

**T.C.**  
**NEVŞEHİR HACI BEKTAŞ VELİ ÜNİVERSİTESİ**  
**FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**NEVŞEHİR İLİNDE YETİŞEN BAZI İĞNE YAPRAKLI**  
**AĞAÇLARDAN TOPLANAN KOZALAKLARIN**  
**ANTİOKSİDAN VE ANTİBAKTERİYEL AKTİVİTELERİ**

**Tezi Hazırlayan**  
**Mustafa AKAR**

**Tez Danışmanı**  
**Prof. Dr. Şahlan ÖZTÜRK**

**Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim dalı**  
**Yüksek Lisans Tezi**

**Ocak 2022**  
**NEVŞEHİR**



**T.C.**  
**NEVŞEHİR HACI BEKTAŞ VELİ ÜNİVERSİTESİ**  
**FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**NEVŞEHİR İLİNDE YETİŞEN BAZI İĞNE YAPRAKLI  
AĞAÇLARDAN TOPLANAN KOZALAKLARIN  
ANTİOKSİDAN VE ANTİBAKTERİYEL AKTİVİTELERİ**

**Tezi Hazırlayan**  
**Mustafa AKAR**

**Tez Danışmanı**  
**Prof. Dr. Şahlan ÖZTÜRK**

**Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim dalı**  
**Yüksek Lisans Tezi**

**Ocak 2022**  
**NEVŞEHİR**

## KABUL VE ONAY SAYFASI



## **TEZ BİLDİRİM SAYFASI**

Tez yazım kurallarına uygun olarak yazılan bu çalışmada yer alan tüm bilgilerin bilimsel ve akademik kurallar çerçevesinde elde edilerek sunulduğunu ve bana ait olmayan her türlü ifade ve bilginin kaynağına eksiksiz atıf yapıldığını bildiririm

Mustafa AKAR



## TEŞEKKÜR

Çalıőmamda tecrübesi, bilgi ve becerisinden faydalandığım ayrıca maddi manevi desteğini esirgemeyen hocam sayın Prof. Dr. Şahlan ÖZTÜRK'e, materyal toplama aşamasında yardımlarından dolayı sevgili dostum İdris İŐNEL'e, laboratuvar çalışmalarında ekstraksiyon aşamasında yardımlarından dolayı Sayın Öğretim Görevlisi Enver ERSOY ANDEDEN'e, ve Mustafa GÜLTEKİN'e, yetişmemde büyük emekler sarf eden değerli annem Meliha AKAR' a, değerli kardeşim Zeynep AKAR' a, değerli ağabeyim İsmail AKAR' a her daim arkamda duran ve beni destekleyen sevgili eşim Remziye AKAR'a

Sonsuz teşekkür ederim.

**NEVŞEHİR İLİNDE YETİŞEN BAZI İĞNE YAPRAKLI AĞAÇLARDAN  
TOPLANAN KOZALAKLARIN ANTIOKSİDAN VE ANTİBAKTERİYEL  
AKTİVİTELERİ**

**(Yüksek Lisans Tezi)**

**MUSTAFA AKAR**

**NEVŞEHİR HACİBEKTAŞ VELİ ÜNİVERSİTESİ FEN BİLİMLERİ  
ENSTİTÜSÜ**

**Ocak 2022**

**ÖZET**

Bu çalışmada Nevşehir ilinde yetişen 6 farklı iğne yapraklı bazı ağaçların (*Thuca occidentalis*, *Juniperus viriginiana*, *Cedrus atlantica*, *Picea pungens engelm*, *Pinus nigra JF. arnold*, *Cupressus arizonica*) kozalaklarına ait antioksidan ve antibakteriyel aktiviteyi incelenmiştir. Antioksidan aktivite tayini için DPPH serbest radikal süpürme aktivitesi, metal iyonları şelatlama aktivitesi, total fenolik içerik tayini,  $\beta$ -karoten miktar tayini, likopen miktarı tayini yapılmıştır. Antibakteriyel aktivite tayini için toplam 6 adet test bakterisi (*Bacillus subtilis* ATCC 6051, *Listeria monocytogenes* ATCC 7644, *Micrococcus luteus* ATCC 4698, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Enterococcus faecalis* ATCC 29212, *Escherichia coli* ATCC 11229) kullanılmıştır. DPPH radikali süpürme aktivitesi bakımında en iyi değer *Pinus nigra jf. arnold*(IC<sub>50</sub>: 55,8  $\mu$ g / mL, indirgeme aralığı % 60,1– % 98,6) türünde, en düşük değer ise *Thuca occidentalis* (IC<sub>50</sub>: 200,4  $\mu$ g / mL, indirgeme aralığı %33,14 - %58,45) türünde görülmüştür. Metal iyonları şelatlama aktivitesi bakımından en iyi sonuç *Pinus nigra JF. arnold* (IC<sub>50</sub>: 61,0, şelatlama aktivitesi %55,5 - %74,6) türünde tespit edilmiştir. Konsantrasyon arttıkça şelatlama oranının arttığı belirlenmiştir. En düşük aktivite *Thuca occidentalis* (IC<sub>50</sub>: 236,2, indirgeme aralığı %22,3 - %52,8) örneğinde görülmüştür. Bu çalışmada likopen miktarı en fazla *Pinus nigra JF. arnold* (0,590) türünde en düşük miktar *Juniperus viriginiana* (0,516) türünde tespit edilmiştir.  $\beta$ -karoten miktarı en yüksek çıkan tür *Cupressus arizonica* (0,95 $\mu$ g / g), miktarı en düşük bulunan tür *Pinus nigra JF. arnold* (0,39 $\mu$ g / g) türü görülmüştür. Total fenolik içerik bakımından en zengin tür

*Pinus nigra jf. arnold* türü olarak belirlenmiştir, içerik bakımından en düşük miktar *Juniperus viriginiana* türünde tespit edilmiştir.

Çalışmada kullanılan 6 farklı tür arasında en iyi antibakteriyel aktivite gösteren tür *Pinus nigra jf. arnold* türünde belirlenmiştir. En az aktivite ise *Thuca occidentalis* türünde tespit edilmiştir.

**Anahtar Kelimeler:** Antioksidan, Antibakteriyel, *Pinus nigra jf. arnold*,

**Tez danışmanı:** Prof. Dr. Şahlan ÖZTRK

**Sayfa Adeti:** 50





**ANTIOXIDANT AND ANTIBACTERIAL ACTIVITIES OF COALS  
COLLECTED FROM SOME NEEDLE LEAF TREES GROWING IN  
NEVSEHIR**

**(M. Sc. Thesis)**

**MUSTAFA AKAR**

**January 2022**

**ABSTRACT**

**NEVŞEHİR HACI BEKTAŞ VELİ UNIVERSITY GRADUATE SCHOOL OF  
NATURAL AND APPIED SCIENCES**

In this study, the antioxidant and antibacterial activities of the cones of 6 different coniferous trees growing in Nevşehir region (*Thuca occidentalis*, *Juniperus viriginiana*, *Cedrus atlantica*, *Picea Pungens Engelm*, *Pinus nigra JF. arnold*, *Cupresus arizonica*) were investigated. For the determination of antioxidant activity, DPPH free radical scavenging activity, metal ions chelating activity, total phenolic content, carotene and lycopene amount were determined. A total of 6 test bacteria (*Bacillus subtilis* ATCC 6051, *Listeria monocytogenes* ATCC 7644, *Micrococcus luteus* ATCC 4698, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Enterococcus faecalis* ATCC 29212, *Escherichia coli* ATCC 11229) used for determination antibacterial activity. While the highest value for DPPH radical scavenging activity has *Pinus nigra JF. Arnold* (IC<sub>50</sub>: 55,8 µg / mL % 60,1– % 98,6), the lowest value has *Thuca occidentalis* (IC<sub>50</sub>: 200,4 µg / mL %33,14 - %58,45). In terms of metal ions chelating activity, the best result was observed in *Pinus nigra JF. arnold* (IC<sub>50</sub> 61.0% 55.5% - 74.6%). It was determined that higher concentration belonging to extracts have higher chelating rate. The lowest activity was observed in *Thuca occidentalis* ((IC<sub>50</sub>: 236.2% 22.3 - 52.8%). In this study, the highest amount of lycopene was observed in *Pinus nigra jf. arnold* (0.590) and the lowest in *Juniperus viriginiana* (0.516). *Cupressus arizonica* (0.95µg / g) species has the highest  $\alpha$ -carotene content and *Pinus nigra JF. arnold* (0.39µg / g) has the lowest  $\alpha$ -carotene content. The richest species in terms of total phenolic content amount was determined as *Pinus nigra JF. arnold* species, the lowest amount in terms of content was observed in *Juniperus viriginiana*. Among the 6  $\beta$ -different species used in the

study, the best antibacterial activity was observed in *Pinus nigra JF. arnold*. The least activity was observed in *Thuca occidentalis*.

**Keywords:** Antioxidant, Antibacterial, *Pinus nigra jf. arnold*,

**The Advisor:** Prof. Dr. Şahlan ÖZTÜRK

**Number Of Pages:** 50



## İÇİNDEKİLER

KABUL VE ONAY SAYFASI .....	I
TEZ BİLDİRİM SAYFASI .....	II
TEŞEKKÜR.....	III
ÖZET .....	IV
ABSTRACT.....	VI
TABLO LİSTESİ.....	XI
ŞEKİL LİSTESİ.....	XII
SİMGELER VE KISALTMALAR LİSTESİ .....	XIV
1.BÖLÜM .....	1
GİRİŞ .....	1
2.BÖLÜM .....	4
GENEL BİLGİLER .....	4
2.1 İğne Yapraklılar.....	4
2.2 <i>Pinaceae</i> (Çamgiller).....	5
2.3 Çalışmada kullanılan bitkilerin genel özellikleri.....	5
2.3.1 <i>Thuca occidentalis</i> (Batı mazısı) .....	5
2.3.2 <i>Cupressus arizonica</i> (Arizona servisi).....	6
2.3.3 <i>Juniperus viriginiana</i> (Kuruşun kalem ardıcı).....	7
2.3.4 <i>Cedrus atlantica</i> (Atlas sedir).....	8
2.3.5 <i>Picea pungens engelm</i> (Mavi ladin) .....	9
2.3.6 <i>Pinus nigra jf. arnold</i> (Anadolu Karaçamı).....	10
2.4 Antioksidanlar .....	11
2.4.1 Antioksidanların sınıflandırılması .....	11
2.4.1.1 Endojen kaynaklı antioksidanlar.....	12
2.4.1.2 Enzimatik antioksidanlar .....	12
2.4.1.2.1 Süperoksit dismutaz.....	12
2.4.1.2.2 Katalaz .....	12
2.4.1.2.3 Glutatyon peroksidaz.....	13
2.4.1.2.4 Glutatyon redüktaz.....	13
2.5 Nonenzimatik antioksidanlar.....	14
2.5.1 Glutatyon .....	14
2.5.2 Melatonin.....	14

2.5.3 Ürik asit .....	15
2.5.4 Bilirubin .....	15
2.5.5 Albumin .....	16
2.5.6 Koenzim Q10 .....	16
2.5.7 $\alpha$ -Lipoik asit .....	17
2.5.8 Selenyum .....	17
2.5.9 Seruloplazmin ve transferrin .....	18
2.4.1.2 Ekzojen kaynaklı antioksidanlar .....	18
2.4.1.2.1 Vitamin kaynaklı antioksidanlar .....	18
2.4.1.2.2 Vitamin E .....	19
2.4.1.2.3 Vitamin C .....	19
2.4.1.2.4 $\beta$ -karoten .....	19
2.4.1.2.5 Folik asit .....	20
2.4 Antibakteriyel özellik .....	20
3.Bölüm .....	22
3.1 MATERYAL .....	22
3.1.1 Çalışmalarda kullanılan cihazlar .....	22
3.1.2 Çalışmada kullanılan kimyasallar .....	22
3.1.3 Çalışmada kullanılan test bakterileri .....	22
3.2 Metot .....	22
3.2.1 Ekstraksiyon işlemi .....	22
3.2.2 DPPH serbest radikal süpürme aktivitesi .....	24
3.2.3 Metal iyonları şelatlama .....	25
3.2.4 Toplam fenolik içerik miktarı belirleme .....	25
3.2.5 $\beta$ -karoten ve likopen miktar tayini .....	26
3.2.6 Antibakteriyel aktivite tayini .....	26
3.2.6 Antibiyotik duyarlılık testi .....	27
3.2.7 İstatiksel veriler .....	27
4.BÖLÜM .....	28
BULGULAR .....	28
4.1 Kozalakların toplandığı bölgeler .....	28
4.2 DPPH serbest radikal süpürme aktivitesi .....	28

4.3 Metal iyonları şelatlama aktivitesi.....	29
4.4 Biyoaktif içerik miktarı .....	29
4.5 Antibakteriyel aktivite .....	30
4.6 Antibiyotik duyarlılık testi .....	31
5. BÖLÜM .....	33
TARTIŞMA .....	33
5.1 DPPH serbest radikali süpürme aktivitesi .....	33
5.2 Metal iyonları şelatlama aktiviteleri.....	34
5.3 Biyoaktif içerik tayini.....	35
5.4 Antibakteriyel aktivite .....	36
6.BÖLÜM.....	38
SONUÇ .....	38
KAYNAKÇA.....	40
ÖZGEÇMİŞ .....	50

## TABLO LİSTESİ

<b>Tablo 4.1</b> Kozalakların tolandığı bölgeler .....	27
<b>Tablo 4.2</b> Ekstraktların DPPH süpürme aktiviteleri ve IC <sub>50</sub> değerleri .....	27
<b>Tablo 4.3</b> Ekstraktların metal iyonları şelatlama yetenekleri ve IC <sub>50</sub> değerleri.....	28
<b>Tablo 4.4:</b> Total fenol, likopen ve $\alpha$ -karoten miktarları.....	29
<b>Tablo4.5</b> Kozalak ekstraktların antibakteriyel etkileri.....	30
<b>Tablo 4.6:</b> Antibiyotiklere karşı direnç.....	31



## ŞEKİL LİSTESİ

Şekil 1: Süperoksit dismutaz reaksiyonu.....	11
Şekil 2: Katalaz enzim aktivitesi.....	11
Şekil 3: Glutatyon peroksidaz aktivitesi.....	12
Şekil 4: Glutatyon redüktaz enzim aktivitesi.....	12
Şekil 5: Glutatyon.....	13
Şekil 6: Melatonin.....	14
Şekil 7: Ürik asit.....	14
Şekil 8: Bilirubin.....	15
Şekil 9: Albumin.....	15
Şekil 10: Koenzim Q10.....	16
Şekil 11: $\alpha$ -Lipoik asit.....	16
Şekil 12: Seruloplazmin.....	17
Şekil 13: Transferin.....	17
Şekil 14: Vitamin E.....	18
Şekil 15: vitamin C.....	18
Şekil 16: $\beta$ -karoten.....	19
Şekil 17: Folik asit.....	19
Şekil 18: DPPH kimyasal yapısı.....	23

## RESİM LİSTESİ

<b>Resim 1:</b> <i>Thuca occidentalis</i> türü.....	5
<b>Resim 2:</b> <i>Supressus arizonica</i> .....	6
<b>Resim 3:</b> <i>Juniperus viriginiana</i> .....	7
<b>Resim 4:</b> <i>Cedrus atlantica</i> .....	8
<b>Resim 5:</b> <i>Picea pungens engelm</i> .....	9
<b>Resim 6:</b> <i>Pinus nigra jf. arnold</i> .....	10
<b>Resim 7:</b> Soxleth cihazı.....	22
<b>Resim 8:</b> Evoparatör cihazı.....	22
<b>Resim 9:</b> Örneklerin <i>Escherichia coli</i> ATCC 11229 üzerindeki etkisi.....	26



## SİMGELER VE KISALTMALAR LİSTESİ

DNA: Deoksiribonükleik Asit

yy. : Yüzyıl

ATP: Adenozin Trifosfat

ROS: Reaktif Oksijen Türleri

ROT: Reaktif Oksijen Türevleri

BHT: Bütillenmiş Hidroksi Toluen

BHA: Bütillenmiş Hidroksi Anisol

TBHQ: Tersiyer Bütihidroksikinon

PG: Propil Gallat

C6 – C3 – C6 : Karbon - 6 - Karbon - 3 -Karbon 6

Fe<sup>+3</sup>: Demir artı 3

Fe<sup>+2</sup>: Demir artı 2

NaCl: Sodyum Klorür

Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>: Sodyum Karbonat

ATCC: Amerikan Tıp Kültür Koleksiyonu

g: Gram

mg: Miligram

µg: Mikrogram

mL: Mililitre

µL: Mikrolitre

ppm: Milyonda bir

mM: Milimolar

nm: Nanometre

%: Yüzde

mm: Milimetre

IC<sub>50</sub>: Yüzde elliye inhibe eden konsantrasyon

UV: Ultraviöle

$\alpha$ : Alfa

$\beta$ : Beta

$\gamma$ : Gama

$\delta$ : Delta

FDA: Amerikan gıda ve ilaç dairesi

°C: Santigrat derece

MİK: Minimal inhibisyon konsantrasyonu

sp. : Alttür AMC10: Ampisilin

E15: Erythromcin

CN10: Gentamisin

CFM5: Cefiksım

OX1: Oksalısın

P10: Penisilin

CRO30: Ceftriakson

AMC30: Amoksilin

CXM30: Cefuroksım

FOX30: Cefoksitin

# 1. BÖLÜM

## GİRİŞ

Geçmişten günümüze bitkiler insanlar için vazgeçilmez besin ve şifa kaynaklarıdır. İnsanoğlu birçok bitkiden çay, besin, ilaç olarak faydalanmışlardır. Ayrıca bazı bitkiler baharat ve kozmetik alanlarında 'da önemli yere sahiptir[1].

Modern bilimin bu temeller üzerinde kurulu olmasının yanı sıra günümüzdeki haline ulaşması uzun yıllar almıştır. DNA'nın keşfedilmesi, aşının bulunması, mikroskobun icadı gibi çeşitli buluşlar bilimin gelişmesinde çok büyük rol almıştır. Geleneksel yöntemlerin yanı sıra bu tür bilimsel keşifler bilimin ilerlemesine, ilaç üretiminin yaygınlaşmasına, hastalıkların tedavi sürelerinin kısaltılmasına, yeni organizmaların keşfedilmesine olanak sağlamıştır.

Bitkilerin çeşitli alanlarda kullanılıyor olması tarih boyunca insanlar tarafından araştırılıp incelemeye tabi tutulmuştur. Bu araştırmalar sonucunda bitkilerin yaşamsal faaliyetlerini sürdürebilmeleri için sentezledikleri bazı moleküller keşfedilmiştir. Bu moleküller primer metabolitler olarak isimlendirilir. Primer metabolitlerin yanı sıra bitkilerin sentezlediği diğer moleküllere ise sekonder metabolitler denilmektedir. Sekonder metabolitler yapı bakımından fenolik bileşikler, alkaloidler, terpenoidler, glikozitler, ribozomal olmayan peptitler gibi özel bileşikler barındırır[3]. Aynı zamanda antioksidan ve antibakteriyel özellikte olan sekonder metabolitler enfeksiyon hastalıkları başta olmak üzere birçok sağlık probleminde kullanılan başlıca doğal ilaçlardandır.

Farklı amaçlar doğrultusunda kullanılan antioksidanlar insan vücudunda serbest radikal olarak adlandırılan son yörüngelerinde bir atom eksikliği olan ve sürekli bu açığı kapatmak için diğer moleküllerin atomlarına saldıran oksijen(ROS) ve nitrojen(RNT) türevi tehlikeli bileşikler veya atomlardır[4]. Bu atom veya bileşiklerin etkilerini ortadan kaldıran veya aktivitelerini yavaşlatan moleküllere antioksidan adı verilir. İnsanda var olan antioksidanlar vücut tarafından doğal olarak üretilir veya dışarıdan ek olarak alınırlar. Hem endojen hem de ekzojen antioksidanlar serbest radikallere karşı

temizleyici görev üstlenirler. Böylelikle savunma sistemini güçlendirerek hastalık riskini azaltırlar[5].

Bu bağlamda bilim insanları ve sanayiciler ilaç, gıda, plastik sanayisi gibi alanlarda yararlanabilmek için sentetik ve doğal antioksidanları kullanmışlardır. Sanayide koruyucu veya katkı maddesi olarak kullanılması için laboratuvar ortamında üretilen antioksidanlara sentetik antioksidan denir, bitkilerin gerek koruma gerek gelişimlerine destek olması amacı ile ürettikleri antioksidanlara doğal antioksidanlar denir.

Günümüzde birçok araştırmacı, tıbbi öneme sahip olduğu düşünülen bitkilerin kimyasal içeriklerinin bulunması için çalışmaktadır. Geçmişten günümüze sağlık başta olmak üzere birçok alanda kullanılan bitkiler günümüzde hala ilk gün ki değerini korumaktadır. Bitkiler kullanılarak tedavi etme yöntemleri ilk kayıtlara göre M.Ö. 5000'lerde Mezopotamya bölgesinde rastlanmış, 250 bitkisel ilacın kullanıldığı belirlenmiştir[2].

Özellikle kozalak gibi sert ve faydasız görünen meyveler uzun yıllardan beri tıbbi destek amacı ile farklı alanlarda kullanılmaktadır. Antioksidan ve antibakteriyel özellikleri bakımından zengin olan kozalaklar günümüzde hâla şerbet şeklinde tüketilmektedir. Herhangi bir bilimsel temele dayanmadan yapılan bu tedaviyi destekleyecek çalışmalar bilim insanları tarafından yapılmaktadır.

Herhangi bir bilimsel temele dayanmaksızın yeşil haldeki kozalaklar toplanıp kaynatılarak şerbet veya reçel halinde tüketilmektedir. Bu işlem için Nisan – Mayıs aylarında taze yeşil çam kozalakları toplanır. Bir miktar su içerisinde uzun süre kaynatılarak kozalak özütü elde edilir. Daha sonra çeşitli maddeler ile karıştırılarak tüketilir.

Bu çalışmada halk tarafından balgam sökücü, ateş düşürücü vb. rahatsızlıkların giderilmesi için tüketilen yeşil kozalakların laboratuvar ortamında deneysel olarak antibakteriyel ve antioksidan özellikleri incelenmiştir. Bitkisel ilaçlara her geçen gün rağbetin artması göz önüne alındığında bu çalışma ilaç sanayisine ve ekonomiye büyük oranda katkı sağlayacaktır. Piyasada var olan ve büyük çoğunluğu kimyasal ilaçların yerine alternatif bitkisel kaynaklı ilaçların ortaya çıkması önem taşımaktadır.

Bitkisel kaynaklı ilaçların temeli bitkilerin kaynatılarak veya havan benzeri aletler ile dövülerek özütlerinin çıkartılmasına dayanır. Bu işlem bilim insanlarının günümüzde içerik analizi, etken madde tayini yapmalarına nc olmuştur. Böylece bitki içerisinde yer alan ve hastalığa sebep olan faktöre tesir eden asıl maddenin bulunup ticari olarak satılmaya hazır hale getirilmesi hedeflenmiştir.

Bu alışmada Nevşehir ilinde yetişen iğne yapraklılar sınıfına ait bazı ağaçların kozalakları'nın (*Thuca occidentalis*, *Juniperus virginiana*, *Cedrus atlantica*, *Picea pungens engelm*, *Pinus nigra jf. arnold*, *Cupresus arizonica*) ilk aşamada antioksidan ve antibakteriyel aktivitelerinin tayini amaçlanmıştır. Toplanan iğne yapraklı ağaç kozalaklarının etanol yardımı ile ekstraksiyonundan elde edilen ekstraktlarının farklı konsantrasyonlarda DPPH serbest radikal absorpsiyonu, metal iyonları şelatlama aktiviteleri, toplam fenolik içeriği ve  $\beta$ -karoten ve likopen miktar tayini hedeflanmıştır. Elde edilen bulgular bu alanda yapılacak çalışmalara nc olacaktır.

## 2. BÖLÜM

### GENEL BİLGİLER

Zengin bitki çeşitliliğine sahip ülkeler arasında ilk sıralarda yer alan ülkemiz, yapılan son çalışmalara göre 12000 bitki türüne sahip olduğu belirlenmiştir. Avrupa'da görülen tüm bitki türlerini barındıran Türkiye, bu özelliğini, yakın mesafede değişen yeryüzü şekillerine, dört mevsim geçirmesine, farklı toprak türlerine, jeolojik konumuna borçludur. Dünyada sadece bir bölgede yaşayan ve başka hiçbir yerde yaşadığı ispatlanmamış bitkilere endemik bitki denir. Ülkemizde görülen bitkilerin yaklaşık olarak 3700 tanesi endemik bitki olup en çok endemik bitki Toros dağlarında görülmektedir[10]. Endemik türler ülkemizde ağırlık olarak Akdeniz bölgesi, iç Anadolu bölgesi, doğu Anadolu bölgesinde tespit edilmiştir[12]. Türkiye yüz ölçümü bakımından topraklarının %27,6'sı orman olan, ılıman iklim kuşağına sahip ülkeler arasında biyolojik çeşitlilik bakımından zengin ülkeler sınıfında bulunmaktadır[11]. Ormanların %60'ı iğne yapraklı ağaçlardan oluşmaktadır[8]. Bu bağlamda iğne yapraklı ağaçların tıbbi ve ekonomik önemine vurgu yapmak, ülke ekonomisine katkıda bulunmak amacı ile yapılmış önemli bir çalışma konusu olmuştur.

#### 2.1 İğne Yapraklılar

İğne yapraklılar, bitkiler âleminin açık tohumlular bölümünde bulunan tek sınıf olan *Pinopsida*'ya dâhil bir bitki takımıdır. Ardıç, çam, göknar, ladin, melez, porsuk, mazı, sekoya, sedir, servi gibi soyu devam etmekte olan tüm kozalaklı bitkileri barındırır. İğne yapraklılar, *Pinopsida* (erkek ve dişi kozalağı ayrı genelde iğne yapraklı bitkilerin tümü) sınıfında yer alan dört takımdan biridir ve iğne yapraklı bitkilerin soyunu devam ettiren tüm üyelerini barındırır[8]. Bu tür, çok soğuk veya çok sıcak bölgelerde yetişme özelliğine sahip olduğu için hemen hemen dünya üzerinde her yerde rastlayabilirsiniz. Ayrıca kalın gövde yapısının kereste, yelken direği, elektrik direği, yapı malzemesi, ahşap kapı vb. alanlarda kullanılıyor olması iğne yapraklı ağaçları tercih sebebi yapmaktadır[9]. İğne yapraklı ağaçlar sınıfında yer alan bazı bitkilerin kozalak ve meyveleri tıbbi amaçla kullanılıyor olması ülkemizin yerli ilaç sanayisinde dışa bağımlılığını azaltacaktır. Dünya Sağlık Örgütü (DSÖ) raporlarına göre dünya üzerinde var olan bitkilerin yaklaşık 70.000 tanesi tıbbi amaç ile kullanılıyor. Bu bitkilerden

21.000 tanesi ilaç sanayisinde kullanılmaktadır. Ülkemiz tıbbi amaç ile kullanılan bitkilerin ihracatında 18. sırada yer almaktadır[13,14,15].

## **2.2 Pinaceae (Çamgiller)**

Sonbaharda diğer ağaçların aksine yaprak dökmeyen iğnemsiz yaprak türüne sahip her mevsim yeşil kalan çam ağaçları soğuk ve kurak ortamlara adaptasyonu sayesinde her yerde yetişebilme özelliğine sahip bir ağaç türüdür. Havayı temizleme özelliği, 100 ila 1000 yıl yaşayabilme ve boylarının 9 ila 25 metre ye ulaşabilmesi çam ağaçlarını ormanların ve peyzaj mühendisliğinin gözdesi haline getirmiştir. İnşaat alanında kereste, sanayide kağıt hamuru, halk arasında yakacak vb. gibi alanlarda kullanılmaktadır.

Aynı zamanda çam sakızı ve çam fıstığı sektörlerinde ciddi rol alan çam ağaçları gıda sanayisinde de kullanılır. Dünyada 100'e yakın türü olmasına karşın ülkemizde yalnızca 5 türü(çam fıstığı, karaçam, kızılçam, halep çamı, sarıçam) bulunmaktadır[6]. Çam ağaçlarının sert kabukları A ve C vitaminleri bakımından çok zengindir. Çam ağaçları Erkek ve Dişi kozalakların her ikisine de sahiptir. Erkek kozalaklar dişi kozalıklara göre daha kısa yaşarlar. Dişi kozalaklar daha tombul ve dayanıklıdır[7].

## **2.3 Çalışmada kullanılan bitkilerin genel özellikleri**

Bu çalışmada Nevşehir bölgesine ait 6 çeşit (*Thuca occidentalis*, *Juniperus virginiana*, *Cedrus atlantica*, *Picea pungens engelm*, *Pinus nigra JF. arnold*, *Cupressus arizonica*) iğne yapraklı ağaç kozalağı kullanılmıştır.

### **2.3.1 *Thuca occidentalis* (Batı mazısı)**

*Cupressaceae* familyasına ait bir bitkidir. Ülkemizde batı mazısı olarak bilinir. Odun kısmı kazık, direk, gemi ve ev inşaatında kullanılır. Taze sürgünleri, yaprak ve kozalak kısmı tıbbi amaçla kullanılır [19]. Ülkemizde genellikle süs bitkisi olarak kullanılmaktadır. Boyları yaklaşık olarak 15-20 metreye kadar uzayabilir[16]. İklim özellikleri bakımından bol güneşli bölgelerde, çok nemli, yarı gölge özelliği sağlayan hemen her bölgede yaşarlar[18].



**Resim 1:** *Thuca occidentalis* türü [17]

### **2.3.2 *Cupressus arizonica* (Arizona servisi)**

*Cupressaceae* familyasından olan Arizona servileri 20 m. kadar uzayabilirler. Diğer servi türlerinden tepelerinin mavi oluşu ve yangında nahoş koku çıkarmaları ile ayrılırlar[20]. Rüzgar perdesi, bahçe çiti olarak kullanılırlar[20]. Bunun yanı sıra servi kozalağı ülkemizde mide ülseri tedavisinde kullanılmaktadır[22]





**Resim 2:** *Supressus arizonica* [21]

### **2.3.3 *Juniperus viriginiana* (Kurşun kalem ardıcı)**

*Cupressaceae* familyasına ait bir bitki çeşidi olan kurşun kalem ardıcı, deniz iklimi etkilerinin düşmeye başladığı bölgelerden başlayarak kurak bölgeye kadar dağılmakta ve soğuğa, kuraklığa dayanıklı olması nedeniyle karasal iklimin bir ağacı olarak yurdumuzun her bölgesinde yayılmıştır[23]. Çürümeye karşı dayanıklı yapıları sayesinde ülkemizde kurşun kalem yapımı, oymacılık, köy evlerinin iç dekorasyonu, çekmece ve dolap yapımında kullanılır[24]. Ayrıca ülkemizde ardıç kozalakları romatizma ağrıları giderici olarak ve antiseptik olarak kullanılmaktadır[26].



**Resim 3:** *Juniperus virginiana*[25]

#### **2.3.4 *Cedrus atlantica* (Atlas sedir)**

*Pinaceae* familyasına ait bir bitkidir. 40 m. boyu 3 m. enine ulaşabilir[30]. Fas ve Cezayir’de yetişen atlas sediri bitkileri üzerinde yapılan çalışmalarda elde edilen yağın antifungal[31], antimikrobiyal[32], antiviral[33] etkilerinin varlığı bilinmektedir.



**Resim 4:** *Cedrus atlantica* [34]

### **2.3.5 *Picea pungens engelm* (Mavi ladin)**

*Pinaceae* ailesinden olan bu tür, serin ve nemli bölgelerde yaşar[35]. Halk arasında soylu kozalak ağaç diye isimlendirilir. Genellikle 30m, uygun ortamlarda 50 metreye kadar yükselebilirler. Ülkemizde yetişme koşulları en uygun İç Anadolu Bölgesi'nde ve İstanbul ilinde görülür[37].



**Resim 5:***Picea pungens engelm*[36]

### **2.3.6 *Pinus nigra jf. arnold* (Anadolu Karaçamı)**

*Pinaceae* familyasına bağlı bir bitkidir. Anadolu karaçamı ülkemizdeki ağaçlandırma çalışmalarında en çok kullanılan ağaç türlerinden biridir[38]. Halk arasında mide ülseri ve hayvanlarda mide solucanı tedavisinde karaçam kozalağı dekoksasyonu dahili olarak kullanılır[40]. Ayrıca halk arasında solunum ve idrar yolu enfeksiyonları tedavisinde çam reçinesi kullanılmaktadır[41].



**Resim 6:** *Pinus nigra jf. arnold* [39]

## 2.4 Antioksidanlar

İnsan vücudunda oluşan oksidatif stres ile mücadelede öncelikli rol oynayan maddelere antioksidanlar adı verilir. İnsanlarda bulunan antioksidanlar ya vücut tarafından kendiliğinden üretilir ya da dışardan hazır olarak alınırlar[43]. Kendi içerisinde iki kısma ayrılan antioksidanlar doğal ve sentetik antioksidanlar olarak sınıflandırılır. Sentetik antioksidanlar endojen ve ekzojen antioksidanlar olmak üzere iki kısımdan oluşur. Doğal antioksidanlar enzimatik etki gösteren ve enzimatik etki göstermeyen olmak üzere iki sınıfta incelenir[42]. Antioksidanlar, hücre metabolizmasının aktivitesi sonucu yan ürün olarak meydana gelen serbest radikaller ile savaşarak koruyucu etki gösterirler[43].

### 2.4.1 Antioksidanların sınıflandırılması

Genel olarak antioksidanları endojen ve ekzojen olmak üzere iki başlık altında toplamak mümkün[44,45].

### 2.4.1.1 Endojen kaynaklı antioksidanlar

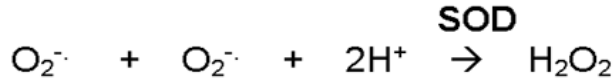
Savunma sistemini güçlendiren endojen kaynaklı antioksidanları iki farklı gurup altında incelemek mümkün. Enzimatik ve nonenzimatik olmak üzere iki guruba ayrılır.

### 2.4.1.2 Enzimatik antioksidanlar

Enzimatik antioksidan türleri: Süperoksit dismutaz (SOD), Katalaz (CAT), Glutasyon peroksidaz (GPX), Gutasyon redüktaz (GR) enzimatik koruma sağlayan antioksidanlardır [45, 46, 47, 48].

#### 2.4.1.2.1 Süperoksit dismutaz

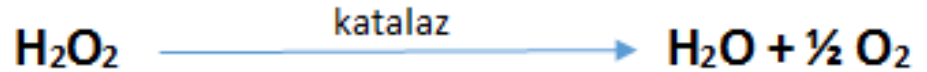
Reaktif oksijen türevlerine karşı mücadelede ilk saflarda yer alır. Süperoksit dismutaz, süperoksit radikalinin ( $O_2^{\cdot-}$ ) hidrojen peroksit ( $H_2O_2$ ) ve moleküler oksijene ( $O_2$ ) dönüşmesini sağlayan enzimatik bir antioksidandır [49].



Şekil 1:Süperoksit dismutaz reaksiyonu[50]

#### 2.4.1.2.2 Katalaz

Katalaz genellikle peroksizomlarda görev alır mitekondri ve endoplazmik retikulumda daha az aktivite göstermektedir [51]. Hidrojen peroksiti su ( $H_2O$ ) ve oksijene ( $O_2$ ) dönüşümünü katalizleyen önemli bir enzimatik antioksidandır [52,53].

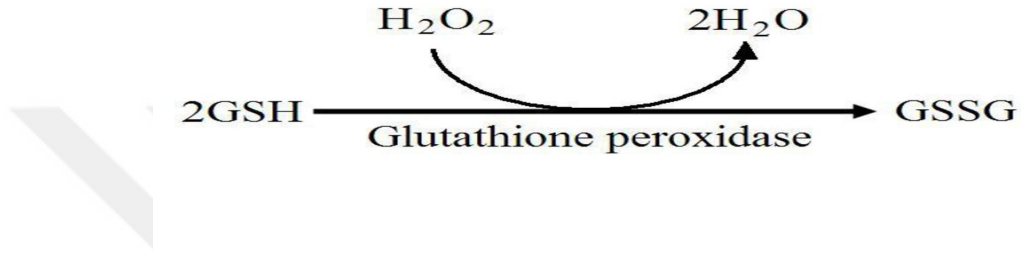


Şekil 2:Katalaz enzim aktivitesi[54]

#### 2.4.1.2.3 Glutatyon peroksidaz

Hücrelerin sitoplazmasında görev alan Glutatyon peroksidaz sitoplazmadaki H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>' den kaynaklanan oksidatif hasarı önleyerek hücreyi korur. Bu sayede H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>'den OH' nin oluşmasına karşı koyar[45].

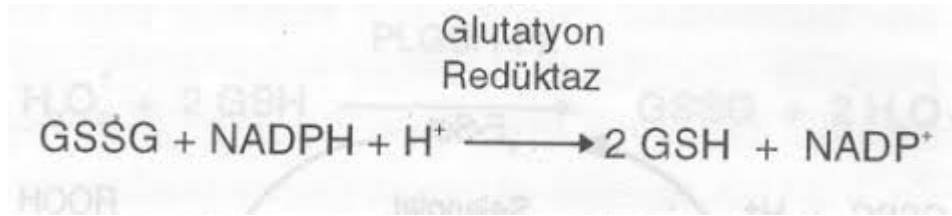
### Glutatyon Peroksidaz (GPx)



Şekil 3:Glutatyon peroksidaz aktivitesi[55]

#### 2.4.1.2.4 Glutatyon redüktaz

Flavin adenin dinükleotid (FAD) içeren flavoprotein bir enzim olarak karşımıza çıkan Glutatyon Redüktaz, NADPH'nin bir elektronunu okside glutatyonun disülfid bağlarına bağlayarak tekrardan Glutatyon (GSH)'ye dönüştürür. Glutatyon NADPH serbest radikal hasarını önlemek için gereklidir. Heksoz monofosfat (pentoz fosfat) kaynak olarak en önemli yoludur[46 48].



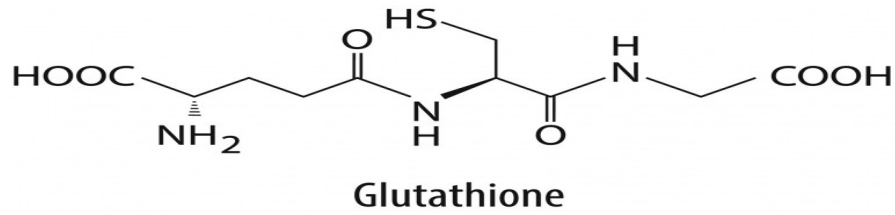
Şekil 4:Glutatyon redüktaz enzim aktivitesi[56]

## 2.5 Nonenzimatik antioksidanlar

Nonenzimatik antioksidanlar arasında koenzim Q10, selenyum,  $\alpha$ -lipoik asit, glutatyon, melatonin, ürik asit, bilirubin, albümin, seruloplazmin ve transferrin sayılabilir[45, 46, 47, 48, 57].

### 2.5.1 Glutatyon

Ökaryotik canlıların tamamında bulunur. Glutatyon antioksidan görevi görür ve ayrıca hücrenin redoks durumunun muhafazasında, eikosonoidlerin üretilmesinde, hücre sinyal yollarının düzenlenmesinde, detoksifikasyon sisteminin çalışmasında, gen ekspresyonunda ve apoptozisde de antioksidan olarak görev yapar[58].



Şekil 5:Glutatyon[59]

### 2.5.2 Melatonin

Pineal bezden üretilen endojen bir antioksidan olan melatonin dolaşıma salgılanır. Ayrıca triptofandan karanlık ortamda sentezlenir. Bütün hücrede görev alan melatonin makromolekülleri, oksidatif strese karşı korur. Mitokondriyel DNA ve çekirdek DNA'sını korur. Çok geniş çaplı bir koruma sağlar[60].

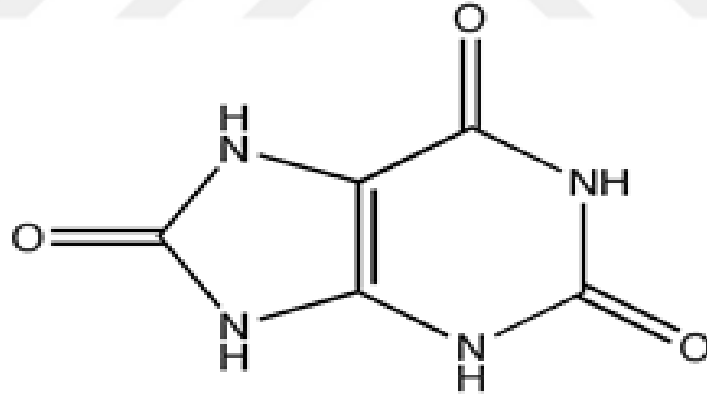




Şekil 6:Melatonin [61]

### 2.5.3 Ürik asit

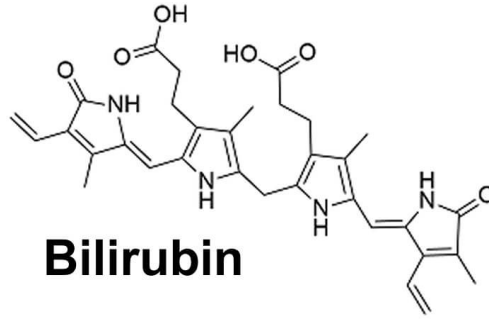
Kanda bulunan oksidatif strese sebep olan zararlıların yarısından sorumlu olduğu düşünülmektedir. Görev tanımına lipid peroksidasyonu da eklenebilir. Serbest radikallere karşı iyi bir savaşçı olmasının yanı sıra Fe ve Cu metal iyonlarına bağlanıp vücuttan atılımını sağlar[62, 63]



Şekil 7:Ürik asit [64]

### 2.5.4 Bilirubin

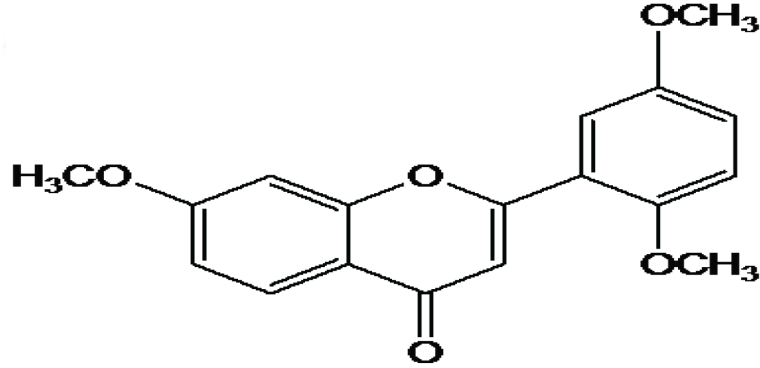
İyi bir antioksidan görevi gören bilirubin eritrositlerin parçalanması sonucu HEM proteinlerinin yıkımı sonucu meydana gelir. Karaciğer tarafından toplanır. Safra veya idrar ile vücuttan atılır[65, 66]



Şekil 8: Bilirubin[67]

### 2.5.5 Albumin

Vücutta farklı bölümler arasındaki sıvı dengesini sağlayan, ozmotik basıncın ayarlanmasında büyük rola sahip bir proteindir. Plazmadaki önem arz eden antioksidanların başında gelir. Bu protein,  $\alpha$ -antiproteaza karşı reaktif duruş sergileyen Hipokloröz asit (HOCl) oksidantlarını süpürür. Hipokloröz asit vücutta tehlikeli bir oksidan türevidir[68].

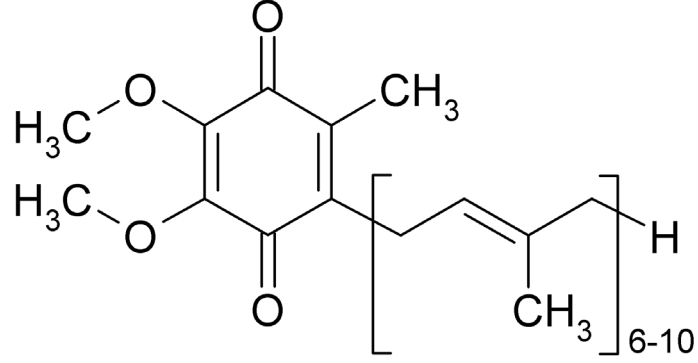


Şekil 9: Albumin[69]

### 2.5.6 Koenzim Q10

Hücrenin solunum işlemlerinde, enerji üretimi gibi hayati önem arz eden işlemlerde önemli rol almaktadır. Koenzim Q10 ubikinon bileşiklerinin bir ailesidir. İyi bir serbest radikal süpürücüsü olarak lipid ve protein peroksidasyonunu baskılamada görev alır. Ayrıca mitokondri iç zarında görevli mitokondriyal enzimlerin en az üç tanesinde (Kompleks I, II, III) kofaktör olarak görev alır. Bu bağlamda oksidatif fosforilasyonda

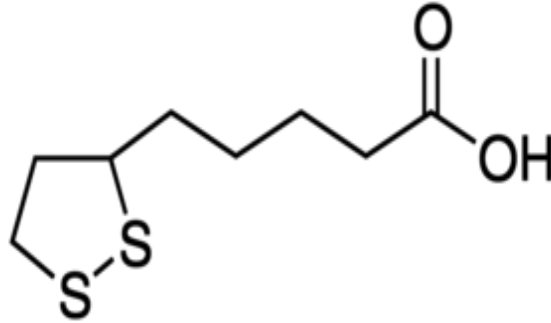
önemli görevi vardır. Koenzim Q10'un indirgenmiş hali olan ubikinol (CoQH<sub>2</sub>), elektron ve proton taşınımı sırasında lipofilik bir antioksidan olarak hareket eder[70].



Şekil 10:Koenzim Q10 [71]

### 2.5.7 $\alpha$ -Lipoik asit

$\alpha$ -Lipoik asit (LA), hidroksil, peroksinitrit anyonu, hipokloröz asit ve single oksijen reaktiflerine karşı antioksidan görevi görür. Ayrıca  $\alpha$ -Lipoik asit indirgenmiş türevi olan dihidrolipoik asit (DHLLA)'de iyi bir antioksidan maddedir[72].



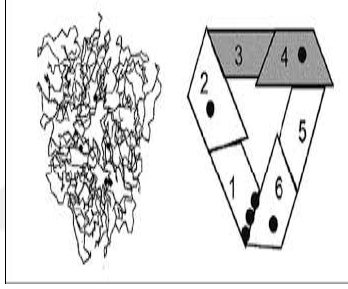
Şekil 11: $\alpha$ -Lipoik asit [73]

### 2.5.8 Selenyum

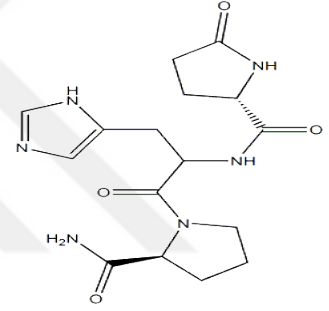
Antioksidan özelliğine sahip selenyum aynı zamanda bağışıklık güçlendirici olarak görev alır. Selenyum Gp<sub>x</sub> aktivitesini engelleyerek reaktif oksijen türlerinin oluşmasını engeller[21]. İnsan vücudunda selenoprotein adı verilen; metabolik enzimler, antioksidan enzimler ve antioksidan proteinlerin görevlerine göre ayrılan en az 25 çeşidi bulunmaktadır[74].

### 2.5.9 Seruloplazmin ve transferrin

Beyin ve diğer birçok organda sentezlenen seruloplazmin ve transferrin vücutta farklı fonksiyonlara sahip önemli antioksidanlardır. Transferrin hücreler arası  $Fe^{+3}$  taşınmasında görev alan asıl protein iken, kandaki Cu'nun yaklaşık %95'ini taşıma görevi  $\alpha_2$  serum glikoproteini olan seruloplazmine aittir.  $H_2O_2$ 'nin toksik olan  $OH^{\cdot}$ 'ye dönüşümünü fenton reaksiyonu ile katalizleyerek oksidatif stres oluşumuna sebep olan Ferrözün iyon( $Fe^{+2}$ )'unun konsatrasyonunu azaltmak, Transferrin molekülünün vücuttaki antioksidan görevinin kanıtıdır. Seruloplazmin, eritrosit zarlarında görevli çoklu doymamış yağ asitlerinin reaktif oksijen zararlılarına karşı korur[76].



Şekil 12:Seruloplazmin[77]



Şekil 13:transferrin[78]

#### 2.4.1.2 Ekzojen kaynaklı antioksidanlar

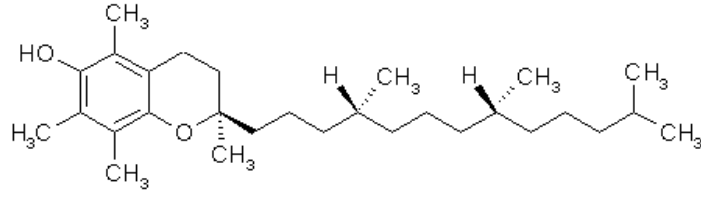
Endojen kaynaklı antioksidanların yanı sıra ekzojen kaynaklı olanlar vitaminler ve ilaçlardan oluşur.

##### 2.4.1.2.1 Vitamin kaynaklı antioksidanlar

Vitamin kaynaklı antioksidanlar,  $\beta$ -karoten (Vitamin A), askorbik asit (Vitamin C) ve folik asit (Vitamin B9),  $\alpha$ -tokoferol (Vitamin E) dışarıdan alınan örnekleridir.

#### 2.4.1.2.2 Vitamin E

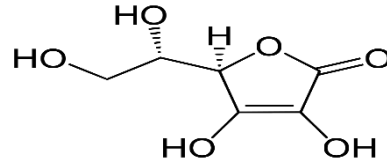
Yağda çözünebilir iyi derecede antioksidan etki gösteren bir vitamindir. İnsan vücudunda farklı formları olmasına karşın antioksidan etki bakımından göze en çok çarpan formu  $\alpha$ -tokoferol'dür. Lipid peroksidasyonuna karşı savaşarak hücre membranını korur. Kolon kanseri kardiyovasküler hastalıklar, nörolojik hastalıklar gibi önem arz eden konularda metabolizmayı güçlendirmektedir [47] .



Şekil 14:Vitamin E[79]

#### 2.4.1.2.3 Vitamin C

Diğer adı askorbik asit olan vitamin C nörotransmitter madde, kollajen ve karnitin gibi hayati önem arz eden maddelerin sentezinde görev alan, suda çözünen bir antioksidan türüdür[80]. Vitamin C, reaktif oksijen ve reaktif hidrojen türevlerini etkisiz hale getirerek güçlü bir antioksidan görevi görür. Bazı yağda çözünen reaktif maddelere karşı  $\alpha$ -tokoferolün oluşmasına yardımcı olarak aynı zamanda koantioksidan görevi görür[81].

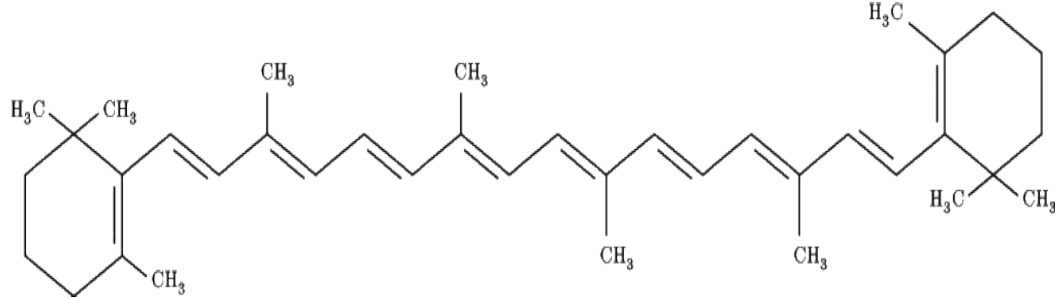


Şekil 15:Vitamin C [82]

#### 2.4.1.2.4 $\beta$ -karoten

Oksijen radikallerine karşı iyi bir antioksidan olan  $\beta$ -karoten, retinada retinole dönüşerek gece karanlığında görme işlevini iyileştirmede etkin görevi vardır. Yağda

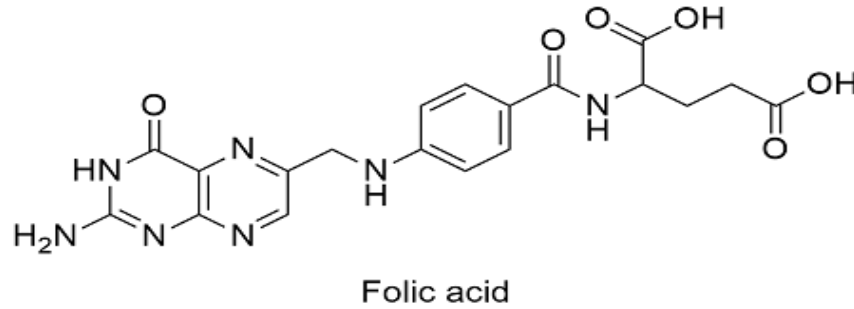
çözünen karotenoid ailesine ait bir üyedir. Aynı zamanda provitamin özelliğini A vitaminine dönüştüğü için önem kazanmaktadır[47].



Şekil 16:β-karoten [83]

#### 2.4.1.2.5 Folik asit

Reaktif oksijen radikallerine karşı güçlü bir etkiye sahip olan folik asit[84], suda çözünebilir vitamin B ailesine ait bir üyedir. Erkeklerde spermatogenesis için çok önemli role sahiptir. Ayrıca kadınlarda üreme döneminde, çocuklarda gelişim döneminde hayati önem taşıyan antioksidanlardır. DNA sentezi ve hemoglobin sentezinde de önemli rolleri vardır[85].



Şekil 17:Folik asit[86]

## 2.4 Antibakteriyel özellik

Geçmişten günümüze sağlık sektörü başta olmak üzere farklı amaçlar doğrultusunda kullanılan bitkiler günümüzde hala ilaç sanayisinde birinci derece kaynak olarak önem

arz etmektedir. Bitkilerin insan sağlığı üzerindeki olumlu etkileri göz önüne alındığında yapılan çalışmaların birçoğunun bitkisel kaynaklı olması normal karşılanmalıdır. Bitkilerin antibakteriyel özelliklerinin test edilmesi eski tarihlerde kök, gövde, yaprak ve rizom ekstraktları ile yapılmıştır[87]. Ülkemizde de bitkiler uzun yıllardan beri sağlık çalışmalarında kullanılmaktadır. Bu bağlamda kullanılan bitkilerin antibakteriyel etkisi bitkinin, yaşadığı bölgeye, türüne, konsantrasyonuna ve uygulanan mikroorganizmanın cinsine ve sayısal çoğunluğuna bağlıdır[88].

Antibakteriyel etki tam olarak doğal veya sentetik bir maddenin bakterilere karşı öldürme kabiliyetinin tanımıdır. Antibakteriyel etkisi bilinen bazı bileşikler şu şekilde sınıflandırılabilir; fenolik asitler, terpenoidler, fenolikler, basit fenoller, yağlar, alkaloidler, flavonoidler, lektinler ve polipeptitler, poliasetilenler[89]. Son yıllarda halk arasında kullanımı sıklaşan sentetik antibiyotiklerin sınırlandırılması doğal antibiyotik sınıfına giren bitki ekstraktlarına yönelimi artırmıştır. Sekonder metabolitler olarak adlandırılan, bitkilerin buldukları çevrede biyotik ve abiyotik stres faktörlerine karşı savunmada kullandıkları biyokimyasal maddeler[90] antibakteriyel olarak insanlar tarafından kullanılmaktadır.

Antibakteriyel etkinin boyutunu tayin etmede kullanılan yöntemlerden biri disk difüzyon yöntemidir. Bu çalışmada bu yöntemden yararlanılmıştır. Bu yöntem ile mikroorganizmaların bulunduğu agar kültüründe belirli boyutlarda kuyucuklar açılır. Bu kuyucuklara belli miktarlarda ekstrakt doldurulup inkübasyon süresince etüvde bırakılır. İnkübasyon süresi bittikten sonra, kullanılan madde etkili ise kuyucukların çevresinde belirgin biçimde bulanıklık gözlenip inhibisyon zonları oluşmaktadır. Üremenin varlığı veya yokluğu, kuyucukların etrafındaki bulanıklık seviyesine göre belirlenir[91.92.93].

## 3. BÖLÜM

### 3.1 MATERYAL

#### 3.1.1 Çalışmalarda kullanılan cihazlar

Bu çalışmada: Baharat öğütücü (Sinbo Scm-2934), sonikasyon cihazı (Bandelin HD 2070), etüv (SELECTA 2001244 00-E 53034), spektrofotometre (Tetra T60), soxhlet ekstraktörü (ISOLAB laborgerate GmbH), otoklav (Tetra MED 20), saf su cihazı (ISOLAB LWD-3004), hassas terazi (Sohn GmbH), buzdolabı (VESTEL), ışık mikroskobu (Soif optikal instruments), rotary evaporatör (BUCHI) cihazı kullanılmıştır.

#### 3.1.2 Çalışmada kullanılan kimyasallar

Çalışmada kullanılan deneysel kimyasallar: Sodyum karbonat ( $\text{Na}_2\text{CO}_3$ ), sodyum klorür (NaCl), Nutrient Agar, (Merck) Metanol, (Merck) Nutrient broth, (SIGMA-Aldrich) DPPH [2,2 diphenyl-1-picrylhydrazyl], (SIGMA- Aldrich)  $\text{FeCl}_2$ , (SIGMA-Aldrich) 3-(2-pyridyl)-5,6-diphenyl-1,2,4-triazine-4',4''- disulfonic acid sodium salt, (Merck) Hekzan, folin-Ciocalteu's phenol reagent, (Merck) Aseton ve (Alkomed) Etil alkol (% 96) kullanılmıştır.

#### 3.1.3 Çalışmada kullanılan test bakterileri

Çalışmada kullanılan *Bacillus subtilis* ATCC 6051, *Listeria monocytogenes* ATCC 7644, *Micrococcus luteus* ATCC 4698, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Enterococcus faecalis* ATCC 29212, *Escherichia coli* ATCC 11229, suşları Prof. Dr. Belma ASLİM'in biyoteknoloji laboratuvarından (Gazi Üniversitesi Fen Fakültesi) temin edilmiştir.

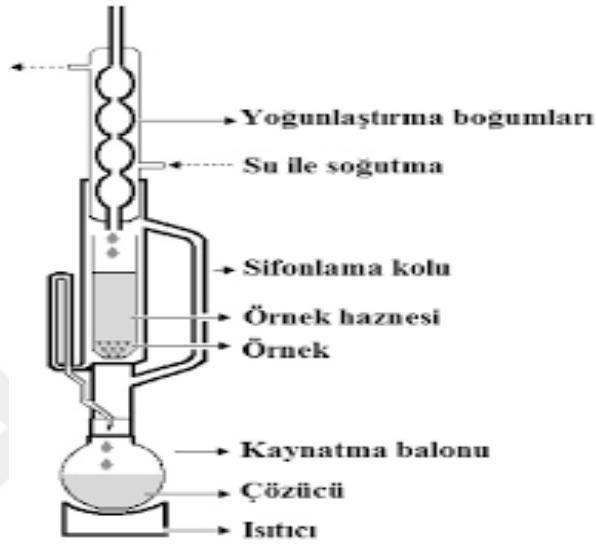
### 3.2 Metot

#### 3.2.1 Ekstraksiyon işlemi

Bu çalışmada kullanılan kozalaklar Nevşehir ilinden toplanmıştır. Toplanan kozalaklar baharat öğütücü yardımı ile öğütülmüştür. Her öğütme işleminden sonra öğütücünün temizlenmesine dikkat edilmiştir. Her örnek ayrı ayrı öğütülüp 60-150gr arası tartılıp paketlenmiştir. Örnekler filtre kağıt içerisinde soxhlet cihazına yerleştirilmiştir. Bu aşamadan sonra ekstraksiyon düzeneği kurulup her bir örnek için 350 mL etanol



kullanılarak ekstraksiyon işlemi başlatılmıştır. Her bir örnek için ekstraksiyon süresi ortalama 24 saat olup örneklerin tam anlamı ile ekstrakte edilmesi sağlanmıştır. Ekstraksiyon işlemi biten her örnek ağzı kapalı bir cam şişe içerisinde +4° de muhafaza edilmiştir.



**Resim 7:** Soxhlet cihazı[94]

Ekstraktaki alkolün uçurulması için evaporatör cihazı kullanılmıştır.

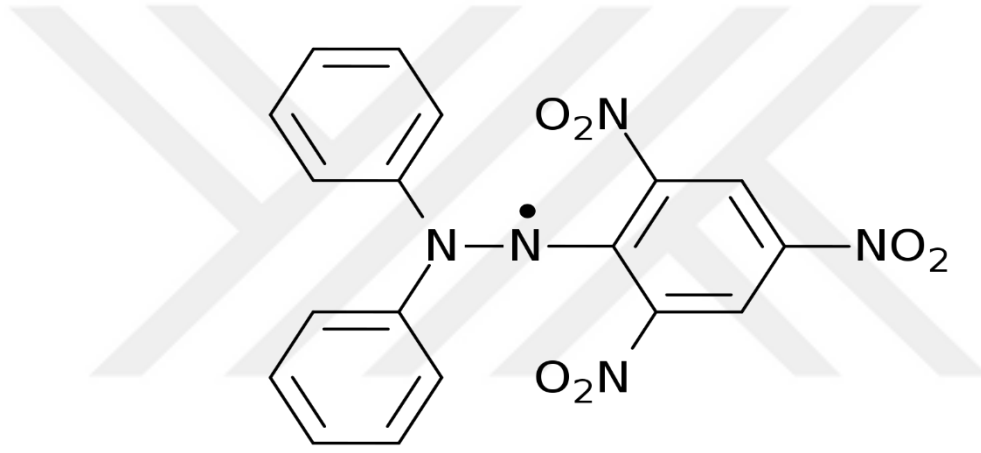


**Resim 8:** Evaporatör cihazı[95]

Evaporatör cihazından alınan örnekler eser miktarda alkol içermesi sebebi ile ağız açık bir şekilde cam petrilere +60 °C de etüv cihazında kalan alkol uçurularak saf halde ekstrakt elde edilmiştir.

### 3.2.2 DPPH serbest radikal süpürme aktivitesi

Kullanılan ekstraktın serbest radikal süpürme aktivitesi, güçlü bir radikal olan DPPH (2,2-difenil-1-pikrilhidrazil)'ı indirgeme yeteneğine göre ölçülmüştür[97]. Sentetik radikal sınıfında olan DPPH güçlü bir radikal olmasına karşın antioksidan deneylerinde önemli bir belirleyici faktördür.



Şekil 18:DPPH kimyasal yapısı[96]

Çalışmanın bu bölümünde Nevşehir ilinden toplanan 6 farklı iğne yapraklı ağaç (*Thuca occidentalis*, *Juniperus viriginiana*, *Cedrus atlantica*, *Picea pungens engelm*, *Pinus nigra jf. arnold*, *Cupresus arizonica*) kozalağından elde edilen ekstraktların DPPH radikali süpürme aktivitesine bakılmıştır.

Çalışmada her bitki için 100ppm, 150ppm, 200ppm, 250ppm konsantrasyon değerlerine sahip metanol ekstraktları hazırlanmıştır. Toplamda 1mL olacak şekilde ayarlanan Ekstrakt + metanol karışımına % 0,004 konsantrasyonda 1mL DPPH radikali eklenerek karanlık ortamda hava almayacak biçimde 30dk muhafaza edilmiş ve ardından 517nm dalga boyunda spektrofotometre ile absorbans değeri okunmuştur.

Koyu mor renkte olan DPPH radikali, kullanılan antioksidan maddeden bir adet proton almak kaydı ile  $\alpha$ ,  $\alpha$ difenil- $\beta$ -pikrilhidrazil molekülüne indirgenir, bu indirgenme sonucu açık bir renk alır[98]. Negatif kontrol için 1 mL metanol + 1 mL DPPH çözeltisi, pozitif kontrol için belirlenen konsantrasyonlarda ekstrakt + 1 mL ye tamamlayacak kadar metanol + 1 mL DPPH kullanılarak 517nm’ de absorbans değeri okunmuştur.

DPPH % süpürme aktivitesi şu formüle göre belirlenir.  $\{(A - (B - C) / A) * 100\}$

A= Negatif absorbans değeri, B= Örnek absorbans değeri, Pozitif absorbans değeri olarak belirlenmiştir.

### **3.2.3 Metal iyonları şelatlama**

Çalışmanın bu aşamasında kullanılan ekstraktların metal iyonlarına karşı gösterdikleri şelatlama etkisi ölçülmüştür. Bu çalışmada Decker ve arkadaşlarının[99] metoduna bazı modifikasyonlar kazandırılarak yapılmıştır. Çalışmada 100ppm, 150ppm, 200ppm, 250ppm konsantrasyon değerleri kullanılmıştır. Belirlenen konsantrasyondaki ekstraktlara 250 $\mu$ l 2mM FeCl<sub>2</sub> ve 100 $\mu$ l 5mM ferrozin çözeltisi eklenerek 10 dakika oda sıcaklığında bekletmeye bırakılmıştır. Bu işlemden sonra karışımın spektrofotometrik değeri 562 nm de okunmuştur. Absorbisyon değerleri  $\{[A - [B - C] / A] * 100\}$  formülüne göre değerlendirilip % şelatlama değeri hesaplanmıştır. Formülde belirtilen kısaltmalar: A= Negatif kontrol değeri B= Örnek absorbans değeri C= Pozitif kontrol değerini sembolize etmektedir. Negatif kontrol olarak tüpte yalnızca 50 $\mu$ l FeCl<sub>2</sub> ve 100 $\mu$ l ferrozin çözeltisi ve 2mL Metanol çözeltisi eklenmiştir.

### **3.2.4 Toplam fenolik içerik miktarı belirleme**

Bu kısımda Folin-Ciocalteu reaktif biyomolekülü kullanılarak, gallik asit eşdeğeri olarak belirlenmiştir[100]. Bu aşamada 0,1 mL kozalak ekstraktı + metanol karışımına 0,2 mL %50 folin biyomolekülü eklenerek homojen bir karışım elde edene kadar vortex cihazı ile karıştırılmış ve 3 dk bekletmeye bıraktık. Bu süre sonunda karışıma 1 mL % 2’lik Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> eklenerek 45 dakika oda sıcaklığında bekletmeye alınmıştır. Bu süre sonunda her örneğin absorbans değeri 760 nm dalga boyunda ölçülüp belirlenen formül yardımı ile örneklerdeki total fenol miktarı belirlenmiştir.

$$\text{Total fenol: } y = 0,0063x - 0,0101 \text{ x} = (y+0,0101) / 0,0063$$

y: ABS değeri

x: fenol miktarı ( $\mu\text{g}$  cinsinden)

### 3.2.5 $\beta$ -karoten ve likopen miktar tayini

Ekstraktların  $\beta$ -karoten ve likopen miktarının tayini için önceden aseton ve hekzan 4mL / 6mL oranlarında karıştırılmış ve önceden tartılan 0,1g kuru kozalak ekstraktı ile homojen olarak karıştırılmıştır. Burada aseton hekzan karışımı çözücü görevi görmüştür. Karışım sonucunda tüm örnekler 453 nm, 505 nm, 663 nm dalga boylarında ölçülmüş ve kaydedilmiştir. Aşağıda belirtilen formüllerden yararlanarak  $\beta$ -karoten ve likopen miktarları belirlenmiştir.

$$\beta\text{-karoten: } [0,216 \times a(663\text{nm}) - 0,304 \times a(505\text{nm}) + 0,452 \times a(453\text{nm})]$$

Likopen:  $[-0,0458 \times a(663 \text{ nm}) + (0,372 \times a(505 \text{ nm}) + (0,0806 \times a(453 \text{ nm}))]$  sonuçlar 100 mL'de var olan mg cinsinden  $\beta$ -karoten ve likopen miktarını ifade eder. İşlemdeki a spektrofotometrede okunan dalga boyunu ifade eder.

### 3.2.6 Antibakteriyel aktivite tayini

Çalışmada toplam 6 bakteri türü (*Listeria monocytogenes* ATCC 7644, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Micrococcus luteus* ATCC 4698, *Enterococcus faecalis* ATCC 29212, *Escherichia coli* ATCC 11229, *Bacillus subtilis* ATCC 6051 suşları) kullanılmıştır. Kullanılan bakteriler aktifleştirilerek nutrient sıvı besiyerine 100  $\mu\text{L}$  aktarılmış ve 37 °C sıcaklıkta 24 saat inkübe edilmiştir.

Aktif bakteriler ekilmiş petrilere 8 mm lik kuyucuklar açılarak, her bir kuyuya 100 $\mu\text{l}$  bitki ekstraktı eklenmiştir. 37° C sabit sıcaklıkta 24 saat inkübasyona bırakılarak oluşan zon çapları cetvel yardımı ile ölçülmüştür.



**Resim 9:**Ekstraktların *Escherichia coli* ATCC 11229 üzerine antibakteriyel etkisi.

### 3.2.6 Antibiyotik duyarlılık testi

Sıvı besiyerleri içerisinde aktiveleştirilen bakteri örneklerin her birinden 100  $\mu$ L alınarak nutrient agar bulunan petri kaplarına aktarılmıştır. Bu aşamadan sonra antibiyotik diskler besiyeri üzerine yerleştirilmiş ve 37°C sıcaklıkta 24 saat inkübasyona bırakılmıştır. Bu çalışmada 10 farklı antibiyotik kullanılmıştır. Kullanılan antibiyotikler (Ampisilin AM10, Erythromcin E15, Gentamisin CN10, Cefiksime CFM5, Oksalisin OX1, Penisilin P10, Ceftriakson CRO30, Amoksisilin AMC30, Amoksisilin AMC30) olup kozalak ekstraktlarının antiakteriyel aktivitelerini mukayese etmek amacı ile antibiyotik duyarlılık testi yapılmıştır.

### 3.2.7 İstatiksel veriler

Elde edilen veriler SPSS (Statistical Package for Social Sciences) for Windows 21,0 programı kullanılarak yorumlanmıştır. Çalışmada kullanılan metotlar 3 tekrarlı yapılmış olup elde edilen değerlerin ortalaması kullanılmıştır.

## 4. BÖLÜM

### BULGULAR

#### 4.1 Kozalakların toplandığı bölgeler

Bitkiler türleri	Toplandığı bölge
<i>Thuca occidentalis</i>	Nevşehir Hacı Bektaş Veli Üniversitesi Kampüsü
<i>Cupressus arizonica</i>	Nevşehir Hacı Bektaş Veli Üniversitesi Kampüsü
<i>Juniperus viriginiana</i>	Nevşehir Hacı Bektaş Veli Üniversitesi Kampüsü
<i>Cedrus atlantica</i>	Nevşehir Hacı Bektaş Veli Üniversitesi Kampüsü
<i>Picea pungens engelm</i>	Nevşehir Hacı Bektaş Veli Üniversitesi Kampüsü
<i>Pinus nigra jf. arnold</i>	Nevşehir Hacı Bektaş Veli Üniversitesi Kampüsü

**Tablo 4.1:**Kozalakların toplandığı bölgeler

#### 4.2 DPPH serbest radikal süpürme aktivitesi

Bu çalışmada 100ppm, 150ppm, 200ppm, 250ppm konsantrasyonlarında kozalak ekstraktları kullanılmıştır. Konsantrasyon arttıkça DPPH süpürme aktivitesinin arttığı gözlemlenmiştir. DPPH süpürme yetenekleri göz önüne alınıp IC<sub>50</sub> değerleri hesaplandığında serbest radikal yakalama aktivitesi en yüksek olan tür *Pinus nigra jf. arnold* (55,8 µg / mL süpürme aktivitesi % 60,1– % 98,6) iken, en düşük olan tür *Thuca occidentalis* (200,4 µg / mL süpürme aktivitesi %33,14 - %58,45)'dir.

Bitki türleri	IC <sub>50</sub> Değerleri [µg / mL]	DPPH süpürme aktivitesi[%]
<i>Thuca occidentalis</i>	200,40	%33,14 - %58,45
<i>Cupressus arizonica</i>	119,49	%35,30 - % 98,40
<i>Juniperus viriginiana</i>	65,50	%26,60 - %60,20
<i>Cedrus atlantica</i>	90,45	%52,64 - %74,93
<i>Picea pungens engelm</i>	60,35	%60,50 - %98,80
<i>Pinus nigra JF. arnold</i>	55,80	%60,10 - %98,60

**Tablo 4,2:**Örneklere ait ekstraktların DPPH serbest radikali süpürme yetenekleri ve IC<sub>50</sub> değerleri

### 4.3 Metal iyonları şelatlama aktivitesi

Bu çalışmada 100ppm, 150ppm, 200ppm, 250ppm konsantrasyonlarda kozalak ekstraktları kullanılmıştır. Konsantrasyon arttıkça metal iyonları şelatlama aktivitesinde orantılı bir artış gözlenmiştir. Çalışmada kullanılan tüm bitki ekstraktlarının metal iyonları inhibisyon yetenekleri göz önünde bulundurularak IC<sub>50</sub> değerleri tespit edilmiştir. En iyi aktivite *Pinus nigra jf. arnold* (61,0 mg/mL şelatlama aktivitesi %55,5 - %74,6) türünde en düşük aktivite ise *Thuca occidentalis*(236,2 mg/mL şelatlama aktivitesi %22,3 - %52,8) türünde tespit edilmiştir (Tablo4.3).

Bitki türleri	IC <sub>50</sub> değerleri [mg / mL]	Yüzde aralıkları [%]
<i>Thuca occidentalis</i>	236,2	%22,3 - %52,8
<i>Cupressus arizonica</i>	129,3	%42,1 - %92,1
<i>Juniperus viriginiana</i>	216,1	%42,9 - %52,5
<i>Cedrus atlantica</i>	173,5	%42,6 - %58,4
<i>Picea pungens engelm</i>	79,6	%54,3 - %78,1
<i>Pinus nigra jf. arnold</i>	61,0	%55,5 - %74,6

**Tablo 4.3:**Örneklere ait ekstraktların metal iyonları şelatlama yetenekleri ve IC<sub>50</sub> değerleri

### 4.4 Biyoaktif içerik miktarı

Ekstraktların antioksidan aktivitesi içeriğindeki biyoaktif maddelerin miktarına bağlıdır. *Pinus nigra JF. arnold* total fenol miktarı bakımından en yüksek (340,23 mg/g), *Juniperus viriginiana* ise en düşük (213,82mg/g) miktara sahip olduğu tespit edilmiştir.

Likopen içeriği bakımından *Pinus nigra jf. arnold* (0,590µg/g)en yüksek değere sahip tür iken en düşük tür *juniperus viriginiana* (0,516 µg/g) olduğu tespit edilmiştir.

□-karoten içeriği bakımından *Cupressus arizonica* (0,95 µg/g ) en yüksek değere sahip tür iken *Pinus nigra jf. arnold*(0,39 µg/g) en düşük tür olduğu belirlenmiştir.

Bitkiler	Biyoaktif içerik		
	Total fenol [mg / g]	Likopen [µg / g]	β-karoten [µg / g]
<i>Thuca occidentalis</i>	320,03	0,574	0,79
<i>Cupressus arizonica</i>	293,82	0,545	0,95
<i>Juniperus viriginiana</i>	213,82	0,516	0,88
<i>Cedrus atlantica</i>	272,23	0,544	0,68
<i>Picea pungens engelm</i>	274,93	0,520	0,62
<i>Pinus nigra JF. arnold</i>	340,33	0,590	0,39

**Tablo 4.4:**Total fenol, likopen ve β-karoten miktarları

#### 4.5 Antibakteriyel aktivite

Bu çalışmada tüm bakteriler üzerinde etki gösteren bitkiler *Pinus nigra jf. arnold*, *Picea pungens engelm*, *Cedrus atlantica*, *Juniperus viriginiana*'dır. En düşük etki gösteren bitki *Thuca occidentalis* tir.



BİTKİLER	BAKTERİLER					
	<i>Escherichia coli</i>	<i>Listeria monocytogenes</i>	<i>Enterococcus faecalis</i>	<i>Bacillus subtilis</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	<i>Micrococcus luteus</i>
<i>Thuca occidentalis</i>	-	20±2	25±3	20±2	12±1	16±2
<i>Cupressus arizonica</i>	-	35±4	35±3	23±2	25±3	20±1
<i>Juniperus virginiana</i>	17±1	20±1	15±2	20±3	17±2	15±3
<i>Cedrus atlantica</i>	16±1	21±2	23±2	20±3	20±1	32±4
<i>Picea pungens engelm</i>	30±2	5±1	5±1	25±1	20±3	35±2
<i>Pinus nigra jf. arnold</i>	25±2	35±3	30±3	30±4	21±1	30±2

**Tablo4.5:**Kozalak ekstraktların antibakteriyel etkileri

#### 4.6 Antibiyotik duyarlılık testi

Çalışmada kullanılan bakterilerin antibiyotiklere(Ampisilin AM10, Erythromcin E15, Gentamisin CN10, Cefiksim CFM5, Oksalisin OX1, Penisilin P10, Ceftriakson CRO30, Amoksilin AMC30, Amoksilin AMC30) karşı ne derece duyarlı oldukları test edilmiştir. Hazır halde bulunan besiyerine antibiyotik diskleri yerleştirilerek uygun şartlarda 24 saat beklendi. Sürenin sonunda antibiyotik disklerinin bakteriler üzerindeki inhibisyonu ölçülmüştür. Detaylı bilgi tablo 4.6 da verilmiştir.

ANTİBİYOTİKLER	BİTKİLER					
	<i>Escherichia coli</i>	<i>Listeria monocytogenes</i>	<i>Enterococcus faecalis</i>	<i>Bacillus subtilis</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	<i>Micrococcus luteus</i>
Ampisilin AM10	19±1	-	25±0	16±1	-	-
Erythromcin E15	14±1	-	18±0	20±0	-	52±4
Gentamisin CN10	16±1	16±1	14±0	-	-	11±1
Cefiksım CFM5	-	-	-	10±1	23±2	9±0
Oksalisin OX1	-	-	-	-	-	32±2
Penisilin P10	18±1	-	21±1	11±1	-	-
Ceftriakson CRO30	14±0	10±0	11±0	13±0	25±0	-
Amoksilin AMC30	18±2	-	0±0	30±2	4±1	-
Cefuroksim CXM30	13±0	-	9±0	17±1	9±1	7±3
Cefoksitin FOX30	-	-	-	-	20±2	31±3

‘-‘ direnç yok

**Tablo 4.6:** Antibiyotiklere karşı direnç (mm)

## 5. BÖLÜM

### TARTIŞMA

Günümüzde birçok bitki ilaç sanayi, çevre düzenlemesi, ağır sanayi, fenni yem, gıda sanayi olmak üzere birçok alanda kullanılmaktadır. Bitkiler çevresel şartlara uyum sağlamak için primer ve sekonder metabolitleri üretirler. Bu bileşikler ilaç sanayinde vazgeçilmez bir öneme sahiptir (). Bu çalışmada Nevşehir ilinde yetişen bazı iğne yapraklı ağaçların (*Thuca occidentalis*, *Juniperus virginiana*, *Cedrus atlantica*, *Picea pungens engelm*, *Pinus nigra jf. arnold*, *Cupresus arizonica*) kozalaklarından elde edilen ekstraktların DPPH serbest radikal süpürme, metal iyonları şelatlama aktiviteleri, antibakteriyel etkileri, total fenol içerik,  $\alpha$ -karoten ve likopen miktarları incelenmiştir.

#### 5.1 DPPH serbest radikali süpürme aktivitesi

Bir maddenin antioksidan özelliğinin varlığı DPPH radikali süpürme aktivitesi yöntemine göre belirlenmektedir. Bu çalışmada 100ppm, 150ppm, 200ppm, 250ppm konsantrasyonda DPPH miktarı ölçülmüştür. Kullanılan ekstraktların konsantrasyonu arttıkça antioksidan aktivitelerinde de artış görülmüştür. DPPH radikali süpürme aktivitesi bakımında en iyi değer *Pinus nigra jf. arnold*(IC<sub>50</sub>: 55,8 µg / mL, indirgeme aktivitesi % 60,1– % 98,6), en düşük değer *Thuca occidentalis* (IC<sub>50</sub>: 200,4 µg / mL indirgeme aktivitesi %33,14 - %58,45) türünde görülmüştür. Bu çalışmada sentetik bir antioksidan türü BHT molekülü kullanılmıştır. BHT molekülü IC<sub>50</sub> değeri 43 µg / mL olarak belirlenmiştir. Sonuçlar karşılaştırıldığında zaman *Pinus nigra jf. arnold*'ın DPPH süpürme potansiyeli sentetik olarak üretilen BHT molekülüne yakın olduğu tespit edilmiştir.

Karapandzova ve arkadaşlarının[102] yaptığı çalışmada pinaceae ailesine ait bazı türlerin esansiyel yağ analizlerini yapmış ve uçucu yağların ana bileşenleri olan monoterpenleri ortaya çıkarmışlardır. Bu çalışmaya göre bulunan monoterpenler şunlardır:  $\alpha$ -pinen (% 23,8–39,9,% 21,2–23,3), kamfen (% 2,2–5,5,% 0,7–2,0),  $\beta$ -pinen (% 10,1–17,1, % 8.2–16.4), mirsen (% 1.2–1.41,% 1.6–2.5), limonen +  $\beta$ -phellandrene (% 6.8–14.0,% 8.8–23.6) ve bornil asetat (% 2.3–6.9,% 1.1–3.4). Sunulan değerlere göre  $\alpha$ -pinen miktarı yüksek çıkmıştır.

Şahin ve arkadaşlarının[103] yaptığı çalışmada biberiye bitkisinden elde edilen  $\alpha$ -pinen molekülünün yüksek derecede antioksidan etkiye ( $IC_{50}$ :  $54\mu M$ ) sahip olduğunu belirtmiştir. Karapandzova ve arkadaşlarının[102] yaptığı çalışmada pinaceae ailesine ait bazı türlerin yüksek miktarda  $\alpha$ -pinen bulunduğunu rapor etmişlerdir. Bu çalışmada *Pinus nigra* kozalağının en yüksek etkiye sahip olması içeriğinde yüksek aktiviteye sahip  $\alpha$ -pinen fenolik bileşiğinden kaynaklandığı düşünülmektedir.

Hofmann ve arkadaşlarının[104] yaptıkları çalışmada *Pinus nigra* *jf. arnold* türüne ait olgun kozalaklardan elde edilen metanol ekstraktında DPPH süpürme aktivitesi  $IC_{50}$  değerini  $40.63 \pm 0.86$  bulmuştur. Bu çalışmaya kıyasla daha iyi bir sonuç elde etmiştir. Hofmann deneyde ekstraksiyon aşamasında çözücü olarak aseton ve su kullanmıştır. Bu çalışmada çözücü olarak etanol kullanıldı sonuçların farklı çıkması çözücü farkından kaynaklandığı düşünülmektedir.

## 5.2 Metal iyonları şelatlama aktiviteleri

Metaller bağlanma eğilimi olan moleküller ile yeni bileşikler oluşturma gücüne sahiptir.  $Fe^{+3}$  iyonun  $Fe^{+2}$  iyonuna yükseltgenmesi demir metalinin başka bir molekül ile bileşik oluşturduğu anlamına gelir. Bu çalışmada kozalak ekstraktlarının demir iyonu ile bileşik yapabileme kapasiteleri ölçülüp karşılaştırılmıştır. Bu yöntem renk değişimi esasına dayanır. Normalde sarı renkte olan karışımın, reaksiyonun gerçekleşmesi ile Prusya mavisine dönüşümü esas alınır[105].

Bu çalışmada kullanılan örnekler arasında en iyi sonuç *Pinus nigra* *jf. arnold* ( $IC_{50}$  61,0 şelatlama aktivitesi %55,5 - %74,6) türünde tespit edilmiştir. Konsantrasyon arttıkça şelatlama oranının arttığı tespit edilmiştir. En düşük aktivite *Thuca occidentalis* ( $IC_{50}$ : 236,2 şelatlama aktivitesi %22,3 - %52,8) örneğinde tespit edilmiştir.

Üstün ve arkadaşlarının[106] yaptığı çalışmada Türkiye'deki *Pinus* türlerinin dal ve yapraklarından elde edilen uçucu yağların yüksek derecede antioksidan etki gösterdikleri belirtilmiştir. Ayrıca bu çalışmada metal iyonları şelatlama aktivitesi incelenmiş ve en yüksek değer *Pinus nigra* ( $IC_{50}$  67.77) türünde bulunmuştur. Bu çalışmadan elde edilen metal şelatlama sonuçları Üstün ve arkadaşlarının bulduğu sonuçtan daha iyidir.

Üstün ve arkadaşlarının[106] yaptığı çalışmada *Pinus nigra*'nın uçucu yağının GC-MS ile fenolik bileşen analizinde % 69.5 oranında  $\alpha$ -Pinen maddesi bulunmuştur. Bu

çalışmada da yüksek oranda metal şelatlama aktivitesinin  $\alpha$ -Pinen varlığına bağlı olduğu düşünülmektedir.

### 5.3 Biyoaktif içerik tayini

Bu çalışmada 6 farklı örneğin (*Thuca occidentalis*, *Juniperus viriginiana*, *Cedrus atlantica*, *Picea pungens engelm*, *Pinus nigra jf. arnold*, *Cupresus arizonica*) Total fenol, likopen ve  $\beta$ -karoten miktarları belirlendi. Antioksidan aktivite ile bağlantılı çalışan total fenol bileşikler lipid oksidasyonunun düzenlenmesinde önemli bir yere sahiptir[107]. Fenolik bileşiklerin günde 1g'a kadar alınması mutajenez ve karsinogenez üzerinde engelleyici rol aldığı ileri sürülmüştür[108]. Bu çalışmada total fenolik içerik bakımından en yüksek değere sahip kozalak ekstraktı *Pinus nigra jf. arnold* a (340,33mg/g) ait iken, içerik bakımından en düşük miktar *Juniperus viriginiana*(213,82mg/g) türünde tespit edilmiştir. Bu çalışmada total fenol miktarı yüksek olan ekstraktın hem DPPH süpürme aktivitesi hem de metal şelatlama aktivitesinin yüksek oranlarda görülmesi tezimizi destekler durumdadır.

Üstün ve arkadaşlarının[109] yaptıkları çalışmada *Pinus nigra* türünün diken yaprak ekstraktına ait total fenol miktarının  $63.14 \pm 2.35$  mg/g olduğu rapor edilmiştir. Bu çalışmada elde edilen sonuç çok daha fazladır. Buradaki büyük farkın temel sebebi bu çalışmada kozalak ekstraktı kullanılmış olmasıdır.

Likopen bitkilerde renk pigmenti olarak bilinen koyu kırmızı renkte bir maddedir. Güçlü antioksidan aktiviteye sahip bir bileşendir. Bu çalışmada likopen miktarı en fazla *Pinus nigra jf. arnold*(0,590 $\mu$ g/g) türünde en düşük miktar *juniperus viriginiana* (0,516  $\mu$ g/g) türünde tespit edilmiştir.

$\beta$ -karoten vitamin A'nın hammaddesidir. Yağda çözünen bir pigmenttir. Oksidasyon sonucu meydana gelen serbest radikalleri scavenging mekanizması ile ortadan kaldırarak oluşabilecek hastalıkların önüne geçmektedir. Bu çalışmada  $\beta$ -karoten miktarı en yüksek çıkan tür *Cupressus arizonica* [0,95 $\mu$ g /g], miktarı en düşük tür *Pinus nigra jf. arnold* (0,39  $\mu$ g/g) tür olarak tespit edilmiştir.

Bu çalışmada bitkilerin kozalak kısmının kullanılması  $\beta$ -karoten ve likopen miktarında düşük sonuç alınmasına sebep olmuştur.

#### 5.4 Antibakteriyel aktivite

Bu aşamada Nevşehir ilinde yetişen 6 farklı iğne yapraklı ağacın kozalak ekstraktlarının antibakteriyel aktiviteleri incelenmiştir. Çalışmada kullanılan 6 türden 4 tanesi tüm patojenler üzerinde etki göstermiştir. Örneklerden en iyi sonuç *Pinus nigra jf. arnold* türünde görülmüştür. En az aktivite ise *Thuca occidentalis* türünde tespit edilmiştir.

Bu çalışmada ayrıca patojen bakteriler üzerinde kozalak ekstraktları ile mukayese etmek için antibiyotik disk çalışması yapılmıştır. Burada amaç bu çalışmada kullanılan bitki ekstraktlarının antibakteriyel etkisinin, günümüzde ticari olarak kullanılan kimyasal antibiyotiklerin patojenler üzerindeki etkisi ile karşılaştırmaktır. Patojenlere karşı en iyi etkiyi Cefuroksim CXM30 antibiyotiği göstermiştir. Bu çalışmada en iyi etki gösteren kozalak ekstraktları ile karşılaştırıldığında, Cefuroksim CXM30 antibiyotiğinin etkisinin zayıf olduğu görülmektedir. Burada anlaşılacağı üzere bu çalışmada kullanılan metanol ekstraktlarının piyasada var olan antibiyotiklere oranla çok daha iyi sonuç verdiği görülmektedir. Kullanılan kozalak ekstraktlarının antibakteriyel etki göstermesi yüksek derecede biyoaktif içeriğe sahip olması ile açıklanabilir.

Demirci ve arkadaşlarının[110] yaptığı çalışmada eylül ayında toplanan *Pinus nigra* türüne ait kozalaklardan elde edilen uçucu yağların *B.substilis* ATTC6633 suşu üzerinde 12 mm zon çapı, *E.coli* ATTC39628 suşu üzerinde 12 mm zon çapı, *P.aeruginosa* ATTC27853 suşu üzerinde 13 mm zon çapı ölçmüştür. Bu çalışmada *Pinus nigra* türüne ait kozalaklardan elde edilen metanol ekstraktı *B.substilis* ATTC6633 suşu üzerinde 30 mm zon çapı, *E.coli* ATTC39628 suşu üzerinde 25 mm zon çapı, *P.aeruginosa* ATTC27853 suşu üzerinde 21 mm zon çapı ölçmüştür. Bu çalışmada metanol ekstraktı kullanmamıza rağmen uçucu yağlardan elde edilen sonuçlardan çok daha yüksek sonuç alınmıştır.

Demirci ve arkadaşlarının [110] yaptığı çalışmada antimikrobiyal aktivitenin uçucu yağ içeriğinde olan  $\alpha$ -pinen miktarı ile orantılı olduğunu savunmuştur.

Bu çalışmada antibakteriyel, DPPH ve metal iyonları şelatlama aktivitesi göz önüne alındığında en iyi sonuçların *Pinus nigra* türünde görülmesi, bu türe ait yapılan GC-MS analizinde[110] yüksek oranda  $\alpha$ -pinen maddesinin bulunması ile açıklanabilir.

Dığrak ve arkadaşlarının[111] yaptığı çalışmada *Pinus nigra* türüne ait kozalaklardan elde edilen metanol ekstraktının *Escherichia coli* bakterisine karşı aktivite göstermediği, kloroform ekstraktının *Escherichia coli* bakterisine karşı 10 mm çapında zon oluşturduğu belirtilmiştir. Aynı çalışmada metanol ekstraktının *Listeria monocytogenes*'e karşı 16 mm zon apı, *Enterobacter aerogenes*'e karşı 15 mm zon apı, *Bacillus subtilis*'e karşı 16 mm zon çapı oluşturduğu rapor edilmiştir. Bu çalışmada alınan metanol ekstraktları sonucu Dığrak ve arkadaşlarının yaptığı çalışmaya kıyasla çok daha iyi sonuç vermiştir.

Elde edilen veriler bu alanda yapılacak çalışmalar için kaynak olacak ve ticari olarak satılan antibiyotiklere karşı alternatif oluşturacaktır.

## 6. BÖLÜM

### SONUÇ

Bu çalışmada Nevşehir ilinde yetişen 6 farklı iğne yapraklı bitkiden (*Thuca occidentalis*, *Juniperus viriginiana*, *Cedrus atlantica*, *Picea Pungens engelm*, *Pinus nigra jf. arnold*, *Cupresus arizonica*) alınan kozalakların antioksidan ve antibakteriyel aktiviteleri incelenmiştir. Çalışmada bitkilerden elde edilen metanol ekstraktları DPPH radikal süpürme aktivitesi, metal iyonları şelatlama aktivitesi, total fenolik içerik, likopen ve  $\beta$ -karoten miktarı tayini, antibakteriyel aktivite tayini ve antibiyotik disklere karşı direnç testi yapılmıştır.

Çalışmada kullanılan ekstraktların konsantrasyonu arttıkça DPPH süpürme yeteneklerinde artış tespit edilmiştir. Bu çalışmada DPPH süpürme aktivitesi en iyi *Pinus nigra* türünde görülmüştür.

Metal iyonları şelatlama aktivitesi bakımından en iyi tür *Pinus nigra* türü olmuştur. Konsantrasyon arttıkça şelatlama aktivitesinde artış tespit edilmiştir.

Çalışmada total fenolik içerik bakımından en yüksek tür *Pinus nigra* türü olarak belirlenmiştir.  $\beta$ -karoten içeriği bakımından en yüksek tür *Cupressus arizonica* türü olarak belirlenmiştir. Likopen içeriği bakımından en yüksek tür *Pinus nigra* türü olarak belirlenmiştir.

Çalışmada *Pinus nigra*, *Picea pungens engelm*, *Cedrus atlantica*, *Juniperus viriginiana* türleri tüm bakteriler üzerinde yüksek derecede antibakteriyel etki göstermiştir. Bu çalışmada öne çıkan en önemli tür *Pinus nigra* türü olmuştur. DPPH radikali süpürme aktivitesi, metal iyonları şelatlama aktivitesi, antibakteriyel aktivite, total fenol miktarı ve likopen miktarı bakımından en zengin tür olarak belirlenmiştir. Sonuçlar arasında pozitif korelasyon görülmüştür.

Elde edilen sonuçlara göre *Pinus nigra* türünün DPPH radikali süpürme aktivitesi sentetik bir antioksidan olan BHT molekülüne yakın değerde seyretmiştir. Antibakteriyel etkisi klinikte kullanılan antibiyotiklere oranla çok daha yüksek çıkmıştır.



Günümüzde doğal antioksidan ve antibakteriyel ilaçlara eğilim arttığı tespit edilmiştir. Bu çalışma *Pinus nigra* türünün doğal bir antioksidan ve antibakteriyel etkiye sahip olduğunu kanıtlamıştır. Bu alanda yapılacak çalışmalara kaynak olacak ve ticari olarak satılan antibiyotik ve antioksidan ilaçlara karşı alternatif olacaktır.



## KAYNAKÇA

1. Arıhan, S.K., “Antik Dönemde Bitkisel Tıp ve Tedavi”, *Ankara Üniversitesi Sosyal Bilimler Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi*, : 199, Ankara, 2003.
2. Ceran, B., “Antik Mısır ve Anadolu Uygarlıklarında Tıp”, *Selçuk Üniversitesi Sosyal Bilimler Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi*, :38, Konya 2008.
3. Miao V, Legal MFC, Brown D, Sinnemann S, Donaldson G, Davies J. Genetic Approaches to Harvesting Lichen Products. *Trends in Biotechnol*, 2001; 19: 349-355.
4. Astley, S. B., “Dietary Antioxidants-Past, Present and Future?”, *Trends in Food Science & Technology*, 14 [3]: 93–98, [2003].
5. Shinde A, Ganu J, Naik P. Effect Of Free Radicals & Antioxidants on Oxidative Stress: A Review. *J Dent Allied Sci*. 2012; 1[2]: 63- 66.
6. İnternet: [https://www.ozturkkontrplak.com/cam-agacinin-ozellikleri-haber\\_8044](https://www.ozturkkontrplak.com/cam-agacinin-ozellikleri-haber_8044).
7. İnternet: <https://www.makaleler.com/cam-agacinin-turleri-ve-ozellikleri-nelerdir>.
8. İnternet: <https://www.destegegitimi.com/igne-yaprakli-agac-turleri>.
9. İnternet: <http://www.sabittuncel.com/wp-content/uploads/2016/12/Igne-Yaprakli-Agaclar.pdf>
10. Coğrafya – 10 Ders Kitabı (Kenan TÜRKEZ – Mutlu KARAKOÇ – Nurullah BALŞEN – Tolga PEKTAŞ – İsmail ÖZDOĞAN) ISBN 978-975-11-4530-7
11. T.C. Orman ve Su İşleri Bakanlığı Orman Genel Müdürlüğü Orman Atlası
12. Acıbuca V, Bostan Budak D. (2018) Dün- ya’da ve Türkiye’de Tıbbi ve Aromatik Bitkilerin Yeri ve Önemi. *Çukurova J Agric Food Sci*. 33(1): 37-44.
13. *Bitkilerle Tedavi Sempozyumu*, (2011). Merkezefendi Geleneksel Tıp Derneği, Bildiri Kitabı, *İstanbul*, 12, 30-39, 128

14. Yılmaz H., Küçüközcü, G., Terzi, E. [2010]. Tıbbi ve Aromatik Bitkilerin Yetiştirilmesi, *Ulusal Meslek Yüksek Kulları Öğrenci Sempozyumu Bildiri Kitabı, Düzce*, P.1-7.
15. *Tıbbi ve Aromatik Bitkiler Sektör Raporu* (2012]. Batı Akdeniz Kalkınma Ajansı, P. 13.
16. <https://www.konusanagac.com/konusan-agac/123/bati-mazisi.html>.
17. <https://www.gezenadam.com/flora/AI.php?ID=316>.
18. MEGEP [2007]. [Mesleki Eğitim ve Öğretim Sisteminin Güçlendirilmesi Projesi]. Bahçecilik Cupressaceae Familyası Bitkileri. (08/04/2019 tarihinde <http://megep.meb.gov.tr> adresinden ulaşılmıştır.)
19. Tanker, N., Doğan, A., & Şener, B. [1977]. Thuja Orientalis L. Uçucu Yağ Üzerine Araştırmalar, *Ankara Eczacılık Fakültesi Mecmuası* 7, 67-76
- 20 Akkemik, Ü., 2018 [ Türkiye'nin Ağaç ve Çalıları ]
21. Kim Y, Kim DC, Cho ES, Ko SO, Kwon WY, Suh GJ, Shin HK. Antioxidant and antiinflammatory effects of selenium in oral buccal mucosa and small intestinal mucosa during intestinal ischemia-reperfusion injury. *J Inflamm.* 2014; 11[36] doi:10.1186/s12950-014-0036-1.
22. Tuzlacı E, Türkiye Bitkileri Geleneksel İlaç Rehberi, *İstanbul Tıp Kitabevleri, İstanbul* 2016.
23. Anonim, 2006. Ardıç Ormanlarının Rehabilitasyonu Eylem Planı. T.C. Çevre ve Orman Bakanlığı, *Orman Genel Müdürlüğü yayını, Ankara*.
24. Yaltırık, F., 1993. Dendroloji I (Gymnospermae). *İ.Ü. Orman Fakültesi Yayını*, 3443/386, *İstanbul*.
25. <https://www.gezenadam.com/flora/AI.php?ID=292>

26. İli P. (2003) Bazı Tıbbi Bitkilerin Kimyasal İçerikleri ve Hayvanlara Etkileri. *Pamukkale Üni- versitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi.*

27. [https://tr.wikipedia.org/wiki/Bat%C4%B1\\_%C3%A7%C4%B1nar%C4%B1](https://tr.wikipedia.org/wiki/Bat%C4%B1_%C3%A7%C4%B1nar%C4%B1)

28. [http://www.agaclar.org/n\\_agac.asp?id=401](http://www.agaclar.org/n_agac.asp?id=401)

30. [https://tr.wikipedia.org/wiki/Atlas\\_sediri](https://tr.wikipedia.org/wiki/Atlas_sediri)

31. Bouchra, C., A. Mohamed, I.H. Mina and M. Hmamouchi, 2003. Antifungal activity of essential oils from several medicinal plants against four post harvest citrus pathogens *Phytopathol. Mediterr.*, 42: 251–256

32. Hammer, K.A., C.F. Carson and T.V. Riley, 1999. Antimicrobial activity of essential oils and other plant extracts. *J. Appl. Microbiol.*, 86: 985– 990

33. Monica, R.L., A. Saab, R. Tundis, A. Giancarlo, I. Lampronti, F. Menichini, R. Gambari, J. Cinatl and H. Wilhelm Doerr, 2008. Phytochemical analysis and in vitro evaluation of the biological activity against herpes simplex virus type 1 [HSV-1] of *Cedrus libani* A. *Rich Phytomed.*, 15: 79–83

34.

[https://www.google.com/search?q=atlas+sediri&hl=trTR&sxsrf=ALeKk0219b89QijRQsmFplPOCFXSXck1pw:1608555838465&source=lnms&tbm=isch&sa=X&ved=2ahUK\\_EwjMjem6kd\\_tAhVMKuwKHcQQDy4Q\\_AUoAXoECAcQAw&biw=1396&bih=646#imgre=D0nyJRxEgX75VM](https://www.google.com/search?q=atlas+sediri&hl=trTR&sxsrf=ALeKk0219b89QijRQsmFplPOCFXSXck1pw:1608555838465&source=lnms&tbm=isch&sa=X&ved=2ahUK_EwjMjem6kd_tAhVMKuwKHcQQDy4Q_AUoAXoECAcQAw&biw=1396&bih=646#imgre=D0nyJRxEgX75VM)

35. bates, carlos c. 1924. Forest types in the central Rocky Mountains as affected by climate and soils. *U.S. department of Agriculture, Bulletin 1233. Washington, DC.* 152 p.

36. <https://images.app.goo.gl/BMM59qWc52w4amVv5>

37. Gökmen,1970; Yaltırık,1988; Anşin, 2001; Sarıbaş, 2008; Eckenwalder, 2009;Yıldız ve Aktoklu, 2010; *Farjon*, 2010

38. Özkan, K., Gülsoy, S. [2009]. Effect of environmental factors on the productivity of Black Pine [Pinus nigra subsp. pallasiana] in Sutculer, Turkey. *Journal of Environmental Biology*, 30[6], 965-970.
39. <https://images.app.goo.gl/ziZgy6YxppnN7ekEA>
40. Sağıroğlu M, Dalgıç S, Toksoy S. Medicinal plants used in Dalaman [Muğla], Turkey. *J Med Plant*. 2013; 7[28]: 2053-2066
41. Baytop T. Türkiye’de Bitkiler ile Tedavi. 2nd ed. *İstanbul: Nobel Tıp Kitapevleri Ltd. Şti*; 1999.
42. Akyüz, E., “Polygonum bistorta ssp. carneum Bitki Ekstraktlarının Kromatografik Yöntemlerle Kimyasal Bileşiminin Belirlenmesi ve Antioksidan ve Antibakteriyel Aktiviteleri”, *Karadeniz Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Yüksek Lisans Tezi, Trabzon*, 2007.
43. Shinde A, Ganu J, Naik P. Effect of free radicals & Antioxidants on oxidative stress: A Review. *J Dent Allied Sci*. 2012; 1[2]: 63- 66.
44. . Aydemir B, Karadağ Sarı E. Antioksidanlar ve Büyüme Faktörleri ile İlişkisi. *Kocatepe Veterinary Journal*. 2009; 2[2]: 56-60.
45. Sen S, Chakraborty R. The Role of Antioxidants in Human Health. American Chemical Society, Oxidative Stress: Diagnostics, Prevention and Therapy. Chapter 1: 1-37. 2011.
46. Sen S, Chakraborty R, Sridhar C, Reddy YSR, De B. Free radicals, antioxidants, diseases and phytomedicines: Current status and future prospect. *International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research*. 2010; 3(1): 91-100.
47. Pham-Huy LA, He H, Pham-Huy C. Free Radicals, Antioxidants in Disease and Health. *Int J Biomed Sci*. 2008; 4[2]: 89-96.
48. Özkan A, Fışkın K. Serbest Oksijen Radikalleri, Karsinogenez ve Antioksidant Enzimler. *Türk Hematoloji Onkoloji Dergisi*. 2004; 14: 52-60.

48. Valko M, Leibfritz D, Moncola J, Cronin MTD, Mazura M, Telser J. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *Int J Biochem Cell Biol.* 2007; 39: 44-84
49. Young IS, Woodside JV. Antioxidants in Health and Disease. *J Clin Pathol.* 2001; 54[3]: 176-186.
50. <https://images.app.goo.gl/NW6CA1T4uknfMRpV8>
51. Limon-Pacheco J, Gonsebatt ME. The role of antioxidants and antioxidant- related enzymes in protective responses to environmentally induced oxidative stress. *Mutat Res.* 2009; 674[1-2]: 137-147.
52. Cheung CCC, Zheng GJ, Li AMY, Richardson BJ, Lam PKS. Relationship Between Tissue Concentrations of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons and Antioxidative Responses of Marine Mussels, *Perna viridis*. *Aquat Toxicol.* 2001; 52(3-4): 189-203.
53. Larson RA. The antioxidants of higher plants. *Phytochemistry.* 1988; 27(4): 969-978.
54. <https://images.app.goo.gl/n82mE3orpvDZk11E7>
55. <https://images.app.goo.gl/XDiLWufouHZh7DQ57>
56. <https://images.app.goo.gl/ZKczdVnYronYoaqL9>
57. Droge W. Free radicals in the physiological control of cell function. *Physiol Rev.* 2002; 82(1): 47-95.
58. Townsend DM, Tew KD, Tapiero H. The importance of glutathione in human disease. *Biomed Pharmacother.* 2003; 57[3-4]: 145- 155.
59. <https://images.app.goo.gl/uCXff6FeqmaFJPRk6>
60. Reiter RJ, Acuna-Castroviejo D, Dun- Xian T, Burkhardt S. Free Radical-Mediated Molecular Damage. Mechanisms for the Protective Actions of Melatonin in the Central

Nervous System. *Ann N Y Acad Sci.* 2006; 939[1] doi: 10.1111/j.1749-6632.2001.tb03627.x

61. <https://images.app.goo.gl/Dz5XGzvdP8Z9uGLB8>

62. Kumar AN, Aruna P, Naidu JN, Kumar R, Srivastava AK. Review of Concepts and Controversies of Uric Acid as Antioxidant and Pro-Oxidant. *Archives Medical Review Journal.* 2015; 24[1]: 19-40.

63. Waring WS. Uric acid: an important antioxidant in acute ischaemic stroke. *QJM.* 2002; 95[10]: 691-693.

64. <https://images.app.goo.gl/SQ2nvW7mu3gZDSshr9>

65. Gutteridge JMC. Lipid Peroxidation and Antioxidants as Biomarkers of Tissue Damage. *Clin Chem.* 1995; 41[12]: 1819- 1828.

66. Burtis CA, Ashwood ER. Vitaminler. Aslan D. Eds. *Klinik Kimyada Temel İlkeler. Palme Yayınları, Ankara;* 2005.

67. <https://images.app.goo.gl/zRrE2e6C2TAHozbn8>

68. Roche M, Rondeau P, Singh NR, Tarnus E, Bourdon E. The antioxidant properties of serum albumin. *FEBS Lett.* 2008; 582[13]: 1783-1787.

69. <https://images.app.goo.gl/wXxTyFimZBugN4Uf7>

70. Gürkan AS, Bozdağ-Dündar O. Coenzyme Q10. *Journal of Faculty of Pharmacy of Ankara.* 2005; 34[2]: 129-154.

71. <https://images.app.goo.gl/PeiMfvgpEskMCZKz9>

72. Packer L, Kraemer K, Rimbach G. Molecular Aspects of Lipoic Acid in the Prevention of Diabetes Complications. *Nutrition.* 2001; 17: 888-895.

73. <https://images.app.goo.gl/b6zmPVZWXkw8fHu17>

74. Kim Y, Kim DC, Cho ES, Ko SO, Kwon WY, Suh GJ, Shin HK. Antioxidant and anti-inflammatory effects of selenium in oral buccal mucosa and small intestinal mucosa during intestinal ischemia-reperfusion injury. *J Inflamm.* 2014; 11[36] doi:10.1186/s12950-014-0036-1.

75. <https://images.app.goo.gl/SUAfaaoy4CjNttKG7>

76. Chauhan A, Chauhan V, Brown WT, Cohen I. Oxidative stress in autism: Increased lipid peroxidation and reduced serum levels of ceruloplasmin and transferrin - the antioxidant proteins. *Life Sci.* 2004; 75: 2539–2549.

77. <https://images.app.goo.gl/YonBiXkXVvGuU1AF8>

78. <https://images.app.goo.gl/RVkBxBd41B2SVkGf8>

79. <https://images.app.goo.gl/iBUm7HovYFhK5wBb8>

80. Li Y, Schellhorn HE. New developments and novel therapeutic perspectives for vitamin C. *J Nutr.* 2007; 137[10]: 2171-2184.

81. Carr AC, Frei B. Toward a new recommended dietary allowance for vitamin C based on antioxidant and health effects in humans. *Am J Clin Nutr.* 1999; 69[6]: 1086-1107.

82. <https://images.app.goo.gl/UNCd3XVeWuKN34UQ6>

83. <https://images.app.goo.gl/SAsgjJSGjNCS68WMA>

84. Title LM, Cummings PM, Giddens K, Genest JJ, Nassar BA. Effect of Folic Acid and Antioxidant Vitamins on Endothelial Dysfunction in Patients With Coronary Artery Disease. *J Am Coll Cardiol.* 2000; 36[3]: 758-765.

85. Ebaid H, Bashandy SAE, Alhazza IM, Rady A, El-Shehry S. Folic acid and melatonin ameliorate carbon tetrachloride-induced hepatic injury, oxidative stress and inflammation in rats. *Nutr Metab.* 2013; 10[20] doi:10.1186/1743-7075-10-20.

86. <https://images.app.goo.gl/YZK4kcagZAWQQ9jz6>



87. Pişkin Ç, 2007. Lamiaceae familyasına mensup bazı baharat bitkilerinin antimikrobiyal etkilerinin belirlenmesi, *Selçuk Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü*.
88. Tüney İ, Cadirci BH, Ünal D, Sukatar A, 2006. Antimicrobial activities of the extracts of marine algae from the coast of Urla [Izmir, Turkey]. *Turkish Journal of Biology*, 30, 3, 171-5.
89. Altuner, E.M., “Bazı karayosunu türlerinin antibakteriyel aktivitesinin belirlenmesi.”, *Ankara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Doktora Tezi, Ankara, 2008*.
90. Baydar, H., 2009. Sekonder metabolitlerin önemi. Tıbbi ve Aromatik Bitkiler Bilimi ve Teknolojisi. *Süleyman Demirel Üniversitesi Yayın No:51 Ziraat Fakültesi. DÜ Basım Evi. Isparta. S: 45-63*.
91. Anssen A.M., Scheffer J.J., Baerheim S.A., *Planta Ned.*, [1987] 53, 395-398.
92. Koneman E.W., Allen S.D., Janda W.M., Schreckenberger P.C., Winn W.C., *Color Atlas and Textbook of Diagnostic Microbiology*, Lippincott-Raven Pub, Philadelphia, USA, pp [1997], 785-856.
93. Elof J.N., *Planta Med.*, [1998], 64, 711-713.
94. <https://images.app.goo.gl/r4LdwiKbDCUugxjQ7>
95. <https://images.app.goo.gl/XuXaiJiqMdZ5Vpyj7>
96. <https://images.app.goo.gl/Y1RqpkSz4GnnGrAK9>
97. Brand-Williams, W., Cuvelier, M.E., Berset, C., “Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity”, *Lebensmittel-Wissenschaft und Technologies*, 28: 25-30, 1995.
98. Pradedova, E., Isheeva, O., Salyaev, R., “Classification of the antioxidant defense system as the ground for reasonable organization of experimental studies of the oxidative stress in plants”. *Russian Journal of Plant Physiology*, 58[2]: 210-217, 2011.

99. Decker, E. A., Welch, B., "Role of ferritin as a lipid oxidation catalyst in muscle food", *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 38: 674-677, 1990.
100. Singleton, V.L., Rossi, J.A., "Clorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents", *American Journal of Enology and Viticulture*, 16: 144-158, 1995.
101. Emami SA, Shahani A., Hassanzadeh Khayyat M. Antioxidant Activity of Leaves and Fruits of Cultivated Conifers in Iran. *Jundishapur Journal of Natural Pharmaceutical Products*, 2013, 8(3):113-117. doi: 10.17795 / jjnpp-9670.
102. Karapandzova, M , Stefkov, G , Cvetkovikj, I , Trajkovska-Dokik, E , Kaftandzieva, A , Kulevanova, S. (2014) Chemical composition and antimicrobial activity of the essential oils of *Pinus peuce* (Pinaceae) growing wild in R. Macedonia. *Natural Product Communications*, 9, 1623–1628.
103. Şahin, Serpil, et al. "Yeni teknolojilerle baharatlardan esansiyel yağ ekstraksiyonu ve bu yağların fiziksel, antioksidan ve antimikrobiyal özellikleri." (2007).
104. Hofmann, Tamás, Eszter Visi-Rajczi, and Levente Albert. "Antioxidant properties assessment of the cones of conifers through the combined evaluation of multiple antioxidant assays." *Industrial Crops and Products* 145 [2020]: 111935.
105. Stamets, P., "Mycelium running", Ten speed press, 399 *Berkeley*, 2005.
106. Üstün, Osman, vd. "Türk *Pinus* türleri ve piktogenolün ekstrakt ve uçucu yağlarının kimyasal bileşimi, antikolinesteraz ve antioksidan aktivitelerinin araştırılması." *Sanayi bitkileri ve ürünleri* 38 [2012]: 115-123.
107. GC Yen , PD Duh , CL Tsai Fıstık kabuğunun antioksidan aktivitesi ile olgunluğu arasındaki ilişki *Tarım Journal of Food Chemistry* , 41 [ 1993 ] , s. 67 – 70
108. M. Tanaka , CW Kuei , Y. Nagashima , T. Taguchi Antioksidatif maillrad reaksiyon ürünlerinin histidin ve glikozdan sardalya ürünlerine uygulanması *Nippon Suisan Gakkaishil* , 54 [ 1998 ] , s. 1409 – 1414

109. Ustun, Osman, et al. "Investigation on chemical composition, anticholinesterase and antioxidant activities of extracts and essential oils of Turkish Pinus species and pycnogenol." *Industrial crops and products* 38 [2012]: 115-123.
110. Demirci, Ayşe Nur, Nazan Çömlekçiöğlü, and Ashabil Aygan. "Determination of the Chemical Composition, Antimicrobial Activity and Flavonoid Content of the Essential Oils of Cedrus libani and Pinus nigra subsp. pallasiana." *Turkish Journal of Agriculture-Food Science and Technology* 8.8 [2020]: 1747-1754.
111. Dığrak, Metin, Ahmet İlçim, and M. Hakkı Alma. "Antimicrobial activities of several parts of Pinus brutia, Juniperus oxycedrus, Abies cilicia, Cedrus libani and Pinus nigra." *Phytotherapy Research: An International Journal Devoted to Pharmacological and Toxicological Evaluation of Natural Product Derivatives* 13.7 [1999]: 584-587.