



T.C.
SELÇUK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ



KARADUT (*Morus nigra* L.) MEYVE
ÖZÜTÜNÜN MUTAJENİK, ANTİMUTAJENİK
VE ANTİMİKROBİYAL AKTİVİTE
YÖNÜNDEN ARAŞTIRILMASI

Ümran GÜNTER

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Biyoloji Anabilim Dalı

Mayıs-2017
KONYA
Her Hakkı Saklıdır

TEZ KABUL VE ONAYI

Ümran GÜNTER tarafından hazırlanan "Karadut (*Morus nigra* L.) meyve özütünün mutajenik, antimutajenik ve antimikrobiyal aktivite yönünden araştırılması" adlı tez çalışması **24/05/ 2017** tarihinde aşağıdaki jüri tarafından oy birliği ile Selçuk Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalı'nda YÜKSEK LİSANS TEZİ olarak kabul edilmiştir.

Jüri Üyeleri

Başkan

Prof. Dr. Ali ATEŞ

Danışman

Prof. Dr. Yusuf DURAK

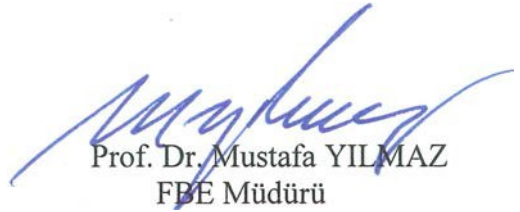
Üye

Doç.Dr. Rüstem DUMAN

imza



Yukarıdaki sonucu onaylarım.



Prof. Dr. Mustafa YILMAZ
FBE Müdürü

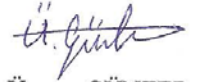
Bu tez çalışması BAP tarafından **15201072** nolu proje ile desteklenmiştir.

TEZ BİLDİRİMİ

Bu tezdeki bütün bilgilerin etik davranış ve akademik kurallar çerçevesinde elde edildiğini ve tez yazım kurallarına uygun olarak hazırlanan bu çalışmada bana ait olmayan her türlü ifade ve bilginin kaynağına eksiksiz atıf yapıldığını bildiririm. .

DECLARATION PAGE

I hereby declare that all information in this document has been obtained and presented in accordance with academic rules and ethical conduct. I also declare that, as required by these rules and conduct, I have fully cited and referenced all material and results that are not original to this work.



Ümran GÜNTER

24.05.2017

ÖZET
YÜKSEK LİSANS TEZİ

**KARADUT (*Morus nigra* L.) MEYVE ÖZÜTÜNÜN MUTAJENİK,
ANTİMUTAJENİK VE ANTİMİKROBİYAL AKTİVİTE YÖNÜNDEN
ARAŞTIRILMASI**

Ümran GÜNTER

**Selçuk Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü
Biyoloji Anabilim Dalı**

Danışman: Prof. Dr. Yusuf DURAK

2017, 57+IX Sayfa

Jüri
Prof. Dr. Yusuf DURAK
Prof. Dr. Ali ATEŞ
Doç. Dr. Rüstem DUMAN

Bu çalışmada; *Morus nigra* L. (Karadut) meyve özütünün mutajenik, antimutajenik ve antimikrobiyal özellikleri araştırıldı. Antimikrobiyal aktivite mikrodilüsyon yöntemi ile, mutajenik ve antimutajenik özellikleri ise *Salmonella*/mikrozom test sistemi ile incelendi. Çalışmalarda standart plak inkorporasyon metodu uygulandı. Denemeler *Salmonella typhimurium* TA 98 ve TA 100 suşları üzerinde metabolik aktivasyon enzimleri (S9) varlığında ve yokluğunda yapıldı. 10000, 5000, 2500, 1000 ve 500 µg /plak dozlar kullanıldı. S9 enzimleri varlığında ve yokluğunda tüm özütlerin olası mutajenik aktivitesi belirlenemedi. Bu durumda aynı dozlarda sodyum azid, 4-nitrofenilendiamin, 2- aminoantrasen ve 2- aminofluoren gibi bilinen mutajenlere karşı ekstraktların antimutajenik aktiviteleri araştırıldı. *Morus nigra* L. ekstraktının, 10000, 5000, 2500, 1000 ve 500 µg/plak dozlarında *Salmomella typhimurium* TA 100 suşu üzerinde S9 varlığında zayıf derecede antimutajenik aktiviteye (% 6, % 4, % 3, % 0, % 0) sahip olduğu belirlendi. *Morus nigra* L. meyve özütünün TA 100 suşu üzerinde, S9 yokluğunda sodyum azid'e (10 µg/plak) karşı 10000 µg/plak dozunda % 20 oranında zayıf derecede antimutajenik aktivite gösterirken, diğer 5000, 2500, 1000 ve 500 µg/plak dozlarında ise sırasıyla % 14, % 5, % 4 ve % 3 oranlarında zayıf derecede antimutajenik aktivite belirlendi. *Morus nigra* L. meyve özütünün TA 98 suşu üzerinde, S9 yokluğunda 4-nitro-o-fenilendiamin (200 µg/plak)' e karşı 10000 µg/plak dozunda % 31 oranında orta derecede antimutajenik aktivite gösterdiği fakat 5000, 2500, 1000 ve 500 µg/plak dozlarında ise sırasıyla % 20, % 16, % 8 ve % 6 oranlarında zayıf derecede antimutajenik aktivite gösterdiği belirlendi. Özütlerin S9 varlığında 2-Aminofluoren (200 µg/plak) karşı ise sadece 10000 µg/plak dozunda % 10 oranı ile zayıf dereceli antimutajenik aktivite gösterdiği, 5000, 2500, 1000 ve 500 µg/plak dozlarında ise sırasıyla % 6, % 10, % 7 ve % 7 oranlarında zayıf dereceli antimutajenik aktivite belirlendi. Antimikrobiyal çalışma sonucunda; özütlerin *Escherichia coli*, *Sarcina lutea*, *Salmonella typhimurium* ve *Yersinia enterocolitica* suşlarına karşı MİK değeri 6.25 mg/ml olarak belirlenirken, *Salmonella enteritidis* için 3.12 mg/ml ve *Listeria monocytogenes* için 1.56 mg/ml olarak belirlenmiştir. *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae*, *Staphylococcus aureus* ve *Proteus mirabilis* suşlarına karşı ise herhangi bir MİK değeri belirlenememiştir. *Candida albicans* suşuna karşı 3.12 mg/ml konsantrasyonda inhibisyon göstermesi, *C. albicans* kaynaklı ağız yaralarının iyileştirilmesinde etkili olmasını açıklamaktadır.

Sonuç olarak karadut (*Morus nigra* L.) meyve özütünün mutajenik etki göstermedikleri fakat antimutajenik ve antimikrobiyal aktivite yönünden farklı derecelerde etkili oldukları belirlenmiştir.

Anahtar Kelimeler: *Morus nigra* L., Ames testi, Antimikrobiyal etki, Mutajenik ve antimutajenik aktivite.



ABSTRACT

MS THESIS

INVESTIGATION OF MUTAGENICITY, ANTIMUTAGENICITY AND ANTIMICROBIAL ACTIVITY OF BLACK MULBERRY'S (*Morus nigra* L.) FRUIT EXTRACT

Ümran GÜNTER

THE GRADUATE SCHOOL OF NATURAL AND APPLIED SCIENCE OF
SELÇUK UNIVERSITY
THE DEGREE OF MASTER OF SCIENCE IN BIOLOGY

Advisor: Prof. Dr. Yusuf DURAK

2017, 57+IX Pages

Jury

Prof. Dr. Yusuf DURAK

Prof. Dr. Ali ATEŞ

Assoc. Prof. Dr. Rüstem DUMAN

In this study; mutagenic, antimutagenic and antimicrobial properties of *Morus nigra* L. (Karadut) fruit extracts were investigated. Antimicrobial activity was examined by microdilution method while mutagenic and antimutagenic properties by *Salmonella* / microsome test system. Standard plate incorporation method was applied in the studies. Experiments were performed in the presence and absence of metabolic activation enzymes (S9) on *Salmonella typhimurium* TA 98 and TA 100 strains. 10000, 5000, 2500, 1000 and 500 µg / plaque doses were used. The possible mutagenic activity of all extracts could not be determined in the presence and absence of S9 enzymes. In this case, antimutagenic activities of extracts against known mutageneses such as sodium azide, 4-nitrophenylenediamine, 2-aminoanthracene and 2-aminofluoresin were investigated at the same doses. *Morus nigra* extract was found to have weak antimutagenic activity (6 %, 4 %, 3 %, 0 %, 0 %) in the presence of S9 on *Salmonella typhimurium* TA 100 strains at doses of 10000, 5000, 2500, 1000 and 500 µg / plaque. *Morus nigra* L. fruit extract showed 20 % weakly antimutagenic activity on TA 100 strain at 10000 µg / plaque dose against sodium azide (10 µg / plaque) in the absence of S9 while the other 5000, 2500, 1000 and 500 µg / plaque doses antimutagenic activity was detected at a low rate of 14 %, 5 %, 4 % and 3 % respectively. *Morus nigra* L. fruit extract showed moderate antimutagenic activity on TA 98 strain at a dose of 10000 µg / plaque versus 4-nitro-o-phenylenediamine (200 µg / plaque) in the absence of S9 but 5000, 2500, 1000 and 500 µg / plaque doses was determined that they had weakly antimutagenic activity at 20 %, 16 %, 8 % and 6 %, respectively. Extracts exhibited 10 % rate as a poor grade antimutagenic activity at a dose of 10000 µg / plaque versus 2-Aminofluorene (200 µg / plaque) in the presence of S9 while 6 %, 10 %, 7 % and 7 % rate as weak antimutagenic activities determined for 5000, 2500, 1000 and 500 µg / plaque. As a result of the antimicrobial study; MIC value was determined as 6.25 mg / ml against *Escherichia coli*, *Sarcina lutea*, *Salmonella typhimurium* and *Yersinia enterocolitica* strains while 3.12 mg / ml for *Salmonella enteritidis* and 1.56 mg / ml for *Listeria monocytogenes*. No MIC values were seen against *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae*, *Staphylococcus aureus* and *Proteus mirabilis* strains. The inhibition at the 3.12 mg / ml concentration versus the *Candida albicans* strain indicates that it is effective in the treatment of *C. Albicans* originated oral wounds.

As a result, the black mulberry (*Morus nigra* L.) fruit extract were not show any mutagenic activity but showed some different of antimutagenic and antimicrobial activity.

Key words: *Morus nigra* L., Ames test, Antimicrobial effect, Mutagenic and antimutagenic activity.



ÖNSÖZ

Bu çalışma 2014-2017 yılları arasında Selçuk Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalında yüksek lisans tezi olarak hazırlandı. Çalışmada Karadut (*Morus nigra* L.) meyve özütünün Ames/Salmonella mikrozom test sistemi ile mutajenik, antimutajenik etkileri ve sıvı mikrodilüsyon yöntemi ile antimikrobiyal aktivitesi araştırıldı. Laboratuvar çalışmaları S.Ü. Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü Mikrobiyoloji Araştırma Laboratuvarında gerçekleştirildi.

Tez konumun belirlenmesi ve yürütülmesinde bilgi ve deneyimleri ile beni yönlendiren değerli danışmanım sayın Prof. Dr. Yusuf DURAK'a (S.Ü. Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü), değerli bilgilerini, yardım ve önerilerini benden esirgemeyen, her zaman yol gösteren değerli hocam Doç. Dr. Ahmet UYSAL'a (S.Ü. Sağlık Hizmetleri Meslek Yüksek Okulu), çalışmalarım sırasında her konuda yardımcı olan değerli hocam Arş. Gör. Erdoğan GÜNEŞ'e (S.Ü. Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü) , tez çalışmamda benimle birlikte çalışan arkadaşım Handan ÇELİK'e (S.Ü. Biyoloji Bölümü Yüksek Lisans Öğrencisi) , hayatım boyunca maddi ve manevi açıdan benden desteğini esirgemeyen, varlıklarıyla beni cesaretlendiren, dürüst ve vicdan sahibi bir birey olmayı öğreten ve her zaman yanımda olan annem, babam ve kız kardeşlerim olmak üzere bütün aileme ve sevdiklerime teşekkürlerimi sunuyorum.

Ayrıca bu çalışmayı 15201072 nolu proje ile destekleyen S.Ü. Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğü'ne teşekkürlerimi sunarım.

Ümran GÜNTER
KONYA-2017



İÇİNDEKİLER

ÖZET	iv
ABSTRACT.....	iv
ÖNSÖZ.....	vi
İÇİNDEKİLER	vii
SİMGELER VE KISALTMALAR	ix
1. GİRİŞ	1
2. KAYNAK ARAŞTIRMASI	3
3. MATERYAL VE YÖNTEM.....	112
3.1. Materyal	13
3.1.1.Karadut (<i>Morus nigra</i> L.) Meyvelerinin Toplanması.....	13
3.1.2.Çalışmada kullanılan test suşları.....	14
3.1.3.Kimyasal maddeler.....	14
3.1.4.Çalışmada kullanılan standart mikroorganizma test suşları	15
3.1.5.Çalışmada kullanılan çözeltiler, tamponlar ve besiyerleri :	16
3.1.6. Antimikrobiyal Aktivitenin Belirlenmesi.....	23
3.1.6.1.Sıvı Mikrodilüsyon Yöntemi.....	23
3.2.Yöntem.....	24
3.2.1.Meyve özütünün hazırlanması.....	24
3.2.2.Çalışmada kullanılan test suşlarının üretilmesi	24
3.2.3. <i>Salmonella</i> /mikrozom test sisteminde kullanılan suşların genetik özelliklerinin kontrolü	25
3.2.4. Spontan , revertant koloni sayısının kontrolü	28
3.2.5. Master plakların çalışmada hazırlanışı.....	29
3.2.6. Pozitif kontrol.....	30
3.2.7. Negatif kontrol.....	31
3.2.8. Mutajenite deneyi (Ames/ <i>Salmonella</i> /mikrozom testi).....	31
3.2.8.1. S9'suz deneyin yapılması.....	32
3.2.8.2. S9'lu deneyin yapılması.....	32
3.2.9. Antimutajenite deneyi.....	33
3.2.9.1 S9 yokluğunda yapılan çalışma	33
3.2.9.2 S9 varlığında yapılan çalışma	34
3.2.10. Mutajenite çalışması sonuçlarının değerlendirilmesi	34
3.2.11. Antimutajenite çalışma sonuçlarının değerlendirilmesi	35
3.2.12. Antimikrobiyal aktivitenin belirlenmesi.....	36
3.2.12.1 Sıvı mikrodilüsyon (Broth dilüsyon) yöntemi ve sonuçlarının değerlendirilmesi.....	36



4. ARAŞTIRMA SONUÇLARI VE TARTIŞMA	37
4.1. Çalışmada Test Suşlarının Üreme Durumları	37
4.2. <i>Morus nigra</i> L. Meyve Özütlerinin Mutajenik Aktivite Sonuçları.....	38
4.3. <i>Morus nigra</i> L. Meyve Özütlerinin Antimutajenik Aktivite Sonuçları	40
4.4. <i>Morus nigra</i> L. Meyve Özütlerinin Antimikrobiyal Aktivite Sonuçları	45
4.5. Tartışma.....	47
5. SONUÇLAR VE ÖNERİLER	50
KAYNAKLAR	51
ÖZGEÇMİŞ.....	57





SİMGELER VE KISALTMALAR

Simgeler

°C	:	santigrad derece
cm	:	santi metre
g	:	gram
kg	:	kilo gram
l	:	litre
mg	:	mili gram
ml	:	mili litre
mm	:	mili metre
mM	:	mili molar
µg	:	mikro gram
µl	:	mikro litre
µm	:	mikro metre
µM	:	mikro molar

Kısaltmalar

KOB	:	Koloni oluşturan birim
DMSO	:	Dimetil sülfoksit
2-AA	:	2-aminoantrasen
2-AF	:	2-aminoflounen
SA	:	Sodyum azid
4-NPDA	:	4-nitro-o-fenilendiamin
TTC	:	Triphehnyltetrazolium chloride
MIC	:	Minimum inhibition concentration



1. GİRİŞ

Meyvelerin lif ve vitaminler yönünden zengin olmasının yanısıra iştah artırıcı özelliği ile yoğun meyve şekeri (fruktoz) içermeleri, sağlık ve beslenmesi açısından ilgi çekmektedir (Karaca, 2009).

Dut, kuzey yarımkürenin sıcak ve astropikal (alt tropikal) bölgelerinde, güney yarımkürenin ise tropik bölgelerinde geniş bir iklim, topografya ve toprak koşullarında yetişebilen bir meyvedir. Çin ve Hindistan gibi bazı ülkelerde, yapraklarının ipek böceği yemi olarak kullanılması amacıyla yetiştirilirken, Türkiye, İtalya ve Yunanistan'ın da içinde bulunduğu bazı ülkelerde ise meyve olarak tüketilmektedir (Ercisli ve Orhan, 2007). Karadut İran orijinli bir meyve olup Kuzey Avrupa, Güney Asya ve pek çok Akdeniz ülkesinde yetişmektedir (Ercisli ve Orhan, 2008).

Karadut (*Morus nigra* L.) *Angiospermae* (kapalı tohumlar) bölümünden, iki çenekliler sınıfından, *Urticales* takımının *Moraceae* familyasının *Morus* cinsine dahildir (Ercisli ve Orhan, 2007; Ibrahim ve Bayir, 2010).

Morus nigra L. 10-15 m boyunda kalın dallı ve geniş tepeli bir ağaçtır. Çiçek yaprakları tüylü, yumurtalık yuvarlak yumurta biçiminde ve tepecik uzun tüylüdür. Olgunlaşmaya başlayan meyve parlak kırmızı, tam olgunlaşmış meyve siyah renklidir. Meyvesi olgunlaştıktan sonra toplanan, taze ya da kurutulduktan sonra meyve olarak veya şurup yapıldıktan sonra tüketilen meyvedir (Yiğit ve ark., 2007). Bileşiminde bulunan papiriflavalon A, kuraridin, saforaflavanon D ve saforaiso flavanon A güçlü antimikrobiyal aktivite göstermektedir. Yapısında bulunan 2-arilbenzofuran metisilin dirençli stafilokoklar üzerinde etki göstermektedir (Şengün ve Yücel, 2008).

Dut meyvesi, laksidatif (barsak boşaltmaya yardım edici), dizanteri tedavisinde tamamlayıcı (yardım edici), odontaljik (diş ve çevresindeki dokularda ortaya çıkan ağrılara karşı), antihelmitik (barsak kurduna karşı), ekseptorant (balgam söktürücü), hipoglisemik (kan şekerini düşürücü), emetik (kusturucu) amaçlarla kullanımının yanı sıra, Türkiye'de ağız lezyonlarının tedavisinde de kullanılmaktadır (Lin ve Tang, 2007; Özgen ve ark., 2009). Dut meyvesi; antifungal, antimikrobiyal, anti- HIV, antialerjik ve antioksidan etkisinden dolayı tıbbi amaçlarla da kullanılmaktadır (Pehlivan ve ark., 2012).

Günümüzde artık bazı meyve ve sebzelerin içerdiği antioksidan maddelerin kanser, kalp ve damar hastalıklarına karşı koruyucu etkisinin vurgulanmasıyla beraber, tüketiciler antioksidan maddelerce zengin ürünleri tercih etmeye başlamış ve dolayısı ile

ürünlerin antioksidan kapasiteleri, onların kalite kriterleri arasına girmiştir (Özgen ve Tokbaş, 2007). Özellikle antosiyanince zengin olan ahududu, böğürtlen, dut, nar, çilek, vişne, kiraz, erik, üzüm, lahana, pancar ve patlıcan gibi koyu kırmızı ve mor renkli meyve ve sebzelerin bazı kanser çeşitleri, damar ve kalp rahatsızlıkları gibi erken ölümlere neden olan hastalıkların ortaya çıkmasını engellemede çok etkili olduğu yapılan çalışmalarla kanıtlanmaya çalışılmıştır.

Bitkisel metabolitlerin antimutajenik aktivitelerinin belirlenmesinde, deney hayvanları kullanılarak yapılan *in-vivo* çalışmalar uzun süre ve yüksek maliyet nedeniyle başlangıç aşamasında tercih edilen test sistemleri değildir (Organization ve Cancer, 1980). Bu nedenle araştırmacılar, antikarsinojenite taramalarına esas olabilecek, kısa zamanda sonuç verebilen ve düşük maliyetli birçok kısa zamanlı mutajenite test sistemleri geliştirmişlerdir (Mortelmans ve Zeiger, 2000).

Ames-Salmonella/mikrozom test sistemi kısa zamanlı mutajenite test sistemlerinden biri olup antimutajen/antikarsinojenlerin veya tersine mutajen/karsinojenlerin tespit edilmesinde sıklıkla kullanılan önemli bir testtir (Abdullaev ve ark., 2003).

Antimikrobiyal maddelerin bazıları sentetik olarak (örneğin kloramfenikol) ya da yarı sentetik olarak (örneğin bazı penisilinler, sefalosporinler) üretilmektedir. Bu nedenle antimikrobiyal madde; bir organizma tarafından üretilen veya sentetik olarak elde edilen, diğer mikroorganizmalar üzerine mikrobisit (öldürücü) veya mikrobiyostatik (üremelerini durdurucu) etki gösteren ve infeksiyon hastalıklarının tedavisinde kullanılan maddeler olarak tanımlanmaktadır (Akman, 1983).

Bitki ekstraktlarının antimikrobiyal etkisi, farklı bileşenlerden kaynaklanmakta ve bunların bazılarını fitokimyasal bileşikler oluşturmaktadır. Antimikrobiyal etkinin oluşumunda, polifenollerin bakteri membranı tarafından absorpsiyonu sonucunda, membranın parçalanması ve hücre içi maddelerin dışarı sızması, ayrıca polifenollerden de hidroperoksitlerin üretilmesi önemli rol almaktadır (Ikigai ve ark., 1993; Akagawa ve ark., 2003).

Bu çalışmada; karadut cinsi ve birçok türünün biyolojik aktiviteleri belirlenmiş olan *Morus* (*Moraceae*) cinsine ait *Morus nigra* L. meyve özütünün mutajenik potansiyellerinin yanı sıra sodyum azid, 4-nitrofenilendiamin, 2- aminoantrasen ve 2- aminofloren gibi bilinen mutajenlere karşı antimutajenik potansiyellerinin de Ames testi ile araştırılması, ayrıca sıvı mikrodilüsyon yöntemi ile antimikrobiyal aktivitesinin belirlenmesi amaçlanmıştır.

2. KAYNAK ARAŞTIRMASI

Meyvesinden, yapraklarından ve ağacından faydalanmak amacıyla yetiştirilen dut ağacı, güney yarım kürenin tropik bölgelerinden kuzey yarım kürenin subtropik bölgelerine kadar farklı sıcaklıklarda ve çok çeşitli iklim, topografik özellikler ve toprak şartlarında yetişebilmektedir (Vijayan ve ark., 1997; Ercisli ve Orhan, 2008). Karadutun yetiştirildiği ülkelerin başında Hindistan, Çin ve Japonya gelmektedir. Bu ülkelerde dut, yaprağı için yetiştirilir. Dut yaprağı ipek böceği yetiştiriciliğinde kullanılmaktadır (Vijayan ve ark., 1997). Bu ülkeleri, aralarında Türkiye ve Yunanistan'ın bulunduğu pek çok Avrupa ülkesi takip etmektedir ve bu ülkelerde ise dut, yaprağından çok meyvesi için yetiştirilir (Gerasopoulos ve Stavroulakis, 1997; Ercisli, 2004).

Dut meyvesi, insan vücudunun sentezleyemediği esansiyel yağ asitlerini de (omega-3, omega-6 vb.) içermektedir. Bu yağ asitleri uzun zincirli çoklu doymamış yağ asitleri olup, sağlıklı hücre membranının şekillenmesi, beyin ve sinir sisteminin fonksiyonlarının uygun şekilde yürütülebilmesi ve 'eikosanoid' olarak adlandırılan hormon benzeri maddelerin üretimi için gereklidirler (Simopoulos ve Salem, 1996). Ayrıca karadutun; ateş ve kan basıncını düşürücü, karaciğeri zararlı etmenlerden koruyucu, boşaltımı kolaylaştırıcı, kalp hastalıklarını önleyici, ağız lezyonlarını iyileştirici özelliklerinden, adeta bir ilaç gibi yararlanılmaktadır (Yang ve Zheng, 1998; Jia ve ark., 1999; Chen ve ark., 2006).

Karadut meyveleri tüketildiğinde vücuda enerji, kuvvet ve serinlik verir, ayrıca yumuşatıcı, toksinleri arıtıcı ve besleyici özellikleri de vardır. Karadutun meyvelerinden yapılan şurup, özellikle küçük çocuklarda boğaz ve diş etleri iltihaplarına karşı gargara olarak kullanılır. İştah arttırıcı özelliği olup, idrar tutamama, baş dönmesi, kulak çınlaması, kansızlık nedeniyle uykusuzluk, sinir zayıflığı, balgam söktürücü, kan şekerini düşürücü, dizanteriyi tedavi edici olarak ve hipertansiyon tedavilerinde kullanılır. Kök ve gövde kabukları solucan düşürücü olarak halk arasında kullanılmaktadır (Baytop, 1996).

Modern tıpta dutun tek kullanım alanı karaduttan elde edilen şuruptur. Karadut şurubu gargara olarak ağız ve boğaz hastalıklarına, özellikle de bebeklerde pamukçuklara karşı uygulanır (Erdoğan ve Pırlak, 2005). İngiltere'deki Montfort üniversitesinde yapılan çalışmaların sonucunda, dutta bulunan resveratrol adlı molekülün vücutta kanser hücrelerini hedef alarak onları tahrip eden, kanser karşıtı bir yapıya dönüştürdüğü saptanmıştır (Altıok ve ark., 2009). Bileşiminde bulunan

papyriflaval A, kuraridin, saphoraflavanone D ve saphoraiso flavanone A iyi bir antifungal ve güçlü antimikrobiyel aktivite göstermektedir. Özellikle *C. albicans* üzerinde antifungal aktivite göstermektedir. Karadut meyvelerinden elde edilen morin flavanoid yapısında bir maddedir ve bu maddenin makrofajlar üzerinde antiinflamator aktivitesi belirlenmiştir (Yiğit ve ark., 2007)

Karaduttan hazırlanan şuruplar özellikle bademcik iltihaplarının giderilmesinde, ağız ve diş yaralarının iyileştirilmesinde, çocuklarda pamukçuk olarak bilinen ve *Candida* türü mayaların neden olduğu enfeksiyonların iyileştirilmesinde de kullanılmaktadır (Davis, 1965).

Dut içeriğinde bol miktarda bulunan antosiyanlerin antitrombotik, antioksidan, antimikrobiyal, antimutajenik ve antikarsinojen iltihaplanmayı önleyici ve sinir sistemini koruyucu gibi sağlığa olumlu etkileri vardır. Bu etki duta renk veren fenolik bileşenlerdendir (Aramwit ve ark., 2010). Meyve temel bileşenleri fruktoz (% 48), glikoz (% 52), sitrik asit (% 92) ve malik asit (% 8) gibi organik asitler, fenolik asitler ve antosiyaninlerdir (Elmacı ve Altuğ, 2002).

Sevilererek tüketilen dut meyveleri, ticari ve endüstriyel açıdan yeterince değerlendirilemediğinden üretimi sınırlı kalmaktadır (Akbulut ve ark., 2007). Bunun nedeni dutun yüksek su içeriğine sahip, oldukça hassas bir meyve olmasıdır. Raf ömrünün çok kısa olması dolayısı ile taze olarak tüketimi de sadece hasat dönemi ile sınırlı olduğundan ülkemizde dutların % 70'i pekmez, % 10'u köme, % 3'ü pestil üretiminde, % 4'ü kurutulmuş ve % 5'i de sofralık olarak değerlendirilebilmektedir (Sengül ve ark., 2005; Ercisli ve Orhan, 2007; Hepsağ ve ark., 2012).

Meyvesinden faydalanılan ve yaygın olarak yetiştiriciliği yapılan dut türleri beyaz dut (*Morus alba* L.), karadut (*Morus nigra* L.) ve kırmızı dut (*Morus rubra* L.)'tur (Ercisli ve Orhan, 2007; Aramwit ve ark., 2010; Boranbayeva ve ark., 2014). Renkleriyle adlandırılmalarına rağmen meyve renginden dut cinsi anlaşılamamaktadır. Örneğin beyaz dut meyvesi beyaz, mor ya da siyah renkte olabilmektedir. Kırmızı dut koyu kırmızı-siyah renktedir. Karadut ise koyu mor neredeyse siyah renkte ve genelde büyük, sulu olması ve dengeli şeker-asit oranına sahip olması nedeniyle dutlar arasında en çok tercih edilenidir (Suh ve ark., 2003).

Karadut meyve özütlerinin *Candida albicans*, *C. parapsilosis*, *C. tropicalis* ve *Geotricum candidum* izolatları üzerinde antikandidal aktiviteleri belirlenmiştir (Yiğit ve ark., 2007).

Yiğit ve yiğit, (2008), tarafından karadutun (*Morus nigra* L.) yaprak ve meyvelerinin antibakteriyel aktivitesinin olduğu ve *Enterobacter aerogenes*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* üzerinde aktivite gösterdiği belirtilmiş ve en yüksek aktivitenin, *S. aureus* bakterisine karşı karadut yaprakları tarafından oluşturulduğu bildirilmiştir. Bununla bağlantılı olarak; dutun meyvesinin, kök ve gövde kabuklarının, antimikrobiyal ve antioksidan özelliklerinden dolayı pek çok hastalığın tedavisinde kullanıldığı da bildirilmektedir (Baytop, 1996; Polat, 2004).

Genel olarak kullanılan antibiyotiklerin çoğuna karşı mikroorganizmaların zamanla direnç geliştirmeleri nedeniyle enfeksiyonlarla savaşta, direnç problemini yenmede ve bugün mevcut antimikrobiyal ajanların meydana getirdiği yan etkilerden dolayı, yeni antimikrobiyal ajanların bulunması için çalışmaların yapılması zorunludur (Ali-Shtayeh ve ark., 1998). Antibiyotiklere karşı mikroorganizmaların çoklu direnç geliştirmesi ve bu mikroorganizmaların neden olduğu enfeksiyonların tedavisindeki başarısızlıklar, alternatif yeni antimikrobiyal ajan arayışına neden olmaktadır. Antibiyotiklerin kullanımı ile ilişkili problemlerin ortaya çıkmasının sonucu olarak, antimikrobiyal özelliklere sahip bitkilere olan ilgi yeniden canlanmaktadır (Emori ve Gaynes, 1993; Pannuti ve Grinbaum, 1995). Bilim adamları son yıllarda bitki türlerinden izole edilen ve patojenik mikroorganizmaları yok etme özelliğine sahip, biyolojik yönden aktif bileşenlerle ilgilenmektedirler. Son yıllarda, tıbbi bitkilerin antimikrobiyal özellikleri dünyanın değişik yerlerinde gittikçe artarak rapor edilmektedir (Pacheco ve ark., 1993; Ratnakar ve Murthy, 1995; Saxena ve Sharma, 1999; Levin ve ark., 2003)

Fenolik maddelerce zengin tat verici yabani otlar ve baharat ekstraktlarının bir çoğunun bakteri, küf ve mayalara karşı antimikrobiyal ve antioksidan etki gösterdiği bildirilmiştir (Yanishlieva ve ark., 2006; Tajkarimi ve ark., 2010).

Ünlüer, (2011) yaptığı çalışmada beyaz dut ve karadut yapraklarının farklı çözücü özütlerinin hücre dışı (*in vitro*) şartlarda antioksidan aktiviteleri ve antimikrobiyal aktivitelerini belirlemiştir. Artan polariteyle sırasıyla hekzan, etil asetat, metanol ve su kullanılarak takip eden özütlenme yapılmıştır. Ayrıca özütlerin toplam fenolik ve flavonoit bileşik miktarı da belirlenmiştir. İki türde de en yüksek antioksidan aktivitesi en polar çözügen olan su özütlerinde hesaplanmıştır. *Morus alba* ve *Morus nigra* yapraklarının aktiviteleri β -karoten-linoleik asit sistemine göre sırasıyla % 94.77-93.38 ölçülmüştür. DPPH serbest radikal giderim aktivitesine göre % 74.34-78.25 indirgeme gücü 0.422-0.482 (λ max 700nm) ve şelatlama kapasitesi % 89.90-92.73 olarak belirlenmiştir. Ayrıca üç farklı derişimde çalışılmıştır. Derişimin artması ile toplam antioksidan aktivitesi ve serbest radikal aktivitesinin de arttığı görülmüştür.

Çayın (*Camellia sinensis*), metisiline dirençli *Staphylococcus aureus* (MRSA)'u da içeren çeşitli patojenik mikroorganizmalara karşı antimikrobiyal aktivite yönünden önemli derecede potansiyel yarar sağladığı, Betalaktam grubu antibiyotiklerle kombine kullanıldığında sinerjik etki gösterdiği belirtilmiştir (Abascal ve Yarnell, 2002).

Arjantin'de yapılan bir çalışmada *Acaena magellanica*, *Baccharis grisebachii*, *Ephedra breana*, *Oxalis erythrorhiza*, *Pachylaena atriplicifolia* ve *Satureja paruiifolia*'dan hekzan, diklorometan (DCM) ve metanol ile elde edilen 18 ekstraktın agar dilüsyon metodu ile bakteri ve funguslara karşı antimikrobiyal aktiviteleri belirlenmiştir. *B. grisebachii* ve *O. erythrorhiza*'nın hekzan ve diklorometan ekstraktları funguslara karşı en geniş etki spektrumunu göstermiştir. Antimikrobiyal aktivite yönünden, *B. grisebachii*'nin hekzan ve diklorometan ekstraktları ile *O. erythrorhiza*'nın DCM ekstraktı 125-500 μ g/ml MIC ile metisilin dirençli *S. aureus* ve metisilin duyarlı *S. aureus* üzerinde, *B. grisebachii*'nin DCM ekstraktının ise metisilin dirençli suşlara karşı metisilin duyarlı suşlardan daha aktif olduğu tespit edilmiştir (Feresin ve ark., 2001).

Isparta'dan toplanan *Origanum minutiflorum*, *Origanum onites*, *Thymbra spicata* ve *Satureja cuneifolia*'nın farklı konsantrasyonlarda esansiyel yağlarının antimikrobiyal aktivitesi çalışılmıştır. Çalışmada dört yağın *Aeromonas hydrophila*, *Bacillus amyloliquefaciens*, *Bacillus brevis*, *Bacillus cereus*, *Bacillus subtilis*, *Corynebacterium xerosis*, *Enterococcus faecalis*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Listeria monocytogenes*, *Micrococcus luteus*, *Mycobacterium smegmatis*, *Proteus vulgaris*, *Staphylococcus aureus* ve *Yersinia enterocolitica*'ya karşı aktivitesi çalışılmış, tüm uçucu yağların etanoldeki 1/50'lik konsantrasyonda tüm bakterilerin

üremesini inhibe ettiği tespit edilmiştir. *O. minutiflorum* esansiyel yağı en yüksek etkiyi *P. Vulgaris*, en düşük etkiyi ise *L. monocytogenes* üzerinde göstermiştir. *O. onites* en yüksek etkiyi *B. brevis*'e en düşük etkiyi *L. monocytogenes*'e karşı göstermiştir. *T. spicata*, *P. vulgaris* üzerinde maksimum etkili olmuştur. *S. cuneifolia*'nın en yüksek etkisi ise *M. luteus* üzerinde görülmüştür. Çalışmada kullanılan türlere ait uçucu yağlar GC ile tanımlandığında yağların yüksek miktarda karvakrol, γ -terpinene ve p-cymene içerdiği belirlenmiştir (Baydar ve ark., 2004).

Meyvesi insanlar tarafından çokça tüketilen *Feijoa sellowiana* Berg'in su ekstraktının antioksidan ve antimikrobiyal aktivitesi değerlendirilmiştir. *F. sellowiana*'nın su ekstraktı tüm bakteriyel suşlar üzerine inhibitör etki göstermiştir. Gr(+) bakteriler (*Streptococcus faecalis* ve *Staphylococcus aureus*) ekstrakta karşı çok duyarlı olmadıkları ve en yüksek MIC değerine sahip oldukları tespit edilmiştir. Gr(-) bakterilerin ise daha duyarlı oldukları görülmüştür. Özellikle *Enterobacter aerogenes*, *Enterobacter cloacae* ve *Pseudomonas aeruginosa* ekstrakta karşı en yüksek duyarlılığı göstermiştir (Vuotto ve ark., 2000).

Nostro ve ark., (2001), antienflamator, antialerjik ve antimikrobiyal aktivitesi ile tanınan *Helichrysum italicum*'un antimikrobiyal etkisini araştırmışlardır. Çalışmada, bitkinin dietil eter ekstraktının *S. aureus* (ATCC 6538P, MRSA ve MSSA izolatları)'un çoğalması üzerine etkisi tespit edilmiştir. Sonuçta, *H. italicum* ekstraktı'nın *S. aureus* suşları üzerinde inhibitör etkisinin olduğunu ve bu bakterinin hem bazı enzimlerini (17 koagülaz, DNase, termonükleaz ve lipaz) hem de üremesini azalttığını göstermiştir (Nostro ve ark., 2001).

Gonzalez ve ark., (2001), enfeksiyon hastalıklarının tedavisinde kullanılan bazı Arjantin yöresel bitkilerinin (*Sebastiania brasiliensis*, *Sebastiania klotzschiana*, *Polygonum punctatum*, *Lithraea molleoides* ve *Myrcianthes cisplatensis*) antimikrobiyel aktivitelerini belirlemek amacıyla *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* ve *Candida albicans*'ın da aralarında bulunduğu çeşitli mikroorganizmalara karşı, bitkilerin % 50 hidroalkolik ekstraktlarını test etmiş, bu ekstraktların denemelerde kullanılan mikroorganizmalar arasında Gram pozitif bakteriler üzerinde etki gösterdiğini belirtmişlerdir, *S. brasiliensis*'ın % 50 hidroalkolik ekstraktında metilgallat ve protokatekuik asit olmak üzere iki antimikrobiyal bileşik tanımlamışlardır.

Renvert ve ark., (2008) tarafından yapılan çalışmada içerisinde Nar çekirdeği yağı, portakal ve limon ürünleri bulunan toplam 46 farklı formülasyon oluşturularak antimikrobiyal aktiviteleri incelenmiştir. *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella*

typhimurium, *Salmonella paratyphi*, *Shigella dysenteriae* mikroorganizmaları ile antibakteriyel aktivitesi ve *Candida albicans* için antifungal aktivitesi araştırmasında birçok formülasyona karşı aktivite göstermediği bildirilmiştir. Tıbbi kullanım amaçlı satışa sunulan bu ürünlerin kullanımının önlenmesi gerekliliği ve yetkili kuruluşların önerileri doğrultusunda kullanılmalarının daha yararlı olacağı bildirilmiştir.

Doğal veya sentetik kimyasal maddelerin çoğu belirli metabolik aktivasyonlardan sonra veya doğrudan doğruya DNA ile etkileşime girerek mutasyona ve kansere neden oldukları hemen herkes tarafından kabul edilmektedir. Sayıları milyonları bulan kimyasal maddelerin çok azının (20.000 civarında) kanserojenik potansiyelleri bilinmektedir. Geriye kalanların ve her gün listeye giren yeni sentezlenen maddelerin seri bir şekilde test edilerek mutajenik/kanserojenik etkilerinin saptanması gerekir. Kimyasal maddelerin karsinojenik risklerini ortaya çıkarmak için en akılcı yaklaşım, deney hayvanlarında tümör indüksiyonudur. Bu testlerde, kimyasal maddelerin uygulanmasıyla, deney sonuçlarının alınması arasında geçen sürenin oldukça uzun olmasından dolayı, bunlara “uzun zamanlı testler” adı verilmiştir. Uzun zamanlı test sistemlerinin kullanılması istenen bir durum olmakla birlikte, deney hayvanlarına kimyasal madde verildikten sonra, bu hayvanlarda tümör oluşması oldukça uzun zaman almakta ve bu testlerin maliyetleri yüksek olmaktadır (Organization ve Cancer, 1980). Bu nedenle araştırmacılar mutajenite taramalarına esas olan ve kısa zamanda sonuç verebilen düşük maliyetli birçok mutajenite test sistemleri geliştirmişlerdir. Kısa zamanlı test sistemlerinden en yaygın olarak kullanılanları bakteriyel testlerdir. Ames / *Salmonella* / Mikrozoom test yöntemi (*Salmonella typhimurium*’un TA ve YG suşları), S.O.S kromotest (*Escherichia coli*) bakteriyel test sistemlerinden bazılarıdır. Bakteriler; genel ve özel besiyeri ortamlarında hızlı üremeleri ve maliyetlerinin düşük olması nedeni ile tercih edilmektedirler (Hofnung ve Quillardet, 1986).

Salmonella/ mikrozoom test sisteminin kullanıma başlandığı 1975 yılından 1982 yılına kadar geçen süre içinde, beş binden fazla kimyasal maddenin mutajenik etkileri araştırılmıştır. Bu test sisteminde, karsinojen olarak bilinen 179 madde teste tabi tutulmuş ve bunlardan 156’sının (% 87’si) mutajenik olduğu bulunmuştur. Aynı sistem ile 117 karsinojenik olmayan maddeyi de % 86’lık bir oran ile nonmutajenik olarak sınıflandırmıştır. Bu sonuçlardan anlaşılacağı üzere; *Salmonella* / mikrozoom test sistemi, karsinojenik maddelerin % 13’ünü mutajenik etkili olarak saptayamamaktadır.

Diğer taraftan aynı test sistemi ile karsinojenik olmayan maddelerin de % 14'ü mutajenik olarak tanımlamaktadır (Akın, 2010).

Ames test sistemi aynı zamanda kimyasal ve doğal maddelerin veya bileşiklerin mutajen veya karsinojen etkilerini ortadan kaldıran, bu maddelerin DNA ile etkileşimlerini önleyen antimutajenlerin ve antikarsinojenlerin belirlenmesinde de kullanılmaktadır (Rosin ve Stich, 1978; Shamberger ve ark., 1979; Ramel ve ark., 1986; Victorin ve ark., 1987).

In-vivo ve *in vitro* çalışmalar, bitkilerin yaprak, meyve ve kök gibi kısımlarından elde edilen bazı doğal bileşiklerin ksenobiyotik etkiler üzerine düzenleyici rol oynadıklarını göstermektedir. Bu bileşiklerin karakterizasyonu, tanımlanması, antimutajenik ve antikarsinojenik etkilerinin belirlenmesi insanlarda kanser hastalığının gelişmesini azaltmak için önemli bir stratejiyi de beraberinde getirmiştir (Roncada ve ark., 2004). Bu hastalığı önlemek için geliştirilen strateji; ya çevresel mutajenleri nötralize eden ajanların kullanımını artırmak yada bu ajanların kullanımını sınırlayan veya azaltan çevresel mutajenleri elemine etmektir (Lee ve Park, 2003). Son zamanlarda birçok doğal bileşiğin tümör inhibe edici etkiye ve immun sistemi kuvvetlendirici niteliklere sahip olduğu gösterilmiştir (Lien ve Li, 1985). Özellikle makro molekülleri içine alan birçok doğal ürün bireysel immun sistemin modülasyonunu sağlamasından dolayı anti - tümör aktiviteye sahiptir. Bu makro moleküllerin, kimyasal anti - tümör droglarla karşılaştırıldığında daha az yan etkiye sahip oldukları belirtilmiştir (Tsukagoshi ve Ohashi, 1974). Yine çeşitli biyoaktif bileşikler ve bunların türevlerinin; başlangıç, gelişme ve yayılım dönemlerini içine alan birçok deneysel sistemlerde karsinogenezisi inhibe ettiği gözlenmiştir (Huang ve ark., 1994). Bu yüzden çabalar, kanserin indüklenmesi ve sonraki gelişim safhalarını engelleyen, azaltan veya gerilemesini sağlayacak doğal antikarsinojenleri tanımlamaktır (Chuang ve ark., 2000).

Birt ve ark., (1986), sebzelerde bulunan apigenin ve robinetin'in antimutajenik aktivitesini Ames testi ile belirlemeye yönelik yaptıkları çalışmada; apigenin'in % 62 ve robinetin'in ise % 87 oranında antimutajenik aktivite gösterdiğini belirlemişlerdir.

Kaur ve ark., (2002), *Terminalia arjuna*'nın benzen, kloroform, aseton ve metanol ekstraktlarının *Salmonella typhimurium* TA 98 suşu üzerinde siyah asit boyası, 2-Aminofluoren (2AF) ve 4-nitro-o-fenilendiamin'e (4-NPDA) karşı antimutajenik etkilerini incelemiş, aseton ve metanol ekstraktlarının antimutajenik aktivitelerinin diğer ekstraktlardan daha yüksek olduğunu belirtmişlerdir.

Kanseri de içine alan çeşitli hastalıkların gelişmesine karşı bitkisel metabolitlerin koruyucu olabileceğini gösteren *in vivo* ve *in vitro* deneysel araştırmalardan ve epidemiyolojiden elde edilen kanıtlar; bu metabolitler üzerine antimutajenik ve antigenotoksik çalışmaların büyük ölçüde artmasını sağlamıştır (Abdullaev ve ark., 2003).

Al-Bataina ve ark., (2003), anason, aspir, çörek otu, kakule ve kimyon gibi bazı baharatlardan elde edilen uçucu yağların *Salmonella typhimurium*'un TA 97a, TA 98, TA 100 ve TA 102 suşları üzerinde mutajenik aktivite göstermediklerini gözlemişlerdir.

Evandri ve ark., (2005), *Lavandula angustifolia* yağının mutajenik ve antimutajenik etkilerini saptamak için *Salmonella typhimurium* TA 98, TA 100 ve *Escherichia coli* WP2 uvrA türlerini kullanmışlardır. Yapılan çalışmalar sonucunda mutajenik bir aktiviteye rastlanmamıştır. Bunun tam aksine lavanta yağının güçlü bir antimutajenik aktiviteye sahip olduğunu bildirmişlerdir.

Hayder ve ark., (2008), *Myrtus communis* (mersin) bitkisinin yaprak kısmının hekzan, etil asetat, metanol ve kloroform ile elde edilen ekstraktlarının mutajenik ve antimutajenik aktivitelerini *Salmonella*/mikrozom test sistemi ile incelemişlerdir. Ekstraktların hiç birinin mutajenik aktivite göstermediğini, test edilen ekstraktların *Salmonella typhimurium* TA 98 ve TA100 suşları üzerinde aflatoxin B1 (AFB1) mutajenine karşı, *Salmonella typhimurium* TA 100 ve TA1535 suşları üzerinde ise sodyum azid mutajenine karşı önemli bir antimutajenik aktivite gösterdiğini, etil asetat ve metanol ekstraktlarının da sodyum azid ve AFB1'e karşı yüksek derecede antimutajenik aktiviteye neden olduğunu belirtmişlerdir.

Özbek ve ark., (2008), Türkiye'nin Doğu Anadolu Bölgesinden toplanan *Origanum vulgare* L. subsp. *vulgare*'nin (kekik) metanol ekstraktının *Salmonella typhimurium* TA1535 ve TA1538 suşları üzerine antimutajenik potansiyelini araştırmış ve sonuç olarak *Origanum vulgare* L. subsp. *vulgare* ekstraktının antimutajenik etki gösterdiğini belirtmişlerdir.

Ham ve ark., (2009), *Inonotus obliquus* (kül mantarı) ekstraktlarının antimutajenik ve antioksidan aktivitelerini değerlendirmiş, ekstraktların *Salmonella typhimurium* TA 98 ve TA 100 suşları üzerine önemli ölçüde antimutajenik etki gösterdiğini saptamışlardır.

Akın, (2010), *Celtis glabrata* (çitlembik) Steven ex. Planch bitkisinin yaprak, meyve ve çekirdek kısımlarının farklı çözücülerdeki özütlerinin antimutajenik aktivitelerini *S. typhimurium* TA98 ve TA100 suşları üzerinde araştırmıştır.

Ekstraktların S9 varlığında ve yokluğunda, dozlara bağlı olarak yüksek oranda antimutajenik aktiviteye sahip olduğunu ileri sürmüştür.

Howell ve ark., (2010) *Sisymbrium officinale* Scop. (yuvarlak hardal) ekstraktlarının *Salmonella typhimurium* TA 98, *Salmonella typhimurium* TA100 ve *Escherichia coli* WP2-uvrA suşları üzerinde güçlü bir antimutajenik aktivite gösterdiğini saptamışlardır.

Bitkilerden elde edilen ekstraktların ve uçucu yağların hücre dışı (*in vitro*) ortamda antioksidan aktivite gösterdiğine dair pek çok çalışma bulunmaktadır. *Cyclotrichium organifolium* bitkisinin uçucu yağ ve çeşitli özütleriyle yapılmış olan antioksidan aktivite çalışmalarında ise bitkinin polar özütlerinin non-polar olanlara göre daha yüksek oranda antioksidan aktivite gösterdiği ifade edilmiştir (Yildiz ve ark., 2004)

2000 yılında Japonya'da yapılan bir araştırmada, *Morus alba* yapraklarına ait fenolik bileşiklerin ve flavonoidlerin izolasyonu ve içerik tayini yapılmıştır. Bütanol ile yapılan ekstraksiyon işlemi sonunda, özütlerin kan serumundaki kolesterol artışını inhibe ettiği ve damar sertleşmesini (ateroskleroz) önlediği açıklanmıştır (Doi ve ark., 2001).

Antimutajenite; mutajenik maddelerin mutajen veya kanserojen etkilerinin ortadan kaldırılması veya bunların DNA ile etkileşimlerinin önlenmesidir. Genellikle antimutajenik maddeler etki etme şekillerine göre desmutajenler ve biyoantimutajenler olmak üzere ikiye ayrılır. Mutajenin DNA'nın yapısına katılmasından sonra, DNA replikasyonu ve DNA tamir mekanizmalarının işleyişini düzenleyerek mutagenезisi azaltan maddelere biyoantimutajenik maddeler denir. DNA polimeraz I ve DNA polimeraz III sentezini artırmak, error- prone DNA tamir mekanizmasını engellemek, error- free DNA tamir mekanizmasını geliştirmek biyoantimutajenlerin etkiledikleri önemli mekanizmalardır. Mutajen ajanların hücreye girişini bloke eden, başka bir ifade ile DNA'nın yapısına dahil olmadan onları inaktif hale getiren antimutajenik maddeler ise desmutajenler olarak tanımlanmaktadır. Ajanları bloke etme, nitrosation reaksiyonlarını engelleme, serbest radikalleri (reaktif oksijen türleri= ROS) giderme, devre I ve devre II detoksifikasyon enzimlerinin modülasyonu başlıca etki mekanizmalarıdır (Nakasugi ve ark., 2000)

Bitkiler; fenolik bileşikler (fenolik asit, flavonoid, quinonlar, kumarinler, taninler), nitrojen bileşikler (alkaloidler, betaalaninler, aminler), vitaminler, terpenoidler (karotenoidler) ve antioksidan aktivite bakımından zengin olan bazı endojen metabolitler içerebilirler. Epidemiyolojik araştırmalar böyle antioksidan bileşiklerin

anti-inflamatuar, anti-arteriosklerotik, antitümör, antimutajenik, antikarsinojenik, antiviral, antibakteriyal aktivitelere az veya çok derecede sahip olduğunu göstermiştir (Cai ve ark., 2004).

Polifenoller, fenolik bileşikler veya polifenollerin aromatik halkaları, bir veya daha fazla sayıda hidroksil grup içeren bileşiklerdir ve büyük bir kısmı hidrofiliktir. Meyvelerde ve sebzelerde çok miktarda bulunan fenolik bileşikler, birçok besin ve içeceğin tadının, lezzetinin, renginin kaynağını oluştururlar (Moss ve Packer, 1983). Fenolik bileşiklerin sahip olduğu antioksidan aktivite esas olarak metal şelatlama, singlet oksijen giderme, hidrojen verici ve indirgeyici ajan olarak davranmalarını sağlayan redox özelliklerinden kaynaklanmaktadır. Polifenollerin antimutajenik ve antikarsinojenik etkiye sahip olduğunu gösteren birçok çalışma yapılmıştır (de Ancos ve ark., 2000).

Bitki pigmentleri olarak bilinen flavonoidler, polifenolik bileşikler grubuna dahil olup bitkilerin herhangi yerinde oluşabilirler (Galati ve O'brien, 2004; Wenzel ve ark., 2004; Xia ve ark., 2004). Doğal olarak oluşabilen 4000 farklı flavonoid tanımlanmış ve bu sayı gün geçtikçe artış göstermektedir (Galati ve O'brien, 2004). Flavonoidlerin (galangin, kaempferol, quercetin, myricetin, fisetin, morin, catechin, rhamnetin, rutin v.b.) birçok biyolojik aktiviteyi düzenlediği belirtilmiştir. Bakterisit ve biyotransformasyon enzimlerini düzenleyici özellikleri nedeni ile antitümör ve antioksidan olarak görev yaptıkları bildirilmektedir.

Beudot ve ark., (1998), heterosiklik aminlere karşı dördüncü pozisyonda fonksiyonel bir karboksil grubu içeren flavonoidlerin, antimutajenik aktivitede son derece önemli rol oynadıklarını tespit etmişlerdir.

Karadutun mutajenik ve antimutajenik aktivitesi ile ilgili herhangi bir çalışmaya rastlanmadığından, ilk kez yapılan bir çalışma olarak değerlendirildi.

3. MATERYAL VE YÖNTEM

3.1. Materyal

3.1.1. Karadut (*Morus nigra* L.) Meyvelerinin Toplanması

Temmuz - 2015'te toplanan karadut meyveleri mekanik olarak ezilerek ve süzgeçten geçirilerek toplanan konsantre meyve suları, plastik kaplarda incelenene dek, - 25⁰C'de saklandı.



a)



b)

Şekil 3.1.1. Karadut (*Morus nigra* L.). a) Karadut ağacı b) Karadut meyveleri

3.1.2. Çalışmada kullanılan test suşları

TA 100 ve TA 98 *Salmonella typhimurium* bakteri kökenleri (Afyon Kocatepe Üniversitesi Fen - Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü'nden) sağlandı (Çizelge 3.1.2).

Suşların genotip özellikleri :

TA 100: +R,his G 46, Δ uvr B, rfa.

TA 98: +R,his D 3052, Δ uvr B, rfa.

Çizelge 3. 1. Bazı *Salmonella* suşları ile genetik özelliklerinin Ames test sisteminde kullanılması (Öksüzoglu ve ark., 2000)

Suş	Histidin Mutasyonu	LPS	Onarım	pKM 101	Mutasyonun Niteliği	Belirlenecek Bileşik Sınıfları
TA 1535	his G46	rfa	Δ uvrB	-	AT→ GC Transisyon	Baz Çifti yer değişimine Neden Olan Mutajenler
TA 1537	his C376	rfa	Δ uvrB	-	C.....C yanına +1	Çerçeve Kaymasına Neden Olan Mutajenler
TA 1538	his D3052	rfa	Δ uvrB	-	CG.....CG yanından -1	Çerçeve Kaymasına Neden Olan Mutajenler
TA 98	his D3052	rfa	Δ uvrB	+	CG yanından -1	Çerçeve Kaymasına Neden Olan Mutajenler
TA 100	his G46	rfa	Δ uvrB	+	AT→ CG Transisyon	Baz Çifti Değişimine Neden Olan Mutajenler
TA 97	his D6610	rfa	Δ uvrB	+	CCC yanına +4	Çerçeve Kaymasına Neden Olan Mutajenler
TA 102	his G428 PAQ1 Δ his	rfa	Δ uvrB	+	G Ochre AT	Oksidanlar, X- Işınları, U.V., Mitomisin C, Bleomisin ve Kinonlar

Salmonella typhimurium bakteri suşlarından, TA 98 çerçeve kayması ve TA 100 ise baz çifti değişimindeki mutasyonların belirlenmesi amacı ile kullanıldı.

3.1.3. Kimyasal maddeler

- 2-aminoflouren (2-AF)
- 2-aminoantrasen (2-AA)
- Sodyum azid (SA)
- 4-nitro-o- fenilendiamin (4-NPDA)
- D-glukoz 6-fosfat
- Ampisilin trihidrat
- D-biyotin
- β -NADP
- Nutrient Broth No:2,
- S9 fare karaciğer fraksiyonu (Moltox, U.S.A)'dan sağlandı.
- L-histidin-HCl monohidrat
- 2, 3, 5-Trifeniltetrazolyum klorid (TTC).

3.1.4. Çalışmada kullanılan standart mikroorganizma test suşları

- *Candida albicans* maya suşu
- *Escherichia coli* ATCC 25922
- *Klebsiella pneumoniae* ATCC 70603
- *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 15442
- *Listeria monocytogenes* 1/2 B
- Metisiline Dirençli *Staphylococcus aureus*(MRSA) ATCC 43300
- *Salmonella enteritidis* ATCC 13076
- *Salmonella typhimurium* NRRLE 4463
- *Sarcina lutea* ATCC 9341
- *Proteus mirabilis* ATCC 25933
- *Yersinia enterocolitica* ATCC 1501

Çalışmada kullanılan standart mikroorganizma test suşları, Selçuk Üniversitesi, Fen Fakültesi, Biyoloji Bölümü, Mikrobiyoloji Araştırma Laboratuvarı koleksiyonundan sağlanmıştır.

3.1.5. Çalışmada kullanılan çözeltiler, tamponlar ve besiyerleri :

Salmonella / mikrozom test sisteminde kullanılması gereken çözeltiler ve besiyerleri aşağıda verilmiştir.

Histidin/biyotin solüsyonu (0.5 mM): Mutajenite deneyinde (90 ml top agara 10 ml olarak) kullanıldı.

	<u>250 ml için</u>
Distile su	250 ml
L-Histidin-HCl (M.A. 191.7)	0.024 g
D-Biyotin (M.A. 247.3)	0.0309 g

Suyun kaynama noktasına kadar biyotin ısıtılarak çözüldü ve sonrasında histidin ilave edildi. Sterilizasyon işlemi otoklavda 110 °C’de 20 dakika veya 0.22 µm membran filtre ile steril edildi. +4 °C’de saklandı.

Kristal viyole solüsyonu (% 0.1): Suşların kristal viyoleye duyarlılıkları ve bu nedenle rfa mutasyonunu taşıyıp veya taşımadıklarını kontrol amacı ile hazırlandı.

	<u>100 ml</u>
Distile su	100 ml
Kristal viyole	0.1 g

Kristal viyole, distile su içerisinde eritildi ve hazırlanan çözelti ışık geçirmeyen koyu renkli cam şişede buzdolabında saklandı.

Glikoz çözeltisi (% 20):Glikoz çözeltisi HBA ile MGA plaklarının hazırlanmasında ilave edildi.

	<u>100 ml</u>
Distile su	100 ml
Glikoz	20 g

Glikoz distile su içerisinde eritildi ve 110 °C’de 20 dakika otoklavda steril edildi. Buzdolabında saklandı.

Vogel-Bonner minimal medium (50xVB tuzları) : Agar plaklarının hazırlanmasında (histidin - biyotin (HB) agar, minimal glukoz agar (MGA), histidin - biyotin ampisilinli agar (HBA) kullanıldı.

	<u>1000 ml için</u>
Potasyum fosfat (K_2HPO_4)	500 g
Sodyum amonyum fosfat ($NaH_2NH_4PO_4 \cdot 4H_2O$)	175 g
Sitrik asit monohidrat	100 g
Magnezyum sülfat ($MgSO_4 \cdot 7H_2O$)	10 g
Distile su (45 °C)	670 ml

Distile su erlen içerisinde 45°C'ye kadar ısıtıldı. Her tuz sırasıyla distile suya eklendi. Her bir madde iyice çözüldükten sonra kristalleşme olmaması için diğer madde eklendi. Toplamında ise hacim 1000 ml'ye tamamlandıktan sonra 121°C'de 20 dakika otoklavda steril edildi ve maddeler tamamen çözüldükten sonra otoklavlandı. Steril çözelti karanlıkta oda ısısında saklandı.

Histidin çözeltisi (% 0.5): Genotip kontrolünün belirlenmesi için standart bakteri deney suşları ile HBA plakları hazırlandı.

	<u>100 ml</u>
Distile su	100 ml
L-Histidin-HCl (M.A. 191.7)	0.5 g

110 °C'de 20 dakika otoklavda steril edildi ve buzdolabında saklandı.

Biyotin çözeltisi (% 0.13): Genotip kontrolünün belirlenmesi için standart bakteri deney suşları ile HBA plakları hazırlandı.

	<u>100 ml</u>
Distile su	100 ml
D-biyotin	0.0013 g

Biyotin Suyun kaynama derecesine kadar biyotin ısıtıldıktan sonra çözüldü. 110 °C'de 20 dakika otoklavda steril edildi ve +4 °C'de saklandı.

Ampisilin çözeltisi (8 mg/ml): R plazmiti taşıyan suşların master plakları ve suşların ampisiline dirençlilik özelliğinin kontrolünde kullanıldı.

	<u>100 ml için</u>
Ampisilin trihidrat	0.8 g
NaOH (0.02 N)	100 ml

NaOH yerine şayet ampisilin suda çözündürülecekse ve sıcaklık 65 °C' ye ayarlanır. Ampisilin eritildikten sonra 0.45 µm filtrede süzüldü. Buzdolabında saklandı.

4- Nitro-o-Fenilendiamin (4-NPDA) (2 µg/µl): Pozitif kontrol amacı ile kullanıldı.

DMSO'da çözündürülerek 200 µg/plak olmak üzere uygulandı. **Direkt** mutajen olarak değerlendirilmesi ise TA 98 suşu için S9 fraksiyonu yokluğunda kullanıldı.

	<u>10 ml</u>
DMSO	10 ml
4-NPDA	0.02 g
Oda sıcaklığında saklandı.	

Sodyum azid çözeltisi (0.1 µg/µl): 10 µg/plak başına pozitif kontrol olarak damıtık suda çözündürülerek kullanıldı ve TA 100 suşu için S9 fraksiyonu yokluğunda kullanılan mutajen maddedir.

	<u>100 ml</u>
Distile su	100 ml
Sodyum azid	0.01 g
+4 °C'de saklandı.	

2-aminoantrasen çözeltisi (2-AA) (0.05 µg/µl): 5 µg/plak başına olmak üzere dimetilsülfoksitte (DMSO) çözündürülerek kullanıldı. Pozitif kontrol olarak uygulandı. TA 100 suşu üzerine S9 fraksiyonu varlığında kullanılan mutajen maddedir.

	<u>100ml</u>
DMSO	100 ml
2-AA	0.005 g

2-Aminofluoren (2-AF) (2 µg/µl): Pozitif kontrol amacı ile kullanıldı. 200 µg/plak başına olmak üzere dimetilsülfoksitte (DMSO) çözündürüldü. **İndirekt** mutajen olarak değerlendirilme ise TA 98 suşu için S9 fraksiyonu varlığında kullanıldı.

	<u>10 ml</u>
DMSO	10 ml
2-AF	0.02 g

+4 °C’de saklandı.

Histidin/biyotin besiyeri plakları (HB agar): Histidin gereksinimi için denemelerde kullanıldı.

	<u>1000 ml</u>	<u>500 ml</u>	<u>250 ml</u>
Agar	15 g	7.5 g	3.75 g
% 20 glikoz	100 ml	50 ml	25 ml
50 X VB	20 ml	10 ml	5 ml
Histidin HCl. H ₂ O	10 ml	5 ml	2.5 ml
0.5 mM Biyotin	6 ml	3 ml	1.5 ml
Distile su	864 ml	422 ml	216 ml

Agar, su içerisine ilave edikten sonra 110°C’ de 20 dakika otoklavda steril edildi. 45 °C’ye kadar soğutulurken (20-30 dakika) % 20 glikoz , 50XVB tuzları, histidin çözeltisi eklendi, solüsyon biraz daha soğuduktan sonra biyotin eklendi, karıştırıldıktan sonra petri kutularına 25 ml olarak dağıtıldı. Katılaştıktan sonra +4 °C’de saklandı.

Minimal glikoz agar plakları (MGA): Mutajenite çalışmalarında denendi.

	<u>1000 ml</u>	<u>500 ml</u>
Agar	15 g	7.5 g
Distile su	880 ml	440 ml
50X VB	20 ml	10 ml
% 20 glikoz	100 ml	50 ml

Agar ile su karıştırıldıktan sonra otoklavda steril edildi. 45 °C’ye soğutulup (20-30 dakika) % 20 glikoz ve 50XVB tuzları karıştırılarak 25 ml olarak petri kutularına dağıtıldı ve +4 °C’de iki ay saklanabilmektedir.

Histidin/biyotin/ampisilin plakları (HBA agar): R faktörü taşıyan suşların ampisiline dirençlilik testini yapmak ve master plak hazırlanmasında kullanıldı.

	<u>1000 ml</u>	<u>500 ml</u>	<u>250 ml</u>
Agar	15 g	7.5 g	3.75 g
Distile su	860 ml	430 ml	215 ml
50XVB tuzları	20 ml	10 ml	5 ml
% 20 glikoz	100 ml	50 ml	25 ml
Histidin HCl.H ₂ O	10 ml	5 ml	2.5 ml
0.5 mM Biotin	6 ml	3 ml	1.5 ml
(% 0.8/0.02 NaOH) Ampisilin	3150 µl	1575 µl	787.5 µl

Not: 50XVB tuzları 50 kez sulandırılarak hazırlanmaktadır (1000 /20 = 50 kez sulandırıldı).

Agar ile su otoklavlandı, 45 °C'ye soğutulduktan sonra 50XVB tuzları % 20 glikoz, histidin bu solüsyona eklenerek karıştırıldı ve daha sonra biraz soğuyunca ampisilin ile biyotin eklenerek, petri plaklarına 25 ml olarak dağıtıldı. Bakteriler bu plaklarda +4 °C'de iki ay saklanabilmektedir.

Nutrient agar plakları (NA): Gecelik kültürün ml'sindeki bakteri sayısını bulma, genotip kontrolünde kullanıldı. Kristal viyole ile test suşlarının UV duyarlılık özelliklerinin belirlenmesi için uygulandı.

	<u>1000 ml</u>	<u>500 ml</u>
Distile su	1000 ml	500 ml
Agar	15 g	7.5 g
Oxoid nutrient broth no:2	25 g	12.5 g

Broth, agar ve su iki litrelik cam kapta karıştırıldıktan sonra, 121°C'de 15 dakika steril edildi ve petri kutularına 30 ml olacak şekilde dağıtıldı. Buzdolabında saklandı.

Top (üst) agar : Mutasyon deneyinde kullanıldı. Bakteri test suşları üstünde denenilen maddelerin homojen dağılımında uygulandı.

	<u>1000 ml</u>	<u>500 ml</u>	<u>250 ml</u>
Agar	6 g	3 g	1.5 g
NaCl	5 g	2.5 g	1.25 g
Distile su	1000 ml	500 ml	250 ml

Agar, tuz ile su manyetik karıştırıcıda ısıtıldı. Karıştırılarak çözündürüldü ve 110 °C’de 20 dakika otoklavda steril edildi.

Tuz çözeltisi (1.65 M KCl + 0.4 M MgCl₂): Mutajenite deneyinde S9 karışımında kullanıldı.

	<u>500 ml</u>	<u>5 ml</u>
Distile su	500 ml	5 ml
Magnezyum klorür (MgCl ₂ .6H ₂ O)	40.7 g	0.40 g
Potasyum klorür (KCl)	61.5 g	0.61 g

110 °C’de 20 dakika otoklavda steril edildi. Oda sıcaklığında veya +4 °C’de muhafaza edildi.

Sodyum-fosfat tamponu (pH :7.4) 0.2 M: Mutajenite deneyinde S9 karışımı için hazırlandı.

	<u>500 ml için</u>
0.2 M Disodyum hidrojen fosfat (Na ₂ HPO ₄)(14.2 g/500 ml)	440 ml
0.2 M Sodyum dihidrojen fosfat (NaH ₂ PO ₄ . H ₂ O)(13.82 g/500 ml)	60 ml

pH’sı ölçüldü ve pH derecesi çok düşük olduğundan dolayı 0.2 M disodyum hidrojen fosfat eklendi, pH derecesi ayarlandı. 121 °C’de 20 dakika otoklavda steril edildi. Karanlıkta oda ısısında muhafaza edildi.

β-NADP çözeltisi (0.1 M): Mutajenite deneyinde S9 karışımı hazırlanmasında uygulandı.

	<u>10 ml</u>
β-NADP (F.W. 765.4)	0.76 g
Steril distile su	10 ml
Sterilizasyon 0.22 µm por çaplı filtrelerle yapıldı. -20°C’de saklandı	

Nutrient broth sıvı kültür ortamı (NB): Bakterilerin bir gecelik sıvı kültürlerinin hazırlanmasında kullanıldı.

	<u>200 ml</u>
Oxoid nutrient broth no:2	5 gr
Distile su	200 ml
Broth ve su karıştırıldıktan sonra, otoklavda 121 °C’de 15 dakika steril edildi.	
Oda sıcaklığında ve karanlık bir ortamda muhafaza edildi.	

Glikoz-6-fosfat çözeltisi (1M): Mutajenite deneyi için S9 karışımı hazırlanmasında uygulandı.

	<u>2.5 ml</u>
Steril distile su	2.5 ml
Glikoz-6-fosfat	0.705 g
Sterilizasyon 0.22 µm por çaplı filtrelerle yapıldı. -20°C’de saklandı.	

S9 karışımı (rat karaciğeri mikrozomal enzimleri + kofaktörler)

Kullanım: Mutajenite deneyi

	<u>50 ml</u>	<u>75 ml</u>
MgCl ₂ ile KCl tuz çözeltisi	1 ml	1.5 ml
Rat karaciğerinde S9 fraksiyonu	2 ml	3 ml
1 M Glikoz-6-fosfat	250 µl	375 µl
0.1 M β-NADP	2 ml	3 ml
0.2 M fosfat tamponu pH=7.4	25 ml	37.5 ml
Steril distile su	19.75 ml	29.625 ml

Aşağıdan yukarı doğru ilave edilir

Aşağıdan yukarıya doğru her daim karışım taze olarak ve yeterince hazırlanır. S9 karışımı deney çalışması sırasında, içerikler daima buz içinde tutulur.

3.1.6. Antimikrobiyal Aktivitenin Belirlenmesi

3.1.6.1.Sıvı Mikrodilüsyon Yöntemi

Escherichia coli ATCC 25922, Metisiline Dirençli *Staphylococcus aureus* (MRSA) ATCC 43300, *Salmonella enteritidis* ATCC 13076, *Sarcina lutea* ATCC 9341, *Salmonella typhimurium* NRRLE 4463, *Klebsiella pneumoniae* ATCC 70603, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 15442, *Yersinia enterocolitica* ATCC 1501, *Proteus mirabilis* ATCC 25933, *Listeria monocytogenes* 1/2 B standart bakteri suşları ile *Candida albicans* maya suşu, sıvı mikrodilüsyon yönteminde, minimum inhibisyon konsantrasyonunu (MİK) belirlemek için kullanıldı.



3.2. Yöntem

3.2.1. Meyve özütünün hazırlanması

Temmuz 2015'te Konya ilinde tek ağaçtan toplanan karadut (*Morus nigra* L.) meyveleri mekanik parçalayıcı yardımıyla ezildi. Süzgeçten geçirilerek toplanan konsantre meyve suları, plastik kaplarda incelenene dek, -25° C 'de saklandı. Karadut konsantre meyve suları laboratuvar ortamında rotary evaporatörde 50 °C'nin altında buharlaştırılıp ham özüt elde edildi. Elde edilen meyve konsantresi etüvde 50 °C'de kurutuldu. Kurutulma işleminden sonra toplanan özüt'ten 25 mg/ml'lik stok hazırlandı.

3.2.2. Çalışmada kullanılan test suşlarının üretilmesi

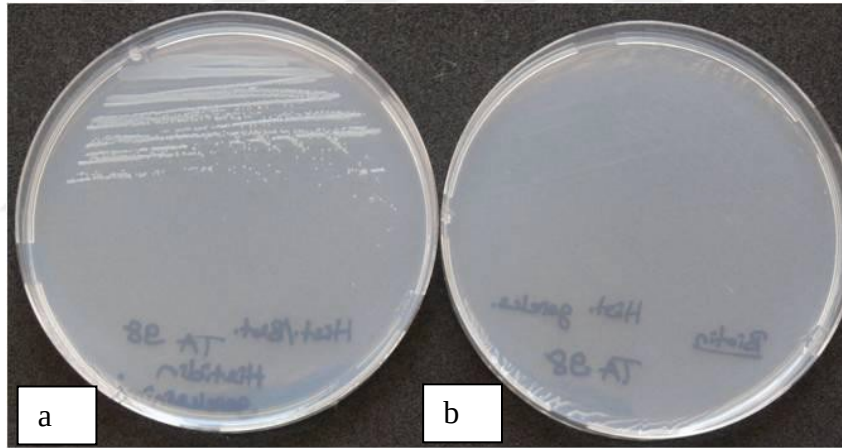
Mutajenite ve antimutajenite çalışmalarında *Salmonella typhimurium* standart bakteri suşları ile 1 ml'sinde $1-2 \times 10^9$ Koloni Oluşturan Birim (kob) bakteri kültürünün olması istenmektedir. 20 ml nutrient broth (63 µl ampisilin solüsyonu eklenmiş) bulunan 50 ml'lik erlenlere, master plaklardan ya da histidin/biyotin agar plaklarından *Salmonella typhimurium* TA 98 ile TA 100'ün üreme eğrilerinin çıkarılması amacıyla tek koloni alınarak ekim yapıldı. 37 °C'de 140 rpm çalkamalı etüvde çalkandı ve 16 saat inkübe edildi. Sürenin sonunda 0.5 ml elde edilen kültürden örnekler alındı ve 20 ml nutrient broth içermesi ile erlenlere ekim yapıldı. 37 °C'de 110 rpm'de çalkalandı ve inkübe edildi. 650 nm dalga boyunda absorbans değerleri spektrofotometrede, bakteri kültüründen örnekler belirli zaman aralıklarında alındı ve ölçüldü. Buna paralel örneklerden alınan belirli oranlarda (10^{-6} ve 10^{-7}) serum fizyolojik ile sulandırıldı ve 0.1 ml olacak şekilde nutrient agarlı plaklara ekim yapıldı. Bakterilerin homojen dağılımını sağlamak için ekim sırasında 50 °C'deki 2 ml üst agara bakteri kültürleri karıştırıldı ve çalkalandı. Daha sonra plakların yüzeyine hızlı bir şekilde dağıtıldı. 37 °C'lik etüvde bir gecede plaklar inkübe edildi ve koloni sayımı yapıldı. Bu hedef *Salmonella typhimurium* TA 98 ile TA 100 test suşlarının canlı bakteri sayıları mililitredeki belirlenerek üreme ile zamana karşı absorbans değerlerinin tabloları hazırlandı (Maron ve Ames, 1983).

Bir mililitredeki koloni oluşturan birim (kob/ml) = plaktaki koloni sayısı x sulandırma faktörü x10 olarak hesaplandı.

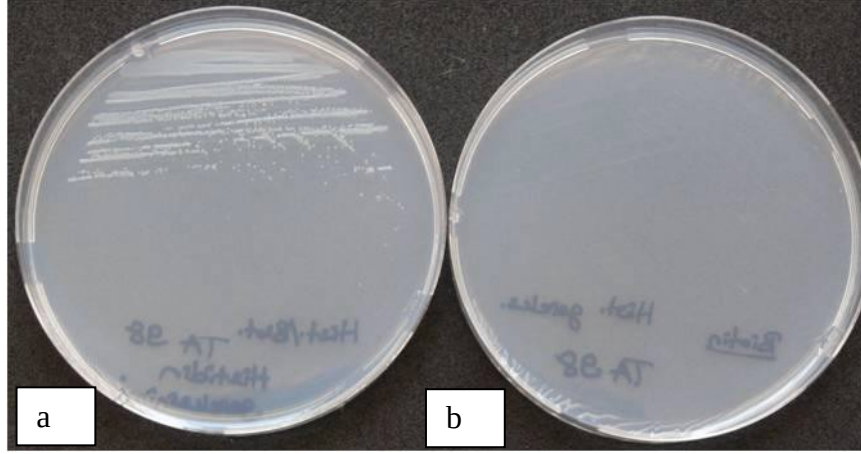
3.2.3. *Salmonella*/mikrozom test sisteminde kullanılan suşların genetik özelliklerinin kontrolü

Suşun genotip özellikleri bakımından mutant karakterlere sahip olduğu veya olmadığı mutasyon testlerinde test maddesinin kontrol edilmesi ve testin güvenilirliği önemlidir. Bundan dolayı çeşitli testler ile bakterilerin genotipleri kontrol edildi.

Histidin gereksinimi: Minimal glukoz agar plaklarına ekilmeleri yolu ile test suşlarının his (-) özelliği kontrol edildi. Daha sonra suşlar; uvrB delesyonu sebebiyle histidine ilave edilmek üzere biyotine de ihtiyaç göstermelerinden dolayı histidin/ biyotin içeren ve sadece biyotin içeren histidinsiz minimal glukoz agar plaklarına ekildi (Şekil 3.2.3.1, 3.2.3.2). Suşların histidin varlığında ürediği ve histidin yokluğunda ürememeleri durumunda his (-) karakterini doğrulamaktadır (Maron ve Ames, 1983; Mortelmans ve Zeiger, 2000).

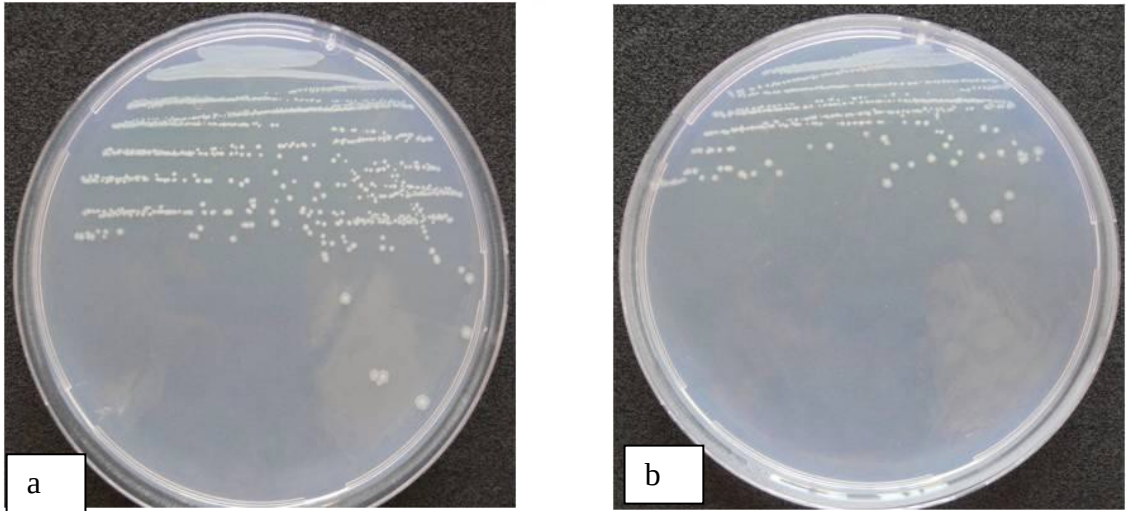


Şekil 3.2.3.1. *S. typhimurium* TA 98'in histidin gereksinim kontrolü: a) Histidin/ biyotin agarda üreme var, b) Biyotin agarda üreme yok.



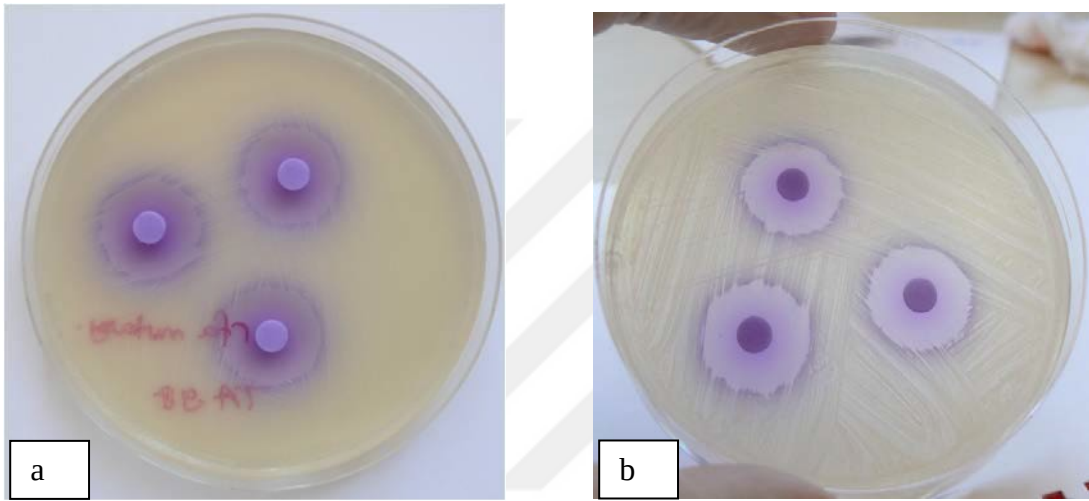
Şekil 3.2.3.2. *S. typhimurium* TA 100'ün histidin gereksinim kontrolü: a) Histidin/ biyotin agarda üreme var, b) Biyotin agarda üreme yok.

R Faktörünün kontrolü: His (-) karakterleri doğrulması sonucunda kolonilerin ampisiline dirençlilikleri kontrol edildi ve HBA agar hazırlandı. R faktörü test edilen suşların ekimi yapıldı (McCann ve Ames, 1976). 37 °C'de 12-24 saatlik inkübasyon süresi sonunda, R faktörü içeren kısımda suşların ampisilinli plaklarda ürediği gözlemlendi (Şekil 3.2.3.3).



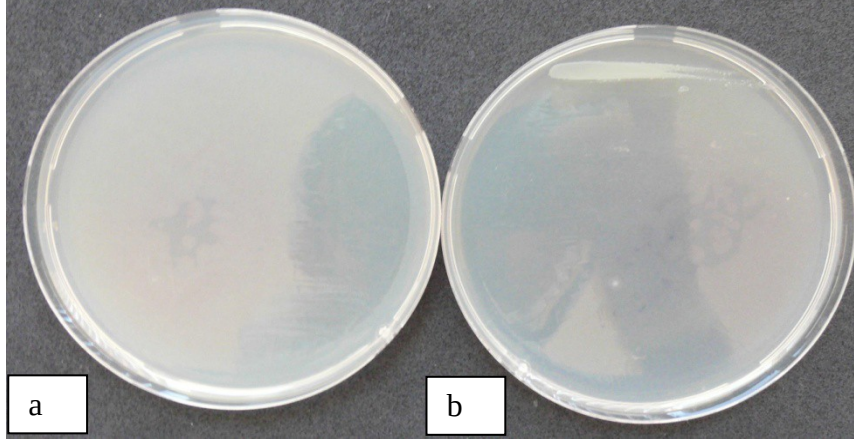
Şekil 3.2.3.3. Test suşlarında R faktörü varlığının kontrolü: a) *S. typhimurium* TA 98 suşunun HBA agar plağında üreme durumu pozitif b) *S. typhimurium* TA 100 suşunun HBA agar plağında üreme durumu pozitif

rfa mutasyonun kontrolü: Test suşlarının gecelik kültüründen 100 µl'lik örnekler alınarak Nutrient agarlı petrilere yayma yöntemi ile aşılandı. 1mg/ml stok kristal viyole çözeltisinden 10 µl emdirilmiş hazır boş diskler, petrilere ortasına yerleştirildi. 37 °C'de bir gece inkübasyona bırakıldı, disklerin çevresinde inhibisyon zonunun oluştuğu veya oluşmadığı kontrol edildi (Şekil 3.2.3.4). Disklerin çevresinde renkli açık bir alan, büyük moleküle sahip kristal viyole solüsyonunun bakterilerin içine difüzyon yolu ile girerek onları inaktive etmesi rfa mutasyonunun pozitif kanıtıdır (b) (Ames ve ark., 1973)

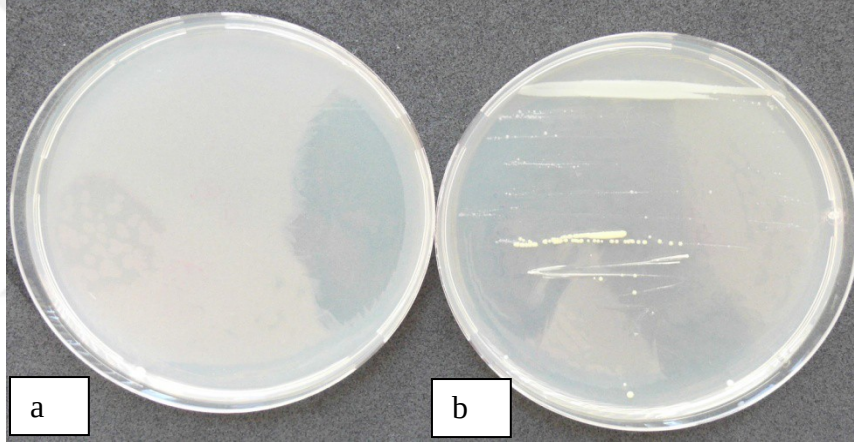


Şekil 3.2.3.4. Nutrient agar plaklarında rfa mutasyonu kontrolü: a) *S. typhimurium* TA 98 suşu (Zon çapı 14 mm) b) *S. typhimurium* TA 100 suşu (Zon çapı 14 mm)

uvrB mutasyonunun kontrolü: Mutasyonun varlığı ile ultraviyole ışınlarına duyarlılık testi ölçüldü. Test suşlarının gecelik kültüründen örnekler öze ile alınıp nütrient agarlı plaklara ise yayma yöntemiyle ekildi. 37 °C'de bir gecelik inkübasyondan sonra tek kolonilerin üreyen kısmında, steril eküvyon çubukları ile alınıp, nütrient agarlı iki plağın bulunduğu kısma çizgi ekim yöntemi ile aşılandı. Plaklardan bir adedi kontrol plağı olarak, diğeri kapağı açılarak 15 watt'lık germisidal UV lambası altında 33 cm uzaklıktan 8 saniye süre ile ışınlanmaktadır. UV' ye maruz bırakılan plak ve kontrol plağı 37 °C'de bir gece inkübe edildi. uvrB delesyonu taşıyan suşların UV ile ışınlanmış plaklarda üremediği ama kontrol plağında ise ürediği gözlemlendi (Şekil 3.2.3.5, 3.2.3.6, a) (Ames ve ark., 1973)



Şekil 3.2.3.5. *S. typhimurium* TA 98 suşunda uvr B mutasyon kontrolü: a) UV ile ışınlanan plakta üreme yok. b) UV ile ışınlanmayan plakta üreme var.



Şekil 3.2.3.6. *S. typhimurium* TA 100 suşunda uvr B mutasyon kontrolü: a) UV ile ışınlanan plakta üreme yok. b) UV ile ışınlanmayan plakta üreme var.

3.2.4. Spontan , revertant koloni sayısının kontrolü

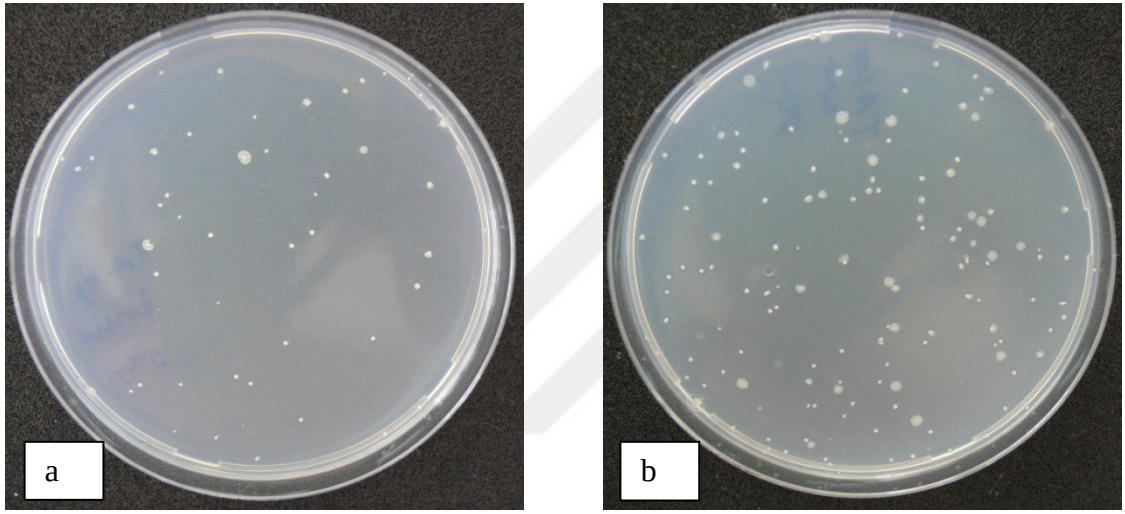
Histidinsiz ortamda üreyebilmesine neden olan test suşlarının revertant ve mutajenite deneylerinde düzenli olarak ölçülür. Her plakta spontan, revertant bakteri sayısı olarak tanımlanır. Spontan, revertant her suş için belli limitler içinde olur.

TA 100 için 80-200 revertant / plak

TA 98 için 30-50 revertant / plak

Oksotrofik mutant bakterilerin geliştiği besiyerde koloniler kolaylıkla gözlenebilir. Spontan, revertant frekansını saptanabilmesi için minimal glukoz agar plakları hazırlandı. NaCl (% 0.5) ve Bacto agar (% 0.6) içerdiği 100 ml'lik üst agar,

otoklavda 110 °C'de 20 dakika steril edildi sonrasında, 45 °C'lik su banyosunda bekletildi. 10 ml steril cam tüpün içerisine homojen agar çözeltisinden alındı. 0.5 mM histidin/biyotin sölüüsyonundan içine 10 ml ilave edildi. Karışım 2.5 ml'lik steril tüplere porsiyon şeklinde dağıtıldı. Her suşun gecelik kültüründen tüplere 0.1 ml ilave edildi. Düşük devirde tüp çalkalayıcıda karıştırıldı ve karışım soğutulmadan plağa döküldü. Daha sonra sekiz şeklinde hareket ettirildi ve yayılması sağlandı. 37 °C'de 48-72 saat inkübasyondan sonra spontan , revertant kolonilerin sayımı yapıldı. Bu çalışma her suş için birden fazla tekrarlandı ve ortalama değerleri hesaplandı (Şekil 3.2.4.1.) (Maron ve Ames, 1983).



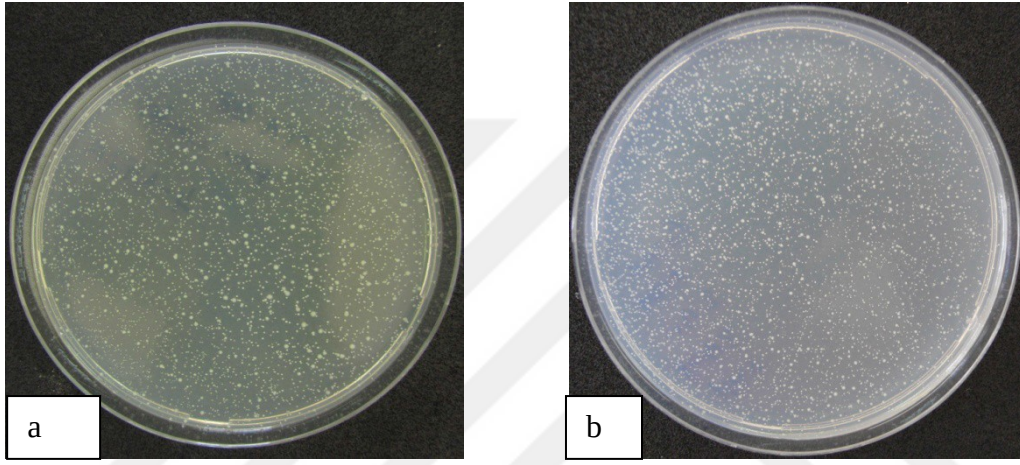
Şekil 3.2.4.1. Kendiliğinden geriye dönen koloni sayılarının kontrolü: a) *S. typhimurium* TA 98 b) *S. typhimurium* TA 100

3.2.5. Master plakların çalışmada hazırlanışı

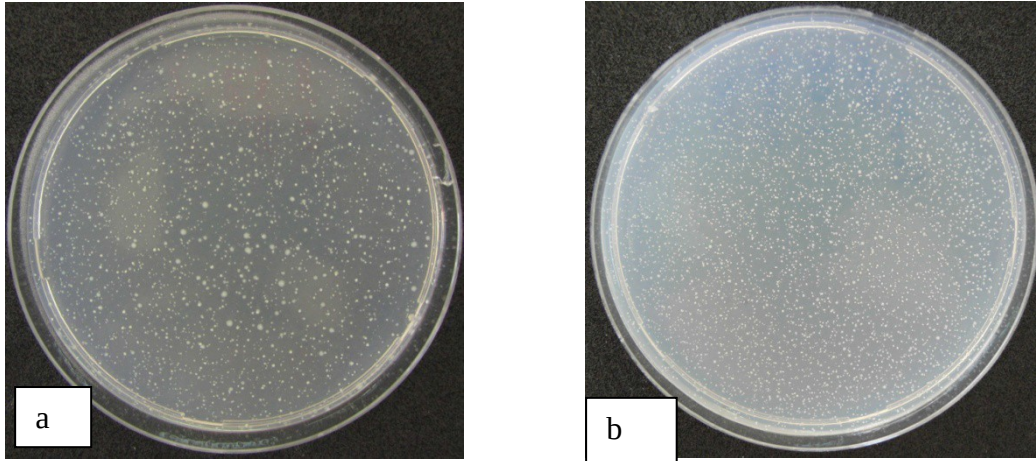
İki ay süre ile saklanabilmesi için buzdolabında bakteri suşlarının master plakları hazırlandı. Histidin/biyotin/ampisilin içeren kısımdaki plaklara genetik işaretleri doğrulanan suşlar ekildi. Sonra kültür hazırlama çalışmaları ise iki ay süre ile bu plaklardan yapıldı (Maron ve Ames, 1983).

3.2.6. Pozitif kontrol

Bilinen standart mutajenik etkili kimyasal bazı maddelere karşı bakterilerin tepkilerini gözlemek amacı ile bu mutajenler, pozitif kontrol amacıyla dolayı esas deneme için paralel olarak uygulandı. *Salmonella typhimurium* TA 98 suşu için ise indirekt mutajen olan 2-aminoflouren S9 karışımı varlığında kullanıldı. Direkt mutajen olan 4-nitro-o-fenilendiamin S9 karışımı ise yokluğunda kullanıldı (Şekil 3.2.6.1). *Salmonella typhimurium* TA 100 için ise direkt mutajen olarak S9 karışımı yokluğunda sodyum azid ve varlığında 2-aminoantrasen kullanıldı (Şekil 3.2.6.2) (Özbek, 2006).



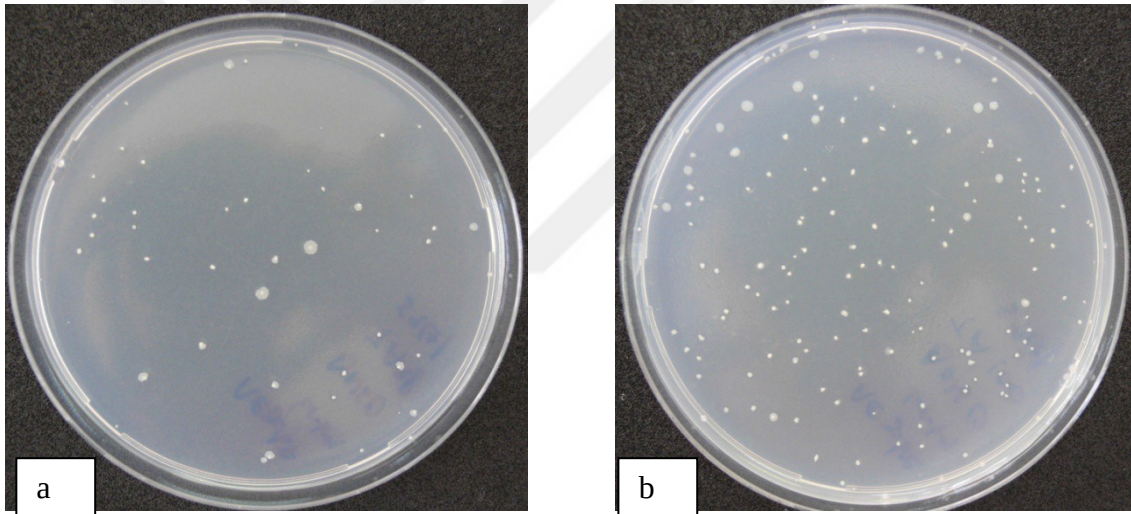
Şekil 3.2.6.1. *Salmonella typhimurium* TA 98 suşu üstünde: a) S9 yokluğunda 4 nitro-o-fenilendiamin'in mutajenik etkisi, b) S9 varlığında 2-Aminoflouren'in mutajenik etkisi.



Şekil 3.2.6.2. *Salmonella typhimurium* TA 100 suşu üstünde: a) S9 yokluğunda Sodyum azid'in mutajenik etkisi, b) S9 varlığında 2-Aminoantrasen'in mutajenik etkisi.

3.2.7. Negatif kontrol

Her iki bakteri suşu üstüne etkilerinin olduğu veya olmadığını kontrol etmek amacı bu çalışmada meyve özütlerinin ve kontrol mutajen maddelerden 4-nitro-o-fenilendiamin, 2-aminoantrasen ve 2-aminofloureni çözmek için dimetil sülfoksit'in (DMSO) ve kontrol mutajenlerden Sodyum azid'i çözmek için su kullanıldı. Bu çalışmada uygun konsantrasyondaki bakteri kültüründen ($1-2 \times 10^9$) 0.1 ml ile spektrofotometrik saflıktaki su ya da dimetil sülfoksit'ten 0.1 ml alınıp, içerisinde 2.5 ml üst agar bulunan tüpe aktarıldı. Sonra minimal glukoz agarlı plakların yüzeyine karışım dağıtıldı. 37 °C'de 48-72 saat inkübasyona plaklar bırakıldı. Süre bitiminde revertant plaklarındaki bakteri sayıları ile negatif kontrol plakları karşılaştırıldı. Bu sayıların benzer ya da yakın olduğu durumlarda , negatif kontrolü doğruladığını gösterdi (Şekil 3.2.7.1).



Şekil 3.2.7.1. Dimetil sülfoksitin (DMSO) negatif kontrol ajanı olarak kullanılması: a) *Salmonella typhimurium* TA 98 suşu üzerine etkisi. b) *Salmonella typhimurium* TA 100 suşu üzerine etkisi

3.2.8. Mutajenite deneyi (Ames/*Salmonella*/mikrozom testi)

Salmonella mikrozom test sistemi meyve özütlerinin mutajenitelerinin araştırılmasında kullanıldı (Maron ve Ames, 1983). Denemelerde (Maron ve Ames, 1983) tarafından “standart plak inkorporasyon” yöntemi kullanıldı. Bu teknikte; S9 varlığı ile yokluğunda iki farklı çalışma yapıldı.

3.2.8.1. S9'suz deneyin yapılması

Gecelik kültür hazırlandı ve 140 rpm de 16 saat çalkaldı. Sabah saat 09:00da 500 µl alındı ve taze kültür hazırlandı. 5 saat boyunca 110 rpm de çalkalamalı inkübatörde inkübe edildi. 5.5 saat sonundaki bakteri kültürünün üremesi bu deney için uygun bulundu.

5.5 saat sonunda, 45 °C' lik su banyosunda tutulan, tüplere 2.5 ml olarak dağıtılmış olan üst agara (tüplere dağıtmadan önce 90 ml top agara 10 ml 0.5 mM histidin/biyotin solüsyonu eklendi) sırasıyla önce 500 µl sodyum-fosfat tamponu, 100 µl test maddesinin değişik konsantrasyonları ile 100 µl 5.5 saatlik taze bakteri kültüründen ilave edildi. Tüpler düşük hızda vortekslenerek minimal glikoz agar (MGA) plakları yüzeyine dökülerek 8 işareti şeklinde karışımın homojen bir şekilde dağıldı.

Çalışmada sırasında her bir doz için deneyde üç ayrı plak kullanıldı. Buna paralel olarak deneye pozitif ve negatif kontroller de yapıldı.

Pozitif kontrol için (3 petri): 500 µl sodyum-fosfat tamponu+100 µl pozitif kontrol+100 µl bakteri kültürü üst agara ilave edildi.

Kontrol için (3 petri): 500 µl sodyum-fosfat tamponu+100 µl bakteri kültürü üst agara ilave edildi.

DMSO için (3 petri): 500 µl sodyum-fosfat tamponu+100 µl DMSO+100 µl bakteri kültürü üst agara ilave edildi.

Agarın donması beklendi. 37 °C'de 48-72 saat inkübasyona bırakılması için plaklar ters çevrildi. Petrilerdeki bakteri kolonileri süre sonunda sayıldı.

3.2.8.2. S9'lu deneyin yapılması

S9'suz deneyde anlatıldığı gibi, bakterinin gecelik taze kültürü hazırlandı. Belli bir süre sonunda yeniden pasajlanarak 5.5 saatlik taze kültür elde edildi. Daha önceden hazırlanmış olan ve 45 °C'lik su banyosunda tutulan 2.5 ml olarak dağıtılmış olan üst agara, sırasıyla önce 500 µl S9 karışımı, 100 µl test maddesinin değişik konsantrasyonları ile 100 µl 5.5 saatlik taze bakteri kültüründen ilave edildi. Tüpler düşük hızda vortekslenerek minimal glikoz agar (MGA) plakları yüzeyine dökülerek 8 işareti şeklinde karışımın homojen bir şekilde dağıldı.

Çalışmada sırasında her bir doz için deneyde üç ayrı plak kullanıldı. Buna paralel olarak deneye pozitif ve negatif kontroller de yapıldı.

Kontrol için (3 petri): 500 µl S9 karışımı+100 µl bakteri kültürü üst agara ilave edildi.

DMSO (negatif kontrol) için (3 petri): 500 µl S9 karışımı+100 µl DMSO+100 µl bakteri kültürü üst agara ilave edildi.

Pozitif kontrol için (3 petri): 500 µl S9 karışımı+100 µl pozitif kontrol+100 µl bakteri kültürü üst agara ilave edildi.

Agarın donması beklendi. 37 °C’de 48-72 saat inkübasyona bırakılması için plaklar ters çevrildi. Petrillerdeki bakteri kolonileri süre sonunda sayıldı.

3.2.9. Antimutajenite deneyi

3.2.9.1. S9 yokluğunda yapılan çalışma

S9 yokluğunda yapılan deney için gecelik kültür hazırlanıp ve 140 rpm’de 16 saat çalkalandı. 500 µl gecelik kültürden alındı ve taze kültür hazırlandı. 110 rpm’de çalkalamalı inkübatörde 5.5 saat boyunca inkübe edildi. 5.5 saat sonundaki bakteri kültürünün üremesi S9 varlığında yapılan deney için uygun olarak görüldü.

İnkübe edilmesi sonrasında su banyosunda tutulan 45 °C’ lik tüplere 2.5 ml olarak üst agara dağıtıldı (tüplere dağıtmadan önce 90 ml üst agara 10 ml 0.5 mM histidin/biyotin solüsyonu eklendi) ve öncelikle 500 µl sodyum-fosfat tamponu, 100 µl meyve özütü ve 100 µl pozitif mutajen madde ilave edildi. Düşük hızda vortekslenerek tüpler MGA plakları yüzeyine dökülerek, sekiz işareti yapılarak homojen bir şekilde karışımın dağılması sağlandı. Agarın donması için beklendi ve 37 °C 48-72 saat olmak üzere plaklar ters çevrilip inkübasyona bırakıldı. Süre bitiminde plaklardaki koloniler sayıldı.

Çalışmada sırasında her bir doz için deneyde üç ayrı plak kullanıldı. Buna paralel olarak deneye pozitif ve negatif kontroller de yapıldı.

Negatif kontrol (DMSO ya da su) için: 100 µl su ya da DMSO+500 µl sodyum-fosfat tamponu +100 µl bakteri kültürü üst agara ilave edildi.

Pozitif kontrol için: 100 µl pozitif mutajen madde +500 µl sodyum-fosfat tamponu +100 µl bakteri kültürü üst agara ilave edildi.

3.2.9.2 S9 varlığında yapılan çalışma

S9 varlığında yapılan deney için gecelik kültür hazırlanıp ve 140 rpm’de 16 saat çalkalandı. 500 µl gecelik kültürden alındı ve taze kültür hazırlandı. 110 rpm’de çalkalamalı inkübatörde 5.5 saat boyunca inkübe edildi. 5.5 saat sonundaki bakteri kültürünün üremesi S9 varlığında yapılan deney için uygun olarak görüldü.

İnkübe edilmesi sonrasında su banyosunda tutulan 45 °C’ lik tüplere 2.5 ml olarak üst agara dağıtıldı (tüplere dağıtmadan önce 90 ml üst agara 10 ml 0.5 mM histidin/biyotin solüsyonu eklendi) ve öncelikle 500 µl S9 karışımı, 100 µl test maddesi ile 100 µl pozitif mutajen madde, 100 µl 5.5 saatlik taze bakteri kültüründen eklendi. Düşük hızda vortekslenerek tüpler MGA plakları yüzeyine dökülerek, sekiz işareti yapılarak homojen bir şekilde karışımın dağılması sağlandı.

Çalışmada sırasında her bir doz için deneyde üç ayrı plak kullanıldı. Buna paralel olarak deneye pozitif ve negatif kontroller de yapıldı.

Pozitif kontrol için: 100 µl pozitif mutajen madde +500 µl S9 karışımı +100 µl bakteri kültürü üst agara ilave edildi.

Negatif kontrol (DMSO ya da su) için: 100 µl su ya da DMSO + 500 µl S9 karışımı +100 µl bakteri kültürü üst ağara ilave edildi.

3.2.10. Mutajenite çalışması sonuçlarının değerlendirilmesi

Bir madde *Salmonella*/mikrozom test sisteminde mutajen olarak tanımlanması için, maddenin mutajenik etkisinden dolayı prototrof bakteri hücre sayılarının histidin (+) hale gelmesi, revertant koloni sayısının ise en az iki katı olması gerekir. Bu sayı doza bağlı bir artış ile revertant koloni sayısının iki katından az olduğu durumda bu maddeye mutajen olarak tanımlanmaktadır (Maron ve Ames, 1983).

3.2.11. Antimutajenite çalışma sonuçlarının değerlendirilmesi

Denemeler üç tekrarlı olarak yapıldı. Çalışmamızda elde edilen sonuçlar ise % inhibisyon değeri hesaplanıp ve analiz edildikten sonra tablo halinde verildi.

Sonuçlar değerlendirilirken *Salmonella*/mikrozom test sisteminde, % inhibisyon oranı aşağıdaki verilen formüle göre hesaplandı (Rajaei ve ark., 2010);

$$\% \text{ inhibisyon oranı} = \left[\frac{(A - B)}{(A - C)} \right] \times 100$$

A → Sadece mutajen madde varlığında geri dönen koloni sayısı

B → Mutajen madde ve test maddesi varlığında geri dönen koloni sayısı

C → Spontan revertant koloni sayısı

Karadut meyve özütlerinin mutajen madde üzerindeki etkisinin değerlendirilmesinde inhibisyon oranı % 25-40 arasında ve antimutajenik etkisinin değerlendirilmesi ise orta dereceli olması; % 40'tan fazla olduğunda ise, güçlü antimutajenik etkisi olduğu kabul edildi. % 25'den daha az olduğunda ise inhibisyon oranı antimutajenik etkisi olarak zayıf veya yok olarak kabul edildi (Negi ve ark., 2003).

3.2.12. Antimikrobiyal aktivitenin belirlenmesi

Antimikrobiyal aktiviteyi belirlemek için (Abbasoglu ve ark., 1995)'nın bildirdiği sıvı mikrodilüsyon (broth microdilution) yöntemi kullanıldı.

3.2.12.1 Sıvı mikrodilüsyon yöntemi ve sonuçlarının değerlendirilmesi

Antimikrobiyal aktivitenin belirlenmesine yönelik olarak uygulanan sıvı mikrodilüsyon metodunda Mueller-Hinton broth besiyeri kullanıldı.

Karadut konsantre meyve suları laboratuvar ortamında, rotary evaporatör yardımı ile kurutuldu. Toplanan özütten 25 mg/ml 'lık stok hazırlandı. Antimikrobiyal aktiviteyi belirlemek için sıvı mikrodilüsyon metodu uygulandı. Sıvı mikrodilüsyon metodunda; test suşları olarak *Escherichia coli* ATCC 25922, *Klebsiella pneumoniae* ATCC 70603, Metisiline Dirençli *Staphylococcus aureus* (MRSA) ATCC 43300, *Salmonella enteritidis* ATCC 13076, *Sarcina lutea* ATCC 9341, *Salmonella typhimurium* NRRLE 4463, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 15442, *Proteus mirabilis* ATCC 25933, *Yersinia enterocolitica* ATCC 1501, *Listeria monocytogenes* 1/2 B standart bakteri suşları ile *Candida albicans* maya suşu kullanıldı. Bu suşlar 37°C'de bir gece inkübasyona bırakılmak üzere Brain– Heart Infusion Broth (Merck) besiyerine ekildi. 24 saatlik bakteri kültüründeki kolonilerden, 0.5 McFarland tüp bulanıklığına eşit olacak şekilde bakteri süspansiyonu hazırlanarak, son inokülüm konsantrasyonu 5×10^5 kob/ml olacak şekilde, 1/100 oranında sulandırıldı. Mikropleytlarin steril U şeklinde olan kuyucuklarının her birine 100 µl Mueller - Hilton Broth Besiyeri ilave edildi. Meyve özütünden 100 µl hazırlanıp ilk kuyucuklara ilave edildi. İlk kuyucuklardan 100 µl alınıp ikincilere, aynı miktar alınıp üçüncülere ve bu sırasıyla 12. kuyucuğa kadar dilüsyon işlemi uygulandı. Ve son olarak pozitif kontrol olması için 12. kuyucuk kullanıldı. Kuyucuklardaki inokulumun son konsantrasyonu, 5×10^5 koloni oluşturan birim (kob) /ml ve karadut (*Morus nigra* L.) meyve özütleri; 6.25 – 0,048 mg/ml arası final konsantrasyonlarda mikropleytlere aktarıldı. 37 °C'de 24 saat boyunca pleytler inkübe edildi ve bu süre sonunda 20 µl 2, 3, 5 – Triphenyl – 2H- Tetrazolium Cehlinde (TTC) (% 0.5) solüsyonu kuyucuklara eklendi. Tekrar inkübasyon için 37 °C'de 30 dakika beklenildi. Daha sonra süre bitiminde bakteri üremesi olan kuyucuklar kırmızı veya pembe boyanırken, üremenin olmadığı kuyucuklarda renk değişimi görülmedi. Renk değişiminin gözlenmediği en son kuyucuk Minimum İnhibisyon Konsantrasyon (MİK) değeri olarak belirlendi.

4. ARAŞTIRMA SONUÇLARI VE TARTIŞMA

4.1. Çalışmada Test Suşlarının Üreme Durumları

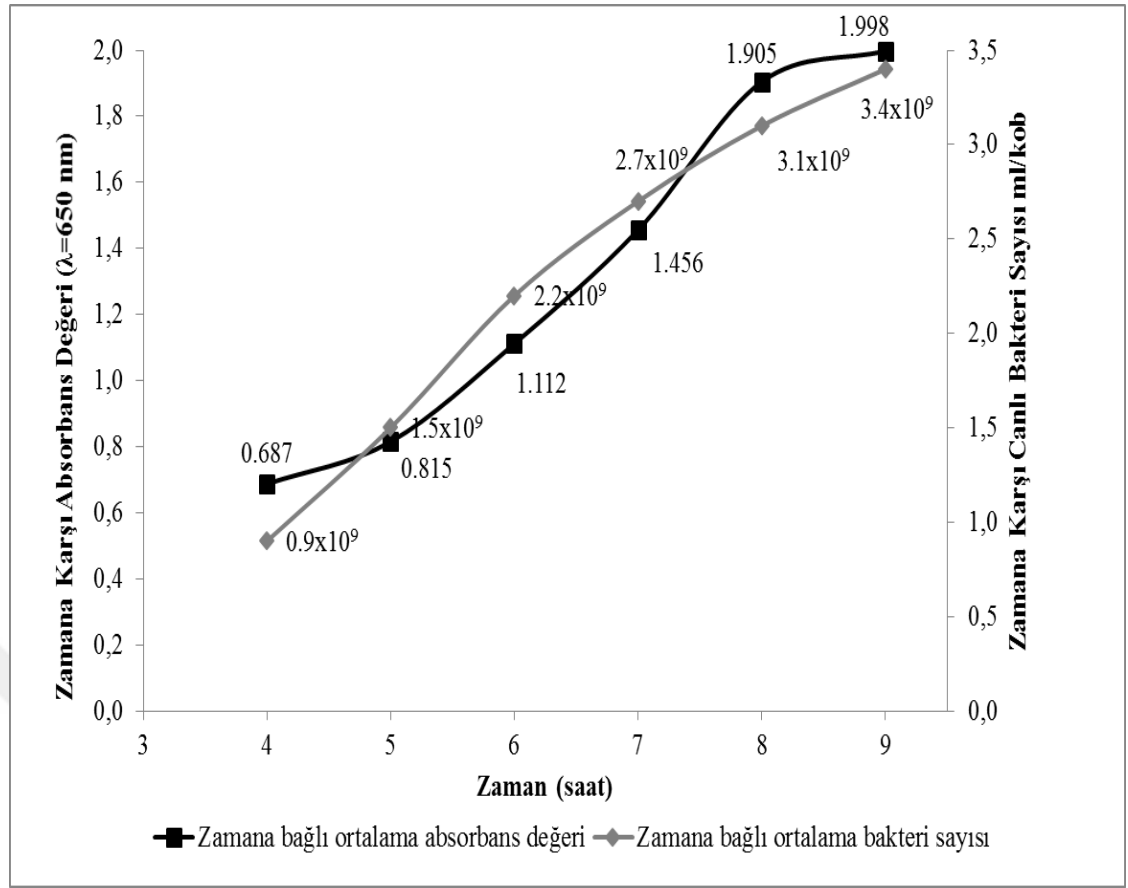
S. typhimurium TA 100 suşunun kültürün mililitresindeki canlı bakteri sayıları ile zamana bağlı absorbans değerleri tespit edildi (Çizelge 4. 1, Şekil 4. 1).

Suş kültürlerinde bulunması öngörülen ve bir mililitresinde $1-2 \times 10^9$ kob/ml olması *Salmonella*/mikrozom test sisteminde kullanılmaktadır (Maron ve Ames, 1983). 1 ml'sinde olması gereken bakteri sayısı ($1-2 \times 10^9$ kob/ml) *Salmonella typhimurium* TA 98 ile TA 100 suşlarında; *Salmonella typhimurium* TA 100 suşu için, inkübasyonunun ortalama 5. ile 6. saatleri arasında ulaşıldı. Bu yüzden denemelerde, *S. typhimurium* TA 98 ile TA 100 suşları çalkalamalı inkübatörde 110 rpm ve 37 °C'de 5.5 saat süre ile inkübe edildi.

Çizelge 4.1. *Salmonella typhimurium* TA 100'ün üreme durumu ile zamana göre absorbans değerleri (*).

Zaman (Saat)	Canlı Bakteri Sayısının /ml Ortalaması	Ortalama Absorbans $\lambda=650$ nm
4	0.9×10^9	0.687
5	1.5×10^9	0.815
6	2.2×10^9	1.112
7	2.7×10^9	1.456
8	3.1×10^9	1.905
9	3.4×10^9	1.998

* Üç ayrı ölçüm ve sayım sonuçlarının ortalamasıdır.



Şekil 4.1. *Salmonella typhimurium* TA 100'ün üreme yoğunluğu ve zamana bağlı absorbans değerleri karşılaştırılması

4.2. *Morus nigra* L. Meyve Özütlerinin Mutajenik Aktivite Sonuçları

Çalışmada kullanılan meyve özütü ekstraktlarının, *Salmonella typhimurium* TA 98 ve TA 100 için S9 fraksiyonu varlığı ile yokluğunda plak inkorporasyon testi sonuçları Çizelge 4.2' de gösterilmiştir.

Çizelge 4. 2. Çalışmada kullanılan *Morus nigra* L. meyve özütlerinin *S.typhimurium* TA 98 ile TA 100 suşları olmak üzere mutajenik aktivite test sonuçları.

Suşlar		Konsantrasyo n (µg/plak)	S9 yokluğunda geri dönen (revertant) koloni sayısı	S9 varlığında geri dönen (revertant) koloni sayısı
			Ortalama±SD	Ortalama±SD
TA 98	Negatif Kontrol (DMSO)	100 µl	28±2	39±6
	Pozitif Kontrol *		880±64	4158±117
	Kontrol	0 µg/plak	31±5	34±4
	<i>Morus nigra</i> meyve özütü	10000 µg/plak	29±3	37 ± 6
		5000 µg/plak	30±4	38 ± 7
		2500 µg/plak	26±4	33 ± 5
		1000 µg/plak	30 ± 4	31 ± 5
		500 µg/plak	29 ± 4	30± 5
TA 100	Negatif Kontrol (DMSO)	100 µl	129±12	140±9
	Pozitif Kontrol *		2547± 45	5019±289
	Kontrol	0 µg/plak	141±9	142±16
	<i>Morus nigra</i> meyve özütü	10000 µg/plak	148±8	150 ± 9
		5000 µg/plak	123±9	146 ± 10
		2500 µg/plak	132±10	131 ± 14
		1000 µg/plak	143±9	110 ± 7
		500 µg/plak	156±13	129 ± 11

* *S.typhimurium* TA 98 suşu üzerinde S9 yokluğunda 4-nitro-o-fenilendiamin (200 µg/plak), S9 varlığında pozitif kontrol olarak 2-Aminofluoren (200 µg/plak); *S.typhimurium* TA 100 suşu için S9 varlığında 2-Aminoantrasen (5 µg/plak), S9 yokluğunda ise sodyum azid (10 µg/plak) kullanılmıştır.

Meyve özütlerinin *Salmonella typhimurium* TA 98 ve TA 100 suşu üzerinde mutajenik etkinin olabilmesi için, her özüt ve aynı zamanda hazırlanan kontrol plaklarındaki (0 µg/plak dozu) koloni sayısının; en yüksek iki katından fazla ya da iki katına yakın sayılarda olması gerekir.(Maron ve Ames, 1983).

Morus nigra L. farklı meyve özütü konsantrasyonlarının (dozlarının) TA 98 suşu üzerinde, S9 yokluğunda herhangi mutajenik bir aktivite göstermediği belirlendi. *Morus nigra* L. farklı meyve özütü dozlarının TA 98 suşu üzerinde, S9 varlığında da herhangi bir mutajenik aktivite göstermediği ve belirlenen sayının, kontrol plağında belirlenen sayının iki katından fazla ya da iki katına yakın sayıda olmadığından, S9'lu denemeleri için de herhangi bir mutajenik aktivite belirlenemedi. *Morus nigra* L. meyve özütü dozlarının TA 100 suşunda ise S9 varlığı ile yokluğunda kontrol plağındaki sayının iki katı veya daha fazlasına ulaşamadığı gözlemlendi. Bu durumda *Morus nigra* L. meyve özütü ekstraktlarının TA 100 suşu için de mutajenik etkili olmadığı tespit edildi (Çizelge 4. 2.) .

4.3. *Morus nigra* L. Meyve Özütlerinin Antimutajenik Aktivite Sonuçları

Çalışmada kullanılan meyve özütlerinin, bilinen mutajenlere karşı gösterdikleri antimutajenik aktiviteleri belirlendi. Antimutajenite oranları ve revertant koloni sayıları Çizelge 4.3'de verildi.

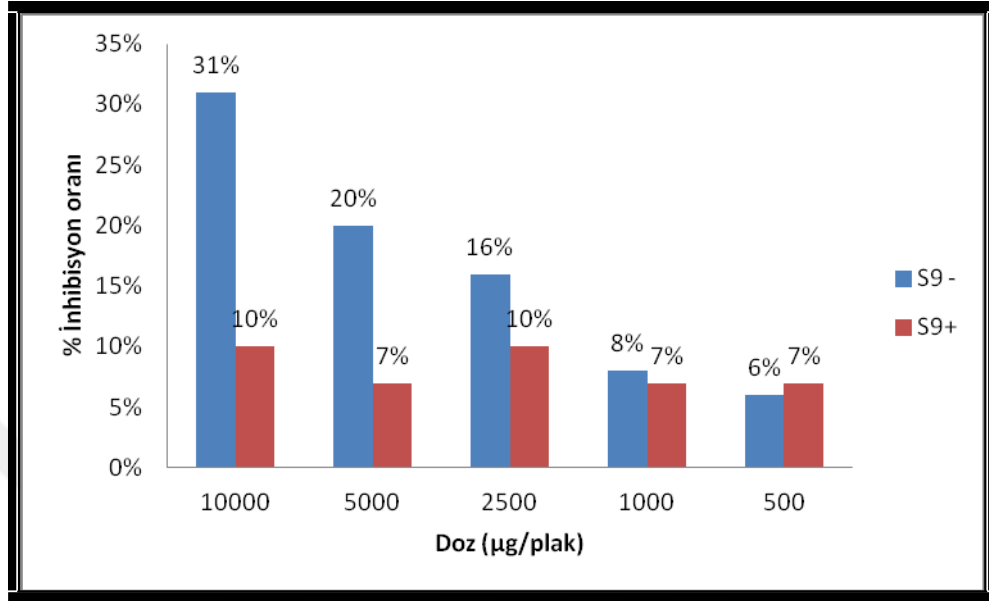
Çizelge 4. 3. Çalışmada kullanılan *Morus nigra* L. meyve özütlerinin *S.typhimurium* TA 98 ile TA 100 suşlarında yapılan antimutajenite test sonuçları ve inhibisyon oranları.

Suşlar		onsantrasyon (µg/plak)	S9 yokluğunda geri dönen His ⁺ (revertant) koloni sayısı		S9 varlığında geri dönen His ⁺ (revertant) koloni sayısı	
			Ortalama± SD	% İnhibisyon	Ortalama± SD	% İnhibisyon
TA 98	Negatif Kontrol (DMSO)		28±2		39±6	
	Pozitif Kontrol *		880±64		4158±117	
	Kontrol	0µg/plak	31±5		34±4	
	<i>Morus nigra</i> meyve özütü	0000 µg/plak	603±63	31	3756±408	10
		5000 µg/plak	698±30	20	3860±166	7
		2500 µg/plak	724±29	16	3748±208	10
		1000 µg/plak	791±20	8	3849±395	7
		500 µg/plak	804±97	6	3865±257	7
TA 100	Negatif Kontrol (DMSO)		129±12		140±9	
	Pozitif Kontrol*		2547± 45		5019±289	
	Kontrol	0 µg/plak	141±9		142±16	
	<i>Morus nigra</i> meyve özütü	0000 µg/plak	2065±132	20	4749±205	6
		5000 µg/plak	2213±182	14	4867±286	4
		2500 µg/plak	2428±188	5	4886±135	3
		1000 µg/plak	2430±90	4	4978±429	0
		500 µg/plak	2455±139	3	4992±115	0

* *S.typhimurium* TA 98 suşu için pozitif kontrol olarak S9 yokluğunda 4-nitro-o-fenilendiamin (200 µg/plak); S9 varlığında ise 2-Aminofluoren (200 µg/plak), *S.typhimurium* TA 100 suşu için S9 varlığında 2-Aminoantrasen (5 µg/plak), S9 yokluğunda ise sodyum azid (10 µg/plak) kullanıldı.

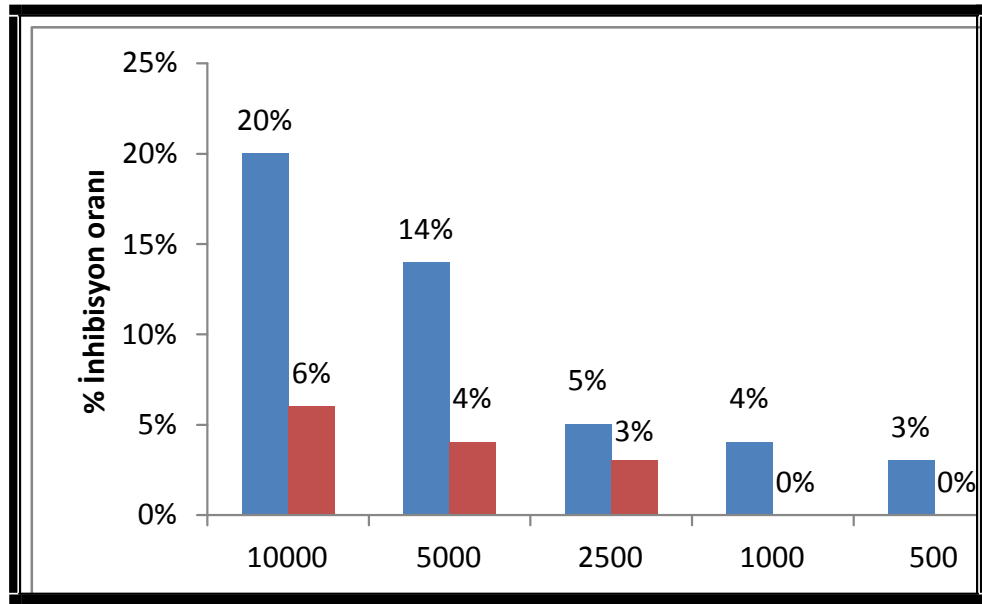
Morus nigra L. meyve özütü dozlarının TA 98 suşu üzerinde, S9 yokluğunda tüm deneme dozlarında 4-nitro-o-fenilendiamin (200 µg/plak)' e karşı 10000 µg/plak dozunda % 31 oranında orta derecede antimutajenik aktivite gösterdiği fakat 5000, 2500, 1000 ve 500 µg/plak dozlarında ise sırasıyla % 20, % 16, % 8 ve % 6 oranlarında zayıf derecede antimutajenik aktivite gösterdiği belirlendi. Ekstraktların S9 varlığında 2-Aminofluoren (200 µg/plak) karşı ise sadece 10000 µg/plak dozunda % 10 oranı ile zayıf dereceli antimutajenik aktivite gösterdiği tespit edildi. Diğer 5000, 2500, 1000 ve

500 µg/plak dozlarında da sırasıyla % 7, % 10, % 7 ve % 7 oranlarında zayıf dereceli antimutajenik aktivite gösterdikleri belirlendi. (Şekil 4.2, Çizelge 4.3).

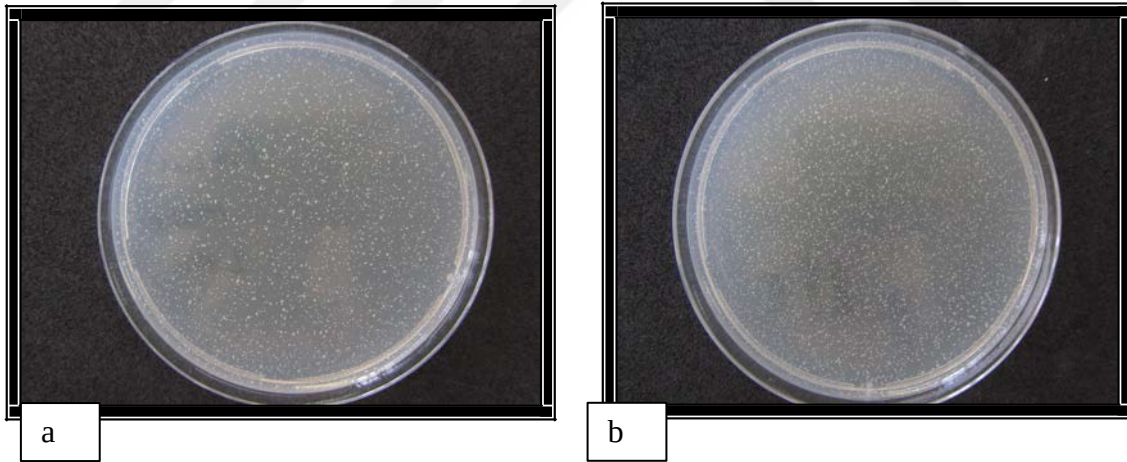


Şekil 4. 2. Çalışmada kullanılan *S.typhimurium*'un *Morus nigra* meyve özütü dozlarında TA 98 suşunun S9 varlığı ile yokluğunda pozitif mutajenlere karşı (2-Aminofluoren 200 µg/plak ve 4-nitro-o-fenilendiamin 200 µg/plak) antimutajenik inhibisyon oranları.

Morus nigra L. meyve özütlerinin TA 100 suşu üzerinde, S9 yokluğunda tüm deneme dozlarında sodyum azid'e (10 µg/plak) karşı, 10000 µg/plak dozunda % 20 oranında zayıf derecede antimutajenik aktivite gösterirken, diğer 5000, 2500, 1000 ve 500 µg/plak dozlarında ise sırasıyla % 14, % 5, % 4 ve % 3 oranlarında zayıf derecede antimutajenik aktivite belirlendi. Meyve özütlerinin S9 varlığında 2-Aminoantrasen'e (5 µg/plak) karşı 10000 µg/plak dozunda % 6 oranı ile zayıf dereceli antimutajenik aktivite gösterirken, diğer 5000, 2500, 1000 ve 500 µg/plak dozlarında ise sırasıyla % 4, % 3, % 0 ve % 0 oranlarında zayıf dereceli antimutajenik aktivite belirlendi. (Şekil 4.3, Çizelge 4.3).



Şekil 4. 3. Çalışmada kullanılan *S.typhimurium*'un *Morus nigra* meyve özütü dozlarında TA 100 suşunun S9 varlığı ile yokluğunda pozitif mutajenlere karşı (2-Aminoantrasen 5 µg/plak ve sodyum azid 10 µg/plak) antimutajenik inhibisyon oranları.

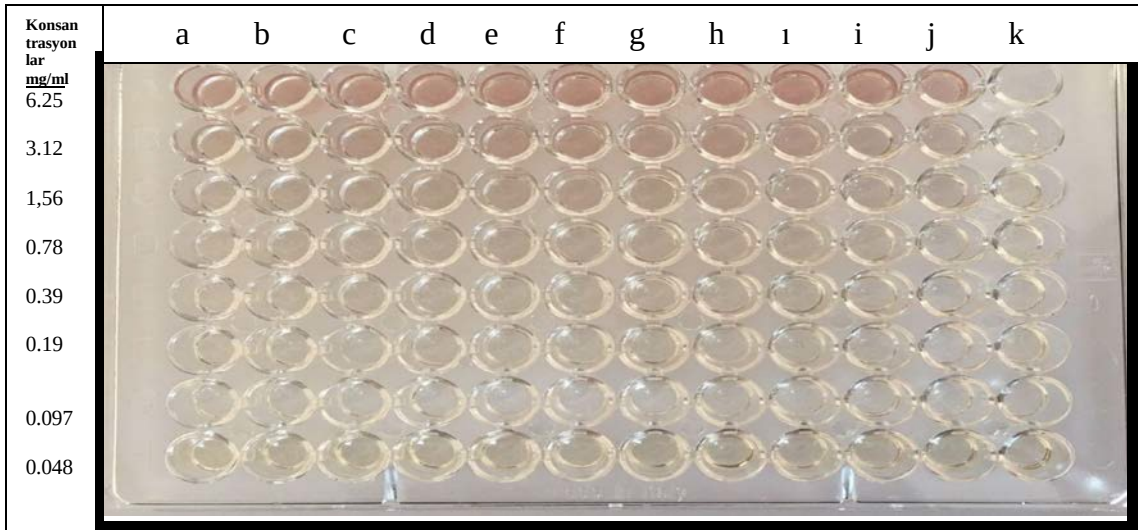


Şekil 4.4. *Morus nigra* L. meyve özütünün *S. typhimurium* TA 100 suşu üzerinde S9 varlığında 5000 µg/plak dozunda antimutajenik etkisi : a) Pozitif kontrol (2-AA) plağı. b) 5000 µg/plak dozunda revertant koloni sayısının indirgenmesi

4.4. *Morus nigra* L. Meyve Özütlerinin Antimikrobiyal Aktivite Sonuçları

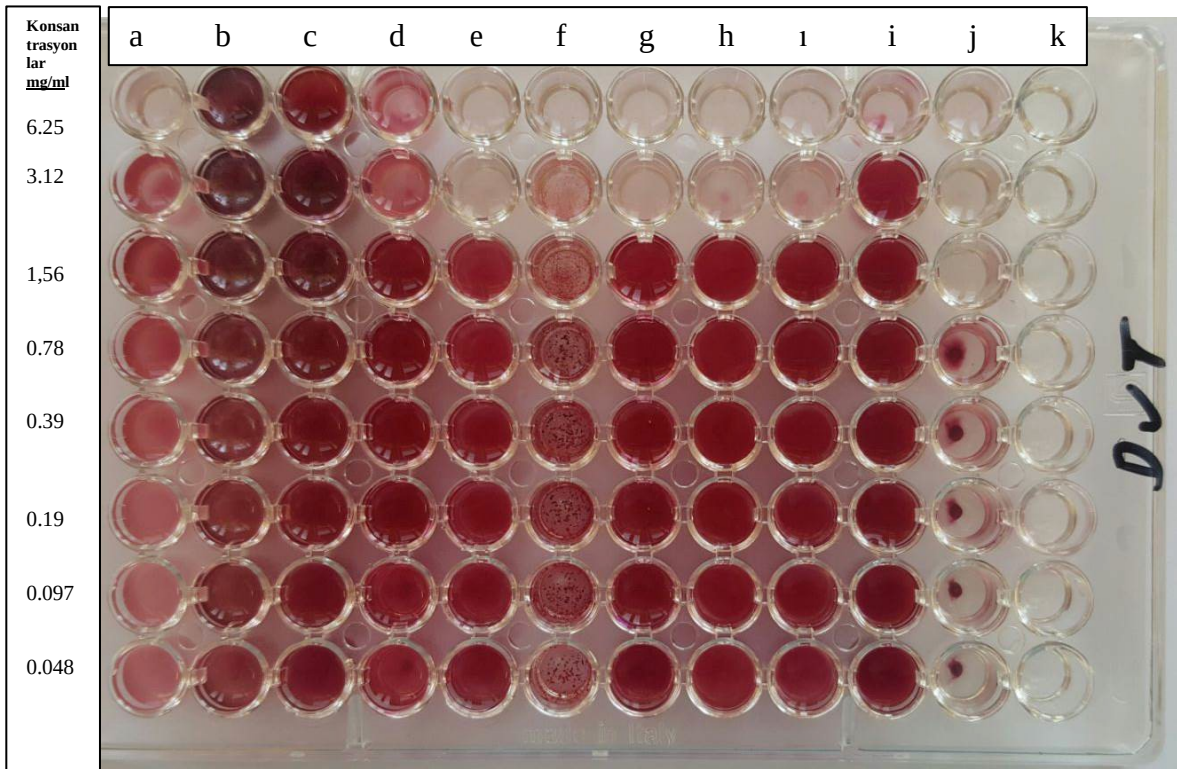
Antimikrobiyal aktivite belirleme çalışması için sıvı mikrodilüsyon yöntemi uygulandı ve çeşitli konsantrasyonlardaki özütlerin Minimum İnhibisyon Konsantrasyon (MİK) değerleri tespit edilmeye çalışıldı. Stok özütler; 6.25 – 0,048 mg/ml arası final konsantrasyonlarda mikro-pleytlere aktarıldı. Test mikroorganizmaları olarak *Escherichia coli* ATCC 25922, *Klebsiella pneumoniae* ATCC 70603, Metisiline Dirençli *Staphylococcus aureus* (MRSA) ATCC 43300, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 15442, *Salmonella enteritidis* ATCC 13076, *Sarcina lutea* ATCC 9341, *Salmonella typhimurium* NRRLE 4463, *Yersinia enterocolitica* ATCC 1501, *Proteus mirabilis* ATCC 25933, *Listeria monocytogenes* 1/2 B standart bakteri suşları ile *Candida albicans* maya suşu kullanıldı.

Çalışma sonucunda; özütlerin *Escherichia coli*, *Sarcina lutea*, *Salmonella typhimurium* ve *Yersinia enterocolitica* suşlarına karşı MİK değeri 6.25 mg/ml olarak belirlenirken, *Salmonella enteritidis* için 3.12 mg/ml ve *Listeria monocytogenes* için 1.56 mg/ml olarak saptandı. *Klebsiella pneumoniae*, *Staphylococcus aureus*, *Proteus mirabilis*, *Pseudomonas aeruginosa* suşlarına karşı ise herhangi bir MİK değeri belirlenemedi. *Candida albicans* suşunda ise 3.12 mg/ml konsantrasyonda inhibisyon gösterdi.



a.

Şekil 4. 1. Mikrodilüsyon yönteminde: a) *Morus nigra* L. meyve özütlerine karşı mikroorganizma test suşlarının üreme öncesi görünümü



b.

b) *Morus nigra* L. meyve özütlerine karşı mikroorganizma test suşlarının üreme sonrası görünümü.

(a: *Escherichia coli* ATCC 25922, b: *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 15442, c: *Klebsiella pneumoniae* ATCC 70603, d: Metisiline Dirençli *Staphylococcus aureus* (MRSA) ATCC 43300, e: *Salmonella enteritidis* ATCC 13076, f: *Sarcina lutea* ATCC 9341, g: *Candida albicans*, h: *Salmonella typhimurium* NRRLE 4463, i: *Yersinia enterocolitica* ATCC 1501, i: *Proteus mirabilis* ATCC 25933, j: *Listeria monocytogenes* 1/2 B, k: besiyeri kontrol.)

4.5.Tartışma

Bitkilerden elde edilen çeşitli bileşiklerin gıda endüstrisinde, hem antioksidan hem de antimikrobiyal bazı özellikleri nedeni ile gıda maddelerinin ve bazı organik ürünlerin korunması ve raf ömürlerinin uzatılmasında önemli rol oynamaktadırlar. Bitkilerin kök, gövde ve yaprak gibi kısımlarından ileri ve modern tekniklerle elde edilen aktif saf bileşikler, insan sağlığı ile ilgili çeşitli alanlarda kullanılmaktadırlar.

Gokbulut ve ark., (2013), karadut meyvesinin antimikrobiyal aktivitesinin belirlenmesi ile ilgili yaptığı çalışmada, karadutun Gram negatif bakterilerden *S.flexneri* hariç, daha çok Gram pozitif bakterilere karşı etkili olduğunu, Minimal inhibitör konsantrasyonlarını (MİK) ; *B. cereus* ve *S. hominis* için 16 mg/mL, *S. epidermidis*, *S.warneri* ve *S. flexneri* için 32 mg/mL ve *C.albicans* için 512 mg/mL olarak belirlemiştir.

Yiğit ve ark., (2007), karadut (*Morus nigra* L.) meyvesinde su ve metanol ekstraktlarının *Candida* türlerine karşı MİK değerlerini tespit etmişlerdir. Çalışma sonucunda, su ve metanol ekstraktlarının *C. paropsiosis*, *C. albicans*, *C. tropicalis*, *Geotricum candidum* izolatları üzerindeki antikandidal aktivitelerini gözlemişlerdir.

Sengun ve ark., (2015), karadut (*Morus nigra* L.) bileşiminde bulunan papiri flavonal A, saforaflavanon D, kuraridin, saforasio flavanon A'nın güçlü antimikrobiyal etki gösterdiğini bildirmektedirler. Çalışmamızda da karadut (*Morus nigra* L.) meyve özütünün çeşitli mikroorganizma türlerine karşı belirlenen MİK değerleri, bu konuda yapılan çalışmaların sonuçlarına yakın değerler göstermiştir.

Grierson ve Munro-Hay, (1999), Güney Afrika'da ağız yaralarının tedavisinde kullanılan yöresel bitkilerin antibakteriyel aktivitelerinin belirlenmesi üzerine yaptıkları çalışmada Gram negatif ve Gram pozitif bakteriler kullanılmış, Gram pozitif bakterilerin (*B. cereus*, *S. aureus*) Gram negatiflere (*E. coli*, *Klebsiella pneumoniae*) kıyasla daha hassas oldukları, Gram negatif bakteriler üzerinde bitkilerin etkili olmadığını tespit etmişlerdir.

Pessini ve ark., (2003), *Piper regnelli* bitkisi neolignanlarının ve ekstraktlarının antibakteriyel aktivitesinin tespiti için yaptıkları çalışmada kullanılan Gram negatif ve Gram pozitif bakterilerden Gram pozitiflerin, (*B. Subtilis* ve *S. aureus*) Gram negatiflere (*P. Aeruginosa* ve *E. coli*) kıyasla daha hassas olduklarını tespit etmişlerdir.

Alzoreky ve Nakahara, (2003), Asya’da yaygın tüketilen yenilebilir bitki ekstraktlarının antibakteriyel aktivitelerinin belirlenmesi konulu çalışmasında denenen bitkiler ve bakteriler değerlendirildiğinde, Gram pozitif bakterilerin (*S. aureus*, *B. cereus*) Gram negatif bakterilere (*E. coli*) kıyasla daha hassas oldukları belirlenmiştir.

Holetz ve ark., (2002), Brezilya’da tıbbi önemi olan 13 bitki ekstraktının antimikrobiyal aktivitesini *B. Subtilis*, *C.krusei*, *S. aureus*, *C. albicans*, *C.parapsilosis* ile *P.aeruginosa*, *C. tropicalis*’ e karşı test etmiş, toplamda 10 bitkide değişen oranlarda antibakteriyel aktivitenin bulunduğunu ve test edilen mikroorganizmalar arasında Gram pozitif bakterilerin bitki ekstraktlarına karşı daha duyarlı olduğunu belirlemişlerdir.

Son yıllarda, araştırmacılar; geleneksel tıbbi bitkilerin mutajenik ve antimutajenik özelliklerinin belirlenmesinde; esas olabilecek, düşük maliyetli test sistemleri ile kısa zamanda sonuç verebilmesi için geliştirmişlerdir (Mortelmans ve Zeiger, 2000). *Salmonella* mutajenite test sistemi; çeşitli kanserojen ile mutajen aktivitelerinde, antioksidanlar başta yer almak üzere çeşitli ajanların inhibitör etkilerinin izlendiği, kısa zamanlı test sistemidir (Rosin ve Stich, 1979; Ramel ve ark., 1986).Bu sistem, kimyasalların mutajen ya da kanserojen etkilerini ortadan kaldıran, bu kimyasalların DNA ve etkileşimlerini engelleyen antimutajenler ile antikanserojenlerin tespitinde de kullanılmaktadır (Petek ve ark., 1999).

Salmonella typhimurium TA 98 suşu çalışmamızda, S9 varlığında ve S9 yokluğunda ortalama 39 revertant koloni ve 28 revertant koloni oluşturdu. TA 100 suşu çalışmamızda, S9 varlığında ve S9 yokluğunda ortalama 129 revertant koloni ve 140 revertant koloni oluşturdu (Çizelge 4.2., 4.3.,). Ames’e (1972) göre mutant bakteri suşlarının belirli sınırlar içinde Spontan his (-) durumundan his (+) durumuna dönüşmesi muhtemeldi. Bu nedenle sınırlar TA 98 için 30– 50 revertant/plak ve TA 100 için 75–200 revertant/plak olmaktadır. Revertant koloni sayıları çalışmamızda uygun değerlerde bulundu. Revertan koloni sayılarını bulmak için sayımda kullanılan MGA bileşimine giren fosfat tamponu, β -NADP, glukoz–6-fosfat, glukoz ile tuz çözeltisinin derişimi, S9 fraksiyonunun miktarı, top agarın miktarı ile yayılma şekli, plaklardaki MGA’nın hacmi, ortamdaki hava sirkülasyonu, ortamın sıcaklığı, etüvdeki nem oranı, gibi farklılıklardan değişebilmektedir (Şekil 3.2.4.1)

Çalışmamızda *Moraceae* cinsine ait *Morus nigra* L., meyve özütünün mutajenik ve antimutajenik özellikleri Ames-Salmonella/ mikrozom test sistemi kullanılarak tespit edildi. Elde edilen veriler doğrultusunda; çalışmada kullanılan meyve özütlerinin herhangi bir mutajenik etkisinin olmadığı belirlendi (Çizelge 4.2).

Çalışmamızda kullanılan meyve özütü dozlarının, mutajenik etkilerinin olmamasından dolayı, sodyum azid, 4-nitrofenilendiamin, 2- aminoantrasen ve 2- aminofloren gibi bilinen mutajenlere karşı antimutajenik potansiyelleri araştırıldı. Üreyen revertant kolonilerin sayısı ve inhibisyon oranları belirlendi (Çizelge 4. 3, Şekil 4.2, 4.3).

Morus nigra L. meyve özütü ekstraktının S9 varlığında ve yokluğunda TA 98 suşu üzerinde zayıf antimutajeniteye sahip olduğu tespit edilmiştir. TA 98 suşu üzerinde 10000, 5000, 2500, 1000 ve 500 µg/plak dozlarında S9 yokluğunda, sırasıyla %31 inhibisyon oranında orta dereceli antimutajenite, %20, %16, %8 ve %6 inhibisyon oranlarıyla zayıf antimutajenite gösterdi. S9 varlığında ise bu oranlar % 10, % 6, %10, % 7, % 7 olarak belirlendi ve zayıf derecede antimutajenik aktiviteli olarak değerlendirildi. Aynı ekstraktlar TA 100 suşu üzerinde 10000, 5000, 2500, 1000 ve 500 µg/plak dozlarında S9 yokluğunda, sırasıyla %20 inhibisyon oranı ile orta dereceli antimutajenik, %14, %5, %4 ve %3 inhibisyon oranlarıyla da zayıf antimutajenik etkili bulundu. S9 varlığında ise bu oranlar %6, %4, %3, %0, %0 olarak doza bağlı azalma görüldü ve zayıf dereceli antimutajenik olarak değerlendirildi.

Bulgular, metabolik aktivasyon enzimlerinin ekstraktın antimutajenik aktivitesini artırdığı ve TA 98 suşunda bulunan çerçeve kayması mutasyonlarının, TA 100 suşundaki baz çifti değişimi mutasyonundan daha stabil olduğu gösterdi. Bu yüzden özütlerin TA 98 suşu ve TA 100 suşu üzerinde belirlenen antimutajenite % oranları, TA 100 suşuna göre daha yüksek olduğu gözlemlendi.

5. SONUÇLAR VE ÖNERİLER

Morus nigra L. (Karadut) meyve özütlerinin antimikrobiyal ve antioksidan özelliklerinin yanı sıra, halk arasında toksin giderici, ağız yaralarını iyileştirici, iştah artırıcı ve balgam söktürücü olarak da tüketilmektedir (Özgen ve ark., 2009).

Çalışmamızda, *Morus nigra* L. meyve özütlerinin *Listeria monocytogenes* bakteri suşuna karşı 1.56 mg/ml konsantrasyonda etkili bulunması, besin zehirlenmelerine neden olan bu bakteri türünün inhibisyonu amacı ile organik gıda katkı maddesi olarak kullanılmasının yararlı olacağı, *Candida albicans* maya suşunun konsantrasyonda 3.12 mg/ml etkili bulunmasına karşı ise bu maya türünün neden olduğu pamukçuk benzeri ağız yaralarının iyileştirilmesinde ve çocuklarda görülen ishaller ile antibiyotik tedavilerinden sonra mide-barsak mikroflora dengesinin bozulması sonrası, *C.albicans*'ın dominant hale geçerek neden olduğu ishal ve benzeri rahatsızlıkların giderilmesi amacı ile de tüketilmesinin önerilebileceği sonucuna varıldı.

Morus nigra L. meyve özütlerinin tüm dozlarda mutajenik etkili olmadığı fakat denemelerde kullandığımız direkt ve endirekt mutajenik maddelere karşı S9 enzimleri varlığında ve yokluğunda, orta ve zayıf derecede antimutajenik aktivite gösterdiği ve bu nedenle de etkili bir antimutajenik bileşik olarak değerlendirilemeyeceği belirlendi.

KAYNAKLAR

- Abascal, K. ve Yarnell, E., 2002, Herbs and drug resistance: Part 1—Herbs and microbial resistance to antibiotics, *Alternative & Complementary Therapies*, 8 (4), 237-241.
- Abbasoglu, O., Berker, M., Ayhan, A., Palaoglu, S. ve Sayek, I., 1995, The effect of the pineal gland on liver regeneration in rats, *Journal of hepatology*, 23 (5), 578-581.
- Abdullaev, F., Riveron-Negrete, L., Caballero-Ortega, H., Hernández, J. M., Perez-Lopez, I., Pereda-Miranda, R. ve Espinosa-Aguirre, J., 2003, Use of in vitro assays to assess the potential antigenotoxic and cytotoxic effects of saffron (*Crocus sativus* L.), *Toxicology in vitro*, 17 (5), 731-736.
- Akagawa, M., Shigemitsu, T. ve Suyama, K., 2003, Production of hydrogen peroxide by polyphenols and polyphenol-rich beverages under quasi-physiological conditions, *Bioscience, biotechnology, and biochemistry*, 67 (12), 2632-2640.
- Akbulut, M., Batu, A. ve Çoklar, H., 2007, Dut Pekmezinin Bazı Fizikokimyasal Özellikleri ve Üretim Teknikleri, *Gıda Teknolojileri Elektronik Dergisi* (2), 25-31.
- Akın, D., 2010, Celtis glabrata'nın bazı ekstraktlarının AMES/Salmonella mikrozom test sistemi ile antimutajenik etkisinin araştırılması, *Selçuk Üniversitesi Sosyal Bilimler Enstitüsü*.
- Akman, M., 1983, Bakteri Genetiği, Cumhuriyet Üniv, *Tıp Fak. Yayını* (8).
- Al-Bataina, B. A., Maslat, A. O. ve Al-Kofahi, M. M., 2003, Element analysis and biological studies on ten oriental spices using XRF and Ames test, *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology*, 17 (2), 85-90.
- Ali-Shtayeh, M., Yaghmour, R. M.-R., Faidi, Y., Salem, K. ve Al-Nuri, M., 1998, Antimicrobial activity of 20 plants used in folkloric medicine in the Palestinian area, *Journal of Ethnopharmacology*, 60 (3), 265-271.
- Altıok, D., Altıok, E., Bayraktar, O. ve Tihminlioglu, F., 2009, Stability of trans-resveratrol incorporated in chitosan microspheres, *Biomedical Engineering Meeting, 2009. BIYOMUT 2009. 14th National*, 1-4.
- Alzoreky, N. ve Nakahara, K., 2003, Antibacterial activity of extracts from some edible plants commonly consumed in Asia, *International journal of food Microbiology*, 80 (3), 223-230.
- Ames, B. N., Durston, W. E., Yamasaki, E. ve Lee, F. D., 1973, Carcinogens are mutagens: a simple test system combining liver homogenates for activation and bacteria for detection, *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 70 (8), 2281-2285.
- Aramwit, P., Bang, N. ve Srichana, T., 2010, The properties and stability of anthocyanins in mulberry fruits, *Food Research International*, 43 (4), 1093-1097.
- Baydar, H., Sağdıç, O., Özkan, G. ve Karadoğan, T., 2004, Antibacterial activity and composition of essential oils from *Origanum*, *Thymbra* and *Satureja* species with commercial importance in Turkey, *Food control*, 15 (3), 169-172.
- Baytop, A., 1996, *Farmasötik Botanik Ders Kitabı*, İstanbul Üniversitesi, p.
- Beudot, C., De Meo, M., Dauzonne, D., Elias, R., Laget, M., Guiraud, H., Balansard, G. ve Duménil, G., 1998, Evaluation of the mutagenicity and antimutagenicity of forty-two 3-substituted flavones in the Ames test, *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 417 (2), 141-153.

- Birt, D. F., Walker, B., Tibbels, M. G. ve Bresnick, E., 1986, Anti-mutagenesis and anti-promotion by apigenin, robinetin and indole-3-carbinol, *Carcinogenesis*, 7 (6), 959-963.
- Boranbayeva, T., Karadeniz, F. ve Yılmaz, E., 2014, Effect of storage on anthocyanin degradation in black mulberry juice and concentrates, *Food and Bioprocess Technology*, 7 (7), 1894-1902.
- Cai, Y., Luo, Q., Sun, M. ve Corke, H., 2004, Antioxidant activity and phenolic compounds of 112 traditional Chinese medicinal plants associated with anticancer, *Life sciences*, 74 (17), 2157-2184.
- Chen, J., Li, X. ve Fang, X., 2006, Purification of total flavones from *Morus alba* L. by macroporous adsorbents and kinetic model for the process, *Zhejiang da xue xue bao. Yi xue ban= Journal of Zhejiang University. Medical sciences*, 35 (2), 219-223.
- Chuang, S.-E., Cheng, A.-L., Lin, J.-K. ve Kuo, M.-L., 2000, Inhibition by curcumin of diethylnitrosamine-induced hepatic hyperplasia, inflammation, cellular gene products and cell-cycle-related proteins in rats, *Food and chemical toxicology*, 38 (11), 991-995.
- Davis, P. H., 1965, Flora of Turkey, *Flora of Turkey*.
- de Ancos, B., González, E. M. ve Cano, M. P., 2000, Ellagic acid, vitamin C, and total phenolic contents and radical scavenging capacity affected by freezing and frozen storage in raspberry fruit, *Journal of agricultural and food chemistry*, 48 (10), 4565-4570.
- Doi, K., Kojima, T., Makino, M., KIMURA, Y. ve FUJIMOTO, Y., 2001, Studies on the constituents of the leaves of *Morus alba* L., *Chemical and pharmaceutical bulletin*, 49 (2), 151-153.
- Elmacı, Y. ve Altuğ, T., 2002, Flavour evaluation of three black mulberry (*Morus nigra*) cultivars using GC/MS, chemical and sensory data, *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 82 (6), 632-635.
- Emori, T. G. ve Gaynes, R. P., 1993, An overview of nosocomial infections, including the role of the microbiology laboratory, *Clinical microbiology reviews*, 6 (4), 428-442.
- Ercisli, S., 2004, A short review of the fruit germplasm resources of Turkey, *Genetic Resources and Crop Evolution*, 51 (4), 419-435.
- Ercisli, S. ve Orhan, E., 2007, Chemical composition of white (*Morus alba*), red (*Morus rubra*) and black (*Morus nigra*) mulberry fruits, *Food Chemistry*, 103 (4), 1380-1384.
- Ercisli, S. ve Orhan, E., 2008, Some physico-chemical characteristics of black mulberry (*Morus nigra* L.) genotypes from Northeast Anatolia region of Turkey, *Scientia Horticulturae*, 116 (1), 41-46.
- Erdoğan, Ü. ve Pırlak, L., 2005, Ükemizde dut (*Morus spp.*) üretimi ve değerlendirilmesi, *alatarım*, 38.
- Evandri, M., Battinelli, L., Daniele, C., Mastrangelo, S., Bolle, P. ve Mazzanti, G., 2005, The antimutagenic activity of *Lavandula angustifolia* (lavender) essential oil in the bacterial reverse mutation assay, *Food and chemical toxicology*, 43 (9), 1381-1387.
- Feresin, G. E., Tapia, A., López, S. N. ve Zacchino, S. A., 2001, Antimicrobial activity of plants used in traditional medicine of San Juan province, Argentina, *Journal of Ethnopharmacology*, 78 (1), 103-107.

- Galati, G. ve O'Brien, P. J., 2004, Potential toxicity of flavonoids and other dietary phenolics: significance for their chemopreventive and anticancer properties, *Free Radical Biology and Medicine*, 37 (3), 287-303.
- Gerasopoulos, D. ve Stavroulakis, G., 1997, Quality characteristics of four mulberry (*Morus* sp) cultivars in the area of Chania, Greece, *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 73 (2), 261-264.
- Gokbulut, I., Bilenler, T. ve Karabulut, I., 2013, Determination of chemical composition, total phenolic, antimicrobial, and antioxidant activities of *Echinophora tenuifolia* essential oil, *International Journal of Food Properties*, 16 (7), 1442-1451.
- Gonzalez, G., Herrera, G., Garc , M. T. ve Pena, M., 2001, Biodegradation of phenolic industrial wastewater in a fluidized bed bioreactor with immobilized cells of *Pseudomonas putida*, *Bioresource technology*, 80 (2), 137-142.
- Grierson, R. ve Munro-Hay, S. C., 1999, The ark of the covenant, Phoenix, p.
- Ham, S.-S., Kim, S.-H., Moon, S.-Y., Chung, M. J., Cui, C.-B., Han, E.-K., Chung, C.-K. ve Choe, M., 2009, Antimutagenic effects of subfractions of Chaga mushroom (*Inonotus obliquus*) extract, *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 672 (1), 55-59.
- Hayder, N., Skandrani, I., Kilani, S., Bouhlel, I., Abdelwahed, A., Ammar, R. B., Mahmoud, A., Ghedira, K. ve Chekir-Ghedira, L., 2008, Antimutagenic activity of *Myrtus communis* L. using the Salmonella microsome assay, *South african journal of botany*, 74 (1), 121-125.
- Hepsağ, F., Hayoğlu, İ. ve Hepsağ, B., 2012, Karadut meyvesinin antosiyanin içeriği ve antosiyaninlerin gıda sanayinde renk maddesi olarak kullanım olanakları, *Electronic Journal of Food Technologies*, 7 (1), 9-19.
- Hofnung, M. ve Quillardet, P., 1986, Recent developments in bacterial short-term tests for the detection of genotoxic agents, *Mutagenesis*, 1 (5), 319-330.
- Holetz, F. B., Pessini, G. L., Sanches, N. R., Cortez, D. A. G., Nakamura, C. V. ve Dias Filho, B. P., 2002, Screening of some plants used in the Brazilian folk medicine for the treatment of infectious diseases, *Mem rias do Instituto Oswaldo Cruz*, 97 (7), 1027-1031.
- Howell, A. B., Botto, H., Combescure, C., Blanc-Potard, A.-B., Gausa, L., Matsumoto, T., Tenke, P., Sotto, A. ve Lavigne, J.-P., 2010, Dosage effect on uropathogenic *Escherichia coli* anti-adhesion activity in urine following consumption of cranberry powder standardized for proanthocyanidin content: a multicentric randomized double blind study, *BMC infectious diseases*, 10 (1), 94.
- Huang, L. E., Zhang, H., Bae, S. W. ve Liu, A., 1994, Thiol reducing reagents inhibit the heat shock response. Involvement of a redox mechanism in the heat shock signal transduction pathway, *Journal of Biological Chemistry*, 269 (48), 30718-30725.
- Ibrahim, H. U. ve Bayir, A., 2010, Distribution of wild and cultivated grapes in Turkey, *Notulae Scientia Biologicae*, 2 (4), 83.
- Ikigai, H., Nakae, T., Hara, Y. ve Shimamura, T., 1993, Bactericidal catechins damage the lipid bilayer, *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes*, 1147 (1), 132-136.
- Jia, L., Li, Y., She, Q., Wu, H., Ping, L. ve Sha, W., 1999, Anti-*Helicobacter pylori* treatment in bleeding ulcer: a controlled trial comparing omeprazole and clarithromycin quadruple-therapy versus bismuth triple therapy, *Chin J Dig* (中华消化杂志), 19, 36-38.
- Karaca, İ., 2009, Pekmez  rneklerinde vitamin ve mineral tayini, *İ n n  Universitesi*.

- Kaur, S., Arora, S., Kaur, K. ve Kumar, S., 2002, The in vitro antimutagenic activity of Triphala—an Indian herbal drug, *Food and chemical toxicology*, 40 (4), 527-534.
- Lee, B. M. ve Park, K.-K., 2003, Beneficial and adverse effects of chemopreventive agents, *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 523, 265-278.
- Levin, A. S., Levy, C. E., Manrique, A. E. I., Medeiros, E. A. ve Costa, S. F., 2003, Severe nosocomial infections with imipenem-resistant *Acinetobacter baumannii* treated with ampicillin/sulbactam, *International Journal of Antimicrobial Agents*, 21 (1), 58-62.
- Lien, E. ve Li, W., 1985, Structure-Activity Relationship Analysis of Anticancer Chinese Drugs and Related Plants, *Oriental Healing Arts Institute, USA, Taipei, Taiwan*, 10-21.
- Lin, J.-Y. ve Tang, C.-Y., 2007, Determination of total phenolic and flavonoid contents in selected fruits and vegetables, as well as their stimulatory effects on mouse splenocyte proliferation, *Food Chemistry*, 101 (1), 140-147.
- Maron, D. M. ve Ames, B. N., 1983, Revised methods for the Salmonella mutagenicity test, *Mutation Research/Environmental Mutagenesis and Related Subjects*, 113 (3-4), 173-215.
- McCann, J. ve Ames, B. N., 1976, Detection of carcinogens as mutagens in the Salmonella/microsome test: assay of 300 chemicals: discussion, *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 73 (3), 950-954.
- Mortelmans, K. ve Zeiger, E., 2000, The Ames Salmonella/microsome mutagenicity assay, *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 455 (1), 29-60.
- Moss, E. H. ve Packer, J. G., 1983, Flora of Alberta: a manual of flowering plants, conifers, ferns, and fern allies found growing without cultivation in the Province of Alberta, Canada, University of Toronto Press, p.
- Nakasugi, T., Nakashima, M. ve Komai, K., 2000, Antimutagens in Gaiyou (*Artemisia a rgyi* Levl. et Vant.), *Journal of agricultural and food chemistry*, 48 (8), 3256-3266.
- Negi, P., Jayaprakasha, G. ve Jena, B., 2003, Antioxidant and antimutagenic activities of pomegranate peel extracts, *Food Chemistry*, 80 (3), 393-397.
- Nostro, A., Bisignano, G., Cannatelli, M. A., Crisafi, G., Germano, M. P. ve Alonzo, V., 2001, Effects of *Helichrysum italicum* extract on growth and enzymatic activity of *Staphylococcus aureus*, *International Journal of Antimicrobial Agents*, 17 (6), 517-520.
- Organization, W. H. ve Cancer, I. A. f. R. o., 1980, Long-term and Short-term Screening Assays for Carcinogens: A Critical Appraisal: Reports of IARC Ad Hoc Working Groups which Met in Hanover, FRG, 7-9 June, 1979, at a Meeting Organized by the Medizinische Hochschule Hanover, the Commission of the European Communities and the IARC, International Agency for Research on Cancer, p.
- Öksüzoglu, R. M., Elmali, A., Weirich, T. E., Fuess, H. ve Hahn, H., 2000, Evolution of the surface roughness (dynamic scaling) and microstructure of sputter-deposited Ag₇₅Co₂₅ granular films, *Journal of Physics: Condensed Matter*, 12 (44), 9237.
- Özbek, T., 2006, Doğu Anadolu tıbbi bitkilerine ait bazı türlerin Ames, *Salmonella* Mikrozom testi kullanılarak antimutajenik özelliklerinin saptanması, Atatürk Üniversitesi Biyoloji Anabilim Dalı Yüksek Lisans Tezi.

- Özbek, T., Guelluece, M., Şahin, F., Oezkan, H., Sevsay, S. ve Barış, Ö., 2008, Investigation of the antimutagenic potentials of the methanol extract of *Origanum vulgare* L. subsp. *vulgare* in the Eastern Anatolia Region of Turkey, *Turkish Journal of Biology*, 32 (4), 271-276.
- Özgen, M. ve Tokbaş, H., 2007, Işıklanma ve meyve dokusunun Amasya ve Fuji elmalarında antioksidan kapasitesine etkisi, *Gaziosmanpaşa Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi*, 2007 (2).
- Özgen, M., Serçe, S. ve Kaya, C., 2009, Phytochemical and antioxidant properties of anthocyanin-rich *Morus nigra* and *Morus rubra* fruits, *Scientia Horticulturae*, 119 (3), 275-279.
- Pacheco, P., Sierra, J., Schmeda-Hirschmann, G., Potter, C., Jones, B. ve Moshref, M., 1993, Antiviral activity of Chilean medicinal plant extracts, *Phytotherapy Research*, 7 (6), 415-418.
- Pannuti, C. S. ve Grinbaum, R. S., 1995, An overview of nosocomial infection control in Brazil, *Infection Control & Hospital Epidemiology*, 16 (03), 170-174.
- Pehlivan, M., Kaya, T., Doğru, B. ve Bozhüyük, M. R., 2012, Farklı Lokasyon ve Hasat Zamanlarının Karadutun (*Morus nigra* L.) Bazı Meyve Özellikleri Üzerine Etkisi.
- Pessini, G. L., Dias Filho, B. P., Nakamura, C. V. ve Cortez, D. A. G., 2003, Antibacterial activity of extracts and neolignans from *Piper regnellii* (Miq.) C. DC. var. *pallenscens* (C. DC.) Yunck, *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 98 (8), 1115-1120.
- Petek, H., Nagano, H. ve Ogawa, S., 1999, Hole decoherence of d bands in copper, *Physical review letters*, 83 (4), 832.
- Polat, A. A., 2004, HATAY'IN ANTAKYA LÇES NDE YET ŞT R LEN BAZI DUT T PLER NN MEYVE ÖZELL KLER NN BEL RLENMES.
- Rajaei, A., Barzegar, M., Mobarez, A. M., Sahari, M. A. ve Esfahani, Z. H., 2010, Antioxidant, anti-microbial and antimutagenicity activities of pistachio (*Pistachia vera*) green hull extract, *Food and chemical toxicology*, 48 (1), 107-112.
- Ramel, C., Alekperov, U., Ames, B., Kada, T. ve Wattenberg, L., 1986, Inhibitors of mutagenesis and their relevance to carcinogenesis: report by ICPEMC expert group on antimutagens and desmutagens, *Mutation Research/Reviews in Genetic Toxicology*, 168 (1), 47-65.
- Ratnakar, P. ve Murthy, P. S., 1995, Purification and mechanism of action of antitubercular principle from garlic (*Allium sativum*) active against isoniazid susceptible and resistant *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv, *Indian Journal of Clinical Biochemistry*, 10 (1), 34-38.
- Renvert, S., Lessem, J., Dahlén, G., Renvert, H. ve Lindahl, C., 2008, Mechanical and repeated antimicrobial therapy using a local drug delivery system in the treatment of peri-implantitis: a randomized clinical trial, *Journal of periodontology*, 79 (5), 836-844.
- Roncada, T., Vicentini, V. ve Mantovani, M., 2004, Possible modulating actions of plant extracts on the chromosome breaking activity of MMC and Ara-C in human lymphocytes in vitro, *Toxicology in vitro*, 18 (5), 617-622.
- Rosin, M. P. ve Stich, H., 1978, The inhibitory effect of cysteine on the mutagenic activities of several carcinogens, *Mutation Research/Environmental Mutagenesis and Related Subjects*, 54 (1), 73-81.

- Rosin, M. P. ve Stich, H., 1979, Assessment of the use of the Salmonella mutagenesis assay to determine the influence of antioxidants on carcinogen-induced mutagenesis, *International Journal of Cancer*, 23 (5), 722-727.
- Saxena, V. ve Sharma, R., 1999, Antimicrobial activity of the essential oil of *Toddalia asiatica*, *Fitoterapia*, 70 (1), 64-66.
- Sengun, I. Y., Icier, F. ve Kor, G., 2015, Effects of Combined Ohmic-Infrared Cooking Treatment on Microbiological Inactivation of Meatballs, *Journal of Food Process Engineering*.
- Sengül, M., Ertugay, M. F. ve Sengül, M., 2005, Rheological, physical and chemical characteristics of mulberry pekmez, *Food control*, 16 (1), 73-76.
- Shamberger, R. J., Corlett, C. L., Beaman, K. D. ve Kasten, B. L., 1979, Antioxidants reduce the mutagenic effect of malonaldehyde and β -propiolactone: Part IX, antioxidants and cancer, *Mutation Research/Genetic Toxicology*, 66 (4), 349-355.
- Simopoulos, A. P. ve Salem, N., 1996, Fatty acids and lipids from cell biology to human disease, *LIPIDS-CHICAGO-AMERICAN OIL CHEMISTS SOCIETY*, 31, S-1.
- Suh, H. J., Noh, D. O., Kang, C. S., Kim, J. M. ve Lee, S. W., 2003, Thermal kinetics of color degradation of mulberry fruit extract, *Molecular Nutrition & Food Research*, 47 (2), 132-135.
- Şengün, İ. Y. ve Yücel, E., 2008, Antimicrobial properties of wild fruits.
- Tajkarimi, M., Ibrahim, S. A. ve Cliver, D., 2010, Antimicrobial herb and spice compounds in food, *Food control*, 21 (9), 1199-1218.
- Tsukagoshi, S. ve Ohashi, F., 1974, Protein-bound polysaccharide preparation, PS-K, effective against mouse sarcoma-180 and rat ascites hepatoma AH-13 by oral use, *GANN Japanese Journal of Cancer Research*, 65 (6), 557-558.
- Ünlüer, A., 2011, Beyaz dut (*Morus alba*) ve karadut (*Morus nigra*) yaprak özütleri üzerine antioksidan ve antimikrobiyal aktivite çalışmaları, *Celal Bayar Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Kimya Anabilimdalı Yüksek Lisans Tezi (basılmamış)*, Manisa.
- Victorin, K., Busk, L. ve Ahlborg, U. G., 1987, Retinol (vitamin A) inhibits the mutagenicity of o-aminoazotoluene activated by liver microsomes from several species in the Ames test, *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 179 (1), 41-48.
- Vijayan, K., Chauhan, S., Das, N., Chakraborti, S. ve Roy, B., 1997, Leaf yield component combining abilities in mulberry (*Morus* spp.), *Euphytica*, 98 (1-2), 47-52.
- Vuotto, M. L., Basile, A., Moscatiello, V., De Sole, P., Castaldo-Cobianchi, R., Laghi, E. ve Ielpo, M. T. L., 2000, Antimicrobial and antioxidant activities of Feijoa sellowiana fruit, *International Journal of Antimicrobial Agents*, 13 (3), 197-201.
- Wenzel, U., Herzog, A., Kuntz, S. ve Daniel, H., 2004, Protein expression profiling identifies molecular targets of quercetin as a major dietary flavonoid in human colon cancer cells, *Proteomics*, 4 (7), 2160-2174.
- Xia, Q., Zhou, Z., Lu, C., Cheng, D., Dai, F., Li, B., Zhao, P., Zha, X., Cheng, T. ve Chai, C., 2004, A draft sequence for the genome of the domesticated silkworm (*Bombyx mori*), *Science*, 306 (5703), 1937-1940.
- Yang, N. ve Zheng, X., 1998, Isolation and identification of chitosan from *Morus alba* L, *Natural Product Research and Development*, 11 (5), 38-41.

- Yanishlieva, N. V., Marinova, E. ve Pokorný, J., 2006, Natural antioxidants from herbs and spices, *European Journal of Lipid Science and Technology*, 108 (9), 776-793.
- Yiğit, D. ve Yiğit, N., 2008, ANTIBACTERIAL ACTIVITY OF BLACK MULBERRY (*Morus nigra*) FRUITS AND LEAVES, *Erzincan University Journal of Science and Technology*, 1 (1), 39-48.
- Yiğit, N., Yiğit, D., Özgen, U. ve Aktaş, A. E., 2007, Anticandidal activity of black mulberry (*Morus nigra* L.).
- Yildiz, A., Tepe, S., Oflaz, H., Yazici, H., Pusuroglu, H., Besler, M., Ark, E. ve Erzen, F., 2004, Carotid atherosclerosis is a predictor of coronary calcification in chronic haemodialysis patients, *Nephrology Dialysis Transplantation*, 19 (4), 885-891.



ÖZGEÇMİŞ

KİŞİSEL BİLGİLER

Adı Soyadı : Ümran GÜNTER
Uyruğu : T.C.
Doğum Yeri ve Tarihi : KONYA- 1990
Telefon : 05536534405
Faks : -
e-mail : umrangunter90@gmail.com

EĞİTİM

Derece	Adı, İlçe, İl	Bitirme Yılı
Lise	: Meram Muhittin Güzelkılınç Y. D. A. L.	2008
Üniversite	: Selçuk Üniversitesi	2014
Yüksek Lisans	: Selçuk Üniversitesi	2017
Doktora	: -	

İŞ DENEYİMLERİ

Yıl	Kurum	Görevi
2016	Özel Konya Bil Temel Lisesi	Biyoloji Öğretmeni

UZMANLIK ALANI

YABANCI DİLLER

BELİRTMEK İSTEĞİNİZ DİĞER ÖZELLİKLER

YAYINLAR