

Endemik *Onosma nana* DC.'nin Kimyasal Bileşimi, Antimikrobiyal, Antioksidan ve Enzim İnhibisyon Aktivitesinin Araştırılması

Kadriye ÖZCAN^{1*} , Tuba ACET² 

Öz

Türkçe adı “Emzik otu” olarak bilinen *Onosma* türleri, etnobotanik açıdan oldukça değerlidir. Bu çalışmada, *Onosma nana*'nın toprak üstü ve kök kısımlarının farklı çözücülerle (etanol, metanol ve etil asetat) elde edilen ekstralarının antioksidan, antimikrobiyal, enzim inhibisyon (α -amilaz, α -glukozidaz ve tirozidaz) ve DNA koruyucu aktivitesi ile fenolik bileşen analizinin (HPLC) yapılması amaçlanmıştır. Elde edilen sonuçlara göre, etanol ekstralarının diğer ekstralara nazaran araştırılan özellikler bakımından daha etkin olduğu bulunmuştur. Etanol ekstralarının major fenolik bileşeni rosmarinik asit (kök: 2883.3 $\mu\text{g/g}$ ekstre, toprak üstü: 11187.5 $\mu\text{g/g}$ ekstre) olarak tespit edilmiştir. Sonuç olarak, bitkinin oldukça etkili antimikrobiyal aktiviteye sahip olduğu bulunmuştur (*S. epidermidis* ve *P. vulgaris*: MİK 32 $\mu\text{g/mL}$). Bitkinin DNA koruyucu etkisi ve antimikrobiyal özellikleri ilk defa araştırılmıştır. Bitkinin doğal bir ajan olarak kullanılma potansiyeli olduğu söylenebilir. Bunun yanısıra, tespit edilen aktivitele ilgili çalışmalarla desteklenerek etki mekanizmalarının aydınlatılması ticari önemini anlaşılması bakımından gereklidir.

Anahtar Kelimeler: Antimikrobiyal, Enzim inhibisyon, Antioksidan, Fenolik içerik, *Onosma nana*, HPLC.

Investigation of Chemical Composition, Antimicrobial, Antioxidant and Enzyme Inhibition Activity of Endemic *Onosma nana* DC.

Abstract

Onosma species, known as “Emzik otu” in Turkish, are very valuable in terms of ethnobotany. In this study, it was aimed to analyze the antioxidant, antimicrobial, enzyme inhibition (α -amylase, α -glucosidase and tyrosidase) and DNA protective activities and phenolic compounds (HPLC) of the extracts obtained from the aboveground and root parts of *Onosma nana* with different solvents (ethanol, methanol and ethyl acetate). According to the results obtained, ethanol extracts were found to be more effective than other extracts in terms of the investigated properties. The major phenolic component of ethanol extracts was rosmarinic acid (root: 2883.3 $\mu\text{g/g}$ extract, aboveground: 11187.5 $\mu\text{g/g}$ extract). As a result, the plant was found to have highly effective antimicrobial activity (*S. epidermidis* and *P. vulgaris*: MIC 32 $\mu\text{g/mL}$). The DNA protective effect and antimicrobial properties of the plant have been investigated for the first time. It can be said that the plant has the potential to be used as a natural agent. In addition, it is necessary to elucidate the mechanisms of action by supporting the detected activities with detailed studies in order to understand its commercial importance.

Keywords: Antimicrobial, Enzyme inhibition, Antioxidant, Phenolic content, *Onosma nana*, HPLC.

¹Giresun Üniversitesi, Mühendislik Fakültesi, Genetik ve Biyomühendislik Bölümü, Giresun, Türkiye, kadriye.ozcan@giresun.edu.tr

²Gümüşhane Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Fakültesi, İş Sağlığı ve Güvenliği Bölümü, Gümüşhane, Türkiye, tubaacet@hotmail.com.tr

*Sorumlu Yazar/Corresponding Author

Geliş/Received: 23.04.2024

Kabul/Accepted: 05.06.2024

Yayın/Published: 18.06.2024

1. Giriş

Onosma L. (Lithospermae, Boraginaceae) dünyada 200'ün üzerinde türe sahip oldukça büyük bir cinistir. *Onosma* türleri, Türkiye ve İran başta olmak üzere dünya genelinde yayılış göstermektedirler (Jabbar ve ark., 2022). Türkiye 57'si endemik olmak üzere yaklaşık 105 tür (110 takson) içermektedir ve *Onosma* için önemli bir orijin merkezidir (Güner ve ark., 2012; Koyuncu et al., 2013; Binzet ve ark. 2018). *Onosma* türlerinin etnobotanik açıdan değerli olduğu bilinmektedir (Kumar ve ark., 2013). Yapılan çalışmalarda *Onosma* türlerinin farklı kısımlarının, antioksidan (Sarikurkcu ve ark., 2022), antimikrobiyal (Ahmad ve ark., 2009; Özgen ve ark., 2003; Ünal ve ark., 2023), sakinleştirici (Shilov ve ark., 2022); antiinflamatuvar (Hashemi ve ark., 2021), mide rahatsızlıkları, antitrombotik (Kundaković ve ark., 2006), yara iyileştirici (Çalhan ve Gündoğan, 2019); Alzheimer ve Diyabet (Sarikurkcu ve ark., 2020), enzim inhibitörü (Katanić Stanković ve ark., 2020), anti-tümör (Jabbar, 2021); COVID-19 tedavi edici (Kilinç, 2021) gibi pek çok tıbbi özelliğe sahip olduğu ortaya konmuştur. *Onosma* cinsi bitkilerin sahip oldukları çeşitli fitokimyasallar sayesinde bu biyolojik aktiviteleri sergilediği belirtilmiştir (Kumar ve ark., 2013). *Onosma* türleri ülkemizde geleneksel halk tıbbında da çeşitli şekillerde sıklıkla kullanılmaktadır (Ünal ve ark., 2023). Bu yüzden, *Onosma* türlerinin biyolojik aktivitelerinin ve özellikle doğru kullanım şekillerinin ortaya konulması önem arz etmektedir.

Günümüzde yoğun iş temposu, çevresel kirlilikler, gıda katkı maddeleri vb. artan stres faktörlerine bağlı olarak insan bünyesindeki reaktif oksijen türleri (ROS) artmaktadır (Maldonado ve ark., 2023). Bu da canlılar üzerinde oksidatif bir strese neden olarak, erken yaşlanma, diyabet, alzheimer, kanser ve immün sistem bozuklukları gibi pek çok metabolik hastalıklara sebebiyet vermektedir (Fahmy ve ark., 2024). Bu yüzden, reaktif oksijen türlerini temizleyebilen doğal antioksidan maddelere ihtiyaç duyulmaktadır (Acet ve ark., 2020). Diğer taraftan, patojen mikroorganizmalar günümüzde daha dirençli hale gelmiştir ve bunlarla başa çıkabilmek giderek güçleşmiştir. Kullanılan antibiyotikler de normal insan florasına zarar vererek, pek çok olumsuz etkiye neden olmaktadır (Keeney ve ark., 2014). Bu bakımdan, daha ekonomik, erişilebilir, yeni doğal ürünlerin keşfedilmesi gerekmektedir. Ki, asırlardır yerel halk tıbbında kullanılan bitkiler bu ihtiyacın giderilmesi noktasında bilim insanlarına ilham kaynağı olmaktadır. Literatürde, son yıllarda *Onosma* türleri üzerine kapsamlı çalışmalar olsa da (Wang ve ark., 2024; Zeljković ve ark., 2023; Safavi ve ark., 2023), mevcut araştırma konusu *Onosma nana* DC. (Tavşangözü) türü üzerine yapılmış kısıtlı çalışma bulunmaktadır (Kirkan ve ark., 2023). Türkiye endemiği olarak bilinen *O. nana*, Anadolu'da O. Karadeniz, O. Kızılırmak ve Y. Fırat Bölgeleri ile Akdeniz Bölgesini içine alan geniş bir yayılış alanına sahip olup (Güner ve ark., 2012), bu çalışma ile türün Gümüşhane ilinde yayılış gösteren bitki örnekleri biyokimyasal içerik ve biyolojik aktivite yönünden ilk kez değerlendirilmiştir. Bu bölge,

sahip olduğu iklimsel ve coğrafi özellikler nedeniyle oldukça özeldir ve buradan toplanan bitkilerin farmakolojik özelliklerinin aydınlatılması önem arz etmektedir. Çünkü, bitkiler bu zorlu şartlarda hayatta kalabilmek için sekonder metabolit içeriğini değiştirmektedir (Qaderi ve ark., 2023). Bitki sekonder metabolitleri ve türevlerinin, eski çağlardan beri çok sayıda hastalık ve rahatsızlığın tedavisinde terapötik ajanlar olarak kullanıldığı bilinmektedir (Özcan, 2020; Elshafie ve ark., 2023). Bununla ilişkili olarak, Gümüşhane'den toplanan bitkilerin diğer bölgelere nazaran daha yüksek bir biyolojik aktiviteye sahip olacağı, mevcut çalışmanın hipotezini oluşturmaktadır.

Bu çalışmada, Gümüşhane ilinde etnobotanik açıdan oldukça değerli olan endemik *O. nana* bitkisinin toprak üstü ve kök kısımlarının farklı çözücüler (etanol, metanol ve etil asetat) kullanılarak elde edilmiş olan ekstralarının:

- a- toplam fenolik ve flavonoid içeriğinin,
- b- Antioksidan (ABTS, DPPH) ve antimikrobiyal (MİK) aktivitesinin,
- c- Enzim inhibisyon (α -amilaz, α -glukozidaz ve tirozinaz) aktivitesinin,
- d- DNA koruyucu aktivitesinin,
- e- Fenolik madde içeriğinin (HPLC) aydınlatılması amaçlanmıştır.

2. Materyal ve Metot

2.1. Bitkilerin eldesi

Çalışmada Türkçe adı Tavşangözü olan endemik *O. nana* türüne ait bitki örnekleri kullanılmıştır. Bitkiler çiçeklenme döneminde (Ağustos-2019) 3200 m yükseklikten Gümüşhane ili Kelkit ilçesi sınırları içinde toplanmıştır. Bitkinin TAK1901 koduyla herbaryum kaydı yapılmıştır. Bitkiler doğrudan güneş ışığına maruz bırakılmadan gölgede kurutulmuştur.

2.2. Bitki ekstralarının elde edilmesi

Bitki ekstralarının eldesi için öncelikle kuru bitkilerin kök ve toprak üstü kısımları mekanik öğütücü (Fristsch) kullanılarak toz haline getirilmiştir. Ekstraksiyon etanol, metanol ve etil asetat çözücülerini kullanılarak yapılmıştır. Bu işlem için 5 g bitki kısımları 100 mL çözücü ile 37°C, 125 rpm'de 8 saat muamele edilmiştir. Süre sonunda filtre yardımıyla bitki kısımları süzülmesi ve evaporatör yardımıyla süzüntüden çözücüler uzaklaştırılmıştır. Elde edilen ekstralar çalışmalarda kullanılmak üzere -20°C'de muhafaza edilmiştir (Acet ve ark., 2020).

2.2. Toplam Fenolik ve Flovanoid Tayini

Ekstrelerin toplam fenolik madde içeriği mikropalakalar kullanılarak spektrofotometrik olarak belirlenmiştir. Reaksiyon, ekstre solüsyonu, folin reaktifi ve sodyum karbonat (Na_2CO_3) eklenerek toplamda 250 μL hacimde gerçekleştirilmiştir. Karışım 37 °C'de 2 saat inkübe edildikten sonra 750 nm dalga boyunda mikropalaka okuyucu kullanılarak ölçümü yapılmıştır. Toplam fenolik madde miktarı, gallik asit eşdeğeri (mg GAE/g ekstre) olarak hesaplanmıştır (Bozkır ve ark., 2022).

Ekstrelerin toplam flavonoid içeriğini belirlemek için AlCl_3 (Alüminyum klorür) kolorimetrik yöntemi kullanılmıştır. 30 μL bitki ekstreleri üzerine sırasıyla 80 μL metanol, 6 μL %10'luk alüminyum klorür, 6 μL 1 mol potasyum asetat eklenip hacim saf su 250 μL ye tamamlanmıştır. Karışım oda sıcaklığında ve karanlıkta 30 dakika bekletildikten sonra 415 nm dalga boyunda mikropalaka okuyucu kullanılarak ölçümü yapılmıştır. Sonuçlar kuersetin eşdeğeri (mg QE/g ekstre) olarak hesaplanmıştır (Özcan, 2020).

2.3. Antioksidan aktivite

Ekstrelerin ABTS [(2,2'-azinobis (3-etilbenzotiazolin-6-sülfonik asit)] radikalini süpürme etkinliği Re ve ark. (1998) tarafından geliştirilen yöntem üzerinde değişiklikler yapılarak belirlenmiştir. 80 μL örnek 160 μL ABTS ile muamele edilip 6 dakika beklenmiş ve 750 nm'de spektrofotometrede ölçümü yapılmıştır. Sonuçlar troloks eşdeğeri (mg TE/g ekstre) olarak hesaplanmıştır.

Ekstrelerin DPPH (2,2-difenil-1- pikrilhidrazil) radikalini süpürme etkinliği Brand-Williams ve ark. (1995) tarafından geliştirilen yöntem üzerinde değişiklikler yapılarak belirlenmiştir. 125 μL ekstre çözültisi üzerine 125 μL DPPH eklenmiş ve 45 dakika oda sıcaklığında bekletilerek 490 nm'de ölçüm yapılmıştır. Sonuçlar troloks eşdeğeri (mg TE/g ekstre) olarak hesaplanmıştır.

2.4. Enzim inhibisyonu (α -amilaz, α -glukozidaz ve tirozinaz)

Bitki ekstraktlarının α -glukozidaz inhibisyon etkileri Acet ark. (2020) tarafından modifiye edilen yöntem kullanılarak belirlenmiştir, α -amilaz inhibitör aktivitesinin saptanması için iyot/potasyum iyodür (IKI) yöntemi tercih edilmiştir. Her iki yöntemde de reaksiyonlar 96 kuyucuklu plakalarda test edilmiştir. Absorbans değerleri α -glukozidaz ve α -amilaz enzim inhibisyon aktiviteleri için sırasıyla 400 nm ve 630 nm'de belirlenmiştir. Sonuçlar, her iki yöntem için akarboz eşdeğeri (mmol/g ekstre) olarak ifade edilmiştir.

Tirozinaz inhibe edici aktivite Sarıkürkçü ve Zengin (2020)' deki yöntem kullanılarak belirlenmiştir, substrat olarak L-DOPA kullanılmıştır. Öncelikle 25 µL ekstre, mikropalakada 40 µL tirozinaz solüsyonu ve 100 µL pH 6.8 fosfat tamponu ile karıştırılmıştır. 15 dakika süreyle 25°C'de inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonunda 10 mM, 40 µL L-DOPA ilave edilerek reaksiyon başlatılmıştır. Benzer şekilde, enzim (tirozinaz) çözeltisi içermeyen tüm reaksiyon reaktiflerine numune çözeltisi eklenerek bir kör hazırlanmıştır. Numune ve boş absorbanslar, 25°C'de 10 dakikalık bir inkübasyondan sonra 492 nm'de okunmuştur. Kör numunenin absorbansı numunenin absorbansından çıkarılmış ve tirozinaz inhibe edici aktivite, kojic asit eşdeğerleri olarak ifade edilmiştir.

2.5. Antimikrobiyal aktivite

Bitki ekstralarının antimikrobiyal etkinliği disk difüzyon ve mikrodilüsyon yöntemleri ile belirlenmiştir. Test mikroorganizmaları olarak standart suşlar *Enterococcus faecalis* ATCC 29212, *Bacillus cereus* RSKK 709, *Listeria monocytogenes* ATCC 33090, MRSA ATCC 43300, *Staphylococcus epidermidis* ATCC 12228, *Vibrio parahaemolyticus* ATCC 17802, *Escherichia coli* ATCC 29998, *Proteus vulgaris* ATCC 13315, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Salmonella typhimurium* CCM 5445, *Candida tropicalis* NRLL YB-366 tercih edilmiştir.

Her iki yöntemde ilk olarak mikroorganizmalar Muller-Hinton sıvısında taze kültür olarak hazırlanmış ve 0.5 MacFarland bulanıklığına seyreltilmiştir. Disk difüzyon testinde hazırlanan mikroorganizmalar Müller-Hinton agar yüzeyine inoküle edilmiştir. Sonrasında petri üzerine yerleştirilen disklere 20 µl ekstre (10 mg/mL) uygulanmıştır. 37°C'de 48 saat inkübasyon sonunda diskler çevresinde oluşan zon çapları ölçülmüştür. Mikrodilüsyon testi ekstraların minimum inhibisyon konsantrasyonlarını (MİK değeri) belirlemek için yapılmıştır (CLSI, 2017). İşlem için mikropalakalarda ekstraların seri dilüsyonları yapılmış ve kuyucuklara ilgili mikroorganizmaların inokülasyonu gerçekleştirilmiştir. Mikropalakalar 37°C'de 48 saat inkübasyona bırakılmış ve inkübasyon sonunda mikrobiyal büyümenin olmadığı kuyucuğun konsantrasyonu ekstranın o mikroorganizmaya karşı MİK değeri olarak belirlenmiştir (Özcan, 2019).

2.6. Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi (HPLC) ile Fenolik bileşen analizi

Fenolik bileşen analizi, en yüksek toplam fenolik madde içeriğine sahip olan metanol özütü kullanılarak Acet ve ark. (2020)'a göre gerçekleştirilmiştir. Analizde, gallik asit, prokateşik asit, kateşin, epikateşin, syringic asit, hesperidin, rosmarinic asit, eriodictiol, luteolin, kaemferol, apigenin, kuersetin, rutin, kafeik asit, klorojenik asit, p-kumarik asit, p-hidroksibenzoik asit, benzoik

asit, o-kumarik asit, ferulik asit, cinnamik asit, sinapinik asit ve vanillin fenolik bileşiklerinin miktarları $\mu\text{g/g}$ ekstre olarak verilmiştir.

2.7. DNA koruyucu aktivite

Bitki ekstralarının pUC19 plazmiti üzerine koruyucu aktivitesinin varlığı fenton reaktifi ile %1'lik agaroz jel elektroforezinde belirlenmiştir (Bozkır ve ark., 2022). Sırasıyla deney tüplerine 6 μL ultra saf su, 5 μL yumru örneği, 3 μL pUC19 plazmit DNA ve son olarak 5 μL fenton reaktifi eklenmiştir. 37°C sıcaklıkta 30 dk inkübe edilen karışım yükleme boyasıyla muamele edilmesinin ardından 10 μL elektroforez kuyucuklarına yüklenerek ve 90 Volta 1 saat süreyle yürütülmüştür. Jel UV ışık altında görünür hale getirilerek sonuçlar negatif ve pozitif kontrollere kıyasla değerlendirilmiştir.

2.8. İstatistiksel analizler

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

3. Bulgular ve Tartışma

Çalışmada, Kelkit (Gümüşhane) ilçesinden toplanan *O. nana* kök ve topraküstü kısımlarının üç çözücü ile (etanol, metanol, etil asetat) ekstraksiyonu yapılmıştır. Ekstrelerin toplam fenolik ve flavonoid miktarları spektrofotometrik ölçümlerle belirlenmiş ve sonuçlar Tablo 1'de verilmiştir. Buna göre, toprak üstü etanol ekstresinin fenolik miktarı diğer ekstralardan anlamlı derecede yüksek bulunmuştur. Bununla birlikte toprak üstü etil asetat ekstresinin flavonoid miktarı diğer ekstralere nazaran anlamlı derecede yüksek tespit edilmiştir. Ekstreler arasındaki bu farklılığın çözücünden kaynaklandığı görülmektedir.

Tablo 1. Ekstrelerin toplam fenolik ve flavonoid içerikleri

Bitki kısımları	Ekstreler	Toplam Fenolik (mg GAE/g ekstre)	Toplam Flavonoid (mg QUE/g ekstre)
Toprak üstü	Etanol	35.09±0.31 ^a	20.43±0.85 ^d
	Metanol	34.43±0.09 ^b	23.29±0.98 ^c
	Etil asetat	28.11±0.19 ^c	70.10±0.52 ^a
Kök	Etanol	28.54±0.42 ^c	19.13±0.71 ^d
	Metanol	28.51±0.75 ^c	8.16±0.13 ^e
	Etil asetat	26.86±0.53 ^d	53.87±0.26 ^b

^{a-c}:Her sütunda yer alan verilerin istatistiksel olarak anlamlı derecede farklı ($p<0.05$) olduğunu ifade etmektedir.

Onosma türleri ile yapılan çalışmalarda toplam fenolik ve flavonoid miktarlarının benzer olduğu rapor edilmiştir. Kirkan ve ark., (2023) Niğde civarından topladıkları *O. nana* toprak üstü kısımlarının metanol ekstresinin toplam fenolik içeriğini 44.63 mg GAE/g ekstre, toplam flavonoid içeriğini ise 27.86 mg QUE/g ekstre olarak rapor etmişlerdir. Mevcut çalışmadan elde edilen bulgulardaki minör sapmaların bitkinin yetiştiği koşullardan kaynaklanabileceği düşünülmektedir. Gümüşhane ili Karadeniz-Doğu Anadolu geçiş bölgesinde olması sebebiyle farklı iklimsel koşulları barındırmaktadır. Bu durumun da bitkilerin sekonder metabolizmasını etkilediği düşünülmektedir.

Ekstrelerin antioksidan özellikleri ABTS ve DPPH yöntemi kullanılarak belirlenmiştir. Her iki yöntemde de en yüksek antioksidan özellik kök ve toprak üstü kısımlarının etanol ekstresinde tespit edilmiştir. Aynı bitkinin toprak üstü metanol ekstresinin benzer yöntemler kullanıldığında, istatistiksel olarak farklılık içermediği görülürken (Kirkan ve ark., 2023); tablo 2’de verildiği gibi mevcut çalışmada ABTS ve DPPH sonuçları istatistiksel olarak farklıdır. Bununla birlikte, etanol ekstresinin hem toprak üstü hem de kök kısımlarında daha yüksek olduğu tespit edilmiştir. Kirkan ve ark. (2023) yapmış oldukları çalışmada, *O. nana*’nın DPPH ve ABTS serbest radikalleri süpürme aktivitesi sırasıyla 229,98 ve 243,58 mg TAE/g ekstre olarak bulunmuştur. Diğer taraftan, *O. microcarpum*’un DPPH ve ABTS aktivitesi, 70 ve 130 mg TAE/g ekstre olarak rapor edilmiştir. Buna göre, mevcut çalışmadan elde edilen sonuçların daha düşük kaldığı görülmektedir. Yakın türlerle yapılan çalışmalarda farklı çözücü ve yöntemlerle elde edilen ekstrelerin antioksidan aktiviteler sergilediği rapor edilmiştir (Zeljković ve ark., 2023; Sarıkürkçü ve ark., 2018; Tosun ve ark., 2008).

Tablo 2. Ekstrelerin antioksidan kapasitesi

Bitki kısımları	Ekstreler	ABTS (mg TAE/g extract)	DPPH (mg TAE/g extract)
Toprak üstü	Etanol	78.81±2.84 ^a	20.13±0.22 ^b
	Metanol	47.69±1.76 ^d	16.56±0.05 ^c
	Etil asetat	25.30±2.35 ^e	3.25±0.34 ^f
Kök	Etanol	60.62±1.65 ^b	22.64±0.17 ^a
	Metanol	57.26±1.32 ^c	14.94±0.81 ^d
	Etil asetat	46.78±0.55 ^d	7.76±0.86 ^e

^{a-f}:Her sütunda yer alan verilerin istatistiksel olarak anlamlı derecede farklı ($p<0.05$) olduğunu ifade etmektedir

Antimikrobiyal aktivite disk difüzyon ve mikrodilüsyon yöntemiyle belirlenmiştir. Testte 1 maya, 5 Gram (+) ve 5 Gram (-) bakteri kullanılmıştır. Tablo 3 ve 4' te görüldüğü üzere ekstratlar test organizmalarına karşı etkili bir aktivite sergilemiştir. En etkili sonuçlar toprak üstü ekstratlarında *S. epidermidis* ve *P. vulgaris*'e (32µg/mL) karşı gözlenmiştir (Tablo 4). Ayrıca bitkinin toprak üstü ekstratlarının ökaryotik *C. tropicalis*'e karşı da etkili olduğu tespit edilmiştir. Bitkinin antimikrobiyal aktivitesi ilk defa araştırılmıştır. Elde edilen veriler, bu bitki ekstratlarının etkili bir antimikrobiyal ajan olarak kullanılma potansiyeli olduğunu göstermektedir. Ünal ve ark. (2023) *Onosma halophila* Boiss. & Heldr. üzerine yaptıkları bir çalışmada, bitkinin etanol, metanol, etil asetat ve petrol eteri ekstratlarının 8 mikroorganizmaya karşı MİK değerleri 15.625 ile 125 µg/mL aralığında bulunmuştur. Bununla birlikte, en yüksek antimikrobiyal etkinliğin etil asetat ekstratında *C. parapsilosis*'e karşı olduğu tespit edilmiştir. Yapılan farklı bir çalışmada *O. sericea* and *O. stenoloba* metanol ekstratlarının test edilen sekiz bakteri suşuna karşı antimikrobiyal aktivitesinin MİK 0,25-10 mg/mL aralığında olduğu bildirilmiştir (Stanković ve ark., 2020). Bu bağlamda çalışmamızda kullanılan bitki ekstratlarının yakın türlere kıyasla oldukça etkili antimikrobiyal aktivite sergiledikleri belirlenmiştir. Dolayısı ile bitkinin antimikrobiyal etkinliğinin, yetiştiği koşullar ve ekstraksiyon metodundan kaynaklandığı düşünülmektedir.

Bitki ekstratlarının DNA koruyucu aktivitesi pUC19 plazmidi üzerine fenton reaktifi ile hasar oluşturularak belirlenmiştir. Farklı konsantrasyonlarla (1-5-10-20 ve 40 mg/mL ekstrat) yapılan denemelerde bitki ekstratlarının oluşturulan DNA hasarını iyileştirdiği yönünde bir etkisi saptanmamıştır. Bitkinin DNA koruyucu aktivitesi ilk kez araştırılmıştır. Bununla birlikte *O. sericea* and *O. stenoloba* metanol ekstratlarının ringa balığı sperm DNA (tek zincir)'sı üzerine dozaja bağlı koruyucu aktivite sergilediği rapor edilmiştir (Stanković ve ark., 2020).

Diyabet çağımızın en sık rastlanan hastalıklarından bir tanesidir (Sun ve ark., 2022). Bu rahatsızlığın yönetilmesinde, şeker metabolizmasında anahtar rol oynayan α -amilaz ve α -glukozidaz enzimlerinin inhibisyonu, kan şekerini normal düzeye getirebilmek için, kullanılan uygulamaların başında gelmektedir (Jaradat ve ark., 2022). Bitki ekstratlarının diyabetin kontrolünde anahtar

enzimler olan α -amilaz ve α -glukozidaz inhibisyonu etkisi araştırılmış ve sırasıyla 129.25-179.69 mmol ve 14.65-15.81 mmol aralıklarında olduğu tespit edilmiştir. Literatüre bakıldığında, *Onosma* türlerinin antidiyabetik etkisinin bulunduğu yönünde deliller bulunmaktadır (Sarıkurkcu ve ark., 2020; Kumar ve ark., 2013). Özellikle, *O. nana*'nın metanol ekstresinin α -amilaz ve α -glukozidaz inhibisyon aktivitesinin olduğu rapor edilmiştir (Kirkan ve ark., 2023).

Tirozinaz deride pigmentasyona sebebiyet veren bir enzimdir (Bozkır ve ark., 2022). Dolayısı ile tirozinaz enziminin inhibisyonu melanin üretiminin engellenmesi anlamına gelmektedir. Yani cilt beyazlatma işlemlerinde veya tedavilerinde kullanılabilir ürünlerde kullanılmak için tirozinaz inhibitörü bileşiklere ihtiyaç duyulmaktadır. Bu çalışmada da bitkinin tirozinaz enzim inhibisyon aktivitesi araştırılmış ve kök etil asetat ekstresinin diğer eksterelere nazaran yüksek aktiviteye sahip olduğu ortaya çıkarılmıştır. Yapılan diğer çalışmalarda da, *Onosma* türlerinin tirozinaz aktivitesine sahip olduğu bildirilmiştir (Kirkan ve ark., 2023; Jabbar ve ark., 2022).

Bitkinin daha önce bahsedilen özellikler bakımından en etkili oldukları gözlemlenen kök ve toprak üstü etanol ekstrelerinin fenolik bileşen analizleri HPLC ile 23 standart fenolik bileşen taranarak yapılmıştır. Her iki ekstrede de majör bileşen rosmarinik asit olarak belirlenmiştir. Yapılan diğer çalışmalara bakıldığında, *O. heterophyllum* Griseb. (Özer ve ark., 2018), *O. ambigens* Lacaita (Sarıkürkçü ve ark., 2020) ve *O. pulchra* Riedl'nin de (Sarıkürkçü ve ark., 2020) majör bileşeninin rosmarinik asit olduğu görülmektedir. Ayrıca, bu bitkilerin benzer aktiviteler de sergilediği ortaya konulmuştur. Kirkan ve ark., (2023) *O. nana* metanol ekstresinin majör bileşeninin rosmarinik asit (2846 $\mu\text{g/g}$) olduğunu rapor etmişlerdir. Bu çalışmada ise *O. nana* kök ve toprak üstü etanol ekstrelerinde bulunan rosmarinik asit, sırasıyla 2883,3 ve 11187,5 $\mu\text{g/g}$ olarak bulunmuştur. Ekstrelerde bulunan diğer majör bileşen ise klorojenik asittir. Literatüre bakıldığında, rosmarinik asit ve klorojenik asitin antioksidan, antiinflamatuvar, antikanserojen, antinörodejeneratif, antihipertansif ve antimikrobiyal özellikler sergilediği yönünde çalışmalar mevcuttur (Noor ve ark., 2022; Wang ve ark., 2022). Bu sebeple, tespit edilen aktivitelerin bu majör bileşenlerden kaynaklandığı düşünülmektedir. Diğer taraftan, minör bileşenlerin de söz konusu aktivitelere katkı sağlaması muhtemeldir.

Tablo 3. Ekstrelerin enzim inhibisyon kapasiteleri

Bitki kısımları	Ekstreler	α -amilaz (mmol)	α -glukozidaz (mmol)	Tirozinaz (mg BAE/g extract)
Toprak üstü	Etanol	159.1413±1.34 ^b	15.2313±0.014 ^c	192.90±1.50 ^b
	Metanol	157.2443±2.28 ^c	15.1167±0.023 ^d	194.07±2.67 ^b
	Etil asetat	179.6980±1.34 ^a	15.1597±0.014 ^d	153.90±3.17 ^c
Kök	Etanol	157.0850±0.55 ^c	14.6540±0.009 ^e	225.73±3.34 ^a
	Metanol	154.3970±1.02 ^d	15.5760±0.000 ^b	135.73±2.00 ^d
	Etil asetat	129.2557±2.7 ^e	15.8180±0.018 ^a	135.07±1.67 ^d

^{a-c}:Her sütunda yer alan verilerin istatistiksel olarak anlamlı derecede farklı ($p<0.05$) olduğunu ifade etmektedir

Tablo 4. Ekstrelerin disk difüzyon zon ölçümleri (mm)

Bitki kısımları	Kök			Toprak üstü			Antibiyotik
	Etanol	Metanol	Etil asetat	Etanol	Metanol	Etil asetat	Gentamisin
Ekstreler							
Gram (+)							
<i>E. faecalis</i>	-	-	-	-	-	-	18
<i>B. cereus</i>	10	10	-	10	10	-	25
<i>L.monocytogenes</i>	-	-	-	12	10	-	23
MRSA	-	-	-	-	-	10	25
<i>S. epidermidis</i>	-	-	-	13	12	13	28
Gram (-)							
<i>V.parahaemolyticus</i>	-	-	-	-	-	-	-
<i>E. coli</i>	-	-	10	-	-	-	-
<i>P. vulgaris</i>	10	9	-	12	-	11	-
<i>P. aeruginosa</i>	-	-	-	10	-	10	26
<i>S. typhimurium</i>	-	-	-	-	-	-	28
Maya							
<i>C.tropicalis</i>	-	-	-	-	-	13	-

Tablo 5. Ekstrelerin minimum inhibisyon konsantrasyonları ($\mu\text{g/mL}$)

Bitki kısımları	Kök			Toprak üstü		
	Etanol	Metanol	Etil asetat	Etanol	Metanol	Etil asetat
Ekstre						
Gram (+)						
<i>E. faecalis</i>	-	-	64	-	-	64
<i>B. cereus</i>	128	-	128	128	128	128
<i>L. monocytogenes</i>	-	-	-	64	-	-
MRSA	128	-	-	-	128	-
<i>S.epidermidis</i>	64	128	64	32	32	32
Gram (-)						
<i>V. parahaemolyticus</i>	128	-	128	-	-	128
<i>E. coli</i>	-	-	-	64	-	-
<i>P. vulgaris</i>	64	-	64	32	-	64
<i>P. aeruginasa</i>	64	-	64	-	-	128
Maya						
<i>C. tropicalis</i>	-	-	-	64	-	128

Tablo 6. Kök ve toprak üstü etanol ekstrelerin fenolik bileşenleri

No	Fenolik bileşen ($\mu\text{g/g}$)	Kök	Toprak üstü
1	Gallik asit	te	te
2	Protokateşik asit	78.0	173.3
3	Kateşin	te	te
4	<i>p</i> -hidroksibenzoik asit	1038.4	306.9
5	Klorojenik asit	535.3	627.8
6	Kafeik asit	478.0	393.3
7	Epikateşin	te	te
8	Syringic asit	132.6	23.2
9	Vanilin	50.1	287.6
10	<i>p</i> -koumarik asit	159.5	58.2
11	Ferulik asit	227.1	te
12	Sinapinik asit	te	te
13	Benzoik asit	te	te
14	<i>o</i> -koumarik asit	te	te
15	Rutin	te	te
16	Hesperidin	te	te
17	Rosmarinik asit	2883.3	11187.5
18	Eriodictiol	te	te
19	Cinnamik asit	275.2	77.7
20	Kuersetin	te	te
21	Luteolin	te	150.1
22	Kaempferol	te	te
23	Apigenin	387.6	327.3

*te:tespit edilmedi.

4. Sonuçlar ve Öneriler

Bu çalışmada Gümüşhane ilinden toplanan *O. nana* toprak üstü ve kök kısımlarına ait EtOH, MeOH ve EtOAc ekstralarının antioksidan, antimikrobiyal, enzim inhibisyon ve DNA koruyucu aktiviteleri ile fenolik içeriği aydınlatılmıştır. Bununla birlikte, bitkinin antimikrobiyal aktivitesi ve DNA koruyucu aktivitesi ilk defa rapor edilmiştir. Elde edilen bulgulara göre, etanol ekstralarının diğer ekstralara nazaran daha yüksek aktivitelere sahip olduğu belirlenmiştir. Ayrıca, etanol ekstralarının majör bileşenleri rosmarinik asit ve klorojenik asit olarak bulunmuştur. Genel olarak, bitkinin incelenen biyolojik aktiviteler bakımından kayda değer etkinliğinin olduğu belirlenmiştir. Söz konusu aktivitelerin, bitkinin sahip olduğu fenolik bileşenlerden kaynaklandığı düşünülmektedir. Sonuç olarak, *O. nana*'nın doğal bir antioksidan, antimikrobiyal ve enzim inhibitörü olarak

kullanılma potansiyelinin olduğu söylenebilir. Ancak, söz konusu aktivitelerin ileri çalışmaları da desteklenmesi, farmakolojik kullanımının ortaya çıkarılması bakımından yararlı olacaktır.

Teşekkür

Bu çalışma, Giresun Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri (Proje no: FEN-BAP-A-240222-25) tarafından desteklenmiştir.

Yazarların Katkısı

Tüm yazarlar çalışmaya eşit katkıda bulunmuştur.

Çıkar Çatışması Beyanı

Yazarlar arasında herhangi bir çıkar çatışması bulunmamaktadır.

Araştırma ve Yayın Etiği Beyanı

Yapılan çalışmada araştırma ve yayın etiğine uyulmuştur.

Kaynaklar

- Acet, T., Ozcan, K., and Zengin, G. (2020). An assessment of phenolic profiles, fatty acid compositions, and biological activities of two Helichrysum species: *H. plicatum* and *H. chionophilum*. *Journal of Food Biochemistry*, 44, e13128.
- Ahmad, B., Ali, N., Bashir, S., Choudhary, M.I., Azam, S., and Khan, I. (2009). Parasiticidal, antifungal and antibacterial activities of *Onosma griffithii* Vatke. *African journal of Biotechnology*, 8, 5084-5087.
- Binzet R., Kandemir, I., and Orcan, N. (2018). Numerical taxonomic study of the genus *Onosma* L. (Boraginaceae) from eastern mediterranean region in Turkey. *Pakistan Journal of Botany*, 50(2), 561-573.
- Brand-Williams, W., Cuvelier, M., and Berset, C. (1995). Use of free radical method to evaluate antioxidant activity. *Food Science and Technology*, 28, 25-30.
- Bozkir, B., Acet, T., and Özcan, K. (2022). Investigation of the effects of different extraction methods on some biological activities of *Dactylorhiza romana* subsp. *georgica* (Klinge) Soó ex Renz & Taubenheim. *South African Journal of Botany*, 149, 347-354.
- Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI), (2017). Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; 27th Informational Supplement. CLSI/NCCLS, 27th ed.; Clinical and Laboratory Standards Institute: Wayne, PA, USA.
- Çalhan, D.S., and Gündogan, M. (2019). Evaluation of changes in the biological activity of *Onosma sericeum* Willd (Boraginaceae) based on collection time and extraction solvent, and determination of its mineral and trace element composition. *Journal of the Turkish Chemical Society, Section A: Chemistry*, 6, 355-364.

- Elshafie H.S, Camele I., and Mohamed, A.A. (2023). A Comprehensive Review on the Biological, Agricultural and Pharmaceutical Properties of Secondary Metabolites Based-Plant Origin. *International Journal of Molecular Sciences*, 24(4), 3266.
- Fahmy, N., Fayez, S., Zengin, G., Selvi, S., Uba, A.I, Mollica, A., Bouyahya, A., Andriano, M., Abdelhakim, B., Ponniya, S., Nilofar, N., Lekmine, S., Claudio, F., and Eldahshan, O. (2024). Chemical exploration of different extracts from *Phytolacca americana* leaves and their potential utilization for global health problems: in silico and network pharmacology validation. *Journal of Biomolecular Structure and Dynamics*, DOI: 10.1080/07391102.2024.2308770
- Güner, A., Aslan, S., Ekim, T., Vural, M. ve Babaç, M.T. (2012). Türkiye Bitkileri Listesi (Damarlı Bitkiler). Nezahat Gökyiğit Botanik Bahçesi ve Flora Araştırmaları Derneği Yayınları, 1. Baskı, 234-240.
- Hashemi, M.M. Marjani, M., Poursharifi, N., and Marjani, A. (2021). Effects of *Onosma dichroanthum* Boiss. root extract on AGS human gastric cancer cell-line. *Journal of Basic and Clinical Physiology and Pharmacology*, 33(4), 487-492.
- Jabbar, A.A. (2021). *Onosma mutabilis*: Phytochemical composition, antioxidant, cytotoxicity, and acute oral toxicity. *Food Science Nutrition*, 9, 5755-5764.
- Jaradat, N., Khasati, A., Hawi, M., Hawash, M., Shekfeh, S., Qneibi, M., Eid, A.M., Arar, M. and Qaoud M.T. (2012) Antidiabetic, antioxidant, and anti-obesity effects of phenylthio-ethyl benzoate derivatives, and molecular docking study regarding α -amylase enzyme. *Scientific Reports*, 12, 3108.
- Keeney, K.M., Yurist-Doutsch, S., Arrieta, M., and Finlay, B.B. (2014). Effects of Antibiotics on Human Microbiota and Subsequent Disease. *Annual Review of Microbiology*, 68(1), 217-235.
- Kilinc, N. (2021). Molecular Mechanisms of Possible Action of Naphthoquinones from *Onosma* in the Treatment and Prevention of COVID-19. *Caucasian Journal of Science*, 8, 173-185.
- Kirkan, B., Sarikurkcu, C., Binzet, R. and Tepe, B. (2023). Two *Onosma* Species (*Onosma microcarpum* and *O. nana*) as an Alternative Source of Multifunctional Agents: *Biological and Phytochemical Evaluation*, 13(1), 77.
- Koyuncu, O., Yaylacı, Ö.K., Kurtuluş, Ö., Sezer, O. and Öztürk, D. (2013). A new *Onosma* (Boraginaceae) species from Central Anatolia, Turkey. *Plant Systematics and Evolution*, 299, 1839–1847.
- Kundaković, T., Stanojković, T., Juranić, Z., and Kovačević, N. (2006). Cytotoxicity in vitro of naphthazarin derivatives from *Onosma arenaria*. *Phytotherapy Research*, 20(7), 602-604.
- Maldonado, E., Morales-Pison, S., Urbina, F., and Solari, A. (2023). Aging Hallmarks and the Role of Oxidative Stress, *Antioxidants*, 12(3), 651.
- Noor, S., Mohammad, T., Rub, M. A., Raza, A., Azum, N., Yadav, D. K., Hassan M.I., and Asiri, A.M. (2022). Biomedical features and therapeutic potential of rosmarinic acid. *Archives of Pharmacal Research*, 45(4), 205-228.
- Özcan, K. (2019). Artabel Gölleri (Gümüşhane) Sedimentlerinden İzole Edilen Aktinobakterilerin Antimikrobiyal Madde ve Endüstriyel Önemi Olan Enzimleri Üretim Kapasitelerinin Belirlenmesi. *Journal of Anatolian Environmental and Animal Sciences*, 4(2), 166-173.
- Özcan, K. (2020). Antibacterial, antioxidant and enzyme inhibition activity capacities of *Doronicum macrolepis* (FREYN&SINT): An endemic plant from Turkey. *Saudi Pharmaceutical Journal*, 28(1), 95-100.
- Özcan, T. (2010). Characterization of *Onosma bracteosum* Hausskn. & Bornm. and *Onosma thracicum* Velen. Based on Fatty Acid Compositions and $\hat{\alpha}$ -Tocopherol Contents of the Seed Oils. *European Journal of Biology*, 68(2), 75-83.
- Özer, M.S., Kirkan, B., Sarikurkcu, C., Cengiz, M., Ceylan, O., Atilgan N. and Tepe, B. (2018). *Onosma heterophyllum*: Phenolic composition, enzyme inhibitory and antioxidant activities. *Industrial Crops and Products*, 111, 179–184.
- Özgen, U., Houghton, P.J., Ogundipe, Y., and Coşkun, M. (2003). Antioxidant and antimicrobial activities of *Onosma argentatum* and *Rubia peregrina*. *Fitoterapia*, 74, 682-685.
- Qaderi, M.M., Martel, A.B., and Strugnell, C.A. (2023). Environmental Factors Regulate Plant Secondary Metabolites. *Plants*. 12(3), 447.
- Safavi, F., Moridi Farimani, M., Golalipour, M., and Bayat, H. (2023). In vitro wound healing potential of cyclohexane extract of *Onosma dichroantha* Boiss. based on bioassay-guided fractionation. *Scientific Reports*, 13(1), 5018.
- Sarikurkcu, C., Kirkan, B., Ozer, M.S., Ceylan, O., Atilgan N., Cengiz, M. and Tepe, B. (2018). Chemical characterization and biological activity of *Onosma gigantea* extracts. *Industrial Crops and Products*, 115, 323–329.

- Sarikurkcu, C., Sahinler, S.S., Ceylan, O., and Tepe, B. (2020). *Onosma pulchra*: Phytochemical composition, antioxidant, skin-whitening and anti-diabetic activity. *Industrial Crops and Products*, 154, 112632.
- Sarikurkcu, C., Sahinler, S.S., Ceylan, O., and Tepe, B. (2020). *Onosma ambigens*: Phytochemical composition, antioxidant and enzyme inhibitory activity. *Industrial Crops and Products*, 154, 112651.
- Shilov, S.V., Ustenova, G.O., Kiyekbayeva, L.N., Korotetskiy, I.S., Kudashkina, N.V., Zubenko, N.V., Parenova, R.A., Jumagazyeva, A.B., Iskakbayeva, Z.A., and Kenesheva, S.T. (2022). Component Composition and Biological Activity of Various Extracts of *Onosma gmelinii* (Boraginaceae), *International Journal of Biomaterials*, 4427804.
- Sun, H., Saeedi P., Karuranga, S., Pinkepank, M., Ogurtsova, K., Duncan, B.B., Stein, C., Basit, A., Chan, J.C.N., Mbanya, J.C., Pavkov, M.E., Ramachandaran, A., Wild, S.H., James, S., Herman, W.H., Zhang, P., Bommer, C., Kuo, S., Boyko, E.J. and Magliano, D.J. (2022). IDF Diabetes Atlas: Global, regional and country-level diabetes prevalence estimates for 2021 and projections for 2045. *Diabetes Research and Clinical Practice*, 183, 109119.
- Stanković, J.S.K., Ceylan, R., Zengin, G., Matić, S., Jurić, T., Diuzheva, A., Jeko, J., and Cziáky, Z. (2020). Abdurrahman Aktumsek, Multiple biological activities of two *Onosma* species (*O. sericea* and *O. stenoloba*) and HPLC-MS/MS characterization of their phytochemical composition. *Industrial Crops and Products*, 144, 112053.
- Tosun, A., Küpeli Akkol, E., Bahadır, Ö., Yesilada E. (2008). Evaluation of anti-inflammatory and antinociceptive activities of some *Onosma* L. species growing in Turkey. *Journal of Ethnopharmacology*, 120, 378–381
- Ünal, N., Kahraman, O., Dögen, A., Binzet, R. (2023). Investigation of the Chemical Composition, Antimicrobial, and Antioxidant Activity of Endemic *Onosma halophila* Boiss. & Heldr. *Current Microbiology*, 20,80(8),247.
- Wang, Z., Li, F., Aga, E.B., Liang, X., He, C., Yin, L., and Lv, C. (2024). *Pteroccephalodes hookeri-Onosma hookeri*' decoction protects against LPS-induced pulmonary inflammation via inhibiting TLR4/NF-κB signaling pathway. *Journal of Ethnopharmacology*, 318, 116918.
- Wang, L., Pan, X., Jiang, L., Chu, Y., Gao, S., Jiang, X., Zhang, Y., Chen, Y., Luo, S. and Peng, C. (2022). The biological activity mechanism of chlorogenic acid and its applications in food industry: A review. *Frontiers in Nutrition*, 9, 943911.
- Zeljkić, S.C, Sahinler, S. S., Sarikurkcu, C., Kirkan, B., Binzet, R., and Tarkowski, P. (2023). Exploring the Pharmacological Potential of *Onosma riedliana*: Phenolic Compounds and Their Biological Activities. *Plant Foods for Human Nutrition*, 1-7.