

Cotinus coggygia (Scop.)
BİTKİSİNİN ANTİOKSİDAN VE ANTİMİKROBİYAL
AKTİVİTESİNİN BELİRLENMESİ

Ezgi BEKTAŞ

YÜKSEK LİSANS TEZİ
BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

Danışman
Doç. Dr. Figen İNCEOĞLU (ERTAN)

2011-EDİRNE

TRAKYA ÜNİVERSİTESİ

FEN BİLİMLERİ

Cotinus coggygia (Scop.)

BİTKİSİNİN ANTIOKSİDAN VE ANTİMİKROBİYAL AKTİVİTESİNİN

BELİRLENMESİ

EZGİ BEKTAŞ

Yüksek Lisans Tezi

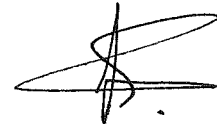
BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

DANIŞMAN: Doç. Dr. FİGEN İNCEOĞLU (ERTAN)

Bu tez 14.10.2011 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından kabul edilmiştir



Prof. Dr. TULİN AKTAÇ



Doç. Dr. FİGEN İNCEOĞLU (ERTAN)

(DANIŞMAN)



Doç. Dr. HÜLYA YAĞAR

EDİRNE-2011

ÖZET

Bu çalışmada *Cotinus coggygia* (Scop.) bitkisinin antioksidan ve antimikrobiyal aktiviteleri çeşitli metotlarla incelendi. Bitkinin yaprakları kurutulup öğütüldükten sonra su, etanol ve aseton çözücüleri kullanılarak ekstraksiyonları yapıldı. Her bir ekstraktın antioksidan aktivitesi, DPPH serbest radikali giderme, indirgeme gücü ve ferrik tiyosiyanat (FTC) yöntemleri ile belirlendi. Toplam fenolik madde miktarı ise, Folin-Ciocalteu metodu ile saptandı. Elde edilen sonuçlar α - tokoferol, BHT ve BHA standart maddeleriyle kıyaslanarak değerlendirildi. Su, etanol ve aseton çözücüleriyle gerçekleştirilen ekstraksiyonlar sonucunda, ekstrakte edilebilen madde miktarı 5-114 mg/g arasında kurutulmuş bitki materyali olarak bulundu. En yüksek ekstraksiyon verimi su ekstraktında gözlemlendi. Toplam fenolik madde tayini sonucunda, ekstraktlarda bulunan fenolik madde miktarlarının gallik asit eşdeğeri olarak 176 ± 0.025 - 199.07 ± 0.044 mg/g aralığında; değiştiği belirlendi. Serbest radikal giderme aktivitesinden elde edilen verilere göre tüm ekstraktlar standart maddelerle karşılaştırılabilir düzeyde DPPH radikali giderme aktivitesi gösterdi. İndirgeme kapasitesi tayini yönünden; bütün bitki ekstraktlarının standartlarla kıyaslanabilir düzeyde yüksek aktiviteye sahip olduğu gözlemlendi. Elde edilen ekstraktların indirgeme kapasiteleri etanol > su \geq aseton şeklinde sıralama gösterdi. Bitki ekstraktlarının toplam antioksidan aktivitesi linoleik asit emülsiyonu kullanılarak tayin edildi. Linoleik asit peroksidasyonunu önlemede en yüksek aktiviteyi su ekstraktının gösterdiği belirlendi.

Cotinus coggygia bitkisi ile hazırlanan ekstraktlar arasında, su ekstraktının en yüksek antibakteriyel etki gösterdiği ve en duyarlı bakterinin *Staphylococcus aureus* olduğu tespit edildi. Ayrıca MİK ve MBK değerleri belirlendi.

Anahtar Kelimeler: *Cotinus coggygia* (Scop.), Anacardiaceae, Antioksidan Aktivite, DPPH, Fenolik Madde, Antibakteriyel Aktivite, MİK, MBK

ABSTRACT

In this study, antioxidant and antimicrobial activities of *Cotinus coggygria* Scop. plant were investigated by various methods. After the plants leaves were dried and milled, their extractions were carried out by using water, ethanol and acetone solvents. The antioxidant activities of all extracts were determined with different methods including DPPH free radical scavenging method, reducing power method and ferric thiocyanate (FTC) method. Their contents of total phenolic compounds were assayed with Folin-Ciocalteu reagent. The obtained results were compared by using α -tocopherol, BHT and BHA as standard. The extractable compounds content were found in the range of 5-114 mg/g dried plant at the end of extractions carried out by water, ethanol and acetone as solvent. The highest extraction yield was observed in the water extract. In the total phenolic compound amounts of extracts were determined to be in the range of 176 ± 0.025 - 199.07 ± 0.044 mg/g as gallic acid equivalent. According to data obtained from the assay of free radical scavenging activity, all extracts showed DPPH scavenging activity, which is comparable with standard compounds. The reducing capacities of obtained extracts were in the order of ethanol > water \geq acetone.

The total antioxidant activities of plant extracts were assayed by using linoleic acid emulsion. The water extract had the highest ability to prevent linoleic acid peroxidation.

Among the prepared extracts from *Cotinus coggygria* plant, water extract showed the best antibacterial activity. *Staphylococcus aureus* were determined to be the most sensitive bacterium. Also MIC and MBC values of extract were determined.

Keywords: *Cotinus coggygria* Scop., *Anacardiaceae*, Antioxidant activity, DPPH, Phenolic, Antibacterial activity, MIC, MBC.

TEŞEKKÜR

Tüm yüksek lisans eğitimim boyunca desteğini, bilgisini ve tecrübelerini benden esirgemeyen, her durumda yanımda olan, değerli tez hocam Sayın Doç.Dr. Figen İNCEOĞLU (ERTAN)'na yardımlarında dolayı sonsuz teşekkürlerimi sunmayı bir borç bilirim.

Desteğini her zaman hissettiren ve Kimya Bölümü Biyokimya Araştırma Laboratuvarının bütün imkanlarından faydalanmamı sağlayan hocam Sayın Doç.Dr. Hülya YAĞAR'a, tüm çalışmalarımdayardımlarını esirgemeyen bilgi ve deneyimiyle beni yönlendiren değerli hocam Arş. Gör. Dr. Şebnem Selen İŞBİLİR'e, bitkinin teşhisinde bana yardımcı olan hocam Yrd. Doç. Dr. Necmettin GÜLER'e, bitkimin su ekstraktlarının liyofilizasyon işlemini gerçekleştiren Namık Kemal Üniversitesi, Tekirdağ Meslek Yüksek Okulu, Gıda Teknolojisi Programı Öğretim üyesi Yrd. Doç. Dr. Hülya ORAK'a çok teşekkür ederim.

Antibakteriyel aktivite tayini deneyi sırasında yol gösteren ve tez çalışmasında kullanılan bakterilerin teminin sağlayan Kırklareli Üniveristesesi Fen–Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü Öğretim üyesi Sayın Prof. Dr. Aysun Egene'ye teşekkür ederim.

Tezimin laboratuvar aşamasında yardımlarıyla yanımda olan değerli arkadaşım Cansel ŞEN'e çok teşekkür ederim.

Beni her zaman içtenlikle destekleyen çalışmalarımdayardımlarında bana moral ve güç veren değerli aileme sabırları ve hoşgörülerinden dolayı sonsuz teşekkürü bir borç bilirim.

Ezgi BEKTAŞ

İÇİNDEKİLER

ÖZET	I
TEŞEKKÜR.....	III
İÇİNDEKİLER.....	III
İÇİNDEKİLER	IV
ŞEKİLLER DİZİNİ	VII
TABLolar DİZİNİ	IX
KISALTMALAR.....	X
1. GİRİŞ.....	1
2. KURAMSAL TEMELLER VE KAYNAK ARAŞTIRMASI.....	5
2.1. YAŞAM İÇİN OKSİJEN	5
2.1.1. Moleküler oksijenin özellikleri.....	5
2.2. SERBEST RADİKALLER.....	6
2.2.1. Serbest oksijen radikalleri ve reaktif oksijen türleri	8
2.2.1.1. Süperoksit radikali	11
2.2.1.2. Hidrojen peroksit.....	11
2.2.1.3. Hidrojen radikali	12
2.2.1.4. Singlet oksijen	12
2.2.1.5. Hipoklorik asit.....	13
2.2.1.6. Nitrik oksit	13
2.2.3. Serbest radikallerin metabolizmaya etkileri	13
2.2.3.1. DNA üzerindeki etkileri.....	13
2.2.3.2. Proteinler üzerindeki etkileri.....	14
2.2.3.3. Lipitler üzerine etkileri.....	14
2.2.3.4. Serbest radikallerin karbonhidratlara etkileri.....	15
2.3. SERBEST RADİKALLERE KARŞI HÜCRESEL SAVUNMA (ANTIOKSIDAN SAVUNMA SİSTEMLERİ, ANTIOKSIDANLAR)	16
2.4. ANTIOKSIDAN AKTİVİTE TAYİN METOTLARI	21
2.5. ANTIMİKROBİYAL MADDELER	22
2.6. ANTIMİKROBİYAL MADDELERİN GENEL ÖZELLİKLERİ.....	24
2.6.1. Antibakteriyel maddenin sınıflandırılması	24
2.7. ANTIMİKROBİYAL AKTİVİTE TAYİN METOTLARI	25

2.7.1. Dilüsyon yöntemi	26
2.7.2 Difüzyon Yöntemi.....	26
2.8. ANACADIACEA.....	27
2.8.1. <i>Cotinus coggygia</i>	28
3. MATERYAL VE METOD	31
3.1. MATERYAL	31
3.1.1. <i>Bitkisel Materyal</i>	31
3.1.2. <i>Test bakterileri</i>	31
3.1.3. <i>Kullanılan kimyasal madde ve ekipmanlar</i>	36
3.1.4. <i>Kullanılan Kimyasal Çözeltiler ve Besiyerleri</i>	36
3.1.4.1. <i>Antioksidan Aktivite Tayininde Kullanılan Çözeltilerin Hazırlanması</i>	36
3.1.4.2. <i>Antimikrobiyal aktivite tayininde kullanılan besiyeri ve çözeltiler</i>	38
3.2. METOD	39
3.2.1. <i>Ekstrelerin Hazırlanması</i>	39
3.3. <i>Ekstraktların Toplam Fenolik Madde Tayini (TPC)</i>	40
3.3.1. <i>Toplam Fenolik Tayini</i>	40
3.4. ANTIOKSIDAN AKTİVİTE TAYİN METODLARI.....	40
3.4.1. <i>DPPH</i>	40
3.4.2. <i>İndirgeme Gücü</i>	41
3.4.3. <i>Linoleik Asit Sisteminde Ferrik Tiyosiyanat Metodu ile Toplam</i>	42
<i>Antioksidan Aktivite Tayini</i>	42
3.5. ANTİBAKTERİYEL AKTİVİTE TAYİN METODLARI	43
3.5.1. <i>Bakteri Kültürlerinin Hazırlanması</i>	43
3.5.2. <i>Disk Difüzyon Yöntemi</i>	43
3.5.3. <i>MİK (Minimal İnhibitör Konsantrasyonu)</i>	44
3.6. DEĞERLENDİRME	44
4. BULGULAR	45
4.1. FCR İLE TOPLAM FENOLİK BİLEŞİK TAYİNİ SONUÇLARI	45
4.2. EKSTRELERİN ANTIOKSIDAN AKTİVİTE SONUÇLARI.....	47
4.2.1. <i>DPPH Serbest Radikal Giderim Aktivitesi</i>	47
4.2.2. <i>İndirgeme Kapasitesi Tayini</i>	50
4.2.3. <i>Linoleik Asit Sisteminde Ferrik Tiyosiyanat Metodu ile Toplam Antioksidan Aktivite</i> <i>Tayini</i>	51
4.3. EKSTRELERİN ANTİBAKTERİYEL AKTİVİTE SONUÇLARI	56
5. TARTIŞMA	62

6. KAYNAKLAR.....	69
ÖZGEÇMİŞ.....	77

ŞEKİLLER DİZİNİ

	Sayfa No:
Şekil 2.1. Delta ve sigma O ₂	6
Şekil 2.2. Oksijenin suya indirgenmesi ve diğler oksijen türlerinin oluşumu	9
Şekil 2.3.1. Singlet Oksijen	13
Şekil 2.3.2. Lipit peroksidasyonunun temel prensipleri	15
Şekil 2.4. Serbest radikallerin hücresele hedefleri	17
Şekil 2.8.1. <i>Cotinus coggygria</i> 'nın dünyadaki dağılışı	29
Şekil 2.8.2. <i>Cotinus coggygria</i>	29
Şekil 4.1. Gallik asit standart grafiğı	46
Şekil 4.2. <i>Cotinus coggygria</i> 'dan hazırlanan ekstrelerin DPPH aktiviteleri (3 paralel test ortalaması)	47
Şekil 4.3. <i>Cotinus coggygria</i> aseton (1), etanol (2), su (3) ekstrelerinde ve BHA (4), BHT (5) standartlarının DPPH serbest radikal giderim aktivitesi inhibisyon değlerleri	48
Şekil 4.4. Bitki ekstresinin indirgeme kapasitesi	50
Şekil 4.5. Linoleik asit peroksidasyonunda sentetik antioksidan olan BHA (A), BHT (B)'nin etkisi	50
Şekil 4.6. Linoleik asit peroksidasyonunda <i>Cotinus coggygria</i> aseton ekstresinin antioksidan etkisi	52
Şekil 4.7. Linoleik asit peroksidasyonunda <i>Cotinus coggygria</i> etanol ekstresinin antioksidan etkisi	53
Şekil 4.8. Linoleik asit peroksidasyonunda <i>Cotinus coggygria</i> su ekstresinin antioksidan etkisi	54

Şekil 4.9. Total % inhibisyon grafiği	56
Şekil 4.10.1. TS (4),TE (2), TA (1) ,Oflaxacin (3), Ampicilin (6), negatif kontrol diskinin (5) <i>S.aureus</i> üzerinde oluşturduğu inhibisyon zonu	58
Şekil 4.10.2. TS (1),TE (5), TA (4) ,Oflaxacin (6),Ampicilin (3),negatif kontrol diskinin (2) <i>E coli</i> üzerinde oluşturduğu inhibisyon zonu	58
Şekil 4.10.3.. TS (1), TE (2), TA (3) ,Oflaxacin (4), Ampicilin (5), negatif kontrol diskinin (6) <i>Klebsiella p.</i> üzerinde oluşturduğu inhibisyon zonu	59
Şekil 4.10.4 TS (2), TE (3), TA (5) ,Oflaxacin (1), Ampicilin (6), negatif control diskinin (4) <i>Pseudomonas a.</i> üzerinde oluşturduğu inhibisyon zonu	59
Şekil 4.10.5 TS'nin 30, 15 ve 7.5 mg/ml konsantrasyonlarındaki <i>K.pneumoniae</i> bakterisine göre MBK değerleri	60

TABLolar DİZİNİ

	Sayfa No:
Tablo 2.1. Serbest radikal ve radikali üreten tür	10
Tablo 2.2. Antioksidanların çeşitleri	18
Tablo 2.3. Gıdaları korumada kullanılan bazı sentetik antioksidanlar	20
Tablo 2.4. Invitro koşullarda uygulanan antioksidan aktivite tayin metotları	22
Tablo 2.5. Kullanılan bakteriler ve kodları	30
Tablo 3.1. Yaprak ekstraktlarının çeşitli çözücülerdeki % ekstraksiyon verimi	39
Tablo 4.1. <i>Cotinus coggygria</i> dan hazırlanan ekstrelerin toplam fenolik madde Miktarları	46
Tablo 4.2. <i>Cotinus coggygria</i> bitkisinin su, etanol, aseton ekstraktları ve BHT BHA Standartlarının % inhibisyon değerleri	49
Tablo 4.2.1 <i>Cotinus coggygria</i> bitkisinin su, etanol, aseton ekstraktlarının EC50 değerleri	50
Tablo 4.3. % İnhibisyon değerleri	61
Tablo 4.3.1. E vitamini lipit peroksidasyon inhibe etme oranları	55
Tablo 4.4. Bitki ekstresinin oluşturduğu inhibisyon zonu çapı değerleri	57
Tablo 4.5. MİK tablosu	60

KISALTMALAR

ABTS	2,2'-Azinobis(3-etilbenzotiazolin-6-sülfonat)
BHA	Bütil hidrooksianizol
BHT	Bütil hidrooksi toluene
DMSO	Dimetil sülfoksit
DPPH	1,1-difenil-2-pikrilhidrazil
ETS	Elektron taşıma sistemi
FCR	Folin Ciocalteu reaktifi
FRAP	Demir(III)'ü indirgeyici antioksidan güç
FADH ₂	Flavin adenin dinükleotit (hidrokinon formu)
GAE	Gallik asit eşdeğeri
GPx	Glutatasyon peroksidaz
MIK	Minimum İnhibitör Konsantrasyonu
MBK	Minimum Bakterisidal Konsantrasyon
NADH	Nikotin adenin dinükleotid
OFX	Oflaxacin
ORAC	Oksijen radikali absorblama kapasitesi
PG	Propil gallat
ROS (ROT)	Reaktif oksijen türleri

SOD	Süperoksit dismutaz
TBHQ	t-bütil hidroksikinon
TEAC	Trolox ekivalenti antioksidan kapasite
TRAP	Toplam radikal absorpsiyon kapasitesi
TE	Tetra Etanol Ekstraktı
TA	Tetra Aseton Ekstraktı
TS	Tetra Su Ekstraktı
QE	Qualitative equivalent

1. GİRİŞ

İnsanların çok eski zamanlardan beri hastalıkların iyileştirilmesinde bitkilerden yararlandığı bilinmektedir. Modern ilaç endüstrisi hastalıklara karşı çeşitli ilaçları geliştirmeden önce, birçok bitki ilaç olarak kullanılmıştır (Abay, 2006). Günümüzde insan ve hayvanların tedavisinde birçok ilaç sentetik olarak üretilmekte, buna karşılık son 30-40 yılda özellikle endüstrileşmiş ülkelerde, bitkisel ilaçlara doğru büyük bir yöneliş görülmektedir (Ünal, 2006).

Tedavi amacıyla kullanılan bitkilerin miktarı, antik çağdan beri devamlı bir artış göstermektedir. Mezopotamya uygarlığı döneminde kullanılan bitkisel drog miktarı 250 civarında iken 19.yy başlarında bilinen tıbbi bitki miktarı 13.000 sayısına erişmiştir. 1979 Dünya Sağlık Teşkilatında (WHO) yapılan bir araştırmanın sonuçlarına göre farmakopilerde kayıtlı olan 5 ülkeden fazla kullanılan ve ticarete bulunabilen bitkisel drogların miktarı 1900 olarak saptanmıştır. Aynı kurumun 91 ülkenin farmokopilerine ve tıbbi bitkileri üzerine yapılmış olan bazı yayınlarına dayanarak hazırladığı bir araştırmaya göre, tedavi amacıyla kullanılan tıbbi bitkilerin toplam miktarı 20.000 civarındadır (Baytop, 1999; Yıldırım, 2006).

19.yy da bitkilerle tedavi alanında hızlı ilerleme ve gelişmeler sağlanmıştır. Böylece şifalı bitkilerin kültürlerinin yapılması, toplanması, kurutulması ve ufalanması gibi işlemler geliştirilmiştir (Öztürk, 2009). Bu durum, bitkilerin anatomik yapılarının tayin edilmesi gerekliliğini ortaya çıkarmıştır. Böylelikle farmakognozi biliminin temeli atılmıştır. Farmakognozi; tıbbi ya da şifalı bitkiler anlamına gelmektedir.

Farmakoloji; ilaçlar ile ilgili biyolojik sistemler arasındaki etkileşimleri inceleyen ve eczacılığın temeli olan bilim dalıdır. Farmakoterapi; uygulamalı farmakolojidir ve hastalıkların tedavisinde ilaçların uygulanmasını konu alır (Yıldırım, 2006). Tüm dünya ülkelerinde olduğu gibi, Türkiye'de de tıbbi açıdan önemli olan bitkiler, yüzyıllardan beri halk arasında hastalıkların tedavisi amacıyla kullanılmaktadır (Bağcı vd., 1998). Bitkilerin organizmaları öldürücü ve insan sağlığı

için önemli olan özellikleri 1926 yılından bu yana laboratuvarlarda araştırılmaya başlanmıştır (Bağcı, 1998; Kırbağ, 2005).

Türkiye 3 fitocoğrafik bölgenin bulunduğu bir alanda bulunması nedeniyle bitki türü bakımından oldukça zengindir. Tür sayısı yaklaşık olarak 10.000 civarında olup, bitki örtüsü bakımından 3 flora bölgesine ayrılır: 1. Kuzey Anadolu 2. Batı ve Güney Anadolu 3. Orta ve Doğu Anadolu Bölgesi Türkiye florası konusunda gerek ulusal gerekse uluslararası çalışmalar bulunup önemli bilgiler aktarılmıştır. Bu bilgiler ışığında Türkiye'nin biyolojik çeşitlilik yönünden önemi yadsınamaz. Bu önem kendisini sadece tür zenginliği olarak değil, biyolojik çeşitlilik olarak da göstermektedir (Kılınç ve Kutbay, 2007).

Son yıllarda tıbbi bitkiler ve bunlardan elde edilen aktif maddeler üzerindeki çalışmalar ve bunlara karşı olan ilgi çok artmıştır. Bunun başlıca sebepleri şunlardır:

1- Yeterli düzeyde bir kimya endüstrisine sahip bulunmayan kalkınma yolundaki ülkelerin, memleketlerindeki bitkilerden yararlanarak, kolay ve ucuz bir tedavi olanağı elde etmek istekleri.

2- Tedavi alanına sokulan yeni sentetik bileşiklerin bazılarında görülen tehlikeli yan etkiler. Bitkisel droglar çok uzun bir zamandan beri tedavide kullanıldıkları için yan etkileri iyi bilinmektedir. Buna karşılık tedaviye yeni sokulan sentetik maddeler, yeterli kontrol zamanına sahip olmadıklarından, bazı tehlikeli yan etkilere sahip oldukları, ancak kullanlarından sonra anlaşılmakta ve bu durumda onarılması olanaksız zararlara sebep olmaktadır.

3- Bazı ilkel ilaç maddelerinin, bitkisel droglardan, sentetik olanlardan daha ucuza ve daha kolaylıkla elde edilebilme imkânları. Steroid bileşikler, kınakına alkaloidleri, afyon alkaloidleri, çavdar mahmuzu alkaloidleri, Atropa alkaloidleri, Rauwolfia alkaloidleri, Strychnos alkaloidleri, Digitalis glikozitleri bu yöndeki uygulamalara örnek olarak verilebilir.

4- Bitkisel drogların diğer bir üstün yanı da birkaç etkiye birden sahip olmalarıdır. Sentetik bileşikler genellikle bir tek etkiye sahiptirler. Bunların bazıları

ise, antibiyotikler gibi, yan etkilerini önlemek için diğer bazı ilaçlara ihtiyaç gösterirler. Bitkisel droglarda böyle bir durum yoktur (Abay, 2006).

Son zamanlarda insanda patojenik etki gösteren mikroorganizmalar pek çok ilaca karşı direnç geliştirmişlerdir. Bu durumda bilim adamları yeni antimikrobiyal kaynak arayışına girişmişlerdir. Antimikrobiyal tedavi ajanları için çeşitli bitkiler kaynak oluşturmaktadır (Türkoğlu vd., 2006). Bütün dünyada yüzlerce bitki, bakteriyel enfeksiyonlar için, tedavi amacı ile kullanılmaktadır. Sıradan ilaçlar genellikle bakteriyel enfeksiyonlar için etkili tedavi sağlamaktadır (Öztürk, 2009). Fakat çalışmalar gösteriyor ki birçok antibiyotiğin bakterilere karşı direncinin zayıflamasında kesinlikle bir artış vardır. Mikroorganizmaların antibiyotiklere karşı direncinin artması, bitki içerisindeki kimyasal bileşiklerin keşfine duyulan gerekliliği artırmıştır (Yi vd. 2007). Bitkilerinde yeni antimikrobiyal kematerapötik maddelerin elde edilebileceği, zengin bir kaynak olmalarından dolayı, araştırmalar özellikle tıbbi bitkiler üzerinde yoğunlaşmıştır. Türkiye gibi gelişmekte olan ülkelerde, tıbbi bitkiler birçok hastalığın tedavisinde yaygın olarak kullanılmaktadır (Ünal, 2006).

Hücrelerin tümünde gerçekleşen kimyasal reaksiyonlar sonucunda serbest radikaller oluşur (Akkuş, 1995). Oksidatif reaksiyonlar ve serbest radikaller birçok mekanizma sonucu meydana gelir. Bu reaksiyonları genellikle demir ve bakır iyonları katalizler (Nićiforović vd., 2010). Serbest radikaller, kimyasal reaksiyonlara ve çeşitli kimyasal bileşiklerin birçok redoks reaksiyonlarına protein oksidasyonuna, DNA hasarına ve hücre içinde lipit peroksidasyonuna neden olurlar (Kil vd., 2009). Son yıllarda serbest radikaller ve bunların insan sağlığı açısından zararları giderek önem kazanmış, arteroskleroz, diyabet, kanser ve yaşlanma gibi birçok durumun mekanizmasının altında serbest radikallerin meydana getirdiği hasarların olduğu öne sürülmüştür (Akagün, 2009). Canlı organizmanın serbest radikallerin etkisinden korunması için antioksidatif korunma sistemine sahip olduğu bilinmektedir. Bazı durumlarda antioksidatif koruyucu sistemin iyi çalışmamasından dolayı, serbest radikallerin vücutta fazlaştığı görülür.

Antioksidanlar vücuda zarar veren serbest radikallerle reaksiyona girerek bunların başlattığı zincir reaksiyonunu durduran ve böylece vücudumuzdaki hayati

bileşenlerin zarar görmesini engelleyen moleküllerdir. Süperoksitler, hidroksil radikalleri ve hidrojen peroksit gibi reaktif oksijen türlerinin oluşturdukları hasara karşı koruyucu olan bu moleküller, reaktif oksijen türlerini temizlemek veya okside bileşikleri indirgemek yoluyla işlev yaparlar (Akkuş, 1995).

Gıda sanayinde yağların ve yağ içeren diğer ürünlerin korunması ve raf ömrünün uzatılması amaçlı kullanılan sentetik antioksidanların vücut için risk taşıdığı, özellikle bütillendirilmiş hidroksitoluen (BHT) ve bütillendirilmiş hidroksianisol (BHA) kullanımının organizmada tümör oluşumunu tetiklediği araştırmalar sonucu bulunmuştur (Nićiforović vd., 2010).

Son yıllarda sentetik antioksidanların yan etkilerinin görülmeye başlaması nedeniyle besin kimyası ve koruyucu tıbbın bitkisel kaynaklı doğal antioksidanlara ilgisi artmıştır. Fenolik maddeler doğal antioksidanların en önemli gruplarını oluştururlar (Rice –Evans vd., 1997).

Doğal ve fenolik bileşiklerce zengin meyve ve sebzelerin insan vücudunu serbest oksijen radikallerine karşı korumada etkili oldukları bilinmektedir. Yapılan epidemiyolojik çalışmalarla reaktif oksijen türlerine (ROS) karşı bitkisel kaynaklardaki fitonutrientlerin yararlı olduğu; meyve ve sebzelerin koruyucu etkilerinin içerdikleri askorbik asit (C vitamini), α -tokoferol (E vitamini), karotenoidler, glutatyon, flavonoidler ve fenolik asitler gibi doğal bileşiklerden dolayı olduğu bildirilmiştir (Halvorsen vd., 2002).

Endüstriyel uygulamalarda kullanılmak üzere; meyve, sebze, aromatik bitki ve özellikle çeşitli baharatların tohum, meyve, yaprak, kök, kabuk gibi kısımları kullanılarak antioksidanca zengin ekstraktlar tanımlamak üzere yapılmış çok sayıda çalışma vardır

Bu tez kapsamında özellikle Balkan ülkelerinde çok iyi bilinen ve çeşitli hastalıkların tedavisinde kullanılan ülkemizde de özellikle Trakya Bölgesinde yaygın olarak bulunan tetra bitkisinin (*Cotinus coggygria* Scop.) yapraklarından oluşan ekstraktın antioksidan aktiviteleri ve antibakteriyel aktivitesi incelenmiştir.

2. KURAMSAL TEMELLER VE KAYNAK ARAŞTIRMASI

2.1. Yaşam İçin Oksijen

Yaşamımızı sürdürmek için havanın moleküler oksijenini (O_2) tükettiğimizi biliyoruz. Oksijen; hidrojen, karbon, azot ve kükürt ile birlikte organik maddelerin temel elementidir. Aerobik canlıların enerji metabolizmasındaki rolü nedeniyle hayati önem taşıyan oksijen, tüm canlılar için vazgeçilmez bir elementtir.

Oksijen sadece anaerobik türlerde değil, yaşamları için mutlaka moleküler oksijene bağımlı olan canlılarda da toksik etkilidir. (URL 1)

Total oksijen tüketimimizin % 90'dan fazlasını elektron transport zinciri (solunum zinciri), % 5-10'u da diğer oksijen gerektiren reaksiyonlarda gerçekleştirilmektedir. Elektron transport zincirinde (ETS) moleküler oksijen, yakıtlardan (glukoz, yağ asidi ve amino asitlerin karbon iskeleti) türeyen NADH ve $FADH_2$ 'den elektronları alarak suya indirgenir. Bu yolda oksijen molekülünün kuvvetli oksitleyici gücü, ATP'nin yüksek enerjili fosfat bağı haline dönüştürülür (URL 2).

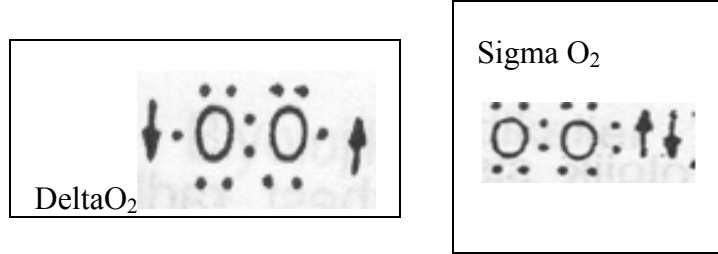
2.1.1. Moleküler oksijenin özellikleri

Moleküler oksijen (O_2), paralel spin durumlu iki ortaklanmamış (eşleşmemiş) elektrona sahiptir.

Ortaklanmamış elektron içeren atom, atom grubu veya moleküller serbest radikal olarak tanımlanırlar. Serbest radikal tanımına göre moleküler oksijen, bir biradikal (diradikal) olarak değerlendirilir. Biradikal oksijen, radikal olmayan maddelerle yavaş reaksiyona girdiği halde diğer serbest radikallerle kolayca reaksiyona girer.

Biradikal oksijenin elektronlarından birinin enerji alarak kendi spininin ters yönünde olan başka bir orbitale yer değiştirmesiyle singlet oksijen oluşur. Singlet

oksijen, eşleşmemiş elektronu olmadığı için radikal olmayan reaktif oksijen molekülüdür, delta ve sigma olmak üzere iki şekli vardır:



Şekil 2.1. Delta ve Sigma O₂ (URL 2)

Organizmada, geçiş metallerini (Fe⁺² ve Cu⁺ gibi metaller) içeren enzimler aracılığıyla moleküler oksijene tek elektronların transferi ile oksidasyon reaksiyonları meydana gelir.

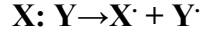
Moleküler oksijen, biradikal doğasının bir sonucu olarak yüksek derecede reaktif oksijen türleri (ROS) oluşturma eğilimindedir (URL 2).

2.2. Serbest Radikaller

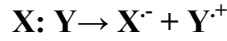
Serbest radikaller iyonların ve uyarılmış moleküllerin ayrılmaları sonucunda oluşan dış yörüngelerinde eşleşmemiş bir elektrona sahip ve genellikle elektriksel açıdan yüksüz atom ya da moleküllerdir. Serbest radikaller son derece reaktiflerdir yani diğer atom ya da moleküllerle kolayca reaksiyona girebilirler (Akyüz, 2007). Bir protonu ve bir elektronu bulunan hidrojen atomu en basit serbest radikaldir. Ortaklanmamış elektron, genel olarak atom veya molekülün üst kısmında konulan bir nokta ile gösterilir. Dış çevrede ve hücre içinde, çeşitli fiziksel ve kimyasal olaylar sonucu sürekli olarak serbest radikal yapımı vardır.

Bir serbest radikal 3 yolla ortaya çıkabilir:

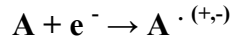
1. Kovalent bağ taşıyan normal bir molekülün homolitik yıkımı sonucu oluşurlar (Bölünme sonrası her bir parçada ortak elektronlardan biri kalır).



2. Normal bir molekülden tek bir elektronun kaybı ya da bir molekülün heterolitik olarak bölünmesi ile oluşurlar. Heterolitik bölünmede kovalent bağı oluşturan her iki elektron, atomlardan birisinde kalır.



3. Normal bir moleküle tek bir elektronun eklenmesi ile oluşurlar.



(Altan vd., 2006.)

Serbest radikaller, pozitif yüklü, negatif yüklü ya da nötral olabilirler. Biyolojik sistemlerde en fazla elektron transferi ile oluşurlar (Akkuş, 1995). Her ne kadar serbest radikal reaksiyonları, bağışıklık sistemi hücrelerinden nötrofil, makrofaj gibi hücrelerin savunma mekanizması için gerekli olsa da, serbest radikallerin fazla üretimi doku hasarı ve hücre ölümü ile sonuçlandırılmaktadır (Halliwell vd., 1992). Serbest radikaller hücrelerin lipit, protein, DNA, karbonhidratlar gibi tüm önemli bileşiklerine etki ederler ve yapılarının bozulmalarına neden olurlar (Altan vd., 2006).

Serbest radikallerin başlıca sigara, alkol ve lipit metabolizması ürünleri, virüsler, güneş ışınları, X ışınları ve kozmik ışınlar, sanayi atıkları, otomobil egzoz gazları, ozon, ağır metaller, kirli su ve havadan da oluşabildiği bilinmektedir (Sies,

1991). Aynı zamanda serbest radikaller aktive olmuş fagositler, antineoplastikler (nitro furantoin, bleomisin, doksorubusin, adriamisin) ve stres (katekolamin artar katekolamin oksidasyonu sonucu serbest radikaller meydana gelir) sonucu biyolojik olarak üretilir. Bugün serbest radikaller kanser, yaşlanma, Alzheimer, arteroskleroz gibi pek çok hastalığın oluşmasından sorumlu ajanlar olarak ele alınmaktadır (Türkoğlu vd., 2010).

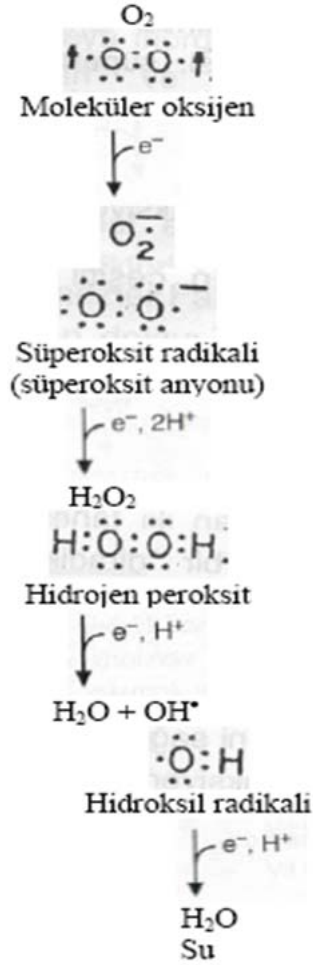
Radikaller, oksijen içerip içermediğine göre, serbest oksijen radikalleri (SOR) ve oksijen içermeyen radikaller olarak ikiye ayrılır. İçerdiği iki eşleşmemiş elektrondan dolayı moleküler oksijenin kendisi de aynı zamanda “biradikal” olup diğer radikallerle kolayca reaksiyon verebilme yeteneğine sahiptir. Moleküler oksijen organizmalar için indirgenmiş karbon bileşiklerinin oksidasyonunda enerji oluşturmak üzere kullanılan en son elektron alıcısı olup tam olarak suya indirgenebilmesi için dört elektrona ihtiyaç duymaktadır (Akyüz, 2007).

Biyolojik sistemlerdeki reaktif oksijen türleri (ROS), süperoksit anyonu ($2O_2^{\cdot-}$), hidroksil radikali (HO^{\cdot}), nitrik oksit (NO^{\cdot}), peroksil radikali (ROO^{\cdot}), ve radikal olmayan hidrojen peroksit (H_2O_2) gibi serbest radikaller oksidatif stresin en önemli nedenlerinden birini oluştururlar. Serbest radikal zincir reaksiyonları genellikle, moleküllerden H'nin uzaklaştırılmasıyla başlar. Lipit peroksidasyonu serbest radikal zincir reaksiyonu için iyi bir örnektir (doymamış yağ asitlerinin hücre membranlarında ve lipoproteinlerdeki oksidasyonu). Bu reaksiyonun özellikle arterosklerozun gelişiminde çok önemli olduğu araştırmacıların savları arasında bulunmaktadır (Altan vd., 2006).

2.2.1. Serbest oksijen radikalleri ve reaktif oksijen türleri

Canlı organizmadaki en önemli serbest radikaller, oksijenden oluşan radikallerdir. Oksijen süperoksit grubuna (O_2) bazı demir-kükürt içeren yükseltgenme-indirgenme enzimleri ve flavoproteinlerin etkisiyle indirgenir (Mercan, 2004).

Serbest oksijen radikali biyokimyasının kilit molekülleri; oksijen, süperoksit, hidrojen peroksit, geçiş metal iyonları ve hidroksil radikalidir. Bunlardan ilk dördü çeşitli reaksiyonlarda hidroksil radikalini oluşturur (Türkyılmaz, 2007).



Şekil 2.2.Oksijenin suya indirgenmesi ve diğer oksijen türlerinin oluşumu (İşbilir, 2008)

Biyolojik sistemlerde sıklıkla oluşabilen serbest oksijen radikalleri ise Tablo 2.1.'de verilmektedir

Tablo 2.1.Serbest radikal ve radikali üreten tür (Winston, 1991)

ADI	SİMGESİ	KİMLİĞİ
Hidrojen Radikali	H^{\bullet}	Bilinen en basit radikal
Süperoksit Radikali	O_2^{\bullet}	Oksijen metabolizmasının ilk ara ürünü
Hidroksil Radikali	OH^{\bullet}	En toksik (reaktif)oksijen metaboliti radikali
Hidrojen Peroksit	H_2O_2	Reaktivitesi çok düşük, moleküler hasar yeteneği zayıf
Singlet Oksijen	1O_2	Yarılma ömrü kısa, güçlü oksidatif form
Peroksil Radikali	ROO^{\bullet}	Perhidroksile oranla daha zayıf etkili, lipitlere lokalize olma yeteneği
Perhidroksil Radikali	H_2O^{\bullet}	Lipitlerle hızlı çözünerek lipit peroksidasyonunu artırmaktadır.
Triklorimetil Radikali	CCl_3	Karaciğerde üretilen bir radikal
Tiyil Radikali	RS^{\bullet}	Sülfürlü ve çiftleşmemiş elektron içeren türlerin genel adı
Alkoksil Radikali	RO^{\bullet}	Organik peroksitlerin yıkımı ile üretilen metabolit
Azot monoksit	NO^{\bullet}	L-argininden in vivo üretilir.
Azot dioksit	NO_2	NO 'in oksijen ile reaksiyonundan üretilir.

Reaktif oksijen türleri, çeşitli serbest radikallerin oluştuğu serbest radikal zincir reaksiyonlarını başlatabilirler ve hücrede karbon merkezli organik radikaller (R^{\bullet}), peroksit radikalleri (ROO^{\bullet}), alkoksil radikalleri (RO^{\bullet}), tiyil radikalleri (RS^{\bullet}), sülfenil radikalleri (RSO^{\bullet}), tiyil peroksit radikalleri (RSO_2^{\bullet}) gibi çeşitli serbest radikallerin oluşumuna neden olurlar (URL 2). Bununla birlikte bir serbest radikal, radikal olmayan bir madde ile reaksiyona girerek yeni bir radikal oluşturabilir. Biyolojik moleküllerin büyük bir kısmı radikal olmadığı için, *invivo* şartlarda reaktif bir radikalin oluşumu, genellikle zincir reaksiyonunun başlamasına yol açabilir (El ve Karakaya, 2006).

2.2.1.1. Süperoksit radikali

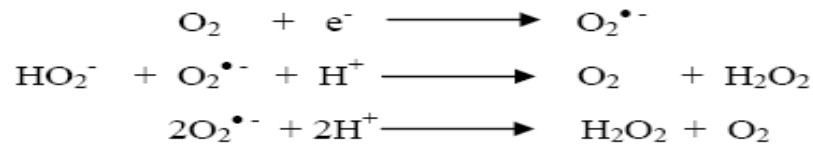
Süperoksit (O_2^-), moleküler oksijenin bir elektron alarak indirgenmesiyle meydana gelen radikal olup, daha çok $O_2^{\bullet-}$ veya O_2^- anyonu şeklinde gösterilir. Süperoksit radikali aerobik hücrelerde oldukça sık oluşur. Fakat daha çok elektron transfer sistemlerinde meydana gelir. Bunun yanında pek çok enzimatik ve enzimatik olmayan yollarla da meydana gelebilir (Halliwell vd., 1992). Süperoksit radikali, diğer radikallere nazaran daha az toksik etkiye sahiptir ve yüklü olduğu için hücre membranından doğrudan geçemez. Ancak eritrosit membranlarındaki anyon kanalından geçebilir.

Başlıca şu yollarla üretilmektedir:

1. Katekolaminler, hidrokinonlar, redükte flavinler, tiyoller, tetrahidrofolatlar gibi biyolojik moleküllerin aerobik ortamda otooksidasyonu sonucu süperoksit oluşur.
2. Aktive olmuş fagositik hücreler (nötrofiller, monositler, makrofajlar, eozinofiller), virüs veya bakteriyi in aktive etmek için bol miktarda süperoksit üretirler.
3. Mitokondriyal enerji metabolizması sırasında oluşan elektron sızıntısı sonucu kullanılan oksijenin % 1-3'ü süperoksit radikali yapımı ile sonlanır.
4. İndirgenmiş geçiş metallerinin otooksidasyonu süperoksidi meydana getirebilir (İşbilir, 2008).

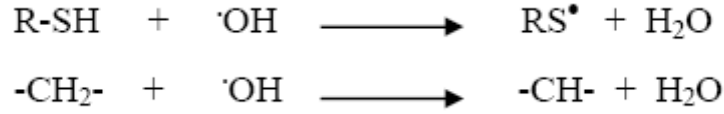
2.2.1.2. Hidrojen peroksit

Hidrojen peroksit, moleküler oksijenin iki ya da süperoksitin bir elektron alması sonucu oluşur. Biyolojik sistemlerde ise genellikle süperoksit radikalinden oluşur.



2.2.1.3. Hidrojen radikali

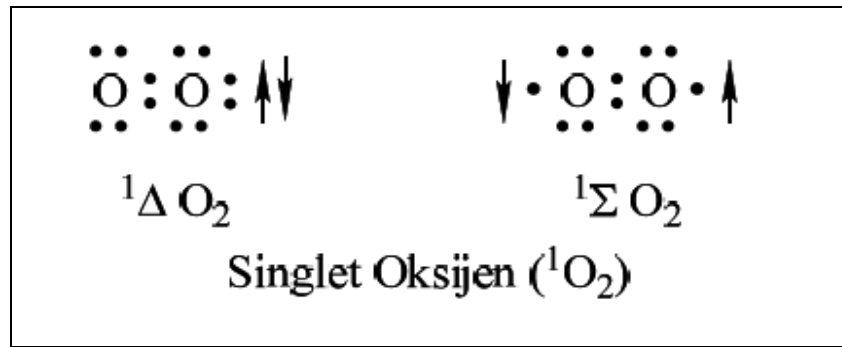
Organizmada oluşan en reaktif ve hasar verici serbest radikaldır ve hidrojen peroksit tarafından oluşturulur. Ayrıca suyun yüksek enerjili iyonize radyasyona maruz kalması sonucunda oluşur (URL 2). Oluştığı yerde hemen reaksiyona girdiği için hücresel elemanlara büyük zarar verir.



Hemen hemen tüm makromoleküllerle reaksiyon verebilir.

2.2.1.4. Singlet oksijen

Moleküler oksijenin elektronlarından birinin enerji alarak kendi spininin ters yönünde olan başka bir orbitale yer değiştirmesiyle singlet oksijen oluşur. Singlet oksijen ortaklanmamış elektronu olmadığı için radikal değildir. Oksijenin ortaklanmamış elektronları paralel spinli olduğundan oksijendeki spin kısıtlaması singlet oksijende yoktur ve oldukça reaktif bir oksijen bileşimidir (URL2).



Şekil 2.3.1 Singlet oksijen (URL 2)

2.2.1.5. Hipoklorik asit

Hipoklorik asit dokularda hasara yol açan çok güçlü bir oksidandır. Bu yüzden radikal olmadığı halde reaktif oksijen türleri arasında yer almaktadır. Fagositik hücreler tarafından bakterileri öldürmek amacıyla üretilir (Murray vd. ,1996).

2.2.1.6. Nitrik oksit

Nitrik oksit hücresel patofizyolojide çok önemli bir role sahip, suda çözünebilen bir serbest radikal gazıdır. Damar genişletici mesajı endotelyumdan düz kasa taşıyan bir enerji aktarıcısı olarak, santral ve periferel sinirsel aktarımda ve bağışıklıkta aktif rol alır, parazitlerin öldürülmesinde kullanılır (Akagün, 2009).

2.2.3. Serbest radikallerin metabolizmaya etkileri

Serbest radikallerdeki aşırı yüklenme vücut için tehlike oluşturur. Ancak vücudun işlevlerini görebilmesi ve hastalıklardan korunabilmesi için de gereklidirler. Serbest radikaller vücudun hastalıklara karşı direncini vücudu saran organizmaları yok ederek arttırır. Buna karşın fazla üretildiğinde vücuttaki bazı yerlere de hasara neden olarak hastalıklara yol açar. Serbest radikaller hücrelerde proteinlere, lipitlere, karbonhidratlara, enzimlere, nükleik asitler ve DNA üzerinde önemli etkileri vardır.

2.2.3.1. DNA üzerindeki etkileri

İyonize edici radyasyonla oluşan serbest radikaller DNA'yı etkileyerek hücrede mutasyona ve ölüme yol açarlar. Hidroksil radikali (OH•) deoksiriboz ve bazlarla kolayca reaksiyona girer ve değişikliklere yol açar. Aktive olmuş nötrofillerden kaynaklanan hidrojen peroksit (H₂O₂) membranlardan kolayca geçerek ve hücre çekirdeğine ulaşarak DNA hasarına, hücre disfonksiyonuna ve hatta hücre ölümüne yol açabilir. Sonuçta mutasyonlar, translasyonel hatalar hatta protein sentezi inhibisyonu ortaya çıkar (URL 2).

2.2.3.2. Proteinler üzerindeki etkileri

Proteinlerin karbonil türevleri ve oksidasyon ürünleri amino asit yan zincirlerinin modifikasyonuna sebebiyet verebilir. Proteindeki karbonil guruplarının çoğalması serbest radikallerin açık hedefi olur. Peptit bağlarını koparabilir. Hücre membranındaki proteinleri yıkararak hücrenin ölümüne sebep olabilir. Enzimler de protein yapısında oldukları için fonksiyonlarını bozabilir. Örneğin hücredeki iyon transportunu bozarak hücrenin iyon dengesini bozabilir (Loeckie, 1999).

2.2.3.3. Lipitler üzerine etkileri

Lipidler serbest radikallerin etkilerine karşı en hassas olan biyomoleküllerdir. Hücre membranlarındaki kolesterol ve yağ asitlerinin doymamış bağları, serbest radikallerle kolayca reaksiyona girerek peroksidasyon ürünleri oluştururlar (URL 2). Çoklu doymamış yağ asitlerinin oksidatif yıkımı 'lipit peroksidasyonu' olarak bilinir. Lipit peroksidasyonuna zararı kendi kendine devam ettiren zincir şeklinde ilerlemesinden kaynaklanmaktadır.

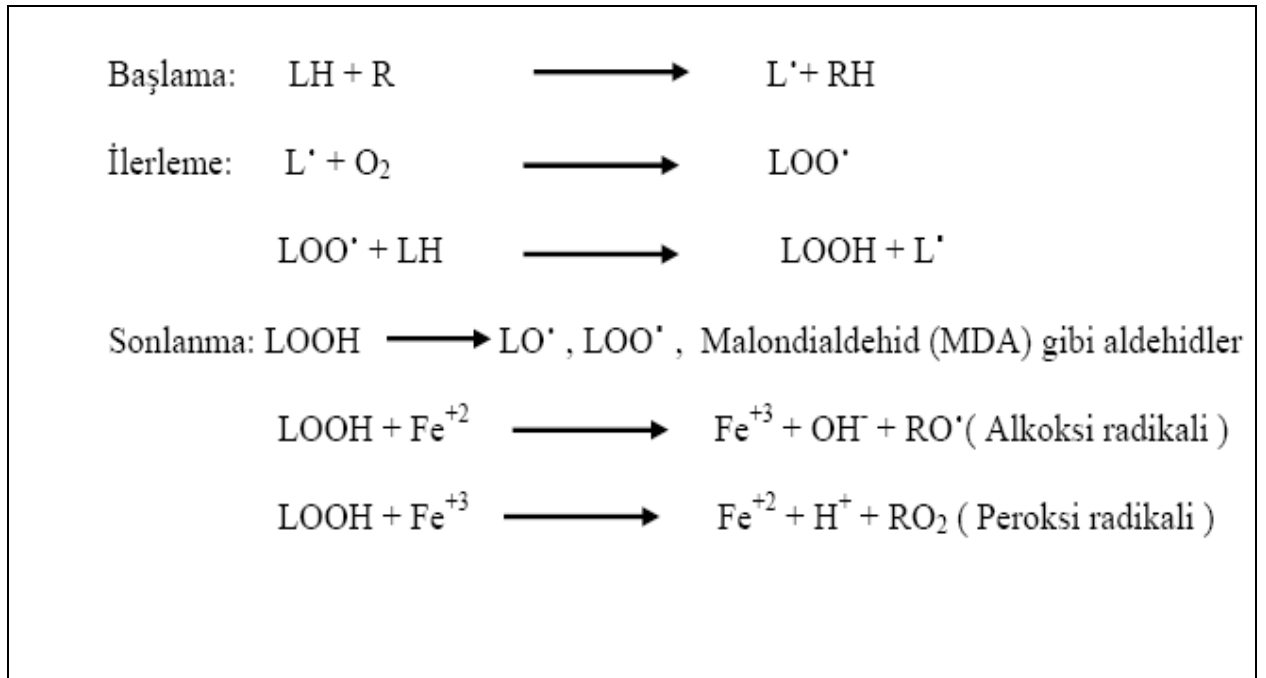
Lipid peroksidasyonu serbest radikaller tarafından başlatılan ve membranda bulunan çoklu doymamış yağ asitlerinin (fosfolipitlerin) oksidasyonunu içeren kimyasal bir olaydır. Çünkü fosfolipitlerin radikallerden hızlıca etkilenebilen, kolay ulaşılan bir hedef durumundadır. Lipitlerde bulunan çoklu doymamış yağ asitlerinin peroksidasyonu radikal zincir reaksiyonuna sebep olur. Lipidlerin peroksidasyonu sonucu karbonil ve alkenler gibi hücrelere zararlı birçok bileşiğin oluşmasına yol açar. Süperoksit radikali, hidroksil radikali, peroksil radikali ve alkoksil radikali lipid peroksidasyonunu başlatan radikallerdir. Demir iyonları lipid peroksidasyonunda önemli rol oynamaktadır.

Serbest radikalın yağ asidinden bir hidrojen atomu koparmasıyla lipit peroksidasyonu başlar. Bir hidrojen kaybeden yağ asidi, lipid radikali niteliği kazanır. Lipit radikali kararsızdır ve bir dizi değişikliğe uğrar. Molekülün kendi içinde bir düzenleme gerçekleşir ve konjuge dienler oluşur. Konjuge dienlerde oksijenle reaksiyona girerek lipit peroksit radikalini oluştururlar. Bu radikaller membran yapısındaki çoklu doymamış yağ asitleriyle etkileşime girerek, yeni lipit

radikallerinin oluşumuna yol açar. Bu sırada kendisi de açığa çıkan hidrojen atomlarını alarak lipid peroksitlerine dönüşür (URL 2).

Reaksiyon, lipid peroksidasyonu sonucu oluşan lipid hidroperoksitlerinin aldehit ve diğer karbonil bileşiklerine dönüşmesi ile sona ermektedir. Bu aldehitler biyolojik olarak çok aktiftirler, ya hücre düzeyinde metabolize edilir yada hücrenin başka bir bölgesinde diffüze olup tahribat yaratırlar.

Lipid peroksidasyonu çok zararlı reaksiyondur. Direkt olarak membran yapısına, reaktif aldehitler üreterek de hücrelere zarar verir. Birçok hastalığa ve doku hasarına sebep olur (Onat ve Emerk, 2002).



Şekil 2.3.2. Lipid peroksidasyonunun temel prensipleri (URL 2)

2.2.3.4. Serbest radikallerin karbonhidratlara etkileri

Serbest radikallerin karbonhidratlara etkisiyle çeşitli ürünler meydana gelir ve bunlar, değişik patolojik süreçlerde önemli rol oynarlar.

Diyabet ve diyabet komplikasyonlarının gelişimi, koroner kalp hastalığı, hipertansiyon, psöriyazis, romatoid arterit, Behçet hastalığı, çeşitli deri ve göz hastalıkları, kanser gibi birçok hastalıkta ve yaşlılıkta serbest radikal üretiminin

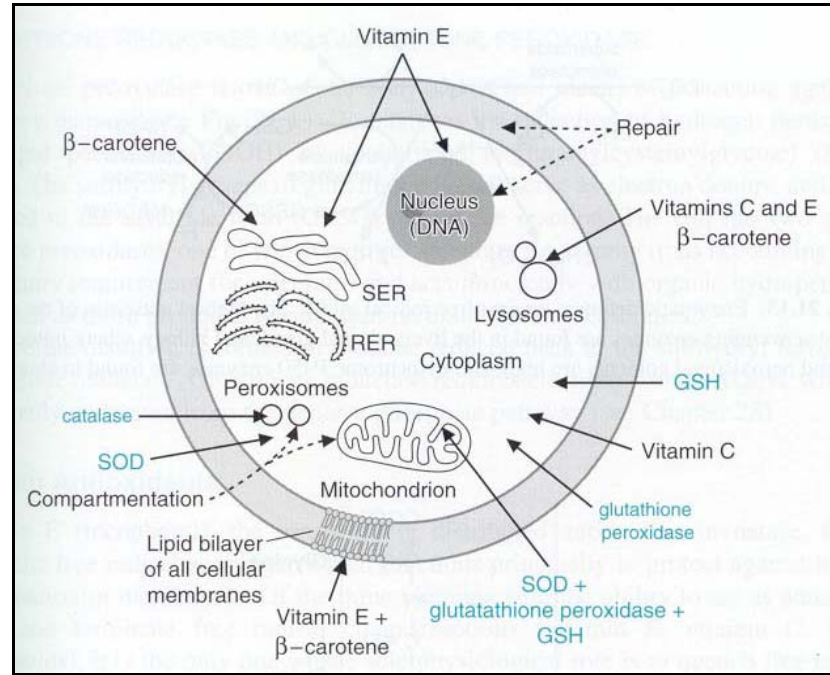
arttığı, antioksidan savunma mekanizmalarının yetersiz olduğu gösterilmiştir. Ancak bu hallerde serbest radikal artışının sebep mi yoksa sonuç mu olduğu tam olarak bilinmemektedir (URL 2).

2.3. Serbest Radikallere Karşı Hücresel Savunma (Antioksidan Savunma Sistemleri, Antioksidanlar)

Reaktif oksijen türlerinin (ROS) oluşumunu ve bunların meydana getirdiği hasarı önlemek için birçok savunma mekanizmaları vardır. Bu mekanizmalar "antioksidan savunma sistemleri" veya kısaca "antioksidanlar" olarak bilinirler.

Antioksidan savunma çeşitli mekanizmalarla etkisini göstermektedir. Bu mekanizmalar:

1. Radikal metabolit üretiminin önlenmesi,
2. Üretilmiş radikallerin temizlenmesi (radikallerin detoksifikasyonu)
3. Hücre deformasyonunun onarılması
4. Sekonder radikal üreten zincir reaksiyonlarının durdurulması
5. Endojen antioksidan kapasitesinin artırır (Akyüz, 2007).

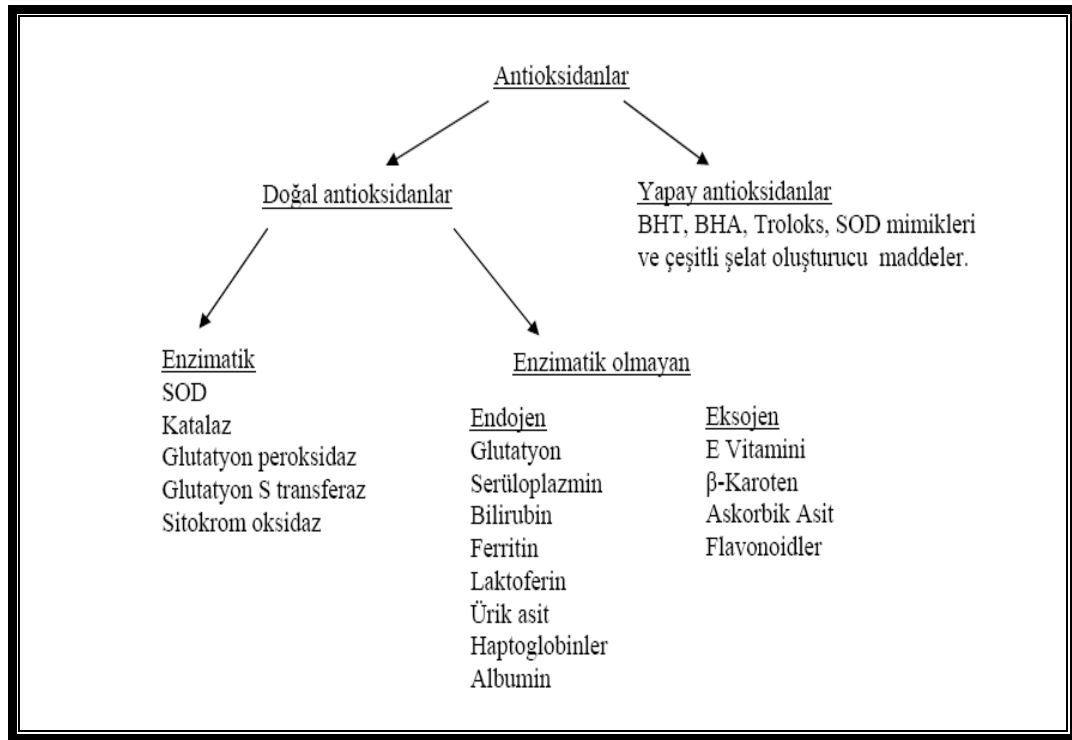


Şekil 2.4. Serbest radikallerin hücresel hedefleri (Onat vd.2002)

Antioksidanlar doğrudan metabolizmada etkin olabildiği gibi beslenme yoluyla da alınabilirler. Bitkiler doğal antioksidan bileşiklerin başlıca kaynağını oluşturmaktadır. Meyve ve sebzeler, baharatlar, bitkisel çaylar ve yağlı tohumların içermiş oldukları antioksidan bileşikleri pek çok çalışmaya konu olmuş ve antioksidan etkilerinin fenolik bileşiklerden ve özellikle flavonoidler yapısından kaynaklandığı gösterilmiştir (Diri, 2006).

Antioksidan moleküller endojen ve eksojen kaynaklı yapılar olup, oluşan oksidan moleküllerin neden olduğu hasarı hem hücre içi hem de hücre dışı savunma ile etkisiz hale getirilirler. Hücre dışı savunma, albümin, bilirubin, transferin, seruloplazmin, ürik asit gibi çeşitli molekülleri içermektedir. Hücre içi serbest radikal toplayıcı enzimler asıl antioksidan savunmayı sağlamaktadır (Halliwell, 1995).

Tablo 2.2. Antioksidanların çeşitleri (Akyüz, 2007)



Organizmada substrat olarak serbest radikal kullanan tek enzim olan süperoksit dismutaz (SOD) süperoksit radikallerinin dismutasyonundan sorumlu, glutatyon peroksidaz (GPx) hücre içinde düşük konsantrasyon da oluşan peroksit ürünlerinin (R_2O_2) dismutasyonundan ve katalaz (KAT) ise yüksek konsantrasyonda oluşan hidrojen peroksidin (H_2O_2) dismutasyonundan sorumlu birer enzimatik antioksidan olup etkinliklerini hücre içinde gösterirler (Halliwell vd., 1992; Mates, 1999).

Glutatyon; aminoasitlerin hücre içine taşınması görevinden başka, çeşitli metabolik fonksiyonları vardır (Onat vd., 2002). Suda çözünen önemli bir antioksidandır. H_2O_2 , disülfidler, askorbat ve serbest radikalleri indirgeyebilir ve böylece hücreleri oksidatif hasara karşı korur. Özellikle eritrosit membranından, lökositleri fagositozda üretilen oksidan maddelerden ve lens proteinlerini oksidatif hasardan korur. Glutatyon, bilirubin, radikal tutucu özelliği ile ürik asit, albümin, bakır iyonlarını bağlayarak metal katalizli reaksiyonları sınırlayan seruloplazmin,

hemoglobin, ferritin birer endojen kaynaklı enzimatik olmayan antioksidanlardır. Ürik asidin plazmada askorbik asidi stabilize etme fonksiyonu direk antioksidan aktivitesinden daha önemli bulunmaktadır (Keaney ve Frei, 1994).

Süperoksit radikali dışındaki diğer bir indirgeyici hücrenel ajan olan askorbik asit (C vitamini), zincir kırıcı antioksidan etki gösteren α - tokoferol (E vitamini), radikal toplayıcı etkisi bulunan β -karoten (vitamin A) ve polifenoller gibi moleküller insan ve hayvan organizmasında sentezlenemeyen bitkiler tarafından sekonder metabolit olarak üretilen maddeler olup radikallerin temizlenmesinde ve zincir reaksiyonlarının durdurulmasında etkili birer antioksidan maddelerdir. Etkinliklerini enzimatik olmayan yolla sürdürürler (Akyüz, 2007).

Süperoksit anyonunun temizlenmesinde en etkili antioksidan süperoksit dismutaz (SOD) enzimi olup glutasyon, flavonoidler ve çeşitli polifenollerde etkin rol oynamaktadır.

Çok sayıda klinik ve epidemiyolojik çalışma bol meyve ve sebze tüketiminin kalp damar bozuklukları, kanser, diyabet gibi kronik hastalıkların gelişme riskini azalttığı Parkinson, Alzheimer ve iltihaplı hastalıkların yanı sıra yaşlanma ile oluşan hücrenel sorunların önlenmesinde etkin rol oynadığını ortaya koymuştur.

Gıdaların korunması ve depolanması sırasında meydana gelen en büyük problemlerden biri lipid oksidasyonu olup; yağlarda acılaşmaya (ransidleşme), yağ içeren diğer gıdalarda ise renk, tat, aroma ve kıvamda bozulmalara ve besinsel kalitenin azalmasına neden olmaktadır. Gıda endüstrisinde lipid oksidasyonu engellemek veya azaltmak, toksik oksidasyon ürünlerinin oluşmasını engellemek, besinsel kaliteyi sürdürmek ve gıdanın raf ömrünü uzatmak amacıyla antioksidan kullanımı gereklidir (Diri, 2006).

Günümüzde BHA (bütillenmiş hidroksianisol), BHT (bütillenmiş hidroksitoluen), PG (propil gallat) ve TBHQ (t- bütül hidrokinon) en çok kullanılan sentetik antioksidanlardır. Ancak sentetik antioksidanlar ve oluşturdukları yan ürünlerin çeşitli hastalıklara yol açabileceğini ortaya koyan çalışmalar vardır. Bu nedenle doğal kaynaklardan, sentetik antioksidanların yerini tutabilecek yeni

antioksidan maddelerin bulunmasına yönelik çalışmalar giderek önem kazanmış ve bu alanda yapılan çalışmalar artmıştır (Ocksook vd., 2007; Kil, vd., 2009).

Sentetik antioksidanların insan sağlığı açısından toksik oluşturduğunun öne sürülmesi üzerine günümüzde tüketici tercihlerini değiştirmiş ve doğal tarımsal ürünlere yönelmiştir. Bu da işlenmiş gıdalarda sağlık, kalite ve güvenlik arayışlarını ön plana çıkarmıştır. Araştırmacılar ve gıda bilimcileri sentetik antioksidanların yerine geçebilecek, doğal antioksidanlar araştırma gayreti içine girmişlerdir. Bu amaçla yeryüzünde geniş dağılım gösteren bitkisel kaynaklara yönelmekte ve bu kaynaklardan elde edilecek doğal antioksidanların gıdaların işlenmesi sırasında sentetik antioksidanlar yerine gıdalara ilave edilmesi hedeflenmektedir (Kelen vd., 2008; Oliveria vd., 2008).

Tablo 2.3. Gıdaları korumada kullanılan bazı sentetik antioksidanlar (Türk Gıda Kodeksi'nin konusuyla ilgili kısmından yararlanılmıştır.)

Antioksidan	Kodu	Kullanıldığı Gıdalar
Askorbik asit tuzları	E300-302	Bebek maması; emülsifiye hayvansal-bitkisel yağlar; reçel, jöle ,marmelat; şarap, süt-süttozu; işlenmiş, dondurulmuş veya konserve ürünler; ekmek, makarna; kıymadan hazırlanan et karışımları; meyve-sebze suları.
Sentetik tokoferoller (alfa-, beta-, gama-)	E307-309	Bebek maması; emülsifiye hayvansal-bitkisel yağlar; reçel, jöle, marmelat; şarap, süt-süttozu; işlenmiş, dondurulmuş veya konserve ürünler; ekmek, makarna; kıymadan hazırlanan et karışımları; rafine zeytinyağı; yağ içeren tahıl, bisküvi, gevrek.
Propil gallat	E310	Isıl işlem görmüş gıdalardaki katı-sıvı yağlar; Katı-sıvı kızartma yağları;
BHA	E320	Balık, sığır, koyun, kanatlı yağları;
BHT	E321	Sakız; tahıl bazlı çerez; hazır kek karışımı;
TBHQ	E319	kurutulmuş patates ve et; süttozu (otomatik makine için); toz çorba ve soslar; çeşni verici maddeler; çeşitli gıda takviyeleri; işlenmiş sert kabuklu meyveler.

2.4. Antioksidan Aktivite Tayin Metotları

Antioksidanlar oksidatif stresle, prooksidanların gıdalarda, çevrede ve organizmada meydana getireceği hasarlarla mücadelede kullanılmaktadırlar. Maddelerin bu amaçla kullanılabilirliğini belirlemek için birçok antioksidan tayin yöntemi geliştirilmiştir.

Ancak her bir değerlendirme farklı oksidasyon şartları altında ve farklı oksidasyon ürünlerini ölçmek için birkaç metot kullanarak yapılmalıdır. Son zamanlarda toplam antioksidan kapasite veya toplam antioksidan aktiviteyi ölçmek için birkaç metot geliştirilmiştir. Bu metotlar substrat, prob, reaksiyon şartları ve antioksidan etkinin hesaplanma şekline göre birbirinden farklıdır (Frankel ve Meyer, 2000).

Bu metotlar kimyasal reaksiyonlarına göre başlıca iki gruba ayrılırlar: Hidrojen atomu transferine (HAT) dayanan metotlar ve bir tek elektron transferine (ET) dayanan metotlar. HAT- ve ET-temelli metotlar örneğin koruyucu antioksidan kapasitesi yerine radikal veya oksidan giderici kapasitesini ölçmeyi hedefler (İşbilir, 2008).

Temel olarak hidrojen atomu transferine dayanan bu metotlara, ilk olarak bir radikal başlatıcı kullanılarak, peroksil radikali üretilir. Reaksiyon ortamındaki antioksidan ve substrat, radikaller için yarışır. Sonuç olarak peroksil radikali ve hedef molekülün arasındaki reaksiyon geciktirilir veya inhibe edilir.

Elektron transferine dayalı metotlar ise antioksidanın, Fe^{+3} , $ABTS^+$ gibi bir oksidan tarafından yükseltgenmesi sonucunda bir elektron antioksidandan oksidana transfer edilir, bu da oksidanın renk değişimine neden olur. UV/VIS ile absorbans değişimi ölçülür. Bu absorbans değişiminin derecesi antioksidan konsantrasyonu ile orantılı olduğundan, antioksidanın indirgeyici kapasitesi tayininde kullanılır. FCR ile toplam fenolik bileşik tayini, Cu^{+2} indirgeme kapasitesi, TEAC ve FRAP metotları bu sınıfa girer (Frankel ve Meyer, 2000).

Tablo 2.4. In vitro koşullarda uygulanan antioksidan aktivite tayin Metodları (İşbilir, 2008)

HAT -temelli metodlar	ET -temelli metodlar	
$ROO\cdot + AH \rightarrow ROOH + A\cdot$ $ROO\cdot + LH \rightarrow ROOH + L\cdot$	$M^n + e^-(AH'den) \rightarrow AH\cdot + M^{(n-1)}$	Diğer metodlar
Oksijen radikali absorblama kapasitesi (ORAC)	Trolox ekivalenti antioksidan kapasite (TEAC)	TiyobarbitürİKasit ile oksidasyon ürünlerinin tayini (TBARS)
Linoleik asit oksidasyonunun inhibisyonunu (TRAP)	Fe (3)iyonu indirgeme gücü	Peroksit değeri (POV)
LDL oksidasyonunun inhibisyonu (TRAP)	DPPH radikali giderme aktivitesi	Ransimat metodu
Crocın ağartma metodu	FCR ile toplam fenolik bileşik tayini	Çeşitli serbest radikalleriyakalama metodları

2.5. Antimikrobiyal Maddeler

Bitkiler yüzyıllardan beri tüm dünyada gıdaların tat ve aromasının artırılmasında gıdalarda istenmeyen kokuların giderilmesinde ve hepsinden önemlisi de tedavi amaçlı olarak kullanılmıştır (Toroğlu vd.,2006). Günümüzde bitkiler ve bitkisel ilaç hammaddeleri tedavide kullanılan ilaçların büyük bir bölümünü oluşturmaktadır (Dağcı ve Dığnak, 2005). Gerek aromatik gerekse tıbbi bitkilerin çeşitli yöntemlerle elde edilen özütlerinin antibakteriyel etkilere sahip oldukları bilinmektedir. M.Ö. 2500 yıllarında bilinçsizce antimikrobik tedavi yöntemleri kullanılmıştır. Bu devirde enfeksiyon hastalıkları tedavisinde kullanılan bitki kökleri, şarap ve küf gibi maddeler olumlu sonuçlar vermiştir (Akyüz, 2007). Bakterilerde gelişen antibiyotik dirençliliğinin önlenmesinde ilaçlara alternatif olarak bitkilerin ve

bitkisel ürünlerin, bazı geleneksel antimikrobiyal olarak kullanılmaları önerilmektedir (Toroğlu vd., 2006). Invitro ortamda yapılmış olan pek çok çalışmada da çeşitli bitkilerden elde edilmiş özütlerin antibakteriyel aktiviteye sahip oldukları gösterilmiştir (Esen, 2008).

Bitkiler antimikrobiyal aktivite göstermelerinin yanı sıra sitotoksik kapasiteye de sahip olabilmektedirler. Kıvak ve arkadaşları tarafından yapılan bir çalışmada *Ceratonia ciliqua* bitkisinden elde edilen metanol ve su özütlerinin hem antimikrobiyal hem de sitotoksik aktivite gösterdiği bildirilmiştir. Türkiye’de yetişen bazı tıbbi bitkilerden ve bu bitkilerin doku kùltürlerinden elde edilen özütler ile yapılan bir araştırmada ise, *Ecbalium elaterium* bitkisinin hücre kùltüründen elde edilen özütün sitotoksik aktivite gösterdiği belirtilmiştir (Erecevit, 2007).

1854-1915 yılları arasında Paul Ehrlich, bir arsenik bileşiği olan arsfenamin ile sifilizi, tripan kırmızısı boyası ile Afrika uyku hastalığını tedavi etmeyi başarmıştır. 1927 yıllarında Almanya’da kimya endüstrisi alanında alışan Gerhard Domagk ve ekibi, çeşitli boyaaların patojen bakterilere etkinliğini ve hayvanlardaki toksik etkisini araştırmışlardır. Bu araştırma sırasında, deri boyamada kullanılan prontosil kırmızısı adlı boyanın hayvanlara toksik olmadığını, stafilokok ve streptokoklara etkili olduğunu saptamışlardır ve bu bulgunun 1935 yılında yayınlanmasından bir yıl sonra prontosil kırmızısının vücutta sülfanilamide dönüştüğü ve antibakteriyel aktiviteyi bu maddenin sağladığı anlaşılmıştır.

1929 yılında S. Alexander Fleming tarafından bulunan ve bu yıllarda toksik etkileri nedeniyle kullanım alanına giremeyen penisilin 1940 yılında kullanılır hale Ernest Chain ve Howard Florey tarafından getirilmiştir. Penisilin 2. Dünya Savaşı’nda yara enfeksiyonlu birçok askerin hayatını kurtarmıştır. Son yıllarda antibakteriyel etki alanı daha genişlemiş ve toksik etkisi az olan birçok antibiyotik ve kematerapötik üretilmiştir (Akyüz, 2007).

2.6. Antimikrobiyal Maddelerin Genel Özellikleri

Antimikrobiyal maddede olması gereken en önemli özellik seçici toksisitedir. Kemoterapide kullanılan antimikrobiyal madde düşük konsantrasyonlarda bile etkili olup çok az toksik olmalıdır. Böyle bir etkinin ortaya çıkabilmesi için antimikrobiyal maddenin hedef olarak memeli hücrelerinden çok mikroorganizmalar seçilmelisi gerekmektedir. Bakteriler prokaryot, memeli hücreler ökaryottur. Prokaryot hücrede var olan, ancak ökaryot hücrede bulunmayan bir molekülü hedefleyen antimikrobiyal maddeler (örneğin; sefalosporinler, sülfonamidler) yüksek derecede seçici toksisiteye sahiptir.

Antimikrobiyal maddeler etkili olabildikleri mikroorganizma cins sayısının az ya da çok oluşuna bağlı olarak, dar ya da geniş spektrumlu şeklinde tanımlanır. En dar spektrumlu maddeler enfeksiyona neden olan mikroorganizma üzerine etkili ve tedavide ideal antimikrobiyal maddeler olarak kabul edilir. Geniş spektrumlu antimikrobiyal maddeler konağın doğal bağışıklığında önemli rol oynayan ve ekolojik dengeyi sağlayan normal mikroorganizma florasını bozar. Fakat birçok patojenin birlikte etken olduğu enfeksiyonlarda ya da mikrobiyoloji laboratuvarı sonuçlarının beklenemeyeceği acil durumlarda geniş spektrumlu antimikrobiyal maddeler (karbapenemler, kinolonlar...) kullanılır.

Bazı bakteri ve mantar türleri tarafından oluşturulan, mikrobisid veya mikrobiyostatik etki gösteren maddelere antibiyotik denir. Mikrobisid madde mikroorganizmaları öldürücü, mikrobiyostatik madde ise mikroorganizmaların üremesini durdurucu etki gösterirler. Antibiyotiklerle benzer özelliklere sahip olan, tümüyle sentetik (kimyasal yolla sentez edilen) olan maddelere de kemoterapötik denir (Akyüz, 2007; Öztürk, 2009).

2.6.1. Antibakteriyel maddenin sınıflandırılması

Antibakteriyel maddeler bakteriler üzerine beş farklı yoldan etki eder:

1-) Hücre duvarı sentezinin inhibisyonu

- Beta-laktam antibiyotikler, penisilinler, glikopeptid antibiyotikler
- 2-) Sitoplâzma zarının fonksiyon ve yapısının bozulması
- Polimksinler
- 3-) Protein sentezinin inhibisyonu
- Amino glikozitler, tetrasiklinler, cloroamfenikol, mikrolit antibiyotikler
- 4-) Nükleik asit sentez ve fonksiyonlarının bozulması
- Kinonlar, rifamisin, nitrofurantoin
- 5-) Kimyasal yapılardaki benzerlik yolu ile metabolizmanın bozulması
- Sülfonamidler (Akyüz, 2007)

2.7. Antimikrobiyal Aktivite Tayin Metotları

Mikroorganizmalar antibiyotiklere karşı çok değişik şekilde duyarlılık gösterirler. Bu durum, hem antibiyotiklerin yapısına ve hem de mikroorganizmaların türüne göre değişebilir. Bu bakımdan gerek koruyucu amaçla ve gerekse en önemlisi sağaltım için kullanılacak antimikrobiyal ilaçların spesifik hastalık etkenine karşı olan statik ve/veya sidal etkisinin çok iyi belirlenmesi ve böyle bir ilacın seçilerek yeterli sürede ve dozda bir program dâhilinde kullanılması gereklidir. Hatta bazen bu da yeterli olmayabilir. Bazen de, enfeksiyonlardan primer etken yerine sekonder mikroorganizmalar izole edilmektedir. Böyle hallerde, hastalığın esas etkenine karşı değil de sekonder ajanın duyarlılığına göre seçilmiş antibiyotikler kullanılmaktadır. Bunların da bir yararı olmamaktadır.

Mikroorganizmaların antibiyotiklere duyarlılığın saptanmasında başlıca 2 temel yöntem vardır (Günay, 2002).

1. Dilüsyon Yöntemi

2. Difüzyon Yöntemi

2.7.1. Dilüsyon yöntemi

Dilüsyon teknikleri bir organizmanın antibiyotiklere duyarlılığı tayin etmek için geliştirilmiştir. Antibiyotiklerin sıvı veya katı (agarda dilüsyon) besiyerlerinde bir seri halinde seyreltilmesi ve her bir seyreltme ortamına, duyarlılığı belirlenecek bakterinin belirli sayıda hücre içeren süspansiyonundan eşit miktarda ilave edilmesidir. Deney serileri uygun sıcaklıkta (35-37 °C'de) ve bakterinin üremesi için uygun süre (16-20 saat) bekletildikten sonra sonuçlar ile bakterinin üremesini durduran en az antibiyotik miktarı (minimum inhibisyon konsantrasyonu (MIK) belirlenir. Antimikrobiyal maddenin kullanılan organizmaya karşı hangi konsantrasyonda etkili olduğu üremenin varlığına ya da yokluğuna göre belirlenmektedir. Antimikrobiyal madde konsantrasyonunun, inhibitör konsantrasyonunun altında olduğu tüplerde süspansiyon bulanıktır. Antimikrobiyal madde konsantrasyonu, inhibitör konsantrasyonuna eşit ya da yüksek olduğu tüpler ise süspansiyon berraktır (İşcan, 2002, Öztürk, 2009). Bir mikroorganizmanın gelişmesini en az düzeyde engelleyecek konsantrasyona MIK (Minimum İnhibitör Konsantrasyonu) denilir (URL 4).

2.7.2 Difüzyon Yöntemi

Test materyalin agarda diffuze olmasına ve diffuze olduğu mesafe kadar test mikroorganizmalarını inhibe etme esasına dayanır (URL 3). Bu yöntemin birbirinin yerine geçebilir tarzda kullanılan disk difüzyon ve çukur agar difüzyon yöntemleri olarak adlandırılan iki alt grubu vardır. Bu iki yöntem arasındaki tek fark çukur agar testin değerlendirilecek olan madde agar üzerinde açılan standart çukurlara yerleştirilirken, disk difüzyonda emdirildikleri kâğıt diskle birlikte agar yüzeyine yerleştirilirler.

Antibiyotikler genellikle kâğıt disklere belli konsantrasyonda emdirilir ve bunlar antibiyotik kaynağı olarak kullanılır. Bu yöntem Kirby-Bauer yöntemi olarak da adlandırılır (Yiğit vd., 2009).

Disk difüzyon yönteminde; belirli bir miktar antimikrobiyal ajan kâğıt diskler test mikroorganizmasından hazırlanan standart süspansiyonun yayıldığı agar plakların yüzeyine yerleştirilir. Böylece disk teki antimikrobiyal madde besiyeri içerisine yayılır ve bakteriye etkili olduğu düzeylerde üremeyi engeller. Bunun sonucunda, disk çevresinde bakterilerin üremediği dairesel bir zon alanı oluşur. Değerlendirme disk etrafında oluşan ürememe alanının çapının mm olarak ölçülmesi ile yapılır (URL 3).

2.8. Anacardiaceae

Kısa saplı, tam kenarlı, geniş yumurtamsı bir biçimdeki üçlü pinnat şekilde yapısı vardır. Lamina boşlukları çukurumsu bazis kısmına doğru gittikçe daralan bir yaprak tipi mevcuttur. Sürgüne almaşlı dizilmişlerdir.

Kök kısmında mantar kambriyumu genellikle yüzeysel bir biçimde olmaktadır. Reçine ya da lâteksle dolu bol salgı doku bulunmaktadır.

Tek ya da çok evcikli olup saplı, izomorf simetridir. Çiçeklenme düzeni 5 kısımlı bileşik salkım panikuladır (Siklik, tetrasiklik, pentasiklik).

Kaliks ve korolla bulunmak üzere olup korolla 3-5 bileşik çok petalli, tüpsüdür (alt kısımda daralmış, yukarı doğru çan şeklini alan). Ovaryum alt durumlu, 1-5 lokusludur. Meyve drupa tipi etli meyvedir. Tohum endospermiktir.

Anacardiaceae, çiçekli bitkilerin sumak ailesinden Sapindales takımı içinde olan, yapraklarını döken ya da dökmeyen 70 cins ve 650 türe sahip çalı ya da odunsu türden sarmaşıklar şeklinde bulunan bir familyadır. Dünya'nın tropikal yada

suptropikal bölgelerine has bir bitki familyası olup ılıman bölgelerde de az miktarda bulunur.

Antep fıstığı (*Pistacia vera*) ve kaju (*Anacardium occidentale*) ve mango (*Mangifera indica*), mombin (*Spondias*), yabani erik (*Harpephyllum caffrum*) bu familyaya örnek bitkilerdir. Ayrıca sakız ağacı (*Pistacia lentiscus*), vernik ağacı (*Rhus vernicifera*), Quebracho ağaçları (cins *Schinopsis*, özellikle *S. lorentzii*) ticari amaçla kullanılan bitkilerdir.

Ayrıca birkaç tür kırmızımsı kahve rengine sahip olan Perulu biber ağacı (*Schinus molle*), Cotinus türleri ve (*Rhus*) ahşap süs bitkisi olarak yetiştirilmektedir (URL 6; URL 7).

2.8.1. *Cotinus coggygria*

Cotinus angiospermlerin Anacardiaceae familyasına ait küçük bir gruptur

1. *Cotinus coggygria* Scop. (Avrasya duman ağacı)

2 *Cotinus obovatus* Raf. (Amerikan duman ağacı)

Cotinus cinsi Avrupa'nın güneyinde, Himalayalar, Güneybatı Çin ve Güneybatı Amerika da genişçe bir şekilde yer kaplamaktadır (Novaković vd., 2007). Duman ağacı önceleri dekoratif süs amaçlı kullanılmaktadır. Daha sonra ise Amerika da bu ağaçlardan elde edilen tahtalar dayanıklı çitlerin yapımında ve sivil savaş zamanları sarı renk boyanın eldesinde kullanıldı. Amerikan duman ağaçları küçük çalılar olup genişçe yer kaplarlar. Yaprakları yuvarlak, rengi mavimsiyah yeşil gittikçe parlak sarı, turuncu, kırmızı ve mora dönüşen bitkilerdir. *Cotinus obovatus* Raf. gövdesi gri kahve karışımı renkte olup küçük sağlam yapıdadır (Pijut, 2008).

Türkiye'de *Cotinus coggygria* bitkisine, duman ağacı, boyacı sumağı, peluke çalısı gibi isimler verilirken Balkanlarda yöresel olarak "rujevina" veya "ruj" diye de isimlendirilmektedir. Sonbahar da yapraklarının kırmızı rengini almasından ötürü böyle adlandırılır (Novaković vd., 2007). 4 m kadar boylanabilen, 3 m kadar yayılma

alanı gösterebilen, sık dallı, dik duran, yuvarlak tepeli ağaççık ya da çalı topluluğudur (URL 8).

Farklı pH değerine uyum sağladığından dolayı her çeşit toprak ve arazilerde genişçe yayılabilmektedir. Yaprakları pinnat tipidir. İlkbaharda yeşil renkteyken yaz sonuna doğru kırmızıya döner. Çiçekleri ise küçük pamuk gibi olup gösterişsizdir. Çiçeklenmenin ardından pediküller ve pediseller uzamasıyla tıpkı bir saç görünümünü alır adı burdan gelmektedir.

C. coggyria farklı ülkelerde yaprakları antiseptik, antiinflamatuvar, antimikrobiyal, antihemamorfik ya da yara iyileştirici olarak kullanılır (Matić vd., 2009)

Çiçeklenme zamanı: Haziran-Temmuz

Meyve tipi: Sulu, ağsı,3.6 mm genişliğinde drupa tipi, rengi kırmızı-kahve olup olgunlaşınca siyah içi çekirdekli

Hasat zamanı: Ağustos-Eylül

Yetiştirme ortamı: Genel olarak kalkerli tortul kayalıklarda, karaçam ve gürgen ağaçlarının bulunduğu ormanlarda

Fitocoğrafik bölgesi: Avrupa'nın güneyinde, Akdeniz de, Moldova, Kafkaslar, Çin'in merkez bölgesi, Himalayalar ve Balkanlar (Novaković vd., 2007)



Şekil 2.8.1. *Cotinus coggygia* 'nin dünyadaki dağılışı (URL 9)



Şekil 2.8.2. *Cotinus coggygia* yaprakları (URL 10)

3. MATERYAL VE METOD

3.1. Materyal

3.1.1. Bitkisel Materyal

Deneylerde kullanılan tetra (*Cotinus coggygia*) bitkisi 2010 yılı Temmuz ayında Kırklareli'nin Saray ilçesinin Kızılağaç köyü Pabuçdere mevki yakınlarından toplandı. Yrd. Doç.Dr. Necmettin Güler tarafından teşhis edildi. Temin edilen örneklerin yaprakları ayıklandıktan sonra oda koşullarında ve gölgede kurutuldu. Analizlerde kullanılmak üzere renkli kavanozlarda muhafaza edildi.

3.1.2. Test bakterileri

Bu araştırmada 6 standart bakteri suşu ve bir tane de klinik bakteri kullanıldı. Kullanılan standart bakteri suşları Trakya Üniversitesi Tıp Fakültesi Mikrobiyoloji Laboratuvarından ve Kırıkkale Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü Mikrobiyoloji Araştırma Laboratuvarındaki kültür koleksiyonundan alınmıştır. Klinik bakteri ise Trakya Üniversitesi Tıp Fakültesindeki bir hastadan alınan örnek üzerinden temin edilmiştir. Kullanılan bakteriler ve kodları Tablo 2.5. verilmiştir. Test edilen her bakteri türünün hassasiyetini belirlemek ve kullanılan yöntemin kontrolü için Oflaxacin, Ampicilin ve Cloroamfenikol standart antibiyotik diskleri kullanıldı.

Tablo 2.5. Kullanılan bakteriler ve kodları

Bakteri Adı	Bakteri kodu
<i>Escherichia coli</i>	ATCC25922
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	ATCC700603
<i>Staphylococcus aureus</i>	ATCC29213
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	ATCC27853
<i>Enterococcus faecialis</i>	KLİNİK
<i>Candida albicans</i>	ATCC60193
<i>Candida crusei</i>	6258

Pseudomonas aeruginosa: Katalaz (+), insan patojeni, gram (-), sitrat (+), metil kırmızısı (-), Voges Proskauer (-), aerobik, polar flagellası (0.5*1.5-3 mikron boyutlarında) ile hareket edebilen çubuk şekilli bakterilerdir. Polar konumlu flagellaları ile hareketlidirler. Ekseriya tek hücreler halinde görünürler, fakat bazen üreme esnasında birkaç hücre bitişik kalarak kısa zincirler teşkil ettikleri görülür (Şen, 2006). Bakterinin çevresinde ekstraselüler polisakkarit yapıda bir tabaka bulunur. Fermantasyon yapmaz, glukozu okside edebilir. *Pseudomonas aeruginosa* aeroptur, üremesi için 30 - 37°C en uygun olmakla beraber 42°C de bile çoğalır, adi besiyerlerinde ürer. Ürerken birçok organik maddeden yararlanır. Bu bakterinin en sık görülen kolonileri büyük saydam ve kenarları düzensizdir, mavi-yeşil bir boya yapabilir (Brock, 1994).

Pseudomonas cinsi ısıya dirençsizdirler. 55°C'de 1 saat ve 60°C'de 15 dakikada ölürlür. Çevre ısısı koşullarında aylarca canlı kalabilirler. *P. aeruginosa* vejetatif bakteriler içinde, çevre koşullarına kendini en iyi uydurabilen bakterilerdir. Yeterli nem sağlandığında, çok az besin maddesiyle, uzun süre canlı kalabilir.

Pseudomonas cinsi bakteriler doğada yaygın olarak bulunmakta, fırsatçı enfeksiyonlar ve hastane enfeksiyonlarına yol açmaktadır. *P. aeruginosa* hastane enfeksiyonu etkenleri içinde ilk sıralarda yer almakta, çeşitli antibiyotiklere direnç geliştirebilmekte ve oluşturduğu enfeksiyonlara bağlı yüksek mortalite ve morbiditeye neden olmaktadır. Hastane enfeksiyonlarının % 10-25'inden *P. aeruginosa* sorumlu tutulmaktadır Hastane ortamında solunum cihazları, duşlar, banyolar, fosekler, soğuk su nemlendiricileri, yataklar, çarşafklar, gazlı bezler, tamponlar, yerler gibi çok sayıda alandan izole edilebilirler. Dezenfektan olarak kullanılan kimyasal maddelere çok dirençlidir, dördü amonyum bileşikleri, heksaklorofenli sabunlar ve iyotlu solüsyonlar içinde bile üreyebilirler. *P. aeruginosa* genellikle çoklu antibiyotik direnci gösterebildiğinden tedavilerde de sorunlara neden olmaktadır. Bu nedenle kullanımda olan antibiyotiklere karşı duyarlılığın izlenmesi gerekmektedir (Gül vd., 2004; Turan, 2007).

Staphylococcus aureus: Küçük, yuvarlak, oval şekilli gram pozitif (+) koklardır. Kamçısız, hareketsiz, sporsuz ve kapsülsüz mikroorganizmalardır. 37°C’de aerob ya da fakültatif anaerob ortamlarda kolayca üretilebilirler. Sıvı besi yerlerinde değişik derecelerde bulanıklık oluşturarak ürerler. Katı besi yerlerinden kanlı agarda ise patojenik olan türleri hemoliz olarak ürerler. Fakültatif anaerob bakterilerdir. Doğada oldukça yaygındır; tozda, toprakta, eşya üzerinde, insan ve hayvan, deri, burun mukozası, ağız ve nazofarink florasında bulunur. Stafilokoklar insanlar ve diğer hayvanlarda toksin üretmek veya işgal etme yoluyla geniş bir çeşitlilikte hastalıklara yol açabilirler. Stafilokok toksinleri gıda zehirlenmesi durumlarında ana etkindir. Bakteri uygun olmayan şartlarda saklanan yiyeceklerde ürer. Pişirme süreci onları öldürse de, enterotoksinler ısıya dayanıklıdır ve dakikalarca kaynamaya bile dayanabilirler. Stafilokoklar daha çok su içeriği az olan peynir ve salam, sucuk gibi gıdalarda ürerler.

S. aureus insanlarda menenjit, septisemi ve yara iltihaplarına ve önemli ölçüde gıda zehirlenmelerine neden olur. Çoğu *S. aureus* penisiline karşı dirençli olmakla, ancak Vancomisin ve Nafsilin türü antibiyotikler etkili olabilmektedir (URL 11).

Klebsiella pneumoniae: Kısa, uçları yuvarlak, 1-2 mikrometre boy ve 0.5-0.8 mikrometre eninde hareketsiz, sporsuz, gram negatif (-) basillerdir. Uç uca ikişer ikişer kısa zincirler halinde veya tek tek bulunurlar. Çevrelerinde ise polisakkarit yapısında bir kapsül bulunur. Kapsül, sadece hastalık evresinde görülebilir, serumda normal şartlarda görünmez. *K. pneumoniae* aerob ve fakültatif anaerob özellik gösterebilen, 37° C ve pH 7’de en iyi üreyen bakteridir.

Doğada yaygın olarak bulunan bu bakteri; kuruluğa dirençli, sıcaklığa dayanıksızdır. *K. pneumoniae* bakterileri, oda sıcaklığında haftalarca ve 4°C’de aylarca canlı kalabilirler. Memelilerde üst solunum yolu ve dışkı florasında bulunan bir bakteri olduğu için patojenliği uygunsuz koşullarda fırsatçı patojen olarak açığa çıkar. Klebsiella özellikle 2 yaş altı ve 40 yaş üstü kişilerde vücut direncinin kırılması, virutik üst solunum yolu enfeksiyonları sırasında pnömonilere neden olur (URL 3).

Escherichia coli: Gram (-) olup 2-6 µm boyunda ve 1.0 -1.5 µm eninde düz, uçları yuvarlak çomakçıklardır. Genellikle etraflarının da bulunan kirpikleri aracılığı ile hareketli olmakla beraber hareketleri yavaştır. Hatta hareketsiz görülebilirler. Spor oluşturmazlar. Fakültatif anaerob olup optimal pH 7-7.2, optimal üreme ısısı 37°C'dir. Isıya fazla dayanıklı değildir. 55°C'ye 1 saat, 60°C'ye 20 dakika dayanıklıdır. İnsan ve sıcakkanlı hayvanların kalın bağırsağında yasar. Soğuğa karşı dirençli fakat dezenfektanlara karşı dirençsizdir. Bakteriden bakteriye kolayca geçebilen ve direnç plazmitleri taşıdıklarından dolayı duyarlı oldukları kemoterapötiklere karşı direnç kazanabilmektedirler. Aslında normal bağırsak florasında bulunup, burada denge altında kaldığı sürece hastalık yapmaz. Ancak belirli koşullar altında bağırsak kanalı dışına bile çıkıp diğer dokulara yerleşerek enfeksiyonlar meydana getirirler (Ereçevit, 2007).

Bağırsak florasının normal bir üyesi olan *E. coli* ile konak organizma arasında uyumlu bir ilişki olduğundan bakteri normalde hastalık yapmaz. Ancak, ortama geçmesi halinde ki bu aynı organizmada başka bir organ olabilir (idrar yolu enfeksiyonu ile mesaneye geçmek gibi) veya başka bir konak organizmanın bağırsağı olabilir, *E. coli* bir hastalık etmeni olabilir. Bazı *E. coli* tipleri içinde buldukları hayvan için zararsız olmalarına rağmen insana geçtiklerinde hastalık yapabilirler. Bu hastalıklar arasında başlıca ishalli hastalıklar olmakla beraber idrar yolu enfeksiyonları, menenjit, peritonit, mastit, sepsis ve gram-negatif pnömonide sayılabilir. *E. coli* 'nin, tavuk, dana ve başka hayvanlarda da hastalık yapabildiği gösterilmiştir (URL 11).

Enterococcus faecalis: Tek tek, çiftler, zincirler halinde bulunan, gram pozitif (+), aerob hareketsiz koklardır. Ekzotoksinleri yoktur. Enterokokların antibiyotiklere rezistans özellikleri vardır. Tedavi sürecinde antibiyotik olarak Vancomisin + Aminoglikozid verilmelidir. Gastrointestinal sistemdeki normal florada bulunur. Kan dolaşımına karışarak enfeksiyonlara neden olur. Bulaşma yolu genellikle hastanelerde eksojen olarak kazanılır (nozokomiyal).

Kalp kapaklarına ve üriner sistemdeki epitel hücrelerine yapışma kabiliyetleri vardır. Üriner sistem enfeksiyonları (ÜSE) özellikle idrar yolu enfeksiyonları, intra abdominal enfeksiyonlar ve hemodiyaliz sırasında veya iv yoldan kateter uygulamaları sonucu hastane enfeksiyonlarından sonra görülür. Kronik hastalıklar veya diyabet gibi hastalıklar bakteriyemi için predispozisyon oluşturur. Tanı için katalaz (-), CAMP (-), safra eskülin (+) hemoliz (alfa, beta, gama) , optokine duyarlılık (rezistans) gibi laboratuvar testleri uygulanır (URL 12).

Candida sp.: Candida cinsi maya formunda mantarlardır. 5-7 µm büyüklüğünde oval veya 4-6 x 6-10 µm büyüklüğünde uzun maya hücreleri şeklinde görülürler. Normal bireylerin deri ve mukoz zarlarının normal florasında yer almalarına rağmen organizmanın doğal direnci zayıfladığında enfeksiyonlar oluşturmaktadırlar. Candida patojen duruma geçmesine yaş, genel enfeksiyonlar, aşırı zayıflama ve şişmanlık, şeker hastalığı, fazla terleme, vitamin eksikliği gibi endojen faktörler ve travma, nem artışı, mantarların virülansı ve patojenitesi gibi eksojen faktörler sebep olmaktadır.

Ayrıca yüksek dozda geniş spektrumlu antibiyotik kullanımı vücut florasında maya mantarları üzerindeki baskının ortadan kalkmasına neden olur ve bunlar üremeye baslar.

Candida cinsine ait 200 tür olmasına karşın Candida enfeksiyonlarının % 75'inin sorumlusu *Candida albicans*'tır. *C. albicans* vücudun diğer çevreye açık ve nemli dokularında (ağız, vajina, bebeklerde alt bezi bölgesi) da aşırı çoğalırsa kandidoza açabilir. Kandidoz kanda ve genital yolda da oluşabilir. Ağızda *C. albicans* enfeksiyonuna pamukçuk denir. Bağışıklığı baskılanmış hastalarda (örneğin HIV-pozitif hastalarda) Candida enfeksiyonuna çok sık rastlanır ve bu hastalığın seyri çok daha ciddi olup fungemiye varabilir.

Candida crusei içerisinde çikolata içeriği bulunan maya formunda bir mantardır. *C. crusei* öncelikle gelişmekte olan bağışıklık ve hematolojik malignitesi olan bir mantar nazokomiyal patojenidir. Bir antifungal ajanı olan flukonazole karşı direnci vardır. *C. crusei* Voriconazole, Amphotericin B, ve ekinokardinlerden olan

Micafungin, Caspofungin, ve Anidulafungin gibi mantar ilcaları ile tedavi edilirler (URL 11).

3.1.3. Kullanılan kimyasal madde ve ekipmanlar

Çalışmada kullanılan kimyasal maddeler analitik saflıkta olup, Sigma, Aldrich, Merck, Oxoid ve Riedel-de Haen'den satın alındı.

Bu çalışmada Trakya Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü Moleküler Biyoloji Araştırma Laboratuvarı ile Kimya Bölümü Biyokimya Araştırma Laboratuvarında yer alan alet ve cihazlar kullanılmıştır. Çalışmamızda rondo (Tefal 400W), çalkalamalı su banyosu (Clifton 100-400 rpm; termostatlı), vortex (Fisons), evaporatör (Buchi R-200), spektrofotometre (Ceceil 5000 series CE5502 - Shimadzu UV-1601), pH-metre (Hanna-HI 221), analitik terazi (Gec Avery), pasteur fırını (Nüvefuge CN180), liyofilizatör (Armfield FT 33), ısıtıcı ve manyetik karıştırıcı (Chiltern HS31), dağıtıcı ve mikropipetler (Eppendorf), otoklav (Nüve OT 4060), etüv (Hybaid-Midi 14), balon jojeler, pensler, cam petripler, eküvyon çubukları, cam tüpler, erlenler, şırıngalar, membran filtreler, Whatmann No:1 kâğıdı, Cloroamfenikol, Ofloxacin, Ampificilin antibiyotik diski kullanılan başlıca ekipmanlardır.

3.1.4. Kullanılan Kimyasal Çözeltiler ve Besiyerleri

3.1.4.1. Antioksidan Aktivite Tayininde Kullanılan Çözeltilerin Hazırlanması

❖ % 2'lik Na₂CO₃ çözeltisi

2 g Na₂CO₃ tartılarak distile suda çözüldü ve balon jodede 100 mL'ye tamamlandı.

❖ Folin-Ciocalteu Reaktifi (FCR)

Ticari olarak satın alındığı şekilde kullanıldı.

❖ **1 mM DPPH çözeltisi**

0.0985 g DPPH tartılarak etanol de çözüldü ve balon jojede 250 mL'ye tamamlandı.

❖ **0,1mM DPPH çözeltisi**

1 mM DPPH çözeltisinden 10 mL alınarak etanolle balon jojede 100 mL'ye tamamlandı.

❖ **% 1'lik $K_3Fe(CN)_6$ çözeltisi**

1 g $K_3Fe(CN)_6$ tartılarak distile suda çözüldü ve balon jojede 100 mL'ye tamamlandı.

❖ **% 10'luk TCA çözeltisi**

10 g TCA tartılarak distile suda çözüldü ve balon jojede 100 mL'ye tamamlandı.

❖ **% 0.1'lik $FeCl_3$ çözeltisi**

0.1 g $FeCl_3$ tartılarak distile suda çözüldü ve balon jojede 100 mL'ye tamamlandı.

❖ **0.2 M fosfat tamponu (pH 6.6)**

KH_2PO_4 (15.602 g/L) ve $Na_2HPO_4 \cdot 2H_2O$ (14.196 g/L) çözeltilerinin pH 6.6 olacak şekilde karıştırılması ile hazırlandı.

❖ **0.04 M fosfat tamponu (pH 7.0)**

KH_2PO_4 (8.27 g/L) ve $Na_2HPO_4 \cdot 2H_2O$ (10.45 g/L) çözeltilerinin pH 7.0 olacak şekilde (yaklaşık 1:4 oranında) karıştırılması ile hazırlandı.

❖ **20mM $FeCl_2$ çözeltisi**

0.252 g $FeCl_2$ tartılarak % 3.5'luk HCl ile balon jojede distile su ile 100 mL'ye tamamlandı.

❖ **Linoleik asit emülsiyonu**

175 mg Tween 20 ve 155 μ L linoleik asit 0.04 M fosfat tamponu (pH 7.0) ile balon jojede 50 mL'ye tamamlandı.

❖ **% 30'luk NH₄SCN çözeltisi**

30 g NH₄SCN tartılarak distile suda çözüldü ve balon jodede 100 mL'ye tamamlandı.

❖ **% 75'lik Etanol**

390.6 mL etanol alınarak distile su ile balon jodede 500 mL'ye tamamlandı.

❖ **Gallik asit çözeltisi (GAE)**

0.029 g gallik asit tartılarak distile suda çözüldü ve mezürde 29 mL'ye tamamlandı.

3.1.4.2. Antimikrobiyal aktivite tayininde kullanılan besiyeri ve çözeltiler

❖ **Besiyerinin hazırlanması:** Bakteriler için 38 g Müller Hinton agar (Oxoid) tartıldı ve 1000 mL distile su ilave edilerek benmari yöntemiyle eritilerek hazırlandı. Maya için ise 5 g Saburo dekstroz agar (Oxoid) tartıldı ve 250 mL distile su ilave edilerek benmari yöntemiyle eritilerek hazırlandı. Otoklavda 121°C 15 dk. steril edildi.

❖ **0,5 Mc Farland standart çözeltisinin hazırlanması**

% 1'lik 99.5 mL H₂SO₄ ile % 1.18 'lik 0.5 mL BaCl₂ karıştırılarak tartıldı.

❖ **Serum fizyolojik hazırlanması**

9g NaCl tartıldı ve 1000 mL distile su ile karıştırılarak hazırlandı. Otoklavda 121°C 15 dk. steril edildi.

3.2. Metod

3.2.1. Ekstrelerin Hazırlanması

Kurutulan bitki örnekleri ev tipi rondoda öğütüldükten sonra su, etanol ve aseton çözücülerini kullanılarak ekstraktlar hazırlandı.

Su infüzyonları için 20 g bitki örneği 400 mL kaynayan suda (katı: sıvı oranı 1:20) 30 dakika boyunca karıştırılarak ekstrakte edildi (Mata vd., 2007). Ekstraktlar süzgeç kâğıdından süzüldü ve Namık Kemal Üniversitesi Teknik Bilimler Meslek Yüksek Okulu Gıda Teknolojisi Laboratuvarında liyofilize edildi.

Etanol ve aseton ekstraksiyonu için 20'şer gram bitki örneği 400 mL çözücü ile oda koşullarında 3 saat boyunca manyetik karıştırıcı yardımıyla karıştırıldı. Süzgeç kâğıdından süzüldü, süzüntülerin çözücülerini evaporatörde 40 °C'de uçuruldu (Tawaha, 2007).

Bitkilerden ekstrakte edilebilen bileşiklerin miktar tayini için liyofilize ve evapore örneklerin tartımı alındı. Analiz edilinceye kadar renkli şişelerde +4 °C'de muhafaza edildi.

Antioksidan aktivite denemelerinde çalışılacak konsantrasyonlar için liyofilize örnekler distile suda, aseton ve etanol ekstraktları ise etanol de 1000 µg/mL olacak şekilde çözüldü. Diğer konsantrasyonlar bu stok çözeltilerden seyreltilerek hazırlandı Antimikrobiyal aktivite denemelerinde ise çalışılan ekstraktlar DMSO' da çözüldü.

Tablo 3.1. *C. coggygia* bitkisinden elde edilen ekstraterinisimleri, miktarları, verimleri

BİTKİ MATERYALİ	KULLANILAN ÇÖZELTİLER	EKSTRELERİN ADLARI	VERİMLERİ %
<i>Cotinus coggygia</i>	ETANOL	Etanol Ekstresi	8,2
	ASETON	Aseton Ekstresi	9,3
	SU	Su Ekstresi	20,4

3.3. Ekstraktların Toplam Fenolik Madde Tayini (TPC)

3.3.1. Toplam Fenolik Tayini

Tüm bitkilerin su, etanol ve aseton ekstraktlarındaki toplam çözünebilen fenolik maddeler Folin-Ciocalteu reaktifi (FCR) ile tayin edildi (Singleton ve Rossi, 1965). FCR reaktifi fosfotungstik ($H_3PW_{12}O_{40}$) ve fosfomolibdik ($H_3PMo_{12}O_{40}$) asitlerin karışımı olup fenol oksidasyonu sırasında bu oksitler mavi renkli bileşiklere indirgenir. Bu renk değişimi polifenolik bileşik miktarı ile orantılı olup 760 nm’de spektrofotometrede takip edilir. Polifenol miktarı genellikle gallik asit veya kateşol ekivalenti olarak ifade edilir.

Tüm bitkilerin 10, 25, 50, 100, 250, 500, 1000 $\mu\text{g/mL}$ konsantrasyonlarında hazırlanan su, aseton ve etanol ekstraktlarından 1 mL alındı. Distile su ile hacimler 46 mL’ye tamamlandıktan sonra 1 mL FCR eklendi. 3 dakika sonra % 2’lik Na_2CO_3 çözeltisi katılarak oda koşullarında 2 saat çalkantılı su banyosunda 250 rpm’de tutuldu. Örnek yerine distile su içeren kör denemeye karşı, 760 nm’de absorbanslar ölçüldü.

Değişik konsantrasyonlarda (50-500 $\mu\text{g/mL}$) hazırlanan gallik asit çözeltisine FCR ile toplam fenolik madde tayini uygulandı. Okunan absorbanslar ile konsantrasyonlar arasında çizilen gallik asit standart grafiğın denklemlerinden, örneklerin toplam fenolik madde miktarları μg gallik asit (μg GAE/g ekstrakt) şeklinde hesaplandı.

3.4. Antioksidan Aktivite Tayin Metodları

3.4.1. DPPH

Serbest radikal yakalama etkinliğı deneyi 1,1-difenil-2-pikrilhidrazil (DPPH) radikali kullanılarak Blois’in metoduna göre çalışıldı (Blois, 1958). Method ekstraktların bir proton veya elektron verebilme yeteneğinin, mor renkli DPPH

çözeltilisinin rengini açması esasına dayanır. Reaksiyon karışımının absorbansının düşmesi yüksek serbest radikal giderme aktivitesinin göstergesidir.

10, 25, 50, 100, 250, 500, 1000 µg/mL olarak hazırlanan *C.coggygria* (tetra) yaprağı ekstraktları ve standart çözeltilerden (10-500 µg/mL) 1'er mL alınarak, 4 mL 0.1 mM DPPH (etanol de) çözeltisi ilave edildi. Vortekslendikten sonra oda koşullarında karanlıkta 30 dakika bekletildi ve 517 nm'de absorbansları okundu. Örnek ve standart madde yerine 1 mL etanol kullanılarak aynı şartlarda kontrolde çalışıldı. Kontrolün absorbansı günlük ölçüldü (Türkoğlu vd., 2006)

% DPPH radikali giderme aktivitesi aşağıdaki formülle hesaplanır:

$$\% \text{ DPPH Radikali Giderme Aktivitesi} = \frac{\text{Kontrolün Absorbansı} - \text{Örnek Absorbansı}}{\text{Kontrol Absorbansı}} \times 100$$

Hesaplandıktan sonra % aktivite-konsantrasyon grafiği çizildi, grafik yardımıyla DPPH'in % 50 'sinin inhibisyonunu sağlayan ekstrakt ve standart madde konsantrasyonu olan EC₅₀ değeri bulundu ve sonuçlar EC₅₀ = µg/mL olarak verildi.

3.4.2. İndirgeme Gücü

Bitki ekstraktlarının indirgeme kapasitesi Oyaizu metoduna göre tayin edildi (Oyaizu, 1986). Ortamdaki indirgen madde Fe⁺³iyonlarını Fe⁺²iyonlarına indirger ve FeCl₃ ilavesiyle oluşan Prusya mavisi rengindeki kompleksin absorbansı ölçülür. Yüksek absorbans değeri yüksek indirgeme kapasitesinin göstergesidir (İşbilir, 2008).

10, 25, 50, 100, 250, 500µg/mL gibi konsantrasyonlarda hazırlanan bitki ekstraktları ve standart madde çözeltilerinin 1 mL'sine, 2.5 mL fosfat tamponu (0.2M, pH 6.6) ve 2.5 mL % 1'lik K₃Fe(CN)₆ eklendi. Karışımlar 50 °C'de 20 dakika çalkalamalı su banyosunda karıştırıldıktan sonra 2.5 mL % 10'luk TCA eklendi ve vortekslendi. Vorteks sonrası süpernatantlardan 2.5 mL alınarak eşit hacimde distile

su ve 0.5 mL % 0.1'lik FeCl₃ çözeltisi ile karıştırıldı. 700 nm'de absorbanslar okundu. Kör deneme, bitki örneği yerine tamponla yapıldı. Deney sonucu absorbans konsantrasyon grafiği çizilerek değerlendirildi.

3.4.3. Linoleik Asit Sisteminde Ferrik Tiyosiyanat Metodu ile Toplam

Antioksidan Aktivite Tayini

Antioksidan aktivite ferrik tiyosiyanat metodu kullanılarak belirlendi. Bu metotta *in vitro* koşullarda linoleik asit oksidasyonu oluşturulur ve oksidasyon sırasında Fe⁺²iyonları Fe⁺³iyonlarına yükseltgenir. Belirli aralıklarla inkübasyondaki karışımdan örnek alınarak spektrofotometrik ölçüm ile peroksitlerin oluşumu takip edilir. Yüksek absorbans değeri yüksek peroksit konsantrasyonunu ifade eder (Pan vd., 2007).

Farklı konsantrasyonlardaki bitki ekstraktları (10, 25, 50, 100, 250, 500 µg/mL) ve standart madde çözeltilerinin (2.5-500 µg/mL) 1 mL'sine 2.5 mL linoleik asit emülsiyonu ve 1.5 mL fosfat tamponu (0.04 M pH 7.0) eklendi. Linoleik asit emülsiyonu 175 mg Tween 20 ve 155 µL linoleik asidin fosfat tamponuyla (0.04 M pH 7.0) 50 mL'ye tamamlanması ile hazırlandı. Ayrıca 2.5 mL fosfat tamponu ve 2.5 mL linoleik asit emülsiyonu içeren kontrol örneği hazırlandı. Vortekslenen çözeltiler inkübatörde 37°C'de inkübasyona bırakıldı. 120 saat boyunca 8 saatte bir inkübasyon çözeltilerinden 0.1 mL alınarak 4.7 mL % 75'lik etil alkol ve 0.1 mL % 30'luk NH₄SCN eklendi. Hazırlanan karışımlara 3 dakika sonra; % 3.5'lük HCl'de hazırlanmış olan 20 µM FeCl₂ (0.1 mL) çözeltisi eklendi ve 5 dakika sonra oluşan kırmızı rengin absorbansı 500 nm'de ölçüldü.

Linoleik asit peroksidasyonunun % inhibisyonu aşağıdaki formül ile hesaplandı:

$$\% \text{ İnhibisyon} = 1 - \frac{\text{500nm Örnekle Absorbansı}}{\text{500nm'de Kontrol Maksimum Absorbans}} \times 100$$

3.5. Antibakteriyel Aktivite Tayin Metodları

3.5.1. Bakteri Kültürlerinin Hazırlanması

Bakteri kültürleri için besiyeri olarak Nutrient agar, maya kültürleri için Saburo dekstroz agar kullanıldı. Besiyerleri steril olarak hazırlandı ve 90 mm çaplı steril petri kapları 20 mL 'lik miktarlarda döküldü. Bakteri kültürlerini hazırlamak için 37 °C de, maya kültürleri için ise 30 °C etüvde 20-24 saat inkübasyona bırakıldı.

MİK değerini belirlemek için Nutrient agarda hazırlanan 18x180 mm kenarlı steril deney tüpleri kullanıldı. 37 °C'de 24 saat inkübasyona bırakıldı.

3.5.2. Disk Difüzyon Yöntemi

Bitki ekstralarının antimikrobiyal aktivitelerini belirlemek için Kirby ve Bauer'in disk difüzyon duyarlılık testi (DDDT) kullanıldı (Yiğit vd.,2009). Daha önce hazırlanan bitki ekstraları DMSO çözülerek 30 mg/ml lik konsantrasyonlarda çözeltileri hazırlandı ve bu çözeltiler milipor filtreden (0.45 µm) geçirilerek steril edildi. Bu çözeltilerin 35 µL'lik miktarlar 6 mm çaplı steril kâğıt disklerle (Whatmann No:1) emdirildi (1mg/disk) (Rankovic vd., 2010). Çözgen maddelerin uzaklaştırılması sağlanarak çalışmada kullanılan diskler hazırlandı.

Bakterilerin katı besiyerlerinde üretilmiş (plak kültür), 18-24 saatlik taze kültürlerinden öze yardımıyla alınan koloniler serum fizyolojik içerisinde süspanse edildi. Çalışmada kullanılan bakteri ve maya suşları Mc Farland 0.5 bulanıklık tüpleriyle kıyaslanarak dilüsyonlar hazırlandı ve inokulum olarak da bu solüsyonlar kullanıldı. Bu solüsyonlar Saburo dektroz agar (SDA) ve Müller Hinton agar besiyerlerine steril eküvyonlar kullanılarak ekildi predifüzyon sağlanması için 5 dak. bekletildi. Daha sonra ekstre içeren diskler besiyeri içeren petrilere uygun bir şekilde yerleştirildi. Bakteriler için 20-24 saatlik 37°C, mayalar için 48 saatlik 30°C inkübasyondan sonra inhibisyon çapının oluşup oluşmadığı kontrol edildi ve oluşan zon çapları milimetrik cetvelle ölçülerek kaydedildi. Pozitif kontrol olarak Oflaxacin

(OFX), Ampicilin standart antibiyotik diskleri kullanıldı. Negatif kontrol için DMSO içeren diskler kullanıldı.

3.5.3. MİK (Minimal İnhibitör Konsantrasyonu)

Çalışmada su ekstresinin disk difüzyon yönteminde aktive belirlenen *E.coli*, *S. aureus*, *P. aeruginosa* ve *K. pnömoni* bakterilerinin suşları üzerine minimal inhibitör konsantrasyon (MİK) değerleri makrobroth yöntemiyle belirlendi. Her bir bakteri kültüründen (18 saatlik) 25 µL (1×10^8 cfu/mL) alınarak 3 mL Müller Hinton Broth ve bir seri bitki ekstresi (30 mg/mL'den başlayarak 0.46 mg/mL konsantrasyona kadar) dilusyonları bulunan deney tüplerine aktarıldı ve 37°C'de 24 saat inkübe edildi.

İnkübasyondan sonra büyümenin görülmediği tüplerdeki en düşük ekstre konsantrasyonu MİK olarak belirlendi.

Ayrıca bulanıklık oluşmayan tüplerden 50 µL alınarak Müller Hinton agara ekimler yapıldı büyüme olup olmadığı kontrol edildi ve minimum bakterisit konsantrasyonu (MBK) da belirlendi. Tüm deneyler birbirine paralel üç ölçüm şeklinde yürütüldü ve sonuçların aritmetik ortalamaları alındı (Bancirova, 2010).

3.6. Değerlendirme

Tüm deneyler birbirine paralel üç ölçüm şekilde yapıldı. Grafikler GraphPad Prism 5 Demo programı kullanılarak çizildi. Hata çubukları grafiklerin üzerinde belirtildi.

4. BULGULAR

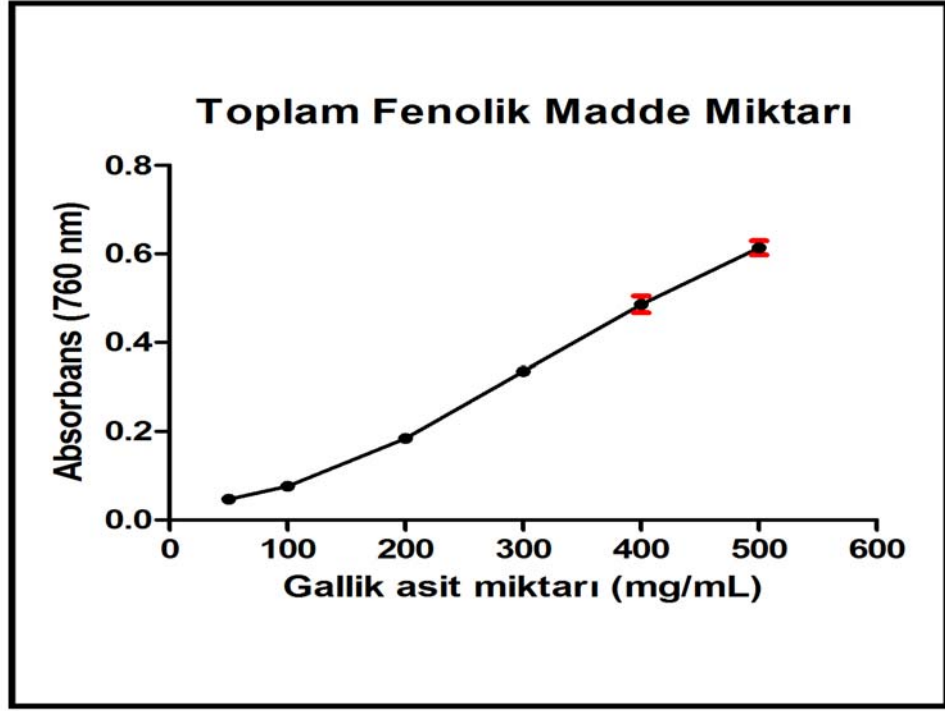
C. coggygia'dan hazırlanan (TA, TE, TS) ekstralarının antioksidan aktivite tayinleri, indirgeme gücü, DPPH serbest radikal giderim aktivitesi ve linoleik asit sisteminde ferrik tiyosiyanat metodu ile toplam antioksidan aktivitesi tayini yöntemleriyle yapıldı. Ayrıca tüm ekstraların toplam fenolik miktarları gallik asitle eşdeğer olarak belirlendi.

C. coggygia'dan hazırlanan (TA, TE, TS) ekstralarının antibakteriyel aktivitesi disk difüzyon yöntemiyle belirlendi ve buna göre MİK ve MBK değerleri bulundu.

4.1. FCR ile Toplam Fenolik Bileşik Tayini Sonuçları

Tüm bitkilerin su, etanol ve aseton ekstralarındaki toplam çözünebilen fenolik maddeler Folin-Ciocalteu reaktifi (FCR) ile tayin edildi. Ortamda fenolik maddenin bulunması durumunda FCR ilavesiyle 760 nm'de maksimum absorbans veren ürünler oluşmaktadır. Absorbansdaki artış fenolik madde miktarıyla orantılıdır. Gallik asit kullanılarak standart grafik hazırlandı (Şekil 4.1). Bu standart grafikten elde edilen doğru denklemi kullanılarak örneklerin toplam fenolik madde miktarları mg gallik asit (mg GAE/g ekstrakt) eşdeğeri şeklinde hesaplandı.

Su, etanol ve aseton ekstralarının fenolik bileşik miktarları Tablo 4.1'te verilmiştir. Aynı bitkinin farklı ekstralarının fenolik bileşik miktarlarında farklılık gözlemlendi.



Şekil 4.1. Gallik asit standart grafiği

Standart grafik denkleminde hesaplanan sonuçlar gallik asit ekvivalenti cinsinden 176 ± 0.025 – 199.07 ± 0.044 mg/g ekstrakt aralığında belirlendi. *C. coggygria*'nın TA ve TE ekstraktları toplam fenolik madde miktarı açısından birbirine yakın değerlere sahipken, su ekstresinin (TS) fenolik madde bakımından oldukça zengin bir ekstre olduğu tespit edildi.

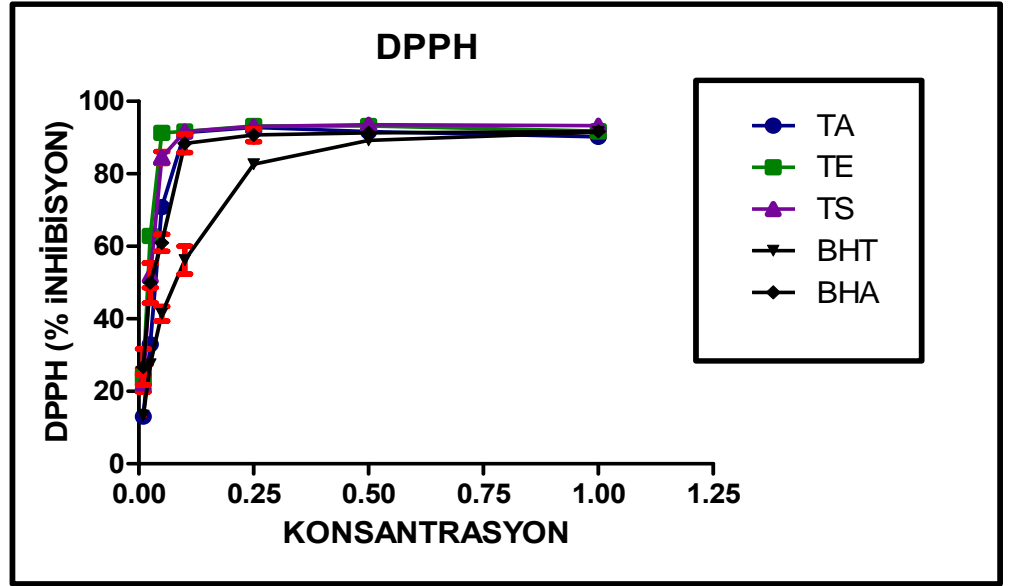
Tablo 4.1. *C. coggygria* 'dan hazırlanan ekstraktların toplam fenolik madde miktarları

<i>Cotinus coggygria</i>	Fenolik Madde İçeriği (mg GA/g ekstrakt)		
	ETANOL	ASETON	SU
	176 ± 0.025	180.61 ± 0.008	199.07 ± 0.044

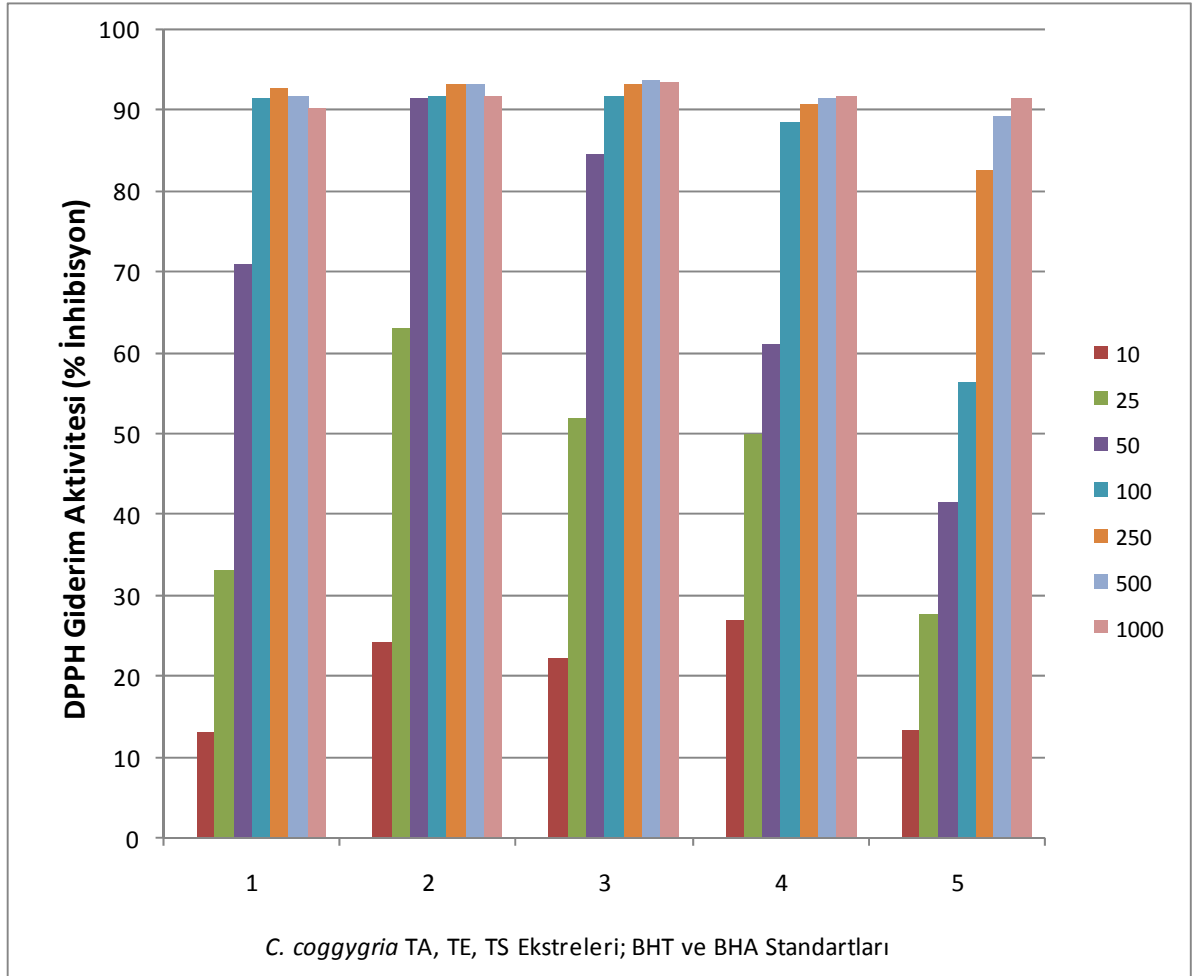
4.2. Ekstrelerin Antioksidan Aktivite Sonuçları

4.2.1. DPPH Serbest Radikal Giderim Aktivitesi

DPPH radikali doğal antioksidanların serbest radikal yakalama aktivitesini değerlendirmek için kullanılan metotlardan biridir. Çalışmada kullanılan her bir ekstraktın serbest radikal giderici etkileri DPPH radikali üzerinden tayin edildi. *C. coggygria* 'dan hazırlanan 3 ekstrenin DPPH serbest radikal giderim aktivitesi 7 farklı konsantrasyonda (10, 25, 50, 100, 250, 500, 1000 µg/mL) tayin edildi. Standart madde olarak BHT, BHA kullanıldı.



Şekil 4.2. *C. coggygria*'dan hazırlanan ekstrelerin DPPH aktiviteleri (3 paralel test ortalamasıdır)



Şekil 4.3. *C. coggyria* aseton (1), etanol (2), su (3) ekstreleri ve BHA (4) , BHT (5) standartlarının DPPH Serbest Radikal Giderim Aktivitesinin % İnhibisyon Değerleri

Şekil 4.3 incelendiğinde; su, etanol, aseton bitki ekstraktlarının, DPPH serbest radikal giderim aktiviteleri hemen hemen aynıdır. Aktiviteleri standartlarla karşılaştırıldığında oldukça başarılıdır. Ancak su ve etanol ekstraktlarının aseton ekstraktından daha yüksek inhibisyon değerlerine sahip olduğu belirlendi. Tüm ekstraktlarda, konsantrasyon artışı ile birlikte % inhibisyon oranlarında artış gözlemlendi. Ekstraktların antiradikalik aktivite açısından gayet yüksek olduğu belirlendi.

Tablo 4.2. *C. coggygia* bitkisinin aseton, su, etanol ekstraktları ve BHT, BHA standartlarının yüzde inhibisyon değerleri

Konsantrasyon	TA	TE	TS	BHT	BHA
10 µg/ml	13.006	24.15	22.13	26.69	13.253
25 µg/ml	32.953	62.89	51.89	49.916	27.443
50 µg/ml	70.79	91.316	84.513	60.96	41.373
100 µg/ml	91.4	91.69	91.663	88.416	56.206
250 µg/ml	92.753	93.216	93.043	90.67	82.586
500 µg/ml	91.62	93.196	93.563	91.283	89.24
1000 µg/ml	90.216	91.75	93.253	91.72	91.436

Tablo 4.2. de görüldüğü üzere *C. coggygia*'nın (Tetra) su, aseton, etanol ekstraktlarının 250 µg/ml, 500 µg/ml, 100 µg/ml konsantrasyonlarına bakıldığında serbest radikal giderme açısından hemen hemen aynı % inhibisyon değerlerine sahip olduğu görüldü. BHT, BHA standartlarının 1000 µg/ml konsantrasyonlarıyla bitki ekstraktlarının 1000 µg/ml konsantrasyonları birbirine yakın değerdedir. Fakat 100, 250, 500 µg/ml konsantrasyonları gösteriyorki su, aseton, etanolden oluşan tetra ekstraktlarının % inhibisyon değerleri BHT ve BHA standartlarının 100, 250, 500 µg/ml konsantrasyonlarından daha yüksek derece aktivite göstermiştir.

Reaksiyon ortamındaki DPPH radikalinin % 50'sinin yok edilmesi için gereken etkili antioksidan konsantrasyonu EC₅₀ (veya IC₅₀) değeri olarak tanımlanır ve düşük EC₅₀ (effective consantrasion) değeri yüksek radikal giderme aktivitesinin göstergesidir. Çalışmada kullanılan tüm bitki ekstraktlarının her biri için ayrı ayrı çizilen konsantrasyon- % inhibisyon grafiklerinden EC₅₀ değerleri belirlendi. Elde edilen bu değerler Tablo 4.2.1 görülmektedir.

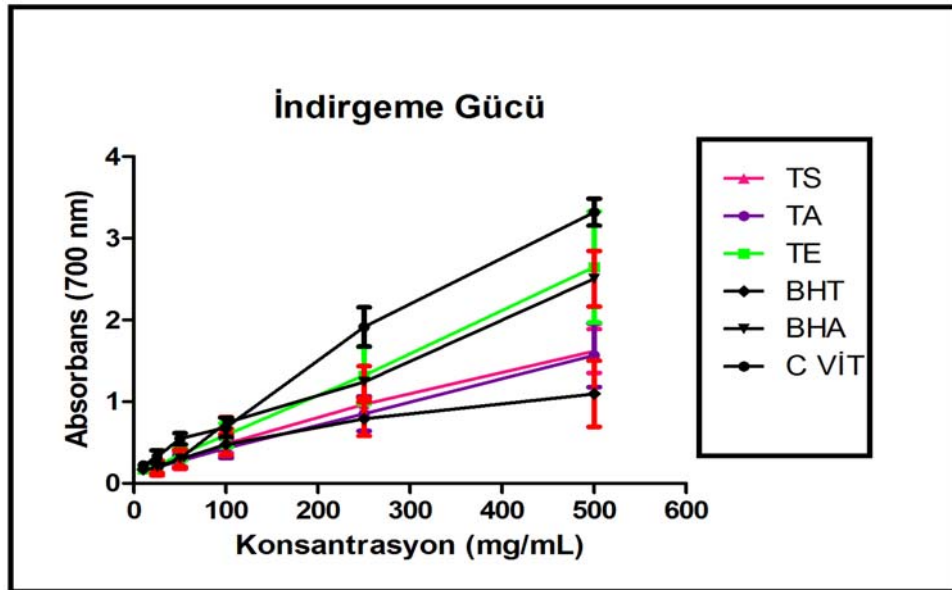
Tablo 4.2.1. *C. coggygia* bitkisinin su, etanol, aseton ekstraktlarının EC₅₀ değerleri

EC ₅₀ Değerleri (µg/ml)					
	Etanol	Aseton	Su	BHA	BHT
<i>Cotinus coggygia</i>	21.7	38.4	23.8	26.8	31.7

Tablo 4.2.1.'de görüldüğü gibi tüm ekstraktlar içinde en düşük EC₅₀ değerini tetra yaprağının aseton ekstraktı en yüksek değerini ise su ekstraktı vermiştir.

4.2.2. İndirgeme Kapasitesi Tayini

Fe⁺³ iyonlarının indirgenmesi, bir bileşiğin antioksidan aktivite gösterebilmesi için önemli bir mekanizma olan elektron verebilme yeteneğinin göstergesidir ve diğer antioksidan özellikler ile de yakından ilişkilidir. Bitki ekstraktının ortamdaki Fe⁺³'ü indirgeme yeteneğini belirlemek üzere değişen ekstrakt ve standart konsantrasyonları ile çalışıldı ve oluşan komplekslerin absorbanı 700 nm'de ölçüldü. BHA, BHT, C vitamini standartlarıyla karşılaştırılarak her bir bitki ekstraktı için konsantrasyon - absorban grafikleri çizildi.



Şekil 4.4. Bitki ekstresinin indirgeme kapasitesi

Grafikten görüldüğü üzere, çalışılan bitki ekstraktlarının Fe^{+3} 'ü indirgeme yetenekleri yönünden standartlarla karşılaştırıldığında çok yüksek aktiviteye sahip oldukları gözlemlendi. Çalışılan bitkinin su, etanol ve aseton ekstraktlarının indirgeme gücü yetenekleri genel olarak etanol > su \geq aseton şeklinde sıralanmaktadır.

İndirgeme kapasitesi tayininde yüksek absorbans değerinin yüksek indirgeme kapasitesinin göstergesi olduğu kabul edilmektedir.

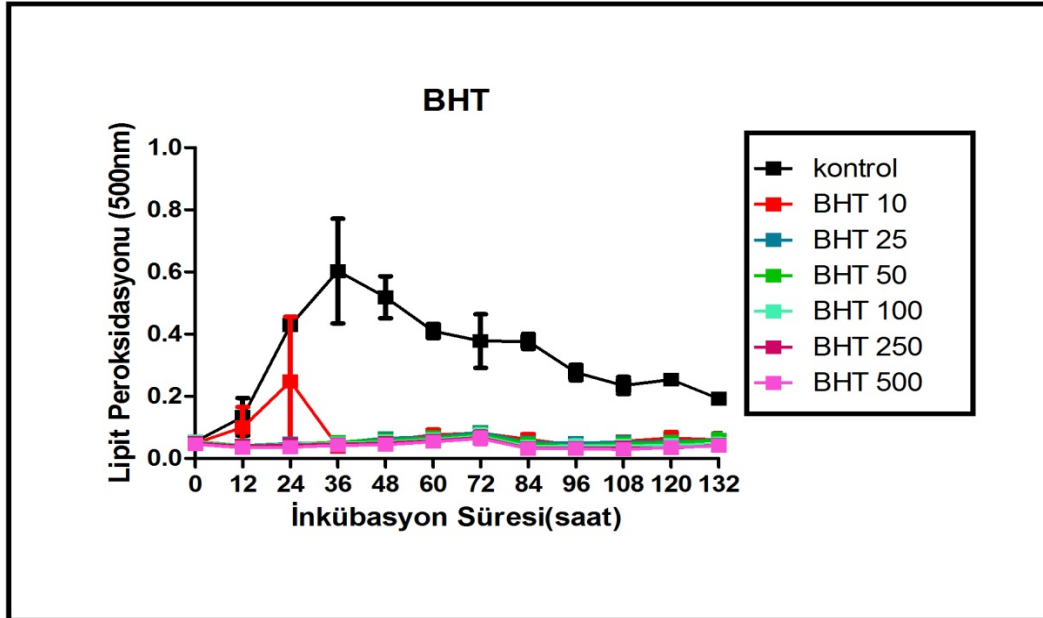
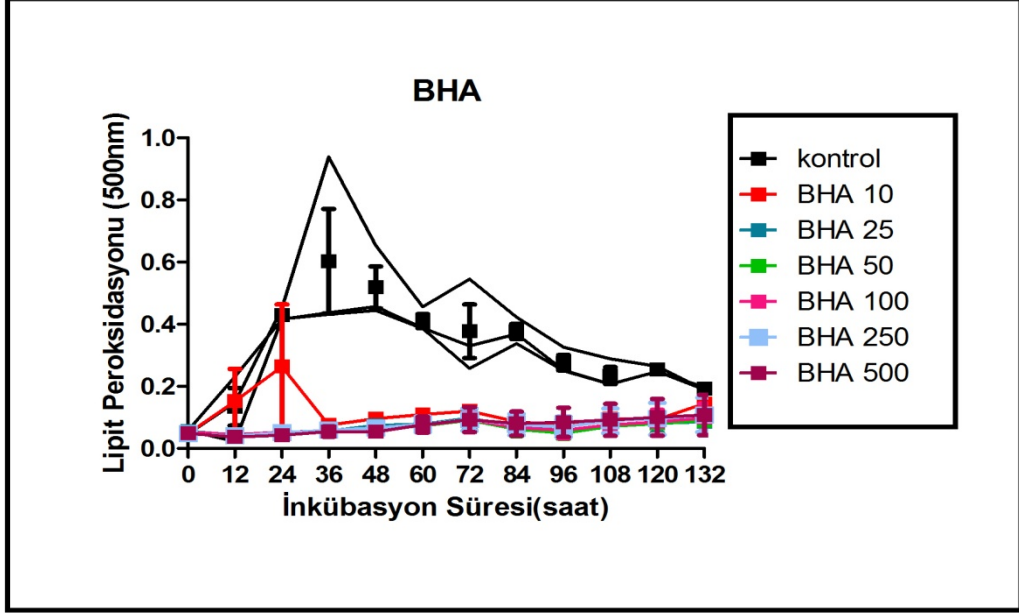
Ayrıca güçlü bir indirgen madde olan C vitamininden sonra, Fe^{+3} 'ü indirgeme yetenekleri yönünden etanol ekstraktının BHA'dan, su ve aseton ekstraktlarının ise BHT'den yüksek aktiviteye sahip oldukları gözlemlendi.

4.2.3. Linoleik Asit Sisteminde Ferrik Tiyosiyanat Metodu ile Toplam Antioksidan Aktivite Tayini

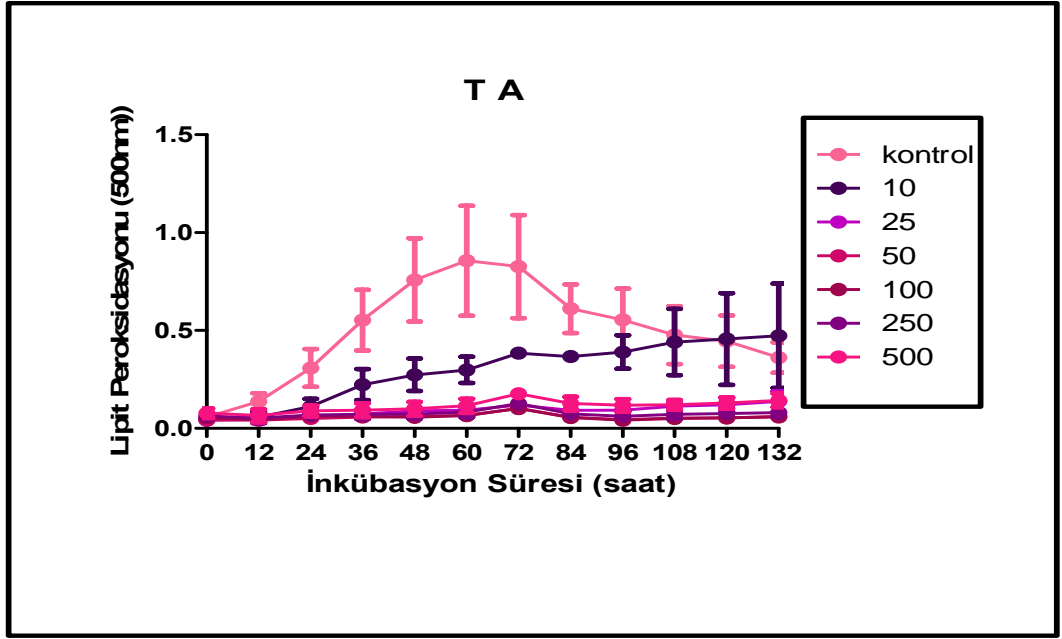
Bitki ekstraktlarının linoleik asit peroksidasyonu üzerindeki inhibisyon etkileri, 2.5-500 $\mu\text{g/mL}$ aralığındaki konsantrasyonlarda ferrik tiyosiyanat (FTC) metodu ile ölçüldü. Sonuçlar BHA, BHT, E vitamini inhibisyon oranları ile karşılaştırıldı. İnkübasyon sırasında emülsiyonda oluşan peroksitlerin miktarı, oksidasyonun ilerleyişi sırasında 12 saatte bir ölçüm alınarak 132 saat boyunca takip edildi.

Her bir ekstraktın farklı konsantrasyonları için ve standart maddeler için absorbans-zaman grafikleri çizildi (Şekil 4.5-4.7). Grafikler yardımıyla, kontrolün absorbansının maksimum olduğu yani lipid peroksidasyonunun en fazla olduğu zaman olan maksimum absorbans değeri ölçüldü. Her bir örneğin maksimum peroksit oksidasyon anına karşılık gelen absorbans değerleri belirlendi. Bölüm 4.3.4.'te verilen formül yardımıyla örneklerin lipid peroksidasyonunu önleme oranları % inhibisyon olarak tayin edildi. Literatürde yüksek dozdaki E vitamininin prooksidan etki gösterebileceği belirtilmiştir. Bu yüzden daha düşük konsantrasyonlar ile (2.5, 5, 10, 25 ve 50 $\mu\text{g/mL}$) çalışıldığında, lipid peroksidasyonunun maksimum olduğu süre bulunarak yüksek inhibisyon oranları tayin edildi.

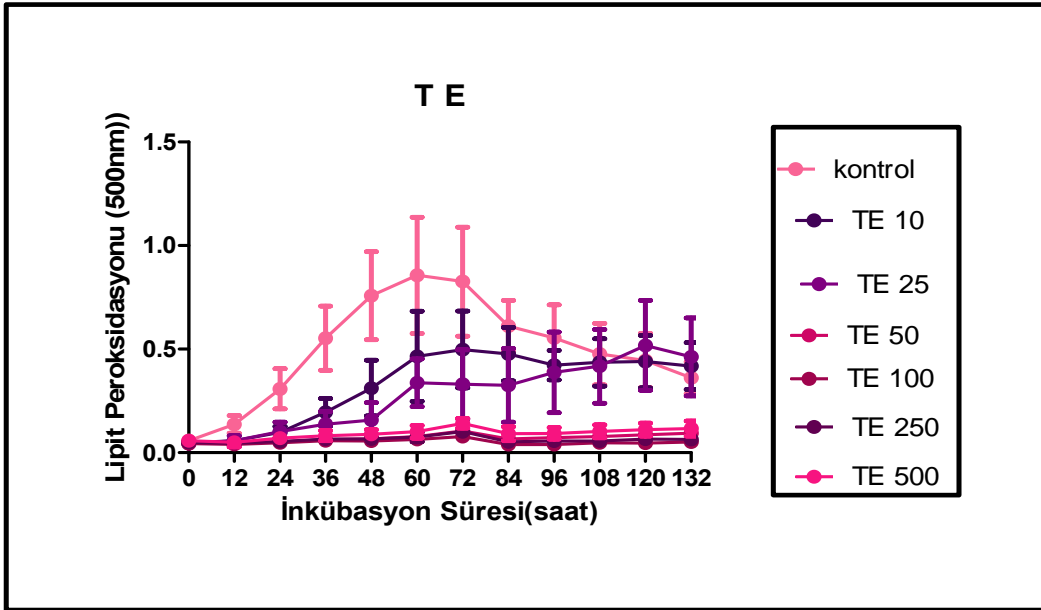
Bölüm 4.3.4.'te verilen formül yardımıyla lipid peroksidasyonunun inhibe etme oranları tayin edildi.



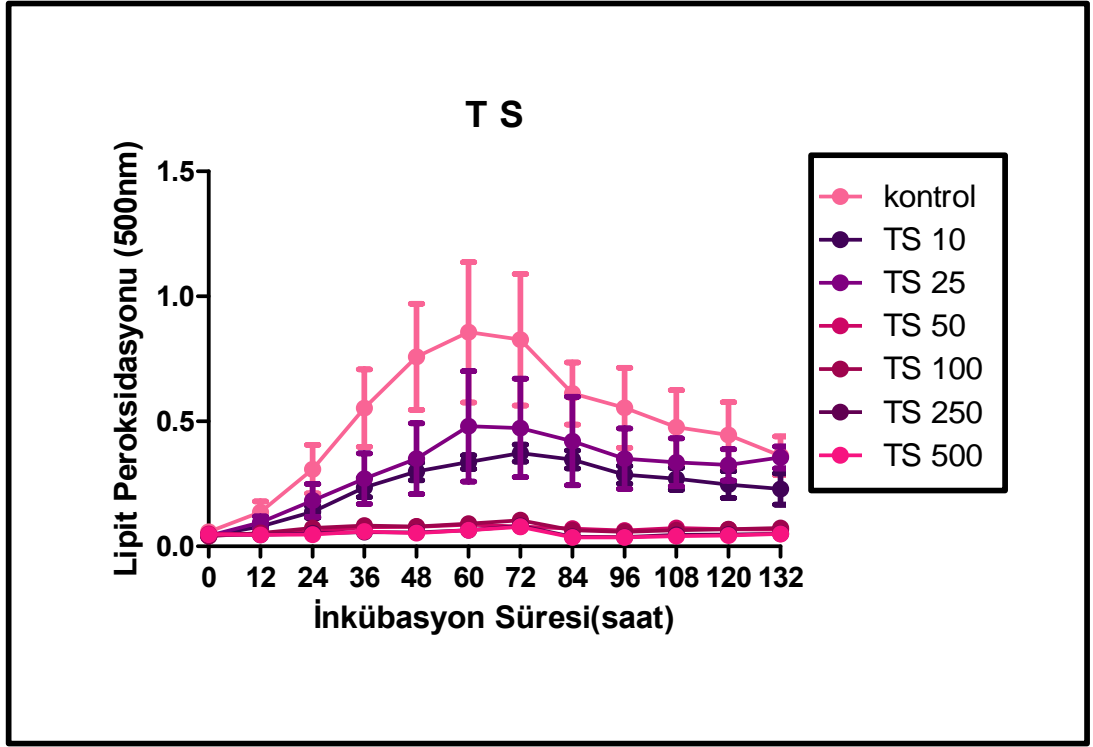
Şekil 4.5. Linoleik asit peroksidasyonunda sentetik antioksidan olan BHA ve BHT 'nin etkisi



Şekil 4.6. *C. coggyria* bitkisinin aseton ekstraktının antioksidan aktivitesi



Şekil 4.7. *C. coggyria* bitkisinin etanol ekstraktının antioksidan etkisi



Şekil 4.8. *C. coggyria* bitkinin su ekstraktının antioksidan etkisi

Şekil 4.6.- 4.8'de görüleceği gibi genel olarak aseton ve etanol ekstraktları su ekstraktına göre daha düşük aktiviteleri sahip olduğu belirlendi. *C. coggyria* su ekstraktı ise, BHT, BHA, E vitamini gibi standartların antioksidan aktivitesine oldukça yakın değerlere sahip olduğu gözlemlendi. Bu yüksek antioksidan özelliği lipid peroksidasyonunu önlemede önemli bir bulgudur. Çalışmamızda; linoleik asit emülsiyonu ile yapılan lipid peroksidasyonu denemesinde, BHA ve BHT kullanılan tüm konsantrasyonlarda peroksit oluşumunu tamamen inhibe ederek tipik bir antioksidan profili sergiledi (Şekil 4.5-4.7). Ancak E vitamini sentetik antioksidanlara göre farklı davranış gösterdi.

Bitki ekstraktlarının ve standartların antioksidan aktivitelerini daha açık şekilde görebilmek için, elde edilen % inhibisyon değerleri Tablo 4.2.3'te verildi. Ayrıca çalışılan konsantrasyonlar ile % inhibisyon oranları arasında çizilen grafikte (Şekil 4.9.) her bir bitki ekstraktının standart olarak kullanılan sentetik antioksidanlar ve E vitaminine karşı total antioksidan aktiviteleri görülmektedir.

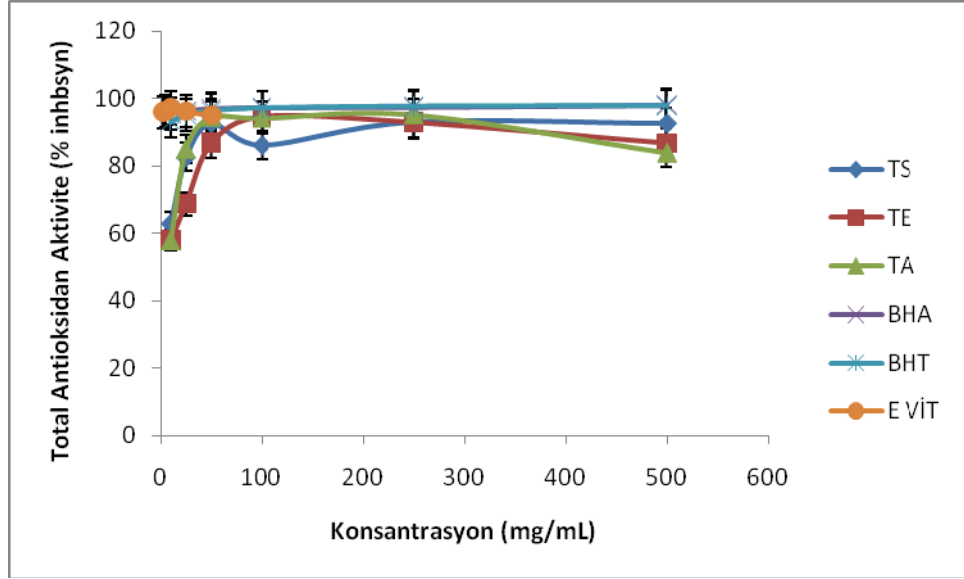
Tablo4.3.Ekstraktların ve standartların lipid peroksidasyonunu inhibe etme oranları(% İnhibisyon)

BİTKİ EKSTRAKTI	% İNHİBİSYON					
	10µg/ml	25µg/mL	50µg/mL	100µg/mL	250µg/mL	500µg/mL
TA	58.05±3.5	85±2.97	94.55±2.77	94.22±2.84	95.28±3.53	83.97±3.41
TE	57.81±2.03	68.75±2.38	86.70±1.33	94.49±2.83	92.78±3.02	86.62±0.68
TS	63.01±4.56	82.613±5.492	92.69±2.88	86.213±1.28	93.166±4.416	92.71±5.5

STANDART MADDE	% İNHİBİSYON					
	10µg/mL	25µg/mL	50µg/mL	100µg/mL	250µg/mL	500µg/mL
BHA	93.14±2.29	95.27±1.4	96.42±0.97	97.14±0.83	92.62±0.24	97.8±0.17
BHT	95.55±0.26	96.28±0.4	96.97±0.55	97.33±0.17	97.46±0.271	98.12±0.31

Tablo 4.3.1. E vitaminini Lipit peroksidasyonunu inhibe etme oranları(% İnhibisyon)

E vitamini	% İNHİBİSYON				
	2,5µg/mL	5µg/mL	10µg/mL	25µg/mL	50µg/mL
E vitamini	95.88±0.86	96.19±0.42	97.21±0.35	97.21±0.35	95.06±0.31



Şekil 4.9. Total Antioksidan Aktivite (% İnhibisyon)

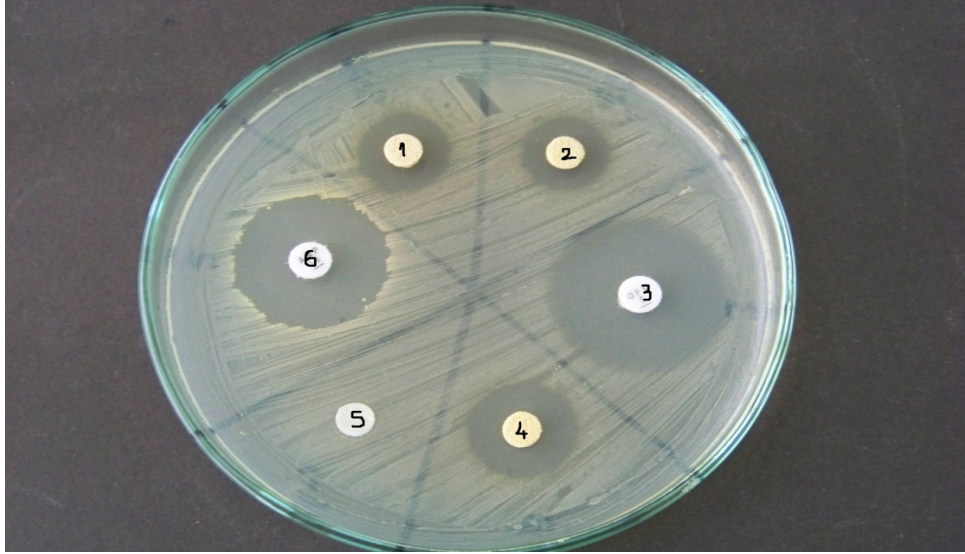
4.3. Ekstrelerin Antibakteriyel Aktivite Sonuçları

C. coggyria'dan hazırlanan (TA, TE, TS) ekstrelerin 5 bakteri 2 maya üzerindeki antimikrobiyal aktiviteleri disk difüzyon yöntemiyle belirlendi.

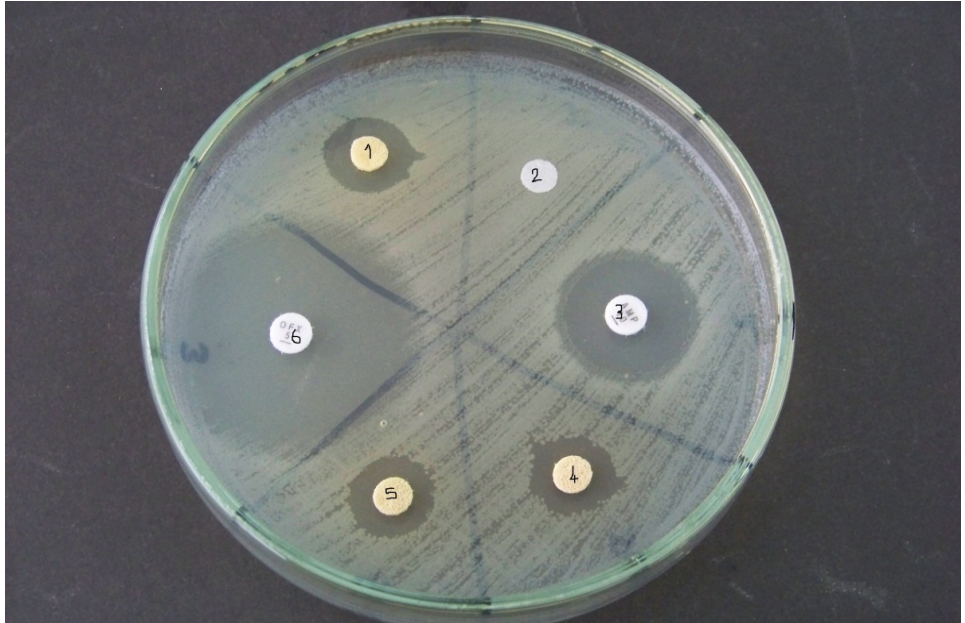
TE, TS ve TA'ya karşı en duyarlı bakterinin *E. coli*, en duyarlı maya ise *C. cruseid*dir. Bitki ekstrklarımızın genel olarak bakterilerden *E. faccialis*, mayalardan ise *C. albicans* üzerinde etkilerinin çok az olduğu hatta inhibisyon çaplarının çok düşük olduğu gözlemlendi. TS'nin *S. aureus* bakterisi üzerinde oluşturduğu 13 mm zon çapı ile en yüksek antimikrobiyal aktiviteyi gösterdiği tespit edilmiştir. Sadece DMSO emdirilmesiyle hazırlanan negatif kontrol disklerinin test bakterileri üzerinde hiçbir inhibisyon zonu oluşturmadığı görüldü. Pozitif kontrol diski olarak da Oflaxacin ve Ampicilin kullanılmıştır.

Tablo 4.4.C. *coggyria* bitkisinin su, etanol, aseton ekstraktlarının antibakteriyel aktiviteleri

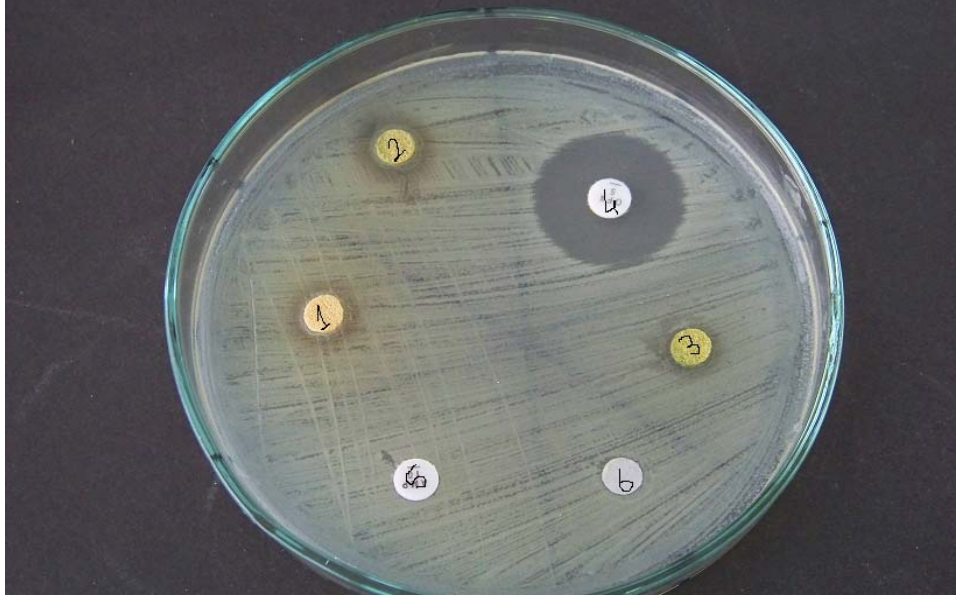
MİKROORGANİZMALAR	İNHİBİSYON ZON ÇAPLARI (mm)				
	TA	TE	TS	Ampificilin	Oflaxacin
<i>Escherichia coli</i>	10	10	10	20	30
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	5	7	7	(-)	(-)
<i>Staphylococcus aureus</i>	10	10	13	20	27
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	8	10	8	(-)	20
<i>Enterococcus faecalis</i>	6	6	5	30	20
<i>Candida albicans</i>	5	5	5	(-)	(-)
<i>Candida crusei</i>	12	11	10	20	25



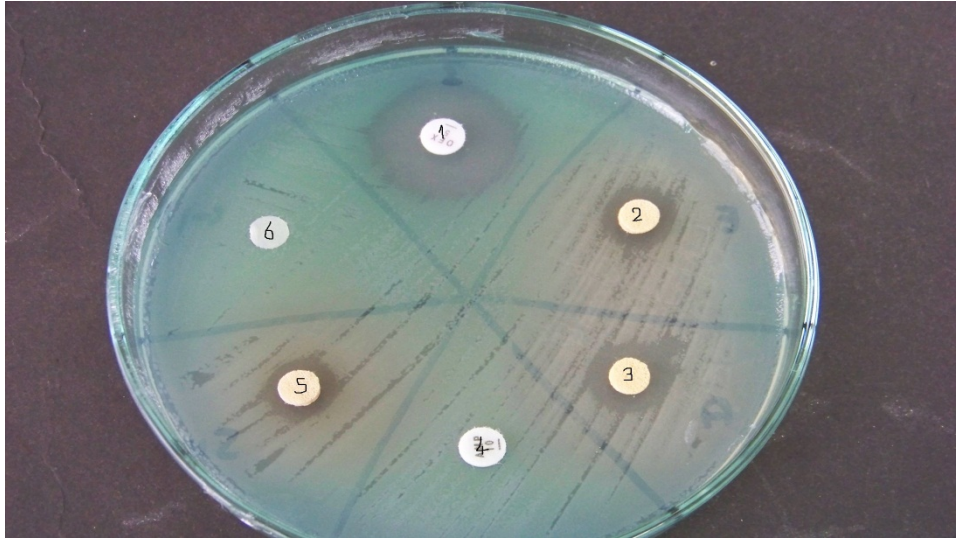
Şekil 4.10.1. TS (4), TE (2), TA (1) 'nın *S.aureus* üzerinde oluşturduğu inhibisyon zonu içeren diskler Oflaxin (3), Ampicilin (6), (5) Negatif kontrol disk (DMSO)



Şekil 4.10.2. TS (1), TE (5), TA (4)'nın *E.coli* üzerinde oluşturduğu inhibisyon zonu içeren diskler Oflaxin (6), Ampicilin (3), (2) Negatif kontrol disk (DMSO)



Şekil 4.10.3. TS (1), TE (2), TA (3) *K.pneumoniae* 'nin üzerinde oluşturduğu inhibisyon zonu içeren diskler Oflaxin (4), Ampicilin 5), (6) Negatif kontrol disk (DMSO)



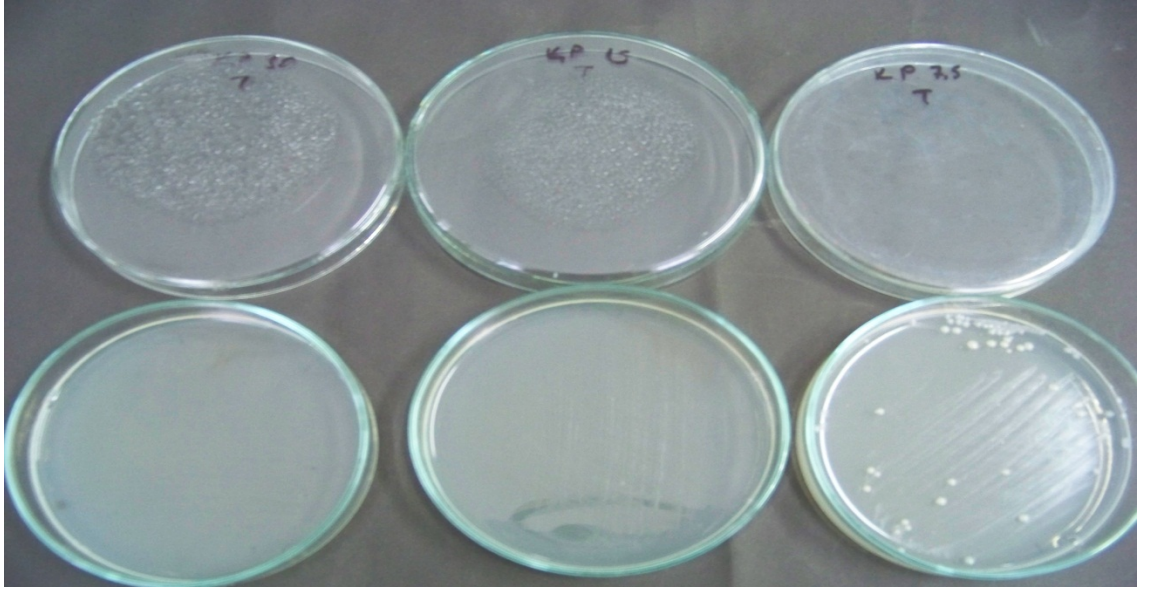
Şekil 4.10.4. TS (2), TE (3), TA (5)'nin *P. aeruginosa* üzerinde oluşturduğu inhibisyon zonu içeren diskler Oflaxin (1), Ampicilin (6) içeren disk, (4) Negatif kontrol disk (DMSO)

Çalışmada kullanılan ekstrelerin antimikrobiyal aktivitelerini gösteren inhibisyon zonu çaplarının yanı sıra MİK değerleri de ölçülmüştür. MİK mikroorganizmaların gelişimini önlemek için gerekli olan en az etken madde veya

antibiyotik miktarıdır. MİK değeri yanında MBK değerlerine de bakılmıştır. MBK (Minimum bakterisidal konsantrasyon) sonuçları tablo 4.5’de verilmiştir.

Tablo 4.5. TS ‘nın Test Mikroorganizmalarına Karşı Makrobroth Yönteminde MIC Değerleri mg/ml

MİKROORGANİZMALAR	MİK DEĞERLERİ	MBK DEĞERLERİ
<i>Escherichia coli</i>	7.5 mg/ml	15 mg/ml
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	7.5 mg/ml	15 mg/ml
<i>Staphylococcus aureus</i>	7.5 mg/ml	15 mg/ml
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	7.5 mg/ml	15 mg/ml



Şekil4.10.5. TS’nin 30, 15 ve 7.5mg/ml konsantrasyonlarındaki *K.pneumoniae* bakterisine göre MBK değerleri

Tablo 4.5.'te bitki ekstraktlarının test mikroorganizmalarına karşı antimikrobiyal aktiviteleri hem disk difüzyon yöntemiyle hem de MİK yöntemiyle incelenmiş genelde tüm mikroorganizmalar üzerinde etkili olduğu tespit edilmiştir.

MİK ile elde edilen sonuçlar MBK ile de desteklenmiştir.

5. TARTIŞMA

Bu çalışmanın başlangıç aşamasında yapılan literatür taramaları *Cotinus coggygria* (Scop.)'nın (tetra bitkisi) esansiyel yağ bileşenlerini ve bu bileşenlerin antioksidan ve antimikrobiyal aktivitelerinin incelendiği (Demirci vd., 2002), ayrıca bitkinin antosiyanin özelliği ile ilgili araştırmaların yapıldığı (Koşar vd., 2002) görülmüştür. Elde edilen kaynaklarda, çalışılması planlanan tetra bitkisinin yapraklarıyla ilgili sınırlı sayıda antioksidan ve antimikrobiyal aktivite çalışmasına rastlanmıştır. Bu yüzden Balkanlara ait bu bitkinin yaprak ekstraktlarının antioksidan ve antimikrobiyal kapasite yönünden detaylı olarak çalışılması planlanmıştır. Kurutulmuş tetra yapraklarından elde edilen su, etanol ve aseton ekstraktlarının total antioksidan aktivite, DPPH serbest radikali giderme aktivitesi ve indirgeme kapasitesi metotlarıyla antioksidan kapasitesinin, toplam fenolik madde miktarının, disk difüzyon ve MİK yöntemleri ile de antimikrobiyal araştırıldı. Çalışılan bitki ekstraktlarının sonuçları kendi aralarında ve benzer literatürlerdeki verilerle kıyaslanarak sonuçlar değerlendirildi.

Bitkiden ekstrakt eldesi katı: sıvı oranı 1:20 olacak şekilde destile su ile 30 dakika kaynatılarak; etanol ve aseton ile 3 saat boyunca oda koşullarında çalkalamalı su banyosunda ekstrakte edilerek yapıldı. (Wong vd., 2006; Mata vd., 2007). Birçok araştırmacı çalışmalarında kullandığı ekstraksiyon yöntemleri; su, metanol, etanol, aseton, petrol eteri, etil asetat, kloroform, diklorometan gibi çeşitli çözücüler veya çözücü karışımları ile homojenizer kullanarak, oda koşullarında bekleterek (maserasyon), çözücü ile kaynatarak ve Soxhlet ekstraksiyonu ile ekstrakt elde etmişlerdir (Nakiboğlu vd., 2007; Su vd., 2007; Silva vd., 2007; Tawaha vd., 2007).

Çalışmamızda ekstraksiyon için polaritesi yüksek, toksitesi diğer çözücülere oranla düşük olan, ekonomik açıdan uygun ve kolay temin edilebilecek çözücüler tercih edildi. Hayouni vd. (2007) ile Özcan vd. (2007) farklı yöntemler ve farklı polariteye sahip çözücüler kullanarak yaptıkları araştırmaları sonucunda % ekstrakt miktarları üzerine polar çözücülerin apolar çözücülerden daha etkili olduğunu

bildirmişlerdir. Bu bulgularla uyumlu olarak, çalışmamızda kullanılan bitkiden ekstrakte edilebilen bileşiklerin ekstraksiyon verimleri genel olarak su > etanol >aseton sıralaması şeklindedir (Tablo 3).

Fenolik bileşikler bütün bitki metabolizmalarında, sekonder metabolit olarak bulunan serbest radikallerin neden olduğu reaksiyonları durdurarak kanser, kalp hastalığı ve akciğer hastalıkları gibi pek çok hastalıkların oluşumuna engel olan çok sayıda farklı nitelik ve miktarlarda bulunabilen bileşiklere denilir (Amarowicz vd., 2010). Son yıllarda fenolik bileşiklerin antioksidan etkilerinin incelenmesi giderek önem kazanmıştır. Fenolik bileşiklerin antialerjik, antiinflamatuvar, antidiyabetik, antimikrobiyal, antipatojenik, antiviral ve antitrombotik etkiye sahip olduğu yapılan pek çok araştırma ile tespit edilmiştir (Nizamlioğlu vd., 2010). Çalışmamızda tetra bitkisinin yaprak ekstraktlarının toplam fenolik miktarı tayinleri FCR ile tayin edilerek ekstraktlardaki miktarlar genel standart olarak kabul edilen gallik asit cinsinden hesaplandı. Toplam fenolik bileşik miktarı su ekstraktı için 199.07 ± 0.044 GAE mg/g ekstrakt, etanol ekstraktı için 176 ± 0.025 GAE mg/g ekstrakt ve aseton ekstraktı için 180.61 ± 0.008 GAE mg/g ekstrakt aralığında değişmektedir (Tablo 4.1.).

Cotinus coggygria (Scop.) bitkisinin dahil olduğu Anacardiaceae ailesinin üyeleri ile yapılan çalışmada *Rhus coriaria* (sumak) bitkisinin esansiyel yağlarının, metanol, su ve etil asetat ekstraktlarının fenolik madde içerikleri sırasıyla 171 ± 2.41 , 5.15 ± 1.11 , 305.21 ± 2.83 GAE mg/g ekstrakt (Koşar vd, 2002) olarak bildirilmiştir. Ayrıca bitki yaprağından elde edilen esansiyel yağlarının metanol ekstraktının toplam fenolik madde içeriği 62.50 ± 2.55 mg/gr (Stanic vd., 2009) olarak bildirilmiştir. Tetra su ekstraktında Folin ile TPC 923.33 ± 14.19 µM QE bulunmuştur (Ivanova vd., 2005).

C. coggygria bitkisinin esansiyel yağ içeriği NMR ve kütle spektrofotometresi ile ayrıştırıldığında fenolik madde içeriğinin yüksek olduğu, içerisinde disulfuretin, sulfuretin, sulfurein, gallik asit, metil gallat, pentagalloyl glukoz gibi antioksidan bileşikler bulunmuştur (Westenburg vd., 2000). Bitkilerdeki polifenol içeriği bitki türü, tarım süreci, iklim şartları, ışık, hasat zamanı ve depolama gibi pek çok dış etki

sebebiyle değişebilir. Ekstraksiyon koşulları, süreci ve çözücü özellikleri de fenolik madde içeriği üzerinde etkilidir (Heimler vd., 2007).

DPPH radikali biyolojik bir radikal olmamasına rağmen, antioksidanların serbest radikal giderme aktivitelerinin tayini için kabul görmüş bir indikatördür (Chen vd.,2007; Wojdylo vd., 2007) Çalışmamızda; bitki ekstraktlarının serbest radikal giderici etkileri stabil bir radikal olan DPPH radikali üzerinden test edilmiştir. DPPH çözeltisi mordur ve antioksidan bir bileşikle etkileştiğinde yapısını değişerek sarı renkli yeni bir bileşik haline gelir. Bu renk değişikliğinin derecesi, antioksidanın konsantrasyonu ile orantılıdır. Çalışmadaki bitki ekstraktlarının radikal giderme kapasitelerine ait grafikler Şekil 4.2.-4.3'de.görölmektedir. Ekstraksiyon için kullanılan çözücülerin radikal giderme aktivitesinde etkili olduğu bilinmektedir.

Çalışılan bitki için radikal giderme aktiviteleri su ekstraktı≥ etanol ekstraktı> aseton ekstraktı sırasıyla şeklindedir (Şekil 4.2-4.3). Bu tez çalışmasında tetra yapraklarından elde edilen ekstraktların DPPH giderme aktiviteleri 1000 µg/mL konsantrasyonu için su ekstraktında % 93.253, etanol ekstraktında % 91.75 ve aseton ekstraktında % 90.216 olarak bulundu. Hatta standart olarak kullanılan BHT ve BHA'nın yüzde inhibisyon değerleri bitki ekstraktlarınkinden daha düşük olduğu belirlendi (Şekil 4.2 - 4.3).

Çalışmada EC₅₀ değerleri µg/ml aralığında belirlenmiştir. DPPH radikali giderme aktivitesi çalışmalarında tüm ekstraktların EC₅₀ değerleri 21.7 – 38.4 µg/ml aralığında EC₅₀ değerleri belirlendi. Kullandıkları referans maddelerin EC₅₀ değerleri BHA= 26.1 µg/ml; BHT= 31.7 µg/ml olarak tayin edilmiştir. EC₅₀ değerlerine bakıldığında su ekstresinin değerinin standartlardan daha düşük bir değerde olduğu gözlemlendi. Bu da su ekstresinin yüksek radikal giderme aktivitesine sahip olduğunun göstergesidir (Tablo 4.2).

İndirgeme kapasitesi tayininde bitki ekstraktlarının Fe⁺³'ü Fe⁺²'ye dönüştürebilmesi incelendi. Bir bileşiğin indirgeme kapasitesi onun elektron transfer edebilmesiyle ilişkilidir ve bu da potansiyel antioksidan aktivitesinin önemli bir göstergesi olarak kabul edilmektedir. Standart olarak BHA, C vitamini, BHT kullanıldı. Ekstraktların Fe⁺³'ü indirgeme açısından standartlarla karşılaştırılabilir

düzye olduğu gözlendi. Bitki ekstraktları kendi aralarında değerlendirildiğinde ise Fe^{+3} 'ü indirgemesi açısından etanol > su \geq aseton ekstraktı şeklinde sıralama gözlendi (Şekil 4.4.).

Bitki ekstraktlarının linoleik asit peroksidasyonu üzerindeki inhibisyon etkisi farklı konsantrasyonlarda FTC metoduna göre çalışıldı. Sonuçlar BHT, BHA ve α - tokoferol standart maddeleriyle karşılaştırıldı. Ekstraktların konsantrasyon artışına bağılı olarak (10-500 $\mu\text{g}/\text{mL}$) lipid peroksidasyon inhibisyonunda da artış gözlendi. Ekstrakt eklenmemiş olan linoleik asit otooksidasyonunun (kontrol) peroksid değerinde hızlı bir artış gözlendi ve artışın 2.5-3. gün de maksimuma ulaştığı görüldü. Genel olarak ekstraktların her birinin linoleik asit peroksidasyonunun inhibisyonunda 50, 100, 250 ve 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$ konsantrasyonlarında önemli derecede antioksidan aktiviteler gösterdiği ve linoleik asit otooksidasyonunun başlama periyodunu uzattığı gözlendi (Tablo 4.3.).

Linoleik asit emülsiyon sisteminde yapılan çalışmada; tetra yaprağı su ,aseton ekstraktlarının 25 mg/mL konsantrasyonu için yüksek inhibisyon oranları (% 82.613 ve % 85.06) gösterdikleri belirlendi (Şekil 4.6).

Linoleik asit peroksidasyonunu önlemede genel olarak bitki örneklerinin su ekstraktlarının , etanol ve aseton ekstraktlarına göre biraz düşük aktiviteler gösterdiği belirlendi. Bu durum deney ortamının apolar karakterli linoleik asit emülsiyonundan oluşması sebebiyle, su ekstraktı içeriğindeki polar karakterli antioksidan bileşikler apolar fazda gerçekleşen reaksiyonlara yeterince katılamamış olabilmesiyle açıklanabilir. Çünkü polar bileşiklerde molekülerarası çekim kuvveti oldukça kuvvetlidir. Apolar bir molekül polar moleküldeki ağı yapısını bozarak çözemez.

E vitamini çalışılan tüm konsantrasyonlarda (2.5-50 $\mu\text{g}/\text{mL}$) ve kontrolde maksimum lipid peroksidasyonunun olduğu ana kadar yüksek inhibisyon etkisi gösterdi (Tablo 4.3.1). Bu süreden sonra (72-84. saat) lipid peroksidasyonunun arttığı gözlendi. Bu artışın sebebi oksidasyonu önlemek veya geciktirmek için ortamda bulunan E vitamininin harcanması ve bunun sonucunda daha az reaktif olan E vitamini radikallerine dönüşmesinden kaynaklanabilir. *İn vivo* koşullarda oluşan E

vitamini radikalleri askorbat veya flavonoidler tarafından rejenere edilerek, tekrar E vitamini formuna dönüştürülmektedir (İşbilir, 2008).

Çalışmamızda, bazı ekstraktların iyi derecede Fe^{+3} indirgeyici kapasiteleri ve elektron verebilme yetenekleri olduğu gözlemlendi. Bu özelliklerinden dolayı ekstraktların reaktif serbest radikal türlerini, daha stabil radikal olmayan türlere dönüştürerek serbest radikal zincirini sonlandırmak üzere rol oynayabilecekleri söylenebilir. Bazı çalışmalarda da Fe^{+3} indirgeyici kapasite ile lipid peroksidasyonunun inhibisyonu arasında güçlü bir ilişki olduğu belirtilmiştir (Juntachote ve Berghofer, 2005; Hinneburg vd., 2006; Özsoy vd., 2008).

Araştırmamızın ikinci aşaması bitkimizin antimikrobiyal aktivitesinin belirlenmesidir. Bitki ekstraktlarının antimikrobiyal aktivitelerinin araştırıldığı çalışmalarda, farklı bitkiler için farklı çözücüler kullanılmıştır. Bu çözücüler arasında metanol, n- bütanol, dietileter, etil asetat, hekzan yer almaktadır (Şahin vd., 2002; Tepe vd., 2003; Oskay vd., 2007; Yı vd., 2007; Kil vd., 2009) *C. coggygia* bitkisinin antimikrobiyal aktivitesini belirlemek amacı ile bitki özütlerinin bazı gram pozitif ve gram negatif bakteriler ve bazı mantarlara (*Aspergillus sp.*) karşı antimikrobiyal aktivite gösterdiği saptanmıştır.

C. coggygia bitkisinin esansiyel yağları ile yapılan bir çalışmada bitki ekstraktının pozitif kontrol amaçlı kullanılan Streptomisin antibiyotığından daha yüksek zon verdiği hatta *S. aureus* bakterisi ile Micrococcus bakterilerine karşı çok iyi zon verip antimikrobiyal aktivitesinin yüksek olduğunu göstermiştir (Novalovi vd., 2007). Bu tez çalışmada *C. coggygia* bitkisinin su ekstresi inhibisyon zonu en yüksek olup sırasıyla etanol ve aseton gelmektedir (Şekil 4.10.1 - 4.10.4). En yüksek aktivite *S. aureus* (ATTC 29213) en düşük aktivite ise *E. faccialis* bakterisi ile *C. albicans*' ta (ATCC 60193) görülmüştür.

Antibiyotik madde içeren disklerin mikroorganizmaların çoğuna etkili olduğu, oluşturdukları inhibisyon zonlarından anlaşıldı. Bitki ekstraktlarının da aynı şekilde inhibisyon zonları meydana getirmesi, yapılarında antimikrobiyal maddelerin bulunduğunu göstermektedir. Bitkilerdeki antimikrobiyal maddelere karşı çeşitli test mikroorganizmalarının farklı ölçülerde etkilendikleri birçok araştırmacı tarafından

doğrulanmaktadır. Bu bitkilerin sahip olduğu kimyasal bileşim, kullanılan mikroorganizma türleri ve ekstraksiyon da kullanılan maddelerin miktarlarındaki farklılıklardan kaynaklandığı düşünülmektedir (Abay, 2006). Çalışmamızda kullanılan ekstraktların da bütün bakterilere karşı etkili olmayışı bu nedenlerden kaynaklanabilir. Araştırmamızda mikroorganizmalar üzerine en etkili çözücünün su olduğu tespit edilmiştir. Su polar çözücü olması, ayrıca kolay buharlaşabilme özelliğine sahip olmasından dolayı sıkça tercih edilen organik bir çözücüdür..

Disk difüzyon yöntemiyle yüksek zon veren tetra bitkisinin su ekstresinin etkili olduğu bakterilere karşı MİK ve MBC değerlerini saptamak amacıyla yapılan deneylerde, bu değerlerin 7.5 mg/ml olduğu belirlendi. Yapılan literatür taramalarında esansiyel yağla ilgili yapılan MİK ve MBK değerinin 2.5 ml/mg konsantrasyonda olduğu gözlenmiştir (Novalovic vd., 2007). Bu değerlerin yüksek çıkmasını, esansiyel yağın direk kullanımı hiçbir çözücüyle karıştırılmaması şeklinde açıklayabiliriz.

Geleceğe yönelik sentetik antioksidanların yerini alabilecek doğal antioksidan arayışları hızla sürmektedir. Bu tip çalışmalarla yüksek antioksidan aktiviteye sahip bitki ekstraktları belirlenerek, bunların gıda sistemlerindeki antioksidan etkilerinin incelenmesi ile çalışmaların endüstriyel uygulamaya yönelik devamlılığının sağlanması düşünülmektedir. Bakterilerin günümüzde kullanılan antibiyotiklere karşı gösterdiği direncin artması bizi bitkilerle tedavi olarak adlandırılan alternatif tıpa doğru yöneltmiştir. Yabancı ülkelere milyonlarca dolar ödeyip ithal ederek, ilaçlarda kullandığımız saf etkili madde yerine daha ucuza elde edilebilecek drog veya ekstreler kullanılabilir.(Baytop vd.,1983).

Bu çalışmada Balkanlarda alternatif tıp uygulamalarında yaygın olarak kullanılan *C. coggygria*'nın antioksidan ve antimikrobiyal özellikleri araştırıldı. *C. coggygria* bitkisi ile ilgili yapılan çalışmalar genelde esansiyel yağları üzerinedir. Çalışmamızda bitkinin yapraklarının ekstraksiyonu çalışılması halk arasında kullanıldığı biçimiyle ele alındı. Tez kapsamında çalışılan bitkilere ait bulguların sonuçlarına göre genel olarak bitkinin 3 farklı ekstraktının da antioksidan ve antimikrobiyal aktiviteye sahip olduğu görülmüştür. Bu bulgular tetra bitkisinin yapraklarının gıda ve ilaç endüstrisinde kullanılan, çeşitli hasarlara sebep olduğu ileri

sürülen sentetik antioksidan maddeler yerine aranılan doğal antioksidan maddelerden biri olabilecek özellikte olduğunu göstermektedir. Özellikle su ekstraktının antioksidan aktivitesinin aseton etanol gibi diğer çözücü ekstraktlarına oranla daha yüksek olması, günlük tüketimde bitkiyi bu konuda iyi bir aday yapmaktadır. Ayrıca *S. aureus* ve *E. coli* gibi patojen mikroorganizmalara karşı oluşturduğu inhibisyon zonu Ampicilin antibiyotiği ile aynı orandadır. Tetra bitkisi ekstraktları antibakteriyal aktivitenini yanı sıra antifungal aktivite de göstermektedir.

Sonuç olarak bu çalışmada, halk arasında şifalı bitki olarak kabul gören ve kullanılan tetra bitkisinin yapraklarından elde edilen ekstraktların herhangi bir ayırıştırma işlemi yapılmaksızın hem antioksidan hem de antimikrobiyal aktivite gösterdiği ile belirlenmiştir.

Bu konu ile ilgili daha fazla araştırma ve yatırım yapıldığı takdirde tarımsal bir ülke olan Türkiye’de bitkisel drog eldesi ve bunlardan ilaç yapılması büyük bir gelişme gösterecektir. İhtiyaç fazlasının satılmasıyla da yeni bir pazar oluşması mümkündür.

6. KAYNAKLAR

- Abay E., (2006). Bazı Bitki Ekstraktlarının Antibakteriyal Etkilerinin Disk Difüzyon Yöntemiyle Araştırılması, Yüksek Lisans Tezi, KARS.
- Akagün G., (2009). Alabaş (*Brassica oleracea var. Gongylodes*) Bitkisinin Antioksidan Aktivitesinin İncelenmesi, Yüksek Lisans Tezi, EDİRNE.
- Akkuş İ, (1995). Serbest aradikaller ve Fizyopatolojik Etkileri, Mimoza Yayınları, Konya
- Akyüz E., (2007). Polygonum bistorta ssp. Carneum Bitki Ekstraktlarının Kromatografik Yöntemlerle Kimyasal Bileşiminin Belirlenmesi ve Antioksidan ve Antimikrobiyal Aktiviteleri, Yüksek Lisans Tezi, TRABZON.
- Altan N., Dinçel A. S., Koca S., (2006). Diabetes Mellitus and Oxidative Stress, Türk Biyokimya Dergisi, 31 (2) 51–56.
- Albayrak S., Aksoy A., Sagdic O., Hamzaoğlu E., (2010). Compositions ,antioxidant and antimicrobial activities of Helichrysum (Asteraceae) species collected from TURKEY .Food Chemistry, 114-122.
- Amarowicz R., Estrella I., Hernández T., Robredo S., Troszyńska A., Kosińska A. and Pegg R. B., (2010). Free radical-scavenging capacity, antioxidant activity, and phenolic composition of green lentil (*Lens culinaris*), Food Chemistry, 121:705-711.
- Bancirova M. (2010). Comparison of the antioxidant capacity and the antimicrobial activity of black and green tea, Food Research International, 43:1379-1382.
- Baytop T., (1999). Türkiye’de Bitkiler İle Tedavi Geçmiste ve Bugün, Nobel Tıp Kitabevi Yayınları, İstanbul, 2, 18-56.

Baytop T., Meriçli A. H., Öztekin,A., (19839, Türkiye’de yapılan ilaçlarda bitkisel drog veya ekstrelerinin kullanılmasının faydaları, IV. Bitkisel İlaç Hammaddeleri Toplantısı, Bildiriler, Eskisehir.

Bilgehan H., (1992): Klinik Mikrobiyolojik Tanı, Barış Yayın Evi, Fakülteler Kitap Evi,İzmir.

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

Diri M., (2006). *Coridothymus capitatus* (L). Reichb. uçucu yağının analizi, su ve etanol ekstraktlarının antioksidant aktivitelerinin belirlenmesi, Yüksek Lisans Tezi, MUĞLA.

Dağcı E. K., Dığrak M., (2005). Bazı Meyve Ekstraktlarının Antibakteriyal ve Antifungal Aktiviteleri, KSÜ. Fen ve Mühendislik Dergisi, 8(2).

De Zwart L. L., Meerman J. H., Commandeur J. N., Vermeulen N. P., (1999). Biomarkers of free radical damage applications in experimental animals and in humans, *Free radic. .Bio. Med.*, 26(1-2):202-260.

Erecevit P., (2007). Tıbbi Amaçlı Kullanılan Bazı Bitki Türlerinin Antimikrobiyal Aktivitelerinin Araştırılması, Yüksek Lisans Tezi, ELAZIĞ.

Esen M., (2008). *Verbascum pinetorum* (Boiss.) O.Kuntze Bitki Ekstraktının Antimikrobiyal ve Antioksidan Aktivitesinin Belirlenmesi, Yüksek Lisans Tezi, HATAY.

Finch, R.G., (1998). Antibiotic resistance, *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 42 (2):125-128.

Frankel E. N., Meyer A. S., (2000). The problems of using one-dimensional methods to evaluate multifunctional food and biological antioxidants., *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 80, 1925-1941.

Günay Z., (2002). Antibiyotik Duyarlılık Testi Yorumları, Türk Toraks Dergisi, 3(1), 75-88.

Gül M., Şensoy A., Çetin B., Korkmaz F., Seber E., (2004). Hastane infeksiyon etkeni *Pseudomonas aeruginosa* suşlarında seftozidine duyarlılığının E testi ve disk difüzyon yöntemleri ile Araştırılması, Turk Mikrobiyal Cem. Dergisi, 34:33-36 .

Halliwell B., Gutteridge J. M., Cross C. M., (1992). Free radicals, antioxidants, and human disease: where are we now? , J Lab.Clin Med, 119(6) 598:620

Halliwell B., (1995). Antioxidant characterization. Methodology and mechanism, Biochem Pharmacol, 49(10):1341-8.

Halliwell B. (1996). Antioxidants in Human Health and Disease, Annual Review of Nutrition, 16: 33-50.

Halvorsen B. L., Holte K., Myhrstad M. C. W., Barigmo I., Hvattum E., Remberg S. F. vd., (2002). A systematic screening of total antioxidants in dietary plants., The Journal of Nutrition, 132(3), 461-471.

Heimler D., Vignolini P., Dini M.G., Vincieri F.F., Pomani A., (2006). Antiradical activity and polyphenol composition of local Brassicaceae edible varieties, Food Chemistry, 99,464-469.

İlçim A., Dığrak M., (1998). Bazı Bitki Ekstraktlarının Antimikrobiyal Etkilerinin Araştırılması, Tr. J. of Biology, 22:119-125.

İşbilir Ş. S., (2008). Yaprakları Salata-Baharat Olarak Tüketilen Bazı Bitkilerin Antioksidan Aktivitelerinin İncelenmesi, Doktora Tezi, EDİRNE.

Karakaya S., El S. N., (2006). Total Phenols and Antioxidant Activities of Some Herbal Teas and *In Vitro* Bioavailability of Black Tea Polyphenols, GOÜ. Ziraat Fakültesi Dergisi, 23 (1), 1-8.

Keaney JF., Frei B., (1994). Antioxidant protection of LDL and its role in the prevention of atherosclerotic vascular disease, In: Natural Antioxidants in Health and Disease, Ed: Frei B., Academic Pres Inc., 303-309.

Kelen M., Tepe B., (2008). Chemical composition ,antioxidant and antimicrobial properties of the essential oils of three Salvia species from Turkish flora,Bioreource Techology, 99:4096-4104.

Kırbağ S., Zengin F., (2006). Elazığ Yöresindeki Bazı Tıbbi Bitkilerin Antimicrobial Aktiviteleri, Tarım Bilimleri Dergisi, 16(2):77-80.

Kılınç M., Kutbay G.H., (2007). Bitki Coğrafyası, Palme Yayıncılık, 229-230, Ankara.

Kil H. Y., Seong E. S., Ghimire B. K., Chung M., Kwon S., S. ,Goh E. J., Heo K., Kim M. J., Lim J.D., Lee D., Yu C. Y., (2009). Antioxidant and antimicrobial activities of crude Sorghum ekstract,Food Chemistry, 115:1234-1239.

Mercan U., (2004). Toksikolojide Serbest Radikallerin Önemi, YYU Vet. Fak., 15(1-2):91-96.

Mata AT., Proença C., Ferreira AR., Serralheiro M.L.M., Nogueira J.M.F., Araujo M.E.M., (2007). Antioxidant and antiacetylcholinesterase activities of five plants used as Portuguese food spices., Food Chemistry, 103, 778-786.

Mates J. M., Peres-G., Costo I. N., (1999). Antioxidant,enzymes and human diseases, Clin. Biochem, 32, 595-603.

Murray R. K. ,Mayes P. A., Granner D. K. ,Rodwell V. W., (1996) Haper'ın Biyokimyası, Barış Kitabevi Yayınları, İstanbul.

Nićiforović N, Mihailović V, Masković P,S. Solujić, A. Stojković and D. Pavlović Muratspahic , (2010). Antioxidant activity of selected plant species; potential new sources of natural antioxidants, Food and Chemical Toxicology, 48:3125-3130.

Nizamoğlu M. N., Nas S., (2010). Meyve ve Sebzelerde Bulunan Fenolik Bileşikler; Yapıları ve Önemleri, Gıda Teknolojileri Elektronik Dergisi, 5(1), 20-35.

M. Novaković, I. Vučković, P. Janačković, M. Soković, A. Filipović, V. Tešević and S. Milosavljević, (2007). Chemical composition, antibacterial and antifungal activity of the essential oils of *Cotinus coggygia* from Serbia, Journal of the Serbian Chemical Society, 72(11) 1045-1051.

Ocksook Y1, Eduardo M. Jovel, G. H. Neil Towers, Wahbe T. R., Cho D., (2007). Antioxidant and antimicrobial activities of native *Rosa sp.* From British Columbia, Canada, 58(3), 178-189.

Oliveira I., Sousa A. , Isabel C.F.R., Ferreira, Bento A. , Estevinho L. and Pereira A. J., (2008). Total phenols, antioxidant potential and antimicrobial activity of walnut (*Juglans regia* L.) green husks ,Food and Chemical Toxicology , 46, 2326-2331.

Pan y., Zhang x., Wang h., Liang y., Zhu j., Li h., Zhang z., Wu Q.,(2007). Antioxidant potential of ethanolic extract of *Polygonum cuspidatum* and application in peanut oil, *Food Chemistry*, 105(4), 1518-1524.

Onat T., Emerk K. ,Sözmen E. Y., (2002). İnsan Biyokimyası, Palme Yayıncılık, İstanbul, 674 .

Oskay M., Aktaş K., Sari D., Azeri C., (2007). *Asphodelus aestivus* (Liliaceae)'un Antimikrobiyal Etkisinin Çukur ve Disk Diffüzyon Yöntemiyle Karsilastirmali olarak belirlenmesi, *Ekoloji*, 16, 62-65.

Öztürk H., (2009). *Jurinea Consanguinea* 'nın Antioksidan ve Antibakteriyel Aktivitesinin Belirlenmesi, Yüksek Lisans Tezi, EDİRNE.

Pijut P. M., (2008). *Cotinus* P. Mill, USDA Forest Services North Central Research Station, Purdue, Indiana.

Rankoviç B., Rankoviç D., Mariç D., (2010). Antioxidant and Antimicrobial Activity of Some Lichen Species,.79(6), 809-815.

Rice-Evans C. A., Miller N. J. ve Paganga G., (1997). Antioxidant properties of phenolic compounds, *Trends Plant Sci.*, 2, 152-159.

Sanja Matić, Snežana Stanić, Slavica Solujić , Sukdolak & Tanja Milošević, (2009). Genotoxicity Testing of the Methanol Extract of the Plant *Cotinus coggygria* and Gallic acid on *Drosophila Melanogaster*, 61(2), 261-266.

Sies H., (1991). Oxidative stress :from basic research to clinical application, *Am J. Med*, 91(3), 31-38.

Singleton VL., Rossi JA., (1965). Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents, *American Journal of Enology and Viticulture*, 16, 144-158.

Tawaha K., Alalı Q., Gharaibeh M., Mohammad M., El-elımat T.,(2007). Antioxidant activity and total phenolic of selected Jordanian plant species, *Food Chemistry*, 104, 1372-1378

Temur N., (2006). am, kavak, sgt ve armut ağaçları üzerinde yetişen kse otu (*Viscum album l.*) bitkilerinin antioksidan aktivitelerinin incelenmesi, Yüksek Lisans Tezi, TOKAT.

Toroğlu S.Dığrak M., enet M., (2006). Baharat olarak tüketilen *Laurus nobilis* Linn ve *Zingiber officinale* Roscoe Bitki Uçucu Yağlarının Antimikrobiyal Aktiviteleri Ve Antibiyotiklere In-Vitro Etkilerinin Belirlenmesi, *KS Fen Müh. Dergisi*, 9(1).

Turan T., (2007). Cumhuriyet Üniversitesi Araştırma Ve Uygulama Hastanesi Mikrobiyoloji Labaratuarına Gönderilen rneklerdeki *Pseudomonas aureginosa* Őuřlarının *İn-Vitro* Antibiyotik Duyarlıklarının Son 10 yıl Açısından Değerlendirilmesi, Yüksek Lisans Tezi, SİVAS.

Türkoğlu A., Duru M. E., Mercan N., Kıvrak İ.,Gezer K., (2007). Antioxidant and Antimicrobial Activities Of *Laetiporus sulphureus* (Bull.) Murrill, *Food Chemistry* , 101, 267-273.

Türkyılmaz Z., (2003). İskemi-reperfüzyon zedelenmesinde pentoksifilin, dimetilsülfoksit ve eksojen melatoninin koruyucu etkilerinin karşılaştırılması., Genel Cerrahi Uzmanlık Tezi, Edirne.

Ünal E., (2006). Türkiye florasında doğal olarak yetişen bazı bitki türlerinin antimikrobiale ve antioksidan aktivitelerinin incelenmesi, Yüksek Lisans Tezi, ERZURUM.

Yıldırım S., (2006). Bazı Heracleum L. (Umbelliferae) taksonlarının antimikrobiyal aktivitelerinin incelenmesi., Yüksek Lisans Tezi, KIRIKKALE.

Yiğit D., Yiğit N., Aktaş E., Özgen U., (2009). Ceviz (*Juglans regia* L.)'nin Antibakteriyel Aktivitesi, Turk Mikrobiyal Cem. Derg., 39(1-2), 7-11.

Winston G., (1991). Oxidant and Antioxidants in Aquatic Animals Comp. ,Biochem Phys., 100, 173-176.

URL1-<http://www.genbilim.com/content/view> (2008)

URL2-<http://www.mustafaaltinisik.org.uk> (2000)

URL3-[http://www.mikrobiyoloji.org/TR/Genel Bilgi](http://www.mikrobiyoloji.org/TR/Genel_Bilgi)

URL4-<http://www.tarimziraat.com>

URL5-<http://www.biyolojimerkez.com/>

URL6-<http://www.britanica.com/>

URL7-http://delta_intkey.com

URL8-<http://www.ağaçlar.net/forum/southread>

URL9-<http://www.discoverlife.org/mp/cotinus>

URL10-<http://www.wildchicken.com/cotinus>

URL11-http://en_wikipedia.org/

URL12<http://tr.wikipedia.org/>

URL13-http://wep_inonu.edu.tr/

ÖZGEÇMİŞ

14 Ekim 1986 tarihinde Sivas ‘ta doğdum.İlk ve orta öğrenimimi Rauf Orbay İlköğretim Okulunda 2000 yılında tamamladım.2000-2004 yılları arasında lise öğrenimimi Habire Yahşi Lisesinde tamamladım. 2005 yılında Trakya Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü’nde okumaya hak kazandım.

2009 yılında lisans eğitimimi tamamladım.2009 yılında bu yana Trakya Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü ,Biyoloji Anabilim Dalı ,Molekülerbiyoloji Dalı ‘nda yüksek lisans yapmaktayım.