

T.C.
GÜMÜŞHANE ÜNİVERSİTESİ
LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ

BİYOTEKNOLOJİ ANABİLİM DALI

GELENEKSEL ÇAM KOZALAĞI ŞURUBUNUN FENOLİK BİLEŞİKLERİNİN
KARAKTERİZASYONU VE BİYOLOJİK AKTİVİTELERİNİN
BELİRLENMESİ

YÜKSEK LİSANS

Tuğba MİDİK

ŞUBAT-2023
GÜMÜŞHANE



T.C.

**GÜMÜŞHANE ÜNİVERSİTESİ
LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ**

BİYOTEKNOLOJİ ANABİLİM DALI

**GELENEKSEL ÇAM KOZALAĞI ŞURUBUNUN FENOLİK BİLEŞİKLERİNİN
KARAKTERİZASYONU VE BİYOLOJİK AKTİVİTELERİNİN
BELİRLENMESİ**

**CHARACTERIZATION OF PHENOLIC COMPOUNDS OF
TRADITIONAL PINECONE SYRUP AND DETERMINATION OF THEIR
BIOLOGICAL ACTIVITIES**

YÜKSEK LİSANS

Tuğba MIDİK

**ŞUBAT-2023
GÜMÜŞHANE**



**T.C.
GÜMÜŞHANE ÜNİVERSİTESİ
LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ**

BİYOTEKNOLOJİ ANABİLİM DALI

**GELENEKSEL ÇAM KOZALAĞI ŞURUBUNUN FENOLİK BİLEŞİKLERİNİN
KARAKTERİZASYONU VE BİYOLOJİK AKTİVİTELERİNİN
BELİRLENMESİ**

**CHARACTERIZATION OF PHENOLIC COMPOUNDS OF
TRADITIONAL PINECONE SYRUP AND DETERMINATION OF THEIR
BIOLOGICAL ACTIVITIES**

YÜKSEK LİSANS

Tuğba MIDİK

Danışman: Doç. Dr. Nesibe ARSLAN BURNAZ

**ŞUBAT-2023
GÜMÜŞHANE**

BİLİMSEL ETİĞE UYGUNLUK BEYANI

Yüksek Lisans Tezi olarak hazırlamış olduğum “**Geleneksel Çam Kozalağı Şurubunun Fenolik Bileşiklerinin Karakterizasyonu ve Biyolojik Aktivitelerinin Belirlenmesi**” isimli bu tezimin, tamamen kendi çalışmam olduğunu, her alıntıya kaynak gösterdiğimi, alıntı yaptığım tüm çalışmaları kaynakçada belirttiğimi ve Gümüşhane Üniversitesi’nin lisanslı kullanıcısı olduğu intihal yazılım programı ile Lisansüstü Eğitim Enstitüsü’nün belirlediği kıstaslara uygun olarak raporladığımı taahhüt ederim. Tezimin kâğıt ve elektronik kopyalarının Gümüşhane Üniversitesi Lisansüstü Eğitim Enstitüsü arşivinde saklanması için izin verdiğimi onaylarım.

Lisansüstü Eğitim ve Öğretim Yönetmeliği’nin ilgili maddeleri uyarınca gereğinin yapılmasını arz ederim.

02/02/2023

.....

Tuğba MIDIK

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans eğitimim boyunca bana desteğini yürekten yapan, iyi ki karşılaşmışız dediğim sevgiye ve saygıya değer hocam Sayın Doç. Dr. Nesibe ARSLAN BURNAZ'a yürekten teşekkürlerimi sunarım.

Çalışmamızda desteği bulunup bize bilgilerini sunan Sayın Prof. Dr. Sevim Beyza ÖZTÜRK SARIKAYA hocama teşekkürlerimi sunarım.

Bu yüksek lisans eğitimim boyunca her şeye yetişmeye çalışırken yılmayıp istikrarla bu yolda ilerleyip sona geldiğim için öncelikle kendime, çoğu zaman yoğun mesai harcayıp beni bitiren ama varoluşlarıyla beni güçlü yapan evlatlarım Zeynep MIDİK ve Mehmet Engin MIDİK'a ve bana çalışma azmini miras bırakan rahmetli babam İsmail MEHMET'e sonsuz teşekkür ederim.

Bu Yüksek Lisans Tezi GÜBAP 2901: Bilimsel ve Teknolojik Araştırma Destek Programı tarafından desteklenmiştir (Proje kodu: 21.A0114.01.01).

Tuğba MIDİK
GÜMÜŞHANE – 2023

ÖZET

Geçmişten günümüze tüm bitkiler insanlığın hizmetinde olup çeşitli hastalıkların tedavisinde kullanılmaktadır. Ülkemiz çok sayıda tıbbi ve aromatik bitkinin yetiştiği zengin bir floraya sahiptir. Özellikle biyoaktif potansiyelleriyle bu bitkiler bilimsel araştırmalara odak noktası olmuştur. Çam ağaçları dünya üzerinde neredeyse tüm ülkelerde yetiştirme alanı bulmuş en geniş kapsamlı ağaç türlerindendir. Çam ağaçlarının farklı kısımlardan hazırlanan özütler farmasötik madde kaynağı olarak bilimsel literatüre de geçmiştir.

Bu çalışmada, halk arasında astım, bronşit hastalıklarında tercih edilen ayrıca bağışıklığı güçlendirme amaçlı mevsimsel geçişlerde yaşanan gribal enfeksiyonlarda öksürük krizlerini hafifletmek için kullanılan çam kozalağı şurubunun fenolik içeriği ve biyolojik aktiviteleri araştırılmıştır. Şuruplar sarıçam (*P. sylvestris*), karaçam (*P. nigra*), kızılçam (*P. brutia*) kozalaklarından elde edilmiştir. Şurupların TPC, TFC, DPPH•, ABTS•⁺, FRAP ve CUPRAC aktivitelerinin yanı sıra antimikrobiyal ve antidiyabetik aktiviteleri belirlenmiştir. Kromatografik LC-MS/MS analizi ile şuruplardaki fenolik bileşikler karakterize edilmiştir.

Sonuç olarak, sarıçam kozalağı şurubunun en çok fenolik/flavonoid madde içeriğine ve en yüksek antioksidan aktiviteye sahip olduğu görülmüştür. Enzim inhibisyonu çalışmasında en yüksek antidiyabetik aktiviteyi ise karaçamdan elde edilen şurup göstermiştir. Antimikrobiyal analizde karaçam şurubu *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* ile *Bacillus cereus*'e karşı antibakteriyal aktivite göstermiş olup diğerlerinden daha etkili bulunmuştur.

Hali hazırda kullanılmakta olan besinler dışında yakacak ve süs bitkisi olarak kullanılan orman ürünlerinin farmasötik değere sahip olmasını ön plana çıkarması bakımından önemli bir çalışmadır.

Anahtar Kelimeler: Antidiyabetik, Antimikrobiyal, Antioksidan, Çam kozalağı, HPLC-MS/MS.

SUMMARY

From past to present, all plants are in the service of humanity and are used in the treatment of various diseases. Our country has a rich flora where many medicinal and aromatic plants grow. Especially with their bioactive potential, these plants have been the focus of scientific research. Pine trees are among the most extensive tree species that have grown in almost all countries in the world. Extracts prepared from different parts of pine trees have also entered the scientific literature as a source of pharmaceutical substances.

In this study, the phenolic content and biological activities of pinecone syrup, which is preferred by the public in asthma and bronchitis diseases and used to alleviate coughing attacks in seasonal flu infections for the purpose of strengthening immunity, were investigated. Syrups were obtained from scotchpine (*P.sylvestris*), blackpine (*P.nigra*), redpine (*P.brutia*) cones. Besides TPC, TFC, DPPH•, ABTS•⁺, FRAP, and CUPRAC activities antimicrobial and antidiabetic activities of the syrups were determined. Phenolic compounds were characterized by chromatographic LC-MS/MS analysis.

As a result, scotchpine cone syrup had the highest phenolic/flavonoid content and the highest antioxidant activity. In the enzyme inhibition study, syrup obtained from blackpine cone syrup showed the highest antidiabetic activity. In the antimicrobial analysis, blackpine cone syrup showed antibacterial activity against *E.coli*, *S.aureus*, and *B.cereus* and was found to be more effective than the others.

It is an important study that highlights the pharmaceutical value of forest products used as fuel and ornamental plants, apart from the foods currently being used.

Keywords: Antidiabetic, Antimicrobial, Antioxidant, Pinecone, HPLC-MS/MS.

İÇİNDEKİLER

KABUL VE ONAY	III
BİLİMSEL ETİĞE UYGUNLUK BEYANI	IV
TEŞEKKÜR	V
ÖZET	VI
SUMMARY	VII
İÇİNDEKİLER.....	VIII
TABLolar DİZİNİ.....	X
ŞEKİLLER DİZİNİ	XI
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ.....	XIII
1. GENEL BİLGİLER	1
1.1. Giriş.....	1
1.2. Fitokimyasallar	2
1.2.1. Polifenoller ve Önemi	2
1.2.1.1. Flavonoidler	3
1.2.1.2. Fenolik Asitler.....	3
1.2.1.3. Tanenler	3
1.2.1.4. Stilbenler.....	4
1.2.1.5. Lignanlar.....	4
1.3. Fitokimyasalların Etkileri.....	4
1.3.1. Fitokimyasalların Antioksidan Etkileri	4
1.3.2. Fitokimyasalların Antidiyabetik Etkileri.....	7
1.3.3. Fitokimyasalların Antimikrobiyal Etkileri	9
1.4. Pinus Türleri	11
1.4.1. <i>Pinus Sylvestris</i>	12
1.4.2. <i>Pinus Nigra</i>	12
1.4.3. <i>Pinus Brutia</i>	13
1.4.4. Pinus Türlerinin Fitokimyasal Açısından Değerlendirilmesi.....	13
2. MATERYAL VE YÖNTEMLER	17
2.1. Kullanılan Cihazlar	17
2.2. Kullanılan Kimyasallar.....	17
2.3. Kozalak Şurubu Elde Edilişi.....	18
2.3.1. Kozalakların Toplanması.....	18

2.3.2. Şurup Tarifi.....	19
2.4. Kozalak Şuruplarında Toplam Kuru Madde Tayini	21
2.5. Toplam Fenolik Madde Miktarı Tayini.....	21
2.6. Toplam Flavonoid Madde Miktarı Tayini.....	21
2.7. Antioksidan Kapasite Analizi	22
2.7.1. ABTS•+ Analizi	22
2.7.2. DPPH• Analizi	22
2.7.3. CUPRAC Analizi	23
2.7.4. FRAP Analizi.....	23
2.8. LC-MS/MS Analizi.....	24
2.8.1. LC-MS/MS Şartları.....	24
2.9. Enzim İnhibisyon Analizi.....	24
2.10. Antimikrobiyal Analiz.....	25
3. BULGULAR	27
3.1. Toplam Kuru Madde Tayini Bulguları.....	27
3.2. Toplam Fenolik Madde Miktarı Bulguları	27
3.3. Toplam Flavonoid Madde Miktarı Bulguları	28
3.4. ABTS•+ Analizi Bulguları	30
3.5. DPPH• Analizi Bulguları.....	32
3.6. CUPRAC Analizi Bulguları	35
3.7. FRAP Analizi Bulguları	36
3.8. HPLC-MS/MS Analizi Bulguları	37
3.9. Enzim İnhibisyon Analizi Bulguları	39
3.10. Antimikrobiyal Analiz Bulguları	41
4. TARTIŞMA.....	44
5. SONUÇ VE ÖNERİLER	48
ÖZGEÇMİŞ.....	61

TABLÖLAR DİZİNİ

Tablo 1. Serbest radikaller	5
Tablo 2. Antioksidanlar.....	6
Tablo 3. Kullanılan Cihaz ve Markaları.....	17
Tablo 4. Kullanılan kimyasallar	18
Tablo 5. Kozalakların toplandığı yer ve koordinatlar	18
Tablo 6. LC analizinde kullanılan gradient akış programı.....	24
Tablo 7. Enzim inhibisyonu çalışma kartı.....	25
Tablo 8. Çam kozalağı şuruplarının toplam kuru madde miktarları.....	27
Tablo 9. Çam kozalağı şuruplarının LC/MS-MS analizi parametreleri.....	38
Tablo 10. Çam kozalağı şuruplarının LC/MS-MS analizi sonuçları	39
Tablo 11. α -glukozidaz enzim inhibisyonu gösteren sarıçam, kızılçam ve karaçam şuruplarının IC_{50} ve R^2 değerleri	41
Tablo 12. Sarıçam kozalağı şurubunun farklı konsantrasyonlarına karşı antimikrobiyal aktivite	41
Tablo 13. Karaçam kozalağı şurubunun farklı konsantrasyonlarına karşı antimikrobiyal aktivite	42
Tablo 14. Kızılçam kozalağı şurubunun farklı konsantrasyonlarına karşı antimikrobiyal aktivite	42

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1. Diyabetin sınıflandırılması	8
Şekil 2. <i>Pinus Sylvestris</i> - Sarıçam	12
Şekil 3. <i>Pinus Nigra</i> - Karaçam.....	12
Şekil 4. <i>Pinus Brutia</i> - Kızılçam.....	13
Şekil 5. Farklı türlere ait çam kozalaklarının görüntüsü	19
Şekil 6. Kozalakların pişirme esnasındaki görüntüsü	20
Şekil 7. Kozalak şuruplarının süzülme aşaması	20
Şekil 8. Toplam fenolik madde tayini için çizilen gallik asit standardının kalibrasyon grafiği	27
Şekil 9. Çam kozalağı şuruplarının toplam fenolik madde miktarları	28
Şekil 10. Toplam flavonoid madde tayini için çizilen kateşin standardının kalibrasyon grafiği	28
Şekil 11. Toplam flavonoid madde tayini için çizilen kuersetin standardının kalibrasyon grafiği	29
Şekil 12. Çam kozalağı şuruplarının toplam flavonoid madde miktarları	29
Şekil 13. Çam kozalağı şuruplarının toplam flavonoid madde miktarları	29
Şekil 14. ABTS ^{•+} çalışmasında kullanılan troloks standardının radikal giderme aktivitesine ait grafik	30
Şekil 15. Sarıçam kozalağı şurubunun ABTS ^{•+} radikali giderme aktivitesi.....	31
Şekil 16. Karaçam kozalağı şurubunun ABTS ^{•+} radikali giderme aktivitesi.....	31
Şekil 17. Kızılçam kozalağı şurubunun ABTS ^{•+} radikali giderme aktivitesi	31
Şekil 18. Troloks ile çam kozalağı şuruplarının ABTS ^{•+} radikali giderme aktivitesini gösteren SC ₅₀ değerleri	32
Şekil 19. Kozalak şuruplarının ABTS ^{•+} radikali giderme yüzdeleri	32
Şekil 20. DPPH [•] çalışmasında kullanılan Troloks standardının radikal giderme aktivitesine ait grafik	33
Şekil 21. DPPH [•] çalışmasında kullanılan α -Tokoferol standardının radikal giderme aktivitesine ait grafik	33
Şekil 22. Sarıçam kozalağı şurubunun DPPH [•] radikali giderme aktivitesi.	34
Şekil 23. Karaçam kozalağı şurubunun DPPH [•] radikali giderme aktivitesi.	34
Şekil 24. Kızılçam kozalağı şurubunun DPPH [•] radikali giderme aktivitesi.....	34

Şekil 25. Troloks ve α -Tokoferol standartları ile kozalak şuruplarının DPPH• radikali giderme aktivitesini gösteren SC ₅₀ değerleri	35
Şekil 26. Kozalak şuruplarının DPPH• radikalini giderme yüzdeleri	35
Şekil 27. CUPRAC tayini için kullanılan Troloks standardının kalibrasyon grafiği.....	36
Şekil 28. Çam kozalağı şuruplarının CUPRAC değerleri	36
Şekil 29. FRAP tayini için kullanılan Troloks standardının kalibrasyon grafiği	37
Şekil 30. Çam kozalağı şuruplarının FRAP değerleri	37
Şekil 31. Sarıçam kozalağı şurubunun α -glukozidaz inhibisyonu aktivitesi	40
Şekil 32. Karaçam kozalağı şurubunun α -glukozidaz inhibisyonu aktivitesi	40
Şekil 33. Kızılçam kozalağı şurubunun α -glukozidaz inhibisyonu aktivitesi	40

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

μL	: mikrolitre
ABTS	: 2,2'-azinobis (3-etilbenzotiazolin-6-sülfonikasıit)
ADA	: Amerikan Diyabet Derneği
Cu^{+2}	: Bakır (II) katyonu
CuCl_2	: Bakır (II) klorür
DM	: <i>Diabetes Mellitus</i>
DPPH	: 2,2 -difenil-1-pikrilhidrazil
Fe^{+2}	: Demir (II) katyonu
Fe^{+3}	: Demir (III) katyonu
FeCl_3	: Demir (III) klorür
FRAP	: Demir indirgeyici antioksidan güç
IDF	: Uluslararası Diyabet Federasyonu
$\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_8$	: Potasyum persülfat
mL	: mililitre
mM	: milimolar
Na_2CO_3	: Sodyum karbonat
NaNO_2	: Sodyum nitrit
NaOH	: Sodyum hidroksit
NH_4Ac	: Amonyum asetat
Nm	: nanometre
RNT	: Reaktif Nitrojen Türleri
ROT	: Reaktif Oksijen Türleri
TFC	: Toplam flavonoid madde miktarı
TPC	: Toplam fenolik madde miktarı
TPTZ	: 2,4,6-tripiridil-triazin
TÜSEB	: Türkiye Sağlık Enstitüleri Başkanlığı
TÜBİTAK-MAM	: Türkiye Bilimsel ve Teknolojik Araştırma Kurumu - Marmara Araştırma Merkezi
TÜRKDİAB	: Türkiye Diyabet Vakfı
WHO	: Dünya Sağlık Örgütü
ZTBB	: Zeytinburnu Tıbbi Bitkiler Bahçesi

1. GENEL BİLGİLER

1.1. Giriş

Yontma taş devri M.Ö. 50000 yıllarına ait kitabeler ve arkeolojik materyaller gösteriyor ki bitkilerin tedavi amacıyla kullanımı tarih öncesi döneme kadar uzanmaktadır. 19. yüzyıla gelindiğinde bitkisel tedavi yöntemlerinin yerini sentetik ilaçlar almıştır. 20. yüzyılın sonuna gelindiğinde sentetik ilaçların faydalı olduğu kadar zararlı olduğu da görülmeye başlanmış olup tekrar bitkisel tedaviler tercih edilmeye başlanmıştır. Böylelikle, bitkisel tedavinin geri dönüşü artık daha teknik ve araştırmaya dayalı olmuştur. Sentetik ilaçlara nazaran tıbbi bitkilerin tedavi edici etkileri yavaştır, beklenen fayda için tedaviye 3-4 hafta kadar devam etmek gerekmektedir (ZTBB, 2010).

Dünyada farklı iklim ve toprak koşullarına bağlı olarak farklı bitkiler yetişmektedir. Farklı bölgelerde farklı tedavi yöntemleri ortaya çıkmaktadır fakat bütün bölgelerde bitkilerin yararlı kısımları su ile kaynatılarak, yağda bekletilerek, lapa yaparak ya da bitki tozu balla karıştırılarak kullanılmaktadır (Meriçli, 1994).

Fitoterapi; bitkilerin yaprakları, kabukları, kökleri, tohumları, çiçekleri ve meyvelerinden elde edilen ekstraktların tıbbi amaçla kullanılmasını ifade etmektedir. Fitoterapi ilk kez Henry Leclerc tarafından 1939 yılında kullanılmıştır (Parıldar vd., 2011). Destek tedavi yöntemi olarak kullanılan fitoterapi soğuk algınlığı, üst solunum yolu rahatsızlıkları, sindirim sistemi şikayetleri, dermatolojik rahatsızlıklar, zayıflama ve diyetlerde öncelikli kullanılsa da kalp-damar hastalıkları, diyabet gibi kronik hastalıkların tedavisinde de kullanılmaktadır (Patlevski vd., 2001).

Diyabetli hastaların ülkemizde ve dünyada gün geçtikçe beslenme ve obeziteye bağlı olarak artışı gözlenmektedir. Tip 1 diyabet tedavisinde insülin kullanımı mecburidir, tip 2 diyabette tedavi için kullanılan oral antidiyabetikler karaciğer ve böbreklerde toksisite oluşturması sebebiyle yeni ilaçların keşfine ihtiyaç duyulmaktadır. Bu amaçla antidiyabetik etkili bitkisel ilaçlar araştırılmaktadır (Aslan ve Orhan, 2010).

Fitoterapi ve diyabet içerikli araştırmalara bakıldığında bitkilerin tip 2 diyabeti tedavi edişi hipoglisemik etkililer, insüline hassasiyeti artıranlar, karbonhidrat absorpsiyonunu etkileyenler ve diğerleri şeklinde sınıflanmaktadır. Yapılan bir çalışmada Türkiye’de 47 familya ve 108 cinse ait 179 tür bitki tip 2 diyabet tedavisinde kullanılmaktadır (Arıtılık ve Ezer, 2021).

Halk arasında bitkinin özünün elde edilmesi laboratuvar cihazları ve herhangi bir kimyasal çözücü kullanılmadan sağlanmaktadır. Ticari amaçla üretilmiş bitki özleri en iyi verimle elde edilebilir yöntemleri kullanılarak üretilmektedir. Fakat insanlar faydalı bir bitkiyi mutfaklarında kendileri hazırlayıp şifa dolabı oluşturmayı sevmektedir.

Bu çalışmamızda 3 farklı (sarıçam-*pinus sylvestris*, karaçam-*pinus nigra* ve kızılçam-*pinus brutia*) türden mutfak teknikleriyle hazırladığımız kozalak şuruplarının;

>> fenolik ve flavonoid madde miktarları

>> fenolik ve flavonoid içerikleri

>> antioksidan etkileri

>> antidiyabetik etkileri

>> antimikrobiyal etkileri bulunmuştur.

Ve ayrıca bu üç türün kıyaslaması yapılmıştır. Hazırladığımız şuruplarda diyabetteki kullanımı göz önüne alınarak standart tariflerin aksine şeker kullanılmamıştır.

1.2. Fitokimyasallar

Bitki kimyasındaki bileşikler işlevlerine göre primer ve sekonder metabolitler şeklinde ikiye ayrılmaktadır. Primer metabolitler bitkinin büyüme ve gelişmesinde rol alırken sekonder metabolitler bitkinin çevreye adaptasyonunda ve sağlıklı kalabilmesinde etkili olan bileşiklerdir (Alvarez, 2014).

Bitkiler kendilerini sekonder metabolitleri sayesinde koruyabildiği gibi insanlar da yüzyıllardır bitkilerdeki fitokimyasallarla hastalıklara çare bulma çabasındadırlar. Öyle ki bilim insanları bitki bileşenleri üzerine araştırmalar yapıp hastalıklar üzerinde denemişlerdir. Ve hatta ilaç endüstrisi sentetik ilaçlar yerine metabolizmaya zarar vermeyecek doğal içerikli ilaç üretimine yönelmektedir.

Sekonder metabolitler; polifenoller, terpen-steroidler ve alkaloidler şeklinde üç grupta sınıflandırılmaktadır (Topçu ve Çölgeçen, 2015). Polifenoller, fitokimyasalların en önemli grubudur (Jan ve Abbas, 2018).

1.2.1. Polifenoller ve Önemi

Gıda maddeleri 25000 civarında fitokimyasal barındırmaktadır ve bunların yaklaşık 500 tanesi fenolik bileşikler (polifenoller) grubunda en popüler olanlarıdır. Fenolik bileşiklerin sahip olduğu biyolojik aktivite; antioksidatif (Albishi vd., 2013), antimikrobiyal (Kaur ve Mondal, 2014), antiinflamatuvar (Zhang ve Tsao, 2016) ve antiviral (Zhang vd., 2014) özelliklerindedir.

Fenolik bileşiklerdeki antioksidan etki, vücutta dejenere etki gösteren oksijen konsantrasyonunu azaltmaya, oksidasyonun başlamasını önlemeye veya direkt olarak serbest radikalleri tutmaya dayanmaktadır (Zhang ve Tsao, 2016).

Yapılan çalışmalarda oksidatif stresle ilişkili fenolik bileşiklerin diyetle alınmasıyla kanser (Thangapazham vd., 2006), yüksek kolesterol (Erlund vd., 2008), koroner kalp (Kris-Etherton vd., 2004), katarakt, diyabet (Demir vd., 2019) gibi hastalıkların ve yaşlanmanın (Fisher vd., 2015) önlenildiği görülmüştür.

Hastalıkların tedavisinde ve önlenmesinde bitki kaynaklı ilaçların kullanılması şeklinde tanımlanmış olan fitoterapi, bilime dayalı tıbbi bir uygulamadır (Menin, 2012).

Polifenoller fenolik yapısal özellikte olup bulundurdukları hidroksil gruplarının sayısı ve düzenlenmesine göre birçok alt gruba ayrılır (Spencer vd., 2008).

1.2.1.1. Flavonoidler

Flavonoidler, bitkilerde bulunan diğer polifenollere oranla daha fazla miktardadır ve 15 karbon atomu içeren iskeleti C6-C3-C6 şeklinde düzenlenmiştir. Bu iskelet düzenine farklı hidroksil gruplarının bağlanması, doymamışlık derecesi ve üçlü karbon segmentinin oksidasyon düzeyinden kaynaklı olarak farklı flavonoid yapılar mevcuttur (Saldamlı, 1998). Yapısal farklılıklar gösteren flavonoidler antosiyanidinler, flavonlar, flavonoller, flavanonlar, flavanoller (kateşinler) ve izoflavonlar gibi isimler almaktadırlar (Hollman vd., 2006).

1.2.1.2. Fenolik Asitler

Fenolik asitler, polifenoller bakımından ikinci en önemli gruptur ve bitkilerde bağlı ve serbest formlarda bulunmaktadır (Haminiuk vd., 2012). C6-C1 iskelet yapısında hidroksibenzoik asit ve C6-C3 iskelet yapısında hidroksisinnamik asit şeklinde iki alt gruba ayrılmaktadır (Tsao, 2010).

1.2.1.3. Tanenler

Tanenler, suda çözünür bir polifenol grubudur. Yoğunlaştırılmış (kateşin tanenleri veya proantosiyanidinler olarak da adlandırılır) ve hidrolize edilebilir tanenler olarak sınıflandırılır (Smeriglio vd., 2017). Tanenler yoğun olarak bitkilerin yaprak dokularında, epidermiste, ağaç kabuklarında, çiçeklerde, meyvelerde ve diğer bitkinin dokularında bulunan gallik asit (3,4,5-trihydroxy benzoic acid) türevlerinden oluşan sarımsı veya kahverengimsi renkli maddelerdir. Yaygın olarak alkaloidler, polisakkaritler ve proteinlerle kompleks halinde bulunur (Mustafa vd., 2020).

Baklagillerin (fasülye vb.), meyvelerin (özellikle üzüksü meyveler) ve kabuklu yemişlerin (findık vb.) bileşeni oldukları bildirilmektedir (Durazzo vd., 2019).

1.2.1.4. Stilbenler

Stilbenler sinnamik asit türevlerinden sentezlenmekte olup bir çift bağla birbirine bağlı iki benzen halkasından oluşmaktadır (Durazzo vd., 2019). Stilbenlerin çoğunun insanlar için uygun olmadığı bilinmekte olup insanlara en faydalı stilben bileşiği resveratroidür. Bu bileşiğin antioksidan, antiviral, kardiyoproteklif, antiobezite ve yaşlanma geciktirici etkileri olduğu bilinmektedir (Atak ve Uslu, 2018; Cai vd., 2022; Gökçen vd., 2017).

1.2.1.5. Lignanlar

Lignanlar iki fenilpropan biriminin dimerizasyonu (C6-C3-C3-C6) oluşur. Fitoöstrojen özellik gösteren secoisolariciresinol, matairesinol, lariciresinol ve pinoresinol en yaygın lignanlardır (Pandey ve Rizvi, 2009; Laura vd., 2019).

1.3. Fitokimyasalların Etkileri

1.3.1. Fitokimyasalların Antioksidan Etkileri

Atom veya molekül olan serbest radikaller dış orbitallerinde eşlenmemiş elektronlar bulundurlar ve yüksek enerjilidirler (Halliwell ve Gutteridge, 1985).

Radikal; »elektronu eksiktir.

»elektron alarak tamamlanmak ister.

»elektron aldığı molekülü radikale çevirir.

Vücudumuzda bulunmakta olan serbest radikaller hem vücutta gerçekteşen reaksiyonlar sonucu (endojen kaynaklar) hem de bazı dış etkenlere maruz kalma sonucu (eksojen kaynaklar) oluşmaktadır. Bunlar;

>>Mitokondride gerçekteşen elektron transport sisteminde oksijen katalizasyonunda yan ürün olarak serbest radikal oluşumu

>>Enfeksiyon durumunda nötrofil ve makrofajların inflamasyonu engellemek için serbest radikal üretimi

>>Zihin ve vücut yorgunluğunda oluşan stresin serbest radikal üretimi

>>Endoplazmik retikulumda sitokrom p450 sisteminde meydana gelen kaçaklardan serbest radikal oluşumu

>>Pişirme sırasında organik maddelerin yıkımı sonucu serbest radikal oluşumu

>>Kloroform ve diğer trihalometanlar gibi su kirletici maddeler
>>Alkol sigara kullanımı, sigara ve egzoz dumanı
>>UV ışınlar, X-rays, gamma ışınları, mikrodalga ışınları
>>Asbest, benzen, karbonmonoksit, formaldehit, ozon ve toluen gibi hava kirleticiler (Karabulut ve Gülay, 2016b).

Oksijen kaynaklı radikaller reaktif oksijen türleri (ROT) ve nitrojen kaynaklı radikaller reaktif nitrojen türleri (RNT) şeklinde isimlendirilir (Valko vd., 2007).

Tablo 1. Serbest radikaller (Karabulut ve Gülay, 2016b).

	Radikaller		Nonradikaller	
ROT	Süperoksit	$\bullet\text{O}_2^-$	Hidrojen peroksit	H_2O_2
	Hidroksil	$\text{OH}\bullet$	Hipokloröz asit	HOCl
	Peroksil	$\text{ROO}\bullet$	Hipobromöz asit	HOBr
	Alkoksil	$\text{RO}\bullet$	Singlet oksijen	$^1\text{O}_2$
	Hidroperoksil	$\text{HO}_2\bullet$	Ozon	O_3
	Lipid peroksil	$\text{LOO}\bullet$		
RNT			Nitrik asit	$\text{NO}_2\bullet$
			Nitrosil katyonu	NO^+
			Nitroksil anyonu	NO^-
			Dinitrojen tetroksid	N_2O_4
	Nitrik oksit	$\text{NO}\bullet$	Dinitrojen trioksit	N_2O_3
	Nitrojen dioksit	$\text{NO}_2\bullet$	Peroksinitrit	ONOO
			Peroksinitrik asit	ONOOH
			Nitronyum katyonu	NO_2^+
			Nitril klorid	NO_2Cl
			Alkil peroksinitrit	ROONO

Tablo 1’de nonradikaller olarak verilen oksidan türleri patolojik ve fizyolojik durumlar altında canlılar tarafından üretilir ve canlıda kolaylıkla serbest radikal reaksiyonlarına yol açabilirler (Valko vd., 2007).

Canlı organizmada her zaman serbest radikaller mevcuttur ve bazı durumlar için oksidasyon elzemdir. Ancak organizma, homeostazi devam ettiği sürece sağlıklıdır. Burada oksidan ve antioksidan dengesinden bahsedilmektedir ve bu denge oksidanlar artacak şekilde bozulursa oksidatif stres meydana gelir.

Oksidan bileşiklerdeki artış, hücre için toksiktir ve hücrenin yapıtaşları olan karbohidrat, protein, lipid ve nükleik asitlere zarar vererek hücre içi sinyal yollarını bozmaktadır (Lopez-Alarcona ve Denicola, 2013). Serbest radikallerin artışıyla oluşan oksidatif stresin, Parkinson, Alzheimer, huntington, amiotrofik lateral skleroz, immün sistem bozuklukları, diyabet, kanser, kardiyovasküler vasküler bozukluklar gibi hastalıkların oluşumuna sebep olduğu düşünülmektedir (Pisoschi ve Pop, 2015).

Oksidatif strese giden durumu dengeye getirecek olan bileşikler antioksidanlardır. Antioksidanlar serbest radikalleri etkisiz hale getirip hücre hasarını engelleyebilen bileşiklerdir. Organizmada serbest radikal üretimi olduğu gibi antioksidan üretimi de mevcuttur veya dışarıdan ilave olarak da alınabilmektedir.

Serbest radikal oluşumunu engellemek, bu maddelerin meydana getirdiği hasarları önlemek ve detoksifikasyonu sağlamak için vücutta görev yapan savunma sistemlerine “antioksidan savunma sistemleri” denir (Karabulut ve Gülay, 2016a).

Tablo 2’de görüldüğü üzere vücudumuz antioksidan savunma mekanizmasıyla serbest radikallerle savaşmaktadır.

Tablo 2. Antioksidanlar (Akyurt, 2014).

Endojen Antioksidanlar		Eksojen Antioksidanlar		
Enzim olan	Enzim olmayan	Vitamin	İlaç	Gıda katkısı
Süperoksit dismutaz, Glutatyon peroksidaz, Glutatyon STransferazlar Katalaz, Mitokondriyal sitokrom oksidaz sistemi, Hidroperoksidaz	Melatonin, Seruloplazmin Transferrin, Miyoglobin, Hemoglobin. Ferritin, Bilirubin, Glutatyon, Sistein, Metiyonin, Ürat, Laktoferrin, Albümin	α -tokoferol (vitamin E), β -karoten, Askorbik asit (vitamin C), Folik asit (folat)	Ksantin oksidaz inhibitörleri, NADPH oksidaz inhibitörleri, Rekombinant süperoksit dismutaz, Trolox-C, Endojen antioksidan aktiviteyi artıranlar, Nonenzimatik serbest radikal toplayıcılar, Demir redoks döngüsü inhibitörleri Nötrofil adezyon inhibitörleri, Sitokinler, Barbitüratlar, Demir şelatörleri.	Butylated hydroxytoluene (BHT), Butylated hydroxyanisole (BHA), Sodium benzoate, Ethoxyquin, Propylgalate, Fe-superoxyde dismutase

Antioksidanlar dört ayrı şekilde etki ederler.

- 1) Serbest oksijen radikallerini etkileyerek onları tutar veya daha zayıf yeni moleküle çevirerek toplayıcı etki gösterirler.
- 2) Serbest oksijen radikalleriyle etkileşip onlara bir hidrojen aktararak aktivitelerini azaltma veya inaktif şekle dönüştürerek bastırıcı etki gösterirler.

3) Serbest oksijen radikallerini bağlayarak zincirlerini kırıp fonksiyonlarını engelleyici etkiyle zincir kırıcı etki gösterirler.

4) Serbest radikallerin oluşturdukları hasarın onarılmasıyla onarıcı etki gösterirler (Dawn vd., 1996).

Beslenmenin hayatımızdaki önemi antioksidanlarla savaşıma kısmında da görülmektedir. Özellikle bitkisel gıdalarda bulunan fenolik bileşikler

>>İndirgen ajan

>>Hidrojen verici

>>Tekli oksijen yakalayıcı

>>Metal şelatlama etkisi göstererek antioksidanlar arasında sayılmaktadır (Rice-Evans vd., 1995).

1.3.2. Fitokimyasalların Antidiyabetik Etkileri

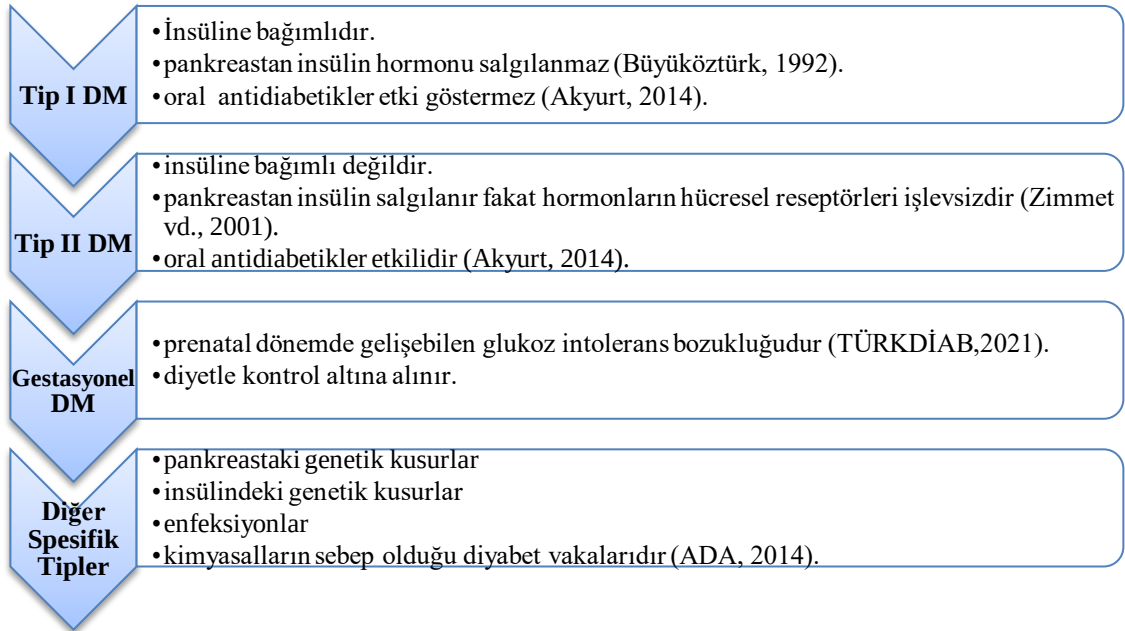
Diabetes mellitus (DM); pankreastan salgılanmakta olan insülin hormonunun üretilmemesi sonucu veya üretilen insülinin vücut tarafından kullanılmadığı durumlarda ortaya çıkan kronik bir hastalıktır (IDF, 2022).

Akıp gitmek anlamını taşıyan “diyabet” terimi ilk kez M.S.200 yıllarında Kapadokyalı Arateus tarafından kullanılmış olup sık idrara çıkma durumu tanımlanmıştır. Bal gibi tatlı anlamında “mellitus” kelimesi M.S.600 yıllarında Sanskritçe literatürde tanımlanmış olup aşırı idrara çıkma ile tatlı idrar arasındaki ilişki tanımlanmıştır. 1921 yılında Banting ve McLead tarafından DM tedavisi için terapötik insülin geliştirilmiştir ve 1923 yılında bu gelişim sayesinde Nobel ödülü almışlardır (TÜSEB, 2022).

Diabetes mellitus, sıklıkla diyabet olarak adlandırılan, genellikle kalıtsal ve çevresel etkenlerin birleşimiyle oluşan ve kan glukoz seviyesinin aşırı derecede yükselmesiyle (hiperglisemi) sonuçlanan metabolik bir bozukluktur (Giugliano vd., 2008). Pankreas yeterince insülin üretmediğinde veya vücut ürettiği insülini etkili bir şekilde kullanamadığında ortaya çıkar. İnsülin, kan şekerini düzenleyen bir hormondur (Powers ve D’alessio, 2011).

Diyabet körlük, böbrek yetmezliği, kalp krizi ve felcin başlıca nedenleri arasındadır. Diyabet, dünya liderlerinin eyleme geçmesi için hedeflenen bulaşıcı olmayan öncelikli hastalıktan biri olan önemli bir halk sağlığı sorunudur. Hem vaka sayısı hem de diyabet prevalansı son on yılda giderek artmaktadır (Roglic, 2016). 2014 yılında, 18 yaş ve üstü yetişkinlerin % 8.5’i diyabet hastasıyken, 2019’da diyabet 1.5 milyon ölümün doğrudan nedeni olduğu bildirilmiştir (WHO, 2021).

Diyabet hastalığının tanımlandığı tarihten bu zamana kadar bilim insanlarının yaptığı araştırmalar sonucu değişik sınıflandırmalar ortaya çıkmıştır. WHO ve ADA bu sınıflandırmaları 4 başlık altında düzenlemektedir. Bu başlıklar; Tip I DM, Tip II DM, Gestasyonel DM ve diğer spesifik tipler olarak belirlenmiştir (ADA, 2018; Gavin, 1998)



Şekil 1. Diyabetin sınıflandırılması

Hastalıkların patogenezelelerine bakan araştırmacılar oksidatif stresin ne kadar etkili olduğunu göstermişlerdir. Bu bilgiler sayesinde oksidatif stresin diyabet hastalığına yol açtığı veya diyabet hastalığının oksidatif strese yol açtığı söylenebilmektedir.

Yapılan çalışmalarda deneysel olarak diyabet oluşturulan ratlarda ve diyabetik hastalarda serbest oksijen radikallerinin ve lipid peroksidasyonun önemli derecede arttığı ve oksidatif stresin diyabet etiyolojisinde ve ilerlemesinde rolü olduğu bildirilmiştir. Bunlara ilave olarak, uzamış oksidatif stresin ve antioksidan kapasitede görülen değişikliklerin, diyabetin kronik komplikasyonlarının ortaya çıkışı ile de ilişkili olabileceği araştırmacılar tarafından vurgulanmaktadır (Pitkanen vd, 1992).

Süperoksit dismutaz, katalaz, glutatyon peroksidaz gibi antioksidan enzimlerin ekspresyonlarının ve antioksidan kapasitenin pankreas adacık hücrelerinde, karaciğer, böbrek, iskelet kası ve adipoz doku gibi diğer dokularla kıyaslandığında en düşük düzeyde olduğu bilinmektedir. Oksidatif strese en duyarlı yapılardan biri olduğu da bilinen beta hücrelerinde gözlenen hasarın hipergliseminin toksik etkilerinden kaynaklandığı düşünülmektedir (Tiedge, 1997; Robertson, 2004).

Tip I DM'li bireylere dışarıdan insülin enjeksiyon şeklinde verilerek glukozun hücre içine girişi sağlanmış olup karbohidrat, protein, yağ metabolizması düzenlenir. Bu tedavinin yanında tıbbi beslenme şekli ve egzersiz içeren bir yaşam tarzı ile desteklenir (ADA,2018)

Tip II DM'li bireylere beslenme ve egzersiz içerikli yaşam tarzı önerilmekte olup farmakolojik ilaçlarla iyileştirme desteklenmektedir (Türkiye Endokrinoloji ve Metabolizma Derneği, 2019).

Kullanılmakta olan ilaçlar

>>İnsülin salgılatıcılar

>>İnsülin duyarlılaştırıcılar

>> α - glukozidaz inhibitörleri

>>insülinomimetikler

>>sodyum glukoz transporter inhibitörleridir.

Enzimler canlı metabolizmada birçok reaksiyonun meydana gelmesinde ve bunun sonucunda istenilen ürünün oluşmasında görev alan geneli protein yapıda biyolojik katalizörlerdir. Enzimlerin aktivitelerini yerine getiremediği durumlarda biyolojik olaylar aksar ve canlı hayatı tehlikeye girer. Bir enzimin eksikliği veya aktif olamaması durumu vücutta zararlı sonuçlara neden olacağı gibi aktivitesi çok yüksek olan enzimlerde zararlı sonuçlara neden olmaktadır (Price, 1982).

Tip II Diyabet için etkin tedavi yöntemlerinden biri α -glukozidaz enziminin inhibisyonudur. α -glukozidaz enzimleri ince bağırsakta lümene bakan fırçamsı yüzeyde bulunmaktadır ve karbohidratların parçalanmasından sorumludur. Bu enzim oligo ve disakkaritleri monosakkaritlere kadar parçalar. Monosakkarit olan glukoz bağırsak epitelinden kolayca geçip kana karışır. Böylelikle kandaki glukoz seviyesi artar. Bu geçişi kontrol altında tutmak için bu enzimin çalışma hızını azaltmak esastır. α -glukozidaz enzim inhibitörleri bu enzimleri yarışmalı olarak inhibe ederler.

α -glukozidaz inhibitörleri, kilo aldırmadan glisemik kontrolü sağlayabilmekte ve genellikle hipoglisemiye yol açmamaktadır. Yapılan çalışmalar, α -glukozidaz inhibitörlerinin tokluk plazma glukoz seviyelerini 40-60 mg/dL (2.2-3.3 mmol/L), açlık plazma glukoz seviyelerini 20-30 mg/dL (1.1-1.7 mmol/L) ve HbA1c seviyelerini de %0.5-1.0 azalttığını göstermiştir (Mayerson ve Inzucchi, 2015).

1.3.3. Fitokimyasalların Antimikrobiyal Etkileri

Bulaşıcı hastalıklara sebep olan bakteri, mantar, virüs ve parazitlere karşı sürekli yeni antibiyotikler geliştirilmeye çalışılmaktadır. Her geliştirilen antibiyotiğe karşı

mikroorganizmaların direnç göstermesi uzun sürmemektedir. Son yıllarda sentetik antimikrobiyal ilaçların bilinçsiz tüketimi ve mikroorganizmaların gösterdiği direnç araştırmacıları yeni doğal bileşikler bulmaya yöneltmiştir (Baydar, 2009).

Sekonder metabolit olan fenolik bileşikler, fenolik asitler, karetonoidler, terpenoidler, alkaloidler, glikozidler ve yağlar antimikrobiyal aktivite göstermektedir. Antimikrobiyal aktivite; mikroorganizmaların çoğalmalarının durdurulmasını veya öldürülmelerini sağlayacak özelliklere sahip olmasıyla gözlenmektedir. Bitkilerde kendilerini mikrobiyal enfeksiyonlardan korumak için bileşikler üretir (Cowan, 1999).

Staphylococcus aureus: Doğada oldukça yaygın bulunur. Toprakta, tozda, insan ve hayvan derisi, burun mukozası, ağız ve nazofarinks floralarında bulunurlar. İnsanlarda en sık rastlanan enfeksiyon etmenlerinden biridir (Bilgehan, 1995). *S. aureus*, birçok organda apse, sivilce, endokardit, perikardit, gastroenterit (gıda zehirlenmesi), toksik şok sendromu, soyulmuş deri sendromu, hastaneden alınmış zatürree, cerrahi yara enfeksiyonları, artritis, menenjit, sepsis gibi hastalıklara neden olmaktadır (Dündar ve Öztürk, 2002). *S. aureus* tüm dünyada toplum ve hastane kaynaklı enfeksiyonlara neden olan en önemli bakterilerden biridir.

Enterococcus faecalis: İnsan gastrointestinal sistem normal flora mikroorganizmalarıdır. Ağız, safra yolları ve genitoüriner sistemde üredikleride bilinmektedir. Enterokoklar üriner sistem enfeksiyonları, endokardit, karın içi enfeksiyonları, menenjit, yara ve yumuşak doku enfeksiyonları gibi hastalıklara yol açmaktadırlar. Enterokokların neden olduğu en sık görülen klinik hastalık üriner sistem enfeksiyonlarıdır (Yıldırım, 2007).

Escherichia coli: Normalde insan ve çoğu sıcakkanlı hayvanların bağırsak florasında bulunmaktadırlar. *E. coli* insanların bağırsak epiteline bağlanarak verotoksin olarak da bilinen Shiga toksini üretmesi ile insanlar için patojen olup hastalıklara neden olmaktadır. Genel olarak çocuklarda zatürre, menenjit, dizanteri, böbrek ve mesane enfeksiyonları, diyare, cerrahi yara enfeksiyonları, septisemi hastalıklarına neden olmaktadır (Ekici vd., 2008). Bağırsak dışına çıkıp diğer dokulara yerleşmeleri ile de hastalıklara yol açtığı bilinmektedir. Hastane enfeksiyonlarının %50'sinden sorumlu olduğu bildirilmektedir. Normal yaşam ortamları insan ve hayvan bağırsak florası olduğundan *E. coli*, içme ve kullanma sularının ve besinlerin fekal kirlenmesinin bir göstergesi olarak kullanılmaktadır (Baysal, 2004a).

Salmonella typhimurium: Genellikle kontamine olmuş gıda ve sularla ağız yolundan insanlara bulaşmaktadırlar. *S. typhimurium*'un neden olduğu en ciddi hastalık tifodur. Bunun dışında besin zehirlenmesi, sepsis ve lokal organ hastalıklarına yol

açmaktadırlar. Et, süt, yumurta, su ve bu besinlerle yapılan yiyeceklere bakterilerin bulaşması sonucu besin zehirlenmeleri meydana gelmektedir. Bakterinin vücuda alımından sonra bağırsaktan hızla kana karışması ile de diğer enfeksiyonlara yol açmaktadır (Baysal, 2004b; Ekici vd., 2008).

1.4. Pinus Türleri

İğne yapraklı bir ağaç türü olan çam ağacı, botanik olarak *Pinaceae* familyasından *Pinus* cinsi olarak sınıflandırılmaktadır. *Pinus*, yaygın olarak bilinen 100'den fazla türle, mevcut en geniş kozalaklı ağaç cinsidir (Kivrak vd., 2013). Dünya üzerinde neredeyse tüm ülkelerde yetişme alanı bulmuş en geniş kapsamlı ağaç türlerinden bir tanesidir. Kuzey Amerika, Avrupa ve Asya'da geniş yayılım gösterir. Çam ağaçları ülkemizde de geniş yayılım göstermektedir. Türkiye'de pek çok çam türü olmakla birlikte doğal olarak beş farklı türü yetişmektedir. Bunlar; kızılçam (*Pinus brutia*), karaçam (*Pinus nigra*), sarıçam (*Pinus sylvestris*), fıstıkçamı (*Pinus pinea*) ve Halepçamı (*Pinus halepensis*) dır (Tomba, 2008).

Ülkemizde *pinus sylvestris* (sarıçam) Kuzey Anadolu'nun iç kesimlerinde, *pinus nigra* (karaçam) Trakya, Karadeniz (Doğu Karadeniz hariç), Ege, Marmara, İç ve Doğu Anadolu Bölgesi'nde, kızılçam Akdeniz, Ege ve Marmara Bölgesi'nde, fıstık çamı Ege ve Akdeniz sahillerinde, Halep çamı Akdeniz Bölgesi'nde yayılım göstermektedir. (Çolak vd., 2012; Turgut, 2016; Kuzugudenli, 2018; Akkuş, 2013; Alptekin, 1990).

Dünya genelinde geleneksel halk ilaçlarında en çok kullanılan çam türleri arasında *Pinus pinaster*, *Pinus sylvestris*, *Pinus brutia*, *Pinus pinea*, *Pinus koraiensis*, *Pinus maritima*, *Pinus eldarica* ve *Pinus nigra* gibi beslenme ve tıbbi amaçlar için kullanılan başlıca türler vardır.

Dünyada olduğu gibi ülkemizde de benzer şekilde geleneksel tıptan faydalanılmaktadır ve çam türleri araştırmacıların ilgisini çekmeye başlamaktadır.

Bu tez kapsamında materyal olarak *pinus sylvestris*, *pinus nigra* ve *pinus brutia* türleri kullanılmıştır.

1.4.1. *Pinus Sylvestris*



Şekil 2. *Pinus sylvestris* – Sarıçam

Pinus sylvestris (Şekil 2), batıda Britanya Adaları'ndan doğuda Sibirya taygasına kadar uzanan dünyanın en yaygın ve kuzey kozalaklı ağaçlarından biridir. Güney Avrupa'daki Akdeniz yarımadalarının dağlık bölgelerinde de bulunur. Özellikle fakir topraklarda ve kuru ve aşırı soğuk ortamlarda rekabet edebilir ve diğer pek çok *Pinus* ile karşılaştırıldığında ekolojik nişi geniştir (Piechowiak vd., 2023).

Sarıçam, Avrasya'da farklı iklim koşullarına sahip geniş alanları işgal eden kuzey yarımkürenin ekonomik açıdan çok önemli ve bilimsel olarak iyi araştırılmış bir ağaç türüdür (Krakau vd., 2013).

1.4.2. *Pinus Nigra*



Şekil 3. *Pinus nigra* – Karaçam

Çamgiller familyasına ait *Pinus nigra* (Şekil 3), Güney Avrupa'da ve genel olarak Akdeniz Bölgesi'nde ekonomik açıdan en önemli yerli kozalaklı ağaçlardan biridir. Karaçamın doğal yayılış alanı Fas, Cezayir, Tunus, İspanya, Güney Fransa, İtalya'ya kadar uzanır ve Avusturya'dan Balkan Yarımadası'na, Türkiye ve Kırım'a, Karadeniz'in Kafkas kıyılarında ve Akdeniz adalarında münferit yayılışı bildirilmiştir (Isajev vd., 2004). Ülkemizde, Anadolu'nun batı ve güney bölgelerinde, özellikle Toros Dağları'nda yetişir (Gülçin vd., 2003).

1.4.3. *Pinus Brutia*



Şekil 4. *Pinus brutia* – Kızılçam

Kızılçam (*Pinus brutia*) (Şekil 4), Halep çamı (*Pinus halepensis*) ile birlikte büyük ormanlar oluşturan Akdeniz Havzası'na özgü bir çam türüdür. Bununla birlikte, *Pinus brutia* *Pinus halepensis*'ten daha kısıtlı bir yayılış alanına ve daha doğuya doğru bir dağılıma sahiptir. Doğu Akdeniz bölgesindeki doğal habitatında *Pinus brutia*, Güney Ege (Sakız, Sisam, Rodos ve Girit adalarında), Kırım, K. Irak, B. Suriye, Lübnan, Güney Türkiye (Toros dağları), Kıbrıs ve Yunanistan'da yetişir (Abdullah vd., 1989).

Pinus brutia, Doğu Akdeniz Bölgesi'nde doğal olarak yayılış gösteren en önemli kereste ağaçlarından biridir. Kabuk, olgun ağaçların odunlarının endüstriyel olarak sahip oldukları alanlardan ve hala işe yaramayan ve atılan ana atıktır, ancak birçok biyoaktif bileşiği barındırır (Cretu vd., 2013).

1.4.4. *Pinus* Türlerinin Fitokimyasal Açıdan Değerlendirilmesi

Çamlar, kereste, odun hamuru, terebentin ve tüm dünyada yenilebilir tohumları (çam fıstığı) ve yaprakları 2-5 iğne içeren kümeler halinde yaprak dökmeyen ağaçlar

için değer verilen endüstriyel açıdan en önemli ağaç türlerinden biridir (Ustun vd., 2012). am (*Pinus*) türleri polifenol denilen biyoaktif bileşikler bakımından zengindir. Polifenoller am kabuğu, am yaprakları ve am kozalaklarında bulunur (Ugartondo vd., 2007). Bu içerikleri sayesinde tıbbi özellikleri de mevcuttur. Yapılan çalışmalarda am polifenollerinin anti-tümör (Yi vd., 2017), antibakteriyel (Frontela-Saseta vd., 2011), anti-inflamatuar (Frontela-Saseta vd., 2013), antidiyabetik (Nocun vd., 2008) ve antioksidan (Cretu vd., 2013; Poussard vd., 2013) vb. biyolojik etkileri rapor edilmiştir (Shao vd., 2018).

Pinus pinaster kabuklarından elde edilen ekstraktların halk arasında kullanıldığı ve günümüzde ticarileşmiş (piknogenol) ürünü olduğu bilinmektedir (Ertop ve İncemehmetoğlu, 2022).

Pinus türlerinin yapraklarındaki esansın ve reçinesinin (terebentin) öksürüğü kesme özelliği bulunur, balgamı söktürür, akciğer hastalıklarında tedavi edici etkiye sahiptir. Terebentin pek çok tıbbi ilacın bileşiminde kullanılır. Terebentin, romatizmal bozuklukların ve kas ağrısının tedavisi için öncelikle topikal karşı tahriş edici maddeler olarak iyileştirici kullanımı konusunda da uzun bir geçmişe sahip olduğu bilinmektedir (Ustun vd., 2012). Güzel kokusu olduğu için parfüm yapımında da kullanılmaktadır. Bunların yanı sıra am balından da yararlanılır. am balı öncelikle Akdeniz ve Ege bölgelerinde üretilir. Arıların am ağaçlarının üzerinde oluşan reçineleri işleyerek elde ettikleri salgı balı türüdür. am balının sindirim sistemine ve solunum yollarına olumlu etki ve faydaları tıpta kabul görmüştür. Ayrıca haricen yara iyileştirici, antimikrobiyal ve antiromatizmal olarak da faydalanılır (Turgut, 2016; Sharma vd., 2015).

am ağacının en bilinen özelliklerinden biri de kozalaklara sahip olmasıdır. Çoğu zaman yakacak ve süs olarak kullanılan bu kozalaklar, günümüzde tıbbi amaçlı olarak da değerlendirilir. am kozalağının bağışıklık sistemini güçlendiren, antioksidan kaynağı olmasından dolayı vücudu toksinlerden arındırmaktadır. am kozalağında bulunan yağlar yani fitonitler anti-inflamatuar özelliklere sahiptir. Bu sayede vücudu enfeksiyonlara karşı daha dirençli hale getirmektedir. Bağışıklık sistemini güçlendirir. Genç am kozalakları gastrit ve ülser ağrılarını hafifletmek için kullanılır. Mide sorunlarına yardımcı olur. am kozalaklarının proteinler, polisakkaritler ve polifenoller gibi biyoaktif maddeler açısından zengin olduğu ve bunların hepsinin insan fizyolojisi için faydalı olduğu kanıtlanmıştır. am kozalaklarında bulunan tanenler, karaciğerin toksinleri atık ürünlere dönüştürmesine ve kanı temizlemesine yardımcı olmaktadır (Wang vd., 2019).

Çam kozalakları bağışıklık sistemini güçlendirir, antikanserojen ve güçlü bir antioksidan kaynağıdır (Yi vd., 2017). Çam kozalaklarından hazırlanan çam kozalağı şurubu ülkemizin farklı yörelerinde takviye amaçlı olarak özellikle mevsim geçişlerinde sıkça görülen grip, faranjit, bronşit gibi solunum yolu hastalıklarının tedavi edilmesinde kullanılmaktadır.

Sarıçam, sürgünleri ve yaprakları yüksek biyoaktif bileşik içeriği ile karakterize edilen, yüksek ekonomik öneme sahip uzun ömürlü iğne yapraklı bir ağaç olup ve geleneksel olarak tedavi edici özelliklere sahip olduğu düşünülen likör, merhem ve şurup üretmek için kullanılmıştır (Baczek vd., 2017). *Pinus sylvestris* kabuğundan elde edilen ekstraktlar, AAPH ve DPPH testlerinde antioksidan aktivitenin yanı sıra indirgeme ve metal şelatlama özellikleri göstermiştir (Nazari vd., 2013; Sokol-Letowska vd., 2007). Bu ağaçların sürgünlerinin ve yapraklarının, diğerlerinin yanı sıra, güçlü antibakteriyel sergileyen, monoterpenler, yani alfa-pinen, beta-pinen, delta3-karen, beta-mirsen, limonen, p-simen gibi uçucu yağlar içerdiği, antifungal, antiviral ve antioksidatif özelliklere sahip olduğu rapor edilmiştir (Acs vd., 2018). Ekstraktlar aynı zamanda kemopreventif veya kemoterapötik ajan olarak terapötik potansiyel sergilemektedir (Dziedzinski vd., 2020).

Pinus sylvestris L.'nin genç çam sürgünlerinin iyi bir antioksidan kaynağı olduğu bulunmuştur (Dziedzinski vd., 2020). Geleneksel tıpta genç çam filizleri, terapötik ve aromatik özellikleri nedeniyle değerlidir. Geçmişten bugüne tentürler, şuruplar, özler, uçucu yağlar yapmak için kullanılmaktadır. Ayrıca bitki çaylarının yapımında da kullanılırlar. *P. sylvestris* sürgünleri, iyi bir askorbik asit, polifenolik bileşikler, özellikle kafeik asit, ferulik asit ve klorojenik asit ve ayrıca uçucu bileşikler, yani alfa ve beta-pinen, beta-fellandren, ocimene, myrcene, camphene, sabinene ve carene bileşiklerini içerir (Piechowiak vd., 2023).

Pycnogenol®, Fransız deniz çamının (*Pinus pinaster*/*P. maritima*) kabuğundan hazırlanan standardize edilmiş bir ekstrattır. Pycnogenol prosiyanidinleri, kateşin ve epikateşin oligomerleri, monomerik kateşin ve epikateşin, taksifolin ve fenolik asitler içerir (Cretu vd., 2013).

Pinus koraiensis, *Pinus* cinsine ait bir başka çam türüdür. Sekonder bitki metabolitleri olan çam polifenolleri, *P. koraiensis*'in beslenme niteliklerinin önemli belirleyicileridir. Çam polifenolleri, antioksidan, anti-tümör, anti-mikrobiyal özellikler gibi biyolojik aktiviteleri nedeniyle birçok biyoloğun ilgisini çekmektedir (Yi vd., 2015). Ayrıca, *P. koraiensis* çam kozalağı, zengin bir polifenol bileşikleri kaynağı olma potansiyeli nedeniyle kısmen incelenmiştir (Zou vd., 2013).

Pinus brutia kabuk ekstraktlarında taksifolin izomerleri, kateşinler ve prosiyanidinler türlerinin bulunduğu bildirilmiştir. Ayrıca, kabuk ekstraktlarının belirli insan kanser hücre dizilerine karşı orta dereceli sitotoksik etkiler ve antiinflamatuvar etkiler gösterdiği bildirilmiştir (Cretu vd., 2013).

Literatürde, bitki özlerinin polifenol içeriği ve antioksidan etkileri hakkındaki çokça çalışma mevcuttur. Bu bağlamda *P. brutia* kabuğu ekstraktlarında ortaya çıkan antioksidan aktivitenin hem terapötik hem de ekonomik öneme sahiptir. Ekstraktlarının, çok güçlü bir antioksidan etkiler gösterdiği bulunmuştur (Cretu vd., 2013). Ayrıca, *P. pinaster* ve *P. radiata* kabuklarından elde edilen ekstraktların, insanlar üzerinde yapılan araştırmalarda güvenli kabul edilerek toksik etkisinin olmadığı bildirilmiştir (Frevel vd., 2012).

Pinus nigra odun özü, bugüne kadar tanımlanmış en zengin pinosilvin ve pinosilvin monometil eter kaynağı olarak bildirilmiştir. Bu içeriği sayesinde biyoaktif özütlerin üretimi için iyi bir doğal kaynağıdır. Pinosilvin antibakteriyel, antifungal, antioksidan, antimetastatik ve potansiyel kanser kemopreventif aktiviteye sahip fenolik bir maddedir ve aynı zamanda potansiyel olarak kardiyovasküler koruyucu bir ajan olarak kabul edilir (Ioannidis vd., 2017). *Pinus nigra* içerisindeki terebentin, solunum sistemi ve idrar yolu hastalıkları üzerindeki antiseptik etkilerinden dolayı Türk halk hekimliğinde birkaç yıldır kullanılmaktadır. Ayrıca sırt ağrılarında reçineli alçı, mide, dermatolojik ve analjezik ilaçlar olarak kullanılmaktadır (Gülçin vd., 2003).

P. brutia'nın kabuğu, oldukça yüksek miktarlarda taksifolin içerir. Taksifolin bitkilerde sekonder metabolit olarak görev yapan güçlü bir flavonoiddir. Literatürde farmakolojik olarak antibakteriyel, antifungal, antiinflamatuvar etkilere sahip olduğu bildirilmiştir (Yesil-Celiktas vd., 2009).

2. MATERYAL VE YÖNTEMLER

2.1. Kullanılan Cihazlar

Deneyisel çalışmaların büyük çoğunluğu Gümüşhane Üniversitesi Sağlık Bilimleri Fakültesi Beslenme ve Diyetetik Bölümü laboratuvarlarında gerçekleştirilmiştir. LC-MS/MS analizi hizmet alımı karşılığında TÜBİTAK-MAM tarafından gerçekleştirilmiştir.

Tablo 3. Kullanılan Cihaz ve Markaları

Cihaz Adı	Markası
LC-MS/MS (Sıvı Kromatografi-Kütle Spektrometresi)	Agilent 1260 Series LC Agilent 6460Triple Quad MS Jet Stream
Kolon	Eclipse Plus Phenyl Hexyl (4.6*150mm 3.5µm)
UV-vis Spektrofotometre	Shimadzu UV-1800, Japan
pH metre	Hanna pH 211
Analitik terazi	Ohaus, Pioneer TM Balances, PA214C, Parsippany, NJ, USA.
Vorteks karıştırıcı	IKA® Works, MS1 Mini-shaker vortex, Inc., USA.
Santrifüj	Centurion Scientific K2015R, UK
Isıticılı manyetik karıştırıcı	Wisestir, SMSH-6, Daihan
Otomatik mikropipet	Eppendorf, Research Plus, Germany
Buzdolabı (+4,-20 °C)	Arçelik
Etüv	Elektromag M6040-P
Set üstü ocak	Naturel NT-102
Saf su cihazı	GLF, 2001/4 Mono Distile Saf Su Cihazı

Bunların yanı sıra analizlerde; plastik ve kuvarz yarı mikro (Isolab, Germany) spektrofotometre küvetleri, makro ve mikro santrifüj tüpleri (Isolab, Germany), filtre kağıtları (Sartorius stedim, grade:391), deney tüpleri ve diğer malzemeler (mezür, beher, erlen, huni, spatül vb.) kullanılmıştır.

2.2. Kullanılan Kimyasallar

Deneyisel çalışmalarda kullanılan kimyasallar Gümüşhane Üniversitesi Bilimsel Araştırmalar Proje Koordinatörlüğünce desteklenmiş projeden temin edilmiştir.

Analizlerde kullanılan çözücüler ve kimyasallar analitik saflıkta olup Tablo 4'te ismi geçen firmalardan satın alınmıştır.

Tablo 4. Kullanılan kimyasallar

Kimyasal Adı	İngilizce literatür	Satın Alınan Firma
Folin-Ciocalteu reaktifi	Folin-Ciocalteu's phenol reagent	Sigma/ Merck
Gallik Asit	Gallic acid	Sigma
Metanol	Methanol	Sigma
Na ₂ CO ₃	Sodium Carbonate	J.T. Baker
Kateşin	Catechin Hydrate	Sigma
NaNO ₂	Sodium Nitrite	Sigma
AlCl ₃	Aluminum Chloride	Fluka Analytical
NaOH	Sodium Hydroxide	Merck
ABTS	2,2'-Azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) diammonium salt	Sigma
Potasyum persülfat	Potassium Persulfate	Acros Organics
Etanol	Ethanol	Isolab
Troloks	6-Hydroxy-2,5,7,8-tetramethyl-chromane-2-carboxylic acid	Sigma
DPPH	2,2- diphenyl-1-picrylhydrazil	Sigma
α - tokoferol	α -tocopherol	Sigma
CuCl ₂	Copper (II) chloride dihydrate	Sigma
Neocuproine	hemihydrate	Sigma
NH ₄ Ac	Ammonium acetate	Sigma
Askorbik asit	L-Ascorbic acid	Sigma
Asetat tamponu	NH ₄ Ac	Sigma
FeCl ₃	Iron (III) chloride	Merck
TPTZ	2,4,6- Tris(2- pyridyl)-s-triazin	Fluka
Sodyum fosfat tamponu	Sodium Phosphate Buffer	Sigma
α -glikozidaz enzimi	α -glucosidase enzyme from saccharomyces cerevisiae	Sigma
PNPG substratı	P- nitrophenyl-a-D-glucopyranoside	Sigma

2.3. Kozalak Şurubu Elde Edilişi

2.3.1. Kozalakların Toplanması

Çam kozalakları ülkemizin farklı yörelerinden ve farklı çam türlerinden olmak üzere toplanmış olup koordinatları Tablo 5'te ve görselleri Şekil 5'tedir.

Tablo 5. Çam kozalaklarının toplandığı yer ve koordinatlar

Kozalak Türleri	Yer	Koordinat
Sarıçam- <i>Pinus sylvestris</i>	Gümüşhane/Zigana	40°37'17'' N 39°24'8'' E
Karaçam- <i>Pinus nigra</i>	İstanbul/Sarıyer	41°8'7'' N 29°34'49'' E
Kızılçam- <i>Pinus brutia</i>	Denizli/Kale	37°28'33'' N 28°48'13'' E



Şekil 5. Çam kozalaklarının görüntüsü (Görseldeki kozalaklar soldan sağa kızılçam, karaçam, sarıçam)

2.3.2. Şurup Tarifi

Öncelikle her bir kozalak türünden (sarıçam, karaçam, kızılçam) analitik terazide yaklaşık 250'şer gram tartıldı. Kozalaklar temiz fırça yardımıyla tek tek iyice yıkanarak üzerindeki yapışkan toz ve kirlerden temizlendi. Ardından kozalaklar derin bir kaba alınarak üzerini geçecek kadar bol su içerisinde 1 gün bekletildi.

Ertesi gün kozalakların suyu süzülerek başka tencerelelere alındı ve her bir kozalak üzerine küçük çekiç yardımıyla yarıklar açıldı. Kozalakların üzerlerine içme suyu koyularak bir taşım (5-10 dk) kaynatıldı. Bu sırada oluşan tortular bir kaşık yardımıyla ara ara atıldı. Bu şekilde kozalaklar istenmeyen tüm kirlerinden arındırıldı. 10 dk sonunda süzgece alınarak ilk kaynama suyu döküldü. Hafif haşlanmış haldeki kozalaklar yine tencereye aktarıldı. Kozalakların üzerlerini kapatacak kadar su ısıtıcısında kaynatılmış içme suyu eklendi ve tekrar kaynamaya bırakıldı. Su kaynamaya başlayınca tencerelerin kapakları yarım açık kalacak şekilde kapatıldı, ocağın altı da en kısığa getirildi (Şekil 6).



Şekil 6. Kozalakların pişirme esnasındaki görüntüsü (Görseldeki dizilim yukarıdan aşağıya sarıçam, kızılçam, karaçam)

Bu şekilde 2 saat boyunca (kozalaklar tamamen yumuşayana dek) çam kozalakları ağır ağır pişmeye bırakıldı. Ara ara kozalaklar kontrol edilerek ters düz edildi. Pişerken üzerinde oluşan köpüklenmeler kaşık yardımıyla toplanarak atıldı. İstenilen kıvamı almaya başladığında biraz daha karıştırıp ocakta her bir tencerenin altı kapatıldı. Tencerelerdeki karışımlar oda sıcaklığına gelene dek bekletildi. Oda sıcaklığına geldiğinde süzgeç ve tülbent kullanılarak her bir karışım süzüldü (Şekil 7). Kozalaklar süzgeç içerisinde bir süre bekletildi (Şekil 7). Ardından kozalak şurupları 50 mL'lik santrifüj tüplerine aktararak 5000 rpm'de 5 dk santrifüj yapıldı ve filtre kağıdından geçirildikten sonra son hacim mezürde 100 mL'ye tamamlandı. Buzdolabına kaldırıldı. Analizlerde kullanılmadan önce şırınga filtresinden (0.45 μ m, NY) geçirildi.



Şekil 7. Kozalak şuruplarının süzülme aşaması

2.4. Kozalak Şuruplarında Toplam Kuru Madde Tayini

Toplam kuru madde tayini için etüvde kurutma yöntemi kullanıldı. Öncelikle kuru madde tayininde kullanılacak olan kurutma kapları (petri kapları) 105°C'lik etüvde sabit tartıma getirildi. Desikatörde soğutulduktan sonra darası alındı. Darası alınmış kaplara kozalak şurubu numunelerinden 5'er mL pipetlenerek tartıldı. Ardından 60°C'lik etüvde kurumaya bırakıldı, 30 dk aralıklarla numuneler etüvden çıkarılarak desikatörde oda sıcaklığına gelinceye dek (yaklaşık 30 dk) bekletildi ve tartım yapıldı. Bu işlem, son iki tartımda değişiklik olmayana dek tekrarlandı. Son olarak numune kurutma kaplarının darası çıkarılarak toplam kuru madde miktarları hesaplandı. Bu hesaplama yapılırken sabit tartıma gelmiş numune kurutma kaplarından kurutma kaplarının darası çıkarılmıştır. Her bir kozalak şurubu numunesi iki paralel çalışılmıştır.

2.5. Toplam Fenolik Madde Miktarı Tayini

Slinkard ve Singleton (1977) tarafından geliştirilen ve Folin-Ciocalteu yöntemi olarak da bilinen yöntem kullanılmıştır. Bu yöntem, suda ve organik çözücülerde çözünmüş olan fenolik bileşiklerin Folin reaktifi ile alkali ortamda renkli kompleks oluşturması esasına dayanır. Mor-menekşe renkli bu kompleks 765 nm'de maksimum absorbans oluşturur.

Standart olarak gallik asit kullanılmış olup kalibrasyon grafiğini oluşturmak için 62.5, 125, 250, 500, 750, 1000 µg/mL konsantrasyonlarda gallik asit (metanolde) çözeltileri hazırlandı.

Numunelerdeki fenolik miktarını bulmak için 1:20 seyreltilmiş numunelerden tüplere 100 µl koyularak üzerine 500 µl 0.2 N Folin-Ciocalteu eklenerek vortekslenip 5 dk karanlıkta bekletildi. Sürenin bitiminde 400 µl %7.5'lik Na₂CO₃ çözeltisi eklenip vortekslendi ve 4000 µl saf su eklenip hacim 5000 µl ye tamamlandı. Vortekslenip iyice karışması sağlandı ve 60 dk karanlıkta bekletilip 765 nm dalgaboyunda absorbans okuması yapıldı. Deneyler 3 paralel çalışılarak sonuçların ortalaması alındı.

2.6. Toplam Flavonoid Madde Miktarı Tayini

Numunelerdeki toplam flavonoid miktarı Chang ve arkadaşlarının kullandığı yöntemle belirlenmiştir (Chang vd., 2006).

Standart olarak kateşin kullanılmış olup kalibrasyon grafiğini oluşturmak için 20, 40, 60, 80, 100, 200, 400 µg/mL konsantrasyonlarda kateşin (metanolde) çözeltileri hazırlandı.

Numunelerdeki flavonoid miktarını bulmak için 1:20 seyreltilmiş numunelerden tüplere 250 µl koyularak üzerine sırasıyla 1250 µl saf su ve 75 µl %5'lik NaNO₂ eklenerek vortekslenip 6 dk karanlıkta bekletildi. Sürenin bitiminde 150 µl AlCl₃ tüplere ilave edilip vortekslenip 5 dk daha karanlıkta beklemeye alındı. Sonra 500 µl 1M NaOH eklenip 275 µl su ilave edildi, hacim 2500 µl ye tamamlandı. Vorteksle iyice karışması sağlandı ve 3 dk bekletip 510 nm dalga boyunda absorbans okundu. Deneyler 3 paralel çalışılarak sonuçların ortalaması alındı.

2.7. Antioksidan Kapasite Analizi

2.7.1. ABTS•⁺ Analizi

Re vd. (1999) tarafından geliştirilen ABTS•⁺ radikali giderme aktivitesi belirleme yöntemi modifiye edilerek kullanıldı.

Stok ABTS•⁺ solüsyonu 7 mM ABTS•⁺ radikal katyon solüsyonunun 2.45 mM potasyum persülfat solüsyonu ile karıştırılmasıyla hazırlandı ve karanlıkta oda sıcaklığında 16-20 saat bekletildi. Daha sonra mavi-yeşil çözeltinin absorbansı 734 nm'de 0.70 (± 0.02) AU'ya ayarlanana kadar %70 etanolle seyreltildi.

Standart olarak troloks kullanılmış olup kalibrasyon grafiğini oluşturmak için 50, 100, 200, 300, 400, 500, 750, 1000 µg/mL konsantrasyonlarda Troloks® (etanolde) çözeltileri hazırlandı.

Numunelerin ABTS•⁺ radikalini giderme aktivitesini bulmak için 1:20, 1:30, 1:50, 1:100, 1:200, 1:300 seyreltilmiş numunelerden tüplere 50 µl koyularak üzerine 1950 µl ABTS çözeltisi eklenerek vortekslenip 6 dk karanlıkta bekletildi. Sürenin bitiminde 734 nm dalgaboyunda absorbans okuması yapıldı. Deneyler 3 paralel çalışılarak sonuçların ortalaması alındı.

ABTS•⁺ radikali giderme aktivitesi % inhibisyon ve µM Troloks® eşdeğeri antioksidan kapasite (TEAC) olarak ifade edilmiştir. Bu yöntemde, artan absorbans değeri, azalan antioksidan aktiviteyi gösterir.

2.7.2. DPPH• Analizi

Brand-Williams vd. (1995) tarafından geliştirilen yöntem modifiye edilerek kullanıldı. 2,2-difenil-1-pikrilhidrazil (DPPH•), azot radikali olup antioksidan molekülle reaksiyona girdiğinde indirgenir.

Standart olarak Troloks® ve α-tokoferol kullanılmış olup kalibrasyon grafiğini oluşturmak için 62.5, 125, 250, 500, 750 µg/mL konsantrasyonlarda Troloks® (metanol)

ve 31.25, 62.5, 125, 250, 500, 750 µg/mL konsantrasyonlarda α - tokoferol (metanol) çözeltileri hazırlandı.

Numunelerin DPPH• radikalini giderme aktivitesini bulmak için 1:10, 1:20, 1:50, 1:100, 1:200 seyreltilmiş numunelerden tüplere 100 µl koyularak üzerine 3900 µl DPPH çözeltisi eklenerek vortekslenip 60 dk karanlıkta bekletildi. Sürenin bitiminde 517 nm dalgaboyunda absorbands okuması yapıldı. Deneyler 3 paralel çalışılarak sonuçların ortalaması alındı.

DPPH• radikali giderme aktivitesi % inhibisyon, µM TEAC ve α - tokoferol eşdeğeri olarak ifade edilmiştir. Bu yöntemde, artan absorbands değeri, azalan antioksidan aktiviteyi gösterir.

2.7.3. CUPRAC Analizi

Apak ve arkadaşlarının geliştirdiği yöntem biraz modifiye edilerek kullanılmıştır (Apak vd., 2004).

Standart olarak Troloks® kullanılmış olup kalibrasyon grafiğini oluşturmak için 12.5, 25, 50, 100, 200, 400 µg/mL konsantrasyonlarda Troloks® çözeltileri hazırlandı.

Numunelerin indirgeme potansiyelini ölçmek için tüplere sırasıyla 500 µl 10 mM CuCl₂, 500 µl 7.5 mM neocuproine (etanolde) ve 500 µl NH₄Ac (pH: 7.0) eklenip vortekslendi. Yükseltgenmiş bakır ortamına 1:50, 1:100, 1:200 seyreltilmiş numunelerden 100µl eklenerek 400 µl saf su ilave edilip vortekslendi ve 30 dk karanlıkta bekletildi. Sürenin bitiminde 450 nm dalgaboyunda absorbands okuması yapıldı. Deneyler 3 paralel çalışılarak sonuçların ortalaması alındı.

2.7.4. FRAP Analizi

Benzie ve Strain (1996) tarafından geliştirilen yöntem kullanılmıştır. Standart olarak Troloks® ve askorbik asit kullanılmış olup kalibrasyon grafiğini oluşturmak için 31.25, 62.5, 125, 250, 500, 750, 1000 µg/mL konsantrasyonlarda Troloks® (metanol) ve 31.25, 62.5, 125, 250, 500, 1000 µg/mL konsantrasyonlarda askorbik asit (suda) çözeltileri hazırlandı.

pH 3.6'da sulu asetat tamponu, FeCl₃ ve TPTZ (2,4,6-tripiridil s-triazin) çözeltileri sırasıyla 10:1:1 oranında karıştırılarak [Fe(III)(TPTZ)₂Cl₃] demir tuzu radikal çözeltisi oluşturuldu. Numunelerin indirgeme potansiyelini ölçmek için 1:20, 1:50, 1:100 seyreltilmiş numunelerden tüplere 50µl koyulup taze hazırlanmış olan yükseltgenmiş demir çözeltisinden 1950 µl eklenerek vortekslenip 20 dk karanlıkta

bekletildi. Sürenin bitiminde 595 nm absorbans okuması yapıldı. Deneyler 3 paralel çalışılarak sonuçların ortalaması alındı.

2.8. LC-MS/MS Analizi

Kozalak şuruplarının içeriğindeki fenolik ve flavonoid bileşenler LC-MS/MS (Sıvı kromatografisi- kütle spektrometresi/kütle spektrometresi) yöntemi ile hizmet alımı karşılığında TÜBİTAK-MAM tarafından gerçekleştirildi.

2.8.1. LC-MS/MS Şartları

Kozalak şurubu numunelerinin LC-MS/MS analizleri hizmet alımı karşılığında TÜBİTAK-MAM tarafından gerçekleştirildi. Sistem Agilent 1260 serisi LC ve buna kombine edilen Agilent 6460 Triple Quad LC-MS Jet Stream'den (AJS/ESI) oluşmaktadır. Analizde kütle spektroskopisi (MS) metodunda iyon kaynağı olarak elektrosprey iyonlaşma (ESI) modu kullanılmıştır. İyonizasyonda hem pozitif hem de negatif iyonizasyondan yararlanılmıştır. Analiz için Eclipse Plus Phenyl Hexyl (4.6*150mm 3.5µm) kromatografi kolonu kullanılmıştır. Analiz öncesinde numuneler 0.22 µl şırınga filtresinden geçirildikten sonra sisteme enjekte edilmiştir. Enjeksiyon hacmi 20µl, akış hızı 0.5 mL/dk ve kolon fırını sıcaklığı 40°C'dir.

Mobil faz çözeltileri olarak 1 mM amonyum format (A) ve metanol: asetonitril karışımı (65/35) (B) kullanılmıştır. Gradient program Tablo 6'daki gibidir.

Tablo 6. LC analizinde kullanılan gradient akış programı

Zaman (dk)	A (%)	B (%)	Akış (mL/dk)	Maksimum basınç sınırı (bar)
0.00	95.0	5.0	0.50	500.00
1.0	95.0	5.0	0.50	500.00
30.0	0.0	100.0	0.50	500.00
31.0	95.0	5.0	0.50	500.00
40.0	95.0	5.0	0.50	500.00

2.9. Enzim İnhibisyon Analizi

Bu çalışmada α -glukozidaz inhibisyon aktivitesini değerlendirmek için, Tao vd.'nin kullandığı yöntem biraz değiştirilerek kullanılmıştır (Tao vd., 2013). Bu yöntemde, α -glukozidaz aktivitesi, α -glukozidazın, p-nitrofenil- α -D-glukopiranosidi (PNPG) hidrolize ederek, mevcut α -glukozidaz aktivitesiyle orantılı bir kolorimetrik ürün oluşumuyla sonuçlanan bir reaksiyonla belirlenir. Numunelerin α -glukozidaz inhibisyon aktivitesi 405 nm'deki absorbans değişiklikleri gözlemlenerek IC₅₀ değerleri hesaplanır.

Analizde kullanılmak üzere enzimi seyreltmek için 0.1 mM sodyum fosfat tamponu hazırlandı ve enzim 1:100 oranında seyreltildi. Enzimin substrat üzerinde gösterdiği aktivite 0. ve 3. dk sonunda 405 nm dalgaboyunda absorbansı ölçülerek aradaki fark hesaplanıp bulundu.

Numunelerin enzim inhibisyon etkisini bulmak için 100, 200, 300, 400, 500 ve 600 µl numune içeren ortamlar oluşturulup 0. ve 3. dk sonunda enzimin aktivite absorbansı ölçüldü (Tablo 7). % enzim aktivitesi-absorbans grafikleri çizilerek IC₅₀ değerleri hesaplandı. Enzim aktivitesi % inhibisyon olarak ifade edilmiştir.

Tablo 7. Enzim inhibisyonu çalışma kartı

	Kontrol	100µl numune	200µl numune	300µl numune	400µl numune	500µl numune	600µl numune	700µl numune
Saf su	730	630	530	430	330	230	130	30
0.1M Tampon	200	200	200	200	200	200	200	200
Enzim	20	20	20	20	20	20	20	20
Numune	-	100	200	300	400	500	600	700
Substrat	50	50	50	50	50	50	50	50

2.10. Antimikrobiyal Analiz

Biemer (1973) tarafından geliştirilen disk difüzyon yöntemi kullanılmıştır. Disk difüzyon uygulamasında minimal inhibitör konsantrasyon (MIC) tespiti yapıldı.

Antimikrobiyal aktivite, *Aeromonas hydrophila* ATCC 35654, *Aspergillus flavus* ATCC 46283, *Bacillus cereus* ATCC 9634, *Bacillus subtilis* ATCC 6633, *Candida albicans* ATCC 10231, *Enterococcus faecalis* ATCC 29212, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Escherichia coli* O157:H7 ATCC 35150, *Listeria monocytogenes* ATCC 7644, *Salmonella typhimurium* ATCC 23566, *Shigella flexneri* ATCC 12022, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Saccharomyces cerevisiae* S288C olmak üzere 13 farklı mikroorganizmaya karşı belirlenmiştir.

Bu yöntemde öncelikle kullanılacak mikroorganizmalar aktifleştirilmiştir. Bu amaçla bütün bakteriler Nutrient Broth besiyerinde 36°C’de 24 saat, maya-küfler ise, Malt Ekstrakt Broth besiyerinde 27°C’de 48 saat inkübasyona bırakılarak konsantrasyonları 0.5 McFarland’a ayarlandı. Ardından hazırlanan steril katı besiyerlerine %1 oranında swap yöntemi ile sürülerek oda sıcaklığında kuruması için yaklaşık olarak 10 dk bekletildi. Bu aşamada, Nutrient Broth besiyerinde aktifleştirilen

bakteriler, Nutrient Agar besiyerinin yüzeyine, Malt Ekstrakt Broth besiyerinde aktifleştirilen maya-küfler Malt Ekstrakt Agar besiyerinin yüzeyine sürüldü.

Farklı konsantrasyonlarda (%95, %90, %85, %80 ve %75) hazırlanan örnek ekstraktları 20 µl olacak şekilde steril disklerle (103 ve 106 kob/mL bakteri içeren ortamlar) emdirildi. Ardından her bir örnekten 20 µl alınarak steril disklerle emdirilmiş ve bu diskler steril bir şekilde besiyerlerinin üzerine bırakıldı. Ardından, bütün petriler uygun şartlarda inkübasyona (bakteriler için 36°C'de 24 saat, maya-küfler için 27°C'de 48 saat) bırakıldı. İnkübasyon süresi sonunda disklerin etrafında oluşan şeffaf zonlar, dijital kumpas yardımıyla 3 farklı noktadan ölçülerek sonuçlar hesaplandı. Bütün mikroorganizmalara kontrol amacıyla hazır Penisilin G diskleri kullanılmıştır.

İnkübasyondan sonra varsa oluşan bulanıklık spektrofometrik olarak 600 nm dalga boyunda ölçülüp, bakteri sayısında %90'lık azalma gösteren MIC değeri belirlenir. Mikrobiyolojide, MIC değeri, bir bakteri veya bakterinin gözle görülür büyümesini engelleyen, (genellikle bir ilaç ya da bitki özütünün) maddenin en düşük konsantrasyonudur (Wiegand vd., 2008).

3. BULGULAR

3.1. Toplam Kuru Madde Tayini Bulguları

Kozalak şuruplarının kuru madde miktarları belirlenirken her bir numune iki paralel çalışıldı. Ölçümlerin ortalamaları ve standart sapma değerleri hesaplanarak Tablo 8’de gösterilmiştir.

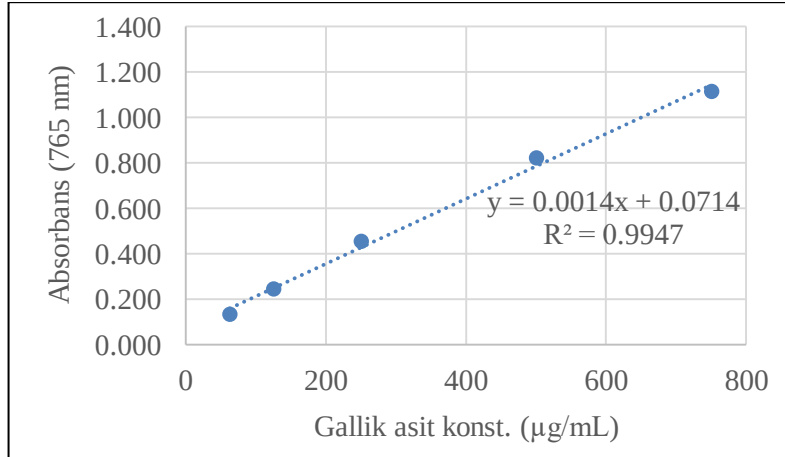
Tablo 8. Çam kozalağı şuruplarının toplam kuru madde miktarları

Numuneler	Toplam Kuru Madde Miktarı (g/mL)	Toplam Kuru Madde Miktarı (mg/mL)
Sarıçam	$0.01903 \pm 0.00033^*$	$19.03 \pm 0.33^*$
Karaçam	$0.02176 \pm 0.00045^*$	$21.76 \pm 0.45^*$
Kızılçam	$0.01822 \pm 0.00042^*$	$18.22 \pm 0.42^*$

*standart sapma

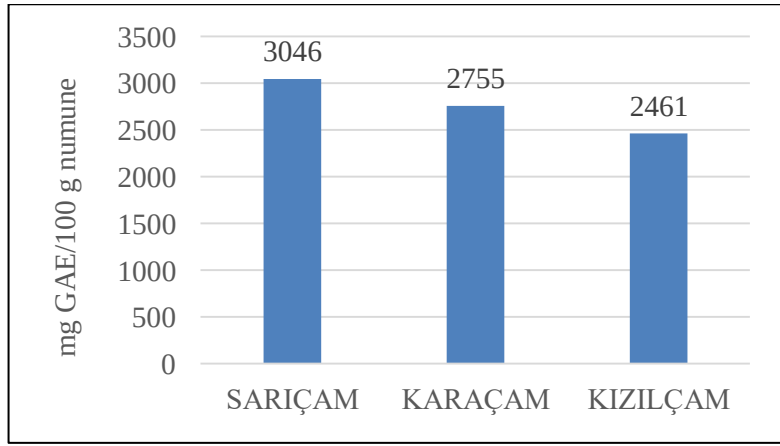
3.2. Toplam Fenolik Madde Miktarı Bulguları

Toplam fenolik madde tayini çalışmasında standart olarak gallik asit kullanılmış olup 765 nm’de absorbans değerleri ölçülmüştür. Alınan veriler sonucunda oluşturulmuş kalibrasyon grafiği Şekil 8’de verilmiştir.



Şekil 8. Toplam fenolik madde tayini için çizilen gallik asit standardının kalibrasyon grafiği

Kozalak şuruplarında toplam fenolik madde miktarları GAE cinsinden hesaplanmıştır. 100 g numune başına eşdeğer miktarda µg gallik asit $y=0.0014x+0.0714$ denkleminde yararlanılarak hesaplanmış ve Şekil 9’da verilmiştir.

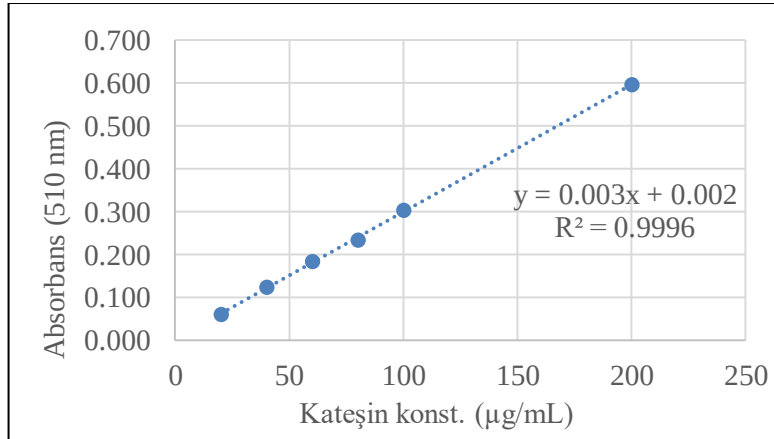


Şekil 9. Çam kozalağı şuruplarının toplam fenolik madde miktarları

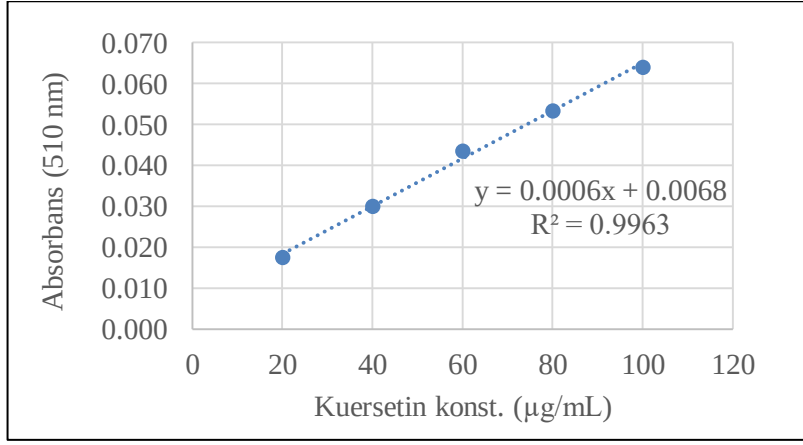
Kozalak şuruplarının fenolik madde miktarları (TPC) birbirine oldukça yakın bulunmuştur. Sarıçamdan elde edilmiş olan kozalak şurubu en yüksek fenolik madde içeriğine sahiptir. Onu sırasıyla karaçam ve kızılçam şurupları takip etmektedir (Sarıçam > Karaçam > Kızılçam).

3.3. Toplam Flavonoid Madde Miktarı Bulguları

Toplam flavonoid madde tayini çalışmasında standart olarak kateşin ve kuersetin kullanılmıştır. 510 nm’de kateşin ve kuersetin konsantrasyonlarına karşılık gelen absorbans değerlerine ait standart kalibrasyon grafikleri Şekil 10 ve 11’de verilmiştir.

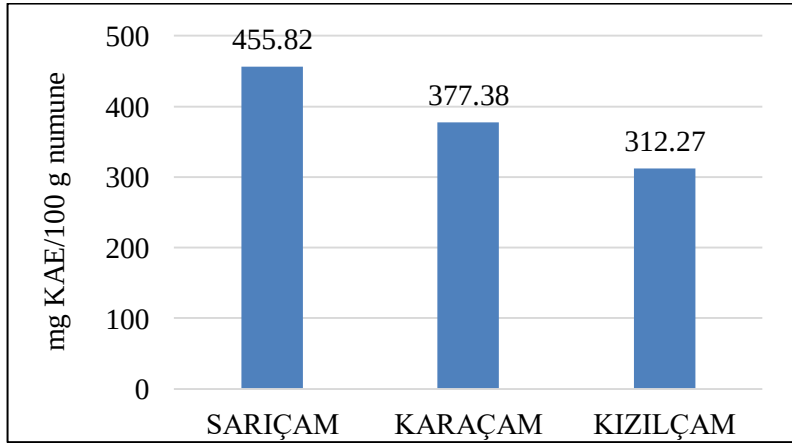


Şekil 10. Toplam flavonoid madde tayini için çizilen kateşin standardının kalibrasyon grafiği

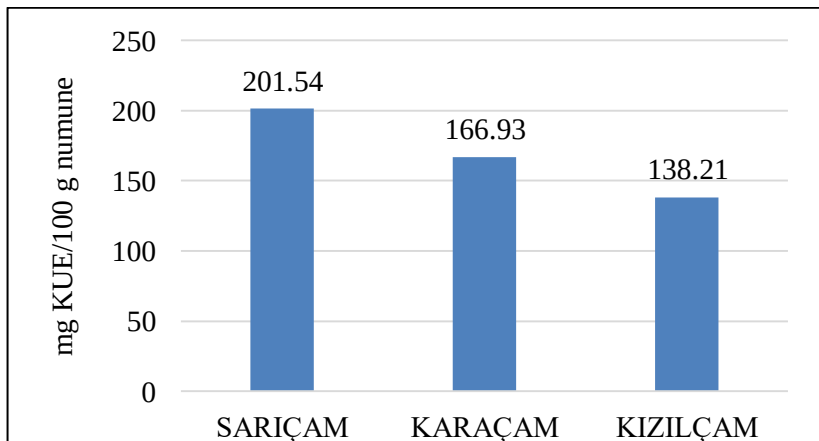


Şekil 11. Toplam flavonoid madde tayini için çizilen kuersetin standardının kalibrasyon grafiği

Kozalak şuruplarında toplam flavonoid madde miktarları kateşin ve kuersetin eşdeğeri cinsinden hesaplanmıştır. 100 g numune başına eşdeğer miktarda mg kateşin $y=0.003x+0.002$ denkleminde yararlanılarak hesaplanmış ve Şekil 12’de verilmiştir. 100 g numune başına eşdeğer miktarda mg kuersetin $y=0.0006x+0.0068$ denkleminde yararlanılarak hesaplanmış ve Şekil 13’te verilmiştir.



Şekil 12. Çam kozalağı şuruplarının toplam flavonoid madde miktarları



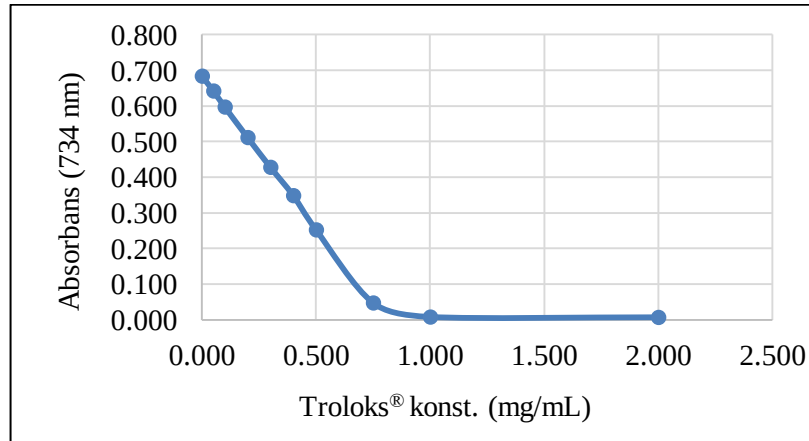
Şekil 13. Çam kozalağı şuruplarının toplam flavonoid madde miktarları

Kozalak şuruplarının flavonoid madde miktarları (TFC) birbirine oldukça yakın bulunmuştur. Sarıçamdam elde edilmiş olan kozalak şurubu en yüksek flavonoid madde içeriğine sahiptir. Onu sırasıyla karaçam ve kızılçam şurupları takip etmektedir (Sarıçam > Karaçam > Kızılçam). Bulgular dikkate alındığında toplam fenolik ve flavonoid analizlerinde numunelere ait sıralama değişmemiştir.

3.4. ABTS^{•+} Analizi Bulguları

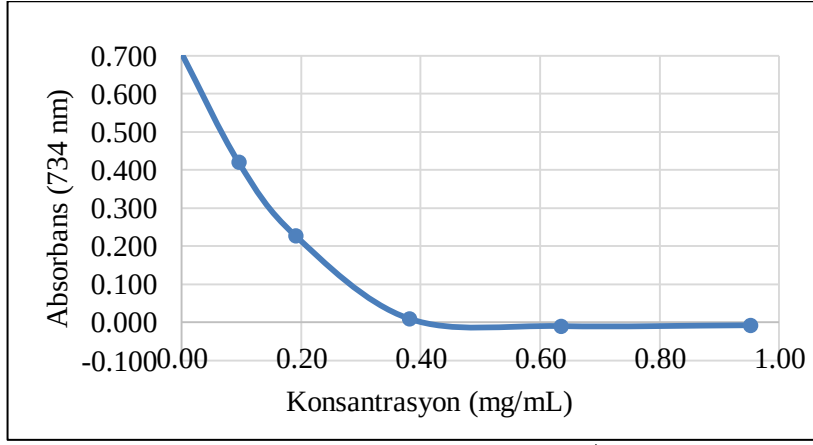
Kozalak şuruplarının ABTS^{•+} radikal giderme aktivite analizinde standart ve numuneler farklı konsantrasyonlarda çalışılmıştır. Bu sayede SC₅₀ değerleri (50% scavenging concentration; ABTS^{•+} radikalinin konsantrasyonunu gidererek yarıya indiren standart/numune konsantrasyonu) belirlenmiştir (Ruberto vd., 2007). Ayrıca şurupların ABTS^{•+} radikal giderme aktiviteleri TEAC cinsinden bulunmuştur.

Analizde kullanılan Troloks[®] standardına ait absorbans-konsantrasyon grafikleri Şekil 14'te verilmiştir.

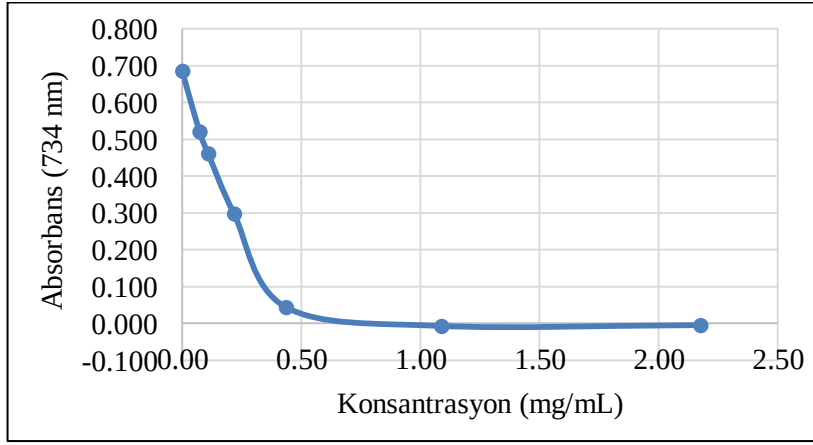


Şekil 14. ABTS^{•+} çalışmasında kullanılan troloks standardının radikal giderme aktivitesine ait grafik

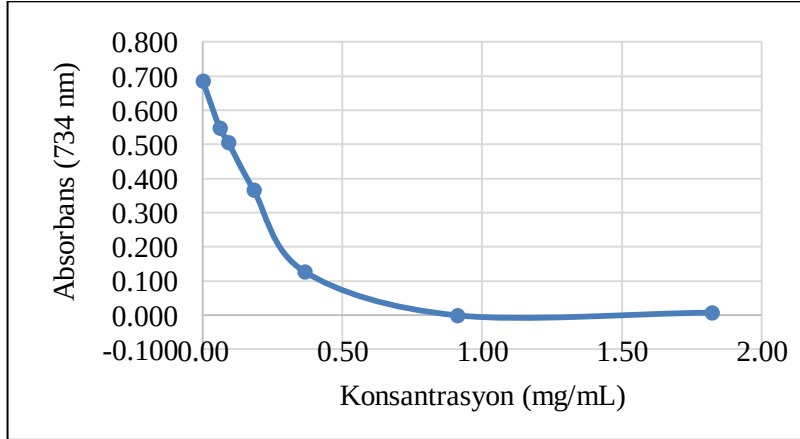
Kozalak şuruplarına ait absorbans-konsantrasyon grafikleri Şekil 15-17'de verilmiştir.



Şekil 15. Sarıçam kozalağı şurubunun ABTS•⁺ radikali giderme aktivitesi

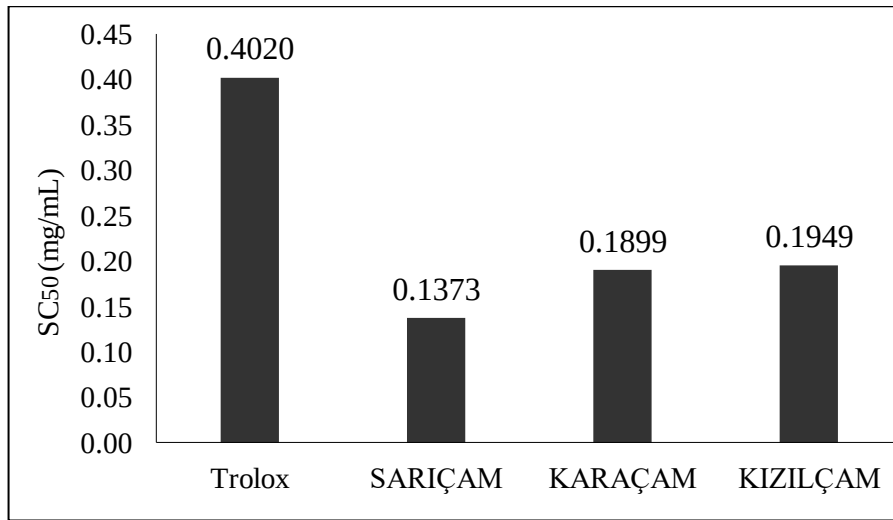


Şekil 16. Karaçam kozalağı şurubunun ABTS•⁺ radikali giderme aktivitesi

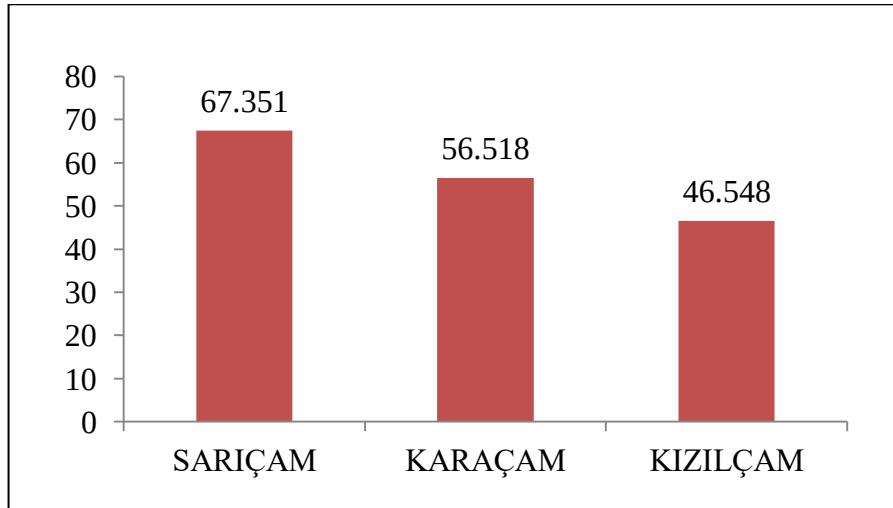


Şekil 17. Kızıлчаam kozalağı şurubunun ABTS•⁺ radikali giderme aktivitesi

Kozalak şuruplarında ABTS•⁺ radikali giderme aktiviteleri gösteren SC₅₀ değerleri Şekil 18’de verilmiştir. Radikal giderme yüzdeleri ise Şekil 19’da verilmiştir.



Şekil 18. Troloks ile çam kozalağı şuruplarının ABTS•⁺ radikali giderme aktivitesini gösteren SC₅₀ değerleri (mg/mL)



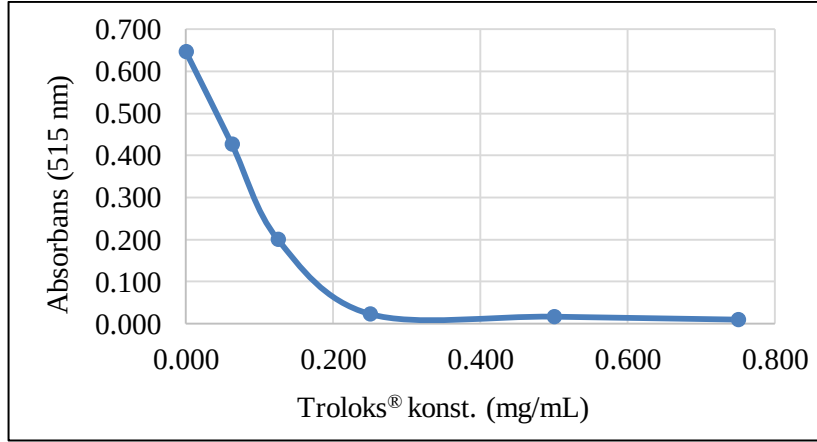
Şekil 19. Kozalak şuruplarının ABTS•⁺ radikalini giderme yüzdesi (%)

Kozalak şuruplarının % ABTS•⁺ radikali giderme aktiviteleri de TPC ve TFC ile aynı sıralamaya sahiptir. Sonuçları arasında pozitif korelasyon bulunmuştur. Sarıçamdan elde edilmiş olan kozalak şurubunun ABTS•⁺ radikalini en fazla temizleyebildiği bulunmuştur. Onu sırasıyla karaçam ve kızılçam şurupları takip etmektedir (Sarıçam > Karaçam > Kızılçam).

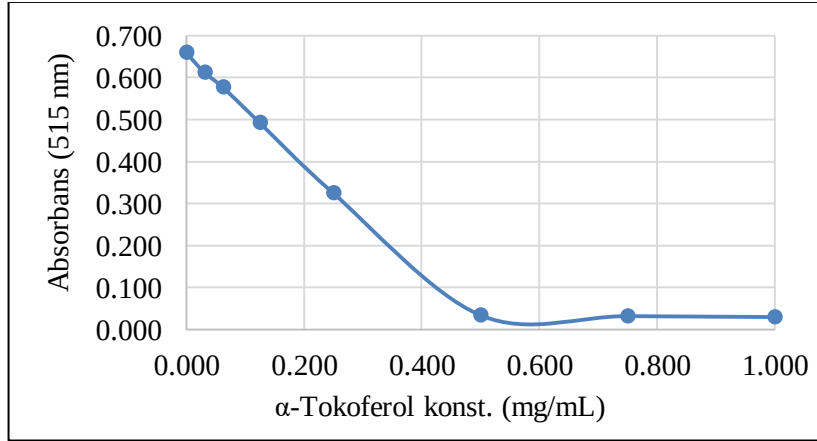
3.5. DPPH• Analizi Bulguları

Kozalak şuruplarının DPPH• radikal giderme aktivite analizinde standart ve numuneler farklı konsantrasyonlarda çalışılmıştır. Bu sayede SC₅₀ değerleri belirlenmiştir. Ayrıca şurupların DPPH• radikal giderme aktiviteleri TEAC cinsinden bulunmuştur.

Analizde kullanılan Troloks ve α -Tokoferol standartlarına ait absorbans-konsantrasyon grafikleri Şekil 20 ve 21’de verilmiştir.

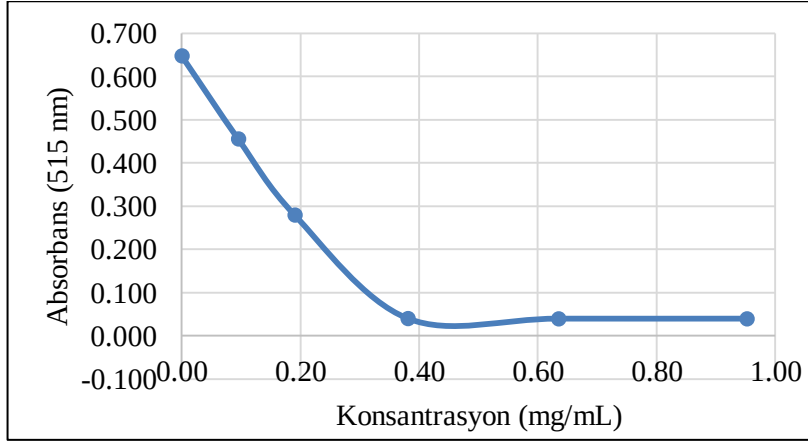


Şekil 20. DPPH• çalışmasında kullanılan Troloks standardının radikal giderme aktivitesine ait grafik

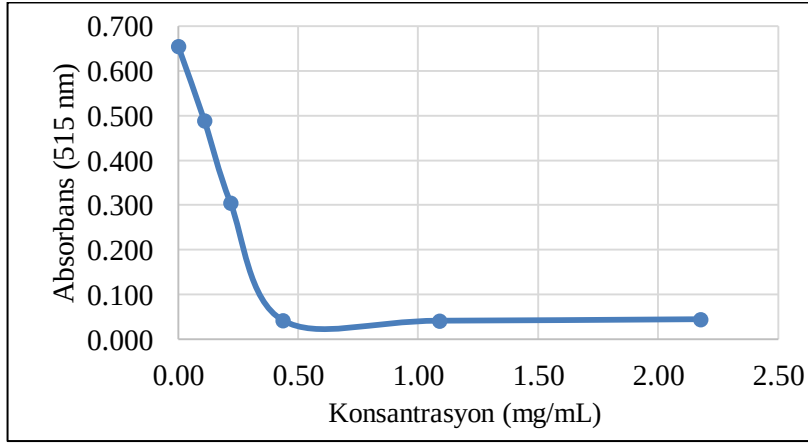


Şekil 21. DPPH• çalışmasında kullanılan α -Tokoferol standardının radikal giderme aktivitesine ait grafik

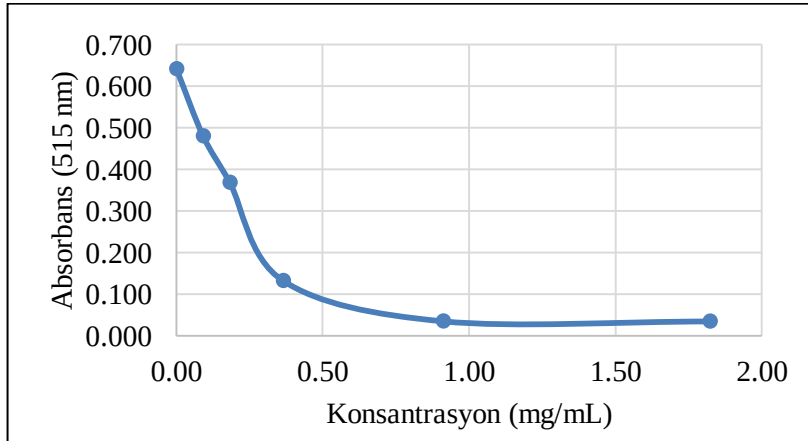
Kozalak şuruplarına ait absorbans-konsantrasyon grafikleri Şekil 22-24’te verilmiştir.



Şekil 22. Sarıçam kozalağı şurubunun DPPH• radikali giderme aktivitesi

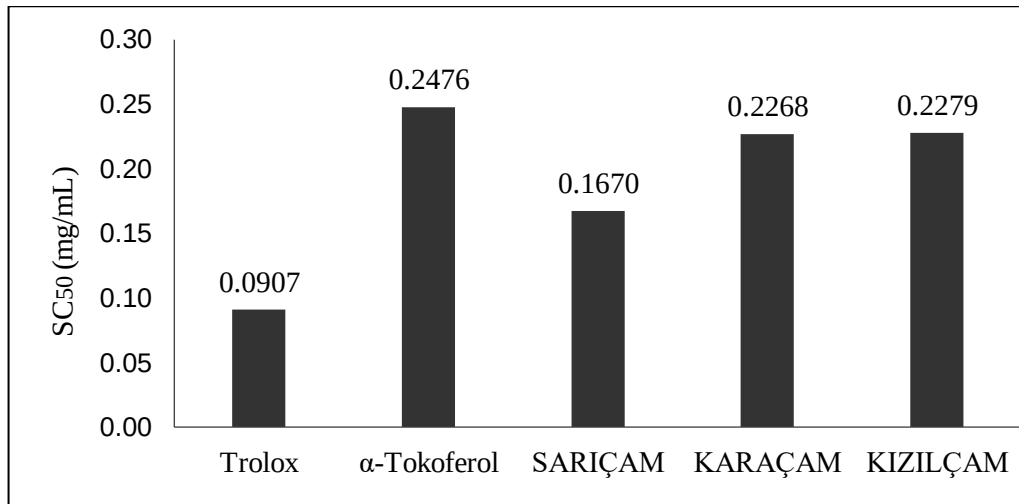


Şekil 23. Karaçam kozalağı şurubunun DPPH• radikali giderme aktivitesi.

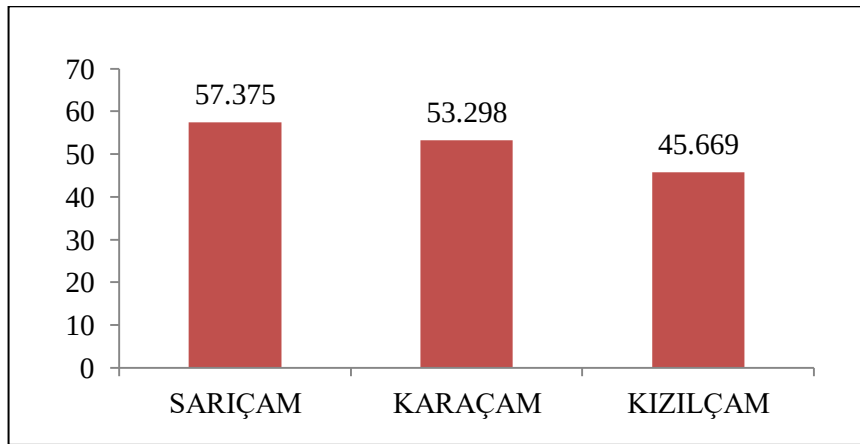


Şekil 24. Kızılçam kozalağı şurubunun DPPH• radikali giderme aktivitesi

Kozalak şuruplarında DPPH• radikali giderme aktiviteleri gösteren SC50 değerleri Şekil 25'te verilmiştir. Radikal giderme yüzdeleri ise Şekil 26'da verilmiştir.



Şekil 25. Troloks ve α-Tokoferol standartları ile kozalak şuruplarının DPPH• radikali giderme aktivitesini gösteren SC₅₀ değerleri

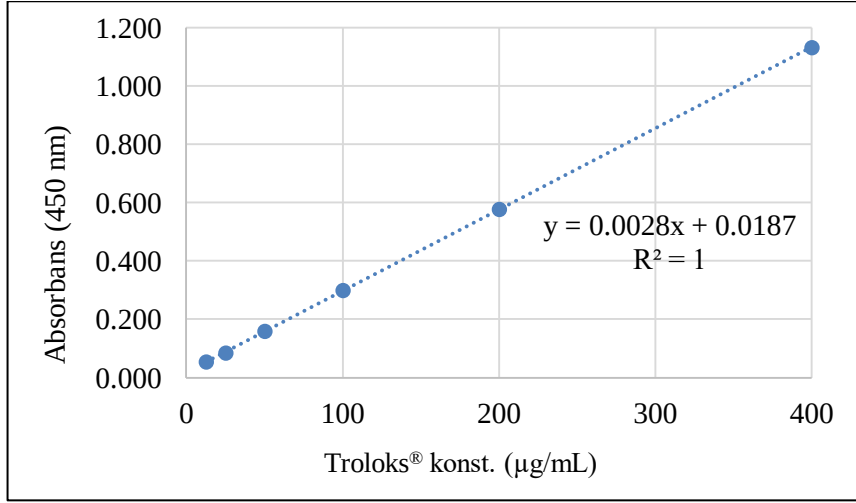


Şekil 26. Kozalak şuruplarının DPPH• radikali giderme yüzdeleri (%)

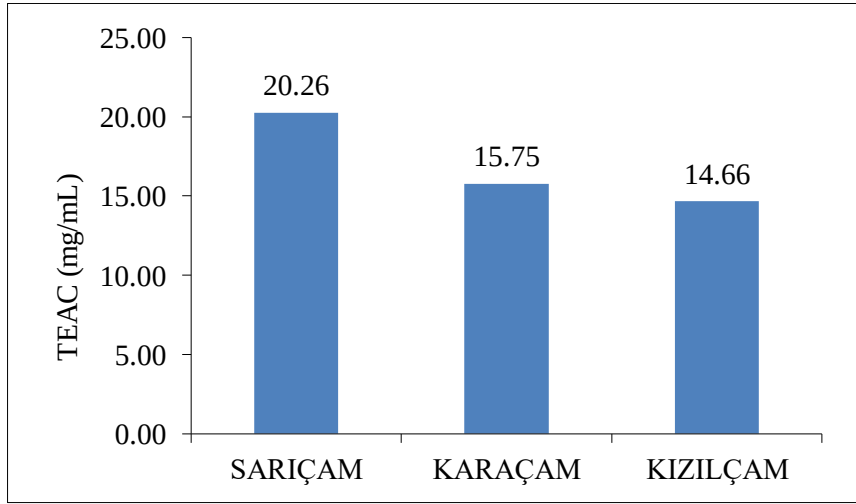
Kozalak şuruplarının % DPPH radikali giderme aktiviteleri de TPC, TFC ve ABTS ile aynı sıralamaya sahiptir. Sonuçları arasında pozitif korelasyon bulunmuştur. Sarıçamdam elde edilmiş olan kozalak şurubunun DPPH radikali en fazla temizleyebildiği bulunmuştur. Onu sırasıyla karaçam ve kızılçam şurupları takip etmektedir (Sarıçam > Karaçam > Kızılçam).

3.6. CUPRAC Analizi Bulguları

Kozalak şuruplarının CUPRAC analizinde standart ve numuneler farklı konsantrasyonlarda çalışılmıştır. Absorbans değerlerinin kesinlik ve güvenilirliği açısından numunelerin analiz sonuçları grafiğe geçirilirken 1:200 seyreltik konsantrasyonları kullanılmıştır. CUPRAC değerleri TEAC cinsinden bulunmuştur. Analizde kullanılan Troloks standardına ait absorbans-konsantrasyon grafiği Şekil 27’de verilmiştir. Şurupların CUPRAC değerleri TEAC cinsinden hesaplanmış ve Şekil 28’de verilmiştir.



Şekil 27. CUPRAC tayini için kullanılan Troloks standardının kalibrasyon grafiği



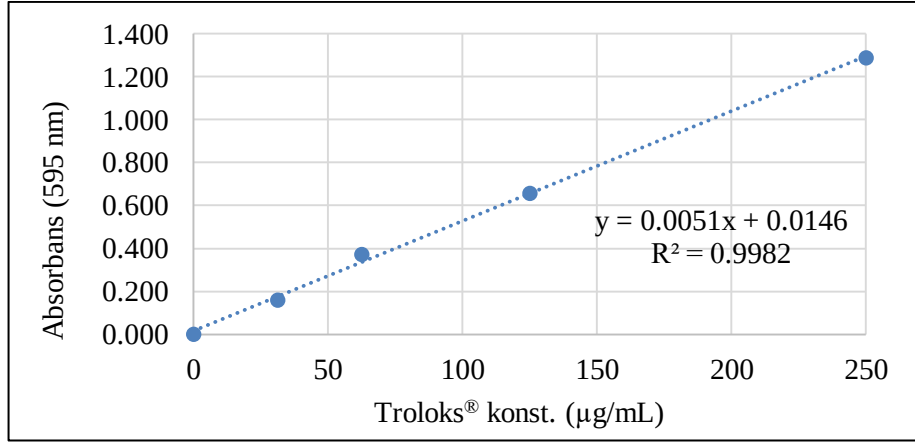
Şekil 28. Çam kozalağı şuruplarının CUPRAC değerleri

Kozalak şuruplarının Cu^{+2} indirgeme antioksidan kapasite değerleri (CUPRAC) de aynı sıralamaya sahiptir. Sarıçamdam elde edilmiş olan kozalak şurubunda CUPRAC değeri en yüksek bulunmuştur. Onu sırasıyla karaçam ve kızılçam şurupları takip etmektedir (Sarıçam > Karaçam > Kızılçam). Diğer antioksidan aktivite test sonuçları ile arasında pozitif korelasyon bulunmuştur.

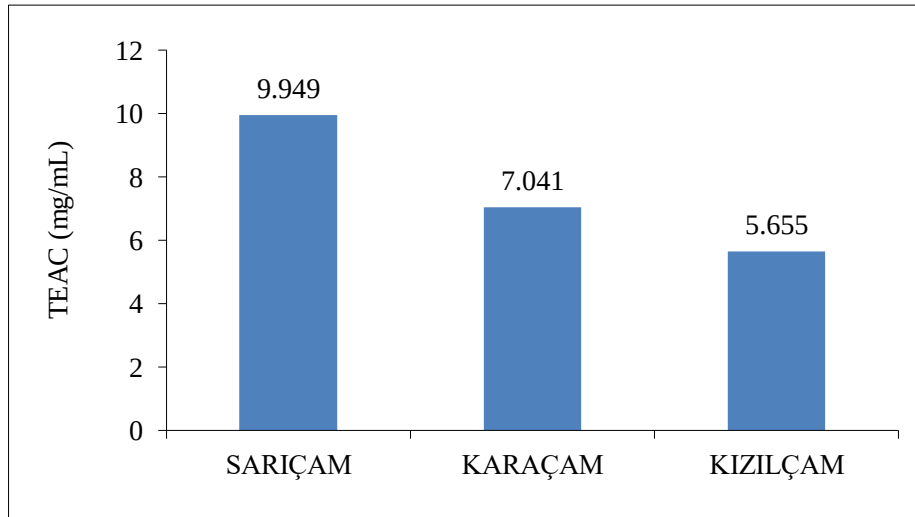
3.7. FRAP Analizi Bulguları

Kozalak şuruplarının FRAP analizinde standart ve numuneler farklı konsantrasyonlarda çalışılmıştır. Absorbans değerlerinin kesinlik ve güvenilirliği açısından numunelerin analiz sonuçları grafiklendirilirken 1:100 seyreltik konsantrasyonları kullanılmıştır. FRAP değerleri TEAC cinsinden bulunmuştur. Analizde kullanılan Troloks standardına ait absorbans-konsantrasyon grafiği Şekil

Şekil 29’da verilmiştir. Şurupların FRAP değerleri TEAC cinsinden hesaplanmış ve Şekil 30’da verilmiştir.



Şekil 29. FRAP tayini için kullanılan Troloks standardının kalibrasyon grafiği



Şekil 30. Çam kozalağı şuruplarının FRAP değerleri

Kozalak şuruplarının Fe^{+3} indirgeme antioksidan gücü değerleri (FRAP) de aynı sıralamaya sahiptir. Sarıçamdam elde edilmiş olan kozalak şurubu en yüksek FRAP değerine sahiptir. Onu sırasıyla karaçam ve kızılçam şurupları takip etmektedir (Sarıçam > Karaçam > Kızılçam). Tüm aktivite test sonuçları (TPC, ABTS, DPPH, FRAP ve CUPRAC) arasında pozitif korelasyon bulunmuştur.

3.8. HPLC-MS/MS Analizi Bulguları

Kozalak şuruplarının LC/MS-MS ile fenolik ve flavonoid analizinde kullanılan parametreleri Tablo 9’da verilmiştir.

Tablo 9. am kozalağı şuruplarının LC/MS-MS analizi parametreleri

FENOLİK / FLAVONOİD	Ana iyon	Ürün iyon	Fragment gerilimi	Çarpışma enerjisi	Polarite
(+)-L-Alliin	178	88	60	16	Pozitif
4 Hidroksibenzoik Asit	137	93	100	22	Negatif
Apigenin	270	153	170	12	Pozitif
Kafeik Asit	179	135	80	22	Negatif
Kateşin	291	139	100	18	Pozitif
Klorojenik Asit	353	85	180	38	Negatif
Sinamik Asit	147	103	40	4	Negatif
Siyanidin Klorit	365	203	100	16	Pozitif
Siyanin Klorit	611	449	80	16	Pozitif
Ellagik Asit	303	257	100	24	Pozitif
Ferulik Asit	193	178	60	6	Negatif
Gallik Asit	169	125	40	6	Negatif
Gentisik Asit	153	108	70	18	Negatif
Kaempferol	287	153	80	34	Pozitif
Luteolin	287	153	100	28	Pozitif
M P Kumarik Asit 10-12	163	119	60	8	Negatif
Naringenin	273	153	110	24	Pozitif
Okzalik Asit	203	131	180	22	Negatif
Pelargonidin HCl	271	215	100	16	Pozitif
Pelargonin Klorit	595	433	100	16	Pozitif
Kuersetin 3 Beta D Glikozit	465	145	130	20	Pozitif
Kuersetin Dihidrat	304	230	100	20	Pozitif
Rozmarinik Asit	359	161	100	16	Negatif
Rutin	611	303	100	16	Pozitif
Salisilik Asit	139	121	100	16	Pozitif
Sinapik Asit	223	121	100	30	Negatif
Süksinik Asit	141	59	50	4	Negatif
Şiringik Asit	197	182	70	10	Negatif
T-3-OH Sinamik Asit	163	119	110	8	Negatif
Tartarik Asit	149	87	60	6	Negatif
Vanilik Asit	167	123	40	4	Negatif

Kozalak şuruplarında LC/MS-MS analizi sonucu bulunan fenolik ve flavonoid bileşenler ve miktarları ppm (mg/mL) cinsinden hesaplanmış olup Tablo 10’da verilmiştir.

Tablo 10. Çam kozalağı şuruplarının LC/MS-MS analizi sonuçları

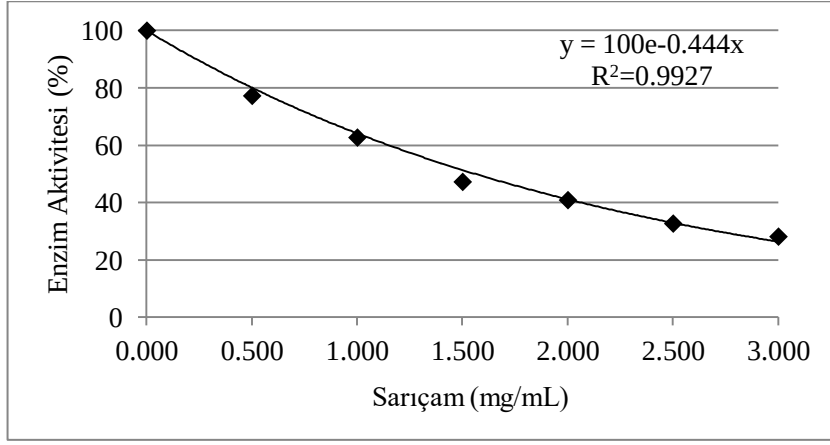
Fenolik/Flavonoid Madde	Sarıçam kozalak şurubu (ppm)	Karaçam kozalak şurubu (ppm)	Kızılcık kozalak şurubu (ppm)	LOD/ (ppm)
Kafeik Asit	0.2185	0.1102	0.1453	0.0200
Gallik Asit	0.6730	0.1405	0.7225	0.0200
T-3-OH Sinnamik Asit	0.0726	0.0551	0.0319	0.0100
Sinamik Asit	0.7952	0.4780	0.1933	0.0200
Gentisik Asit	0.7716	0.6506	1.0285	0.0200
Vanilik Asit	0.0332	0.0132	0.0386	0.0100
Ferulik Asit	0.1515	0.1541	0.0765	0.0200
M P Kumarik Asit	0.0726	0.0551	0.0319	0.0100
Siringik Asit	0.0047	<LOD*	0.0070	0.0030

*Dedeksiyon limitinin (LOD) altında olduğundan miktarı belirlenememiştir.

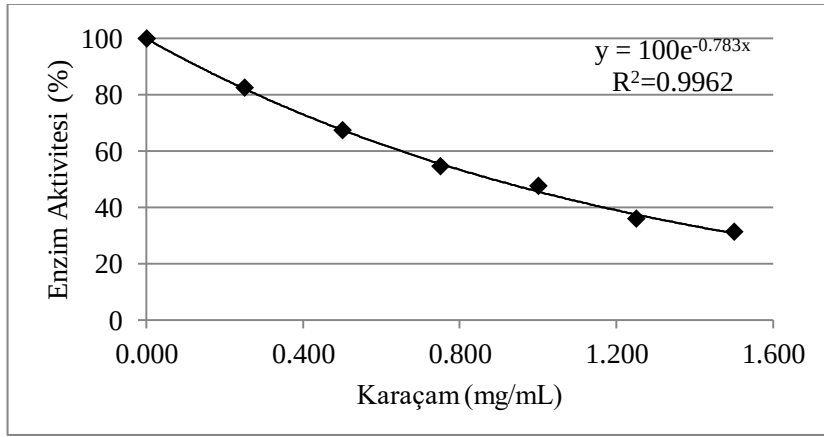
Miktarları farklılık göstermekle birlikte her üç çam kozalağı şurubunda da aynı fenolik bileşiklere rastlanmıştır. Sarıçam kozalağı şurubunda özellikle sinamik asit, gentisik asit, gallik asit ve T-3-OH sinamik asit bileşikler diğerlerine oranla daha yüksek miktardadır (>0.4). Karaçam kozalağı şurubunda özellikle gentisik asit ve sinamik asit bileşikler diğerlerine oranla daha yüksek miktardadır (>0.4). Kızılcık kozalağı şurubunda ise özellikle gentisik asit ve gallik asit bileşikler diğerlerine oranla oldukça yüksek miktardadır (>0.7).

3.9. Enzim İnhibisyon Analizi Bulguları

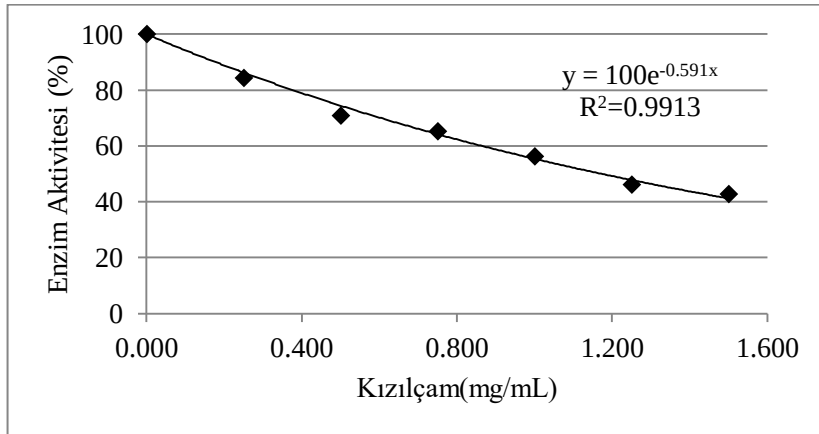
Kozalak şuruplarının α -glukozidaz enzim inhibisyonu aktivite analizi için numuneler farklı konsantrasyonlarda çalışılarak % enzim aktivitesine karşılık gelen konsantrasyon ($\mu\text{g/mL}$) grafikleri çizilmiştir (Şekil 31, 32, 33). Elde edilen veriler kullanılarak her bir kozalak şurubunun IC_{50} değerleri hesaplanarak karşılaştırılmış ve Tablo 11’de verilmiştir.



Şekil 31. Sarıçam kozalağı şurubunun α -glukozidaz inhibisyonu aktivitesi (%)



Şekil 32. Karaçam kozalağı şurubunun α -glukozidaz inhibisyonu aktivitesi (%)



Şekil 33. Kızılçam kozalağı şurubunun α -glukozidaz inhibisyonu aktivitesi (%)

α -Glukozidaz aktivitesi metodu ile çalışılan numunlerden elde edilen grafiklerden hesaplanan IC_{50} ve R^2 değerleri Tablo 11’de verilmiştir.

Tablo 11. α -glukozidaz enzim inhibisyonu gösteren sarıçam, kızılçam ve karaçam şuruplarının IC₅₀ ve R² değerleri

Kozalak Şurupları	IC ₅₀ (mg/mL)	R ²
Sarıçam- <i>P. sylvestris</i>	1.561	0.9927
Karaçam- <i>P. nigra</i>	0.885	0.9962
Kızılçam- <i>P. brutia</i>	1.173	0.9913

Çam kozalağı şuruplarının α -glukozidaz enzim inhibisyonu analizi sonucu elde edilen IC₅₀ değerleri karşılaştırıldığında karaçam kozalak şurubunun IC₅₀ değeri diğerlerine oranla düşük bulunmuştur. IC₅₀ değerinin düşük olması inhibisyon aktivitesinin yüksek olduğu anlamına gelmektedir. Enzim inhibisyon çalışmasında kozalak şuruplarının aktivite sıralaması Karaçam>Kızılçam>Sarıçam şeklinde olmuştur.

Antioksidan kapasite analizlerinde kozalak şuruplarının aktivite sıralaması Sarıçam>Karaçam>Kızılçam şeklindeyken enzim inhibisyon analizinde Karaçam>Kızılçam>Sarıçam şeklinde sıralanmıştır. Sıralamadaki farklılığa farklı çam türlerine ait olan bu şuruplarda tanımlanmamış başka bileşiklerin varlığının neden olabileceği düşünülmektedir.

3.10. Antimikrobiyal Analiz Bulguları

Kozalak şuruplarının antimikrobiyal aktivite analizinde standart ve numuneler farklı konsantrasyonlara seyreltilerek çalışılmıştır. Her bir çam kozalağı şurubuna ait konsantrasyon ve MIC değerlerini içeren tablolar (Tablo 12, 13,14) aşağıda verilmiştir.

Tablo 12. Sarıçam kozalağı şurubunun farklı konsantrasyonlarına karşı antimikrobiyal aktivite

Bakteriler	Sarıçam MIC değerleri (mm)			Penisilin G (10 mg)
	1:100	1:200	1:300	
<i>Aeromonas hydrophila</i> ATCC 35654	-	-	-	34±0.01
<i>Bacillus cereus</i> ATCC 9634	-	-	-	30±0.01
<i>Bacillus subtilis</i> ATCC 35654	-	-	-	34±0.01
<i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 29212	-	-	-	32±0.01
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	-	-	-	34±0.01
<i>Escherichia coli</i> O157:H7 35150	-	-	-	34±0.01
<i>Listeria monocytogenes</i> ATCC 7644	-	-	-	30±0.01
<i>Salmonella typhimurium</i> ATCC 23566	-	-	-	34±0.01
<i>Shigella flexneri</i> ATCC 12022	-	-	-	30±0.01
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	-	-	-	38±0.01

Tablo 12. (Devamı)

Sarıçam MIC değerleri (mm)				
Maya-Küf				
<i>Aspergillus flavus</i> ATCC 46283	-	-	-	25±0.01
<i>Candida albicans</i> ATCC 10231	-	-	-	22±0.01
<i>Sac. cerevisiae</i> S288C	-	-	-	14±0.01

Tablo 13. Karaçam kozalağı şurubunun farklı konsantrasyonlarına karşı antimikrobiyal aktivite

	Karaçam MIC değerleri (mm)			
Bakteriler	1:100	1:200	1:300	Penisilin G (10 mg)
<i>Aeromonas hydrophila</i> ATCC 35654	-	-	-	34±0.01
<i>Bacillus cereus</i> ATCC 9634	5.35±0.01	-	-	30±0.01
<i>Bacillus subtilis</i> ATCC35654	-	-	-	34±0.01
<i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 29212	-	-	-	32±0.01
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	5.20±0.01	-	-	34±0.01
<i>Escherichia coli</i> O157:H7 35150	-	-	-	34±0.01
<i>Listeria monocytogenes</i> ATCC 7644	-	-	-	30±0.01
<i>Salmonella typhimurium</i> ATCC 23566	-	-	-	34±0.01
<i>Shigella flexneri</i> ATCC 12022	-	-	-	30±0.01
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	4.15±0.01	-	-	38±0.01
Maya-Küf				
<i>Aspergillus flavus</i> ATCC 46283	-	-	-	25±0.01
<i>Candida albicans</i> ATCC 10231	-	-	-	22±0.01
<i>Sac. cerevisiae</i> S288C	-	-	-	14±0.01

Tablo 14. Kızıлчаam kozalağı şurubunun farklı konsantrasyonlarına karşı antimikrobiyal aktivite

	Kızıлчаam MIC değerleri (mm)			
Bakteriler	1:100	1:200	1:300	Penisilin G (10 mg)
<i>Aeromonas hydrophila</i> ATCC 35654	-	-	-	34±0.01
<i>Bacillus cereus</i> ATCC 9634	-	-	-	30±0.01
<i>Bacillus subtilis</i> ATCC 35654	-	-	-	34±0.01
<i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 29212	-	-	-	32±0.01
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	5.12±0.01	-	-	34±0.01
<i>Escherichia coli</i> O157:H7 35150	-	-	-	34±0.01
<i>Listeria monocytogenes</i> ATCC 7644	-	-	-	30±0.01
<i>Salmonella typhimurium</i> ATCC 23566	-	-	-	34±0.01
<i>Shigella flexneri</i> ATCC 12022	-	-	-	30±0.01
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	-	-	-	38±0.01
Maya-Küf				
<i>Aspergillus flavus</i> ATCC 46283	-	-	-	25±0.01
<i>Candida albicans</i> ATCC 10231	-	-	-	22±0.01
<i>Sac. cerevisiae</i> S288C	-	-	-	14±0.01

Antimikrobiyal analiz sonucu kıızıлчаam kozalak şurubunun sadece *Escherichia coli*'ye, karaçam kozalak şurubunun *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* ile

Bacillus cereus 'e karşı antibakteriyal aktivite gösterdiği belirlenmiştir. Sarıçam kozalak şurubunun ise çalışmada kullanılan mikroorganizmalara karşı herhangi bir antimikrobiyal aktivite göstermediği belirlenmiştir.

4. TARTIŞMA

Günümüzde, toksik ve karsinojenik etkileri nedeniyle sentetik antioksidanlardan olabildiğince uzak durulmaktadır (Kaur ve Kapoor, 2001). Toksikolojik açıdan daha güvenilir olduğu düşünülen, ekstrakte edilmesi daha ucuz ve doğal antioksidan kaynağı olan bitkilere talep gittikçe artmaktadır (Willcox vd., 2004). Gıda kaynağı olarak kullanılan sebze ve meyvelerden antioksidan içerik elde etmek çok anlamlı olmayabilirken, çam kabuğu ve kozalağı gibi beslenmede yer almayan bitkisel kaynaklardan antioksidan içerik elde etmek ekonomiye katkı sağlar (Marmol vd., 2019).

Kastamonu ilinde farklı ilçelerde 15 adet halk tarafından üretilmiş karaçam (*P.nigra*) ve göknara ait kozalak pekmezlerinin fizikokimyasal, biyoaktif ve fonksiyonel özelliklerinin incelendiği çalışmada toplam fenolik konsantrasyon 875.00 µgGAE/g ile 2750.00 µgGAE/g arasında ve DPPH radikali giderme yüzdeleri %44.06 ile %89.77 arasında bulunmuştur. Temin edilen çam pekmezlerinde farklı pişirme süresi uygulanması ve farklı miktarda şeker kullanılması sebebiyle herhangi bir regülasyona tabi olunarak değerlendirilememiştir (İncemehmetoğlu, 2021).

Kars, Gümüşhane ve Erzurum'dan toplanan *p. sylvestris* türüne ait kozalaklardan etanol çözücüsü ile elde edilen ekstraktlarda toplam fenolik madde miktarı en yüksek Gümüşhane'den toplanmış kozalaklarda 131.82 µgGAE/mg bulunmuş olup sırasıyla Erzurum ve Kars takip etmiştir. Aynı sıralama toplam flavonoid miktarı için de geçerli olup Gümüşhane'den toplanan kozalaklarda 14.44 µgQE/mg flavonoid miktarı bulunmuştur. Yapılan antioksidan kapasite çalışmasında en yüksek DPPH• ve ABTS• radikal süpürme aktivitesinin IC₅₀ değerleri 14.75 µg/mL ve 12.56 µg/mL Gümüşhane'den toplanan kozalaklarda olup sırasıyla Erzurum ve Kars takip etmiştir. α-glukozidaz enzim inhibisyonunda 26.65 mg/mL IC₅₀ değeri ile Gümüşhane yine ilk sıradadır (Topal, 2020).

Adıyaman'da toplanmış nar ve karaçam materyalleriyle yapılan çalışmada metanol çözücüsüyle elde edilmiş ekstraktların DPPH•, CUPRAC testi ve toplam fenolik madde içerikleri değerlendirilmiştir. Çalışmada iki ürün arasında karşılaştırma yapılmakla beraber karaçam materyallerinden yaprak, odun ve kozalak arasında bir karşılaştırma da yapılmıştır. Karaçamın yaprak ve odun ekstraktına oranla kozalak ekstraktı; toplam fenolik madde, DPPH• ve CUPRAC testinde en iyi değerleri vermiş

olup sırasıyla 96.14 mgGAE/g, 0.225 mg/mL (IC₅₀) ve 0.793 mmol TEAC/g şeklindedir (Said vd., 2022).

P. nigra ve *P. brutia* türlerinden elde edilen pekmezleri biyoaktif ve fizikokimyasal yönlerden inceleyen bir çalışmada, toplam fenolik içerik ve DPPH analizlerinin sonuçları *P. nigra* > *P. brutia* olacak şekilde sonuçlanmıştır. Bulunan değerler toplam fenolik madde içeriği *p. nigra* için 1388.7 – 1466.4 mgGAE/L, *p. brutia* için 1294.1 – 1444.7 mgGAE/L şeklindedir. DPPH analizi sonuçları *P. nigra* 73.44-77.68 %, *P. brutia* için 69.44-77.16 % şeklindedir (Gamlı, 2022).

Topal'ın yaptığı çalışmada Gümüşhane, Erzurum ve Kars'tan toplanan *P. sylvestris* türüne ait etanollü kozalak ekstraktının α -glukozidaz enzim inhibisyonu sırasıyla 26.65, 40.76, 43.3 mg/mL'dir. Bu çalışmada bulunan antioksidan aktivite ile antidiyabetik aktivite aynı sıralamaya sahiptir (Topal, 2020).

α -amilaz ve α -glikozidaz enzimleri nişasta sindiriminde görev alan enzimlerdir. Özellikle polifenolik bileşikler bu enzimleri inhibe ederek besin ögesi emilimine ilişkin nişastanın sindirilebilirliğine ve glisemik yüke etki etmektedir (Suyundikov, 2020).

Mısır'da 264 bitki ekstraktı ile yapılan α -glukozidaz inhibisyon aktivitesi çalışmasında pinus cinsine ait 4 tür (*P. canariensis* C.S.m., *P. halepensis* Mill., *P. pinea* L., *P. roxburghii* Sarg.) bulunmaktadır. Bu 264 bitki içerisinde en iyi IC₅₀ değerine sahip olan *pinus roxburghii* Sarg.'ın IC₅₀ değeri 2.47 ppm'dir (El-Manawaty ve Gohar, 2018).

Fas'ta *P. halepensis* türüne ait kabuk materyalinden elde edilen sulu ve etanollü ekstraktların α -glukozidaz ve α -amilaz inhibisyon çalışması in vivo ve in vitro olarak gerçekleştirilmiştir. İn vitro çalışmanın α -glukozidaz sonucu sulu ve etanollü ekstraktları IC₅₀ değerleri sırasıyla 9.37 μ g/mL ve 7.97 μ g/mL ve α -amilaz sonucu 1196.38 μ g/mL ve 234.26 μ g/mL'dir (Salhi vd., 2021).

Tunus'ta farklı ülkelerden toplanmış *P. nigra*'nın 9 alt türüne ait çam iğnelerinden elde edilen uçucu yağ ekstraktı ile α -amilaz inhibisyon çalışması yapılmış olup en iyi inhibisyonu 26.6% ile *P. nigra pallasiana* vermiştir (Mezni vd., 2022).

Yapılan literatürde araştırmaları sonucunda *P. sylvestris*, *P. nigra* ve *P. brutia* türlerinden yapılmış kozalak şuruplarının fenolik ve flavonoid madde içeriği, diğer antioksidan analizler ve antidiyabetik etkisine ilişkin karşılaştırmalı bir çalışmaya rastlanmamıştır.

Kahramanmaraş'ta toplanan *Cedrus libani* ve *Pinus nigra* subsp. *pallasiana* türlerinin yaprak ve kozalaklarına ait uçucu yağların aylara göre antimikrobiyal aktivitesindeki değişim araştırılmış olup *P. nigra* yaprak ve kozalak uçucu yağları, nisan

ve temmuz ayına nazaran eylül ayında toplanan materyallerde daha iyi anitimikrobiyal aktivite göstermiştir (Demirci vd., 2020).

Literatüre kazandırılmak üzere yapılmış bu tez çalışması kapsamında üç çam türünden elde edilen kozalak şuruplarının toplam fenolik madde miktarı analizinde en yüksek değer *P. sylvestris*'te (3046 mgGAE/100g) olup onu sırasıyla *p. nigra* (2755 mgGAE/100g) ve *P. brutia* (2461 mgGAE/100g) takip etmiştir (Sarıçam>Karaçam>Kızılçam).

Toplam flavonoid madde miktarı analizinde iki farklı standartla çalışılarak en yüksek değer yine *P. sylvestris*'te (455.82 mgKAE/100g, 201.54 mgKUE/100g) olup onu sırasıyla *P. nigra* (377.38 mgKAE/100g, 166.93 mgKUE/100g) ve *P. brutia* (312.27 mgKAE/100g, 138.21 mgKUE/100g) takip etmiştir.

ABTS^{•+} analizinde Troloks[®] standardına karşı değerlendirme yapılarak en iyi SC₅₀ değeri *P. sylvestris*'te (0.1373 mg/mL) olup onu sırasıyla *P. nigra* (0.1899 mg/mL), *P. brutia* (0.1949 mg/mL) ve Troloks[®] (0.4020 mg/mL) takip etmiştir. Aktivite yüzdeleri hesaplanmış olup sırasıyla *P. sylvestris*>*P. nigra*>*P. brutia* (%67.351, %56.518, %46.548) şeklindedir.

DPPH analizinde Troloks[®] ve α -tokoferol standardına karşı değerlendirme yapılarak Troloks[®]'tan sonra (0.0907 mg/mL) en iyi SC₅₀ değerini sırasıyla *P. sylvestris* (0.1670 mg/mL), *P. nigra* (0.2268 mg/mL), *P. brutia* (0.2279 mg/mL) ve α -tokoferol (0.2476 mg/mL) almıştır. Aktivite yüzdeleri hesaplanmış olup sırasıyla *P. sylvestris*>*P. nigra*>*P. brutia* (%57.375, %53.298, % 45.669) şeklindedir.

FRAP analizinde en yüksek değer *P. sylvestris*'te (9.946 mg TEAC/mL) olup onu sırasıyla *P. nigra* (7.041 mgTEAC/mL) ve *P. brutia* (5.655 mg TEAC/mL) takip etmiştir.

CUPRAC analizinde en yüksek değer *P. sylvestris*'te (20.26 mg TEAC/mL) olup onu sırasıyla *P. nigra* (15.75 mg TEAC/mL) ve *P. brutia* (14.66 mg TEAC/mL) takip etmiştir.

LC-MS/MS analizinde bu üç türe ait kozalak şuruplarındaki fenolik bileşikler karşılaştırılmıştır. Şuruplardaki fenolik bileşiklerin miktarları türler arasında farklılık göstermekle birlikte aynı fenolik bileşiklere rastlanmıştır. *P. sylvestris* kozalağı şurubunda özellikle sinnamik asit, gentisik asit, gallik asit ve T-3-OH sinnamik asit bileşikleri diğerlerine oranla daha yüksek miktardadır (>0.4). *P. nigra* kozalağı şurubunda özellikle gentisik asit ve sinnamik asit bileşikleri diğerlerine oranla daha yüksek miktardadır (>0.4). *P. brutia* kozalağı şurubunda ise özellikle gentisik asit ve gallik asit bileşikleri diğerlerine oranla oldukça yüksek miktardadır (>0.7).

Enzim inhibisyonu metoduyla yapılan antidiyabetik aktivite çalışmasında en iyi IC₅₀ değeri *P. nigra*'da 0.885 mg/mL olup onu sırasıyla *P. brutia* (1.173 mg/mL) ve *P. sylvestris* (1.561 mg/mL) takip etmiştir.

Antimikrobiyal analizde kozalak şuruplarının 1:100 seyreltik örneklerinde MIC değerleri mm cinsinden belirlenmiştir. Kızılçam kozalak şurubunun sadece *Escherichia coli*'ye (5.12 mm), karaçam kozalak şurubunun *Escherichia coli* (5.20 mm), *Staphylococcus aureus* (4.15 mm) ile *Bacillus cereus*'e (5.35 mm) karşı antibakteriyal aktivite gösterdiği belirlenmiştir. Sarıçam kozalak şurubunun ise çalışmada kullanılan mikroorganizmalara karşı herhangi bir antimikrobiyal aktivite göstermediği belirlenmiştir.

5. SONUÇ VE ÖNERİLER

Bu çalışmada sarıçam (*P. sylvestris*), karaçam (*P. nigra*) ve kızılçam (*P. brutia*) türlerinden aynı şartlarda kozalak şurupları hazırlanmış, elde edilen şurupların biyoaktif (fenolik-flavonoid) bileşen içerikleri, antioksidan, antidiyabetik ve antimikrobiyal aktiviteleri araştırılmıştır.

Toplam fenolik madde miktarları gallik asit eşdeğeri (GAE) cinsinden hesaplanmış olup 3046 mgGAE/100g ile 2461 mgGAE/100g arasındadır. TPC tayininde en yüksek değere sarıçamdan elde edilen şurupta ulaşılmıştır. Çalışmada kullanılan üç çam türünden elde edilen şuruplarda toplam fenolik madde miktarı sarıçam>karaçam>kızılçam şeklindedir.

Toplam flavonoid madde miktarları kateşin (KAE) ve kuersetin eşdeğeri (KUE) cinsinden hesaplanmış olup 455.82 mgKAE/100g ile 312.27 mgKAE/100g ve 201.54 mgKUE/100g ile 138.21 mgKUE/100g arasındadır. TFC tayininde en yüksek değere sarıçamdan elde edilen şurupta ulaşılmıştır. Çalışmada kullanılan üç çam türünden elde edilen şuruplarda toplam flavonoid madde miktarı sarıçam>karaçam>kızılçam şeklindedir.

LC-MS/MS analizinde üç türe ait kozalak şuruplarındaki fenolik bileşikler karşılaştırıldığında, şuruplardaki fenolik madde miktarları türler arasında farklılık göstermekle birlikte aynı fenolik bileşiklere rastlanmıştır. Sarıçam kozalağı şurubunda özellikle sinamik asit, gentisik asit, gallik asit ve T-3-OH sinamik asit bileşikleri içerdiği diğer bileşiklere oranla daha yüksek miktardadır (>0.4). Karaçam kozalağı şurubunda özellikle gentisik asit ve sinamik asit bileşikleri içerdiği diğer bileşiklere oranla daha yüksek miktardadır (>0.4). Kızılçam kozalağı şurubunda ise özellikle gentisik asit ve gallik asit içerdiği diğer bileşiklere oranla oldukça yüksek miktardadır (>0.7).

ABTS^{•+} radikali giderme aktivitesi Troloks[®]'a karşı değerlendirilerek SC₅₀ değerleri hesaplanmış olup en yüksek aktiviteyi sarıçamdan elde edilen şurup göstermiştir. Üç farklı çam türünden elde edilen şuruplarda ABTS^{•+} radikali giderme aktivitesi sarıçam>karaçam>kızılçam şeklindedir.

DPPH[•] radikali giderme aktivitesi Troloks[®] ve α -tokoferole karşı değerlendirilerek SC₅₀ değerleri hesaplanmış olup en yüksek aktiviteyi sarıçamdan elde

edilen şurup göstermiştir. Üç farklı çam türünden elde edilen şuruplarda DPPH• radikali giderme aktivitesi sarıçam>karaçam>kızılçam şeklindedir.

CUPRAC analizinde şurupların indirgeme kapasitesi TEAC cinsinden hesaplanmış olup en yüksek aktiviteyi sarıçamdan elde edilen şurup göstermiştir. Üç farklı çam türünden elde edilen şuruplarda indirgeme kapasitesi sarıçam>karaçam>kızılçam şeklindedir.

FRAP analizinde şurupların indirgeme gücü TEAC cinsinden hesaplanmış olup en yüksek aktiviteyi sarıçamda elde edilen şurup göstermiştir. Üç farklı çam türünden elde edilen şuruplarda indirgeme gücü sarıçam>karaçam>kızılçam şeklindedir.

α -glukozidaz enzim inhibisyonu aktivite analizinde şurupların IC₅₀ değerleri hesaplanmış olup en yüksek inhibisyon etkisini karaçamdan elde edilen şurup göstermiştir. Üç farklı çam türünden elde edilen şuruplarda inhibisyon etkisi karaçam>kızılçam>sarıçam şeklindedir.

Antimikrobiyal analizde karaçam kozalak şurubunun *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* ile *Bacillus cereus*'e karşı olmak üzere en fazla antibakteriyal aktivite gösterdiği belirlenmiştir. Sarıçam kozalak şurubu ise çalışmada kullanılan mikroorganizmalara karşı herhangi bir antimikrobiyal aktivite göstermemiştir.

Yapılan tez çalışması bulguları doğrultusunda çam kozalağından elde edilen şurupların iyi birer antioksidan kaynağı olduğu belirlenmiştir. Bunun yanı sıra hazırlanan şurupların α -glukozidaz enzimini inhibe ederek antidiyabetik etki gösterdiği tespit edilmiştir. Ülkemizde geleneksel olarak hazırlanıp tüketilen bu şuruplarda toksikolojik testler yapıldığı takdirde, diyabet ve oksidatif stresin yol açtığı diğer hastalıkların tedavisinde kullanılan sentetik ilaçlara alternatif olarak bitkisel drog ya da takviye gıda olarak üretilbilir.

Böylelikle, kozalak şuruplarının ilaç ve gıda sektöründe kullanım potansiyelinin belirlenmesine yönelik gelecekte yapılacak çalışmalara katkı sağlayacağı düşünülmektedir.

KAYNAKÇA

- Abdullah, A. A., Yeoman, M. M., ve Grace, J. (1989). Calabrian pine (*Pinus brutia* Tenore). In *Trees II* (pp. 507-525). Springer, Berlin, Heidelberg.
- Acs, K., Balazs, V. L., Kocsis, B., Bencsik, T., Böszörményi, A. ve Horvath, G. (2018). Antibacterial activity evaluation of selected essential oils in liquid and vapor phase on respiratory tract pathogens. *BMC Complement. Altern. Med.* 18, 227.
- Akkuş, S. A. (2013). *Direkt Organogenesis Yöntemi ile Çoğaltılan Kızılçam'da (Pinus Brutia Ten.) Sürgün Gelişiminin Optimize Edilmesi, Yüksek Lisans Tezi, Akdeniz Üniversitesi, Biyoloji Anabilim Dalı, Antalya.*
- Akyurt, B. (2014). *Ülkemizde tüketilen bazı yaprakların antioksidan ve antidiyabetik aktivitelerinin belirlenmesi. Yüksek Lisans Tezi, Erciyes Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Gıda Mühendisliği Ana Bilim Dalı, Kayseri.*
- Albishi, T., John, J. A., Al-Khalifa, A. S., Shahidi, F. (2013). Antioxidant, anti-inflammatory and DNA scission inhibitory activities of phenolic compounds in selected onion and potato varieties. *Journal of Functional Foods*, 5(2), 930-939.
- Alptekin, Ü. (1990). Halepçanı (*Pinus halepensis* Mill.)'nın Türkiye ağaçlandırma çalışmalarındaki yeri ve doğal yayılışına ait bazı tespitler. *İstanbul Üniversitesi Orman Fakültesi Dergisi*, 40(2), 110-122.
- Alvarez, M. A. (2014). *Plant Biotechnology for Health: From Secondary Metabolites to Molecular Farming*, Springer International Publishing, Switzerland
- American Diabetes Association (2018). 2. Classification and diagnosis of diabetes: standards of medical care in diabetes. *Diabetes Care*, 41, (Suppl. 1), 13-27.
- American Diabetes Association. (2014). Diagnosis and classification of diabetes mellitus. *Diabetes Care*, 37(1), 81-90.
- Apak, R., Güçlü, K., Özyürek, M. ve Karademir, S. E. (2004). Novel total antioxidant capacity index for dietary polyphenols and vitamins C and E, using their cupric ion reducing capability in the presence of neocuproine: cuprac method. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52(26), 7970-7981.
- Arıtılık, Z. C. ve Ezer, N. (2021). Halk Arasında Diyabete Karşı Kullanılan Bitkiler (Türkiye)-II. *Hacettepe Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Dergisi*, 32, 179-208.
- Aslan M., Orhan N. (2010). Diyabet Tedavisinde Kullanılan Bitkisel Ürünler ve Gıda Destekleri. *Mised*, 24, 28-37.

- Atak, E., Uslu ve M. E., (2018). Fenolik Bileşikler, Ekstraksiyon Metotları ve Analiz Yöntemleri. *M.C.B.Ü. Soma Meslek Yüksekokulu*, 27(3).
- Baczek, K. B., Kosakowska, O., Przybyl, J. L., Pioro-Jabrucka, E., Costa, R., Mondello, L., ... ve Weglarz, Z. (2017). Antibacterial and antioxidant activity of essential oils and extracts from costmary (*Tanacetum balsamita* L.) and tansy (*Tanacetum vulgare* L.). *Industrial Crops and Products*. 102, 154-163.
- Baydar, H. (2009). “Sekonder metabolitlerin önemi”. Tıbbi ve Aromatik Bitkiler Bilimi ve Teknolojisi. Süleyman Demirel Üniversitesi Yayın No:51 Ziraat Fakültesi. DÜ Basım Evi. Isparta. S: 45-63.
- Baysal, B. (2004a). *Escherichia coli*. A.T.Cengiz (Editör). Tıp ve dişhekimliğinde genel ve özel mikrobiyoloji, Güneş Kitabevi, 453-459, Ankara.
- Baysal, B. (2004b). *Salmonella*. A. T. Cengiz (Editör). Tıp ve dişhekimliğinde genel ve özel mikrobiyoloji, Güneş Kitabevi, 467-473, Ankara.
- Benzie, I. F. ve Strain, J. J. (1996). The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of “antioxidant power”: the FRAP assay. *Analytical Biochemistry*, 239(1), 70-76.
- Biemer, J. J., (1973). Antimicrobial Susceptibility Testing by The Kirby-Bauer Disc Diffusion Method. *Annalyses of Clinical Laboratory Science*. 3, 135-140.
- Bilgehan, H. (1995). Klinik Mikrobiyoloji, 9. Basım, Fakülteler Kitabevi Barış Yayınları, İzmir, 629 s.
- Brand-Williams, W., Cuvelier, M. E. ve Berset, C. L. W. T. (1995). Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *LWT-Food Science and Technology*, 28(1), 25-30.
- Büyüköztürk, K. (1992). Diabetes Mellitus (Şekerli Diyabet), B. S. Hastalıkları. İstanbul Tıp Fakültesi Vakfı, İstanbul. s. 190-207.
- Cai, X., Qi, J., Xu, Z., Huang, L., Li, Y., Ren, X. ve Kong, Q. (2022). Three stilbenes make difference to the antifungal effects on ochratoxin A and its precursor production of *Aspergillus carbonarius*. *Food Microbiology*, 103, 103967.
- Chang, C. C., Yang, M. H., Wen, H. M. ve Chern, J. C. (2002). Estimation of total flavonoid content in propolis by two complementary colometric methods. *Journal of Food and Drug Analysis*, 10(3), 3.
- Chang, C. H., Lin, H. Y., Chang, C. Y., ve Liu, Y. C. (2006). Comparisons on the antioxidant properties of fresh, freeze-dried and hot-air-dried tomatoes. *Journal of Food Engineering*, 77(3), 478-485.

- Cowan, M.M. (1999). Plant products as antimicrobial agents. *Clinical Microbiology Reviews*. 12(4), 564-582.
- Cretu, E., Karonen, M., Salminen, J. P., Mircea, C., Trifan, A., Charalambous, C., ... ve Miron, A. (2013). In vitro study on the antioxidant activity of a polyphenol-rich extract from *Pinus brutia* bark and its fractions. *Journal of Medicinal Food*, 16(11), 984-991.
- Çolak, D., Semerci, A., Semerci, H., (2014). Sarıçam (*Pinus sylvestris* L.), Anadolu Karaçamı (*Pinus nigra* Arn. subsp. *pallasiana* (Lamb.) Holmboe) ve Toros Sedirinde (*Cedrus libani* A. Rich.) dona dayanıklılık. II. Ulusal Akdeniz Orman ve Çevre Sempozyumu
- Dawn, B. M., Allan, D. M. ve Colleen, M. S. (1996). Basic Medical Biochemistry - A Clinical Approach. *Seneca Valley Books & Paper Collectibles*, New York, 806 s.
- Demir, T., Akpınar, Ö., Kara, H., Güngör, H. (2019). Nar (*Punica granatum* L.) kabuğunun in vitro antidiyabetik, antienflamatuar, sitotoksik, antioksidan ve antimikrobiyal aktivitesi. *Akademik Gıda*, 17(1), 61-71.
- Demirci, A. N., Çömlekçioğlu, N. ve Aygan, A. (2020). Determination of the chemical composition, antimicrobial activity and flavonoid content of the essential oils of *Cedrus libani* and *Pinus nigra* subsp. *pallasiana*. *Food Science and Technology*. 8(8), 1747-1754.
- Durazzo, A., Lucarini, M., Souto, E. B., Cicala, C., Caiazzo, E., Izzo, A. A., Novellino, E. ve Santini, A. (2019). Polyphenols: A concise overview on the chemistry, occurrence, and human health. *Phytotherapy Research*, 33(9), 2221-2243.
- Dündar V. ve Öztürk D. (2002). Stafilokok İnfeksiyonları. Topçu A.W., Söyletir G., Doğanay M. (Editörler), İnfeksiyon Hastalıkları ve Mikrobiyolojisi, 4. Cilt, Nobel Tıp Kitabevleri, 1507-1516, İstanbul.
- Dziedzinski, M., Kobus-Cisowska, J., Szymanowska-Powalowska, D., Stuper-Szablewska, K., ve Baranowska, M. (2020). Polyphenols composition, antioxidant and antimicrobial properties of *Pinus sylvestris* L. shoots extracts depending on different drying methods. *Emirates Journal of Food and Agriculture*, 229-237.
- Ekici, L., Telli, R. ve Yetim, H. (2008). Gıda kaynaklı enfeksiyon ve intoksikasyon bakterileri. 1. *Gıda Teknolojileri Elektronik Dergisi*, 2, 29-42.
- El-Manawaty, M. ve Gohar, L. (2018). In vitro alpha-glucosidase inhibitory activity of egyptian plant extract as an indication for their antidiabetic activity. *Asian Journal of Pharmaceutical and Clinical Research*, 11, 7.

- Erlund, I., Koli, R., Alfthan, G., Marniemi, J., Puukka, P., Mustonen, P., ... Jula, A. (2008). Favorable effects of berry consumption on platelet function, blood pressure, and HDL cholesterol. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 87(2), 323-331.
- Fisher, L., Ianiro, T., Lau, F., Wang, H. ve Daggy, B. (2015). Synergistic effects of phenolic mixtures in human cell models of aging. *The FASEB Journal*, 29, 608-36.
- Frevel, M. A., Pipingas, A., Grigsby, W. J., Frampton, C. M. ve Gilchrist, N. L. (2012). Production, composition and toxicology studies of Enzogenol® *Pinus radiata* bark extract. *Food and Chemical Toxicology*, 50(12), 4316-4324.
- Frontela-Saseta, C., López-Nicolás, R., González-Bermúdez, C. A., Martínez-Graciá, C. ve Ros-Berruezo, G. (2013). Anti-inflammatory properties of fruit juices enriched with pine bark extract in an in vitro model of inflamed human intestinal epithelium: The effect of gastrointestinal digestion. *Food and Chemical Toxicology*, 53, 94-99.
- Frontela-Saseta, C., López-Nicolás, R., González-Bermúdez, C. A., Peso-Echarri, P., Ros-Berruezo, G., Martínez-Graciá, C. ve Virgili, F. (2011). Evaluation of antioxidant activity and antiproliferative effect of fruit juices enriched with Pycnogenol® in colon carcinoma cells. The effect of in vitro gastrointestinal digestion. *Phytotherapy Research*, 25(12), 1870-1875.
- Gamlı, Ö. F. (2022). Phsicochemical Properties of Pine Cone Molasses (Pekmez) from *Pinus nigra* and *Pinus brutia* in Osmaniye. *Journal of Food Processing and Preservation*, e17264.
- Gavin, L. (1998). New classification and diagnostic criteria for Diabetes mellitus. *Clinical Cornerstone*, 1(3), 1-12.
- Giugliano, D., Ceriello, A. ve Esposito, K. (2008). Glucose Metabolism and Hyperglycemia. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 87(1), 217-222.
- Gökçen, İ. S., Keskin, N., Kunter, B., Cantürk, S. ve Karadoğan, B. (2017). Üzüm Fitokimyasalları ve Türkiye’de Yetiştirilen Üzüm Çeşitleri Üzerindeki Araştırmalar. *Turkish Journal of Forest Science*, 1(1), 93-111.
- Gülçin, İ., Büyükokuroğlu, M. E., Oktay, M., ve Küfrevioğlu, Ö. İ. (2003). Antioxidant and analgesic activities of turpentine of *Pinus nigra* Arn. subsp. *pallsiana* (Lamb.) Holmboe. *Journal of Ethnopharmacology*, 86(1), 51-58.

- Halliwell, B ve Gutteridge, J. M. C. (1985). The Importance of Free Radicals and Catalytic Metal Ions In Human Diseases. *Molecular Aspects Medicine*, 8(2), 89-193.
- Haminiuk, C. W., Maciel, G. M., Plata-Oviedo, M. S. ve Peralta, R. M. (2012). Phenolic compounds in fruits—an overview. *International Journal of Food Science & Technology*, 47(10), 2023-2044.
- Hendek Ertop, M. ve İncemehmetoğlu, E. (2021). Çam (Pinus spp.) Türlerinin ve Fraksiyonlarının Gıda Takviyesi ve Tıbbi Bitki Olarak Kullanım Olanakları. *Iğdır Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi*, 12(1), 266-278.
- Hollman, P. C. H., Hertog, M. G. L. ve Katan, M. B., (1996). Analysis and health effects of flavonoids. *Food Chemistry*, 57 (1), 43-46.
- International Diabetes Federation (2022). What is diabetes. 12 Kasım 2022 tarihinde <https://www.idf.org/aboutdiabetes/what-is-diabetes.html> üzerinden erişildi.
- Ioannidis, K., Melliou, E., Alizoti, P., ve Magiatis, P. (2017). Identification of black pine (Pinus nigra Arn.) heartwood as a rich source of bioactive stilbenes by qNMR. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 97(6), 1708-1716.
- Isajev, V., Fady, B., Semerci, H., ve Andonovski, V. (2004). *EUFORGEN Technical Guidelines for genetic conservation and use for European black pine (Pinus nigra)*. Bioversity International.
- İncemehmetoğlu, E. (2021). *Geleneksel Çam Kozalağı Pekmezinin Fizikokimyasal, Biyoaktif ve Fonksiyonel Özelliklerinin Araştırılması, Yüksek Lisans Tezi, Kastamonu Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Sürdürülebilir Tarım Ve Tabii Bitki Kaynakları Ana Bilim Dalı, Kastamonu*.
- Jan, S., ve Abbas, N. (2018). Himalayan phytochemicals: sustainable options for sourcing and developing bioactive compounds. *Elsevier.*, 65-76.
- Karabulut, H. ve Gülay, M. Ş. (2016a). Antioksidanlar. *Mehmet Akif Ersoy Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*, 1(1), 65-76
- Karabulut, H. ve Gülay, M. Ş. (2016b). Serbest Radikaller. *Mehmet Akif Ersoy Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Dergisi*, 4 (1), 50-59.
- Kaur, C. ve Kapoor, H. C. (2001). Antioxidants in fruits and vegetables – the millenium’s healt. *International Journal of Food Science and Technology*, 36, 703-725.
- Kaur, S. ve Mondal, P. (2014). Study of total phenolic and flavonoid content, antioxidant activity and antimicrobial properties of medicinal plants. *Journal of Microbiology & Experimentation*. 1(1), 5.

- Kivrak, I., Kivrak, S., Harmandar, M. ve Cetintas, Y. (2013). Phenolic compounds of *Pinus brutia* ten.: chemical investigation and quantitative analysis using an ultra-performance liquid chromatography tandem mass spectrometry with electrospray ionization source. *Records of Natural Products*, 7(4), 313.
- Krakau, U. K., Liesebach, M., Aronen, T., Lelu-Walter, M. A. ve Schneck, V. (2013). Scots pine (*Pinus sylvestris* L.). In *Forest tree breeding in Europe* (pp. 267-323). Springer, Dordrecht.
- Kris-Etherton, P. M., Lichtenstein, A. H., Howard, B. V., Steinberg, D. ve Witztum, J. L. (2004). Antioxidant vitamin supplements and cardiovascular disease. *Circulation*, 110(5), 637- 641.
- Kuzugudenli, E., (2018). Effect of microwave radiation on growth and germination of stone pine (*pinus pinea* l.) seedlings. *Applied Ecology and Environmental Research*. 16(3), 2837-2844.
- Laura, A., Moreno-Escamilla, J. O., Rodrigo-García, J. ve Alvarez-Parrilla, E. (2019). Phenolic compounds. In *Postharvest Physiology and Biochemistry of Fruits and Vegetables* (pp. 253-271). Woodhead Publishing.
- López-Alarcón, C. ve Denicola, A. (2013). Evaluating the antioxidant capacity of natural products: a review on chemical and cellular-based assays. *Analytica chimica acta*, 763, 1–10.
- Marmol, I., Quero, J., Jimenez-Moreno, N., Rodriguez-Yoldi, M.J. ve Ancin-Azpilicueta, C. (2019). A systematic review of the potential uses of pine bark in food industry and health care. *Trends in Food Science & Technology*, 88, 558-566.
- Mayerson, A. B. ve Inzucchi, S. E. (2002). Type 2 diabetes therapy: a pathophysiologically based approach. *Postgraduate Medicine*, 111(3), 83-95.
- Menin, A. (2012). Henri Leclerc and the birth of modern phytotherapy. *European Journal of Integrative Medicine*, 4, 187.
- Meriçli, F. (1994). Eczacılıkta Bitkilerden Yararlanma Şekilleri, s. 6-27. In: Bitkilerle Tedavi, Eczacı Odası Yayınları, İstanbul.
- Mezni, F., Fkiri, S., Khouja, M.L., Nasr, Z. ve Khaldi, A. (2022). In vitro α -amylase inhibitory activity of the essential oils of *pinus nigra* arn.: A preliminary assay. *Journal of Food Chamistry and Nanotechnology*. 8(1), 18-20.
- Mustafa, S. K., Oyouni, A. A. W. A., Aljohani, M. M. ve Ahmad, M. A. (2020). Polyphenols more than an antioxidant: Role and scope. *Journal of Pure & Applied Microbiology*, 14(1), 47-61.

- Nazari, S., Nazarnezhad, N. ve Ebrahimzadeh M. (2013). Evaluation of antioxidant properties and total phenolic and flavonoids content of *Eucalyptus camaldulensis* and *Pinus sylvestris* bark. *Iranian Journal of Wood and Paper Science Research*, 28, 522-533.
- Nocun, M., Ulicna, O., Muchova, J., Durackova, Z. ve Watala, C. (2008). French maritime pine bark extract (Pycnogenol®) reduces thromboxane generation in blood from diabetic male rats. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 62(3), 168-172.
- Pandey, K. B. ve Rizvi, S. I. (2009). Plant polyphenols as dietary antioxidants in human health and disease. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2(5), 270-278.
- Parıldar, H., Serter, R. ve Yeşilada, E. (2021). Diabetes mellitus and phytotherapy in Turkey. *Journal of the Pakistan Medical Association*, 61, 1116-1136.
- Patlevski R., Hadzija M., Slijepcevic M. ve Juretic D. (2001). Effect Of Antidiabetis Herbal Preperation On Serum Glucose and Fructosamine in NOD Mice. *Journal of Ethnopharmacology*, 75, 181-184.
- Piechowiak, T., Balawejder, M., Grzelak-Blaszczyk, K., Oracz, J. ve Matlok, N. (2023). Antioxidant activity of fruit jellies enriched with phytochemicals from *Pinus sylvestris* L. *LWT*, 173, 114262.
- Pisoschi, A. M. ve Pop, A. (2015). The role of antioxidants in the chemistry of oxidative stress: A review. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 97, 55–74.
- Pitkanen, O. M., Martin, J. M., Hallman, M., Akerblom, H. K., Sariola, H., Andersson S.M. (1992). Free radikal activity during development of insülin dependent diabetes mellitus in the rat. *Life Sciences*, 50(5), 335-339.
- Poussard, S., Pires-Alves, A., Diallo, R., Dupuy, J. W. ve Dargelos, E. (2013). A natural antioxidant pine bark extract, oligopin®, regulates the stress chaperone HSPB1 in human skeletal muscle cells: a proteomics approach. *Phytotherapy Research*, 27(10), 1529-1535.
- Powers, A. C. ve D’alessio, D. (2011). Endocrine pancreas and pharmacotherapy of diabetes mellitus and hypoglycemia. Goodman and Gilman’s The Pharmacological Basis of Therapeutics 12th edition. Edited by Brunton LL, Chabner BA, Knollman BC. New York: McGraw Hill Publishers, 1237-1274.
- Re, R., Pellegrini, N., Proteggente, A., Pannala, A., Yang, M. ve Rice-Evans, C. (1999). Antioxidant activity applying an improved abts radical cation decolorization assay. *Free Radical Biology and Medicine*, 26(9-10), 1231-1237.

- Rice-Evans, C. A., Miller, N. J., Bolwell, P.G., Bramley, P. M. ve Pridham, J. B. (1995). The relative antioxidant activities of plant-derived polyphenolic flavonoids. *Free Radical Research*, 22(4), 375-383.
- Robertson, R. P., Harmon, J., Tran, P. O. ve Poitout, V. (2004). B-cell glucose toxicity, lipotoxicity and chronic oxidative stress in type 2 diabetes. *Diabetes*, 53, 119-124.
- Roglic, G. (2016). WHO Global report on diabetes: A summary. *International Journal of Non-communicable Diseases*, 1, 3-8.
- Ruberto, G., Renda, A., Daquino, C., Amico, V., Spatafora, C., Tringali, C., ve De Tommasi, N. (2007). Polyphenol constituents and antioxidant activity of grape pomace extracts from five Sicilian red grape cultivars. *Food Chemistry*, 100(1), 203-210.
- Said, O., Aksut, Y., Yardımcı, R. E., Karatas, S., Yigit, H., Tel, A. Z. ve Arda, N. (2022). Antioxidant and antibacterial activities of methanol extracts from various plant parts of pomegranate an anatolian black pine. *Current Perspectives on Medicinal and Aromatic Plants (CUPMAP)*, 5(1), 50-62.
- Saldamlı, İ. (1998). Gıda Kimyası. Hacettepe Üniversitesi, Mühendislik Fakültesi Gıda Mühendisliği, 489-495 s, Ankara.
- Salhi, S., Bouyahya, A., El Guourami, O., El Jemli, M., Bourais, I., Zellou, A., Faouzi, A. (2021). Investigation of in vitro and in vivo antioxidant and antidiabetic activities of Pinus halepensis extracts. *Journal of Herbmed Pharmacology*. 10(1), 123-131.
- Shahidi, F. ve Yeo, J. (2016). Insoluble-bound phenolics in food. *Molecules*, 21(9), 1216.
- Shao, S., Yi, J., Regenstein, J. M., Cheng, C., Zhang, H., Zhao, H. ve Wang, Z. (2018). Protective effects on 60Co- γ radiation damage of pine cone polyphenols from pinus koraiensis-loaded chitosan microspheres in vivo. *Molecules*, 23(6), 1392.
- Sharma, A., Goyal, R. ve Sharma, L. (2015). Potential biological efficacy of Pinus plant species against oxidative, inflammatory, and microbial disorders. *BMC Complementary and Alternative Medicine*. 16(1), 1-11.
- Slinkard, K. ve Singleton, V. L. (1977). Total phenol analysis: automation and comparison with manual methods. *American Journal of Enology and Viticulture*, 28(1), 49-55.

- Smeriglio, A., Barreca, D., Bellocco, E. ve Trombetta, D. (2017). Proanthocyanidins and hydrolysable tannins: occurrence, dietary intake and pharmacological effects. *British Journal of Pharmacology*, 174(11), 1244-1262.
- Sokol-Letowska, A., Oszmianski, J. ve Wojdylo, A. (2007). Antioxidant activit of the phenolic compounds of hawthorn, pine and skullcap. *Food Cheistry*, 103, 853-859.
- Spencer, J. P., Abd El Mohsen, M. M., Minihane, A. M. ve Mathers, J. C. (2008). Biomarkers of the intake of dietary polyphenols: strengths, limitations and application in nutrition research. *British Journal of Nutrition*, 99(1), 12-22.
- Suyundikov, M. (2020). *Eber sarısı bitkisinin α -amilaz, α -glukozidaz, tirozinaz, asetilkolin esteraz enzimlerini inhibe edici özellikleri ile esansiyel yağ asidi içeriğinin belirlenmesi, Yüksek Lisans Tezi, Afyon Kocatepe Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Afyonkarahisar.*
- Tao, Y., Zhang, Y., Cheng, Y. ve Wang, Y. (2013). Rapid screening and identification of α -glucosidase inhibitors from mulberry leaves using enzyme-immobilized magnetic beads coupled with HPLC/MS and NMR. *Biomedical Chromatography*, 27(2), 148-155.
- Thangapazham, R. L., Sharma, A. ve Maheshwari, R. K. (2006). Multiple molecular targets in cancer chemoprevention by curcumin. *The AAPS Journal*, 8(3), E443.
- Tiedge, M., Lortz, S., Drinkgern, J. ve Lenzen, S. (1997). Relation between antioxidant enzyme gene expression and antioxidative defense status of insülin-producing cells. *Diabetes*, 46, 1733-1740.
- Tomba, T. (2008). *Fıstıkçamı (Pinus pinea L.)'nın somatik embriyogenesis ve tomurcuk kültürü yoluyla in vitro çoğaltımı, Yüksek Lisans Tezi, Adnan Menderes Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Aydın.*
- Topal, M. (2020). Secondary Metabolites of Ethanol Extracts of *Pinus sylvestris* Cones from Eastern Anatolia and Their Antioxidant, Cholinesterase and α -Glucosidase Activities, *Records of Natural Products*, 14(2), 129-138.
- Tsao, R. (2010). Chemistry and biochemistry of dietary polyphenols. *Nutrients*, 2(12), 1231-1246.
- Tupçu, Ş. ve Çölgeçen, H. (2015). Bitki Sekonder Metabolitlerinin Biyoreaktörlerde Üretilmesi. *Türk Bilimsel Derlemeler Dergisi*, 8(2), 9-29.

- Turgut, B. C., (2016). *Türkiye’de yayılış gösteren bazı ağaç türlerine ait uçucu yağların anti-biyofilm etkilerinin belirlenmesi, Yüksek lisans Tezi, Pamukkale Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalı, Denizli*
- TÜRKDİAB Diyabet Tanı ve Tedavi Rehberi 2021, Türkiye Diyabet Vakfı. Armoni Nüans Baskı Sanatları A.Ş., Güncellenmiş 10. Baskı, İstanbul, 2021. Erişim adresi:
https://www.turkdiab.org/admin/PICS/webfiles/Diyabet_Tani_ve_Tedavi_Rehberi_2021.pdf, Erişim tarihi: 03/10/2021.
- Türkiye Endokrinoloji ve Metabolizma Derneği. (2019). Diabetes Mellitus ve komplikasyonlarının tanı, tedavi ve izlem kılavuzu. 12. Baskı. Ankara: TEMD Yayınları; 2019, s: 87- 94.
- Türkiye Sağlık Enstitüleri Başkanlığı (2022). Diyabet Tarihi. 12 Kasım 2022 tarihinde https://www.tuseb.gov.tr/tuhke/uploads/yayinlar/diger/pdf/15-11-2021_6192992302e41_diyabet_tarihcesi_tr.pdf üzerinden erişildi.
- Ugartondo, V., Mitjans, M., Touriño, S., Torres, J. L. ve Vinardell, M. P. (2007). Comparative antioxidant and cytotoxic effect of procyanidin fractions from grape and pine. *Chemical Research in Toxicology*, 20(10), 1543-1548.
- Ustun, O., Senol, F. S., Kurkcuoglu, M., Orhan, I. E., Kartal, M. ve Baser, K. H. C. (2012). 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.
- Valko, M., Leibfritz, D. ve Moncola, J. (2007). Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 39, 44-84.
- Wang, L., Li, X. ve Wang, H., (2019). Physicochemical properties, bioaccessibility and antioxidant activity of the polyphenols from pinecones of *Pinus koraiensis*. *International Journal of Biological Macromolecule*. 126, 385-391.
- Wiegand, I., Hilpert, K. ve Hancock, R. (2008). Agar and broth dilution methods to determine the minimal inhibitory concentration (MIC) of antimicrobial substances. *Nature*. 3, 163-175.
- Willcox, J.K., Ash, S.L. Catignani, G.L. (2004). Antioxidants and prevention of chronic disease. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 44(4), 275-295.
- World Health Organization, (WHO), Diabetes, Fact Sheets Detail, 13 April, (2021).

- Yesil-Celiktas, O., Ganzera, M., Akgun, I., Sevimli, C., Korkmaz, K. S. ve Bedir, E. (2009). Determination of polyphenolic constituents and biological activities of bark extracts from different *Pinus* species. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 89(8), 1339-1345.
- Yıldırım, M. (2007). Enterokoklar ve enterokoklarla gelişen infeksiyonlar. *Düzce Üniversitesi Tıp Fakültesi Dergisi*, 2, 46-52.
- Yi, J., Qu, H., Wu, Y., Wang, Z. ve Wang, L. (2017). Study on antitumor, antioxidant and immunoregulatory activities of the purified polyphenols from pinecone of *Pinus koraiensis* on tumor-bearing S180 mice in vivo. *International Journal of Biological Macromolecules*, 94, 735-744.
- Yi, J., Wang, Z., Bai, H., Yu, X., Jing, J. ve Zuo, L. (2015). Optimization of purification, identification and evaluation of the in vitro antitumor activity of polyphenols from *Pinus koraiensis* pinecones. *Molecules*, 20(6), 10450-10467.
- Zhang, H. ve Tsao, R. (2016). Dietary polyphenols, oxidative stress and antioxidant and antiinflammatory effects. *Current Opinion in Food Science*, 8, 33-42.
- Zhang, X. L., Guo, Y. S., Wang, C. H., Li, G. Q., Xu, J. J., Chung, H. Y., ... Wang, G. C. (2014). Phenolic compounds from *Origanum vulgare* and their antioxidant and antiviral activities. *Food Chemistry*, 152, 300-306.
- Zimmet, P., Alberti, K. G. M. M. ve Shaw, J. (2001). Global and societal implications of the diabetes epidemic. *Nature*, 414, 782-787.
- Zou, P., Yang, X., Huang, W. W., Zhao, H. T., Wang, J., Xu, R. B., ... Qin, D. (2013). Characterization and bioactivity of polysaccharides obtained from pinecones of *Pinus koraiensis* by graded ethanol precipitation. *Molecules*, 18(8), 9933-9948.
- ZTBB (2010). Bitkilerle Tedavi Sempozyumu, Zeytinburnu

ÖZGEÇMİŞ

.....yılında.....doğdu. Orta öğretimini Lisesi'nde tamamladı. Lisans eğitimini İstanbul Üniversitesi Mühendislik Fakültesinde Kimyager diploması alarak tamamladı. 2014 yılında girdiği KPSS sınavından aldığı puanla 2015 yılında Sağlık Bakanlığına bağlı Halk Sağlığı Laboratuvarlarından Gümüşhane ilineolarak atandı. Gümüşhane'de görevini yapmakta iken 2019 yılında Gümüşhane Üniversitesi Lisansüstü Eğitim Enstitüsü Biyoteknoloji Anabilim dalında yüksek lisans eğitimine başladı. Şu an no.lu Halk Sağlığı Laboratuvarındaki klinikdışı laboratuvarı kimya biriminde görevini sürdürmektedir.