



Nevşehir Bilim ve Teknoloji Dergisi

Araştırma Makalesi (Research Article)

Makale Doi: **10.17100/nevbiltek.1023406**

Geliş Tarihi:14-11-2021

Kabul Tarihi: 04-02-2022



Nevşehir İlinde Yetişen *Pinus nigra* JF. *arnold* ve *Thuca occidentalis* L. Türü Ağaçlardan Toplanan Kozalakların Antioksidan ve Antibakteriyel Aktiviteleri*

Mustafa AKAR

¹Nevşehir Hacı Bektaş Veli Üniversitesi Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı Yüksek Lisans Öğrencisi

ORCID ID:0000-0001-8241-0414

Öz

Bu çalışmada Nevşehir ilinde yetişen *Pinus nigra* JF. *arnold* ve *Thuca occidentalis* L. türlerine ait kozalakların antioksidan ve antibakteriyel aktiviteleri incelenmiştir. Antioksidan aktivite tayini için DPPH serbest radikal süpürme aktivitesi, metal iyonları şelatlama aktivitesi, total fenol, βkaroten, likopen miktarı tayini yapılmıştır. Antibakteriyel aktivite tayini için toplam 6 test bakterisi (*Bacillus subtilis* ATCC 6051, *Listeria monocytogenes* ATCC 7644, *Micrococcus luteus* ATCC 4698, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Enterococcus faecalis* ATCC 29212, *Escherichia coli* ATCC 11229) kullanılmıştır. Bu çalışmada *Pinus nigra* türünde yüksek oranda DPPH süpürme aktivitesi ve Metal iyonları şelatlama aktivitesi tespit edilmiştir. Çalışmada total fenol miktarı ve Likopen içeriği bakımından en yüksek değer *Pinus nigra* türünde tespit edilmiştir. β-karoten miktarı bakımından ise en yüksek değer *Thuca occidentalis* L. türünde belirlenmiştir.

Anahtar Kelimeler: Antioksidan, Antibakteriyel, *Pinus nigra*, *Thuca occidentalis*

Antioxidant and Antibacterial Activities Of Cone From *Pinus nigra* JF. Arnold and *Thuca occidentalis* L. Trees in Nevşehir

Abstract

In this study, antioxidant and antibacterial activities of cones belonging to *Pinus nigra* JF Arnold and *Thuca occidentalis* species growing in Nevşehir were investigated. In terms of antioxidant activity, DPPH free radical scavenging activity, metal ions chelating activity, total phenolic, carotene and lycopene amount were determined. A total of 6 test bacteria (*Bacillus subtilis* ATCC 6051, *Listeria monocytogenes* ATCC 7644, *Micrococcus luteus* ATCC 4698, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Enterococcus faecalis* ATCC 29212, *Escherichia coli* ATCC 11229) were used for the determination of antibacterial activity. In this study, The best DPPH scavenging activity and chelating activity of metal ions was observed in *Pinus nigra* species. In the study, the highest total phenolic and lycopene contents was determined at *Pinus nigra* species. B-carotene content was determined highest at *Thuca occidentalis* species

Keywords: Antioxidant, Antibacterial, *Pinus nigra*, *Thuca occidentalis*

* Bu çalışma yüksek lisans tezinden üretilmiştir.

Sorumlu yazar: mustafaakar@gmail.com

1. Giriş

Arkeolojik bulgularda rastlanan verilere göre ilk çağ insanları beslenme ihtiyaçlarını gidermek ve sağlık sorunlarına çözüm bulmak için öncelikle bitkilerden faydalanmışlardır[1].

Modern bilimin bitkisel kaynaklı temeller üzerinde kurulu olmasının yanı sıra günümüzdeki haline ulaşması uzun yıllar almıştır. DNA'nın keşfedilmesi, aşının bulunması, mikroskobun icadı gibi çeşitli buluşlar bilimin gelişmesinde çok büyük rol almıştır. Bitkilerin çeşitli alanlarda kullanılıyor olması tarih boyunca insanlar tarafından araştırılıp incelemeye tabi tutulmuştur. Bu araştırmalar sonucunda bitkilerin yaşamsal faaliyetlerini sürdürebilmeleri için sentezledikleri bazı moleküller keşfedilmiştir. Bu moleküller primer metabolitler olarak isimlendirilir. Primer metabolitlerin yanısıra bitkilerin sentezlediği diğer moleküllere ise sekonder metabolitler denilmektedir. Sekonder metabolitler yapı bakımından fenolik bileşikler, alkaloidler, terpenoidler, glikozitler, ribozomal olmayan peptitler gibi özel bileşikler barındırır[2]. Aynı zamanda antioksidan ve antibakteriyel özellikte olan sekonder metabolitler enfeksiyon hastalıkları başta olmak üzere birçok sağlık probleminde kullanılan başlıca doğal ilaçlardır.

Farklı amaçlar doğrultusunda kullanılan antioksidanlar insan vücudunda serbest radikal olarak adlandırılan son yörüngelerinde bir atom eksiği olan ve sürekli bu açığı kapatmak için diğer moleküllerin atomlarına saldıran oksijen(ROS) ve nitrojen(RNT) türevi tehlikeli bileşikler veya atomlardır[3]. Bu atom veya bileşiklerin etkilerini ortadan kaldıran veya aktivitelerini yavaşlatan moleküllere antioksidan adı verilir. İnsanda var olan antioksidanlar vücut tarafından doğal olarak üretilir veya dışarıdan ek olarak alınırlar. Hem endojen hem de ekzojen antioksidanlar serbest radikallere karşı temizleyici görev üstlenirler. Böylelikle savunma sistemini güçlendirerek hastalık riskini azaltırlar[4].

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

Günümüzde birçok araştırmacı, tıbbi öneme sahip olduğu düşünülen bitkilerin kimyasal içeriklerinin bulunması için çalışmaktadır. Geçmişten günümüze sağlık başta olmak üzere birçok alanda kullanılan bitkiler günümüzde hala ilk gün ki değerini korumaktadır. Bitkiler kullanılarak tedavi etme yöntemleri ilk kayıtlara göre M.Ö. 5000'lerde Mezopotamya bölgesinde rastlanmış, 250 bitkisel ilacın kullanıldığı belirlenmiştir[5].

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

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

Bitkisel kaynaklı ilaçların temeli bitkilerin kaynatılarak veya havan benzeri aletler ile dövülerek özütlerinin çıkartılmasına dayanır. Bu işlem bilim insanlarının günümüzde içerik analizi, etken madde tayini yapmalarına öncü olmuştur. Böylece bitki içerisinde yer alan ve hastalığa sebep olan faktöre tesir eden asıl maddenin bulunup ticari olarak satılmaya hazır hale getirilmesi hedeflenmiştir. Bu çalışmada halk tarafından balgam sökücü, ateş düşürücü vb. rahatsızlıkların giderilmesi için tüketilen yeşil kozalakların laboratuvar ortamında deneysel olarak antibakteriyel ve antioksidan özellikleri incelenmiştir. Bitkisel ilaçlara her geçen gün rağbetin artması göz önüne alındığında bu çalışma ilaç sanayisine ve ekonomiye büyük oranda katkı sağlayacaktır.

Bu çalışmada Nevşehir ilinde yetişen iğne yapraklılar sınıfına ait *Pinus nigra* ve *Thuca occidentalis*'in kozalaklarının ilk aşamada antioksidan ve antibakteriyel aktivitelerinin tayini amaçlanmıştır. Toplanan ağaç kozalaklarının etanol yardımı ile ekstraksiyonundan elde edilen ekstraktlarının farklı konsantrasyonlarda DPPH serbest radikal absorpsiyonu, metal iyonları şelatlama aktiviteleri, toplam fenolik içeriği ve β-karoten ve likopen miktar tayini hedeflenmiştir. Elde edilen bulgular bu alanda yapılacak çalışmalara öncü olacaktır.

2. Materyal ve Metot

Çalışmada kullanılan bakteriler *Bacillus subtilis* ATCC 6051, *Listeria monocytogenes* ATCC 7644, *Micrococcus luteus* ATCC 4698, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Enterococcus faecalis* ATCC 29212, *Escherichia coli* ATCC 11229 suşları Gazi üniversitesi biyoteknoloji laboratuvarından temin edilmiştir.

Bu çalışmada kullanılan kozalaklar Nevşehir ilinin farklı lokasyonların'dan toplanmıştır. Toplanan kozalaklar (Sinbo scn-2934 marka) baharat öğütücü yardımı ile öğütülmüştür. Her öğütme işleminden sonra öğütücünün temizlenmesine dikkat edilmiştir. Her örnek ayrı ayrı öğütülüp 60-150 g arası tartılıp (Sohn GmbH marka hassas terazi) paketlenmiştir. Örnekler filtre kâğıdı içerisinde soxhlet cihazına yerleştirilmiştir. Her bir örnek için 350 mL etanol kullanılarak özüt çıkarma işlemi başlatılmıştır. Her bir örnek için özüt çıkarma süresi ortalama 24 saat olarak ayarlanmış olup örneklerin tam anlamı ile özütün çıkartılması sağlanmıştır. Özüt çıkarma işlemi biten her örnek ağzı kapalı bir cam şişe içerisinde +4°C'de (VESTEL marka buzdolabı) muhafaza edilmiştir.

Özüt çıkarma işlemi bittikten sonra yaklaşık 350 mL içerisinde çözünmüş olan özütteki alkolü uzaklaştırmak için evoperatör (BUCHI marka rotary evaporatör) cihazı kullanılmıştır. Evoperatör cihazından alınan örnekler eser miktarda alkol içerdiği için ağzı açık bir şekilde cam petrielerde +60°C' de etüvde (SELECTA 2001244 00-E 53034 marka etüv), kalan alkol uçurularak saf halde özüt elde edilmiştir.

Kullanılan ekstraktın serbest radikal yakalama yeteneği, güçlü bir radikal olan DPPH (2,2-difenil-1-pikrilhidrazil)' ı indirgeme yeteneğine göre ölçülmüştür. Sonuçların doğru alınması ve hesaplama aşamasında kullanılmak üzere negatif ve pozitif kontrollere ihtiyaç vardır[6]. Negatif kontrol için 1 mL metanol + 1 mL DPPH çözeltisi, pozitif kontrol için belirlenen konsantrasyonlarda ekstrakt + 2 mL ye tamamlayacak kadar metanol kullanılarak 517nm' de absorpsiyon değeri okunmuştur.

DPPH % süpürme yeteneği şu formüle göre belirlenir. $\{[A - [B - C] / A] * 100\}$

A= Negatif absorpsiyon değeri, B= Örnekte absorpsiyon değeri, Pozitif absorpsiyon değeri olarak belirlenmiştir.

Çalışmanın bu aşamasında kullanılan özütlerin metal iyonlarına karşı gösterdikleri şelatlama etkisi ölçülmüştür. Çalışmada 100ppm, 150ppm, 200ppm, 250ppm konsantrasyon değerleri kullanılmıştır. Pozitif kontrol için belirlenen konsantrasyondaki ekstrele 2 mM FeCl₂ ve 5 mM ferrozin çözeltisi eklenerek 10 dakika oda sıcaklığında inkübasyon sağlanmıştır. Bu işlemden sonra karışımın spektrometrik değeri 562 nm de okunup kayıt altına alınmıştır. Absorpsiyon değerleri $\{(A - (B - C) / A) * 100\}$ formülüne göre değerlendirilip % şelatlama değeri hesaplanmıştır. Formülde belirtilen kısaltmalar: A= Negatif kontrol değeri B= Örnek absorpsiyon değeri C= Pozitif kontrol değerini sembolize etmektedir. Negatif kontrol olarak tüpte yalnızca 2 mM FeCl₂ ve 5 mM ferrozin çözeltisi ve 2ml Metanol çözeltisi eklenir.

Toplam fenolik içeriği Folin-Ciocalteu reaktif biyomolekülü kullanılarak, gallik asit eşdeğeri olarak belirlenmiştir[7]. Bu aşamada 0,1 mL bitki ekstresi + metanol karışımına 0,2 mL %50 folin biyomolekülü eklenerek homojen bir karışım elde edene kadar vortex cihazı ile karıştırılmış ve 3 dk inkübe edilmiştir. Bu süre sonunda karışıma 1 mL % 2'lik Na₂CO₃ eklenerek 45 dakika oda sıcaklığında inkübasyona bırakılmıştır. Bu süre sonunda her örneğin absorpsiyon değeri 760 nm dalga boyunda ölçülüp belirlenen formül yardımı ile örneklerdeki total fenol miktarı belirlenmiştir.

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

y: ABS değeri

x: fenol miktarı (μg cinsinden)

Bu bölümde kullanılan örneklerin β -karoten ve likopen miktarının tayininde önceden aseton ve hekzan 4mL – 6mL oranlarında karıştırılmış ve önceden tartılan 0,1g kuru kozalak ekstraktı ile homojen olarak karıştırılmıştır. Burada aseton hekzan karışımı çözücü görevi görmüştür. Karışım sonucunda tüm örnekler 453 nm, 505 nm, 663 nm dalga boylarında ölçülmüş ve kaydedilmiştir. Aşağıda belirtilen formüllerden yararlanarak β -karoten ve likopen miktarları belirlenmiştir.

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

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

a= belirlenen dalga boyunda okunan değeri ifade etmektedir.

Çalışmada toplam 6 bakteri türü (ATCC 7644, ATCC 27853, ATCC 4698, ATCC 29212, ATCC 11229, ATCC 6051 suşları) kullanılmıştır. Kullanılan bakteriler aktifleştirilerek nutrient sıvı besiyerine 100 μL aktarılmış ve 37°C sıcaklıkta 24 saat inkübe edilmiştir. Aktif bakteriler ekilmiş petrilere 8 mm lik kuyucuklar açılarak, her bir kuyuya 100 μl bitki özütü eklenmiştir. 37°C sabit sıcaklıkta 24 saat inkübasyona bırakılarak oluşan zon çapları cetvel yardımı ile ölçülmüştür.

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

Elde edilen veriler SPSS (Statistical Package for Social Sciences) for Windows 21,0 programında ortalama değer ve standart sapma testleri yapılarak yorumlanmıştır. Çalışmada kullanılan metotlar 3 tekrarlı yapılmış olup elde edilen değerlerin ortalaması kullanılmıştır.

3. Bulgular

3.1 DPPH serbest radikal yakalama yeteneği

Bu çalışmada 100ppm, 150ppm, 200ppm, 250ppm konsantrasyonlarında kozalak ekstraktları kullanılmıştır. Konsantrasyon arttıkça DPPH süpürme aktivitesinin arttığı gözlemlenmiştir. DPPH süpürme yetenekleri göz önüne alınıp IC₅₀ değerleri hesaplandığında serbest radikal yakalama aktivitesi en yüksek olan tür *Pinus nigra* (55,8 μg / mL süpürme aktivitesi % 60,1– % 98,6) iken, en düşük olan tür *Thuca occidentalis* (200,4 μg / mL süpürme aktivitesi %33,14 - %58,45)'dir. Sonuçlar Tablo 1' de gösterilmiştir.

Tablo 1: Örneklere ait DPPH serbest radikali süpürme yetenekleri ve IC₅₀ değerleri

Bitki türleri	IC ₅₀ Değerleri [μg / mL]	DPPH süpürme yeteneği[%]
<i>Thuca occidentalis</i>	200,4	%33,14 - %58,45
<i>Pinus nigra</i>	55,8	%60,1 - %98,6

3.2 Metal iyonları şelatlama yeteneği

Bu çalışmada 100ppm, 150ppm, 200ppm, 250ppm konsantrasyonlarda kozalak ekstraktları kullanılmıştır. Konsantrasyon arttıkça metal iyonları şelatlama aktivitesinde orantılı bir artış gözlenmiştir. Çalışmada kullanılan tüm bitki ekstraktlarının

metal iyonları inhibisyon yetenekleri göz önünde bulundurularak IC₅₀ değerleri tespit edilmiştir. En iyi aktivite *Pinus nigra* (61,0 mg / mL şelatlama aktivitesi %55,5 - %74,6) türünde en düşük aktivite ise *Thuca occidentalis*(236,2 mg / mL şelatlama aktivitesi %22,3 - %52,8) türünde tespit edilmiştir. Tüm sonuçlar tablo 2 de gösterilmiştir.

Tablo 2: Örneklere ait ekstrelerin metal iyonları şelatlama yetenekleri ve IC₅₀ değerleri

Bitki türleri	IC ₅₀ değerleri [mg / mL]	Yüzde aralıkları [%]
<i>Thuca occidentalis</i>	236,2	%22,3 - %52,8
<i>Pinus nigra jf. arnold</i>	61,0	%55,5 - %74,6

3.3. Biyoaktif içerik tayini

Antioksidan yeteneğinin varlığı araştırılan ekstrenin biyoaktif içeriğine bağlıdır. Bu bağlamda örneklerimizin biyoaktif içeriği belirlenmiştir. Total fenol içerik bakımından *Pinus nigra* (340,23 mg/ml) türünün *Thuca occidentalis* (320,03mg/ml) türünden daha yüksek olduğu belirlenmiştir.

Likopen içeriği bakımından *Pinus nigra* (0,590mg/ml) türü *Thuca occidentalis* (0,574 mg/ml) türünden daha yüksek olduğu belirlenmiştir.

β-karoten içeriği bakımından *Thuca occidentalis* (0,79 mg / g) türünün *Pinus nigra* (0,39 mg / g) türünden daha yüksek olduğu belirlenmiştir.

3.4 Antibakteriyel Etki

Çalışmada kullanılacak özütler önceden hazırlanmış besiyerindeki kuyucuklara taşmayacak biçimde (100µl) aktarılmıştır. 37°C’ de 24 saat inkübasyona bırakılmıştır. Bu süre sonunda örneklerin bakteriler üzerindeki antibakteriyel etkileri gözlemlenmiştir. Sonuçlar Tablo 3 de detaylı olarak verilmiştir. Deney sonucunda *Pinus nigra* tüm bakteriler üzerinde yüksek etki gösterirken(*E. coli* 25±2, *L. monocytogenes* 35±3, *E. faecalis* 30±3, *B. subtilis* 30±4, *P. aeruginosa* 21±1, *M. luteus* 30±2) en düşük etki *Thuca occidentalis* bitkisinde görülmüştür(*E. Coli* -, *L. monocytogenes*20±2, *E. faecalis* 25±3, *B. subtilis* 20±2, *P. aeruginosa* 12±1, *M. luteus* 16±2).

Tablo 3: Bitkilere ait Antibakteriyel etki sonuçları.(mm)

BİTKİLER	Bakteriler					
	<i>Escherihia coli</i>	<i>Listeria monocytogenes</i>	<i>Enterococcus faecalis</i>	<i>Bacillus subtilis</i>	<i>Pseudomons aeruginosa</i>	<i>Micrococcus luteus</i>
<i>Thuca occidentalis</i>	-	20±2	25±3	20±2	12±1	16±2
<i>Pinus nigra</i>	25±2	35±3	30±3	30±4	21±1	30±2

‘-’ aktivite görülmemiştir

3.5 Antibiyotik duyarlılık testi

Çalışmada kullanılan bakterilerin antibiyotiklere karşı ne derece duyarlı oldukları test edilmiştir. Hazır halde bulunan besiyerine antibiyotik diskleri yerleştirilerek uygun şartlarda 24 saat beklendi. Sürenin sonunda antibiyotik disklerinin bakteriler üzerindeki inhibisyonu ölçülmüş olup detaylı bilgi Tablo 4 de verilmiştir. Tabloda ‘-’ ile belirtilen yerlerde bakteri üremesi görülmemiştir.

Tablo 4: Antibiyotiklere karşı direnç (mm).

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

(-) direnç yok

4 Tartışma ve Sonuç

Bitkiler günümüzde ilaç sanayi, çevre düzenlemesi, ağır sanayi, fenni yem, gıda sanayi olmak üzere birçok alanda kullanılmaktadır. Bitkiler çevresel şartlara uyum sağlamak için primer ve sekonder metabolitleri üretirler. Bu bileşikler ilaç sanayinde vazgeçilmez bir öneme sahiptir.

Bu çalışmada Nevşehir ilinde yetişen bazı iğne yapraklı ağaçların(*Thuca occidentalis*, *Pinus nigra*) kozalaklarından elde edilen özütlerin DPPH serbest radikal süpürme, metal iyonları şelatlama aktiviteleri, antibakteriyel etkileri, total fenol içerik, β -karoten ve likopen miktarları incelenmiştir.

Bir maddenin antioksidan özelliğinin varlığı DPPH radikali süpürme aktivitesi yöntemine göre belirlenmektedir. Kullanılan ekstrelerin konsantrasyonu arttıkça antioksidan aktivitelerinde artış görülmüştür. Bu çalışmada 100ppm, 150ppm, 200ppm, 250ppm konsantrasyonda ölçüm yapılmıştır. DPPH radikali süpürme aktivitesi bakımında en iyi değer *Pinus nigra* (IC₅₀: 55,8 μ g / ml % 60,1– % 98,6), en düşük değer *Thuca occidentalis* (IC₅₀: 200,4 μ g / ml %33,14 - %58,45) türünde görülmüştür. Bu çalışmada sentetik bir antioksidan türü BHT molekülü kullanılmıştır. BHT molekülü IC₅₀ değeri 43 μ g / mL olarak belirlenmiştir. Sonuçlar karşılaştırıldığı zaman bizim örneğimizin sentetik olarak üretilen BHT molekülüne yakın değerler görülmüştür.

Karapandzova ve arkadaşlarının[8] yaptığı çalışmada Pinaceae ailesine ait bazı türlerin esansiyel yağ analizlerini yapmış ve uçucu yağların ana bileşenleri olan monoterpenleri ortaya çıkarmışlardır. Bu çalışmaya göre bulunan monoterpenler şunlardır: α -pinen (% 23,8–39,9, % 21,2–23,3), kamfen (% 2,2–5,5, % 0,7–2,0), β -pinen (% 10,1–17,1, % 8,2–16,4), mirsen (% 1,2–1,41, % 1,6–2,5), limonen + β -phellandrene (% 6,8–14,0, % 8,8–23,6) ve bornil asetat (% 2,3–6,9, % 1,1–3,4). Sunulan değerlere göre α -pinen miktarı yüksek çıkmıştır.

Şahin ve arkadaşlarının[9] yaptığı çalışmada biberiye bitkisinden elde edilen α -pinen molekülünün yüksek derecede antioksidan etkisi(Biberiye ekstraktı için IC₅₀ 54 μ M) gözlemlenmiştir. Bu çalışmada *Pinus nigra* kozalağının en yüksek etkiye sahip olması içeriğinde yüksek aktiviteye sahip α -pinen fenolik bileşiğinden kaynaklandığı düşünülmektedir.

Hofmann ve arkadaşlarının[10] yaptıkları çalışmada *Pinus nigra* türüne ait olgun kozalaklardan elde edilen metanol özütlerinde DPPH süpürme aktivitesi IC₅₀ değerini 40.63 \pm 0.86 bulmuştur. Bu çalışmaya kıyasla daha iyi bir sonuç elde etmiştir. Hofmann deneyde özüt çıkartma aşamasında çözücü olarak aseton ve su kullanmıştır. Bu çalışmada çözücü olarak metanol kullanıldı sonuçların farklı çıkmasının çözücü farkından kaynaklandığı düşünülmektedir.

Metaller bağlanma eğilimi olan moleküller ile yeni bileşikler oluşturma gücüne sahiptir. Fe^{+3} iyonun Fe^{+2} iyonuna yükseltgenmesi demir metalinin başka bir molekül ile bileşik oluşturduğu anlamına gelir. Bu çalışmada bitki ekstralarının demir iyonu ile bileşik yapabilme kapasiteleri ölçülüp karşılaştırılmıştır. Bu yöntem renk değişimi esasına dayanır. Normalde sarı renkte olan karışımın, reaksiyonun gerçekleşmesi ile Prusya mavisine dönüşümü esas alınır[11].

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

Üstün ve arkadaşlarının[12] yaptığı çalışmada Türkiye'deki *Pinus* türlerinin dal ve yapraklarından elde edilen uçucu yağların yüksek derecede antioksidan etki gösterdikleri belirtilmiştir. Ayrıca bu çalışmada metal iyonları şelatlama aktivitesi incelenmiş ve en yüksek değer *Pinus nigra* (IC_{50} 67,77) cinsinde bulunmuştur. Bu çalışmada bulunan sonuçlar üstün ve arkadaşlarının bulduğu sonuçtan daha iyidir. Üstün ve arkadaşlarının[15] yaptığı çalışmada *Pinus nigra*'nın uçucu yağının GC-MS ile fenolik bileşen analizinde % 69.5 oranında α -Pinen maddesi bulunmuştur. Bu çalışmada yüksek oranda metal şelatlama aktivitesinin α -Pinen varlığına bağlı olduğu düşünülmektedir.

Çalışmanın bu bölümünde elimizde bulunan 2 farklı örneğin (*Thuca occidentalis*, *Pinus nigra*) Total fenol, likopen ve β -karoten miktarları belirlendi. Antioksidan aktivite ile bağlantılı çalışan fenolik bileşikler lipid oksidasyonunun düzenlenmesinde önemli bir yere sahiptir[13]. Fenolik bileşiklerin günde 1g'a kadar alınması mutajenez ve karsinogenez üzerinde engelleyici rol aldığı ileri sürülmüştür[14]. Bu çalışmada total fenol miktarı bakımından en zengin tür *Pinus nigra* türü olarak belirlenmiştir, içerik bakımından en düşük miktar *Thuca occidentalis* türünde gözlemlenmiştir. Total fenol içeriği ve antioksidan aktivitenin birbirine bağlı olduğu daha önce belirtilmiştir. Bu çalışmada hem total fenol içeriğinin hem de antioksidan etkinin aynı türde yüksek oranlarda görülmesi tezimizi destekler durumdadır.

Üstün ve arkadaşlarının[15] yaptıkları çalışmada *Pinus nigra* türünün diken yaprak ekstraktına ait total fenol miktarı 63.14 ± 2.35 mg/g'dır. Bu çalışmada alınan sonuç çok daha fazladır. Bu farkın temel sebebi bu çalışmada kozalak ekstraktı kullanılmış olmasıdır.

Likopen bitkilerde renk pigmenti olarak bilinen koyu kırmızı renkte bir maddedir. Güçlü antioksidan aktiviteye sahip bir bileşendir. Bu çalışmada likopen miktarı *Pinus nigra* (0,590 μ g/g) türünde *Thuca occidentalis* (0,574 μ g/g) türüne oranla daha yüksek miktarda olduğu belirlenmiştir.

β -karoten vitamin A'nın hammaddesidir. Yağda çözünen bir pigmenttir. Oksidasyon sonucu meydana gelen serbest radikalleri scavenging mekanizması ile ortadan kaldırarak oluşabilecek hastalıkların önüne geçmektedir. Bu çalışmada β -karoten miktarı *Thuca occidentalis* (0,79 mg / g), türünde *Pinus nigra* (0,39 μ g / g) türü ne oranla daha yüksek olduğu belirlenmiştir. Bu çalışmada bitkilerin kozalak kısmının kullanılması β -karoten ve likopen miktarında düşük sonuç alınmasına sebep olmuştur.

Bu aşamada Nevşehir ilinde yetişen 2 farklı iğne yapraklı ağacın kozalak ekstralarının antibakteriyel aktiviteleri incelenmiştir. Çalışmada kullanılan 2 türden 1 tanesi tüm patojenler üzerinde etki göstermiştir. *Pinus nigra* *jf. arnold* türünün *Thuca occidentalis* türüne oranla daha yüksek antibakteriyel etki gösterdiği belirlenmiştir.

Bu çalışmada ayrıca patojen bakteriler üzerinde antibiyotik disk çalışması yapılmıştır. Burada amaç bu çalışmada kullanılan bitki ekstraktlarının antibakteriyel etkisinin, günümüzde ticari olarak kullanılan kimyasal antibiyotiklerin (Ampisilin AM10, Erythromcin E15, Gentamisin CN10, Cefiksim CFM5, Oksalisin OX1, Penisilin P10, Ceftriakson CRO30, Amoksilin AMC30, Amoksilin AMC30) patojenler üzerindeki etkisi ile mukayese etmektir. Patojenlere karşı en iyi etkiyi Cefuroksim CXM30 antibiyotiği göstermiştir. Bu çalışmada en iyi etki gösteren kozalak ekstraktı (*Pinus nigra*) ile karşılaştırıldığında, Cefuroksim CXM30 antibiyotiğinin etkisinin zayıf olduğu görülmektedir. Burada anlaşılacağı üzere bu çalışmada kullanılan metanol ekstralarının piyasada var olan antibiyotiklere oranla çok daha iyi

sonuç verdiği görülmektedir. Kullanılan kozalak ekstraktlarının antibakteriyel etki göstermesi yüksek derecede biyoaktif içeriğe sahip olması ile açıklanabilir.

Demirci ve arkadaşlarının [16] yaptığı çalışmada Eylül ayında toplanan *Pinus nigra* türüne ait kozalaklardan elde edilen uçucu yağların *B.subtilis* ATTC6633 suşu üzerinde 12 mm zon çapı, *E.coli* ATTC39628 suşu üzerinde 12 mm zon çapı, *P.aeruginosa* ATTC27853 suşu üzerinde 13 mm zon çapı ölçmüştür. Bu çalışmada *Pinus nigra* türüne ait kozalaklardan elde edilen etanol ekstraktı *B.subtilis* ATTC6633 suşu üzerinde 30 mm zon çapı, *E.coli* ATTC39628 suşu üzerinde 25 mm zon çapı, *P.aeruginosa* ATTC27853 suşu üzerinde 21 mm zon çapı ölçmüştür. Bu çalışmada metanol ekstraktı kullanmamıza rağmen uçucu yağlardan elde edilen sonuçlardan çok daha yüksek sonuç alınmıştır. Demirci ve arkadaşlarının [16] yaptığı çalışmada antimikrobiyal aktivitenin uçucu yağ içeriğinde olan α -pinen miktarı ile orantılı olduğunu savunmuştur. Bu çalışmada antibakteriyel, DPPH ve metal iyonları şelatlama aktivitesi göz önüne alındığında en iyi sonuçların *Pinus nigra* türünde görülmesi, bu türe ait yapılan GC MS analizinde[16] yüksek oranda α -pinen maddesinin bulunması ile açıklanabilir.

Dığrak ve arkadaşlarının[17] yaptığı çalışmada *Pinus nigra* türüne ait kozalaklardan elde edilen metanol ekstraktının *Escherichia coli* bakterisine karşı aktivite gözlenmediği, cloroform ekstraktının *Escherichia coli* bakterisine karşı 10 mm çapında zon oluşturduğu belirtilmiştir. Aynı çalışmada metanol ekstraktının *Listeria monocytogenese* karşı 16 mm zon çapı, *Enterobacteraerogenese* karşı 15 mm zon çapı, *Bacillussubtilise* karşı 16 mm zon çapı oluşturduğu kaydedilmiştir. Bu çalışmada alınan metanol ekstreleri sonucu Dığrak ve arkadaşlarının yaptığı çalışmaya kıyasla çok daha iyi sonuç vermiştir. Elde edilen veriler bir sonraki çalışmalar için kaynak olacak ve ticari olarak satılan antibiyotiklere karşı alternatif oluşturacaktır.

Sonuçlar göz önüne alındığında *Pinus nigra* türünün DPPH radikali süpürme aktivitesi sentetik bir antioksidan olan BHT molekülüne yakın değerde seyretmiştir. Antibakteriyel etkisi piyasada satılan antibiyotiklere oranla çok daha yüksek çıkmıştır. Günümüzde doğal antioksidan ve antibakteriyel ilaçlara eğilim arttığı gözlemlenmiştir. Bu çalışmada elde edilen veriler *Pinus nigra* türünün doğal bir antioksidan ve antibakteriyel etkiye sahip olduğunu göstermektedir, elde edilen sonuçlar bundan sonra yapılacak çalışmalara kaynak niteliğinde olup ticari olarak satılan ilaçlara karşı alternatif olacaktır.

5. Kaynaklar

- [1] Koçyiđit., M. “Yalova Đlinde Etnobotanik Bir Araştırma”, İstanbul Üniversitesi *Sağlık Bilimleri Enstitüsü Yüksek Lisans Tezi*, İstanbul 2005..
- [2] Astley, S. B., “Dietary antioxidants-past, present and future?”, *Trends in Food Science & Technology*, 14(3): 93–98, 2003.
- [3] Shinde A, Ganu J, Naik P. “Effect of free radicals & Antioxidants on oxidative stress: A Review” **J Dent Allied Sci.** 1,2, 63- 66, 2012;.
- [4] Ceran, B., “Antik Mısır Ve Anadolu Uygarlıklarında Tıp”, Selçuk Üniversitesi *Sosyal Bilimler Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi*, Konya 2008.
- [5] Miao V, Legal MFC, Brown D, Sinnemann S, Donaldson G, Davies J. “Genetic approaches to harvesting lichen products”. *Trends in Biotechnol*, 19: 349-355, 2001.
- [6] Brand-Williams, W., Cuvelier, M.E., Berset, C., “Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity”, *Lebensmittel-Wissenschaft und Tecnologies*, 28: 25-30, 1995.
- [7] Singleton, V.L., Rossi, J.A.,”Clorimetry of total phenolics with phosphomolybdeid-phosphotungstic acid reagents”, *American Journal of Enology and Viticulture*, 16: 144-158, 1995.

- [8] Karapandzova, M , Stefkov, G , Cvetkovikj, I , Trajkovska-Dokik, E , Kaftandzieva, A , Kulevanova, S. (2014) Chemical composition and antimicrobial activity of the essential oils of *Pinus peuce* (Pinaceae) growing wild in R. Macedonia. *Natural Product Communications*, 9, 1623–1628.
- [9] Şahin, Serpil, et al. "Yeni teknolojilerle baharatlardan esansiyel yağ ekstraksiyonu ve bu yağların fiziksel, antioksidan ve antimikrobiyal özellikleri." (2007).
- [10] Hofmann, Tamás, Eszter Visi-Rajczi, and Levente Albert. "Antioxidant properties assessment of the cones of conifers through the combined evaluation of multiple antioxidant assays." *Industrial Crops and Products* 145 [2020]: 111935.
- [11] Stamets, P., "Mycelium running", Ten speed press, 399 Berkeley, 2005.
- [12] Üstün, Osman, vd. "Türk *Pinus* türleri ve piknogenolün ekstrakt ve uçucu yağlarının kimyasal bileşimi, antikolinesteraz ve antioksidan aktivitelerinin araştırılması." *Sanayi bitkileri ve ürünleri* 38, 115-123, 2012.
- [13] GC Yen , PD Duh , CL "TsaiFıstık kabuğunun antioksidan aktivitesi ile olgunluğu arasındaki ilişki" *Tarım Journal of Food Chemistry* , 41, s. 67 – 70, 1993
- [14] M. Tanaka, CW Kuei , Y. Nagashima , T. "TaguchiAntioksidativ maillrad reaksiyon ürünlerinin histidin ve glikozdan sardalya ürünlerine uygulanması" *Nippon Suisan Gakkaishil* , 54,] ,1409 – 1414, 1998.
- [15] Ustun, Osman, et al. "Investigation on chemical composition, anticholinesterase and antioxidant activities of extracts and essential oils of Turkish *Pinus* species and pycnogenol." *Industrial crops and products* 38, 115-123,2012.
- [16] Demirci, Ayşe Nur, Nazan Çömlekçioğlu, and Ashabil Aygan. "Determination of the Chemical Composition, Antimicrobial Activity and Flavonoid Content of the Essential Oils of *Cedrus libani* and *Pinus nigra* subsp. *pallasiana*." *Turkish Journal of Agriculture-Food Science and Technology* 8.8, 1747-1754, 2020.
- [17] Dığrak, Metin, Ahmet İlçim, and M. Hakkı Alma. "Antimicrobial activities of several parts of *Pinus brutia*, *Juniperus oxycedrus*, *Abies cilicia*, *Cedrus libani* and *Pinus nigra*." *Phytotherapy Research: An International Journal Devoted to Pharmacological and Toxicological Evaluation of Natural Product Derivatives* 13.7, 584-587, 1999.