STACHYS MACROSTACHYA (WEND.) BRIQ ÜZERİNDE FARMAKOGNOZİK ARAŞTIRMALAR

Arij HALWANİ

Farmakognozi Ana Bilim Dalı

Tez Danışmanı
Doç. Dr. Esen SEZEN KARAOĞLAN

Yüksek Lisans Tezi-2023

SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
Graduate School of Health Sciences

STACHYS MACROSTACHYA (WEND.) BRIQ ÜZERİNDE FARMAKOGNOZİK ARAŞTIRMALAR

Arij HALWANİ

Farmakognozi Ana Bilim Dalı
Yüksek Lisans Tezi

Tez Danışmanı
Doç. Dr. Esen SEZEN KARAOĞLAN

ERZURUM
2023

İÇİNDEKİLER

İÇİNDEKİLER ..... **I**

TEŞEKKÜR ..... **V**

ÖZET ..... **VI**

ABSTRACT ..... **VII**

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ ..... **VIII**

ŞEKİLLER DİZİNİ ..... **X**

TABLOLAR DİZİNİ ..... **XII**

1. GİRİŞ **1**

2. GENEL BİLGİLER **4**

2.1. Botanik Özellikler 4

2.1.1. Lamiaceae Familyası Botanik Özellikleri 4

2.1.2. *Stachys* Cinsi Botanik Özellikleri 4

2.1.3. *Stachys macrostachya* Botanik Özellikleri 4

2.2. *Stachys* Cinsi Yayılışı 5

2.3. *Stachys* Cinsinin Halk Arasındaki Kullanımı 5

2.4. Biyolojik Aktivite Çalışmaları 7

2.4.1. Antioksidan Aktivite Çalışmaları 7

2.4.2. Antimikrobiyal Aktivite Çalışmaları 10

2.4.3. Antienflamatuvar Aktivite Çalışmaları 13

2.4.4. Antikanser Aktivite Çalışmaları 15

2.4.5. Antidiyabetik Aktivite Çalışmaları 16

2.4.6. Antikolinesteraz Aktivite Çalışmaları 17

2.4.7. Yara İyi Edici Aktivite Çalışmaları 18

2.4.8. Anksiyolitik Aktivite Çalışmaları 18

2.4.9. Hepatoprotektif Aktivite Çalışmaları 20
2.4.10. Antitirozinaz Aktivite Çalışmaları 22
2.4.11. Antiülser Aktivite Çalışmaları 23
2.5. Fitokimyasal Çalışmalar 24
2.5.1. *S. byzantina* 24
2.5.2. *S. sylvatica* 24
2.5.3. *S. pilifera* Benth 24
2.5.4. *S. germanica* L. subsp. *salviifolia* (Ten.) Gams 24
2.5.5. *S. rizeensis* R. Bhattacharjee 24
2.5.6. *S. candida* Bory & Chaubard 25
2.5.7. *S. brachyclada* de Noé ex Coss. 25
2.5.8. *S. ocymastrum* (L.) Briq. 25
2.5.9. *S. glutinosa* L. 25
2.5.10. *S. cretica* ssp. *anatolica* 26
2.5.11. *S. palustris* L. 26
2.5.12. *S. riederi* var. *japonica* (Miq.) 26
2.5.13. *S. lavandulifolia* Vahl. var. *brachydon* Boiss. 26
2.5.14. *S. ionica* 26
2.5.15. *S. spinosa* 26
2.5.16. Bazı *Stachys* türlerinin uçucu yağ bileşenleri 27
2.5.16.1. (-) α-Pinen 27
2.5.16.2. (+) β- Pinen 27
2.5.16.3. (+) Limonen 27
2.5.16.4. Linalol 27
2.5.16.5. Timol 28

2.5.16.6. Karvakrol 28
2.5.16.7. Germakren D 28
2.5.16.8. *β*-Karyofilen 28
2.5.16.9. *α*-Kadinol 29
2.5.16.10. Nonanal 29
2.5.16.11. (2*E*)-Hekzenal 29
2.5.16.12. (*E*)-2-Hekzenal 29
3. MATERYAL VE METOT 30
3.1. Kullanılan Malzemeler ve Bitki Materyali 30
3.2. Ekstraksiyon ve Kolon Kromatografisi Çalışmaları 30
3.3. Yapı Tayini 31
3.4. Antimikrobiyal Etkinin Mikrodilisyon Yöntemi ile Belirlenmesi 32
3.5. Antioksidan Aktivite Tayini 32
3.5.1. Toplam Fenolik Bileşik Miktar Tayini 32
3.5.2. $DPPH^{\bullet}$ Radikali Süpürücü Kapasite Tayini 33
3.5.3. $ABTS^{\bullet+}$ Süpürücü Kapasite Tayini 33
3.6. Tirozinaz Enzim İnhibisyonu Yöntemi 34
4. BULGULAR 35
4.1. İzolasyon Sonuçları 35
4.1.1. Apigenin-7-*O*-*β*-D-(6″-kumaroil)-glukopiranozit (SME) 35
4.2. Antimikrobiyal Aktivite Sonuçlar 53
4.3. Antioksidan Aktivite Sonuçları 53
4.3.1. Toplam Fenolik Bileşik Miktar Tayini Bulguları 53
4.3.2. $DPPH^{\bullet}$ Radikali Süpürme Çalışmalarına Ait Bulgular 54
4.4. Tirozinaz İnhibitör Aktivite Sonuçları 57

5. TARTIŞMA 59

6. SONUÇ VE ÖNERİLER 64

KAYNAKLAR 65

EKLER 81

EK-1. ETİK BİLDİRİM VE İNTİHAL BEYAN FORMU 81

EK-2. ETİK KURUL ONAY FORMU 82

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans tezi olarak sunduğum bu çalışmanın her aşamasında bana destek olan danışman hocam Doç. Dr. Esen SEZEN KARAOĞLAN'a en derin saygı ve şükranlarımı sunarım.

Tez kapsamında NMR spektrumlarının alınmasında destek olan Prof. Dr. Cavit KAZAZ'a, antimikrobiyal araştırmalarda yardımcı olan Doç. Öğr. Hayrunisa HANCI'ya, antioksadan çalışmalara yardım eden Dr. Öğr. Üyesi Handan Gökben SEVİNDİK'e ve her konuda destek veren aileme sonsuz teşekkür ederim.

Arij HALWANİ

ÖZET

Stachys macrostachya (Wend.) Briq Üzerinde Farmakognozik Araştırmalar

Amaç: Bu çalışmanın amacı *Stachys macrostachya* (Wend.) Briq. toprak üstü kısımlarının farklı ekstrelerinin ve bu bitkiden izole edilmiş apigenin-7-*O*-*β*-D-(6″-kumaroil)-glukopiranozit'in (SME) antioksidan, antimikrobiyal ve tirozinaz inhibisyon aktivitelerini araştırmaktır.

Materyal ve Metot: SME bileşiği kromatografik yöntemlerle izole edilerek yapısı spektrofotometrik yöntemlerle aydınlatılmıştır. Ekstrelerin ve SME bileşiğinin antioksidan aktivitesi toplam fenolik içerik, $DPPH^{\bullet}$ ve $ABTS^{\bullet+}$ radikallerinin inhibisyonu yöntemleriyle, antimikrobiyal aktivitesi mikrodilüsyon yöntemiyle, tirozinaz inhibitör etkisi ise mushroom tirozinaz yöntemiyle araştırılmıştır.

Bulgular: Etil asetat ekstresinden apigenin-7-*O*-*β*-D-(6″-kumaroil)-glukopiranozit (SME) izole edilmiştir. *Staphylococcus aureus* ve *Enterococcus faecalis* üzerine en yüksek etkiyi metanol ve su ekstresi göstermiştir. Etil asetat ekstresi toplam fenolik bileşik miktar tayini (132.59 ± 0.115 µg GAE/mg ekstre), $DPPH^{\bullet}$ radikali süpürme aktivitesi (51.3 ± 0.121 µg/ml) ve $ABTS^{\bullet+}$ radikali süpürme kapasite (99.2 ± 0.297 µg/ml) tayinlerine göre en etkili çıkmıştır. Etil asetat ekstresi % 42.9 ve SME ise IC_{50} 350.99 ± 1.8 µg/ml değerinde tirozinaz inhibitör etki göstermiştir.

Sonuç: Çıkan sonuçlara göre *S. macrostachya* ileride yapılabilecek antioksidan ve antimikrobiyal çalışmalara yol gösterebilir.

Anahtar Kelimeler: Antimikrobiyal aktivite, antioksidan aktivite, *Stachys macrostachya*, tirozinaz inhibitör etki

ABSTRACT

Pharmacognostical Studies on *Stachys macrostachya* (Wend.) Briq

Aim: The aim of this study is to investigate the antioxidant, antimicrobial and tyrosinase inhibition activities of different extracts of the aerial parts of *Stachys macrostachya* (Wend.) Briq. and isolated apigenin-7-*O*-*β*-(6″-coumaroyl)-glucopyranoside (SME).

Material and Method: SME was isolated by chromatographic methods and its structure was elucidated by spectrophotometric methods. The antioxidant activity of the extracts and SME compound was investigated by total phenolic content, inhibition of $DPPH^{\bullet}$ and $ABTS^{\bullet+}$ radicals, antimicrobial activity was investigated by microdilution method, and tyrosinase inhibitory effect was investigated by mushroom tyrosinase method.

Results: Apigenin-7-*O*-*β*-D-(6″-coumaroyl)-glucopyranoside (SME) was isolated from the ethyl acetate extract. Methanol and water extracts showed the highest effect on *Staphylococcus aureus* and *Enterococcus faecalis*. Ethyl acetate extract was the most effective according to total phenolic content (132.59 ± 0.115 µg GAE/mg extract), $DPPH^{\bullet}$ radical scavenging activity (51.3 ± 0.121 µg/ml) and $ABTS^{\bullet+}$ radical scavenging capacity (99.2 ± 0.297 µg/ml) assays. Tyrosinase inhibitory effect of ethyl acetate extract was % 42.9 and IC_{50} of SME was 350.99 ± 1.8 µg/ml.

Conclusion: According to the results, *S. macrostachya* may guide future antioxidant and antimicrobial studies.

Key Words: Antimicrobial activity, antioxidant activity, *Stachys macrostachya*, tyrosinase inhibitory effect

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

$ABTS^{\bullet+}$: 2,2'-azino-bis(3-etilbenztiyazolin-6-sülfonik asit)

BHT : Bütil hidroksitoluen

CFU : Colony forming unit

COSY : İki dimensiyonlu ^{1}H korelasyon spektroskopisi

^{13}C-NMR : ^{13}C nükleer manyetik rezonans

d : Dublet

δ : Delta

DMSO : Dimetilsülfoksit

DMSO-d_6 : Dötero dimetilsülfoksit

$DPPH^{\bullet}$: 2,2-difenil-1-pikrilhidrazil

FCR : Folin-Ciocalteu reaktifi

GAE : Gallik asit eşdeğeri

gs : Geniş singlet

HMBC : Heteronuclear multiple bond correlation

HMQC : Heteronuclear multiple quantum correlation

HPLC : Yüksek basınç sıvı kromatografisi

^{1}H-NMR : ^{1}H Nükleer manyetik rezonans

Hz : Hertz

IC_{50} : %50 inhibitör sağlayan konsantrasyonu

İTK : İnce tabaka koromatografisi

J : Etkileşme sabiti

L-DOPA : 3,4-dihidroksil-L-fenilalanin

m : Multiplet

µg : Mikrogram

MHz : Megahertz

MİK : Minimum inhibitör konsantrasyonu

nm : Nanometre

NMR : Nükleer manyetik rezonans

ppm : Milyonda parça

Q-TOF : Kuadrupol uçuş zamanlı kütle spektrometre

s : Singlet

UV : Ultraviyole

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil No **Sayfa No**

Şekil 4.1. Apigenin-7-*O*-*β*-(6″-kumaroil)-glukopiranozit (SME) molekül formülü 35

Şekil 4.2. SME ^{1}H-NMR (400 *MHz*) Spektrumu (DMSO-d_6) 38

Şekil 4.3. SME ^{1}H-NMR (400 *MHz*) Spektrumu (DMSO-d_6) 39

Şekil 4.4. SME ^{13}C-NMR (100 *MHz*) Spektrumu (DMSO-d_6) 40

Şekil 4.5. SME ^{13}C-NMR (100 *MHz*) Spektrumu (DMSO-d_6) 41

Şekil 4.6. SME COSY (400 *MHz*) Spektrumu (DMSO-d_6) 42

Şekil 4.7. SME COSY (400 *MHz*) Spektrumu (DMSO-d_6) 43

Şekil 4.8. SME COSY (400 *MHz*) Spektrumu (DMSO-d_6) 44

Şekil 4.9. SME HMQC Spektrumu (DMSO-d_6) 45

Şekil 4.10. SME HMQC Spektrumu (DMSO-d_6) 46

Şekil 4.11. SME HMQC Spektrumu (DMSO-d_6) 47

Şekil 4.12. SME HMQC Spektrumu (DMSO-d_6) 48

Şekil 4.13. SME HMQC Spektrumu (DMSO-d_6) 49

Şekil 4.14. SME HMBC Spektrumu (DMSO-d_6)..... 50

Şekil 4.15. SME HMBC Spektrumu (DMSO-d_6)..... 51

Şekil 4.16. SME Q-TOF spektrumu 52

Şekil 4.17. Gallik asit standart grafiği 54

Şekil 4.18. Troloksun konsantrasyon-% inhibisyon grafiği 55

Şekil 4.19. 50 µg/ml konsantrasyonda test maddelerinin DPPH$^{\bullet}$ serbest radikali süpürücü kapasiteleri 55

Şekil 4.20. Troloksun konsantrasyon-% inhibisyon grafiği 56

Şekil 4.21. 50 µg/ml konsantrasyonda test maddelerinin ABTS$^{\bullet+}$ radikali süpürme kapasiteleri 57

Şekil 4.22. Ekstrelerin 400 µg/ml konsantrasyonda tirozinaz enzim inhibitör etkisi 58

TABLOLAR DİZİNİ

Sayfa No **Tablo No**

Tablo 3.1. Ekstraksiyon, izolasyon ve aktivite çalışmalarında kullanılan kimyasallar . 30

Tablo 4.1. Apigenin-7-*O*-*β*-D-(6″-kumaroil)-glukopiranozit (SME) ^{13}C-NMR, ^{1}H-NMR spektrum değerleri 36

Tablo 4.2. Test maddelerinin MİK değerleri (µg/ml) 53

Tablo 4.3. Test maddelerinin toplam fenolik bileşik içerikleri 54

Tablo 4.4. Test maddelerinin DPPH$^{\bullet}$ serbest radikali süpürücü kapasiteleri 56

Tablo 4.5. Test maddelerinin ABTS$^{\bullet+}$ katyon radikali süpürme kapasiteleri 57

1. GİRİŞ

60.000 yıldan fazla bir süredir insanlar tıbbi bitkileri çeşitli hastalıkların tedavisi için kullanmışlardır. MÖ 2730-3000'de Çin imparatoru Shen Nung, MÖ 1500'de Eski Mısırlılar ve MS 1500'de Araplar gibi farklı kültürlerin çağlar boyunca bitkisel ilaçları kullandığı kayıtlıdır. Hipokrat'ın *Materia Medica*'sı, Ebers Papirüs'ün *Mısır Farmakopesi* gibi pek çok kaynakta tıbbi bitkilerin tanımları, toplama yöntemleri, etkileri ve farklı dillerdeki adlarından bahsedilmiştir. Orta çağdaki diğer kaynaklar arasında; İbni Sina'nın *Canon Medicinae*'si ve İbn al-Baitar'ın *Liber Magnae Collectionis Simplicum Alimentorum et Medicamentorum*'u bulunmaktadır. Birçok gezginin seyahatleri, Asya, Avrupa, Hindistan ve Amerika'nın farklı coğrafi bölgeleri arasında bitkisel ilaç deneyimlerinin yayılmasına ve değiş tokuşuna yardımcı olmuştur (Gossell-Williams ve ark., 2006; Sewell ve ark., 2014).

Bitkisel ilaçların kullanımlarının daha kolay olması, doktora gitmeden alınabilmesi, maliyetinin düşük olması, bazı kırsal alanlarda gelişmiş sağlık tesislerinin olmaması, yanlış olmasına rağmen bitkisel ilaçların güvenli olduğuna inanılması ve bitkilerin toksisitesi hakkındaki bilgilerin yetersizliği birçok insanın hala sentetik ilaçlar yerine bitkisel ilaçları tercih etmesine neden olmaktadır (Pal ve ark., 2003).

Günümüzde atropin (*Atropa belladonna*), morfin ve kodein (*Papaver somniferum*), aspirin (*Salix*), digoksin (*Digitalis* spp.), paklitaksel (*Taxus brevifolia*), vinkristin ve vinblastin (*Catharanthus roseus*) gibi bitkisel kaynaklı birçok ilaç bulunmaktadır (Pal ve ark., 2003; Rates ve ark., 2001; Greenwell ve ark., 2015).

Serbest radikaller kanser, enflamasyon, kalp hastalıkları gibi birçok hastalığın başlıca nedenlerinden biridir ve bunlar vücudun oksidatif stres ile aşırı yüklenmesiyle oluşur (Burton ve ark., 2011). Bitkiler, fenoller gibi antioksidan içerikleri bakımından zengin kaynaklardır. *Ocimum sanctum, Piper cubeba, Allium sativum, Terminalia*

bellerica ve *Camellia sinensis* gibi birçok bitkinin antioksidan aktivite sergilediği kayıtlıdır (Khalaf ve ark., 2008). Bitkilerin antioksidan aktivitesi $DPPH^{\bullet}$, $ABTS^{\bullet+}$, TRAP (Toplam reaktif antioksidan potansiyeli), toplam fenolik içerik (TPC) ve metal şelasyon kapasitesi gibi yöntemlerle test edilmektedir (Antolovich ve ark., 2002; Shahidi ve ark., 2015).

Uzun yıllardır insanların enfeksiyonları tedavi etmek için bitkisel ilaçlar kullandığı ve geleneksel tıpta kullanılan birçok bitkinin belirli hastalıklara karşı tedavi edici etkiye sahip olduğu kayıtlıdır. İdrar yolu enfeksiyonlarını tedavi etmek için *Arctostaphylos uva-ursi* ve *Vaccinium macrocarpon*'un halk arasında kullanımı buna örnektir. Antibiyotik direnci ciddi bir sorun olması nedeniyle yeni antibiyotiklere ihtiyaç duyulmaktadır (Mothana ve ark., 2005; Rios ve ark., 2005). Bitkinin antimikrobiyal aktivitesini değerlendirmenin *in vitro* antimikrobiyal duyarlılık testi (Antimikrobiyal duyarlılık testi AST), agar disk difüzyon testi, agar kuyusu difüzyon testi, zehirli gıda tekniği (antifungal aktivite için), spor çimlenme testi, broth mikrodilüsyon, broth makrodilüsyon testi, biyootografi, agar difüzyon veya kontak biyootografi (İTK kullanarak), daldırma veya agar bindirme biyootografi ve doğrudan biyootografi (İTK kullanarak) gibi farklı yolları vardır (Das ve ark., 2010).

Tirozinaz, cilde tonunu veren ve onu UV radyasyonundan koruyan melanin üreten melanogenez sürecinden sorumlu olan bir enzimdir, aşırı melanin üretimi ciltte istenmeyen pigmentasyon ve meyvelerin hasat sonrası renginin değişmesine neden olmakta, bu nedenle tirozinaz inhibitörleri gıda endüstrisi ve kozmetik alanlarında büyük ilgi görmektedir (M Casanola-Martin ve ark., 2014; Masuda ve ark., 2005).

Lamiaceae önemli tıbbi bitkilerin bulunduğu büyük bir familyadır. Geçmişten beri bu familyanın türleri tatlandırıcı, gıda koruyucu ve tıbbi etkilerinden dolayı kullanılmaktadır. Familyadaki türler çok farklı çeşitlilikte biyoaktif bileşikler

içermektedir. Antibakteriyel, antioksidan, antienflamatuar, antimikrobiyal, antiviral ve antikanser gibi aktivitelere sahip olan bu bitkilerin etkilerinin içeriğindeki çeşitli sekonder bileşiklerden kaynaklandığı düşünülmektedir (Carović-Stanko ve ark., 2016).

Stachys cinsi, Lamiaceae (Labiateae) familyasına aittir ve yaklaşık 300 tür içermektedir. Bu cins Akdeniz, Asya, Amerika ve Güney Afrika'nın ılıman bölgelerinde yaygındır (Tomou ve ark., 2020). Çoğu *Stachys* türü antimikrobiyal, antioksidan ve sitotoksik aktivite gibi çeşitli biyolojik aktiviteler göstermekle birlikte geleneksel tıpta büzücü, yara iyileştirici, ishal önleyici, nefrit önleyici ve iltihap önleyici olarak kayıtlıdır. *Stachys* türlerinin iridoitler, flavonoitler, fenolik asitler ve diterpen gibi sekonder metabolitler içerdiği bildirilmiştir (Tundis ve ark., 2014).

Stachys macrostachya (Wend.) Briq, *Stachys* cinsine ait bir türdür. Kafkasya, İran, Azerbaycan'da bulunur. Türkiye'de ise Kuzeydoğu ve Doğu Anadolu'da yer almaktadır (TÜBİVES, 2022). Gözlemlediğimiz kadarıyla *S. macrostachya* üzerinde çok fazla literatür kaydı bulunmamaktadır. Bu çalışmada bu türün ve izole edilen major bileşiğinin antimikrobiyal, antioksidan, tirozinaz inhibisyonu aktiviteleri araştırılmıştır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Botanik Özellikler

2.1.1. Lamiaceae Familyası Botanik Özellikleri

Lamiaceae familyasına ait bitkilerin bazı ortak özellikleri vardır; dörtgen gövdeli, yapraklar oppozit, dekussat ve pek çok salgı bezine sahiptir. Çiçekler zigomorfik, bilateral simetriktir, iki ayrı dudaklı, 4 stamene sahiptir ve iki erimiş karpelden oluşan ovaryum her karpel iki tek tohumlu lokulusa bölünmüştür (Rattray ve ark., 2021; Nassar ve ark., 2013; Halmschlag ve ark., 2022).

2.1.2. *Stachys* Cinsi Botanik Özellikleri

Stachys türleri genellikle bir veya çok yıllık otsu veya çalılardır, genellikle kalın yumrulu bir yer altı kısmı ve yüksekliği 1 metreyi geçmeyen dörtgen gövdelidir. Yapraklar oppozit ve dekussattır, petiol yoktur veya iyi gelişmiştir, uçları lineer ila ovattır. Çiçekler vertisillat, dört ila çok arasında değişir ve çiçek infloresensi terminal spikaya benzeridir. Çiçeğin kaliksi 5 loplu, tüpleri tubular kampanulat şeklindedir. Korolla iki dudaklı (balbitat); üst dudak düz veya örtülüdür ve genellikle tüylüdür, alt dudak ise tüysüz ila tüylüdür ve 3 ilmeklidir, 4 stamene sahiptir ve 4 ovülü tutan 2 karpelli üst durumlu (hipogin) bir ovaryum vardır (Tomou ve ark., 2020; Nelson, 1981).

2.1.3. *Stachys macrostachya* Botanik Özellikleri

Gövde düz dik, 30-60 cm, genellikle dalsızdır, ancak nadiren 1-2 dalı olabilir, yoğun ila seyrek tüylüdür. Taban yaprakları yaklaşık 3-10 X 1-2.8 cm'dir, yaprak şekli oblong-lanseolat, açık bir şekilde krenat, ucu obtus ila akut ancak balta kordat, lamina 5-11 X 1.5-2.5 cm ve yaprak sapı 3.5-9 cm'dir. Alttaki bir ila iki çift çiçek yaprağı kısa yaprak saplarına (petiol) sahiptir veya sapsız (subsessil), krenat serrat, vertisillasterlerden daha uzun, üsttekiler sapsız (sessil), alttakilerden daha kısa, bütün, brakte benzeri ve eşit kalikslidir. Vertisillasterler 12-16 çiçekli, alttaki 1-2 çiçek uzaktır, 1.5-10 cm aralıklı.

Brakteoller çoktur, 3-12 mm, lanseolat, otsu ve mukronattır. Kaliks 12-15 mm, üçgen-subulat. Korolla'nın rengi morumsu pembe ve 17-20 mm'dir (Davis ve ark., 1982, s.261-261).

2.2. *Stachys* Cinsi Yayılışı

Stachys L. (Woundwort), Lamiaceae (Labiatae) familyasına aittir ve yaklaşık 300 tür içeren bu ailenin en büyük cinslerinden biridir. *Stachys* türleri, başlıca Akdeniz'in ılıman bölgelerinde, ardından ikinci olarak Güneybatı Asya'da ve daha düşük ölçüde Kuzey ve Güney Amerika ile Güney Afrika'da yetişir (Bilušić Vundać, 2019). Türkiye'de yaklaşık 92 türe sahip olduğundan, *Stachys* çeşitliliği açısından bir merkez olarak kabul edilmektedir. *Stachys* türleri ormanlar, sulak yerler, kireçtaşı, kayalık yerler, akarsu kenarları ve deniz kumları gibi farklı habitatlarda büyüyebilir. Türkiye'de farklı *Stachys* türleri için "kara çay, deli çay, dağ çayı ve tüylü çay" gibi yöresel isimler mevcut olup bazıları tıbbi olarak kullanılmaktadır (Güner ve ark., 2021).

2.3. *Stachys* Cinsinin Halk Arasındaki Kullanımı

Stachys türlerinin, anti-inflamatuar, anti-oksidan, anti-kanser, anti-malaryal, anti-spazmodik ve anti-romatoit aktiviteler (Bahadori ve ark., 2020a) gibi çok çeşitli biyolojik aktivitelere sahip olduğu ve yüzyıllardır halk arasında kullanıldığı kayıtlıdır. En çok enfeksiyon, soğuk algınlığı, inflamasyon, mide-bağırsak rahatsızlıkları, ülser, cilt rahatsızlıkları ve yaraları, genital tümörler, astım ve anksiyete için kullanıldığı bilinmektedir (Tomou ve ark., 2020; Bahadori ve ark., 2020a; Venditti ve ark., 2017). *Stachys* türlerinin yapraklarından veya toprak üstü kısımlarından yapılan çayların spazm giderici, yatıştırıcı, emenagog ve idrar söktürücü olduğu bilinmektedir (Venditti ve ark., 2017). *S. inflata* Benth'in toprak üstü kısımlarının özü, İran'da inflamasyon, romatoit, enfeksiyon ve astım vakalarında (Maleki ve ark., 2001), *S. lavandulifolia* Vahl'ın kardiyotonik, karminatif, kaygı giderici, yatıştırıcı, romatizma, hazımsızlık ve baş ağrısı

tedavisinde (Ghasemi ve ark., 2013), *S. byzantina*'nın toprak üstü kısmının enfeksiyonlar ve enfekte yaralar, astım, kanser ülserleri, dizanteri, epilepsi, soğuk algınlığı, nöropati, romatizmal bozukluklar ve sindirim bozukluklarında kullanıldığı kayıtlıdır (Bahadori ve ark., 2020a). *S. recta* yaraların iyileşmesini destekleyici ve büzücü olarak, Fransa'da nazofaringeal nezle, ateş ve epilepsi tedavisinde, kurutulmuş toprak üstü kısımları ise Avrupa'da histeri ve epilepsiye karşı kullanılmıştır (Chalchat ve ark., 2000). *S. sylvatica* yara iyileşmesi için kullanılımaktadır ve antienflamatuvar, antispazmodik, diüretik, emenagog ve tonik gibi birçok özelliği bulunmaktadır. Tüm bu aktivitelere ek olarak, polikistik over sendromu tedavisi için bitki terapistleri tarafından toprak üstü kısımları önerilmektedir (Alizadeh ve ark., 2020). *S. japonica*, Japonya, Çin ve Rusya'da geniş çapta yayılmıştır ve Çin halk tıbbında dizanteri larenjiti ve diğer birçok hastalığın tedavisi için kullanılmaktadır (Wang ve ark., 2020). Ayrıca *S. riederi* var. *japonica* (Miq.) Japonya, Çin ve Rusya'da da yetişen Çin tıbbında dizanteri, tonsilit ve boğaz ağrısı tedavisinde, Kore'de cilt hastalıkları, öksürük ve kanama tedavisinde kullanılmaktadır (Quan ve ark., 2018). *S. sieboldii* Tibet ve Çin geleneksel tıbbında tüberküloz, yaşlılık demansı, hipertansiyon ve iskemik felç tedavisinde uzun süredir kullanılan ve toksisitesi olmadığı düşünülen bir ilaçtır (Slobodianiuk ve ark., 2021a). *S. ehrenbergii* yaprakları Lübnan'da farenjit, larenjit, astım ve artriti tedavi etmek için kullanılmaktadır. Ayrıca Lübnan'da *S. nivea*'nın toprak üstü kısımları ayak ağrısının tedavisinde ve aynı zamanda laksatif olarak kullanılmaktadır (Dawra ve ark., 2022). *S. palustris* geleneksel olarak emetik, antispazmodik, ekspektoran, antiseptik, yara iyi edici, sedatif ve hemostatik ajan olarak kullanılmaktadır. Ek olarak *S. palustris*'in eklem ağrıları, gut ve krampların tedavisinde, iç ve dış kanamalara karşı da kullanıldığı bilinmektedir (Venditti ve ark., 2017).

2.4. Biyolojik Aktivite Çalışmaları

2.4.1. Antioksidan Aktivite Çalışmaları

Bazı *Stachys* türleri (*S. beckeana, S. plumosa, S. alpina* ssp. *dinarica* ve *S. anisochila*) üzerinde yapılan bir çalışmada, çiçekli toprak üstü kısımlarının metanol ekstreleri araştırılmıştır. *S. plumosa* dışında, test edilen tüm türler (IC_{50} < 50 µg/ml) yüksek bir anti-DPPH• aktivite sergilemiştir. Tüm ekstreler için 6.25 ila 50 µg/ml aralığındaki konsantrasyonlarda hidroksil radikal süpürme aktivitesinin % 40'ın üzerinde olduğu gözlenmiştir (*S. beckeana* (% 64.97), *S. alpina* ssp. *dinarica* (% 50.94) ve *S. anisochila* (% 50.22)). 100 µg/ml'de *S. plumosa* % 60.67 değerinde aktivite göstermiştir. 12.5 ila 250.0 µg/ml arasında değişen konsantrasyonlarda lipit peroksidasyonu testinde IC_{50} değerleri *S. beckeana* ve *S. alpina* ssp. *dinarica* için sırasıyla 25.07 ve 49.00 µg/ml bulunmuştur, ancak *S. anisochila* ve *S. plumosa*'nın IC_{50} değerleri standart olarak kullanılan kersetine kıyasla (IC_{50} = 0.75 µg/ml) % 50 lipit peroksidaz inhibisyonuna ulaşmamıştır (Kukic ve ark., 2006). Dokuz *Stachys* türünün toprak üstü kısımları antioksidan aktivite ve toplam fenolik içerikleri açısından FRAP (demir iyonu indirgeyici antioksidan gücü) ve Folin-Ciocalteu yöntemleri kullanılarak test edilmiştir. *S. persica* Gmel. ve *S. fruticulosa* M.B. metanol ekstreleri sırasıyla 61.42 ve 62.02 mmol FeII/100g ve toplam fenolik içerik sırasıyla 3294.96 ve 4450.36 mg gallik asit/100 g ile en yüksek antioksidan aktiviteyi sergilemiştir (Khanavi ve ark., 2009). Başka bir çalışmada yedi *Stachys* türünün metanol, etanol ve diklorometan ekstreleri, lipit peroksidaz, DPPH• ve ksantin oksidaz analizleri kullanılarak test edilmiştir. Ekstreler, lipit peroksidasyonunu veya ksantin oksidazı inhibe etmemiş, ancak DPPH• süpürme üzerinde aktivite göstermiştir. Polar ekstrelerin nonpolarlardan daha yüksek aktiviteye sahip olduğu ve metanol ekstrelerinin en aktif olduğu tespit edilmiştir. *S. recta* subsp. *recta* ve *S. palustris*'in metanol ekstrelerinin referans olarak kullanılan rutinden daha etkili olduğu

gözlenmiştir (IC_{50} değerleri rutin (3.01 µg/ml), *S. recta* subsp. *recta* (1.96 µg/ml) ve *S. palustris* (2.67 µg/ml)) (Vundać ve ark., 2007). *S. officinalis* yaprakları $ABTS^{\bullet+}$ ve $DPPH^{\bullet}$ analizleri kullanılarak test edilmiştir. Metanol ekstresi iyi bir radikal süpürme aktivitesi göstermiştir. Düşük bir fenolik içeriğe sahip aseton ekstresinin de etkili olduğu gözlenmiştir (Šliumpaitė ve ark., 2013). *S. inflata*'nın metanol ekstresi (polar ve nonpolar altfraksiyonları) ve uçucu yağı, farklı yöntemler kullanılarak antioksidan aktivite açısından test edilmiştir. $DPPH^{\bullet}$ testinde polar fraksiyonun IC_{50} değeri 89.50 µg/ml olarak gözlenirken, nonpolar fraksiyon önemli bir antioksidan aktivite göstermemiştir (% 20 civarında). *β*-karoten/linoleik asit testinde standart olarak kullanılan BHT (bütillenmiş hidroksitoluen)'ye kıyasla (% 87.59) nonpolar fraksiyon (% 77.08) en yüksek inhibisyonu gösterirken, polar fraksiyon ve uçucu yağ oldukça düşük aktivite göstermiştir. Toplam fenolik içeriğin polar fraksiyon için % 5.4 ve nonpolar için % 2.8 (w/w) olduğu gözlenmiştir (Ebrahimabadi ve ark., 2010). *S. lavandulifolia* metanol ekstresi, toplam fenolik, flavonoit ve antioksidan aktivitesi açısından test edilmiştir. Toplam fenolik bileşik miktarı 16.59 GAE/g kuru drog; flavonit miktarı ise 4.48 kersetin eşdeğeri/g kuru drog olarak bulunmuştur. $DPPH^{\bullet}$ testinde, ekstre BHT (7.7 µg/ml) ile kıyaslandığında güçlü bir antioksidan aktivite göstermiştir (2.07 µg/ml). FRAP sonuçlarına göre, ekstrenin BHT'den daha düşük bir indirgeme aktivitesine sahip olduğu gözlenmiştir. Ayrıca ekstrenin TAC (toplam antioksidan aktivite) değeri 14.61 mg BHT eşdeğeri/g kuru maddedir (Khoigani ve ark., 2017). *S. lavandulifolia* toprak üstü kısmının metanol, etil asetat, su ve hekzan ekstrelerinin antioksidan aktiviteleri analiz edilmiştir. Toplam fenolik miktarı en yüksek metanol ekstresinde gözlenmiş, ardından sırasıyla etil asetat, su ve hekzan (0.166, 0.151, 0.068 ve 0.025 mg gallik asit eşdeğeri/mg ekstre) ekstreleri olarak belirlenmiştir. $DPPH^{\bullet}$ ve $ABTS^{\bullet+}$ deneylerinde en yüksek aktiviteyi metanol ve sonra sırasıyla etil asetat, su ve hekzan göstermiştir. FRAP testinde de sırasıyla metanol,

etil asetat, su ve hekzan ekstreleri (sırasıyla 11.5, 8.6, 5.33 ve 3.69 mM gallik asit eşdeğeri/mg ekstrakt) etkili bulunmuştur. Son olarak mikrozomal lipit peroksidasyon inhibisyon testinde en yüksek etkiyi etil asetat ekstresi (IC_{50} 32.03 µg), ardından sırasıyla metanol, su, hekzan ekstreleri (64.71 µg, 289.4 µg ve 312.66 µg) göstermiştir (Ghaffari ve ark., 2012). *S. affinis* yumruları etanol kullanılarak ekstre edilmiş ardından farklı çözücü ile alt fraksiyonlarına (su, etil asetat, *n*-butanol, diklorometan ve *n*-hekzan) ayrılmış ve farklı teknikler ile antioksidan aktiviteleri araştırılmıştır. Toplam fenolik miktarı testinde etil asetat ve *n*-butanol fraksiyonları sırasıyla 587.33 ve 343.61 mg tannik asit eşdeğeri/g olarak bulunmuştur. Etil asetat ekstresi (60 mg kersetin eşdeğeri/g) en yüksek flavonoit içeriğini göstermiştir. $DPPH^{\bullet}$ süpürme deneyinde, aktivite doza bağlı bir şekilde artmıştır. Etil asetat fraksiyonu, 0.85 µg/ml IC_{50} değeriyle kontrol *α*-tokoferol 18.68 µg/ml'den daha yüksek etki göstermiştir. En düşük etkiyi 18.05 µg/ml IC_{50} değeriyle *n*-butanol göstermiştir. Nitrit süpürme aktivitesi, farklı pH değerlerinde *in vitro* diazolama-eşleşme reaksiyonu ile araştırılmış, kontrol olarak askorbik asit kullanılmış, aktivitenin doza bağımlı olduğu ve en yüksek etkiyi etil asetat ekstresinin gösterdiği belirlenmiştir. Süperoksit radikal süpürücü testinde, aktivite doza bağımlı bir şekilde artmış ve 200 µg/ml dozda askorbik asit ve etil asetat arasında anlamlı bir fark olmadan sırasıyla askorbik asit, etil asetat, *n*-butanol, diklorometan, su ve *n*-hekzan sırasında etki göstermiştir. Etil asetat ekstresi 50 ve 200 µg/ml dozlarda % 38.63 ve % 61.41 arasında değişen aktivite göstermiştir. Metal şelatlama aktivitesinde en yüksek aktiviteyi etil asetat fraksiyonu (200 µg/ml konsantrasyonda % 53.65 şelatlama), ardından sırasıyla *n*-butanol, su, diklorometan ve *n*-hekzan fraksiyonları göstermiştir. İndirgeme gücü aktivitesi de doza bağlı bir ilişkiyi takip eder. Askorbik asit ve etil asetat fraksiyonu elektron donörü olarak en aktif olanlardır. Tüm bu sonuçlar, etil asetat fraksiyonunun en iyi antioksidan aktiviteye sahip olduğunu ve bunun yüksek fenolik ve flavonoit bileşik içeriğinden

kaynaklandığını doğrulamıştır (Guo ve ark., 2018). Üç *Stachys* türünün (*S. byzantina* K. Koch, *S. thirkei* K. Koch ve *S. cretica* subsp. *bulgarica*) toprak üstü kısımlarının, su, metanol, kloroform ve *n*-hekzan ekstreleri CUPRAC (Bakır (II) İyonu İndirgeyici Antioksidan Kapasite Tayini), DPPH$^{\bullet}$ ve FRAP deneyleri kullanılarak antioksidan aktivite açısından analiz edilmiştir. Sonuçlar, *n*-hekzan ekstresinin en düşük fenolik içeriğe sahip olduğunu, su ve metanol ekstraktlarının ise en yüksek fenolik içeriğe sahip olduğunu göstermiştir (metanol ekstreleri; *S. cretica* 0.101, *S. byzantina* 0.090 ve *S. thirkei* 0.058 mg gallik asit eşdeğeri/g ekstre). DPPH$^{\bullet}$ testinde metanol ve su ekstreleri en iyi aktiviteyi göstermiştir (metanol ekstreleri; *S. byzantina* 0.063, *S. cretica* 0.062 ve *S. thirkei* 0.039 mg askorbik asit eşdeğeri/mg ekstre ve *S. thirkei* su ekstresi (0.051) mg AaE/mg ekstre). *S. thirkei*'nin diğer iki türe göre daha düşük süpürme aktivitesine sahip olduğu tespit edilmiştir. FRAP testinde, test edilen ekstrelerin tümünün, kontrol bütillenmiş hidroksitoluene (BHT) (1.1 mM Fe^{2+}/mg ekstre) göre daha düşük bir indirgeme aktivitesine sahip olduğu belirtilmiştir. *S. byzantina* ve *S. cretica*'nın metanol ekstreleri sırasıyla 0.476 ve 0.454 mM Fe^{2+}/mg ekstre değerleri ile en yüksek aktivite göstermiştir. *S. cretica*, *S. thirkei* ve *S. byzantina* su ekstreleri sırasıyla 0.459, 0.451 ve 0.434 mM Fe^{2+}/mg ekstre değerlerinde aktivite göstermiştir (Toplan ve ark., 2021).

2.4.2. Antimikrobiyal Aktivite Çalışmaları

Yapılan bir çalışmada; *S. byzantina, S. inflata, S. lavandulifolia* ve *S. laxa*'nın toprak üstü çiçekli kısımlarının metanol ekstreleri, *Staphylococcus aureus, Streptococcus sanguis, Escherichia coli, Pseudomonas aeroginosa* ve *Klebsiella pneumonia*'ya karşı konsantrasyona bağlı antimikrobiyal aktivite göstermiştir. Ekstrelerin gram pozitif bakterilere (*S. sanguis* ve *S. aureus*) karşı gram negatiflere göre daha etkili olduğu ve *Aspergilus niger* ve *Candida albicans*'a karşı test edildiğinde herhangi bir antifungal aktivite göstermediği görülmüştür (Saeedi ve ark., 2008). Yunanistan'dan sekiz *Stachys*

türü (*S. alopecuros* (L.) Bentham., *S. scardica* (Griseb.) Hayek, *S. cretica* L. ssp. *cretica, S. germanica* L. ssp. *heldreichii* (Boiss.) Hayek, *S. recta* L., *S. spinulosa* L., *S. euboica* Rech. ve *S. menthifolia* Vis.) uçucu yağlarının *P. aeruginosa, E. coli, Bacillus subtilis, Bacillus cereus, Micrococcus flavus* ve *Staphylococcus epidermidis* ve aşağıdaki mantarlar: *A. niger, Penicillium ochrochloron, Epidermophyton floccosum, C. albicans* ve *Trichophyton mentagrophytes* üzerindeki antimikrobiyal etkileri araştırılmıştır. Uçucu yağların tümünün, test edilen bakteri suşlarına karşı mantarlardan daha etkili olduğu; test edilen *S. scardica*'nın hem bakteri hem de mantarlara karşı en aktif olduğu tespit edilmiştir fakat uçucu yağların hiçbirinin dirençli *P. aeruginosa*'ya karşı etkili olmadığı gözlenmiştir (Skaltsa ve ark., 2003). *S. pseudopinardii*'nin etanol ekstresi, 16 µg/ml minimum inhibitör konsantrasyonu (MİK), 32 µg/ml minimum bakterisit konsantrasyonu (MBC) ve 25.0 mm'lik bir inhibisyon zonu ile *B. cereus*'a karşı güçlü bir antibakteriyel aktivite göstermiştir. Ayrıca 32 µg/ml MIC, 32 µg/ml minimum fungisidal konsantrasyon (MFC) ve 17.0 mm inhibisyon zonu ile *Debaryomyces hansenii*'ye karşı antifungal aktivite göstermiştir. Ekstre *S. aureus, B. subtilis, E. coli, Proteus vulgaris, Salmonella typhimurium* ve *P. aeruginosa*'nın yanı sıra *Kluyveromyces fragilis, Candida albicans* ve *Rhodotorula rubra*'ya karşı orta düzeyde bir aktivite göstermiştir (Dulger ve ark., 2009). *S. plumosa*'nın uçucu yağı buhar distilasyonu ile elde edilmiş ve daha sonra agar disk difüzyon yöntemi kullanılarak % 2 ve % 4 konsantrasyonlarında antimikrobiyal aktivitesi analiz edilmiştir. En iyi aktiviteyi *P. aeruginosa* ve *B. subtilis*'e karşı, ardından *Enterococcus faecalis* ve *K. pneumonia*'ya karşı ve daha az ölçüde *E. coli* ve *C. albicans*'a karşı göstermiştir, ancak *S. aureus*'a karşı herhangi bir antimikrobiyal aktivite göstermemiştir (Petrović ve ark., 2006). *S. sieboldii*'nin *S. aureus, B. subtilis, E. coli, S. typhimurium* ve *C. albicans*'a karşı antimikrobiyal aktivitesi difüzyon agar yöntemi kullanılarak araştırılmıştır. Bitkinin kuru ekstraktları (herba % 70 etanol ekstraktı ve

yumruların % 40 etanol ekstraktı) incelenmiştir. Sonuçlar, herba kuru ekstraktının antimikrobiyal etkisinin daha yüksek olduğunu, test edilen tüm mikroorganizmaların duyarlı olduğunu göstermiştir (inhibisyon zonu *S. typhimurium* için (19.75 ± 2.12) mm ve *P. aeruginosa* için (24.55 ± 1.20) mm arasında). Herbadan elde edilen homojenat, gram-pozitif koksiye (19.35 ± 1.08 mm) ve maya mantarlarına (22.35 ± 1.15 mm) karşı en önemli antimikrobiyal etkiyi göstermiştir. Ancak *S. typhimurium, E. coli, P. aeruginosa, S. aureus* ve *C. albicans*'ın bitki yumrularının ekstresine karşı duyarsız olduğu gözlenmiştir (Slobodianiuk ve ark., 2021b). Clevenger tipi bir aparat kullanılarak hidro-distilasyon ile elde edilen *S. macrostachya* (Wend.) Briq uçucu yağının antimikrobiyal aktivitesi *P. aeruginosa, Acinetobacter baumannii, E. faecalis, Enterococcus faecium, E. coli, Streptococcus salivarius* ve *Streptococcus mutans*'a karşı mikrodilüsyon ve disk difüzyon yöntemleri kullanılarak araştırılmıştır. Uçucu yağ, 20 mm inhibisyon bölgesi ve 62.50 µg/mL MİK ile *A. baumannii*'ye karşı etki göstermiştir (Karaoglan ve ark., 2021). Üç *Stachys* türünün (*S. cretica* subsp. *bulgarica, S. byzantina, S. thirkei*) farklı ekstrelerinin (metanol, kloroform ve hekzan) yedi bakteri (*S. aureus, S. epidermidis, E. faecalis, P. aeruginosa, E. coli, K. pneumoniae* ve *Proteus mirabilis*) ve üç mantara (*C. albicans, Candida parapsilosis* ve *Candida tropicalis*) karşı antimikrobiyal aktivitelerini araştırmak için bir çalışma yapılmıştır. Mikrodilüsyon brot tekniği kullanılarak ve aktivite MİK değerleri belirlenerek test edilmiştir. Ekstreler, kullanılan standart ilaçlarla karşılaştırıldığında hafif ila orta derecede antimikrobiyal aktivite göstermiştir. *S. cretica*'nın metanol ekstresinin *E.coli*'ye karşı etkisinin (312.5 µg/ml MİK değeri) dışında test edilen ekstrelerin hiçbiri gram negatiflere karşı antibakteriyel aktivite göstermemiştir. *S. cretica*'nın *n*-hekzan ekstresinin, 312.5 ila 625 mg/L arasında değişen MİK ile gram pozitif bakterilere karşı aktiviteye sahip olduğu belirlenmiştir. *S. byzantina* ve *S. thirkei*'nin kloroform ekstresinin, *E. faecalis* ve *S.*

epidermis üzerinde aktiviteye sahip olduğu (MİK değeri; *S. byzantina*'nın *E. faecalis*'e karşı 156.2 mg/L ve *S.thirkei*'nin *S. epidermis*'e karşı 625 mg/L) belirlenmiştir. Test edilen üç *Stachys* türünün *n*-hekzan ekstresi, *C. parapsilosis* ve *C. tropikalis*'e karşı iyi bir antifungal aktivite göstermiştir (MİK değerleri: *S. cretica*; *C. parapsilosis*'e karşı 78.12 ve *C. tropikalis*'e karşı 156.2, *S. byzantina*; *C. parapsilosis*'e karşı 156.2 ve *C. tropikalis*'e karşı 312.5 ve *S.thirkei C. parapsilosis*'e karşı 78.12) (Toplan ve ark., 2021). *S. aleurites*'in 26 bakteri suşuna ve 3 mayaya karşı etkisi agar well difüzyon yöntemi kullanılarak test edilmiştir. *S. aleurites*'in *Aeromonas hydrophila, Pseudomonas lachrymans, Bacillus pumilus, B. cereus, Xanthomonas campestris* pv. *campestris, Pseudomonas syringae* pv. *glycine* ve *S. typhimurium*'e karşı (MİK; 250 µg/ml) etkili olduğu gözlenmiştir (Guven ve ark., 2009).

2.4.3. Antienflamatuvar Aktivite Çalışmaları

S. sieboldii'nin etanol ekstresinin, karragenanın neden olduğu akut pençe iltihabına bağlı fare ayak ödemi üzerindeki anti-enflamatuar etkisi 30 erkek fare üzerinde araştırılmıştır. Mekanik bir onkometre kullanılarak pençelerin hacmi ölçülmüştür. Sadece 10 mg/kg dozda pençe ödeminde bir azalma gözlenmiş ve ilk 2 saat içinde % 48'lik anti-inflamatuar aktivite tespit edilmiştir. 3-5 saat içinde antiinflamatuar aktiviteye sahip olan ve ortalama % 50 seviyesinde olan bitki ekstresi etkisinin serotonin, histamin ve lökotrienlerin aracılık ettiği enflamasyonun akut fazında ortaya çıktığını düşündürmektedir (Slobodianiuk ve ark., 2021a). *S. byzanthina* C. Koch'un toprak üstü kısımların metanol ve aseton ekstreleri formalin testi ve carrageenan ile indüklenen pençe ödemi kullanılarak anti-inflamatuar aktiviteleri açısından araştırılmıştır. Formalin testinde, formalin enjeksiyonundan 60 dakika önce ekstrelerden 3 farklı doz (50, 100 ve 200 mg/kg) kullanılmıştır. Erken fazda yalama süresinde bir fark bulunmazken, geç fazda ekstrelerin tüm dozları yalama süresini etkili bir şekilde azaltmış, maksimum azalma 50

mg/kg'lık dozla elde edilmiştir ve 5 mg/kg indometazin dozundan daha etkili bulunmuştur. Karagenin ile indüklenen pençe ödemi kaynaklı inflamasyonda, ekstreler doza bağımlı bir şekilde anti-inflamatuar etki göstermiştir. Aseton ekstresi, metanol ekstresinden daha fazla anti-enflamatuar aktivite göstermiş ve yüksek dozda indometazine benzer bir şekilde enflamasyonu inhibe etmiştir. 200 mg/kg'lık dozda, aseton ekstresi tüm zaman noktalarında enflamasyonu önemli ölçüde ortadan kaldırmıştır (Khanavi ve ark., 2005). *S. inflata*'nın toprak üstü çiçek açmayan kısımlarının metanol ekstesi, anti-enflamatuar aktivitesi açısından test edilmiştir. Carrageenan indüklü pençe ödemli sıçanlarda, *S. inflata* ekstresi intraperitonal olarak uygulanmıştır. 50-400 mg/kg dozlarında güçlü bir anti-inflamatuar etkiye sahip olduğu ve en etkili dozun 200 mg/kg olduğu gözlenmiştir. Formalinle indüklenen yalama tepkisi testinde, ekstre özellikle 50 mg/kg'lık dozda, enflamasyonun geç fazında yalama süresinde bir azalma göstermiştir. Ayrıca ekstre 200 mg/kg intraperitoneal dozunda pençe dokularının histolojik hasarını azaltmış, bundan başka nötrofil infiltrasyonunu ve miyeloperoksidaz aktivitesini azaltmıştır (Maleki ve ark., 2001). On *Stachys* türünün toprak üstü kısımlarının sulu ekstreleri, karagenin ile indüklenen pençe ödemi kaynaklı inflamasyonu olan sıçanlara intraperitonal ve oral yoldan uygulanarak anti-inflamatuar aktivite açısından değerlendirilmiştir. Oral olarak uygulanan *Stachys* sulu ekstreleri ile en önemli inflamasyon inhibisyonları *S. alpine* (% 30.5), *S. officinalis* (% 26.6), *S. sylvatica* (% 26.3), *S. recta* (% 25.8), *S. germanica* (% 23.8) ve *S. palustris* (% 23.0) olmuştur. Hepsi, (% 41.0) aktiviteye sahip olan kontrol oral diklofenak sodyum ile karşılaştırılmıştır. İntraperitonal olarak uygulanan sulu ekstrelerden *S. alpine* (% 79.9) en yüksek antiinflamatuar aktiviteyi göstermiş, sonra sırasıyla *S. recta* (% 61.6), *S. germanica* (% 50.6) ve *S. officinalis* (% 45.4) takip etmiştir (Háznagy-Radnai ve ark., 2012).

2.4.4. Antikanser Aktivite Çalışmaları

S. pilifera'nın diklorometan ekstresi, test edilen üç hücre hattının (HL-60 hücreleri, K562 hücreleri ve MCF-7 hücreleri) tümünde, IC_{50} değeri 33.1 ile 48.2 arasında değişen bir sitotoksik aktivite göstermiştir. *S. byzantina*'nın diklorometan ekstresi (IC_{50} 62.7-131.0 µg/ml) ve % 80 metanol ekstresi (IC_{50} 62.1-104.1 µg/ml) test edilen üç hücre hattının hepsinde etkili olmuştur. *S. acerosa*'nın üç farklı ekstresinin de, K562 hücreleri (kronik miyelojenöz lösemi hücre dizisi) üzerinde seçici olarak etkili olduğu gözlenmiştir (Jassbi ve ark., 2014). Altı *Stachys* türünün uçucu yağının sitotoksik aktivitesi, iki insan kanser hücre hattında (C32; amelanotik melanom ve ACHN; renal hücreli adenokarsinom) incelenmiştir. C32 hücre hattında, *S. germanica* uçucu yağı, 100 µg/ml'lik bir konsantrasyonda % 77 inhibisyonla bir anti-proliferatif etki sergilemiş (LD_{50} 75 µg/ml) ve sonraki etkiyi *S. spinosa* (LD_{50} 83.5 µg/ml) göstermiştir. ACHN hücre hattında ise 100 µg/ml konsantrasyonda *S. germanica* (LD_{50} 74.5 µg/ml), *S. palustris* (LD_{50} 83.9 µg/ml) ve *S. spinosa* (LD_{50} 83.0 µg/ml) uçucu yağlarının anti-proliferatif etkileri sırasıyla % 81, % 77 ve % 73 inhibisyon olarak gözlenmiştir (Conforti ve ark., 2009). Farklı *Stachys* türlerinin % 80 metanol ekstrelerinin, 3 tip kanser hücre hattı üzerindeki sitotoksik aktiviteleri, Doxorubicin ve Cisplatin ile kıyaslanarak test edilmiştir. 10 µg/mL konsantrasyonunda *S. recta* kök ekstresi > % 50 inhibisyon ile MCF7 hücre hattına (göğüs adenokarsinomu) karşı önemli bir aktivite göstermiştir. Ayrıca A431 hücre hattına (skinepidemoidkarsinom) karşı > % 25 inhibisyon ve HeLa (serviksadenokarsinom) hücrelerinde > % 25 inhibisyon sergilemiştir. MCF7 hücre hattında, *S. palustris'*in yaprak, gövde ve çiçek ekstresi, *S. byzantina*'nın gövde ekstresi ve *S. germanica*'nın çiçek ekstresi > % 25 inhibisyon sergilemiştir. *S. palustris,* HeLa hücreleri üzerinde % 25'lik bir inhibisyon sergilemiştir. Bu çalışmada, test edilen üç hücre hattının hepsine karşı *S. recta*'nın kök ekstresinin aktif olduğu tespit edilmiştir (Háznagy-

Radnai ve ark., 2008). Dört *Stachys* türünün çeşitli ekstrelerinin 3.125 ila 800 µg/ml aralığındaki dozları, kolorektal adenokarsinoma (Caco-2), kolon karsinomu (HT-29), İsviçre faresi embriyo fibroblastı (NIH 3T3) ve meme duktal karsinomu (T47D) hücre hatlarına karşı MTT testi kullanılarak sitotoksik aktiviteleri açısından araştırılmıştır. Sonuçta, *S. laxa*'ın polar olmayan fraksiyonların (etil asetat ve kloroform, IC_{50}< 50 µg/mL) T47D, HT-29'a karşı polar ve ana ekstreden daha büyük bir aktivite sergilediği gösterilmiştir. *S. subaphylla* etil asetat ve kloroform ekstreleri (IC_{50} < 50 µg/mL) T47D hücre hattına karşı yüksek aktivite sergilemiştir. Ayrıca T47D üzerinde *S. turcomanica*'nin etil asetat fraksiyonu 30.14 µg/mL IC_{50} ile iyi bir aktivite göstermiştir (Khanavi ve ark., 2012).

2.4.5. Antidiyabetik Aktivite Çalışmaları

S. annua'nın su ekstresinin (IC_{50}; *α*-glikozidaz üzerinde 18.7 µM ve *α*-amilaz üzerinde 11.4 µM), metanol ekstresinden (IC_{50}; *α*-glikosidaz üzerinde 25.7 µM ve *α*-amilaz üzerinde 43.3 µM) daha yüksek etki gösterdiği ve her iki ekstrenin de, standart bir inhibitör olarak kullanılan akarboz (IC_{50}; *α*-glikozidaz üzerinde 22.8 µM ve *α*-amilaz üzerinde 10.0 µM) gibi bir enzim inhibitörü olarak etkili olduğu gözlenmiştir (Bursal ve ark., 2020). *S. palustris* L.'nin farklı kısımları (yapraklar, çiçekler, gövdeler ve kökler), sindirim enzimlerini inhibe edici aktiviteleri açısından değerlendirilmiştir. Çiçek ekstresinin en iyi *α*-glikozidaz inhibe edici aktiviteye sahip olduğu (IC_{50} 11.20 mg/ml), yaprak ekstresinin ise *α*-amilaz (IC_{50} 6.85 mg/ml) ve pankreatik lipaz (IC_{50} 27.46 mg/ml) üzerinde daha iyi bir inhibe edici aktivite gösterdiği belirlenmiştir (Lachowicz-Wiśniewska ve ark., 2022). Başka bir çalışmada, *S. brachyclada*'nın yapraklarının metanol ekstresi (IC_{50} 13.7 µg/ml) standart akarbozla (7.5 µg/ml) kıyaslanarak *α*-glikozidaz enzim inhibitör etki göstermiştir. Ayrıca aynı deney izole edilmiş bileşikler üzerinde test edilmiş ve hepsi, ana ekstreden daha düşük bir enzim inhibisyon aktivitesi

göstermiş, bunun sinerjik etki kaynaklı olduğu düşünülmüştür (Lemoui ve ark., 2023). Üç *Stachys* türünün (*S. inflata, S. byzantina* ve *S. lavandulifolia*) uçucu yağları Clevenger tipi distilasyon ünitesi kullanılarak elde edilmiş ve ardından bazı biyolojik aktiviteler açısından test edilmiştir. En yüksek *α*-amilaz inhibisyon aktiviteyi *S. byzantina* (0.74 mmol akarboz eşdeğeri/g uçucu yağ) göstermiş, ardından *S. lavandulifolia* (0.68 mmol akarboz eşdeğeri/g uçucu yağ) ve sonra *S. inflata* (0.52 mmol akarboz eşdeğeri/g uçucu yağ) gelmiştir. Ayrıca *S. inflata,* S. *byzantina* ve *S. lavandulifolia* uçucu yağları (sırasıyla 4.62, 4.56 ve 4.47 mmol akarboz eşdeğeri/g uçucu yağ) *α*-glikozidaz aktivite göstermiştir (Bahadori ve ark., 2020b).

2.4.6. Antikolinesteraz Aktivite Çalışmaları

S. lavandulifolia'nın beş ekstresinin, asetilkolinesteraz (AChE) ve bütirilkolinesteraz (BChE) inhibitör etkileri Ellman'ın kolorimetrik yöntemi kullanılarak araştırılmıştır. Standart fizostigmin (IC_{50}; AChE 0.2 µg/ml ve BChE 2.4 µg/ml) ile karşılaştırıldığında, AChE'ye karşı *n*-hekzan ekstresi (IC_{50}:13.7 µg/ml) ve BChE'ye karşı diklorometan ekstresi (IC_{50}: 143.9 µg/ml) en etkili bulunmuştur (Tundis ve ark., 2015). *S. lavandulifolia, S. byzantina* ve *S. inflata*'nın uçucu yağlarının (EO) kolinesteraz inhibisyon aktivitesi Ellman yöntemi kullanılarak araştırılmıştır. En aktif uçucu yağın, BChE'ye karşı 7.68 mg galantamin eşdeğeri/g EO ve AChE'ye karşı 5.20 mg GALAEs/g EO inhibisyonu ile *S. inflata* olduğu gözlenmiştir. Ayrıca *S. byzantina*'nın inhibisyon değerlerinin BChE için 6.62 ve AChE için 5.06 mg GALAEs/g EO, *S. lavandulifolia*'nın ise BChE için 4.96 ve AChE için 4.88 mg GALAE/g EO olduğu belirlenmiştir (Bahadori ve ark., 2020b). *S. guyoniana*'ın üç farklı ekstresinin (etil asetat, kloroform ve *n*-butanol) kolinesteraz inhibisyon aktivitesi, referans Galatamin ile karşılaştırmalı olarak Ellman yöntemi kullanılarak incelenmiştir. AChE'ye karşı, tek aktif fraksiyon, IC_{50} 5.78 µg/ml ile *n*-butanol ekstresiyken, (Galantamin IC_{50} 5.01 µg/ml), *n*-butanol ekstresi (IC_{50} 19.23

μg/ml) BChE'ye karşı Galantamin'den (IC_{50} 53.90 μg/ml) daha iyi inhibitör etki göstermiştir (Ferhat ve ark., 2017).

2.4.7. Yara İyi Edici Aktivite Çalışmaları

S. hissarica ekstresi, ensizyonel lineer yaraları olan sıçanlarda oral yoldan 10 mg/kg dozda yara iyileştirme aktivitesi göstermiştir. Ekstre uygulanan grupta iyileşme süreci kontrol grubuna (metilurasil) göre daha hızlı olup yaralanmadan sonra 1-2 gün içinde oluşan kabuk 7. günde, kontrol grubunda ise 12. günde ayrılmıştır. Aynı deney, alloksanla indüklenen diyabet fareleri üzerinde yapılmış ve sonuç olarak *S. hissarica* ekstresi iyi bir etki göstermiştir (10. günde tensile dayanma, kontrol için 286.4 g ve ekstre ile tedavi edilen grup için 520.6 g) (Ramazanov ve ark., 2016). *S. lavandulifolia* Vahl'ın sulu ekstresi ve *Malva sylvestris* Linn'in kloroform ekstresi, indüklenmiş yaraları olan Wistar sıçanlarında yara iyileştirme özellikleri açısından incelenmiş ve soğuk krem (kontrol) ve nitrofurazon (standart ajan) ile yara bölgesi ve histopatolojik özellikler açısından karşılaştırılmıştır. *M. sylvestris* ile tedavi edilen grup yara alanında % 99 azalma göstermiş, bunu nitrofurazon grubu (% 95) ve *S. lavandulifolia* grubu (% 92) izlemiştir. Histopatolojik analiz, *M. sylvestris* ekstresi içeren soğuk krem ile tedavi edilen grupta daha fazla doku rejenerasyonu göstermiştir, ardından nitrofurazon ve *S. lavandulifolia* grupları gelmiştir, ancak soğuk krem ile tedavi edilen grupta ödem, monosit hücreleri ve hücresel nekrozlu alan gözlenmiştir. Ayrıca *M. sylvestris* ile daha iyi organize olmuş kollajen, fibroblast bantları ve az sayıda enflamatuar hücre varlığı görülmüştür (Pirbalouti ve ark., 2011).

2.4.8. Anksiyolitik Aktivite Çalışmaları

S. tibetica'nın metanol ekstresi (yapraklar, gövde, kökler ve tüm bitki) yükseltilmiş artı labirent kullanılarak albino Wistar fareleri üzerinde 200-400 mg/kg dozda anksiyolitik aktivitesi açısından test edilmiş ve diazepam (1 mg/kg ağızdan) ile

karşılaştırılmıştır. Tüm *S. tibetica* ekstreleri ve diazepam giriş sayısını ve kapalı kollarda geçirilen süreyi azaltmıştır, ayrıca girişleri ve açık kollarda geçirilen süreyi artırmıştır. Tüm ekstreler ve diazepam labirentin merkezinde geçirilen süreyi azaltmıştır. 400 mg/kg dozda kök, yaprak, bütün bitki ekstresi ve diazepam alan gruplarda açık kollarda baş daldırma sayısında artış fark edilmiştir. Diazepam ve bütün bitki ekstraktı dışında, diğer tüm ekstraktlar kontrol grubuna kıyasla fekal bolusu azaltmıştır. Ekstreler arasında en fazla anksiyolitik aktiviteyi bütün bitki ve yaprak ekstreleri, orta aktiviteyi kök ekstresi ve en düşük aktiviteyi ise gövde ekstresi göstermiştir. Tüm bu bulgular, *S. tibetica*'nın yeni bir anksiyolitik ilaç kaynağı olarak hizmet edebileceğini düşündürtmüştür (Kumar ve ark., 2013). Başka bir çalışmada, *S. tibetica*'nın uçucu yağı hidro-distilasyon yoluyla elde edilmiş ve 25 ve 50 mg/kg dozlarında Diazepam (1 mg/kg) ile karşılaştırılarak albino Wistar fareleri üzerindeki anksiyolitik aktivitesi araştırılmıştır. Deney, delikli tahta, yükseltilmiş artı labirent, aydınlık/karanlık arena ve sosyal etkileşim yöntemleri kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Sosyal etkileşim testinde (alışılmadık ve tanıdık koşullar) 25 ve 50 mg/kg uçucu yağ ve diazepam dozlarının tümü sosyal etkileşim süresini artırmış, fakat tanıdık koşullarda 50 mg/kg uçucu yağ ekstresinin diazepamdan daha aktif olduğu gözükmüştür. Hepsi hem tanıdık hem de alışılmadık koşullarda saldırgan davranışların süresini azaltmştır. Delik tahtası testinde, test edilen tüm gruplarda kontrole kıyasla azalmış bir baş daldırma gecikmesi gözlenmiş, ayrıca uçucu yağ gruplarının daha yüksek baş daldırma süresine sahip olduğu tespit edilmiştir. Yükseltilmiş artı labirentte hem uçucu yağ hem de diazepam açık kollara giriş sayısını ve burada geçirilen süreyi artırmış, ayrıca 50 mg/kg dozunun 25 mg/kg'dan daha aktif olduğu bulunmuştur, bu da doza bağımlı bir aktivite olduğunu düşündürmüştür. Aydınlık/karanlık alan testinde uçucu yağ, kontrole kıyasla hareketsizlik süresini ve karanlık alanda geçirilen süreyi önemli ölçüde azaltmış, hem uçucu yağ hem de diazepam,

aydınlık arenada geçirilen zamanı artırmıştır (Kumar ve ark., 2012). *S. annua* L.'nin maserasyon ile elde edilen metanol ekstresinin anti-anksiyete ve antidepresan etkileri erkek albino fareler üzerinde (12.5, 25, 50 ve 100 mg/kg intraperitoneal dozlarda) araştırılmıştır. Anksiyolitik ve lokomotor aktiviteleri yükseltilmiş artı labirent ve açık alan testi ile değerlendirilmiş ve pozitif kontrol olarak kullanılan diazepam (2 mg/kg intraperitoneal) ile karşılaştırılmıştır. Antidepresan aktivitesi zorlu yüzme testi ve kuyruktan asma testi ile değerlendirilmiş ve fluoksetin ve imipramin ile karşılaştırılmıştır. Açık kola girişlerin yüzdesi ve burada harcanan zamanın yüzdesi, vehikül kontrol grubuyla karşılaştırıldığında hem ekstre hem de diazepam ile tedavi edilen gruplarda önemli ölçüde yüksek olduğu gözlenmiştir. Ekstrenin 50 ve 100 mg/kg dozları diazepam da lokomotor aktiviteyi azaltmıştır. Zorla yüzdürme testi ve kuyruktan asma testinde 25, 50 ve 100 mg/kg ekstre dozları ile hareketsizlik önemli ölçüde azaltılmıştır (Motavallian ve ark., 2021). *S. lavadulifolia* Vahl'ın hidroalkolik ekstresi (etanol:su; 8:2) ve uçucu yağı, erkek farelerde intraperitoneal olarak uygulandıktan sonra yükseltilmiş artı labirent yöntemi kullanılarak anksiyolitik aktiviteleri açısından analiz edilmiştir. 100 mg/kg ekstre ve diazepam hem açık kollara giriş yüzdesini hem de burada geçirilen süreyi artırmış, aynı zamanda kapalı kollarda giriş yüzdesini ve harcanan zamanı da azaltmıştır. Ayrıca 100 mg/kg ekstrenin lokomotor aktiviteyi azalttığı ve ketaminin neden olduğu uyku süresini uzatarak *S. lavadulifolia* Vahl ekstraktının anksiyolitik etkiye sahip olduğunu ve diazepamdan daha az sedatif etkiye sahip olduğunu göstermiştir. 50 mg/kg bitki ekstresi bu parametrelerin hiçbirini etkilememiş, ayrıca uçucu yağ farelerin yükseltilmiş plus labirentindeki davranışlarını etkilememiştir (Rabbani ve ark., 2003).

2.4.9. Hepatoprotektif Aktivite Çalışmaları

Yapılan bir araştırmada *S. pilifera* Benth'in etanol ekstresinin, CCl_4 (karbon tetraklorür) kaynaklı hepatotoksisiteli sıçanlardaki hepatoprotektif aktivitesi

değerlendirilmiştir. 42 yetişkin erkek Wistar sıçan rastgele ve eşit olarak 6 gruba ayrılmıştır. 1. gruba normal salin, 2. gruba intraperitoneal CCl_4 (2 ay boyunca haftada iki kez 1 mg/kg), 3., 4. ve 5. gruplara farklı dozlarda oral *S. pilifera* ekstresi (100, 200 ve 400 mg/kg/gün) ve CCl_4, 6. gruba 400 mg/kg/gün dozunda ekstre verilmiştir. Aktivite histopatolojik analiz ve ALT (alanin aminotransferaz), AST (aspartat aminotransferaz), ALP (alkalen fosfataz), MDA (malondialdehit), TP (toplam protein) ve ALB (albumin) ölçümleri kullanılarak değerlendirilmiştir. CCl_4, serum ALB (2.7 g/dL) ve TP'de (6.23 g/dL) azalmaya neden olurken, geri kalanını artırmıştır (ALT 167, AST 222, ALP 800 U/l). 200 ve 400 mg/kg/gün dozlarındaki ekstre, yüksek ALT (97, 79), AST (193, 160), ALP (519, 382) ve MDA düzeylerini önemli ölçüde azaltmıştır. TP ve ALB düzeylerini önemli ölçüde normalleştirmiştir. Ayrıca salin ve 400 mg/kg/gün dozunda ekstre grubu arasındaki TP, ALB, AST, ALT, ALP ve MDA düzeylerinde önemli bir fark gözlenmemiştir. CCl_4 kaynaklı histolojik yaralanmalar (iltihaplanma ve yağlı dejenerasyon), 200 ve 400 mg/kg/gün ekstre ile azaltılmıştır (Kokhdan ve ark., 2017). *S. pumila*'nın (400 mg/kg) dozundaki metanol ekstresinin, CCl_4 kaynaklı hepatotoksisite ve oksidatif stresli erkek Wistar albino sıçanda hepatoprotektif aktivitesi araştırılmıştır. Lipit peroksidasyonu ve oksidatif stres durumu için bir belirteç olan MDA ve OSI (oksidatif stres indeksi) sırasıyla, CCl_4 grubunda yükselmiştir (MDA 36.06 nmol/mg. protein ve OSI 2.30 TOS/TAS), *S. pumila* ekstresi ile ön işleme tabi tutulmuş grupta ise azalmıştır (MDA 20.53 nmol/mg. protein ve OSI 0.95 TOS/TAS). SOD (süperoksit dismutaz) ve CAT (katalaz) antioksidan enzimlerinin CCl_4 uygulaması ile seviyeleri düşmüş, ancak *S. pumila* ile ön tedavi uygulanan grupta aktivitelerinde iyileşme kaydedilmiştir. Hepatik enzimler ALT ve AST, CCl_4 uygulamasına bağlı olarak yükselmiş, bu yüksek seviyeler *S. pumila* ile önemli ölçüde azalmıştır. Tüm bu bulgular, *S. pumila*'nın CCl_4 tarafından indüklenen hepatik hasara karşı geleneksel ilaç Silimarin'den daha iyi hepatoprotektif

aktivitesi olduğunu desteklemiştir (Kepekçi ve ark., 2017). *S. floridana* Schuttl. ex Benth'in kurutulmuş rizomlarının sulu ekstresi, kırk sekiz 2 aylık erkek Kunming farelerinde (bazıları CCl_4 kaynaklı hepatotoksisiteye sahip) oral olarak 100, 200 ve 400 mg/kg/gün dozlarında incelenmiştir. 200 ve 400 mg/kg/gün dozlardaki ekstre ile yüksek ALT ve AST'de önemli bir düşüş gözlenmiştir (AST: 120.30, 102.02 ve 80.07 U/l, CCl_4 grubunda, 200 ve 400 mg/kg ekstre, sırasıyla) ve (ALT: 91.79, 77.93 ve 60.4 U/l, CCl_4 grubunda, 200 ve 400 mg/kg ekstre, sırasıyla). Azalan SOD ve CAT aktivitesi, GSH (indirgenmiş glutatyon) ve TAC (toplam antioksidan kapasitesi) seviyeleri, 200 ve 400 mg/kg ekstre ile önceden tedavi edilen grupta belirgin şekilde artmış ve yüksek MDA önemli ölçüde azalmış, hepsinin doza bağımlı olduğu gözlenmiştir (Ma ve ark., 2012).

2.4.10. Antitirozinaz Aktivite Çalışmaları

S. lavadulifolia'nın toprak üstü kısımlarının beş farklı ekstresinin (metanol, metanol sokslet, etanol, diklorometan ve *n*-hekzan) anti-tirozinaz aktiviteleri pozitif kontrol kojik asit ile karşılaştırılarak incelenmiştir. İnhibisyon aktivitesi doğrusal bir konsantrasyon ilişkisinde artmıştır. IC_{50} değerleri (µg/ml cinsinden) incelendiğinde yüksekten düşüğe aktivitenin sırasıyla etanol (33.4), metanol sokslet (42.8), metanol (51.8), diklorometan (64.3) ve *n*-hekzan (272.7) ekstrelerinin olduğu görülmüştür. Kojik asitin IC_{50}'sinin10.8 ug/ml olduğu gözlenmiştir (Tundis ve ark., 2015). *S. macrostachya* (Wend.) Briq'in toprak üstü kısımlarının uçucu yağı, clevenger tipi aparat kullanılarak hidro-distilasyon yoluyla elde edilmiş, substrat olarak L-DOPA ve kontrol olarak kojik asitin kullanıldığı yöntemle farklı konsantrasyonlarda (25, 50, 100 ve 200 µg/ml) tirozinaz inhibisyon aktivitesi açısından analiz edilmiştir. Kojik asidin IC_{50} değeri 3.86 µg/ml iken *S. macrostachya*'nınki 22.86 µg/ml bulunmuştur. Uçucu yağın yüzde inhibisyonu konsantrasyona bağlı doğrusal bir şekilde artmıştır (Karaoglan ve ark., 2021). *S. annua* (L.) subsp. *annua* var. *annua'*nın toprak üstü kısımlarının metanol, etil asetat ve

su ekstrelerinin tirozinaz inhibisyon aktivitesi değerlendirilmiştir. En yüksek aktivitenin etil asetat ekstresine ait olduğu, en düşük aktivitenin ise su ekstresine ait olduğu gösterilmiştir (etil asetat için 23.95, metanol için 17.96 ve su için 8.13 mg kojik asit eşdeğeri/g ekstre) (Kocak ve ark., 2017). *S. cretica* subsp. *kutahyensis*'nin toprak üstü kısımlarının sulu ve metanol ekstrelerinin tirozinaz inhibisyon aktivitesi araştırılmıştır. Metanol ekstresinin (264.21 mg kojik asit eşdeğeri/g ekstre) tirozinaz inhibisyonunun sulu ekstreden (161.46 mg kojik asit eşdeğeri/g ekstre) daha yüksek olduğu gözlenmiştir. Metanol ekstresinin bu yüksek aktivitesinin, kersetin ve kempferol gibi bazı fenolik bileşiklerin varlığından kaynaklanabileceği düşünülmüştür (Benabderrahim ve ark., 2021). *S. germanica* subsp. *holdreichii*'nin su, metanol ve etil asetat ekstrelerinin, anti-tirozinaz aktiviteleri araştırılmıştır. Metanol ekstresinin (IC_{50} 2.90 mg/ml) en iyi aktiviteye sahip olduğu, ardından su ekstresi (IC_{50} 4.73 mg/ml) ve son olarak etil asetat ekstresinin (IC_{50} 44.76 mg/ml) geldiği gözlenmiştir. Kontrol olarak kullanılan kojik asit 0.26 mg/ml'lik bir IC_{50} göstermiştir (Sarikurkcu ve ark., 2021).

2.4.11. Antiülser Aktivite Çalışmaları

S. lavandulifolia'nın Wistar erkek sıçanları üzerinde alkolün neden olduğu mide ülserini önleyici ve terapötik etkisini araştırmak için bir çalışma gerçekleştirilmiştir. Sıçanlar kontrol, alkol (1 ml/ 200 g canlı ağırlık), alkol/ *S. lavandulifolia* (100 mg/kg canlı ağırlık/gün, bitki ekstresi alkol uygulamasından 2 hafta sonra verilmiş) ve *S. lavandulifolia*/alkol (bitki ekstresi indüklenen ülserden 2 hafta önce verilmiş) olmak üzere 4 gruba ayrılmıştır. *S. lavandulifolia* ekstresinin alkol/*S. lavandulifolia* grubunda ülser sayısını, ülser indeksini ve skorunu azalttığını göstermiş ve ülseri % 46 oranında inhibe edilmiştir. Mide asidi pepsinin, alkol ve *S. lavandulifolia*/alkol gruplarında kontrol grubuna göre daha düşük olduğu gözlenmiştir. Mide dokusunun nitrik oksit metabolitlerinin alkol ve *S. lavandulifolia*/alkol gruplarında daha düşük olduğu

belirlenmiştir. Histopatolojik incelemelerde alkol/ *S. lavandulifolia* grubunda alkolün neden olduğu tüm mukozal hasarlara karşı anlamlı bir koruma saptanmıştır (Nabavizadeh ve ark., 2011).

2.5. Fitokimyasal Çalışmalar

2.5.1. *S. byzantina*

Apigenin, apigenin-7-*O*-glukozit ve apigenin-7-*O*-(6-*p*-kumaroil)-glukozit, verbaskozit, 2'-*O*-arabinosil verbaskozit (Asnaashari ve ark., 2010) ve apigenin-7-O-*β*-(6″-kumaroil)-glukopiranozit'in (Demirtas ve ark., 2013) içerdiği kayıtlıdır.

2.5.2. *S. sylvatica*

Fenilpropanoit, fenolik bileşikler, flavonoitler (stakispinosit, krizoeriol 7-*O*-*β*-*D*-glukopiranozit, naringenin-7-*O*-(6''-*E* + *Zp*-kumaroil)-*β*-*D*-glukopiranozit ve apigenin-7-*O*-(6''-*E* + *Z*-*p*-kumaroil)-*β*-*D*-glukopiranozit), lignan'ın içerdiği belirtilmiştir (Di Stasi ve ark., 2023).

2.5.3. *S. pilifera* Benth

S. pilifera Benth'in monogliserit, steroidal bileşikler (*β*-sitosterol ve dakosterol) ve flavonoitler (krizoeriol, 5-demetilsinensetin, pakipodol, apigenin, kirsimaritin, penduletin, velutin, isoskutellarin-7-*O*-[6'''-*O*-asetil-*β*-*D*-allopiranoil-(1→2)-*β*-*D*-glukopiranozit] ve 7,3',4'-tri-*O*-metilluteolin) içermektedir (Khademian ve ark., 2021).

2.5.4. *S. germanica* L. subsp. *salviifolia* (Ten.) Gams

İridoitler (5-allosiloksi-okubin, harpajit, 7-*β*-hidroksi-harpajit ve ajugol), fenolik bileşikler (arbutin ve verbaskozit) içermektedir (Venditti ve ark., 2013).

2.5.5. *S. rizeensis* R. Bhattacharjee

Kemferol, luteolin, verbaskozit ve klorojenik asit içermektedir (Gerçek ve ark., 2022).

2.5.6. *S. candida* Bory & Chaubard

Flavon (krizoeriol, krizoeriol-7-*O*-*β*-*D*-(3"-*E*-*p*-coumaroil)-glukopiranozit, krizoeriol-7-*O*-*β*-*D* glukopiranozit, apigenin 7-*O*-*β*-*D*-glukopiranozit, apigenin 7-(6"-*E*-*p*-kumaroil)-*β*-*D*-glukopiranozit, 4'-*O*-metil-hipoletin-7-*O*-[6'''-*O*-asetil-*β*-*D*-allopiranosil-(1→2)]-*β*-*D*-glukopiranozit, 4'-metil-izoskutellarein-7-*O*-[6'''-*O*-asetil-*β*-*D*-allopiranosil-(1→2)]-*β*-*D*-glukopiranozit, izoskutellarin 7-*O*-[6"-*O*-asetil-*β*-*D*-allopiranosil-(1 → 2)]-6"-*O*-asetil-*β*-*D*-glukopiranozit ve izoskutellarin 7-*O*-[6'''-*O*-asetil-*β*-*D*-allopiranosil-(1 → 2)]-*β*-*D*-glukopiranozit), bir metillenmiş flavon (kalikopterin), fenolik asit (klorojenik asit) ve feniletanoit glikozit (akteozit) içermektedir (Michailidou ve ark., 2021).

2.5.7. *S. brachyclada* de Noé ex Coss.

Stakisetin, etil 4-hidroksibenzoat, flavon aglikon (luteolin ve apigenin) ve flavon glikozit (izoskutellarein 7-*O*-[6'''-*O*-asetil-*β*-*D*-allopiranosil-(1→2)-*β*-*D*-glukopiranozit]), krizoeriol 7-*O*-[6'''-*O*-asetil-*β*-*D* allopiranosil-(1→2)-*β*-*D*-glukopiranozit] ve luteolin 7-*O*-[6'''-*O*-asetil-*β*-*D*-allopiranosil-(1→2)-*β*-*D*-glukopiranozit]) içermektedir (Lemoui ve ark., 2023).

2.5.8. *S. ocymastrum* (L.) Briq.

Luteolin, apigenin, apigenin-7-*O*-*β*-*D*-(6"-*O*-*p*-kumaroil-glukopiranozit) ve izoskutellarin 7-*O*-*β*-*D*-allopiranosil-(1→2)-glukopiranozit)'in içerdiği kayıtlıdır (Lakhal ve ark., 2011).

2.5.9. *S. glutinosa* L.

İridoitler (5-alosiloksi-okubin, melittozit, monomelittozit ve allobetonikozit)'in içerdiği kayıtlıdır (Serrilli ve ark., 2006).

2.5.10. *S. cretica* ssp. *anatolica*

Apigenin-7-glukozit, verbaskozit ve klorojenik asit, pinorezinol, siringik asit, luteolin ve luteolin-7 glukozit içermektedir (Carev ve ark., 2021).

2.5.11. *S. palustris* L.

İridoitler (harpajit, 8-*O*-asetil-harpajit ve monomelitosit), flavonoitler (izoskutellarin türevi), feniletanoit glikozitler (ekinakozit ve verbaskozit) ve kaffeoil-kinik asit (klorojenik asit) içermektedir (Frezza ve ark., 2016).

2.5.12. *S. riederi* var. *japonica* (Miq.)

Yağ asitleri (linolenik asit, linoleik asit, palmitik asit, palmitoleik asit, oleik asit, oleanolik asit, stearik asit, *n*-pentadekanal ve heptadekanal), fenolik bileşikler (kafeik asit, rosmarinik asit, umbelliferon ve 4-hidroksibenzoik asit heptil ester), amino asitler (fenilalanin ve asparagin) ve bir triterpenoit (ursolik asit) içermektedir (Saravanakumar ve ark., 2021).

2.5.13. *S. lavandulifolia* Vahl. var. *brachydon* Boiss.

Kinik asit, klorojenik asit, hiperozit, protokateşik asit, *p*-kumarik asit, kemferol, apigenin, kafeik asit, naringenin, 4-OH benzoik asit ve salisilik asit içermektedir (Bingol ve ark., 2018).

2.5.14. *S. ionica*

Flavonoitler (apigenin, salvigenin, kastisin, krizosplenetin), iridoitler (gardosit ve loganik asit), seskiterpen ve apigenin-7-O-*β*-(6″-kumaroil)-glukopiranozit'in içerdiği belirtilmiştir (Meremeti ve ark., 2004).

2.5.15. *S. spinosa*

İridoitler (harpajit, 7-*O*-asetil-8-*epi*-loganik asit, ajugol) ve bir flavonoit glikoziti (stakispinozit)'in içerdiği kayıtlıdır (Kotsos ve ark., 2001).

2.5.16. Bazı *Stachys* türlerinin uçucu yağ bileşenleri

2.5.16.1. (-) *α*-Pinen

S. schtschegleevii (% 36.4) (Sonboli ve ark., 2005), *S. plumosa* (% 35.84) (Grujic-Jovanovic ve ark., 2004), *S. annua* ssp. *annua* var. *annua* (% 11.4) *S. macrantha* (% 11.2) (Renda ve ark., 2017), *S. macrostachya* (Wend.) Briq. (% 9.72) (Karaoglan ve ark., 2021), *S. anisochila* (% 7.6) (Grujic-Jovanovic ve ark., 2011), *S. recta* (% 5.42) ve *S. scardica*'nın (% 5.03) (Grujic-Jovanovic ve ark., 2004) *α*-pinen içerdiği kayıtlıdır.

2.5.16.2. (+) *β*- Pinen

S. plumosa (% 31.74) (Grujic-Jovanovic ve ark., 2004), *S. annua* ssp. *annua* var. *annua* (% 23.1) (Renda ve ark., 2017), *S. germanica* subsp. *salviifolia*'nın çiçek yağında (% 18.7) (Giuliani ve ark., 2009), *S. recta* (% 8.07) (Grujic-Jovanovic ve ark., 2004), *S. anisochila* (% 5.28) (Grujic-Jovanovic ve ark., 2011) ve *S. germanica*'nın (% 4.28) (Grujic-Jovanovic ve ark., 2004) (+) *β*- pinen içerdiği belirtilmiştir.

2.5.16.3. (+) Limonen

S. sylvatica (% 37) (Renda ve ark., 2017), *S. germanica* subsp. *salviifolia*'nın çiçek yağı (% 24.1) (Giuliani ve ark., 2009), *S. pilifera* (% 9.9) (Masoudi ve ark., 2003), *S. schtschegleevii* (% 8.2) (Sonboli ve ark., 2005), *S. obliqua* L. (% 6.2) (Harmandar ve ark., 1997) ve *S. plumosa*'nın (% 3.62) (Grujic-Jovanovic ve ark., 2004) (+) limonen içerdiği kayıtlıdır.

2.5.16.4. Linalol

S. inflata (% 28.55) (Ebrahimabadi ve ark., 2010), *S. pubescens* (% 23.7) (Akhlaghi ve ark., 2011), *S. acerosa* (% 23.5) (Masoudi ve ark., 2003), *S. iberica* subsp. *stenostachya* (% 18.86) (Kaya ve ark., 2001), *S. corslcs* (% 13.4) (Pélissier ve ark., 1999), *S. byzantina* (% 12.9) (Mostafavi ve ark., 2013) ve *S. lavandulifolia*'nın (% 11.9) (Bahadori ve ark., 2020b) linalol içerdiği kayıtlıdır.

2.5.16.5. Timol

S. pubescens (% 35.5) (Akhlaghi ve ark., 2011), *S. byzantina* C. (% 19.0) (Manafi ve ark., 2010), *S. obliqua* L. (% 16.4) (Harmandar ve ark., 1997), *S. paslutris* (% 5.8) *S. spinosa* (% 4.5) ve *S. hydrophila*'nın (% 3.5) (Conforti ve ark., 2009) timol içerdiği kayıtlıdır.

2.5.16.6. Karvakrol

S. macrantha (% 28.8) (Renda ve ark., 2017), *S. spinosa* (% 27.9) (Conforti ve ark., 2009), *S. inflata* Benth (% 7.4) (Omidbaigi ve ark., 2006) ve *S. pubescens*'in (% 2.9) (Akhlaghi ve ark., 2011) karvakrol içerdiği kayıtlıdır.

2.5.16.7. Germakren D

S. sylvatica çiçekleri (% 55.2) ve yapraklarının (% 31.7) (Tirillini ve ark., 2004), *S. germanica* subsp. *salviifolia* yaprakları (% 39.4) ve çiçeklerinin (% 12.8) (Giuliani ve ark., 2009), *S. byzantina* (% 37.0) (Manafi ve ark., 2010), *S. obliqua* L. (% 25.4) (Harmandar ve ark., 1997), *S. lavandulifolia* (% 22.5) (Bahadori ve ark., 2020b), *S. salviifolia* (% 22.3) (Vundac ve ark., 2006), *S. inflata* (% 21.6) (Bahadori ve ark., 2020b), *S. officinalis* (L.) Trevis (% 20.1), *S. recta* L. subsp. *subcrenata* (Vis) Briq. (% 19.7) (Vundac ve ark., 2006), *S. schtschegleevii* (% 18.6) (Sonboli ve ark., 2005), *S. macrostachya* (Wend.) Briq. (% 12.19) (Karaoglan ve ark., 2021) ve *S. cretica* ssp. *vacillans*'ın (% 9.5) (Conforti ve ark., 2009) germakren D içerdiği belirtilmiştir.

2.5.16.8. *β*-Karyofilen

S. viticina (% 62.3), *S. balansae* subsp. *carduchorum* (% 29.9), *S. sericantha* (% 23.2), *S. tmolea* (% 19.7), *S. balansae* subsp. *balansae* (% 17.9), *S. obliqua* (% 16.7), *S. germanica* subsp. *heldreichii* (% 15.7), *S. cretica* subsp. *smyrnaea* (% 14.8), *S. germanica* subsp. *bithynica* (% 14.8), *S. huber-morathii* (% 14.5), *S. cretica* subsp. *lesbiaca* (%

12.5), *S. huetii* (% 12.4), *S. cretica* subsp. *bulgarica* (% 11.8), *S. pinetorum*'un (% 11.3) *β*-karyofilen içerdiği kayıtlıdır (Goren ve ark., 2011).

2.5.16.9. *α*-Kadinol

S. cretica subsp. *garana* (% 16.4) (Goren ve ark., 2011), *S. recta* L. subsp. *subcrenata* (Vis) Briq. (% 9.5) (Vundac ve ark., 2006), *S. cretica* subsp. *lesbiaca* (% 7.4) (Goren ve ark., 2011), *S. byzantina* (% 6.8) (Mostafavi ve ark., 2013), *S. cretica* subsp. *kutahyensis* (% 5.7), *S. cretica* subsp. *smyrnaea* (% 5.4), *S. longispicata* (% 5.3) ve *S. huetii*'nin (% 5.2) (Goren ve ark., 2011) *α*-kadinol içerdiği kayıtlıdır.

2.5.16.10. Nonanal

S. alpina L. (% 9.8), *S. recta* L. subsp. *recta* (% 3.0) ve *S. palustris*'in (% 2.9) nonanal içerdiği kayıtlıdır (Vundac ve ark., 2006).

2.5.16.11. (2*E*)-Hekzenal

S. sylvatica (% 7.3) (Renda ve ark., 2017), *S. inflata* Benth. (% 4.62) (Ebrahimabadi ve ark., 2010) ve *S. annua* ssp. *annua* var. *annua*'nın (% 1.1) (Renda ve ark., 2017) (2*E*)-hekzenal içerdiği kayıtlıdır.

2.5.16.12. (*E*)-2-Hekzenal

S. palustris (% 16.3) ve *S. alpina*'nın (% 4.5) (*E*)-2-hekzenal içerdiği belirtilmiştir (Vundac ve ark., 2006).

3. MATERYAL VE METOT

Bu tez çalışması için Eczacılık Fakültesi Dekanlığı Birim Etik Kurulundan 12.04.2022/5 numaralı karar ile izin alınmıştır.

3.1. Kullanılan Malzemeler ve Bitki Materyali

Bitki materyali Palandöken Dağı'ndan (Erzurum) Temmuz 2019'da toplanmıştır. Bir örneği Atatürk Üniversitesi Biyoçeşitlilik Uygulama ve Araştırma Merkezinde saklanmaktadır (SBE-1400 (ABBM)). Yüksek lisans tez çalışması kapsamında ekstraksiyon, izolasyon ve aktivite çalışmalarında kullanılan kimyasal malzemeler Tablo 3.1'de gösterilmiştir.

Tablo 3.1. Ekstraksiyon, izolasyon ve aktivite çalışmalarında kullanılan kimyasallar

Kimyasal Adı	Menşei	Kimyasal Adı	Menşei
Slikajel	Merck	Vanilin	Merck
Sefadeks	Sigma	Sülfirik asit	Sigma
Ters faz slikajel	Merck	Asetik asit	Sigma
Poliamit	Merck	Sodyum fosfat monobazik	Sigma
İTK plağı	Merck	Sodyum fosfat dibazik dodekahidrat	Sigma
Etil asetat	Sigma	Kojik asit	Sigma
Diklorometan	İsolab	Mushroom tirozinaz enzimi	Sigma
Hekzan	Sigma	3,4-Dihydroxy-L phenylalanine	Sigma
Metanol	İsolab	Mueller hinton broth besiyeri	Oxoid
Dötoro metanol	Eurisolab	Formik asit	İsolab
DMSO	Sigma	$DPPH^{\bullet}$	Sigma
Folin-Ciocalteu	Sigma	Etanol	Sigma
Sodyum karbonat	Sigma	Troloks	Sigma
Gallik asit monohidrat	Sigma	$ABTS^{\bullet+}$	Sigma
Potasyum persülfat	Sigma		

3.2. Ekstraksiyon ve Kolon Kromatografisi Çalışmaları

Bitki nemsiz ve havadar bir yerde kurutuldu. Uygun büyüklükte toz edildi (533 g). Balona yerleştirildi. Bir gece metanol ile masere (1500 ml) edildi. Süzgeç kağıdı ile

süzüldü. Daha sonra geri çeviren soğutucu altında mantolu ısıtıcıda 40 °C'de 3 defa 2000 ml metanol ile tekrar ekstraksiyona devam edildi. Süzgeç kağıdı ile her seferinde süzülerek, süzüntüler birleştirildi. Rotavaporda uçurularak metanol ekstresi elde edildi (123.86 g).

120 g metanol ekstresi alt fraksiyonlar elde edilmesi amacıyla 130 ml suda çözüldü. Daha sonra ayırma hunisinde 5 kez 200 ml *n*-hekzan ile ekstre edildi. *n*-Hekzan katmanı ayrıldıktan sonra, kalan sulu kısım önce 5 kez 200 ml diklorometan ile sonra 5 kez 200 ml etil asetat ile ekstre edildi. Ana metanol ekstresinden sırasıyla *n*-hekzan, diklorometan, etil asetat ve su alt fraksiyonları elde edilmiş oldu. Hepsi rotavaporda kuruluğa kadar uçuruldu.

7 g etil asetat ekstresi çözülerek, 10 g silika jel (0.063-0.200 mm) ile karıştırıldı. Kurutuldu ve silika jel kolona (85 g) kromatografik ayrım yapmak üzere kuru tatbik yapıldı. 90:10:1 (Diklorometan: Metanol: Su) solvan sistemi ile elüsyona başlandı (500 ml), sonra sırasıyla 80:20:2 (1500 ml), 70:30:3 (1500 ml), 65:35:5 (500 ml), 50:50:5 (1000 ml) solvan sistemleri geçirildi. Tüplere toplandı. İnce tabaka kromatografisine tatbik yapıldı. UV_{254}-UV_{366} altıda incelendi. % 1'lik vanilin sülfirik asit püskürtülerek etüvde ısıtıldı. Benzer fraksiyonlar tespit edilerek birleştirildi. 46-52. tüplerde oluşan çökelek metanol ile yıkanarak saf olarak elde edildi (SME).

3.3. Yapı Tayini

SME bileşiğinin yapısı spektroskopik yötemler ile aydınlatılmıştır. Q-TOF spektrumu Atatürk Üniversitesi Doğu Anadolu İleri Teknoloji Uygulama ve Araştırma Merkezinde (DAYTAM), NMR spektrumları ise Atatürk Üniversitesi Fen Fakültesi Kimya Bölümü ve İnönü Üniversitesi Bilimsel ve Teknolojik Araştırma Merkezinde (İBTAM) çekilmiştir.

3.4. Antimikrobiyal Etkinin Mikrodilisyon Yöntemi ile Belirlenmesi

Çalışmada *Escherichia coli* (ATCC 25922), *Klebsiella pneumoniae* (ATCC 700603), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 9027) *Staphylococcus aureus* (ATCC 29213) ve *Enterococcus faecalis* (ATCC 29212) standart bakteri suşları kullanılmıştır. Örneklerin *in vitro* antimikrobiyal etkinlikleri Klinik ve Laboratuvar Standartları Enstitüsü önerileri doğrultusunda mikrodilüsyon yöntemi ile test edilmiştir (CLSI, 2017). Bu yöntemde Mueller Hinton sıvı besiyeri kullanılarak her bir örneğin çift kat sulandırımları hazırlandı (Test maddeleri için 1024 µg/mL-1 µg/mL ve sülfomerazin için 3200 µg/mL-6.25 µg/mL). Son konsantrasyonları 10^5 CFU / mL olacak şekilde hazırlanan mikroorganizmalar ve sulandırımları hazırlanan test maddeleri steril 96 kuyucuklu plakların ilgili kuyucuklarına 50 µL ye 50 µL olacak şekilde eklendi ve plaklar 24-48 saat 37 °C'de inkübe edildi. İnkübasyon sonunda gözle görülür bulanıklığın olmadığı en düşük konsantrasyonlar MİK olarak belirlendi.

3.5. Antioksidan Aktivite Tayini

3.5.1. Toplam Fenolik Bileşik Miktar Tayini

Örneklerin toplam fenolik bileşik miktarlarını belirlemek için Folin ve Denis tarafından geliştirilen, Singleton tarafından modifiye edilen yöntem uygulandı (Folin & Denis, 1912; Slinkard & Singleton, 1977). Gallik asit standart fenolik bileşik kullanıldı. Öncelikle 100, 200, 400, 500 ve 600 µg/ml konsantrasyonda gallik asit çözeltileri hazırlandı, her bir çözeltiden 1 ml alınarak 23 ml'ye (distile su ile) tamamlandı. Tamamlama yapıldıktan sonra Folin-Ciocalteu Reaktifi (FCR) 0.5 ml eklenerek ve 3 dakika sonra % 2 sodyum karbonat (Na_2CO_3) çözeltisi 1.5 ml ilave edildi. Oda sıcaklığında manyetik karıştırıcıda 2 saat karıştırıldıktan sonra absorbanslar 760 nm'de ölçüldü. Kör olarak distile su kullanıldı. Deney sonucunda okunan absorbanslar konsantrasyona karşı grafiğe alındı ve gallik asit standart grafiği elde edildi.

Örneklere ait numunelerin hazırlanması için her bir örneğin stok çözeltisi (1 mg/ml) hazırlandı. Bu stok çözeltilerin her birinden 1 ml alınarak hacim 23 ml'ye distile suyla tamamlandı. Tamamlama yapıldıktan sonra sırasıyla 0.5 ml FCR ve 3 dk sonra da % 2'lik Na_2CO_3 (1.5 ml) eklendi. Oda sıcaklığında iki saat manyetik karıştırıcıda karıştırıldıktan sonra numunelerin absorbansları 760 nm'de distile sudan oluşan köre karşı ölçüldü. Ölçümler üç tekrarlı gerçekleştirildi. Absorbans değerlerine karşı gelen gallik asit eşdeğerleri standart grafikteki denklem yardımıyla elde edildi. Gallik asit eşdeğeri (GAE) ve mikrogram olarak sonuçlar belirtildi.

3.5.2. DPPH• Radikali Süpürücü Kapasite Tayini

Çalışmada 1 mM'lık DPPH• çözeltisi serbest radikal olarak kullanılmıştır. Örneklerin farklı konsantrasyonlarda (10-60 µg/mL) stok çözeltileri hazırlanmıştır. Mikroplakaya her bir stok çözelti (210 µl) ve DPPH• çözeltisi (70 µl) eklenmiştir. Ortalama 1 dakika karıştırılan numuneler oda sıcaklığında ve karanlıkta 30 dakika inkübe edilmiştir. Örneklerin absorbansları kör olarak kullanılan etanole karşı 517 nm'de ölçülmüştür. Kontrol olarak 210 µl etanol ve 70 µl DPPH• çözeltisi kullanılmıştır. Yüzde inhibisyon değerleri aşağıda belirtilen formül ile hesaplanmıştır (Blois, 1958).

DPPH• giderme aktivitesi (%) = $[A_{kontrol}-A_{örnek} / A_{konrol}] \times 100$

A_{Numune}: DPPH• radikal çözeltisine numune ilave edildikten sonra bulunan absorbans değeri

$A_{Kontrol}$: Yalnızca DPPH• radikal çözeltisi içeren kontrolün absorbans değeri

Troloks pozitif kontrol olarak kullanılmıştır.

3.5.3. $ABTS^{\bullet+}$ Süpürücü Kapasite Tayini

Re ve arkadaşları tarafından yapılan çalışmaya göre $ABTS^{\bullet+}$ katyon radikali süpürme kapasitesi gerçekleştirilmiştir (Re ve ark., 1999). 2 mM $ABTS^{\bullet+}$ çözeltisi

hazırlanıp, çözeltiye 1:1 oranında, 2.45 mM potasyum persülfat çözeltisi eklenerek $ABTS^{\bullet+}$ katyon radikali elde edilmiştir. Örneklerden hazırlanan farklı konsantrasyonlardaki stok çözeltiler (140 µl) ve $ABTS^{\bullet+}$ çözeltisi (100 µl) kuyucuklara ilave edildi. 1 dakika çalkalama işlemi gerçekleştirildi. Kontrol numunesi olarak 140 µl fosfat tampon (0.1 M, pH = 7.4) ve 100 µl $ABTS^{\bullet+}$ çözeltisi kullanıldı. Kontrol numunesinin 734 nm'de absorbans değerinin 0.700 ± 0.025 olması beklendi. 30 dakika sonunda absorbanslar tampondan oluşan köre karşı 734 nm'de ölçüldü. Troloks standart olarak kullanıldı. Test maddelerinin $ABTS^{\bullet+}$ katyon radikali süpürme kapasitelerinin yüzde değerleri belirtilen denkleme göre yapıldı (Re ve ark., 1999).

$ABTS^{\bullet+}$ süpürme kapasitesi (%) = $[A_{kontrol}-A_{örnek} / A_{konrol}] \times 100$

A_{numune}: $ABTS^{\bullet+}$ çözeltisine numunelerin ilavesinden sonra bulunan absorbans değeri

$A_{kontrol}$: Yalnızca $ABTS^{\bullet+}$ ve tampon çözelti içeren kontrol numunesinin absorbans değeri

3.6. Tirozinaz Enzim İnhibisyonu Yöntemi

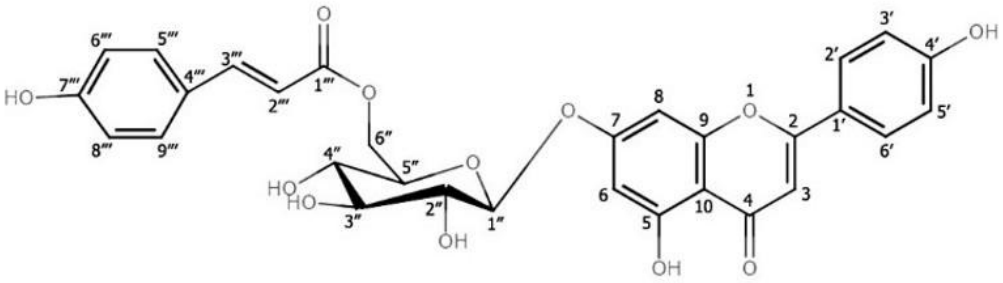
3,4-dihidroksil-L-fenilalanin (L-DOPA)'nın substrat olarak kullanıldığı Masuda'nın metoduna göre gerçekleştirilmiştir (Masuda ve ark., 2005). Pozitif kontrol olarak kojik asit kullanılmıştır. Farklı konsantrasyonlarda 80 µL fosfat tamponu (pH=6.5), 40 µL test çözeltisi ve 40 µL tirozinaz solüsyonu 96 kuyucuklu mikroplakaya uygulanarak 23°C'de 10 dakika inkübasyona bırakılmıştır (A: Fosfat tamponu ve enzim; B: Fosfat tamponu; C: Fosfat tamponu, enzim ve örnek; D: Fosfat ve örnek). 40 µL L-DOPA tüm kuyucuklara eklenip 23°C'de 10 dakika inkübe edilmiş ve 490 nm'de absorbansları ölçülmüştür. Yüzde ihhibisyonları aşağıdaki formüle göre hesaplanmıştır.

% İnhibisyon değeri: [[(A-B)-(C-D)]/(A-B)]×100

4. BULGULAR

4.1. İzolasyon Sonuçları

4.1.1. Apigenin-7-*O*-*β*-D-(6″-kumaroil)-glukopiranozit (SME)



Şekil 4.1. Apigenin-7-*O*-*β*-D-(6″-kumaroil)-glukopiranozit (SME) molekül formülü

$C_{30}H_{26}O_{12}$ (M.A. 578.14)

Şekil 4.2 ve Şekil 4.3: SME ^{1}H-NMR (400 *MHz*) Spektrumları (DMSO-d_6)

Şekil 4.4 ve Şekil 4.5: SME ^{13}C-NMR (100 *MHz*) Spektrumları (DMSO-d_6)

Şekil 4.6-4.8: SME COSY (400 *MHz*) Spektrumları (DMSO-d_6)

Şekil 4.9-4.13: SME HMQC Spektrumları (DMSO-d_6)

Şekil 4.14 ve Şekil 4.15: SME HMBC Spektrumları (DMSO-d_6)

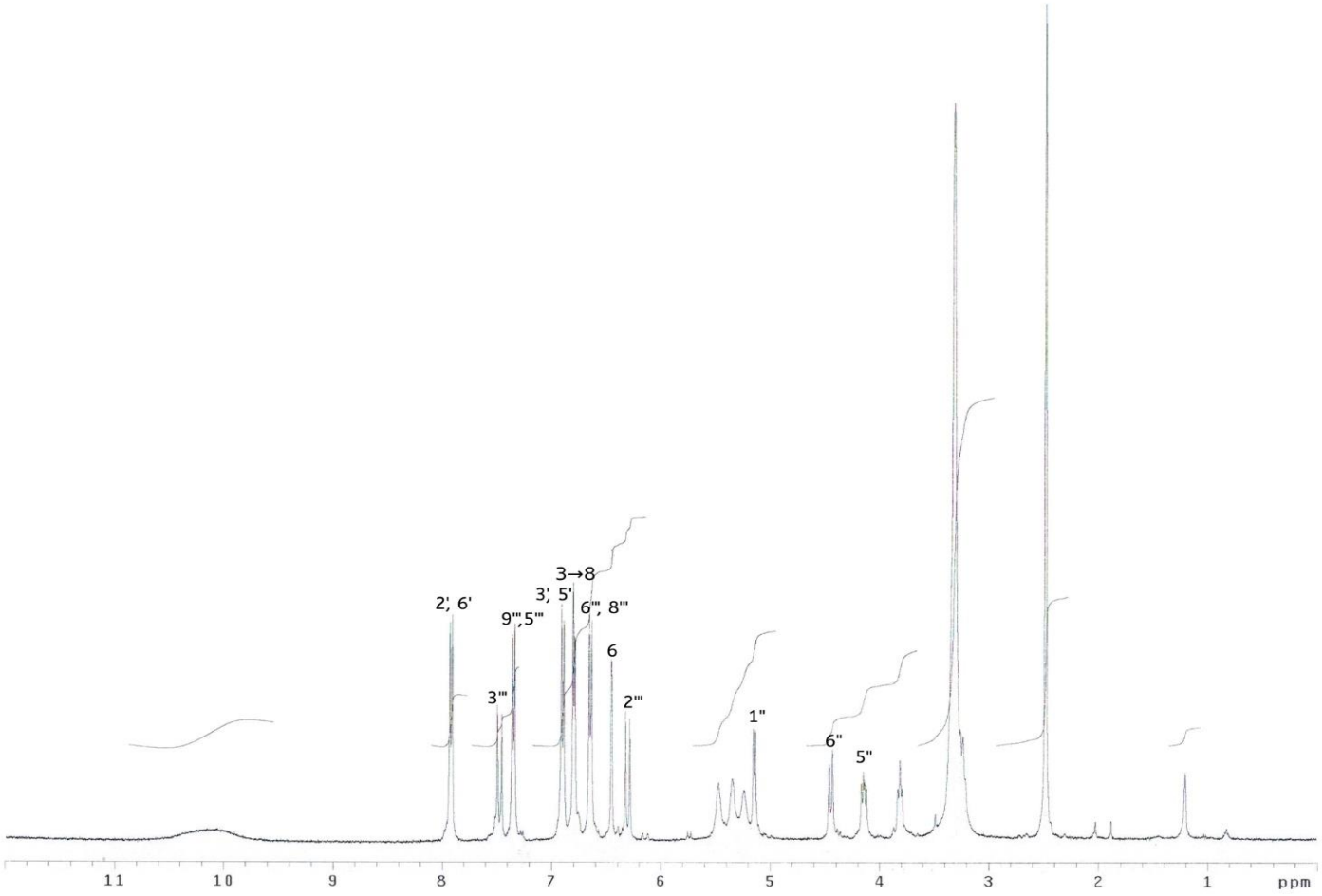
Şekil 4.16: SME Q-TOF Spektrumu

Tablo 4.1. Apigenin-7-*O*-*β*-D-(6″-kumaroil)-glukopiranozit (SME) ^{13}C-NMR, ^{1}H-NMR spektrum değerleri

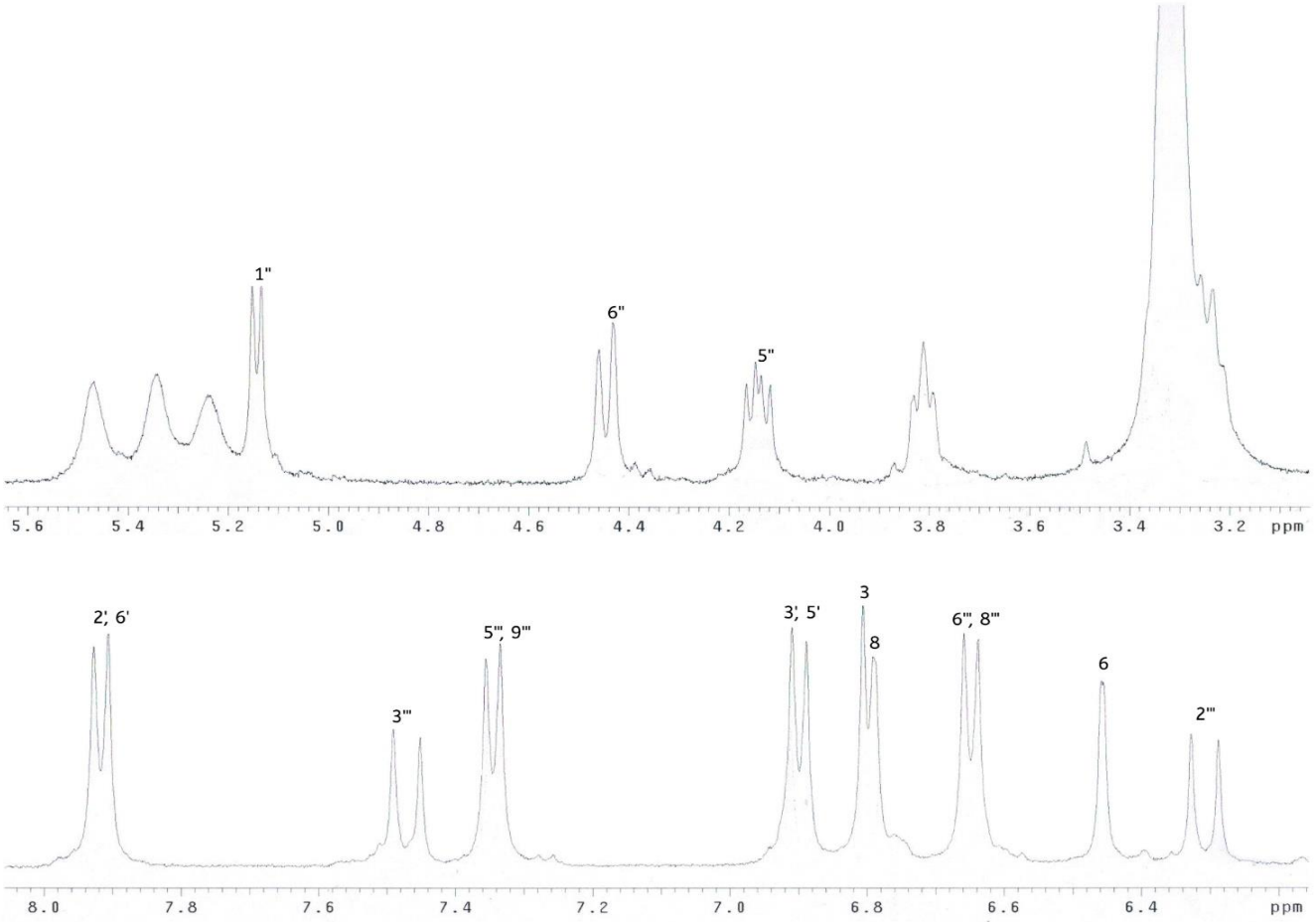
C atomu	^{13}C δ (ppm)	^{1}H δ (ppm)	HMBC
2	164.9		
3	103.7	6.80 *s*	2, 4
4	182.7		
5	162.1		
6	100.1	6.46 *gs*	5, 7
7	163.4		
8	95.4	6.79, *d*, *J* = 2.4 *Hz*	7, 9
9	157.6		
10	106.0		
1'	121.6		
2'	129.2	7.91, *d*, *J* = 8.8 *Hz*	2, 4'
3'	116.7	6.90, *d*, *J* = 8.4 *Hz*	4'
4'	161.8		
5'	116.7	6.90, *d*, *J* = 8.4 *Hz*	4'
6'	129.2	7.91, *d*, *J* = 8.8 *Hz*	2, 4'
1"	100.0	5.14, *d*, *J* = 7.3 *Hz*	7
2"	76.9	3.24-3.81 *Hz*	
3"	73.6	3.24-3.81 *Hz*	
4"	70.6	3.24-3.81 *Hz*	
5"	74.5	4.14 *Hz*, *m*	1'"
6"	64.1	4.44, *d*, *J* = 10.6 *Hz*	1'"
1'"	167.1		
2'"	114.4	6.30, *d*, *J* = 16.1 *Hz*	1'"
3'"	145.6	7.47, *d*, *J* = 16.1 *Hz*	1'"
4'"	125.5		
5'"	130.8	7.34, *d*, *J* = 8.4 *Hz*	3'", 7'"
6'"	116.3	6.64, *d*, *J* = 8.4 *Hz*	7'"
7'"	160.5		
8'"	116.3	6.64, *d*, *J* = 8.4 *Hz*	7'"
9'"	130.8	7.34, *d*, *J* = 8.4 *Hz*	3'", 7'"

SME bileşiğinin İTK plağında çıplak gözle bakıldığında sarı renkli, herhangi bir reaktif kullanmadan UV_{254} nm'de leke şeklinde, UV_{366} nm'de koyu mor, vanilin/H_2SO_4 ile etüvde 100-110 ºC'de ısı ile sarı renkli olması flavonoit olabileceğini akla getirmiştir.

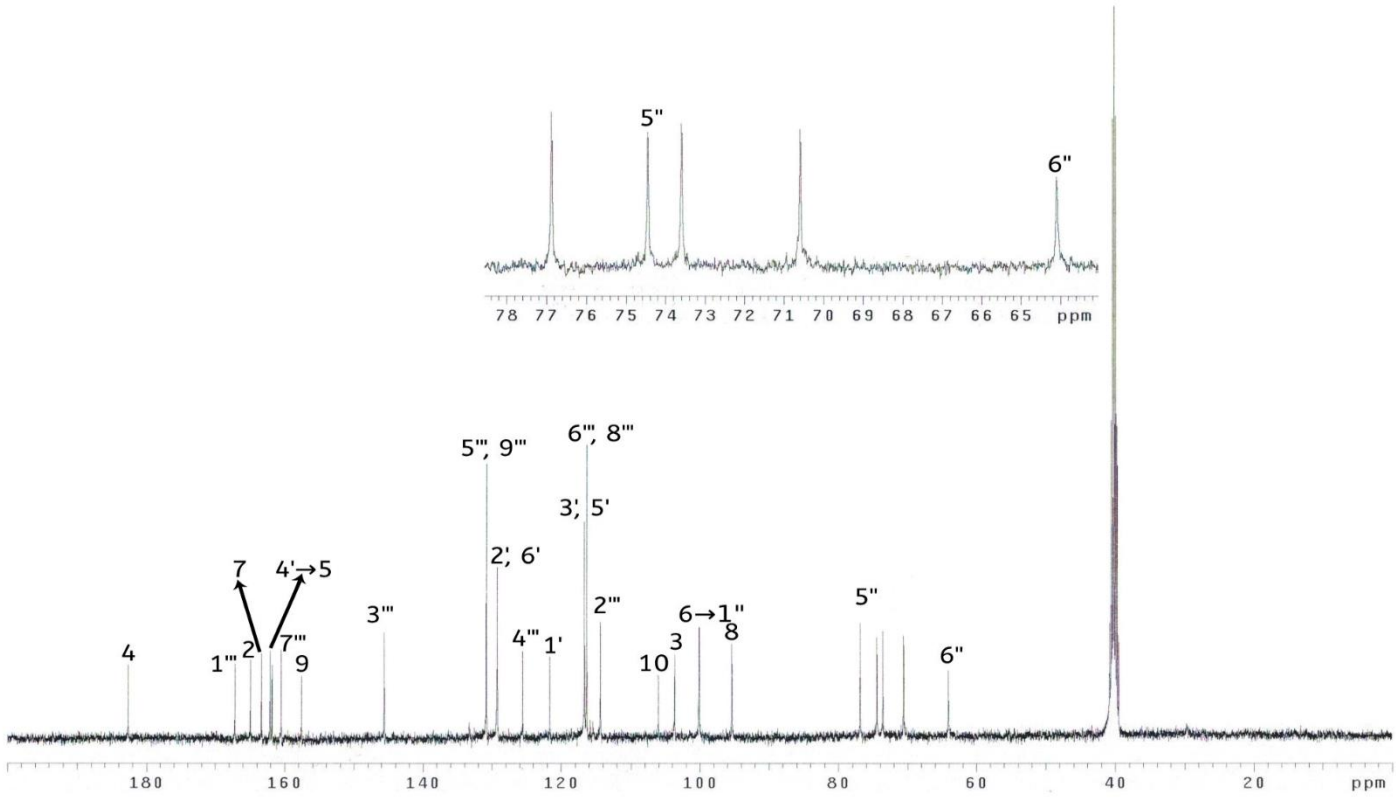
^{1}H NMR spektrumu incelendiğinde δ 6.80 (*s*, H3), δ 6.46 (*gs*, H6) ve δ 6.79, (*d*, *J* = 2.4 *Hz*, H8), δ 7.91 (2H, *d*, *J* = 8.8 *Hz*, H2', H6') ve δ 6.90 (2H, *d*, *J* = 8.4 Hz, H3', H5') ppm'de aglikonun sinyalleri gözlenmiştir. δ 6.64 (2H, *J* = 8.6 *Hz*) ve δ 7.34 (2H, *J* = 8.4 *Hz*) ppm'de gözlenen sinyallerin sırasıyla moleküldeki kumaroilin H6''', H8''' ve H5''', H9''' protonlarına ait olduğu belirlenmiştir. δ 7.47 (H3''') ve δ 6.30 (H2''') ppm'de gözlenen protonlar arasındaki eşleşme sabitinin 16.1 Hz olması trans konumunda olduğunu göstermiştir. δ 5.14 ppm'deki sinyalin ozun anomerik protonuna ait olduğu ve *J* = 7.3 *Hz* değerinden *β* konfigürasyonda olduğu tespit edilmiştir. ^{13}C-NMR spektrumunda molekülün 30 karbonlu olduğu, 64.1-76.9 ppm arasında gözlenen sinyaller ise molekülde oz olduğunu göstermiştir. 116.7 ppm'de gelen sinyalin C-3', C-5', 129.2 ppm'de gelen sinyalin C-2', C-6' karbonlarına ait olduğu belirlenmiştir. 64.1 ppm'de gelen sinyalin glikozun 6'' karbonuna ait olduğu literatür ile desteklenmiştir. HMQC spektrumu ile hangi protonun hangi karbon üzerinde olduğu tespit edilmiştir. HMBC spektrumu incelendiğinde δ C 163.4 ppm'deki C-7 ile anomerik protonun (H-1'') korelasyonu, glikozun 7. karbondan bağlı olduğunu göstermiştir. HMBC spektrumunda gözlenen 167.1 ppm'de C-1''' sinyali ile δ 4.44 ppm'deki (H-6'') etkileşim kumaroil grubunun bağlantısının glikozun 6'' nolu karbonundan olduğunu göstermiştir. ^{1}H NMR ve ^{13}C-NMR değerleri Tablo 4.1'de gösterilmiştir. Molekülün apigenin-7-*O*-*β*-D-(6″-kumaroil)-glukopiranozit olduğu literatür ile desteklenmiştir (Aderogba ve ark., 2019; Itokawa ve ark., 1981; Ashour 2015). Molekül yapısı Şekil 4.1'de gösterilmiştir.



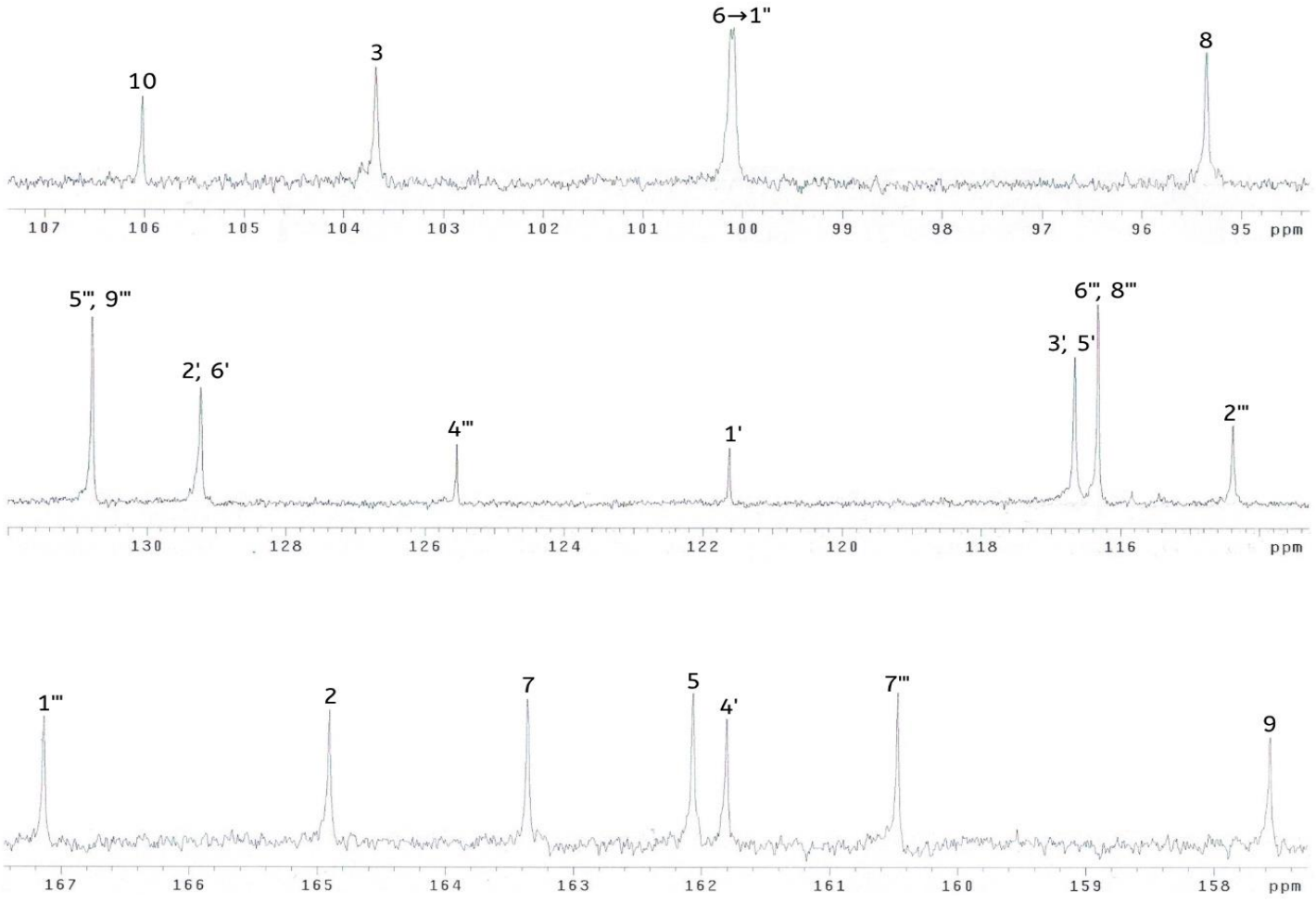
Şekil 4.2. SME ^{1}H-NMR (400 *MHz*) Spektrumu (DMSO-d_6)



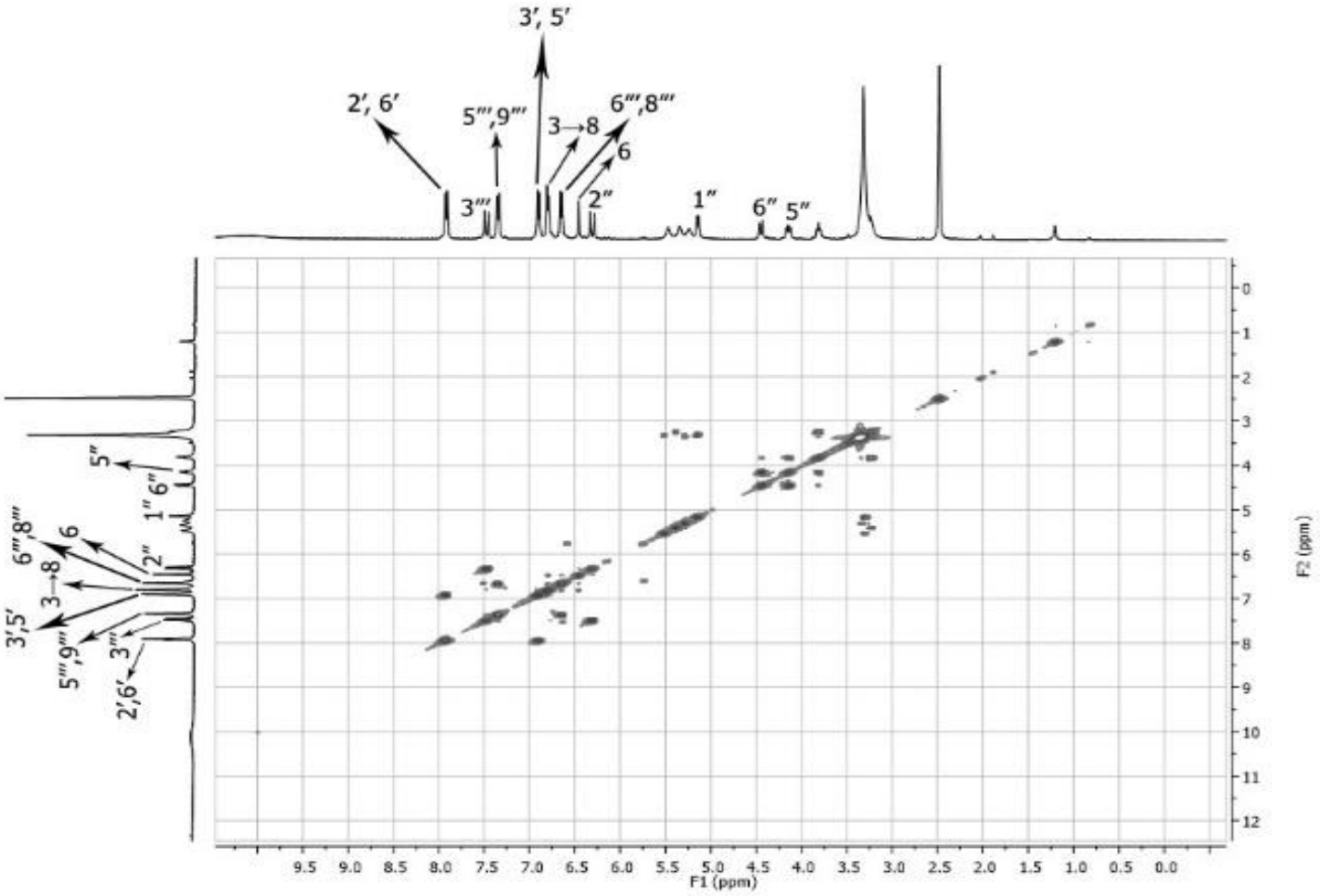
Şekil 4.3. SME ^{1}H-NMR (400 *MHz*) Spektrumu (DMSO-d_6)



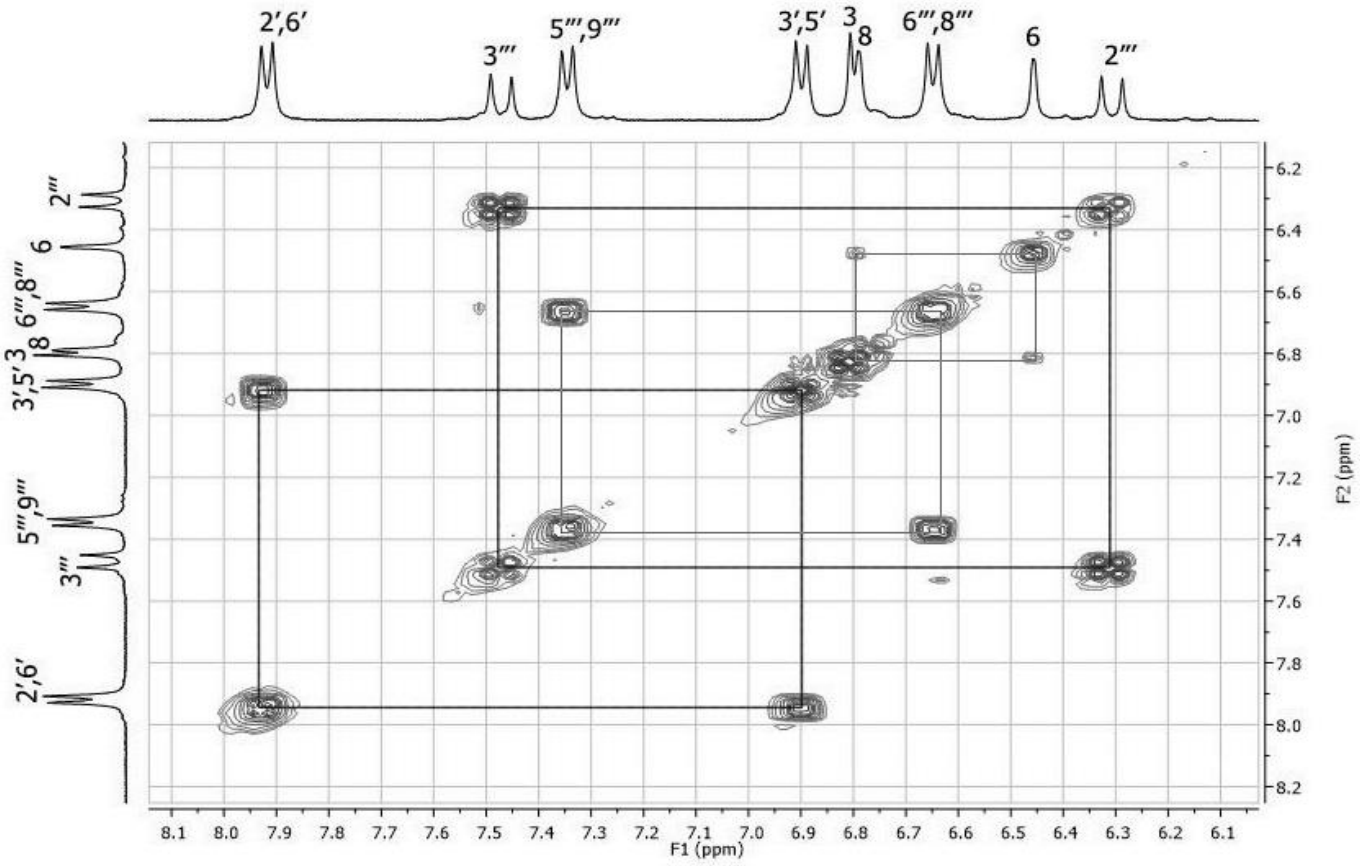
Şekil 4.4. SME ^{13}C-NMR (100 *MHz*) Spektrumu (DMSO-d_6)



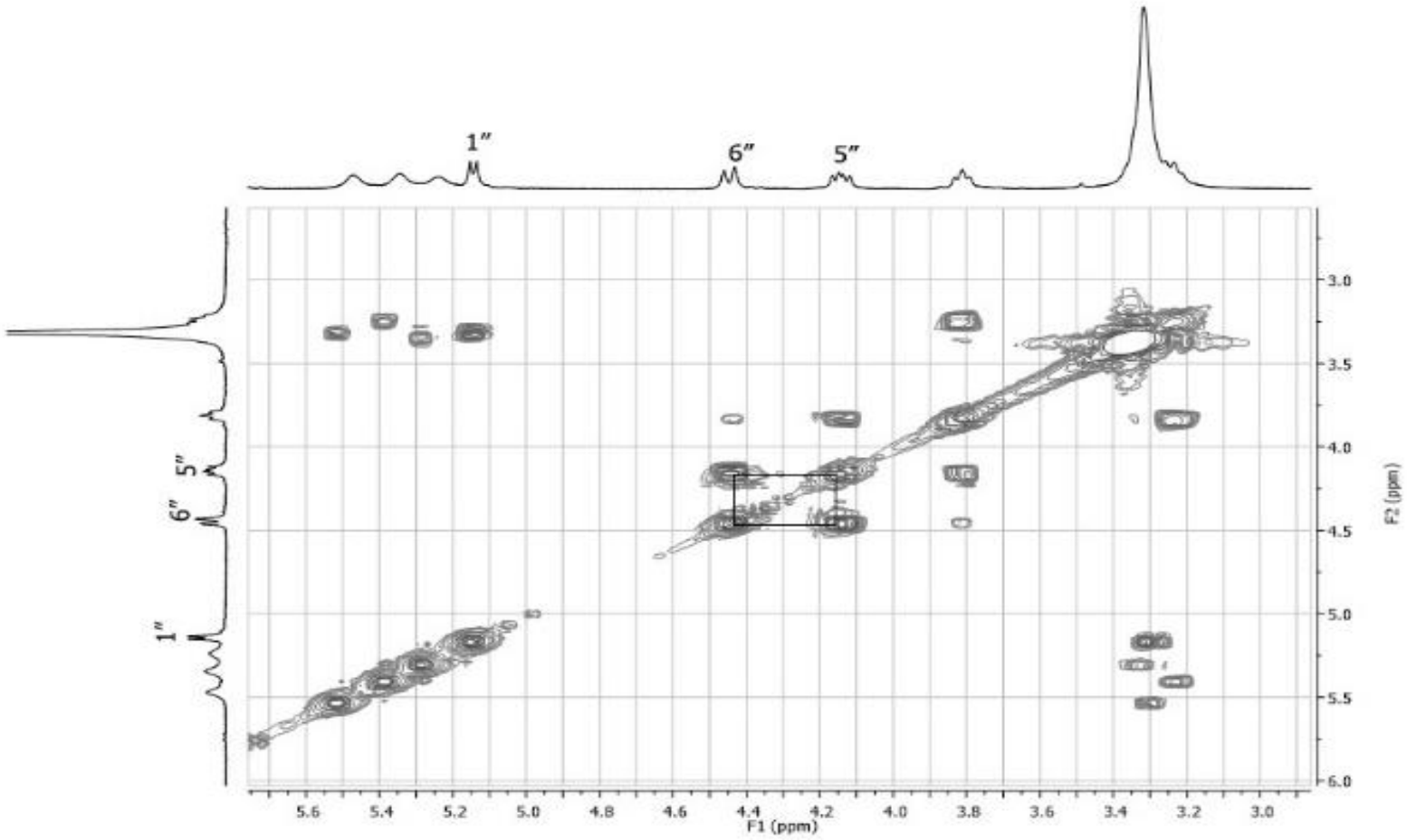
Şekil 4.5. SME ^{13}C-NMR (100 *MHz*) Spektrumu (DMSO-d_6)



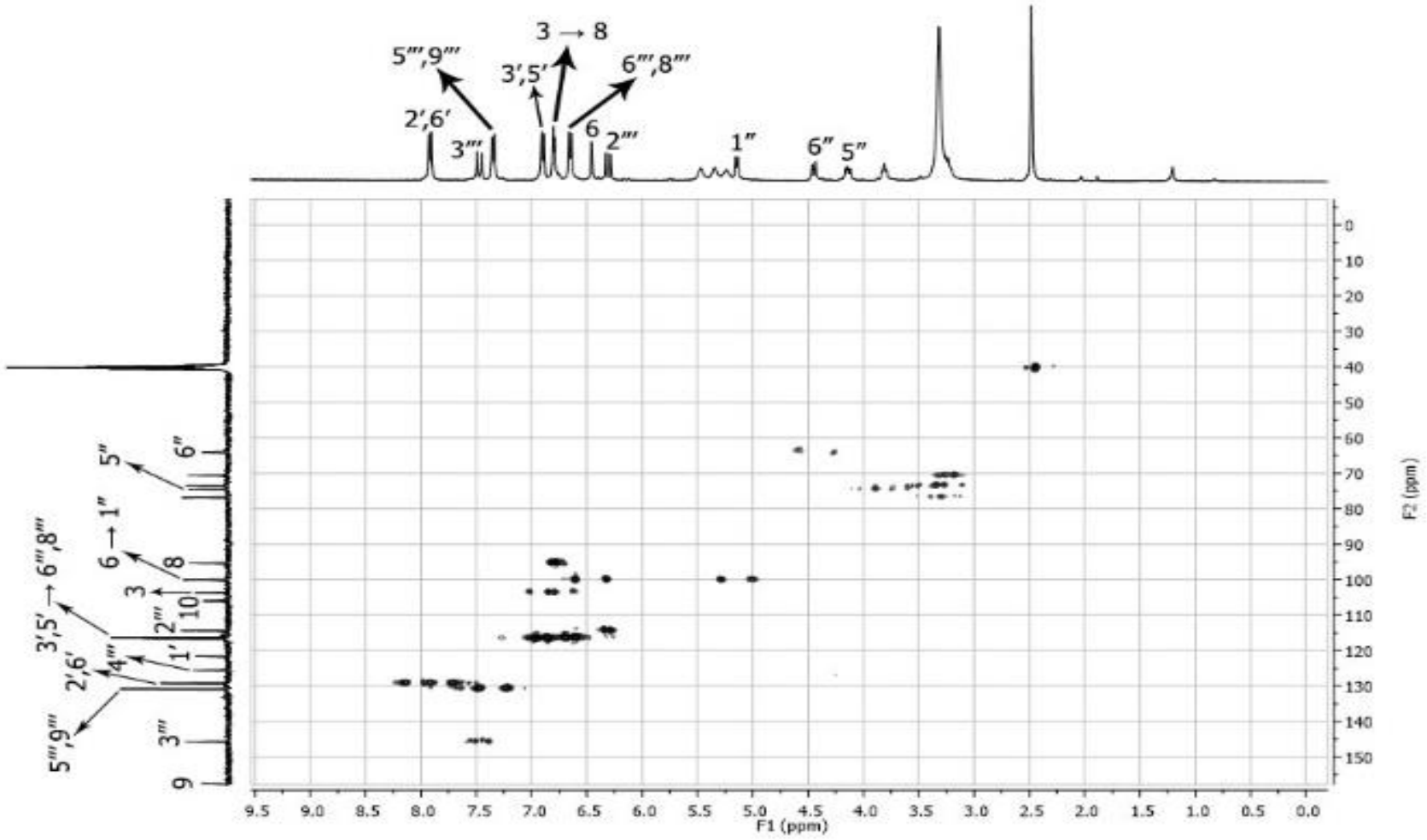
Şekil 4.6. SME COSY (400 *MHz*) Spektrumu (DMSO-d_6)



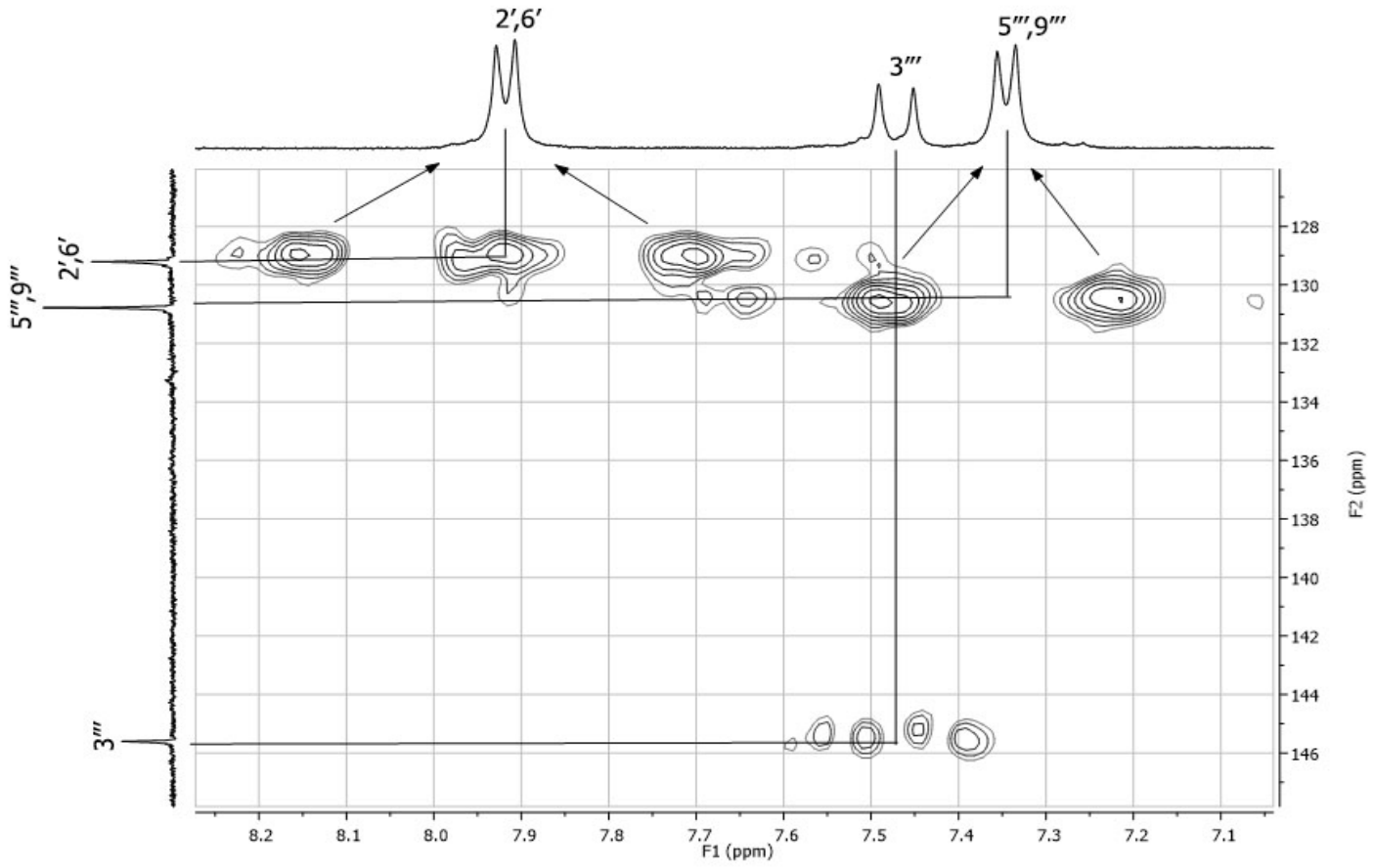
Şekil 4.7. SME COSY (400 *MHz*) Spektrumu (DMSO-d_6)



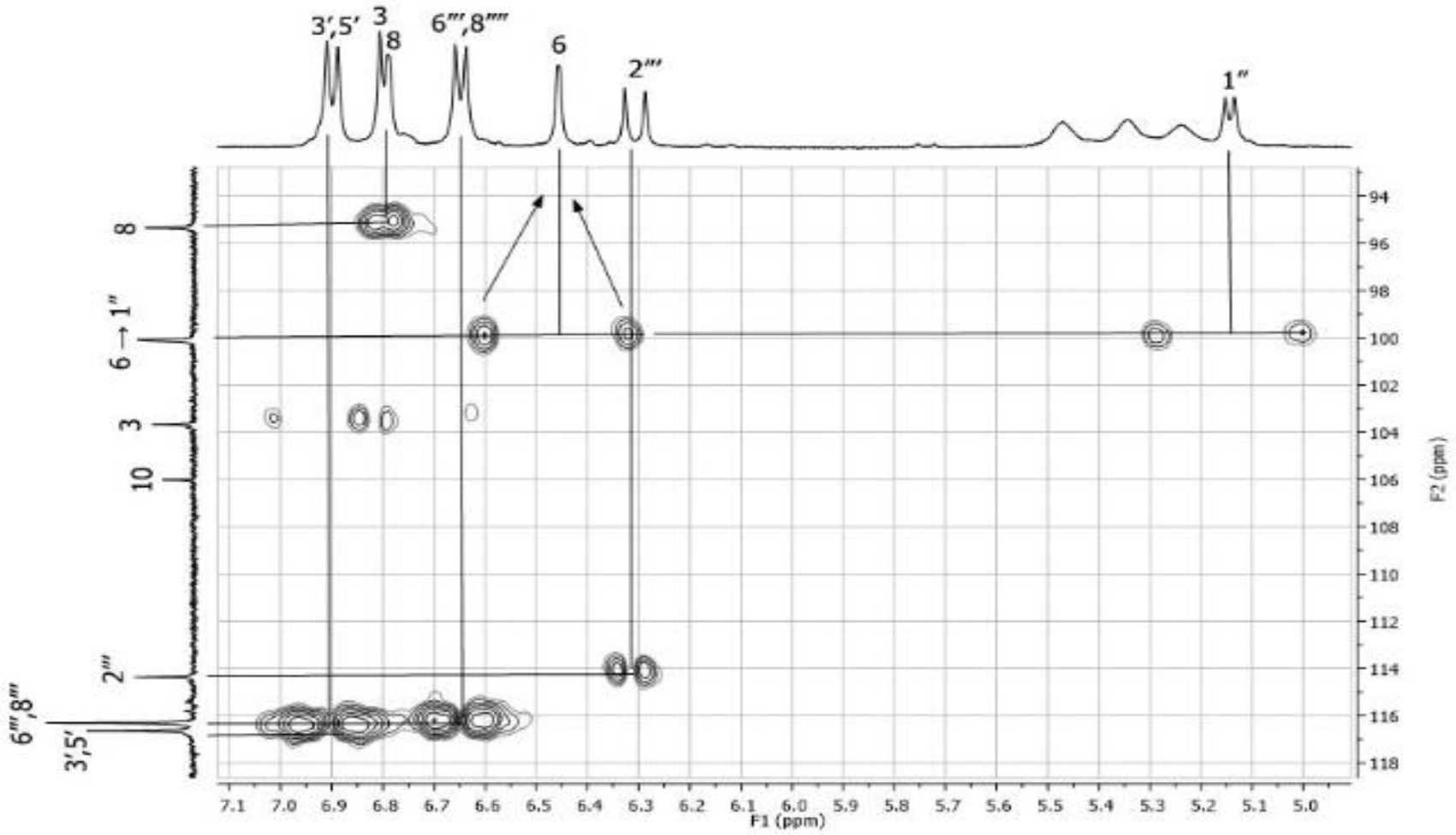
Şekil 4.8. SME COSY (400 *MHz*) Spektrumu (DMSO-d_6)



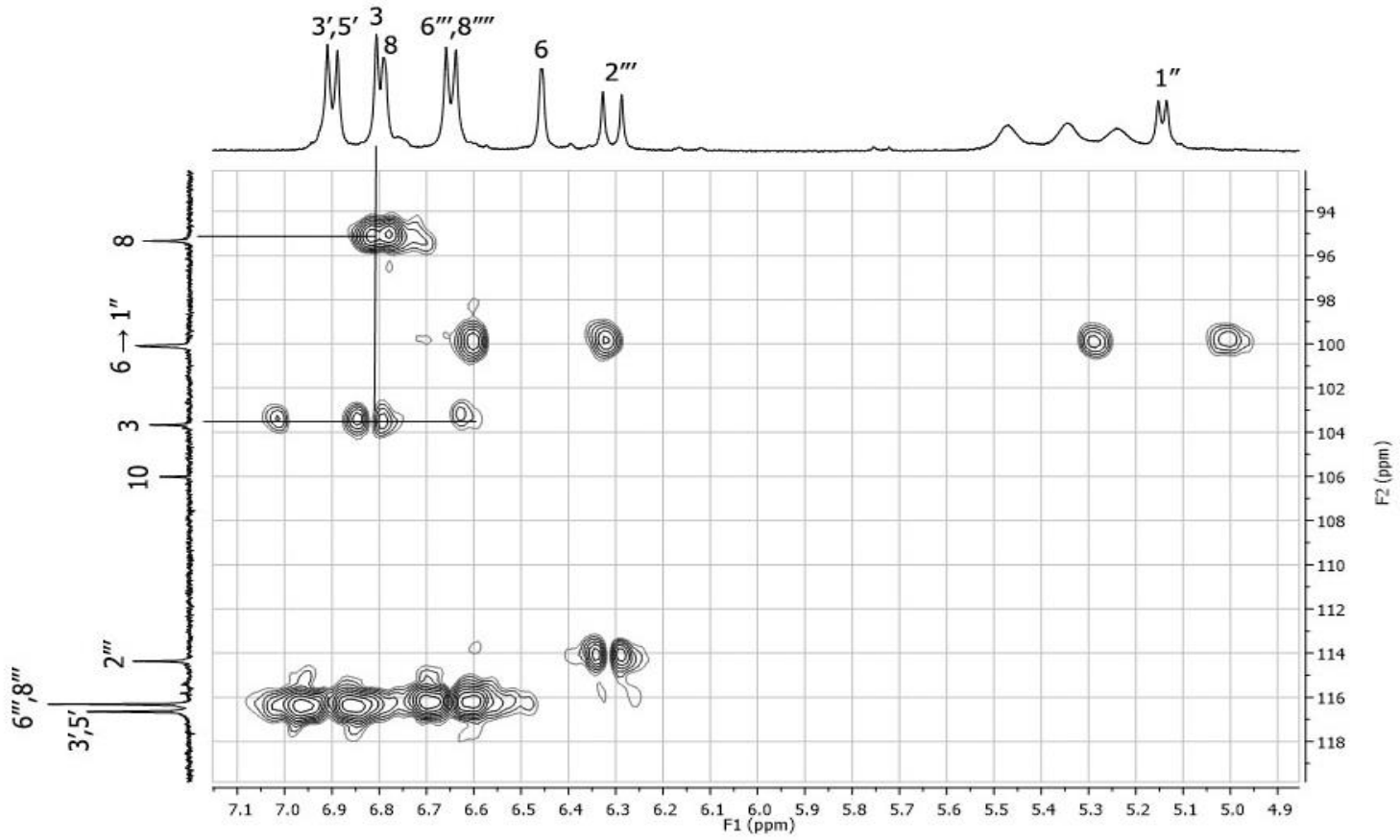
Şekil 4.9. SME HMQC Spektrumu (DMSO-d_6)



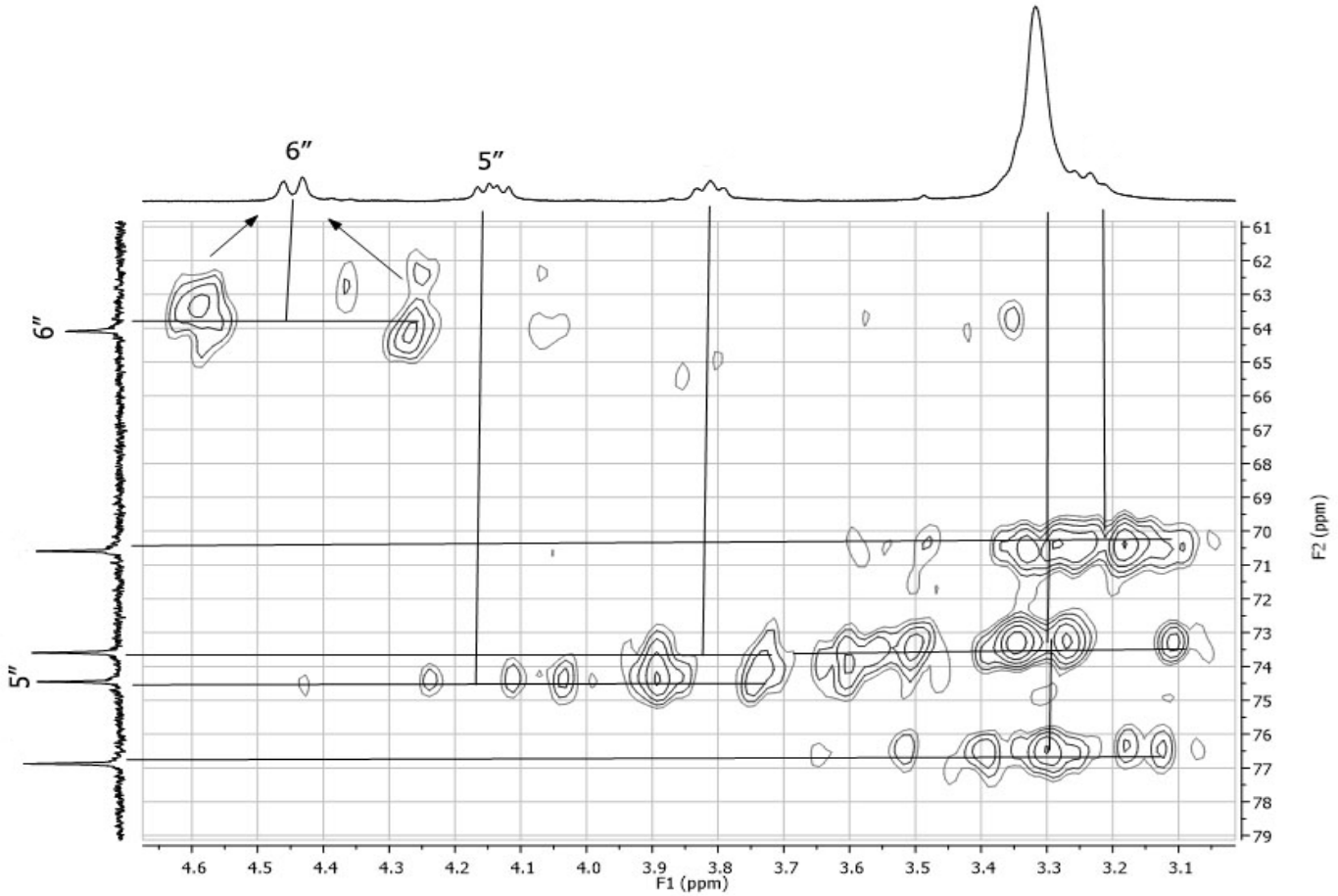
Şekil 4.10. SME HMQC Spektrumu (DMSO-d_6)



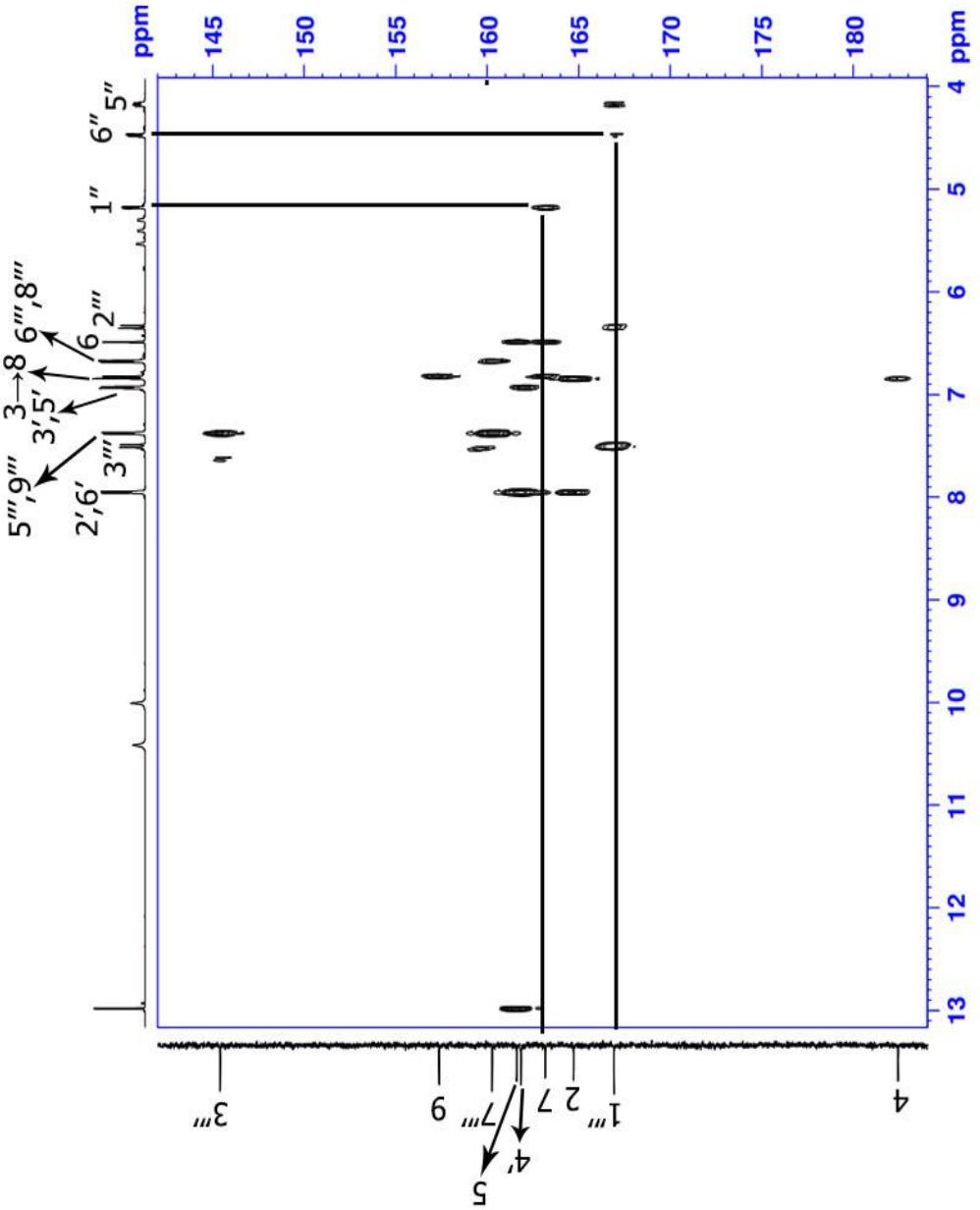
Şekil 4.11. SME HMQC Spektrumu (DMSO-d_6)



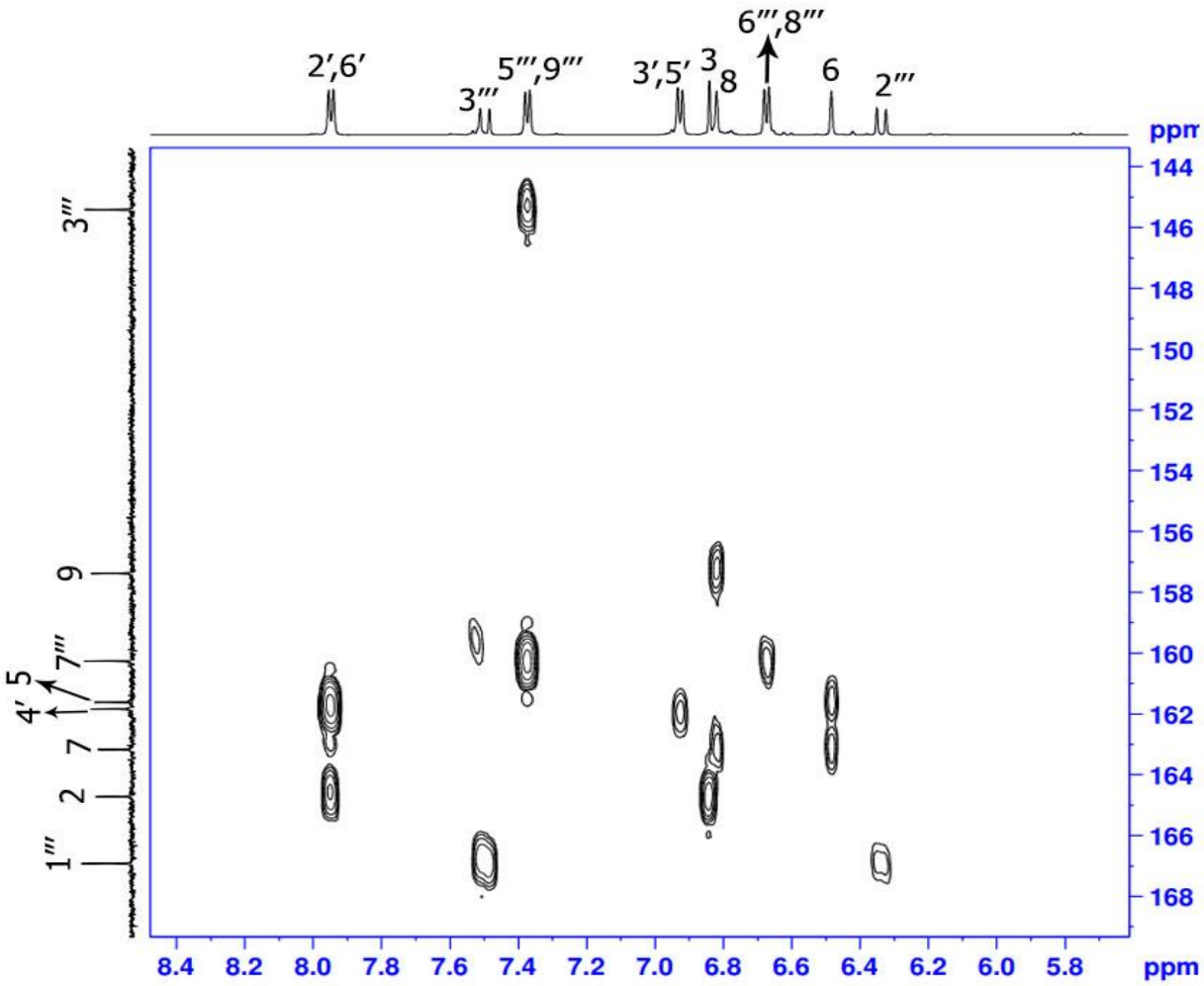
Şekil 4.12. SME HMQC Spektrumu (DMSO-d_6)



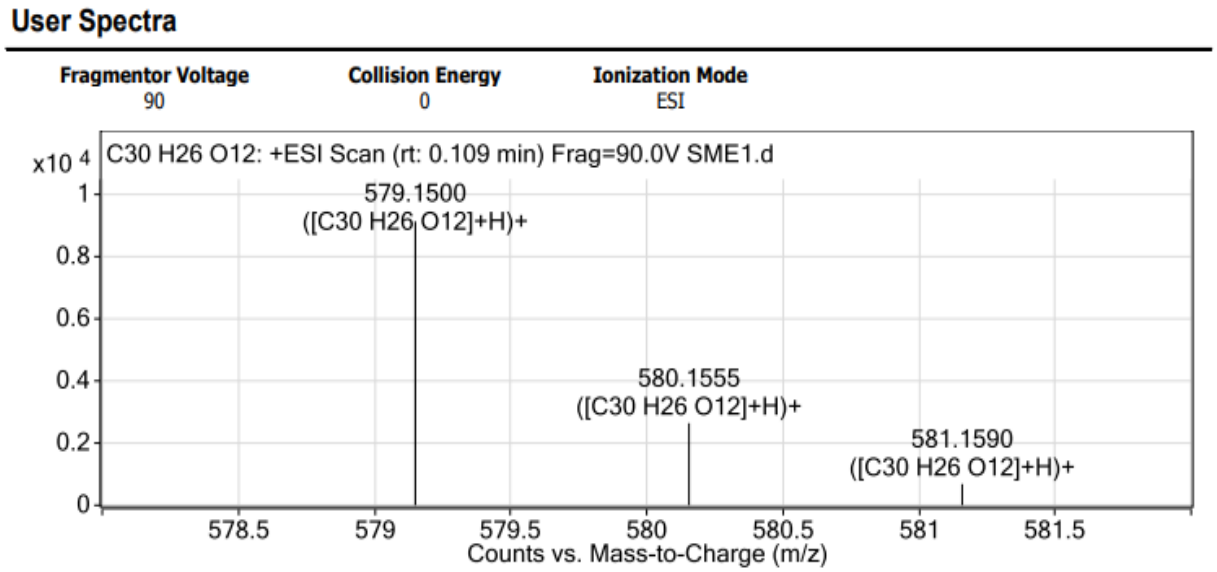
Şekil 4.13. SME HMQC Spektrumu (DMSO-d_6)



Şekil 4.14. SME HMBC Spektrumu (DMSO-d_6)



Şekil 4.15. SME HMBC Spektrumu (DMSO-d_6)



Şekil 4.16. SME Q-TOF spektrumu

4.2. Antimikrobiyal Aktivite Sonuçlar

Tüm ekstreler ve SME *E. coli*, *K. pneumonia* ve *P. aeruginosa*'ya karşı sülfomerazin'den daha yüksek etki göstermiştir. *S. aureus* ve *E. faecalis*'e karşı ise en yüksek etkiyi metanol ve su ekstreleri göstermiştir. Ekstrelerin ve SME'nin test bakterilerilerine karşı MİK değerleri (µg /mL) Tablo 4.2'de gösterilmiştir.

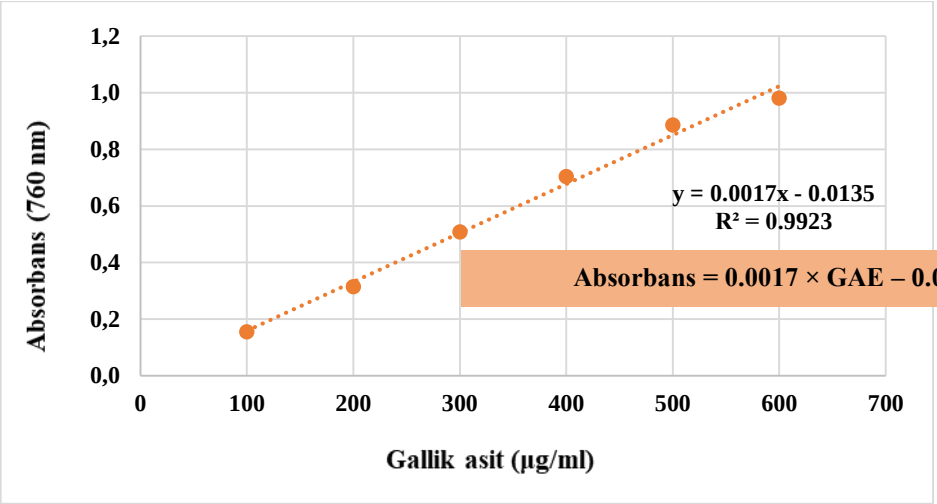
Tablo 4.2. Test maddelerinin MİK değerleri (µg/ml)

	Escherichia coli (ATCC 25922)	*Klebsiella pneumonia* (ATCC 700603)	*Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 9027)	*Staphylococcus aureus* (ATCC 29213)	*Enterococcus faecalis* (29212)
Metanol	512	1024	1024	4	2
Su	512	1024	1024	1	2
Etil asetat	512	1024	1024	16	32
Diklorometan	512	1024	1024	64	64
n-Hekzan	512	1024	1024	16	16
SME	512	1024	1024	512	64
Sülfomerazin (µg /mL)	1600	1600	1600	6.25	3.12

4.3. Antioksidan Aktivite Sonuçları

4.3.1. Toplam Fenolik Bileşik Miktar Tayini Bulguları

Ana metanol ekstresinin ve değişen polariteye sahip alt fraksiyonlarının FCR yöntemi ile toplam fenolik bileşik miktarları tayin edilmiştir (Folin & Denis, 1912; Slinkard & Singleton, 1977). Gallik asit standart fenolik bileşik olarak kullanılmıştır. Standart grafik hesaplamalarda kullanılmak üzere oluşturulmuştur (Şekil 4.17).



Şekil 4.17. Gallik asit standart grafiği

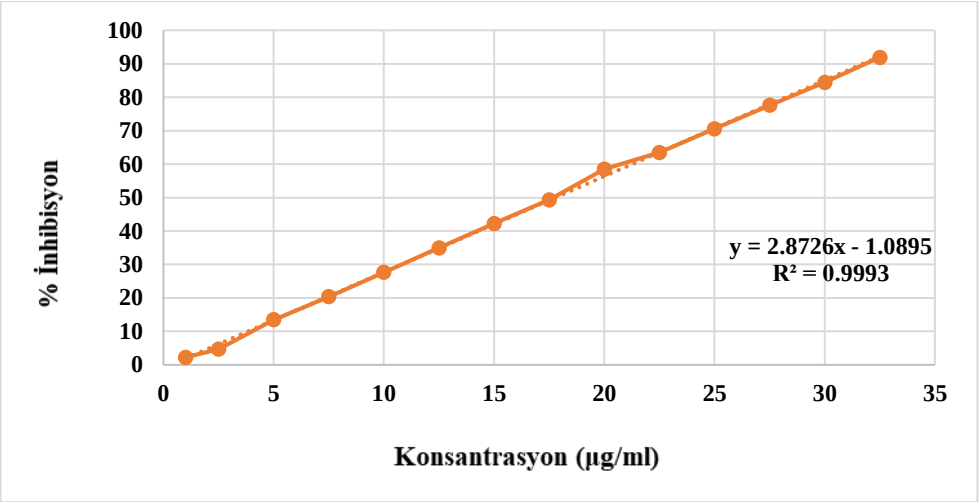
Veriler yardımıyla yukarıdaki formül elde edilmiş, ekstrelerin toplam fenolik bileşik içerikleri GAE şeklinde hesaplanmıştır (Tablo 4.3).

Tablo 4.3. Test maddelerinin toplam fenolik bileşik içerikleri

Ekstre	Toplam Fenolik Bileşik içerikleri (µg GAE/mg ekstre)
Metanol	56.82 ± 0.085
***n*-Hekzan**	33.59 ± 0.160
Diklorometan	47.76 ± 0.201
Etil Asetat	**132.59 ± 0.115**
Su	54.00 ± 0.078

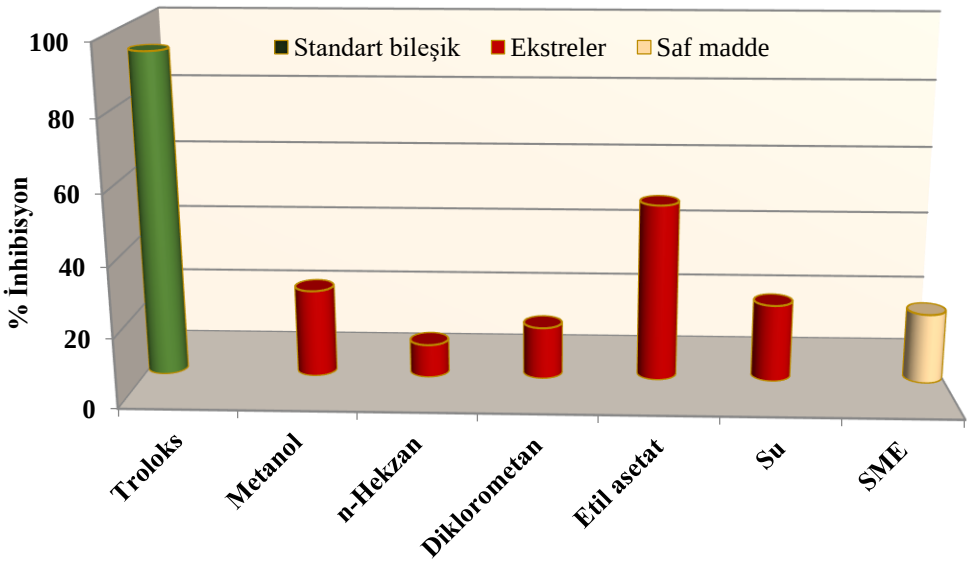
4.3.2. DPPH• Radikali Süpürme Çalışmalarına Ait Bulgular

Ana metanol ekstreleri, farklı polariteye sahip alt ekstreler, standart antioksidan bileşik ve izole edilen SME isimli bileşiğin Blois yöntemine göre DPPH• radikali süpürme aktivite tayinleri yapılmıştır (Blois, 1958). Troloksun konsantrasyon-% inhibisyon grafiği Şekil 4.18'de gösterilmiştir.



Şekil 4.18. Troloksun konsantrasyon-% inhibisyon grafiği

Ekstrelerin, standart antioksidan bileşiğin ve izole edilen SME isimli bileşiğin DPPH• radikali süpürücü kapasiteleri (50 µg/ml) % inhibisyon olarak gösterilmiştir (Tablo 4.4 ve Şekil 4.19).



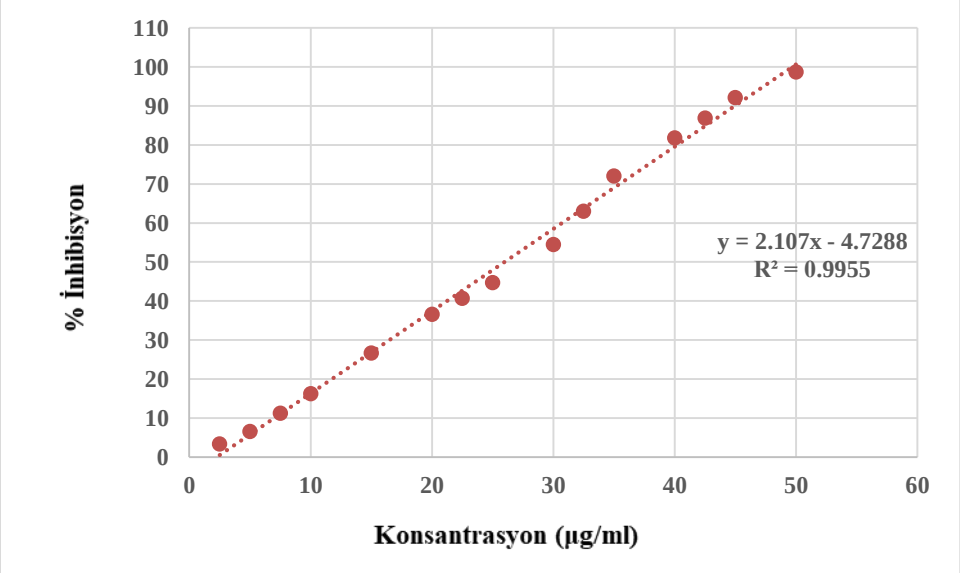
Şekil 4.19. 50 µg/ml konsantrasyonda test maddelerinin DPPH• serbest radikali süpürücü kapasiteleri

Tablo 4.4. Test maddelerinin DPPH$^{\bullet}$ serbest radikali süpürücü kapasiteleri

	% İnhibisyon (50 µg/ml)
Metanol	25.5 ± 0.065
***n*-Hekzan**	9.7 ± 0.005
Diklorometan	15.2 ± 0.036
Etil Asetat	**51.3 ± 0.121**
Su	22.6 ± 0.096
SME	20.4 ± 0.003
Troloks	93.3 ± 0.209

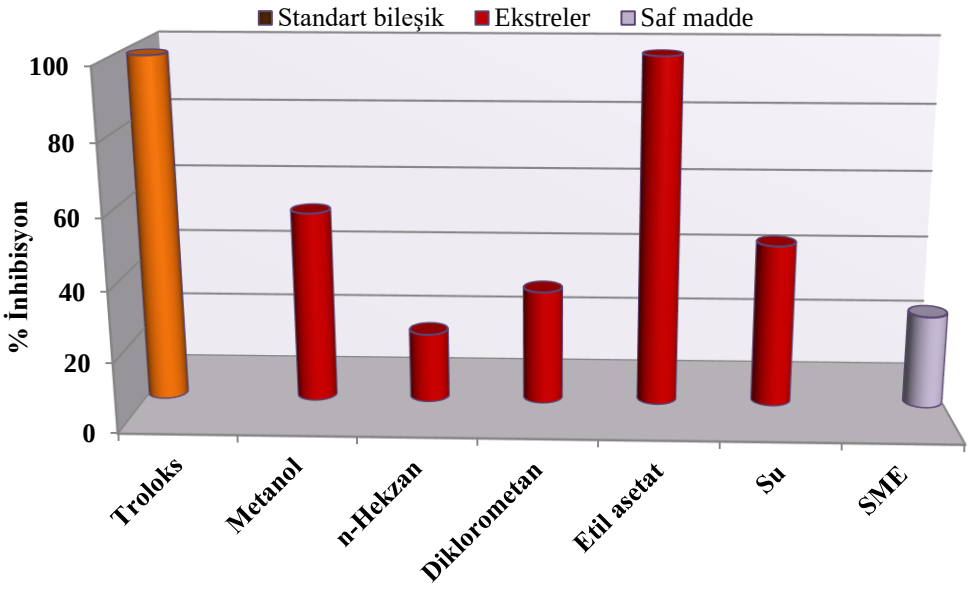
4.3.3. ABTS^{+} Radikali Süpürme Kapasite Çalışmalarına Ait Bulgular

Re ve ark. tarafından geliştirilen metoda göre ABTS$^{\bullet+}$ radikali süpürücü kapasiteleri tayin edilmiştir (Re ve ark., 1999). Pozitif kontrol olarak troloks kullanılmış ve troloksun konsantrasyon-% inhibisyon grafiği Şekil 4.20'de gösterilmiştir.



Şekil 4.20. Troloksun konsantrasyon-% inhibisyon grafiği

50 µg/ml konsantrasyonda ekstrelerin, troloksun ve izole edilen bileşiğin ABTS$^{\bullet+}$ radikali süpürme kapasiteleri yüzde inhibisyon olarak Şekil 4.21 ve Tablo 4.5'de gösterilmiştir.



Şekil 4.21. 50 µg/ml konsantrasyonda test maddelerinin $ABTS^{\bullet+}$ radikali süpürme kapasiteleri

Tablo 4.5. Test maddelerinin $ABTS^{\bullet+}$ katyon radikali süpürme kapasiteleri

	% İnhibisyon (50 µg/ml)
Metanol	55.0 ± 0.174
***n*-Hekzan**	20.1 ± 0.093
Diklorometan	32.9 ± 0.203
Etil Asetat	**99.2 ± 0.297**
Su	46.8 ± 0.179
SME	26.8 ± 0.013
Troloks	98.7 ± 0.301

4.4. Tirozinaz İnhibitör Aktivite Sonuçları

Etil asetat, diklorometan, su, metanol ve *n*-hekzan ekstrelerinin 400 µg/ml konsantrasyonda tirozinaz enzim inhibisyon yüzdeleri sırasıyla % 42.9, % 38.1, % 28.6, % 23.8 ve % 4.8 olarak bulunmuştur. Standart olarak kojik asit (% 90.5) kullanılmıştır (Şekil 4.22). Etil asetat ekstresinden elde edilen SME bileşiği IC_{50} 350.99 ± 1.8 µg/ml (kojik asit 14.6 ± 0.5 µg/ml) değerinde tirozinaz inhibitör etki göstermiştir.



Şekil 4.22. Ekstrelerin 400 µg/ml konsantrasyonda tirozinaz enzim inhibitör etkisi

5. TARTIŞMA

Stachys cinsi, Lamiaceae familyasına ait olup yaklaşık 300 türden oluşmaktadır (Tomou ve ark., 2020). Bu türler geleneksel tıpta kullanılmaktadır ve çeşitli biyolojik aktiviteleri ile bilinmektedir (Tundis ve ark., 2014). Bu çalışmada *Stachys* cinsine ait *S. macrostachya* türünün ana metanol ekstresi, *n*-hekzan, diklorometan, etil asetat ve su alt fraksiyonları elde edilmiştir. Etil asetat fraksiyonundan kromatografik yöntemlerle SME bileşiği elde edilmiştir. Ayrıca tüm ekstreler ve SME bileşiğinin antimikrobiyal, antioksidan ve tirozinaz inhibisyon aktiviteleri test edilmiştir.

SME bileşiğinin yapısı ^{1}H-NMR, ^{13}C-NMR, 2D NMR, Q-TOF ve literatür karşılaştırması ile tayin edilmiş ve bileşiğin apigenin-7-*O*-*β*-D-(6″-kumaroil)-glukopiranozit olduğu belirlenmiştir. Daha önce de *S. bombycina* (Delazar ve ark., 2005), *S. spreitzenhoferi* (Napolitano ve ark., 2022), *S. schtschegleevii* Sosn. (Nazemiyeh ve ark., 2007), *S. sylvatica* (Di Stasi ve ark., 2023), *S. ionica* (Meremeti ve ark., 2004), *S. recta* (Karioti ve ark., 2010), *S. byzantina* (Demirtas ve ark., 2013), *S. atherocalyx* ve *S. plumosa*'dan (Karioti ve ark., 2022) apigenin-7-*O*-*β*-D-(6″-kumaroil)-glukopiranozit izole edildiği kayıtlıdır.

Oksidatif stres ve serbest radikaller birçok hastalığa neden olmaktadır (Burton ve ark., 2011). Bitki materyalleri, fenolik bileşikler gibi birçok doğal bileşikler açısından zengin olduklarından, antioksidan olarak fayda sağlamaktadır (Khalaf ve ark., 2008). *Stachys* türlerinin antioksidan aktivitesi üzerinde yapılan bir çalışmada, *S. lavandulifolia*'nın metanol ekstresi en yüksek toplam fenolik içeriği göstermiş, bunu etil asetat ekstresi, su ve son olarak hekzan ekstresi izlemiştir (Ghaffari ve ark., 2012). *S. affinis* yumrularının etil asetat ekstresinin ve ardından *n*-butanol ekstresinin en yüksek toplam fenolik içeriğe sahip olduğu belirtilmiştir (Guo ve ark., 2018). Üç *Stachys* türü (*S. byzantina* K. Koch, *S. thirkei* K. Koch ve *S. cretica* subsp. *bulgarica*) üzerinde yapılan

bir araştırmada en yüksek toplam fenolik içeriği metanol ekstrelerinin göstediği, ikinci sırada ise infüzyon (sulu) ekstrelerinin gösterdiği belirtilmiştir. Hem *S. byzantina* hem de *S. cretica*'nın hekzan ekstreleri ile *S. thirkei*'in diklorometan ekstresi en düşük fenolik içerik göstermiştir (Toplan ve ark., 2021). Bu çalışmalara benzer olarak bizim çalışmamızın sonucunda da, *S. macrostachya*'nın etil asetat ekstresinin en yüksek ve *n*-hekzan ekstresinin en düşük fenolik içeriği gösterdiği belirlenmiştir. Bu çalışmada ekstreler toplam fenolik içeriklerine göre etil asetat, metanol, su, diklorometan ve son olarak *n*-hekzan olarak sıralanmıştır.

S. lavandulifolia üzerinde DPPH$^{\bullet}$ testi ile yapılan bir çalışmada metanol ekstresinin en yüksek inhibisyon aktiviteye sahip olduğu, ardından sırasıyla etil asetat, su ve hekzan ekstrelerinin geldiği kayıtlıdır (Ghaffari ve ark., 2012). *S. affinis* yumrularının etil asetat ekstresinin en yüksek süpürme aktivitesine sahip olduğu, bunu sırasıyla *n*-butanol, diklorometan, su ve *n*-hekzan ekstrelerinin takip ettiği tespit edilmiştir (Guo ve ark., 2018). *S. byzantina* ve *S. cretica*'nın metanol ekstrelerininde en yüksek DPPH$^{\bullet}$ süpürücü etki gösterdiği, sonra sırasıyla sulu ekstreler, diklorometan ve hekzan ekstrelerinin geldiği belirtilmiştir. *S. thirkei* sulu ekstresinin en yüksek sonra sırasıyla metanol, diklorometan ve hekzan ekstrelerinin DPPH$^{\bullet}$ süpürme aktivitesi gösterdiği belirtilmiştir (Toplan ve ark., 2021). Bir çalışmada *Echinops orientalis* Trauv'dan izole edilen apigenin-7-*O*-(6''-trans-*p*-kumaroil)-*β*-*D*-glukopiranozit'in yüksek bir aktivite göstermediği (Erenler ve ark., 2014), fakat yapılmış başka bir çalışmada ise apigenin-7-*O*-*β*-*D*-(6-*p*-kumaroil)-glukopiranozit'in (RC_{50} 7.69 x10^{-4} mg/mL) kersetin'den (2.88 x 10^{-5} mg/mL) daha yüksek DPPH$^{\bullet}$ inhibisyonu gösterdiği belirtilmiştir (Delazar ve ark., 2005). Bizim çalışmamızda *S. macrostachya*'nın metanol ve alt fraksiyonlarının ve izole edilmiş apigenin-7-*O*-*β*-D-(6″-kumaroil)-glukopiranozit bileşiğinin DPPH$^{\bullet}$ süpürme aktivitesi çalışılmıştır. En yüksek etkiyi etil asetat ekstresi gösterirken, daha sonra

sırasıyla metanol, su, apigenin-7-*O*-*β*-D-(6″-kumaroil)-glukopiranozit, diklorometan ve *n*-hekzan göstermiştir. Literatüre benzer olarak, *n*-hekzan ekstresinin en düşük, etil asetat ve metanol ekstrelerinin en yüksek DPPH$^{\bullet}$ süpürücü etkiye sahip olduğunu belirlenmiştir.

S. lavandulifolia toprak üstü kısımları üzerinde yapılan bir çalışmada sırasıyla metanol, etil asetat, su ve hekzan ekstreleri büyükten küçüğe ABTS$^{\bullet+}$ radikali süpürücü aktivite göstermiştir (Ghaffari ve ark., 2012). Ayrıca *S. officinalis*'in metanol ekstresi de aseton ekstresinden daha yüksek süpürücü aktiviteye sahiptir (Šliumpaitė ve ark., 2013). *Echinops orientalis* Trauv. üzerinde yapılan bir çalışmada, izole edilmiş apigenin 7-*O*-(6″-trans-*p*-kumaroil)-*β*-*D*-glukopiranozit BHT, BHA ve troloks ile karşılaştırılılarak ABTS$^{\bullet+}$ süpürme aktivitesi test edilmiş ve iyi bir aktivite göstermiştir (Erenler ve ark., 2014). Bizim çalışmamızda S. *macrostachya* etil asetat ekstresi, standart troloks da dahil olmak üzere diğer tüm test maddelerinden daha yüksek ABTS$^{\bullet+}$ radikali süpürücü aktivite göstermiştir. Sonra sırasıyla metanol, su, diklorometan, apigenin-7-*O*-*β*-D-(6″-kumaroil)-glukopiranozit ve *n*-hekzan büyükten küçüğe doğru etkili olmuştur. Apigenin-7-*O*-*β*-D-(6″-kumaroil)-glukopiranozit bileşiği, etil asetat fraksiyonundan izole edilmiş olmasına rağmen, etil asetat ekstresinden daha düşük bir DPPH$^{\bullet}$ ve ABTS$^{\bullet+}$ radikali süpürücü aktivite göstermiştir. Etil asetat ekstresinin bu yüksek etkisi içeriğindeki apigenin-7-*O*-*β*-D-(6″-kumaroil)-glukopiranozit ile birlikte bulunan diğer bileşiklerin sinerjik etkisinden kaynaklandığını düşündürtebilir. Etil asetatın ekstresinin güçlü antioksidan aktivite göstermesinin nedeni yüksek miktardaki polifenolik bileşiklere sahip olması ve polifenollerin polaritesinden kaynaklanabileceği düşünülmektedir (Tian ve ark., 2011).

İnsanlar yüzyıllardır bulaşıcı hastalıkları tedavi etmek için bitkisel ilaçları kullanmışlardır (Rios ve ark., 2005), öyle ki antibiyotik direnci arttıkça antibiyotik için yeni kaynaklar bulma ihtiyacı da artmıştır (Mothana ve ark., 2005). Üç *Stachys* türünün (*S. cretica* subsp. *bulgarica* Rech.f., *S. byzantina* K. Koch ve *S. thirkei* K. Koch) toprak

üstü kısımlarının farklı ekstrelerin (metanol, hekzan ve kloroform) arasında sadece *S. cretica*'nın metanol ekstresi *E. coli*'ye karşı bir aktivite göstermiştir. *E. faecalis*'e karşı ise hem *S. byzantina*'nın kloroform ekstresi hem de *S. cretica*'nın hekzan ekstresi antimikrobiyal aktivite göstermiştir. Öte yandan ekstrelerin hiçbiri *P. aeruginosa, K. pneumonia* ve *S. aureus*'a karşı aktivite göstermemiştir (Toplan ve ark., 2021). *S. macrostachya*'nın uçucu yağı daha önceden çalışılmış, *A. baumannii*'ye karşı etkili bulunmuş, *E. coli, P. aeruginosa* ve *E. faecalis*'e karşı etkili bulunmamıştır (Karaoglan ve ark., 2021). Bu çalışmada ise *S. macrostachya*'nın uçucu yağı değil, farklı olarak metanol ve alt fraksiyonları ile etil asetat fraksiyonundan izole edilmiş SME bileşiğinin *E. coli, K. pneumoniae, P. aeruginosa, S. aureus* ve *E. faecalis* bakterileri üzerindeki etkisi mikrodilüsyon yöntemi ile araştırılmış, tüm test maddeleri *K. pneumonia, P. aeruginosa* ve *E. coli*'ye karşı kullanılan kontrol Sulfamerazine'den daha yüksek aktivite göstermiştir. *S. aureus*'a karşı etki büyükten küçüğe doğru sırasıyla su, metanol, etil asetat ile *n*-hekzan, diklorometan ve SME olarak gözlenmiştir. Su ve metanol ekstreleri *S. aureus*'a karşı kontrolden daha yüksek etki göstermiştir. *E. faecalis*'e karşı metanol ve su en aktif iken, sonra sırasıyla *n*-hekzan, etil asetat ve son olarak diklorometan ve apigenin-7-*O*-*β*-D-(6″-kumaroil)-glukopiranozit antimikrobiyal aktivite göstermiştir. Aynı şekilde su ve metanol ekstreleri, *E. faecalis*'e karşı kontrol sülfamerazinden daha yüksek etki göstermiştir. Bu çalışmanın sonuçları, *Stachys* türleri üzerinde literatürdeki yapılmış çalışmalardaki gibi *S. macrostachya*'nın da çeşitli bakterilere karşı güçlü antimikrobiyal aktiviteye sahip olabileceğini desteklemektedir.

Tirozinaz, melanogenezden sorumlu ve cildi UV radyasyonundan koruyan bir enzimdir. Aşırı melanin üretimi cilt pigmentasyonuna neden olabilir ve bu da tirozinaz inhibitörlerini kozmetik endüstrisinde önemli kılar (M Casanola-Martin ve ark., 2014; Masuda ve ark., 2005). *S. lavadulifolia* toprak üstü kısımlarının farklı ekstrelerinin

antitirozinaz aktivitesi araştırılmış, tüm ekstreler kojik asitten daha düşük etki göstermiş, aktivite büyükten küçüğe doğru etanol, sokslet metanol, metanol, diklorometan ve *n*-hekzan olarak sıralanmıştır (Tundis ve ark., 2015). Yapılan bir araştırmada *S. annua* (L.) subsp. *annua* var. *annua*'nın toprak üstü kısımlarının farklı ekstreleri çalışılmış, etil asetat ekstresi en yüksek antitirozinaz aktivite göstermiş, ardından metanol ve son olarak su ekstresi takip etmiştir (Kocak ve ark., 2017). *S. cretica* subsp. *kutahyensis*'in toprak üstü kısımlarının metanol ekstresi su ekstresinden daha yüksek antitirozinaz aktivite göstermiştir (Benabderrahim ve ark., 2021). *S. germanica* subsp. *holdreichii*'nin tirozinaz inhibisyon aktivitesi en yüksek metanol ekstresinde, ardından su ekstresinde bulunurken, etil asetat ekstresinde çok daha düşük çıkmıştır (Sarıkurkcu ve ark., 2021). *S. macrostachya* toprak üstü kısımlarının uçucu yağı üzerinde yapılan bir çalışmada, uçucu yağ konsantrasyona bağlı bir şekilde artan tirozinaz inhibisyon aktivitesi göstermiştir (Karaoglan ve ark., 2021). *Marrubium cylleneum*'dan izole edilmiş apigenin-7-*O*-(6″-*p* kumaroil)-glukozit'in % 17.66 ± 2.64 tirozinaz inhibisyonu gösterirken, kullanılan kontrol kojik asit % 80.02 ± 1.05 tirozinaz inhibisyonu göstermiştir (Karioti ve ark., 2007). Bizim çalışmamızda, *S. macrostachya*'nın toprak üstü kısımlarının 5 farklı ekstresi ve izole apigenin-7-*O*-*β*-D-(6″-kumaroil)-glukopiranozit bileşiğinin tirozinaz intibitör etkisi araştırılmış, etil asetat ekstresi en yüksek yüzde inhibisyonu göstermiştir. Ardından sırasıyla diklorometan, su, metanol ve *n*-hekzan gelmiştir. Tüm ekstrelerin tirozinaz inhibitör etkileri kontrol kojik asitten daha düşük çıkmıştır. Etil asetat fraksiyonundan izole edilen apigenin-7-*O*-*β*-D-(6″-kumaroil)-glukopiranozit bileşiği IC_{50} 350.99 ± 1.8 µg/ml değerinde tirozinaz inhibitör etki göstermiştir.

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

S. macrostachya (Wend.) Briq. etil asetat ekstresinden flavonoit yapısındaki apigenin-7-*O*-*β*-D-(6″-kumaroil)-glukopiranozit elde edilmiştir. Gözlemlediğimiz kadarıyla bileşik bu türden ilk kez izole edilmiştir. *S. aureus*'a karşı en yüksek etkiyi su ekstresi, *E. faecalis*'e karşı en yüksek etkiyi metanol ve su ekstreleri göstermiştir. Antioksidan testlerinin hepsinde en yüksek etkiyi etil asetat ekstresi göstermiştir. Sonuçlar *S. macrostachya*'nın antioksidan ve antimikrobiyal ajan geliştirmek için ileriki çalışmalara yol gösterebileceğini düşündürtmektedir.

KAYNAKLAR

Aderogba, M. A., Madikizela, B., McGaw, L. J., 2019. Bioactive constituents from *Malvastrum coromandelianum* (L.) Garcke leaf extracts. *South African Journal of Botany*, 126, 371-376.

Akhlaghi, H., Shafaghat, A., Salimi, F., Mohammadhoseini, M., 2011. GC-MS analysis of the essential oil from wild *Stachys pubescens* Ten. leaves from Northwest Iran. *Analytical Chemistry Letters*, 1(4), 325-327.

Alizadeh, F., Ramezani, M., Piravar, Z., 2020. Effects of *Stachys sylvatica* hydroalcoholic extract on the ovary and hypophysis-gonadal axis in a rat with polycystic ovary syndrome. *Middle East Fertility Society Journal*, 25(1), 1-7.

Antolovich, M., Prenzler, P. D., Patsalides, E., McDonald, S., Robards, K., 2002. Methods for testing antioxidant activity. *The Royal Society of Chemistry*, 127, 183-198.

Ashour, M. A. G., 2015. New diacyl flavonoid derivatives from the Egyptian plant *Blepharis edulis* (Forssk.) Pers. *Bulletin of Faculty of Pharmacy, Cairo University*, 53(1), 11-17.

Asnaashari, S., Delazar, A., Alipour, S. S., Nahar, L., Williams, A. S., Pasdaran, A., Mojarab, M., Azad, F. F., Sarker, S. D., 2010. Chemical composition, free-radical-scavenging and insecticidal activities of the aerial parts of *Stachys byzantina*. *Archives of Biological Sciences*, 62(3), 653-662.

Bahadori, M. B., Zengin, G., Dinparast, L., Eskandani, M., 2020a. The health benefits of three Hedgenettle herbal teas (*Stachys byzantina*, *Stachys inflata*, and *Stachys lavandulifolia*) - profiling phenolic and antioxidant activities. *European Journal of Integrative Medicine*, 36, 101134.

Bahadori, M. B., Maggi, F., Zengin, G., Asghari, B., Eskandani, M., 2020b. Essential oils of hedgenettles (*Stachys inflata*, *S. lavandulifolia*, and *S. byzantina*) have antioxidant, anti-Alzheimer, antidiabetic, and anti-obesity potential: A comparative study. *Industrial Crops & Products*, 145, 112089.

Benabderrahim, M. A., Sarikurkcu, C., Elfalleh, W., Ozer, M. S., Ceylan, O., 2021. Phenolic composition and biological activities of Turkish endemic plant: *Stachys cretica* subsp. *kutahyensis*. *South African Journal of Botany*, 138, 124-128.

Bilušić Vundać, B., 2019. Taxonomical and phytochemical characterisation of 10 *Stachys* taxa recorded in the Balkan Peninsula flora: A Review. *Plants*, 8(2), 32.

Bingol, M. N., Bursal, E., 2018. LC-MS/MS analysis of phenolic compounds and in vitro antioxidant potential of *Stachys lavandulifolia* Vahl. var. *brachydon* Boiss. *International Letters of Natural Sciences*, 72, 28-36.

Blois, M. S., 1958. Antioxidant determinations by the use of a stable free radical. *Nature*, 181, 1199-1200.

Bursal, E., Taslimi, P., Gören, A. C., Gülçin, I., 2020. Assessments of anticholinergic, antidiabetic, antioxidant activities and phenolic content of *Stachys annua*. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 28, 101711.

Burton, G. J., Jauniaux, E., 2011. Oxidative stress. *Best Practice & Research Clinical Obstetrics & Gynaecology*, 25(3), 287-299.

Carev, I., Sarikurkcu, C., 2021. LC-MS/MS Profiles and in vitro biological activities of extracts of an endemic species from Turkey: *Stachys cretica* ssp. *anatolica*. *Plants*, 10(6), 1054.

Carović-Stanko, K., Petek, M., Grdiša, M., Pintar, J., Bedeković, D., Ćustić, M. H., Satovic, Z., 2016. Medicinal plants of the family Lamiaceae as functional foods – a Review. *Czech Journal of Food Sciences*, 34(5), 377-390.

Chalchat, J. C., Petrovic, S. D., Maksimovic, Z. A., Gorunovic, M. S., 2000. Essential oil of the herb of *Stachys recta* L., Lamiaceae from Serbia. *Journal of Essential Oil Research*, 12(4), 455-458.

Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI), 2017. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing, Twenty-seventh informational supplement, M100-S27, Wayne, Pennsylvania

Conforti, F., Menichini, F., Formisano, C., Rigano, D., Senatore, F., Arnold, N. A., Piozzi, F., 2009. Comparative chemical composition, free radical-scavenging and cytotoxic properties of essential oils of six *Stachys* species from different regions of the Mediterranean Area. *Food Chemistry*, 116, 898-905.

Das, K., Tiwari, R. K. S., Shrivastava, D. K., 2010. Techniques for evaluation of medicinal plant products as antimicrobial agent: Current methods and future trends. *Journal of Medicinal Plants Research*, 4(2), 104-111.

Davis, P. H., Edmondson, J. R., Mill, R. R., Tan, K., 1982. Flora of Turkey and the East Aegean Islands. Edinburgh University Press, 948 p, Edinburgh.

Dawra, M., Nehme, N., El Rayess, Y., El Beyrouthy, M., Taillandier, P., Bouajila, J., 2022. Folk medicinal applications, phytochemical composition and biological activities of some Lebanese endemic plants. *South African Journal of Botany*, 150, 511-527.

Delazar, A., Celik, S., Göktürk, R. S., Unal, O., Nahar, L., Sarker, S. D., 2005. Two acylated flavonoid glycosides from *Stachys bombycina*, and their free radical scavenging activity. *Die Pharmazie-An International Journal of Pharmaceutical Sciences*, 60(11), 878-880.

Demirtas, I., Gecibesler, I. H., Yaglioglu, A. S., 2013. Antiproliferative activities of isolated flavone glycosides and fatty acids from *Stachys byzantina*. *Phytochemistry letters*, 6(2), 209-214.

Di Stasi, M., Dolci, D., Peruzzi, L., Braca, A., De Leo, M., 2023. Phytochemical study of *Stachys sylvatica* (Lamiaceae) aerial parts. *Plant Biosystems - An International Journal Dealing with all Aspects of Plant Biology*, 157(3), 569-583.

Dulger, G., Aki, C., 2009. Antimicrobial activity of the leaves of endemic *Stachys pseudopinardii* in Turkey. *Tropical Journal of Pharmaceutical Research*, 8(4), 371-375.

Ebrahimabadi, A. H., Ebrahimabadi, E. H., Djafari-Bidgoli, Z., Kashi, F. J., Mazoochi, A., Batooli, H., 2010. Composition and antioxidant and antimicrobial activity of the essential oil and extracts of *Stachys inflata* Benth from Iran. *Food Chemistry*, 119, 452-458.

Erenler, R., Yilmaz, S., Aksit, H., Sen, O., Genc, N., Elmastas, M., Demirtas, I., 2014. Antioxidant activities of chemical constituents isolated from *Echinops orientalis* Trauv. *Records of Natural Products*, 8 (1), 32-36.

Ferhat, M., Erol, E., Beladjila, K. A., Çetintaş, Y., Duru, M. E., Öztürk, M., Kabouche, A., Kabouche, Z., 2017. Antioxidant, anticholinesterase and antibacterial activities of *Stachys guyoniana* and *Mentha aquatic*. *Pharmaceutical Biology*, 55(1), 324-329.

Folin O., Denis W., 1912. On phosphotungstic-phosphomolybdic compounds as colour reagents. *Journal of biological chemistry*, 12(2), 239-243.

Frezza, C., Venditti, A., Maggi, F., Cianfaglione, K., Nagy, D. U., Serafini, M., Bianco, A. 2016. Secondary metabolites from *Stachys palustris* L. *In Book of abstracts* (pp. 80-80). Ligia Salgueiro, Carlos Cavaleiro, Célia Cabral.

Gerçek, Y. C., Şahin, A. A., Bayram, N. E., Çelik, S., Sefalı, A., Gıdık, B., Öz, G. C., Pınar, N. M., 2022. Anatomy, trichome micromorphology and phytochemical profile of *Stachys rizeensis* R. Bhattacharjee from Turkey. *South African Journal of Botany*, 149, 19-28.

Ghaffari, H., Ghassam, B. J., Prakash, H. S., 2012. Evaluation of antioxidant and antiinflammatory activity of *Stachys lavandulifolia*. *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*, 4(3), 691-696.

Ghasemi, P. A., Momeni, M., Bahmani, M., 2013. Ethnobotanical study of medicinal plants used by Kurd tribe in Dehloran and Abdanan districts, Ilam province, Iran. *African Journal of Traditional, Complementary and Alternative Medicines*, 10(2), 368-385.

Giuliani, C., Pellegrino, R. M., Tirillini, B., Bini, L. M., 2009. Composition of essential oils from leaves and flowers of *Stachys germanica* subsp. *salviifolia* (Ten.) Gams (Labiatae) and related secretory structures. *Natural Product Communications*, 4(6), 831-834.

Goren, A. C., Piozzi, F., Akcicek, E., Kiliç, T., Çarıkçı, S., Mozioğlu, E., Setzer, W. N., 2011. Essential oil composition of twenty-two *Stachys* species (mountain tea) and their biological activities. *Phytochemistry Letters*, 4(4), 448-453.

Gossell-Williams, M. G., Simon, O. R., West, M. E., 2006. The past and present use of plants for medicine. *The West Indian medical journal*, 55(4), 217-218.

Greenwell, M., Rahman. P. K. S. M., 2015. Medicinal plants: their use in anticancer treatment. *International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research*, 6(10), 4103-4112.

Grujic-Jovanovic, S., Skaltsa, H. D., Marin, P., Sokovic, M., 2004. Composition and antibacterial activity of the essential oil of six *Stachys* species from Serbia. *Flavour and Fragrance Journal*, 19, 139-144.

Grujic-Jovanovic, S., Ana, D. M., Ristic, M. S., Marin, P. D., 2011. Eeeential oil composition of *Stachys anisochila*. *Chemistry of Natural Compounds*, 47(5), 721-723.

Guo, H., Saravanakumar, K., Wang, M., 2018. Total Phenolic, Flavonoid contents and free radical scavenging capacity of extracts from tubers of *Stachys affinis*. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 15, 235-239.

Guven, K., Karabacak, E., Çelik, S., Uysal, I., 2009. Antimicrobial activity of Centaura derderiifolia, *Stachys aleurites* and *Anthemis aciphylla*. *Journal of Applied Biological Sciences*, 3(2), 169-174.

Güner, Ö., Akçiçek, E., Dirmenci, T., 2021. A new *Stachys* species from Turkey: *Stachys siirtensis* (Lamiaceae). *Phytotaxa*, 516(3), 252-262.

Halmschlag, C. B., Moura, C. C. D. M., Brambach, F., Siregar, I. Z., Gailing, O., 2022. Molecular and morphological survey of Lamiaceae species in converted landscapes in Sumatra. *PLoS One*, 17(12), e0277749.

Harmandar, M., Duru, M. E., Cakir, A., Hirata, T., Izumi, S., 1997. Volatile constituents of *Stachys obliqua* L. (Lamiaceae) from Turkey. *Flavour and Fragrance Journal*, 12, 211-213.

Háznagy-Radnai, E., Réthy, B., Czigle, S., Zupkó, I., Wéber, E., Martinek, T., Falkay, G., Máthé, I., 2008. Cytotoxic activities of *Stachys* species. *Fitoterapia*, 79(7-8), 595-597.

Háznagy-Radnai, E., Balogh, Á., Czigle, S., Máthé, I., Hohmann, J., Blazsó, G., 2012. Antiinflammatory activities of Hungarian *Stachys* Species and their iridoids. *Phytotherapy Research*, 26, 505-509.

Itokawa, H., Suto, K., Takeya, K., 1981. Studies on a novel *p*-coumaroyl glucoside of apigenin and on other flavonoids isolated from patchouli (Labiatae). *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*, 29 (1), 254-256.

Jassbi, A. R., Miri, R., Asadollahi, M., Javanmardi, N., Firuzi, O., 2014. Cytotoxic, antioxidant and antimicrobial effects of nine species of woundwort (*Stachys*) plants. *Pharmaceutical Biology*, 52(1), 62-67.

Karaoglan, E. S., Gormez, A., Yilmaz, B., Kaci, F. N., Ozgen, U., 2021. Composition and bioactivity of essential oil from *Stachys macrostachya* (Wend.) Briq. *Anais da Academia Brasileira de Ciências*, 93(3).

Karioti, A., Protopappa, A., Megoulas, N., Skaltsa, H., 2007. Identification of tyrosinase inhibitors from *Marrubium velutinum* and *Marrubium cylleneum*. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 15, 2708-2714.

Karioti, A., Bolognesi, L., Vincieri, F. F., Bilia, A. R., 2010. Analysis of the constituents of aqueous preparations of *Stachys recta* by HPLC–DAD and HPLC–ESI-MS. *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis*, 53(1), 15-23.

Karioti, A., Kukić-Marković, J., Bilia, A. R., Niketić, M., Petrović, S., 2022. Chemical profiling of six *Stachys* taxa from Balkan Peninsula. Biochemical Systematics and Ecology, 104, 104482.

Kaya, A., Demirci, B., Baser, K. H. C., 2001. The composition of the essential oil of *Stachys iberica* subsp. s*tenostachya* growing in Turkey. *Chemistry of Natural Compounds*, 37(4), 326-328.

Kepekçi, R. A., Polat, S., Çoşkun, G. C., Çelik, A., A. Bozkurt, S., Yumrutaş, Ö., Pehlivan, M., 2017. Preliminary characterization of phenolic acid composition and hepatoprotective effect of *Stachys pumila*. *Journal of Food Biochemistry*, 41(2), e12286.

Khademian, A., Tabefam, M., Mazarei, Z., Kanani, M. R., Sepehri, H., Delphi, L., Danton, O., Hamburger, M., Farimani, M. M., 2021. Chemical constituents and cytotoxic activity of *Stachys pilifera* Benth. *South African Journal of Botany*, 139, 226-229.

Khalaf, N. A., Shakya, A. K., Al-Othman, A., El-Agbar, Z., Farah, H., 2008. Antioxidant activity of some common plants. *Turkish Journal of Biology*, 32(1), 51-55.

Khanavi, M., Sharifzadeh, M., Hadjiakhoondi, A., Shafiee, A., 2005. Phytochemical investigation and anti-inflammatory activity of aerial parts of *Stachys byzanthina* C. Koch. *Journal of Ethnopharmacology*, 97, 463-468.

Khanavi, M., Hajimahmoodi, M., Cheraghi-Niroomand, M., Kargar, Z., Ajani, Y., Hadjiakhoondi, A., Oveisi, M. R., 2009. Comparison of the antioxidant activity and total phenolic contents in some *Stachys* species. *African Journal of Biotechnology*, 8(6), 1143-1147.

Khanavi, M., Manayi, A., Lotfi, M., Abbasi, R., Majdzadeh, M., Ostad, S. N., 2012. Investigation of cytotoxic activity in four *Stachys* species from Iran. *Iranian Journal of Pharmaceutical Research*, 11(2), 589-593.

Khoigani, S. R., Rajaei, A., Goli, S. A. H., 2017. Evaluation of antioxidant activity, total phenolics, total flavonoids and LC–MS/MS characterisation of phenolic constituents in *Stachys lavandulifolia*. *Natural Product Research*, 31(3), 355-358.

Kocak, M. S., Uren, M. C., Calapoglu, M., Tepe, A. S., Mocan, A., Rengasamy, K. R. R., Sarikurkcu, C., 2017. Phenolic profile, antioxidant and enzyme inhibitory

activities of *Stachys annua* subsp. *annua* var. *annua*. *South African Journal of Botany*, 113, 128-132.

Kokhdan, E. P., Ahmadi, K., Sadeghi, H., Sadeghi, H., Dadgary, F., Danaei, N., Aghamaali, M. R., 2017. Hepatoprotective effect of *Stachys pilifera* ethanol extract in carbontetrachloride-induce hepatotoxicity in rats. *Pharmaceutical Biology*, 55(1), 1389-1393.

Kotsos, M., Aligiannis, N., Mitaku, S., Skaltsounis, A. L., Charvala, C., 2001. Chemistry of plants from crete: *Stachys pinoside*, a new flavonoid glycoside and iridoids from *Stachys spinosa*. *Natural Product Letters*, 15(6), 377-386.

Kukic, J., Petrovic, S., Niketic, M., 2006. Antioxidant activity of four endemic *Stachys* taxa. *Biological & Pharmaceutical Bulletin*, 29(4), 725-729.

Kumar, D., Bhat, Z. A., Kumar, V., Khan, N. A., Chashoo, I. A., Zargar, M. I., Shah, M. Y., 2012. Effects of *Stachys tibetica* essential oil in anxiety. *European Journal of Integrative Medicine*, 4, 169-176.

Kumar, D., Bhat, Z. A., Kumar, V., Raja, W. Y., Shah, M. Y., 2013. Anti-anxiety activity of *Stachys tibetica* Vatke. *Chinese Journal of Natural Medicines*, 11(3), 240-244.

Lachowicz-Wiśniewska, S., Pratap-Singh, A., Kapusta, I., Kruszyńska, A., Rapak, A., Ochmian, I., Cebulak, T., Żukiewicz-Sobczak, W., Rubiński, P. 2022. Flowers and leaves extracts of *Stachys palustris* L. exhibit stronger anti-proliferative, antioxidant, anti-diabetic, and anti-obesity potencies than stems and roots due to more phenolic compounds as revealed by UPLC-PDA-ESI-TQD-MS/MS. *Pharmaceuticals*, 15(7), 785.

Lakhal, H., Boudiar, T., Kabouche, A., Laggoune, S., Kabouche, Z., Topcu, G., 2011. Antioxidant activity and flavonoids of *Stachys ocymastrum*. *Chemistry of Natural Compounds*, 46(6), 964-965.

Lemoui, R., Picerno, P., Benyahia, S., Mencherini, T., Vassallo, A., Armentano, M. F., Noman, L., Bouchama, K., Rastrelli, L., Aquino, R. P., 2023. Phytochemical analysis, antioxidant and hypoglycemic activities of a methanol extract from *Stachys brachyclada* de Noé ex Coss. leaves. *Natural Product Research*, 1-6.

M Casanola-Martin, G., Le-Thi-Thu, H., Marrero-Ponce, Y., Castillo-Garit, J. A., Torrens, F., Rescigno, A., Abad, C., Khan, M. T. H., 2014. Tyrosinase enzyme: 1. An overview on a pharmacological target. *Current Topics in Medicinal Chemistry*, 14(12), 1494-1501.

Ma, L., Gan, D., Wang, M., Zhang, Z., Jiang, C., Zeng, X., 2012. Optimization of extraction, preliminary characterization and hepatoprotective effects of polysaccharides from *Stachys floridana* Schuttl. ex Benth. *Carbohydrate Polymers*, 87(2), 1390-1398.

Maleki, N., Garjani, A., Nazemiyeh, H., Nilfouroushan, N., Eftekhar Sadat, A. T. E., Allameh, Z., Hasannia, N., 2001. Potent anti-inflammatory activities of hydroalcoholic extract from aerial parts of *Stachys inflata* on rats. *Journal of Ethnopharmacology*, 75, 213-218.

Manafi, H., Shafaghat, A., Mazloomifar, A., Kashanaki, R., 2010. Antimicrobial Activity and Volatile Constituents of Essential Oils from Leaf and Stem of *Stachys byzantina* C. Koch. *Journal of Essential Oil Bearing Plants*, 13(3), 371-376.

Masoudi, S., Jamzad, M., Attari, L., Rustaiyan, A., 2003. Volatile constituents of *Stachys pilifera* Benth. and *Stachys acerosa* Boiss. from Iran. *Journal of Essential Oil Research*, 15, 189-190.

Masuda, T., Yamashita, D., Takeda, Y., Yonemori, S., 2005. Screening for tyrosinase inhibitors among extracts of seashore plants and identification of potent inhibitors

from *Garcinia subelliptica*. *Bioscience, biotechnology, and biochemistry*, 69(1), 197-201.

Meremeti, A., Karioti, A., Skaltsa, H., Heilmann, J., Sticher, O., 2004. Secondary metabolites from *Stachys ionica*. *Biochemical Systematics and Ecology*, 32, 139-151.

Michailidou, A. M., Tomou, E. M., Skaltsa, H., 2021. Phytochemical study of *Stachys candida* Bory & Chaubard (Lamiaceae). *Biochemical Systematics and Ecology*, 94, 104208.

Mostafavi, H., Mousavi, S. H., Zalaghi, A., Delsouzi, R., 2013. Chemical composition of essential oil of *Stachys byzantina* from North-West Iran. *Journal of Essential Oil Bearing Plants*, 16(3), 334-337.

Motavallian, A., Yousefbeyk, F., Tehrani, B. S., Zeinoddini, Z., Torshkooh, F. A., Andalib, S., 2021. Evaluation of Anti-depressant and Anti-anxiety Activity of Methanol Extract of *Stachys annua* L. in Mice. *Research Journal of Pharmacognosy*, 8(1), 29-38.

Mothana, R. A. A., Lindequist, U., 2005. Antimicrobial activity of some medicinal plants of the island Soqotra. *Journal of Ethnopharmacology*, 96(1-2), 177-181.

Nabavizadeh, F., Alizadeh, A. M., Adeli, S., Golestan, M., Moloudian, H., Kamalinejad, M., 2011. Gastroprotective effects of *Stachys lavandulifolia* extract on experimental gastric ulcer. African Journal of Pharmacy and Pharmacology, 5(2), 155-159.

Napolitano, A., Di Napoli, M., Castagliuolo, G., Badalamenti, N., Cicio, A., Bruno, M., Piacente, S., Maresca, V., Cianciullo, P., Capasso, L., Bontempo, P., Varcamonti, M., Basile, A., Zanfardino, A., 2022. The chemical composition of the aerial parts of *Stachys spreitzenhoferi* (Lamiaceae) growing in Kythira Island (Greece), and

their antioxidant, antimicrobial, and antiproliferative properties. *Photochemistry*, 203, 113373.

Nassar, M. A., El-Segai, M. U., Mohamed, S. N. A., 2013. Botanical Studies on *Ocimum basilicum* L. (Lamiaceae). *Research Journal of Agriculture and Biological Sciences*, 9(5), 150-163.

Nazemiyeh, Maleki, N., Mehmani, F., Kumarasamy, Y., Shoeb, M., Garjani, A., Sarker, S. D., 2007. Assessment of anti-inflammatory properties of ethyl acetate extract of *Stachys schtschegleevii* Sosn. *DARU Journal of Pharmaceutical Sciences*, 15(4), 174-182.

Nelson, J. B., 1981. *Stachys* (Labiatae) in Southeastern United States. *The Botanical Research Institute of Texas*, 9 (2), 104-123.

Omidbaigi, R., Omidbaigi, M. A., Bastan, M. R., 2006. The essential oil content and composition of *Stachys inflata* Benth from Iran. *Journal of Essential Oil Bearing Plants*, 9(1), 60-64.

Pal, S. K., Shukla, Y., 2003. Herbal medicine: current status and the future. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention*, 4, 281-288.

Pélissier, Y., Marion, C., Rapior, S., Bessière, J. M. 1999. Volatile components of *Stachys Corsica* Pers. (Lamiaceae). *Journal of Essential Oil Research*, 11, 63-64.

Petrović, S., Ristić, M., Milenković, M., Kukić, J., Antić-Stanković, J., Niketić, M., 2006. Composition and antimicrobial activity of essential oil of *Stachys plumosa* Griseb. *Flavour and Fragrance Journal*, 21, 250-252.

Pirbalouti, A. G., Koohpyeh, A., 2011. Wound healing activity of extracts of *Malva sylvestris* and *Stachys lavandulifolia*. *International Journal of Biology*, 3(1), 174-179.

Quan, M., Liu, Q. Z., Liu, Z. L., 2018. Identification of Insecticidal Constituents from the Essential Oil from the Aerial Parts *Stachys riederi* var. *japonica*. *Molecules*, 23(5), 1200.

Rabbani, M., Sajjadi, S. E., Zarei, H. R., 2003. Anxiolytic effects of *Stachys lavandulifolia* Vahl on the elevated plus-maze model of anxiety in mice. *Journal of Ethnopharmacology*, 89, 271-276.

Ramazanov, N. S., Bobayev, I. D., Yusupova, U. Y., Aliyeva, N. K., Egamova, F. R., Yuldasheva, N. K., Syrov, V. N., 2016. Phytoecdysteroids-containing extract from *Stachys hissarica* plant and its wound-healing activity. *Natural Product Research*, 31(5), 593-597.

Rates, S. M. K., 2001. Plants as source of drugs. *Toxicon*, 39, 603-613.

Rattray, R. D., Van Wyk, B. E., 2021. The botanical, chemical and ethnobotanical diversity of southern African Lamiaceae. *Molecules*, 26(12), 3712.

Re, R., Pellegrini, N., Proteggente, A., Pannala, A., Yang, M., Rice-Evans, C., 1999. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free radical biology and medicine*, 26, 1231-1237.

Renda, G., Bektaş, N. Y., Korkmaz, B., Celik, G., Sevgi, S., Yayli, N., 2017. Volatile constituents of three *Stachys* L. species from Turkey. *Marmara Pharmaceutical Journal*, 21 (2), 278-285.

Rios, J. L., Recio, M. C., 2005. Medicinal plants and antimicrobial activity. *Journal of Ethnopharmacology*, 100(1-2), 80-84.

Saeedi, M., Morteza-Semnani, K., Mahdavi, M. R., Rahimi, F., 2008. Antimicrobial studies on extracts of four species of *Stachys*. *Indian Journal of Pharmaceutical Sciences*, 70(3), 403-406.

Saravanakumar, K., Park, S., Mariadoss, A. V. A., Sathiyaseelan, A., Veeraraghavan, V. P., Kim, S., Wang, M. H., 2021. Chemical composition, antioxidant, and anti-diabetic activities of ethyl acetate fraction of *Stachys riederi* var. *japonica* (Miq.) in streptozotocin-induced type 2 diabetic mice. *Food and Chemical Toxicology*, 155, 112374.

Sarikurkcu, C., Ceylan, O., Benabdallah, A., Tepe, B., 2021. *Stachys germanica* subsp. *heldreichii* (Boiss.) Hayek: Phytochemical analysis, antioxidant and enzyme inhibitory activities. *South African Journal of Botany*, 143, 291-300.

Serrilli, A. M., Alessia Ramunno, A., Piccioni, F., Serafini, M., Ballero, M., Bianco, A., 2006. Monoterpenoids from *Stachys glutinosa* L. *Natural Product Research*, 20(6), 648-652.

Sewell, R. D. E., Rafieian-Kopaei, M., 2014. The history and ups and downs of herbal medicines usage. *Journal of HerbMed Pharmacology*, 3(1), 1-3.

Shahidi, F., Zhong, Y., 2015. Measurement of antioxidant activity. *Journal of Functional Foods*, 18(B), 757-781.

Skaltsa, H. D., Demetzos, C., Lazari, D., Sokovic, M., 2003. Essential oil analysis and antimicrobial activity of eight *Stachys* species from Greece. *Phytochemistry*, 64, 743-752.

Slinkard, K., Singleton, V. L., 1977. Total phenol analysis: automation and comparison with manual methods. *American Journal of Enology and Viticulture*, 28(1), 49-55.

Šliumpaitė, I., Venskutonis, P. R., Murkovic, M., Ragažinskienė, O., 2013. Antioxidant properties and phenolic composition of wood betony (*Betonica officinalis* L., syn. *Stachys officinalis* L.). *Industrial Crops and Products*, 50, 715-722.

Slobodianiuk, L., Budniak, L., Marchyshyn, S., Demydiak, O., 2021a. Investigation of the anti-inflammatory effect of the dry extract from the herb of *Stachys sieboldii* MIQ. *Pharmacology Online*, 2, 590-597.

Slobodianiuk, L., Budniak, L., Marchyshyn, S., Sydor, V., 2021b. The antibacterial activity of the extracts from the *Stachys sieboldii* MIQ. *Pharmacology Online*, 3. 948-957.

Sonboli, A., Salehi, P., Ebrahimi, S. N., 2005. Essential oil composition and antibacterial activity of the leaves of *Stachys schtschegleevii* from Iran. *Chemistry of Natural Compounds*, 41(2), 171-174.

Tian, S., Shi, Y., Zhou, X., Ge, L., Upur, H., 2011. Total polyphenolic (flavonoids) content and antioxidant capacity of different *Ziziphora clinopodioides* Lam. extracts. *Pharmacognosy Magazine*, 7(25), 65-68.

Tirillini, B., Pellegrino, R., Bini, L. M., 2004. Essential oil composition of *Stachys sylvatica* L. from Italy. *Flavour and Fragrance Journal*, 19, 330-332.

Tomou, E. M., Barda, C., Skaltsa, H., 2020. Genus *Stachys*: A review of traditional uses, phytochemistry and bioactivity. *Medicines*, 7(10), 63.

Toplan, G. G., Taşkın, T., Kara, E. M., Genç, G. E., 2021. Antioxidant and antimicrobial activities of various extracts from *Stachys cretica* subsp. *bulgarica* Rech. f., *Stachys byzantina* K. Koch and *Stachys thirkei* K. Koch. *İstanbul Journal of Pharmacy*, 51(3), 341-347.

Tundis, R., Peruzzi, L., Menichini, F., 2014. Phytochemical and biological studies of *Stachys* species in relation to chemotaxonomy: A review. *Phytochemistry*, 102, 7-39.

Tundis, R., Bonesi, M., Pugliese, A., Nadjafi, F., Menichini, F., Loizzo, M. R., 2015. Tyrosinase, acetyl- and butyryl-cholinesterase inhibitory activity of *Stachys*

lavandulifolia Vahl (Lamiaceae) and its major constituents. *Records of Natural Products*, 9(1), 81-93.

Türkiye Bitkileri Veri Servisi (TÜBİVES). *Stachys macrostachya*. TÜBİVES *Stachys macrostachya*. 4 aralık 2022.

Venditti, A., Serrilli, A. M., Di Cecco, M., Ciaschetti, G., Andrisano, T., Bianco, A., 2013. Phytochemical composition of polar fraction of *Stachys germanica* L. subsp. *salviifolia* (Ten.) Gams, a typical plant of Majella National Park. *Natural Product Research*, 27(2), 190-193.

Venditti, A., Frezza, C., Bianco, A., Serafini, M., Cianfaglione, K., Nagy, D. U., Iannarelli, R., Caprioli, G., Maggi, F., 2017. Polar constituents, essential oil and antioxidant activity of marsh woundwort (*Stachys palustris* L.), *Chemistry & biodiversity*, 14(3), e1600401.

Vundac, V. B., Pfeifhofer, H. W., Brantner, A. H., Males, Z., Plazibat, M., 2006. Essential oils of seven *Stachys* taxa from Croatia. *Biochemical Systematics and Ecology*, 34, 875-881.

Vundać, V. B., Brantner, A. H., Plazibat, M., 2007. Content of polyphenolic constituents and antioxidant activity of some *Stachys* taxa. *Food Chemistry*, 104, 1277-1281.

Wang, M., Zhao, Q., Jiang, D., Wang, Z., 2020. Complete chloroplast genome sequence of *Stachys japonica* (Labiatae). *Mitochondrial DNA Part B*, 5(3), 2675-2676.

EKLER

EK-1. ETİK BİLDİRİM VE İNTİHAL BEYAN FORMU

SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
Graduate School of Health Sciences

ETİK BİLDİRİM VE İNTİHAL BEYAN FORMU[1]

Öğrencinin Adı ve Soyadı	Arij HALWANİ
Öğrencinin Numarası	
Ana Bilim Dalı	Farmakognozi
Öğrencinin Kayıtlı Olduğu Program Türü	Yüksek Lisans

Yukarıda bilgileri verilen tezin intihal tespit yazılımıyla (Turnitin) yapılan tarama sonucunda elde edilen benzerlik oranları aşağıdaki gibidir. Beyan edilen bilgilerin doğru olduğunu, aksi hâlde doğacak hukuki sorumlulukları kabul ve beyan ederiz.

Bölümler	Benzerlik Oranı	Maksimum Benzerlik Oranları
I. Giriş	% 2	% 15
II. Genel Bilgiler	% 5	% 35
III. Materyal ve Metod	% 15	% 35
IV. Bulgular	% 10	% 15
V. Tartışma	% 2	% 20

Not: *Yedi kelimeye kadar benzerlikler ile Başlık, Kaynakça, İçindekiler, Teşekkür, Dizin ve Ekler kısımları tarama dışı bırakılabilir. Yukarıdaki azami benzerlik oranları yanında tek bir kaynaktan olan benzerlik oranlarının %5'den büyük olmaması gerekir.*

[1] Bu form bilgisayar ortamında doldurulmalı, çıktısı imzalanıp Tez Savunması Jüri Öneri Formu'yla birlikte Ana Bilim Dalı Başkanlığı aracılığıyla ÜBYS üzerinden Enstitüye iletilmelidir.

EK-2. ETİK KURUL ONAY FORMU

T.C.
ATATÜRK ÜNİVERSİTESİ
Eczacılık Fakültesi Dekanlığı
Birim Etik Kurulu

Sayı : 93722986.12/
Konu: Birim Etik Kurul Kararı **13/04/2022**

Sayın: Doç. Dr. Esen SEZEN KARAOĞLAN

İlgi: 08.04.2022 tarih ve 2200113417 sayılı dilekçeniz.

Fakültemiz Birim Etik Kurulunun 12.04.2022 tarihinde 5 numaralı kararı ile danışmanı olduğunuz yüksek lisans öğrencisi Arıj HALWANI'nın "Stachys macrostachya (WEND.) BRIQ Üzerinde Farmakognozik Araştırmalar" (İn Vitro) başlıklı çalışması etik kurulumuz tarafından kabul edilmiştir.

Bilgilerinizi ve gereğini rica ederim.

Karar -5- Atatürk Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Farmasötik Botanik Anabilim Dalı öğretim üyesi Doç. Dr. Esen SEZEN KARAOĞLAN'ın danışmanı olduğu yüksek lisans öğrencisi Arıj HALWANI'nın Eczacılık Fakültesi Farmakognozi Anabilim Dalı Araştırma Laboratuvarlarında yürüteceği "Stachys macrostachya (WEND.) BRIQ Üzerinde Farmakognozik Araştırmalar" (İn Vitro) başlıklı araştırma çalışması ile ilgili 08.04.2022 tarih ve 2200113417 sayılı yazısı ile ekleri görüşüldü.

Yapılan görüşmelerden sonra; söz konusu çalışmanın yürütülmesinin etik kurallara uygun olduğu mevcut oybirliği ile kabul edilmiştir.

Atatürk Üniversitesi kampusu 25040 Tlf: 0442-231 52 07 Fax: 0442 – 2315201 Elektronik Post: eczfak@atauni.edu.tr ERZURUM