



**T.C.**

**BATMAN ÜNİVERSİTESİ  
LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ**

**GÜMÜŞ NANOPARTİKÜL (AgNP)  
UYGULAMALARININ *Pistacia lentiscus* L.  
SÜRGÜN KÜLTÜRLERİNDE ANTİOKSİDAN  
VE ANTİMİKROBİYAL AKTİVİTE ÜZERİNE  
ETKİLERİ**

**Orhan YEL**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**Biyoloji Anabilim Dalı**

**Haziran-2021  
BATMAN  
Her Hakkı Saklıdır**

## TEZ KABUL VE ONAYI

Orhan YEL tarafından hazırlanan “Gümüş Nanopartikül (AgNP) Uygulamalarının *Pistacia lentiscus* L. Sürgün Kùltürlerinde Antioksidan ve Antimikrobiyal Aktivite Üzerine Etkileri” adlı tez çalışması 28/06/2021 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından oy birliği ile Batman Üniversitesi Lisansüstü Eğitim Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalı’nda YÜKSEK LİSANS TEZİ olarak kabul edilmiştir.

### Jüri Üyeleri

### İmza

#### Başkan

Prof. Dr. Abdulselam ERTAŞ

#### Danışman

Prof. Dr. Engin TİLKAT

#### Üye

Dr. Öğr. Üyesi Alevcan KAPLAN

Yukarıdaki sonucu onaylarım.

Doç. Dr. Ömer Faruk ERTUĞRUL  
Enstitü Müdürü

## **TEZ BİLDİRİMİ**

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

## **DECLARATION PAGE**

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

İmza

Orhan YEL

Tarih: 28. 06. 2021

## ÖZET

### YÜKSEK LİSANS TEZİ

## GÜMÜŞ NANOPARTİKÜL (AgNP) UYGULAMALARININ *Pistacia lentiscus* L. SÜRGÜN KÜLTÜRLERİNDE ANTİOKSİDAN VE ANTİMİKROBİYAL AKTİVİTE ÜZERİNE ETKİLERİ

Orhan YEL

Batman Üniversitesi Lisansüstü Eğitim Enstitüsü  
Biyoloji Anabilim Dalı

Danışman: Prof. Dr. Engin TİLKAT

2021, 62 Sayfa

Jüri

Prof. Dr. Engin TİLKAT

Prof. Dr. Abdulselam ERTAŞ

Dr. Öğr. Üyesi Alevcan KAPLAN

Bu çalışmada, *Pistacia lentiscus* L. (Sakız ağacı)'nın *in vitro* çimlendirilmiş tohumlarından elde edilen sürgünler 2 mg/l Benziladenin (BA) ve 0.5 mg/l Giberellik asit (GA<sub>3</sub>) destekli MS besisi ortamında çoğaltılmıştır. Bu sürgünlere farklı konsantrasyonlarda Ag nanopartikül (NP) uygulamaları yapmak suretiyle kültüre alınan sürgünlerin bazı büyüme parametreleri ve biyolojik aktivite kapasitelerinin nasıl etkilendiği ile ilgili gerekli temel bilgileri içeren bir protokol geliştirilmiştir. *In vitro* çimlendirilen sakız fidelerine ait aksenik sürgünleri içeren MS besisi ortamlarına öncelikle (1, 2 ve 4 mg/l) 3 farklı konsantrasyonda Ag nanopartikül eklenmiş ve akabinde 4 haftalık kültür süresi sonrasında bu sürgünlere antioksidan ve antimikrobiyal aktivite testleri uygulanmıştır. AgNP uygulamalarının tohum çimlenmesi sonrası gelişen sürgünlerde, bazı fizyolojik büyüme parametreleri ve biyolojik aktivite kapasitesi üzerine etkileri test edilmiştir.

Genel olarak, AgNP uygulamalarının hem fenolik ve flavonoit madde miktarında hem de antioksidan ve antimikrobiyal aktivite bakımından kontrol grubuna oranla artışa yol açtığı tespit edilmiştir. Test edilen tüm parametreler arasında en yüksek toplam fenolik içerik 67.63±0.014 µg/mg ile 1 mg/l AgNP uygulamasından, en yüksek toplam flavonoit içerik ise, 18.53±0.006 µg/mg ile 2 mg/l AgNP uygulamasından elde edilmiştir. 1 mg/l AgNP uygulamasının diğer AgNP uygulamalarına oranla daha yüksek antioksidan aktivite (DPPH, ABTS ve CUPRAC) sonuçlarına sahip olduğu belirlenmiştir. Antimikrobiyal aktivite bakımından ise test edilen parametreler içerisinde, 1 mg/l AgNP uygulamasının *Candida albicans* (ATCC 10231) mantar ve *Escherichia coli* (ATCC 25922) bakteri suşlarına karşı orta derece, *Bacillus cereus* (DSSM 4312) bakteri suşuna karşı ise düşük derecede aktivite gösterdiği tespit edilmiştir.

**Anahtar Kelimeler:** AgNP, Antimikrobiyal, Antioksidan aktivite, *Pistacia lentiscus* L.

## ABSTRACT

## MS THESIS

### SILVER NANOPARTICLE (AgNP) APPLICATIONS EFFECTS ON ANTIOXIDANT AND ANTIMICROBIAL ACTIVITY IN THE SHOOT CULTURES of *Pistacia lentiscus* L.

Orhan YEL

INSTITUTE OF GRADUATE STUDIES  
OF BATMAN UNIVERSITY

Advisor: Prof. Dr. Engin TILKAT

2021, 62 Pages

Jury  
Prof. Dr. Engin TILKAT  
Prof. Dr. Abdulselam ERTAŞ  
Assist. Prof. Dr. Alevcan KAPLAN

In this study, shoots obtained from *in vitro* germinated seeds of *Pistacia lentiscus* L. (Mastic tree) were grown in MS medium supplemented with 2 mg/l Benzyladenine (BA) and 0.5 mg/l Gibberellic acid (GA<sub>3</sub>). A protocol has been developed that contains the necessary basic information about how different Ag nanoparticle (NP) concentration applications affect some growth parameters and biological activity capacities. Firstly, Ag nanoparticles at three different concentrations (1, 2 and 4 mg/l) were added to the axenic shoots of mastic seedlings germinated *in vitro*, antioxidant and antimicrobial activity tests were applied. The effects of AgNP applications on seed germination, some physiological growth parameters and secondary metabolite content were tested.

In general, it was determined that AgNP applications caused an increase in both the amount of phenolic and flavonoid substances and in terms of antioxidant and antimicrobial activity compared to the control group. Among all tested parameters, the highest total phenolic content was obtained from 1 mg/l AgNP with 67.63±0.014 µg/mg, and the highest total flavonoid content was obtained from the application of 2 mg/l AgNP with 18.53±0.006 µg/mg. Furthermore, it was determined that 1 mg/l AgNP application had higher antioxidant activity (DPPH, ABTS and CUPRAC) results than other AgNP applications. In terms of antimicrobial activity, it was determined that 1 mg/l AgNP application showed moderate activity against *Candida albicans* (ATCC 10231) fungus and *Escherichia coli* (ATCC 25922) bacterial strains and low activity against *Bacillus cereus* (DSSM 4312) bacterial strains the tested parameters.

**Keywords:** AgNP, Antimicrobial, Antioxidant activity, *Pistacia lentiscus* L.

## ÖNSÖZ

Tez çalışmamın belirlenmesinde ve yürütülmesinde bilgi, birikim ve tecrübelerinden her anlamda faydalandığım değerli Danışman hocam Prof. Dr. Engin TİLKAT'a, tez yazım sürecinde yardımlarını benden esirgemeyen ve bana daima güç veren değerli hocam Prof. Dr. Emine AYAZ TİLKAT'a, yine tez çalışmalarım boyunca bütün labaratuvar çalışmaları esnasında her zaman desteğini ve ilgisini hissettiğim bir abi samimiyetiyle bizlere yön gösteren, kendisini örnek aldığım değerli hocam Dr. Öğr. Üyesi Veysel SÜZERER'e, tezimin biyolojik aktivite testleri kısmında yardım ve katkılarını gördüğüm sayın hocalarım Doç. Dr. Nesrin HAŞİMİ ve Dr. Öğr. Üyesi İ. Selçuk KURU'ya, lisansüstü eğitimim boyunca tüm deney aşamalarında yardım ve ilgilerini çokça hissettiğim kıymetli hocam Dr. Ayşe HOŞER'e ve aynı dönemde beraber yüksek lisans eğitimine başladığım Zelal EREN'e sonsuz şükranlarımı sunuyorum.

Yaptığım tez çalışmasını; beni bugünlere getiren, maddi ve manevi her türlü desteğini gördüğüm canım babama ve özellikle geniş sabrı ile bana her zaman örnek olan, her zaman sevgisini yanımda hissettiğim ve bana bitki sevgisini aşılayan biricik anneme, çok kıymetli kardeşlerim Gülbeyaz, Leyla, Burhan ve Bilal'e ve ayrıca yeğenim Miraç'a ithaf ediyorum.

Orhan YEL  
BATMAN-2021

## İÇİNDEKİLER

|                                                                                                                        |     |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| ÖZET .....                                                                                                             | iv  |
| ABSTRACT.....                                                                                                          | v   |
| ÖNSÖZ .....                                                                                                            | vi  |
| İÇİNDEKİLER .....                                                                                                      | vii |
| 1. GİRİŞ .....                                                                                                         | 1   |
| 2. KAYNAK ARAŞTIRMASI .....                                                                                            | 5   |
| 2.1. <i>P.lentiscus</i> L. Türü Hakkında Genel Bilgiler .....                                                          | 5   |
| 2.2. Doku Kültürü Uygulamaları ve Sekonder Metabolit Sentezindeki Önemi .....                                          | 10  |
| 2.3. Nanopartiküller .....                                                                                             | 13  |
| 2.4. Serbest Radikaller ve Antioksidanlar .....                                                                        | 16  |
| 2.5. Antimikrobiyal Madde.....                                                                                         | 20  |
| 2.6. <i>P.lentiscus</i> L. Türü Üzerinde Yapılan <i>In vitro</i> , Biyolojik Aktivite ve Elisitasyon Çalışmaları ..... | 23  |
| 3.MATERYAL VE YÖNTEM.....                                                                                              | 28  |
| 3.1. Materyal .....                                                                                                    | 28  |
| 3.1.1. Bitkisel materyal .....                                                                                         | 28  |
| 3.2.Yöntem.....                                                                                                        | 28  |
| 3.2.1. <i>In vitro</i> çalışmalar .....                                                                                | 28  |
| 3.2.2. Biyolojik aktivite çalışmaları.....                                                                             | 31  |
| 4. ARAŞTIRMA SONUÇLARI VE TARTIŞMA.....                                                                                | 36  |
| 4.1. <i>In vitro</i> Çalışmalara Ait Sonuçlar ve Tartışma .....                                                        | 36  |
| 4.2. Antioksidan Aktivitelere Ait Sonuçlar ve Tartışma .....                                                           | 39  |
| 4.2.1. Toplam fenolik ve flavonoit içeriklerine ait sonuçlar.....                                                      | 39  |
| 4.2.2. DPPH radikal giderme aktivitesine ait sonuçlar .....                                                            | 39  |
| 4.2.3. ABTS radikal giderme aktivitesine ait sonuçlar .....                                                            | 40  |
| 4.2.4. CUPRAC radikal giderme aktivitesine ait sonuçlar .....                                                          | 41  |
| 4.3. Antimikrobiyal Aktivitelere Ait Sonuçlar ve Tartışma .....                                                        | 44  |
| 5. SONUÇLAR VE ÖNERİLER .....                                                                                          | 47  |
| 5.1 Sonuçlar .....                                                                                                     | 47  |
| 5.2 Öneriler .....                                                                                                     | 48  |
| KAYNAKLAR .....                                                                                                        | 49  |



## SİMGELER VE KISALTMALAR

|                                   |                                                     |
|-----------------------------------|-----------------------------------------------------|
| °C                                | : Santigrat derece                                  |
| dk                                | : Dakika                                            |
| µl                                | : Mikrolitre                                        |
| µg                                | : Mikrogram                                         |
| M                                 | : Molar                                             |
| mg                                | : Miligram                                          |
| ml                                | : Mililitre                                         |
| mM                                | : Milimolar                                         |
| nm                                | : Nanometre                                         |
| mm                                | : Milimetre                                         |
| sn                                | : Saniye                                            |
| NP                                | : Nanopartikül                                      |
| Ag                                | : Gümüş                                             |
| Au                                | : Altın                                             |
| AA                                | : Askorbik asit                                     |
| BHA                               | : Bütillenmiş hidroksianisol                        |
| BBD                               | : Bitki büyüme düzenleyicileri                      |
| 2,4-D                             | : 2,4-Dikloro fenoksi asetik asit                   |
| NAA                               | : Naftalen asetik asit                              |
| BA                                | : 6- benzil adenin                                  |
| GA <sub>3</sub>                   | : Gibberelik asit                                   |
| IBA                               | : Indol bütirik asit                                |
| SOD                               | : Süperoksit dismutaz                               |
| CAT                               | : Katalaz                                           |
| GPx                               | : Glutasyon peroksidaz                              |
| GR                                | : Glutasyon redüktaz                                |
| GST                               | : Glutasyon-S-transferaz                            |
| TFC                               | : Total fenolik içerik                              |
| KA                                | : Kuru ağırlık                                      |
| ABTS                              | : 2,2'-azinobis(3-etilbenzotiazolin-6-sülfonat)     |
| CUPRAC                            | : Bakır (II) iyonu indirgeme antioksidan kapasitesi |
| DPPH                              | : 2,2-difenil-1-pikrilhidrazil                      |
| NB                                | : Nutrient broth                                    |
| Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> NP | : Demir oksit nanopartiküller                       |
| ZnONP                             | : Çinko oksit nanopartiküller                       |
| CuONP                             | : Bakır oksit nanopartiküller                       |
| TiO <sub>2</sub> NP               | : Titanyum oksit nanopartiküller                    |
| EtOH                              | : Etil alkol                                        |
| HCl                               | : Hidroklorik asit                                  |
| MİK                               | : Minimum inhibisyon konsantrasyonu                 |
| MS                                | : Murashige ve Skoog                                |
| NaOCl                             | : Sodyum hipoklorit                                 |
| UV                                | : Ultraviyole                                       |

## 1. GİRİŞ

Bitkilerdeki biyoaktif bileşikler fitokimyasallar olarak bilinir. Bilimsel anlamda biyoaktif bir bileşik, biyolojik bir aktiviteye sahip bir maddedir. Biyoaktif bileşiklerin sağlıktaki olumlu etkileri arasında kanser ve diyabet gibi gelişen kronik hastalıkların azaltılması bulunmaktadır (Reiss ve ark., 2012; Slavin ve Lloyd, 2012). Bu yararlar genellikle meyve ve sebzelerle ilgilidir ve gıdada bulunan biyoaktif bileşiklerin sinerjik etkileşimlerine atfedilir. Günümüze kadar, meyve, sebze ve tahıllardan 5000'den fazla fitokimyasal izole edilmiş ve tanımlanmıştır. Başlıca biyoaktif bileşikler arasında C vitamini, folat, provitamin A, potasyum, kalsiyum, magnezyum, flavonoidler, fenolik asitler, alkaloidler, karotenoidler ve lifleri bulabiliriz (Rivero-Montejo ve ark., 2021). Biyoaktif bileşikler, tıp, farmakoloji, zirai kimyasallar, kozmetikler, gıda endüstrisi ve nanoteknoloji alanlarındaki uygulamalara uyan ve gelişmesi bakımından ümit verici bir alandır. Biyoaktif bileşiklerin etkilerinin çok yönlülüğü nedeniyle, tarımsal beslenme, parfüm, aroma, renk ve farmakolojik preparatlarda kullanılır. Dahası, sekonder metabolitlerin ana rolü, bitkilerin böcekler, hayvanlar ve patojenlerin saldırılarından veya diğer biyotik veya abiyotik streslerden korunarak hayatta kalmasıdır. Yukarıda bahsedilen uygulamalar, bu bileşiklerin arttırılmış veya geliştirilmiş üretimi için önemlidir. Bu bileşiklerin üretimini arttırmaya yönelik bir yaklaşım, bitkilerdeki çoklu sinyal iletim yollarını hedeflemektir. Ancak bitkiler tarafından doğal yollarla gerçekleşen üretim düşük seviyededir ve bitkinin fizyolojik ve gelişim aşaması gibi farklı özelliklere bağlıdır (Dixon, 2001). Bu bileşiklerin üretimini aşamalı olarak arttırmak için bir strateji, bitkinin elisitör adı verilen bazı maddelerle muamele edilmesi gerektiğidir. Stres uygulamaları, bitkiler tarafından aktif sekonder metabolitlerin üretilmesi için kullanılan temel yöntemlerden biridir ve bitkide aktif kimyasal savunmaya sahip bu bileşikler çeşitli elisitörler kullanılarak uyarılabilirler. Bu durum ile ilgili son yıllarda uygulanan yeni bir strateji ise, bitkilerde elisitör olarak kullanılabileceği gösterilen nanopartiküllerdir (NP) (Vargas-Hernandez ve ark., 2020).

NP'ler, boyutları 1-100 nm arasında değişen organik, inorganik veya hibrit malzemelerdir (Shang ve ark., 2019). Nanoteknolojik materyaller, boyutlarının bir sonucu olarak mikrometrik veya daha büyük moleküllerden farklı özellikler sergilerler. Bunlar; optik, fiziksel dayanıklılık, kimyasal reaktivite, elektriksel iletkenlik ve manyetizm gibi özelliklerdir. Nanoteknolojinin konusu, biyolojik olan ve olmayan 100 nm'den küçük yapıları üretmek, karakterize etmek ve fonksiyonel hale getirmektir. Bu

alandaki çalışmalar son yıllarda hızla artmıştır. Farmakolojik bilimler ve elektronik endüstrisi gibi pek çok alanda, nanoteknolojinin avantajlarının farkına varılmış ve ticari ürünler üretilmeye başlanmıştır (Erol Demirbilek, 2015). Nanoteknolojiye olan ilginin gün geçtikçe artmasının temel nedeni; nanoteknolojik araştırmalar, maddenin temel bilgisindeki eksiklikleri tamamlaması, nanoteknolojinin yeni uygulamalar vaat etmesi, endüstriyel protiplendirmenin ticari boyut kazanmasıyla elde edilen yüksek kar marjı nedeniyle neredeyse tüm bilim dallarında en popüler çalışma konularından bir tanesi olarak değerlendirilmektedir. Günümüzde NP'lerin çeşitli tıp, biyoteknoloji, elektronik, gıda ve tarım dallarında potansiyel kullanımları vardır. NP'ler, tıbbi tedaviler, optik cihazlar, bakterisit, mantar öldürücü, sensör teknolojisi ve resimlerden güneş kremine kadar yaygın olarak kullanılan çeşitli malzemelerden geniş bir uygulama yelpazesi için kullanılmaktadır (Dubchak ve ark., 2010). Ayrıca, NP'lerin benzersiz özellikleri, tarımsal uygulamalarında önemli ölçüde dikkat çekmiştir. Nanomalzemelerin mahsul üretiminde temel uygulaması, tarım kimyasallarının kullanımının azaltılması, haşere ve besin yönetimi yoluyla verimin artırılmasıdır.

NP'ler antiviral, antibakteriyel, antifungal, antikanser ve antiparazit özelliklere sahip olmakla birlikte, kataliz veya fotonik alanlarda da uygulamaları bulunmaktadır. Gümüş, altın ve bakır antibakteriyel aktivitesi olan NP'lere birer örnektir ve AgNP'lerin potansiyel antimikrobiyal etkiler taşıdığı yapılan çalışmalarla rapor edilmiştir (Rai ve ark., 2009). Gümüş, olağanüstü çeşitlilikteki tıbbi özellikleri nedeniyle, eski çağlardan beri çeşitli hastalıkların tedavisi ve yönetiminin bir parçası olmuştur. Gümüş iyonlarının ve gümüş bazlı bileşiklerin büyük bir mikrobiyal öldürme kapasitesine sahip olduğu iyi bilinen bir gerçektir (Slawson ve ark., 1992; Zhao ve Stevens 1998). Nanotıpta AgNP'ler, yüksek antimikrobiyal etkinlikleri ve nispeten toksik olmayan, geniş bakteri öldürücü özellikleri, antikanser özellikleri ve diğer terapötik yetenekleri yanında benzersiz oluşma yetenekleri nedeniyle de son derece önemlidir (Durán ve ark., 2016; Sohn ve ark., 2015). AgNP'lerin, *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis*, *Vibria cholera*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Syphilis typhus* ve *S.aureus* gibi bulaşıcı mikroorganizmalara karşı potansiyel antimikrobiyal etkiler gösterdiği bildirilmiştir. AgNP'lerin antioksidan etkileri, kullanımlarını belirleyen faydalı etkilerinden biridir (Suriyakalaa ve ark., 2013). Gupta ve ark. (Gupta ve ark., 2018), *Oryza sativa* L. bitkisinde, gümüş AgNP'lerin katalaz (CAT) ve askorbat peroksidaz (APX) gibi antioksidan enzim aktivitelerini ve gen ekspresyonlarını arttırarak fide büyümesini hızlandırdığını ve fitostimülör etki gösterdiğini belirtmişlerdir.

Pek çok değerli sekonder metabolitleri bünyesinde barındıran *Pistacia* türleri de doku kültürü teknikleri kullanılarak uzun yıllar boyunca araştırmacılar tarafından materyal kaynağı olarak kullanılmıştır (Mascarello ve ark., 2007; Yıldırım, 2012; Onay ve ark., 2014). M.Ö. yıllardan beri birçok ülkede *Pistacia lentiscus* L. (sakız ağacı)'un gövdesinin reçinesi, yaprakları ve meyvelerinden drog (ilaç etkili madde) olarak yararlanılmıştır. *P.lentiscus* L. Sapindales takımının Anacardiaceae familyasından *Pistacia* cinsine dâhil bir türdür. Anacardiaceae familyası, yaklaşık 70 cins ve 600'den fazla tür içerir (Bozorgi ve ark. 2013). Akdeniz'e kıyısı olan ülkelerden özellikle Yunanistan, Türkiye, İtalya ve İspanya'nın kıyı bölgelerinde doğal olarak yetişir. Aynı familyanın diğer önemli üyeleri; *P.atlantica* (Atlantik Sakızı), *P.terebinthus* (Melengiç) ve *P.vera* (Antepfıstığı)'dır. Ancak, *P.lentiscus* özellikle Akdeniz ve Ortadoğu bölgesinde *Pistacia* cinsine ait diğer türlerden (*P.atlantica*, *P.palaestina*, *P.terebinthus* ve *P.khinjuk*) her dem yeşil olması ile kesin bir şekilde kolaylıkla ayırt edilebilir (Onay ve ark, 2016).

*P.lentiscus*, reçine ve değişik bitki kısımlarından izole edilen terpenoid, flavonoid ve fenolik/fenolik olmayan asitler, yağ asitleri ve uçucu yağlar gibi tıbbi anlamda önem taşıyan değerli sekonder metabolitler içerdiğinden günümüze kadar pek çok farmakolojik çalışmada kullanılmıştır ve özellikle reçinesinin tarih boyunca birçok hastalığın tedavisinde kullanıldığı bilinmektedir. Antibakteriyel özelliklerinin yanı sıra, sakız reçinesinin antienflamatuar, antioksidan, antiaterojenik olarak fonksiyon gösterdiği, hepatoprotektif, kardiyoprotektif özelliklere de sahip olduğu rapor edilmiştir. Ayrıca, araştırmacıların yaptıkları çalışmalarda, elisitör olarak adlandırılan ve ortama ilave edildiklerinde bu değerli sekonder metabolitlerin üretimini arttıran bazı kimyasal maddeleri ya da uygulamalarını tek ya da birbirleri ile kombine olarak kullandıkları görülmüştür. Bunlar içerisinde en yaygın olarak kullanılanları ağır metal, tuz, ışık radyasyonu, UV, jasmonik asit, metil jasmonat, ozon ve etilen gibi bitki üzerinde stres oluşturabilen bileşiklerdir. Bunların yanı sıra, literatürlerde NP'lerin de elisitör olarak kullanımıyla ilgili bazı çalışmalar yer almaktadır (Desai ve ark. 2015; Ghasemi ve ark. 2015; Javed ve ark. 2017). Bununla birlikte, farmakolojik öneme sahip metabolitlerin üretimi için alternatif arayışlar, biyolojik olarak aktif olan bitkisel metabolitlerin büyük ölçekli ticari üretimlerinde, bitki hücre ve doku kültürleri yöntemlerinin, yabani ya da kültür bitkilerinden saflaştırma yoluyla gerçekleştirilen geleneksel yöntemlere oranla daha etkili olduğunu ortaya koymuştur (Mulagal ve Tsay, 2004).

Bu bağlamda, bu tez çalışmasında, değerli sekonder metabolitleri bünyesinde barındıran ve *in vitro* şartlarda yetiştirilen *P.lentiscus* L. sürgünlerine farklı konsantrasyonlarda AgNP uygulamalarının, antioksidan ve antimikrobiyal aktivite üzerine etkilerinin araştırılması amaçlanmıştır. Ayrıca, analizi yapılan parametrelere ait sonuçlar, ilk kez bu tez kapsamında verilmiştir.



## 2. KAYNAK ARAŞTIRMASI

### 2.1. *P.lentiscus* L. Türü Hakkında Genel Bilgiler

#### Bilimsel sınıflandırması



Şekil 2.1. *L. Pistacia lentiscus* L. bitkisinin genel görünümü (Anonim, 2017)

|                 |                                            |
|-----------------|--------------------------------------------|
| <b>Âlem</b>     | : Plantae                                  |
| <b>Altâlem</b>  | : Tracheobionta                            |
| <b>Bölüm</b>    | : Magnoliophyta                            |
| <b>Sınıf</b>    | : Magnoliopsida                            |
| <b>Altsınıf</b> | : Rosidae                                  |
| <b>Takım</b>    | : Sapindales                               |
| <b>Aile</b>     | : Anacardiaceae                            |
| <b>Cins</b>     | : Pistacia                                 |
| <b>Tür</b>      | : <i>Pistacia lentiscus</i> L. (Şekil 2.1) |

*Pistacia* cinsinin sistematigine yönelik en kapsamlı araştırma, Al-Saghir tarafından yapılmıştır (Al-Saghir ve Porter, 2012). Cins iki seksiyona ayrılarak sınıflandırılmıştır:

**1) *Pistacia*:** *P.atlantica* Desf., *P.chinensis* Bunge, *P.eurycarpa* Yalt., *P.khinjuk* Stocks, *P.terebinthus* L., *Pistacia vera* L.,

**2) *Lentiscella*:** *P.lentiscus* L., *P.mexicana* Humb., *P.weinmannifolia* J. Poiss. ExFranch.

### **Biyolojik özellikleri**

1-5 metre yüksekliğinde, bazen 6 m'ye ulaşabilen boyu, genellikle çalı ve küçük ağaç yapısında her dem yeşil dioik bir bitkidir. Kök uzunluğu 20-25 metre derinliğe ulaşabilir. Genç dönemde kazık kök ve birçok yan kök ile karakteristiktir. Olgun dönemde, yan kökler oldukça genişler ve saçaklar oluşturur. Doğal sakız ağacının gövdesi düz değildir. Juvenil dönemde açık gri renkte, olgun dönemde ise kül karası rengindedir. Periant içermeyen çiçekler 1 yıllık sürgünlerin yaprak koltuklarında gelişir. Sakız ağacında çiçeklenme Mart-Nisan aylarında gerçekleşmekte ve çok sayıda çiçek üretimi söz konusu olmaktadır. Çiçekleri küçük, kırmızımsıdır ve çiçek salkımı halinde kümelenmiştir (Şekil 2.2). Meyveler 4-7 mm çapında, yuvarlak-basık ve sivri uçlu, başlangıçta kırmızı, olgunlaştığında ise siyah renktedir. Drupa tipi olan meyveler, etli-sulu bir mezokarp ile kemiksi bir endokarpa sahiptir. Meyveler Ekim sonu ile Aralık ayı ortasına kadar olgunlaşmaktadır. Yapraklar genellikle 2-4, nadiren de 5-7 çift yaprakçıktan oluşur. Yaprakları gövdeye bağlı dal üzerinde 2-12 adet dikdörtgen, mızraksı veya oval biçimindedir (Akdemir ve ark., 2013; Seçmen ve ark., 2008).



**Şekil 2.2.** *P.lentiscus* L. çiçeğinin genel görünümü (Anonim, 2016)

Sıcak ve kurak Akdeniz ikliminde, 0 - 500 m yükseltilerde, deniz kıyılarında; sığ, taşlı, kayalık ve fakir topraklar üzerinde gelişebilir; kireç, deniz suyu ve rüzgâra

dayanır. Düşük sıcaklığın yansıra yüksek sıcaklık ve aşırı kuraklıktan olumsuz etkilenir. Deniz kıyılarında tuzlu suya toleransı iyidir. Yetiştği yerler itibariyle sakız ağacı kimi zaman kurak yamaçlarda maki bitkileriyle bir arada görülürken, kimi zaman nadiren de olsa kızılçam ormanlarının altlarında bulunur (Tilkat ve ark., 2018).

Maki formasyonu içerisinde çeşitli formlarına rastlanan yabani sakız, farklı iklim ve toprak koşullarına adaptasyon sağlamıştır. Doğuda Levant bölgesinden batıda Kanarya Adaları'na, İtalya'nın kuzey bölgelerinden Kuzey Afrika kıyılarına kadar hemen hemen tüm Akdeniz ülkelerinde (Mısır-Fas-Cezayir-İsrail-Lübnan-İspanya-İtalya) geniş bir coğrafyada yayılış göstermektedir. Ülkemizde İstanbul Adaları'ndan, Ege ve Akdeniz kıyıları boyunca uzanıp İskenderun'a ulaşan bir coğrafyada görülmektedir. Hatta İç Anadolu'da dahi bazı bölgelerde belirli yüksekliğe kadar rastlanmaktadır (Kılıç, 2019).

Sakız ağacını ekonomik anlamda önemli kılan, bu bitkinin bir varyetesi olarak kabul edilen *P.lentiscus* var. Chia'dan sakız (mastic) elde edilmesidir. Fiziksel ve kimyasal özellikler açısından bir reçine olan sakız, gövde ve kalın dalların, Haziran-Ağustos aylarında 2-3 mm derinlik, 10 cm uzunluğunda çizilmesi ile elde edilir. Pistacia türlerinde reçine kanalları floem dokusunda bulunmakta olup, çizim yapılan yerlerden bir süre sonra reçine salgısı başlamaktadır. Reçinede bulunan uçucu yağın havayla temas ederek uzaklaşması sonucunda reçine sertleşir ve gözyaşı (Şekil 2.3) şeklini oluşturur (Keçeci, 2019). Sakız ağacı, kutsal kitaplarda adından bahsedilen (Duke,1983; Włodarczyk, 2007) ve reçinesi tarih boyunca geleneksel tıpta birçok hastalığın tedavisinde kullanılan bir bitkidir (Tilkat ve ark., 2018).



Şekil 2.3. *P.lentiscus* L. reçinesi (Anonim, 2016)

Sakız ağacı başta reçinesi olmak üzere meyveleri, yaprakları, dalları, odunu ve peyzaj alanında kullanımıyla ekonomik bir değere sahiptir. Reçinesi tıp, gıda ve kimya

konularında çok geniş bir kullanım alanına sahiptir. Çok çeşitli tıbbi araştırmalara konu olan sakız reçinesi, ilaçlarda ve besin takviyelerinde hammadde olarak kullanılmaktadır. Gıdada, katıldığı ürüne yüksek bir katma değer kazandıran damla sakızı çok yüksek fiyatlardan alıcı bulmaktadır. Reçinesi dışında, sakız ağacının ve özellikle yabancı sakızın peyzaj alanında dış mekân süs bitkisi ve bonsai olarak kullanılmaktadır. Bunun dışında, sahip olduğu botanik ve fizyolojik özellikleriyle toprak erozyonuna ve çölleşmeye karşı, tahrip olmuş vejetasyonun yeniden oluşturulmasında ve deniz kumullarının engellenmesi çalışmalarında kullanılabilecek bitkilerdendir. Damla sakızı, tutsü olarak dini törenleri süslemesinin yanında arı kovanlarındaki birtakım materyallerin yapımında kullanılmak gibi ekstrem kullanım alanları da bulmuştur. Fakat hiç şüphesiz, sakız ağacını değerli kılan şey reçinesinin içerdiği zengin fitokimyasallardır (Pericos, 1993; Kılıç, 2019).

*P.lentiscus* son 2500 yıldır geleneksel bir ilaç olarak kullanılmaktadır. Bugüne kadar reçinesinde 120'den fazla kimyasal bileşik tanımlanmıştır ve ana bileşenleri doğal polimerler, asidik ve nötr triterpenler ile uçucu sekonder metabolitlerdir (Pachi ve ark., 2020). *P.lentiscus*'taki iki ana biyoaktif kaynak sınıfı fenolikler ve terpenlerdir (Çizelge 2.1.). Bitkilerin tüm kısımları hem fenolikler hem de terpenler içermesine rağmen, fenolikler esas olarak ham, bütün yapraklarda ve dallarda yoğunlaşırken, terpenler, doğranmış yaprakların veya reçinenin hidro-damıtılmasıyla elde edilen reçine veya uçucu yağlardaki başlıca biyoaktif maddelerdir (Landau ve ark., 2014). Sarantinidis ve Smyrnioudis (2011)'e göre sakız (yağının) anti bakteriyel bileşenlerinin verbenone,  $\alpha$ -terpineol ve linalool olduğu ve bu bileşenler ve poly- $\beta$ -myrcene'nin aynı zamanda sakız reçinesine yapışkanlık özelliği veren bileşenler olduğu da vurgulanmıştır. Toprak üstü kısımları uyarıcı ve idrar söktürücü özelliklere sahip olup geleneksel olarak hipertansiyon tedavisinde kullanılmıştır.

Sakız reçinesi ve uçucu yağları, tüm dünyada yüzyıllardır Ayurvedik gibi geleneksel sistemlerde enfeksiyonların ve hastalıkların tedavisinde ilaç olarak kullanılmaktadır. Yaprakları anti-enflamatuar, antibakteriyel, antifungal, antipiretik, hepatoprotektif, balgam söktürücü ve uyarıcı aktivitelere sahiptir. Ayrıca egzama, ağız enfeksiyonları, ishal, böbrek taşı, sarılık, baş ağrısı, astım ve solunum problemlerinin tedavisinde de kullanılmaktadır. Uçucu yağı, lenfatik ve dolaşım problemleriyle ilgili terapötik özellikleri ile bilinir (Hafsé ve ark., 2015). Özellikle Ortadoğu'da diş ve diş etlerini korumak, ferah bir nefes almak için kullanılmaktadır. Boyaların cilalanmasında, aromatik özelliğinden dolayı alkollü içeceklerde katkı maddesi olarak kullanılmaktadır

(Coppen, 1995). Dispepsi tedavisinde, anti-aterojenik mikroplara karşı, anti-mutajen, anti-oksidan, karaciğer yağlanması karşı, antiartrit ve anti-gut olarak kullanıldığı da rapor edilmiştir (Nahida ve Siddiqui, 2012). Antiseptik etki göstermesinden dolayı monoterpenlerin ve diğer madde gruplarının desteğiyle, peptik ülserle sebep olan *Helicobacter pylori*'yi inhibe edici özelliği de bulunmaktadır. Bilhassa yemekten sonraki çiğnenmesi antiseptik etki nedeniyle ağız hijyeni açısından önemlidir (Fıtlamak, 2014). Ayrıca doğal bir çinko kaynağı olduğundan çiğneme süresi boyunca ve bu eser elementin eksikliği olan kişilerde kullanılabilir.

**Çizelge 2.1.** *P. lentiscus* L.'un uçucu yağ bileşenleri ve yüzdeleri (Abdelkader ve ark., 2016)

| Pik Sayısı | Bileşik                | Yüzde (%) |
|------------|------------------------|-----------|
| 1          | $\alpha$ -pinen        | 9.48      |
| 2          | $\beta$ -Myrcene       | 0.9       |
| 3          | $\alpha$ -phellandrene | 2.20      |
| 4          | $\beta$ -pinene        | t         |
| 5          | Cis-ocimene            | t         |
| 6          | Unknown                | -         |
| 7          | 3-carene               | 0.8       |
| 8          | $\delta$ -Carene       | t         |
| 8          | Limonene               | 09.11     |
| 9          | p-Cymene               | 8.67      |
| 10         | p-cymen-8-ol           | t         |
| 11         | Terpinolene            | t         |
| 12         | Linalool               | 1.4       |
| 13         | Verbenol               | 0.7       |
| 14         | Terpinene-4-ol         | 41.24     |
| 15         | Borneol                | 0.8       |
| 16         | $\alpha$ -terpineol    | 7.31      |
| 17         | 2-Undecanone           | 0.7       |
| 18         | Isoledene              | 0.9       |
| 19         | Unknow                 | -         |
| 20         | $\beta$ -caryophyllene | 12.62     |
| 22         | Globulol               | 0.8       |

Sakızın gıda sanayisindeki yeri de büyüktür. Hazır çorba gibi gıdalarda koruyucu olarak kullanılır. Türk mutfağında birçok yemeğin ve tatlının içine ilave edilir. Günümüzde sütlü tatlılar ve dondurmalarda çok kullanılmaktadır. Pilav ve birçok etli yemeğin içine koku ve tat vermek maksadıyla baharat olarak ilave edilebilir. Yağla

karıştırılarak koku almak maksadıyla balık üzerine sürülmektedir. Lezzet vermesi ve dayanma ömrünü uzatmak maksadıyla hazır çorba ve mahalli ekmeklerin içine de katılmaktadır. Ayrıca, saç kepeklenmesine karşı bittim sabununun yapımında kullanılmaktadır. Sakız günümüzde bazı içecekler, yiyecekler, çiğnenen sakız, diş macunu, losyon ve diğer kozmetikler gibi ürünlerin içeriğinde katkı maddesi olarak da kullanılmaktadır. Geçmişte Osmanlı ve diğer imparatorluk saraylarının önemli bir baharatı niteliğinde olduğu bilinmektedir. Kısaca Sakız, yüzlerce yıldır sakız reçinesi ve sakız yağı şeklinde, ilaç, kozmetik, boya, gıda ve içki sanayinde kullanılmaktadır (Sakız Eylem Planı 2014-2019).

## 2.2. Doku Kültürü Uygulamaları ve Sekonder Metabolit Sentezindeki Önemi

Ülkemizde sakız ağacı öncelikle İzmir'in Çeşme ve Karaburun ilçeleri başta olmak üzere, Muğla ve Antalya'yı da çevreleyen Ege ve Akdeniz Bölgelerinde doğal olarak yetişmektedir ve bu bölgelerde yetiştiriciliğinin yapılabilceği alanlar bulunmaktadır. Geniş kapsamlı kullanım alanına sahip sekonder metabolitler bakımından zengin olan bu türün doğal koşullar altında elde edilmesi sırasında çeşitli zorluklarla karşılaşmaktadır. Sakız ağacının çeşit özelliklerini kaybetmeden doğrudan tohumla çoğaltımı uygun değildir. Çünkü tohumla çoğaltmada, standart çeşitlerin üstün özellikleri sonraki nesillerde kaybolma ya da bozulma tehlikesi bulunmakta ve bu durum da kalıtsal yapının bozulmasına neden olmaktadır.

*In vitro* bitki hücre ve doku kültürü teknikleri, diğer üretim yöntemlerinden farklı olarak kontrollü şartlarda, bitki için hazırlanmış optimum bir besin ortamında, aseptik olarak izole edilen hücre, doku ve organların kültürlerini kapsayan; organogenezis, somatik embriyogenezis, genetik transformasyon gibi farklı yöntemler aracılığı ile ekonomik olarak önemli bitkilerin korunması ve değerli ve metabolitlerinin üretimi için kullanılan bir teknolojidir (Tilkat ve ark., 2018). Ayrıca yaygın kullanım alanları aşağıdaki gibidir;

- ✓ Hastalıksız bitkiler elde etmek.
- ✓ Sekonder metabolit üretimi
- ✓ Üretilmesi zor bitkilerin hızlı çoğalması.
- ✓ Somatik melezleşme.
- ✓ Ticari bitkilerin genetik gelişimi.
- ✓ Islah programları için androjenik ve jinojenik haploid bitkilerin elde edilmesi.

Doku Kültürü, bitkilerin vejetatif çoğalmasını sağlayan alternatif bir araçtır. *In vitro* büyüyen bitkiler genellikle bakteri ve mantar kaynaklı hastalıkları içermez. Nispeten kısa bir zaman ve mekânda, tek bir eksplanttan başlayarak çok sayıda fidan üretilir. Bunların yanısıra, *in vitro* doku kültürleri yoluyla nadir ve nesli tükenmekte olan bitkiler güvenli bir şekilde klonlanabilir. Arzu edilen özellikleri *in vitro* şartlarda seçmek kolaydır, böylece saha denemeleri için gereken alan miktarını azaltır. Bir bitki doku kültürü hattı kurulduktan sonra, yıl boyunca sürekli genç bitkiler tedarik edebilir. Gereken süre çok kısalmış, tohum gelişiminin tüm yaşam döngüsünü beklemeye gerek yoktur. Uzun nesil süresine, düşük tohum üretimine sahip türler veya kolayca filizlenmeyen tohumlar için hızlı çoğalma mümkündür. Eksplantlar, bitki doku bankalarında dondurulabilir ve ardından doku kültürü yoluyla yeniden oluşturulabilir. Bitkilerin çoğaltılabileceği polen ve hücre koleksiyonlarını korur (Sharma, 2015). Bu teknikle çoğaltmada bitkilerden yeni bitki oluşturabilecek birçok parçalar; meristemler, sürgün uçları, nod ve internodlar, hipokotil, yaprak, gövde parçaları, kotiledonlar, kökler, tomurcuklar vb. eksplantlar kullanılabilir.

Mikroçoğaltımın basamakları 5 aşama halinde incelenir. Bu aşamalar;

- Hazırlık (sterilizasyon ve anaç bitki seçimi),
- Kültür başlangıcı (çoğunlukla apikal veya aksillar tomurcuklar),
- Sürgün çoğaltım aşaması,
- Sürgün gelişimi ve köklendirme,
- Dış ortama alıştırma şeklindedir.

Sekonder metabolitler fenolikler, terpenler ve alkaloidler şeklinde genellikle üç büyük molekül ailesi olarak sınıflandırılır.

Fenoller, aromatik bir fenolik gruba eklenmiş bir hidroksil (-OH) fonksiyonel grubundan oluşan kimyasal bileşikler sınıfıdır. Bu bileşik grubundaki önemli alt sınıflar arasında fenoller, fenolik asitler, kinonlar, flavonlar, flavonoidler, flavonoller, tanenler ve kumarinler bulunur.

Terpenler, izopren alt birimlerinden oluşan geniş ve çeşitli bir organik bileşik sınıfıdır, terpenoidler ise terpenlerin oksijen içeren analoglarıdır. İzopren alt birim sayılarına göre monoterpenler (C<sub>10</sub>), seskiterpenler (C<sub>15</sub>), diterpenler (C<sub>20</sub>), triterpenler (C<sub>30</sub>), tetraterpenler (C<sub>40</sub>) ve politerpenler şeklinde sınıflandırılırlar (Kovacevic, 2004). Uçucu yağların ana bileşenleri monoterpenler, diterpenler ve seskiterpenlerdir.

Alkaloidler ise, heterosiklik azot bileşikleridir. Amino asitlerden türetilirler ve azot onlara alkali özellikler verir.

Bitki biyoteknolojisi alanındaki son gelişmeler, bitki hücre ve doku kültürlerinin, tüm bitkilerin değerli sekonder metabolitlerinin büyük ölçekli üretimi için bir kaynak olarak olma potansiyelini işaret etmektedir. Sekonder metabolit ürünlerin *in vivo* koşullarda tüm bitkiden elde edilmesi yerine *in vitro* koşullarda hücre kültürlerinden elde edilmesinin önemli bazı avantajları vardır. Bu avantajlar; • Üretim çok daha güvenli, basit ve öngörülebilir şekilde yapılabilir • Biyokimyasalların izolasyonu bitkiden ekstraksiyonla izolasyona göre çok daha hızlı ve etkin olabilir • *In vitro* koşullarda üretilen bileşikler bitkide üretilen bileşikler ile benzer olabilir • Tarla koşullarında kaliteyi olumsuz etkileyen bileşikler *in vitro* koşullarda engellenebilir • Hücre ve doku kültürlerinde büyük hacimlerde tanımlanmış standart biyokimyasallar üretilir. • Hücre ve doku kültürleri bitkinin sekonder metabolit üretmesine neden olan uyarıcıları test etmek için model olarak kullanılabilir • *In vitro* koşullarda hücre kültürleri radyoaktif olarak işaretlenebilir ve bu kültürlerden elde edilen sekonder metabolit ürünleri deney hayvanlarının beslenmesinde kullanıldığında bu ürünler metabolik olarak izlenebilir (Çalışkan ve ark., 2019).

Son 20 yıldan bu yana, bitki hücre ve doku kültürü teknolojisinin, yararlı sekonder metabolitler için bir kaynak olarak kullanıldığı bilinmektedir. *In vitro* kültürler ile sekonder metabolitleri arttırmanın birkaç yolu vardır. Metabolik yolları teşvik eden biyotik ya da abiyotik elisitörlerin kullanımı ya da ara bileşik ya da bileşiklere öncülük eden metabolik yolların ifadesini destekleyen karbon akışında değişimleri indükleyen ya da onun üretimini arttırma amacı ile kültür ortamına arzu edilen bir bileşiğin bir prekürsör (öncü) olarak eklenmesi yaygın olarak karşımıza çıkmaktadır. Ancak son yıllarda, sekonder metabolitlerin biyosentezinde yer alan genlerin ekspresyonunu indüklemek için bir elisitör olarak nanopartiküllerin kullanılması gündeme gelmiştir. Bazı çalışmalarda, NP'lerin reaktif oksijen türlerini (ROS) ve bitki sekonder metabolizmasında transkripsiyonel düzenlemeye yol açan ikincil sinyal habercilerini indüklediği öne sürülmüştür. Elisitörler, plazma zarındaki spesifik reseptörler/iyon kanalları tarafından algılanır, gen ekspresyonunu tetikler ve bitkilerde bir stres tepkisini indükler, bu da daha yüksek miktarlarda veya yeni değerli sekonder metabolit formlarının üretilmesine neden olabilir (Roy ve Bharadvaja, 2019). Bugüne kadar, bitki sekonder metabolizmasının ortaya çıkarılması için farklı türlerde biyotik ve abiyotik elisitörler kullanılmıştır. Farklı elisitörler arasında, NP'ler benzersiz özelliklerinden

dolayı bitkilerde flavonoidlerin yeni elisitörleri olma konusunda büyük bir potansiyel göstermiştir. Metalik, metal oksit ve karbon bazlı NP'ler dâhil olmak üzere farklı NP tipleri, flavonoidlerin sentezinde son teknolojik yöntemler olarak geniş çapta rapor edilmektedir. Bu NP'ler arasında gümüş NP'ler (AgNP), bakır NP'ler (CuNP), demir oksit NP'ler (Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>NP), çinko oksit NP'ler (ZnONP), bakır oksit NP'ler (CuONP), karbon nanotüpler ve kitosan bazlı NP'ler bulunur (Amer, 2019). NP'lerin tıbbi bitkilerde kullanılmasının ve biyoaktif bileşiklerin indüklenmesinin ana amacı, flavonoidleri, uçucu yağı, karotenoidleri, terpenoidleri, kumarinleri ve alkaloidlerine atfedilen terapötik aktiviteyi arttırmayı sağlamaktır. Farklı NP'ler arasında AgNP'lerin, *in vitro* kültürlerde flavonoidlerin arttırılmasında yaygın olarak kullanıldığı bildirilmektedir (Çizelge 2.2).

**Çizelge 2.2.** AgNP'lerin flavonoidlerin elisitörü olarak kullanılmasındaki rolü (Khan ve ark., 2021)

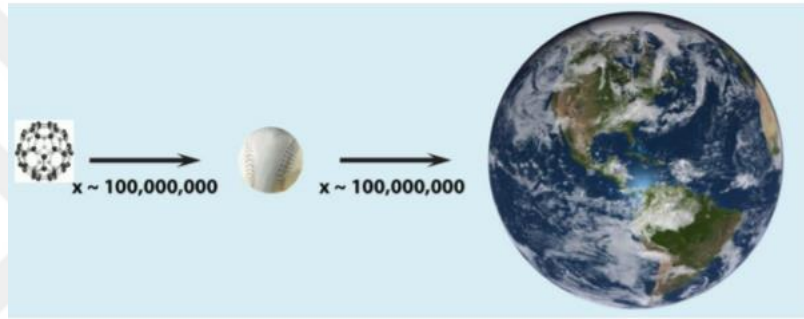
| Bitki Türü              | Kültür Tipi       | Büyüme Ortamı         | NP Boyutu (nm) | Kons.     | Yanıtları                                                                                                                        |
|-------------------------|-------------------|-----------------------|----------------|-----------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <i>M. charantia</i>     | Hücre Süspansiyon | MS                    | 50             | 5 mg/l    | Quercetin, kaempferol, catechin, myricetin, rutin, naringenin ve biochanin A artışı                                              |
| <i>C. anguria</i>       | Saçak Kök         | MS                    | -              | 2.0 mg/l  | Flavonol üretiminde artış                                                                                                        |
| <i>B. rapa</i>          | Saçak Kök         | MS                    | 2–10           | 100 mg/l  | TFC ve myricetin, naringenin, catechin, quercetin, rutin, kaempferol, biochanin A, formononetin, ve hesperidin birikiminde artış |
| <i>A. caudatus</i>      | Tüm Bitki         | Toprak                | 17–91          | 50 ppm    | Kaempferol ve quercetin.flavonoidlerinin birikimi                                                                                |
| <i>C. tuberculata</i>   | Kallus            | 2,4-D ve BA içeren MS | 40             | 90 µg/ml  | 1.8 mg TFC artışı                                                                                                                |
| <i>A. thaliana</i>      | Fide              | MS                    | 8–47           | 50 M      | Anthocyaninlerde 56% artış                                                                                                       |
| <i>L. usitatissimum</i> | Hücre Süspansiyon | MS                    | 18             | -         | TFC miktarı 11.85 mg/g KA                                                                                                        |
| <i>P. vulgaris</i>      | Kallus            | NAA içeren MS         | Ag + Au        | 1:3 oranı | TFC Artışı                                                                                                                       |
| <i>P. vulgaris</i>      | Hücre Süspansiyon | NAA içeren MS         | Ag + Au        | 1:3 oranı | TFC Artışı                                                                                                                       |

MS: Murashige and Skoog Basal Medium; BA: 6-Benzylaminopurine; NAA: 1-Naphthaleneacetic acid; TFC: total flavonoid içeriği; KA: Kuru ağırlık

### 2.3. Nanopartiküller

Nanoteknoloji kelimesi, yunanca 'cüce' anlamına gelen 'nano' önekiyle dayanır. Henüz geçtiğimiz yüzyıldan beri bilinen bir araştırma alanıdır. "Nanoteknoloji", Nobel

ödüllü Richard P. Feynman tarafından 1959'daki "Altta bolca yer var" ("There's Plenty of Room at the Bottom") adlı ünlü konferansında sunulduğundan beri, nanoteknoloji alanında devrim niteliğinde gelişmeler olmuştur. Bu terim ilk kez 1974'de Norio Taniguchi tarafından yayımlanan bir makalede kullanılmıştır. 'Nano' sözcük olarak, bir fiziksel büyüklüğün bir milyarda biri anlamına gelmektedir. Bir nanometre ise metrenin bir milyarda birine eşit bir uzunluk birimidir (Beykaya ve Çağlar, 2015). NP'ler, bir boyutu en az 100 nm'den küçük olan partikül maddeler içeren geniş bir malzeme sınıfıdır (Laurent ve ark., 2010). Bir nanometre, bir metrenin milyarda biridir. Yani **Şekil 2.4**'te görüldüğü üzere oranlamak gerekirse, yarıçapı 1.1 nanometre olan bir fulleren ile softbol topu arasındaki boyut farkı, Dünya ile softbol topu arasındaki boyut farkıyla aynıdır (Eroğlu, 2019).



**Şekil 2.4.** Fulleren, softbol ve dünya arasındaki boyut farklarının şeması (Eroğlu, 2019)

Araştırmacılar, boyutun bir maddenin fizyo-kimyasal özelliklerini etkileyebileceğini keşfettilerinde bu malzemelerin önemi anlaşılmıştır. NP'ler, biyo-görüntüleme uygulamalarında kullanılabilen muazzam derecede boyut ve şekil çeşitliliği ile karakteristik renkler ve özellikler gösterirler (Dreaden ve ark., 2012). NP'ler üç katmandan oluşur; (a) Çeşitli küçük moleküller, metal iyonları, yüzey aktif maddeler ve polimerler ile işlevselleştirilebilen yüzey katmanı (b) Çekirdekten tüm yönleriyle kimyasal olarak farklı olan kabuk tabakası ve (c) Esasen NP'in merkezi kısmı olan ve genellikle NP'ün kendisine atıfta bulunulan çekirdek kısmı mevcuttur (Shin ve ark., 2016).

NP'ler doğal yada sentetik yapıdaki polimerlerle hazırlanan, hazırlama yöntemine göre nanoküre veya nanokapsül olarak adlandırılan ve etkin maddenin partikül içinde çözündürüldüğü, hapsedildiği ve/veya yüzeye absorbe edildiği ya da bağlandığı matriks sistemlerdir. Doğal dünyada var olan NP'ler fotokimyasal reaksiyonlar, volkanik patlamalar, orman yangınları, basit erozyon, bitkiler, hayvanlar ve hatta mikroorganizmalar tarafından üretilebilir.

### **Kullanım alanları ve Çeşitleri**

Nanopartiküllerin bazı kullanım alanları aşağıda sıralanmıştır;

- Bilgisayar malzemeleri ve hafıza kartları
- Hidrojen üretimi ve bataryalar
- Televizyon, telefon gibi elektronik cihazlar
- Nanotüp içeren bileşikler, kimyasal kaplamalar, alaşımlar, akıllı malzemeler
- Optik sistemler
- Yanık ve yara bantları ve sargıları
- Kimyasal sensörler, dedektör ve lazerler
- Biyoanaliz sistemleri
- Tıpta görüntüleme teknolojileri
- Farmasötik ürünler
- Filtre sistemleri, yapıştırıcılar, parlaticı maddeler, boyalar
- Tekstil, otomobil endüstrisi, inşaat malzemeleri, şeklinde örnekler verilebilir

(Sekmen, 2019).

NP'ler morfolojilerine, boyutlarına ve kimyasal özelliklerine bağlı olarak çeşitli kategorilere ayrılırlar. Fiziksel ve kimyasal özelliklere göre, iyi bilinen NP sınıflarından bazıları aşağıda verilmiştir.

1. Karbon bazlı nanopartiküller
2. Metal bazlı nanopartiküller
3. Yarı iletken bazlı nanopartiküller

### **Gümüş (Ag) NP'ler**

AgNP'ler, benzersiz optik, elektriksel ve termal özelliklere sahiptirler. Arzu edilen fiziko-kimyasal özellikleri nedeniyle özellikle tıp, biyoteknoloji ve tarım alanlarında kullanılmaktadır ve fotovoltajikten biyolojik ve kimyasal sensörlere kadar uzanan ürünlere dâhil edilmektedir. Örnekler arasında, yüksek elektrik iletkenlikleri, stabilite ve düşük sinterleme sıcaklıkları için gümüş nanopartikülleri kullanan iletken mürekkepler, macunlar ve dolgu maddeleri yer alır.

Mikroorganizmalar, bitki ekstraktları veya bitki biyokütlesi gibi biyolojik varlıkların, AgNP üretimi için kullanılması ve çevre dostu bir şekilde kimyasal ve fiziksel yöntemlere bir alternatif olabilmesi şeklindeki ilerlemeler, nanoteknolojinin bir kilit noktası olarak görülmektedir (Pathak ve Hendre, 2015).

## 2.4. Serbest Radikaller ve Antioksidanlar

Serbest radikaller, dış orbitalinde bir ya da daha fazla eşlenmemiş elektron taşıyan, yüksek enerjili atom veya moleküller olarak tanımlanmaktadır (Karabulut ve Günay, 2016). Normal hücresel metabolizmanın ürünleridir. Bir serbest radikalın tek sayıdaki elektron (lar) ı onu kararsız, kısa ömürlü ve oldukça reaktif hale getirir. Yüksek reaktiviteleri nedeniyle, stabiliteye ulaşmak için elektronları diğer bileşiklerden ayırabilirler. Böylece saldırıya uğrayan molekül elektronunu kaybeder ve kendisi serbest radikal haline gelir ve sonunda canlı hücreye zarar veren bir zincirleme reaksiyon dizisi başlatır. Serbest radikaller oksijen ve nitrojen kaynaklı olabilirler (Çizelge 2.3).

**Çizelge 2.3.** Metabolizma sırasında üretilen bazı ROS ve RNS listesi (Lushchak, 2014)

|                                | Radikaller                      | Nonradikaller                 |
|--------------------------------|---------------------------------|-------------------------------|
| Reaktif oksijen türleri (ROS)  | Süperoksit $O_2^{\cdot -}$      | Hidrojen peroksit $H_2O_2$    |
|                                | Hidroksil $OH^{\cdot}$          | Hipokloröz asit $HOCl$        |
|                                | Peroksil $ROO^{\cdot}$          | Hipobromöz asit $HOBr$        |
|                                | Alkoksil $RO^{\cdot}$           | Singlet oksijen $^1O_2$       |
|                                | Hidroperoksil $HO_2^{\cdot}$    | Ozon $O_3$                    |
|                                | Lipid peroksil $LOO^{\cdot}$    |                               |
| Reaktif nitrojen türleri (RNS) | Nitrik oksit $NO^{\cdot}$       | Nitrik asit $HNO_2$           |
|                                | Nitrojen dioksit $NO_2^{\cdot}$ | Nitrosil katyonu $NO^+$       |
|                                |                                 | Nitroksil anyonu $NO^-$       |
|                                |                                 | Dinitrojen tetroksid $N_2O_4$ |
|                                |                                 | Dinitrojen trioksit $N_2O_3$  |
|                                |                                 | Peroksinitrit $ONOO^-$        |

Oksijen molekülünün kendisi bir radikaldır ve iki eşleşmemiş elektronun varlığından dolayı biradikal olarak adlandırılır. ROS'lar arasında süperoksit ( $O_2^{\cdot -}$ ), hidroksil ( $OH^{\cdot}$ ), peroksil ( $ROO^{\cdot}$ ), nitrik oksit ( $NO^{\cdot}$ ) ve nitrojen dioksit ( $NO_2^{\cdot}$ ) radikalleri sayılabilir (Halliwell, 2001). Genellikle radikal olmayan türler arasında ise, hidrojen peroksit ( $H_2O_2$ ), hipokloröz asit ( $HOCl$ ), hipobromöz asit ( $HOBr$ ), ozon ( $O_3$ ), singlet oksijen ( $^1O_2$ ) ve nitrik asit ( $HNO_2$ ) bulunmaktadır (Kohen ve Nyska, 2002). Bu türler patolojik ve fizyolojik durumlar altında canlılar tarafından üretilir ve canlı organizmada kolaylıkla serbest radikal reaksiyonlarına yol açabilirler. ROS, endojen veya eksojen kaynaklardan üretilebilir. Bu kaynaklar aşağıda sıralanmıştır; (Karabulut ve Günay, 2016)

### Endojen kaynaklar

- Mitokondride aerobik solunum sırasında elektron transport sistemi tarafından katalize edilen oksijenler serbest radikalleri yan ürün olarak üretirler.
- Serbest radikaller lipid peroksidasyonu, ksantin oksidaz ve mitokondriyel sitokrom oksidaz gibi çeşitli kaynaklardan oluşabilir.
- Zihinsel stres veya vücut yorgunluğundan kaynaklanan stres toksik yan ürün olarak serbest radikal üretebilir.
- İmmun sistem hücreleri patojenlere yanıt olarak ROS üretebilir.

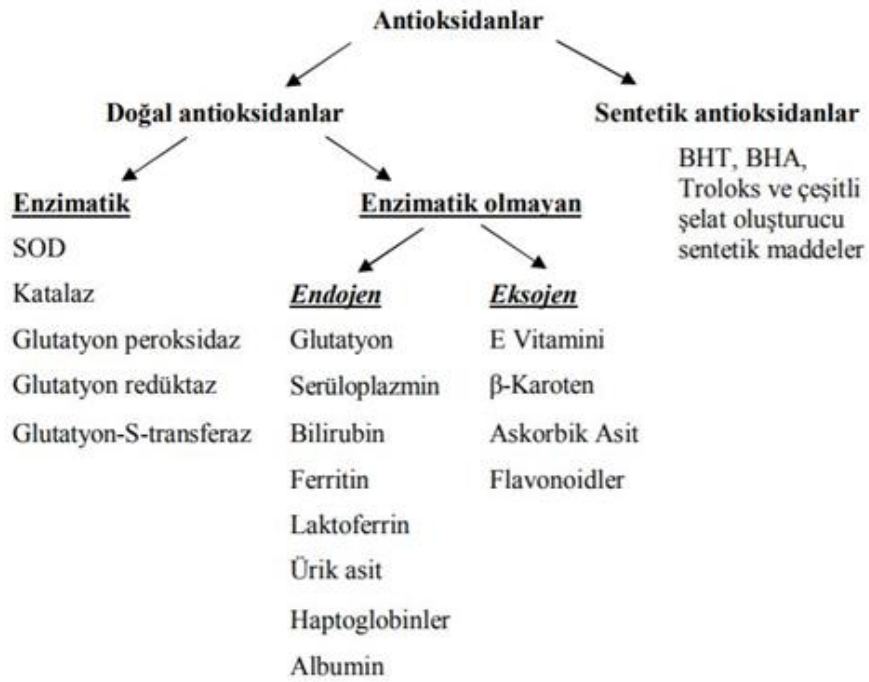
#### Eksojen kaynaklar

- UV ışınlar, X-rays, gamma ışınları, mikrodalga ışınları,
- Pişirme sırasında organik maddelerin yakılması,
- Asbest, benzen, karbonmonoksit, formaldehit, ozon ve toluen gibi hava kirleticiler,
- Temizlik ürünleri, tutkal, boya, tiner, parfümler ve böcek ilaçları gibi kimyasallar,
- Alkol ve sigara kullanımı, sigara dumanı, egzoz dumanı eksojen olarak serbest radikal üretimine katkıda bulunabilir.

ROS'un çoğu, vücut tarafından alınan oksijenin %80'inden fazlasının mitokondriyal solunum zinciri yolunda kullanılması nedeniyle oluşur. Düşük ROS konsantrasyonları, gen ekspresyonu, hücresel büyüme, tiroksin, prostaglandin gibi moleküllerin biyosentezi için gereklidir ve büyümeyi ve gelişim süreçlerini uyarır (Wafula ve ark., 2017). Birçok hücreye karşı normal fizyolojik bir fonksiyon olarak birçok hücrede  $O_2^-$ ,  $H_2O_2$  ve NO üretiminden söz edilebilir. Reaktif oksijen türleri, çevresel uyarılar altında bitkilerin alışma sürecine ana moleküller olarak katılır. Temelde, stres koşulları altında bitkinin alışması boyunca çeşitli yolları kontrol eden sinyal iletim molekülleri olarak hareket ederler (Hasanuzzaman ve ark., 2020). Bitki hücrelerinde redoks homeostazı, bitkilerde etkin savunma sisteminin ROS üretimi ve eliminasyonu arasında dengeyi koruduğu, ROS üretimi ile antioksidan enzimlerin işleyişi arasındaki denge sonucunda gelişir (Paciolla ve ark., 2016). Bununla birlikte, ROS oluşumunun dengesindeki herhangi bir değişiklik ve antioksidanlar tarafından ROS süpürülmesi, çeşitli abiyotik stres koşulları altında oksidatif stresle sonuçlanan aşırı ROS birikimine yol açar. Serbest radikallerin birikimi arttıkça da zararlı etkileri ortaya çıkar. Meydana gelen oksidatif stres, lipid peroksidasyonuna neden olur, nükleik asitlere ve proteinlere zarar verir ve karbonhidrat metabolizmasını değiştirerek hücre fonksiyon bozukluğuna ve ölüme neden olur (Mahmud ve ark., 2019). Hidroksil gibi serbest radikaller, karbonhidratlar ile reaksiyona girer ve karbon atomlarının birinden

bir hidrojen atomu çıkararak karbon merkezli radikal üretirler. Bunlar hiyaluronik asit gibi önemli moleküllerde zincir kırılmalarına yol açar (Karabulut ve Günay, 2016).

Canlı hücrelerde bulunan protein, lipid, karbohidrat ve DNA gibi okside olabilecek maddelerin oksidasyonunu önleyen veya geciktirebilen maddelere ‘antioksidanlar’ ve bu olaya ‘antioksidan savunma’ denir (Çavdar ve ark.,1997). Kaynaklarına göre doğal ve sentetik antioksidanlar olmak üzere iki kısma ayrılır (Yavaşer, 2011). Doğal antioksidanlar da kendi aralarında enzimatik ve non-enzimatik (enzimatik olmayan) antioksidanlar olarak sınıflandırılabilir (Şekil 2.5);



Şekil 2.5. Antioksidanların sınıflandırılması (Yavaşer, 2011)

Süperoksit Dismutaz (SOD), Katalaz (CAT), Glutasyon Peroksidaz (GPx), Glutasyon Redüktaz (GR) ve Glutasyon-S-Transferaz (GST) gibi enzimatik antioksidanlar ile mineraller (Fe, Mg, Se, Cu ve Zn gibi), Askorbik asit (C Vitamini), Tokoferoller (E Vitamini), Karotenoidler ve Polifenoller gibi enzim yapısında olmayan doğal antioksidanlar ROS'un aşırı üretimini engellemek için koordineli bir şekilde çalışırlar. Örneğin Katalaz (EC 1.11.1.6), 26 milyon  $H_2O_2$  molekülünü 1 dakikada  $H_2O$ 'ya dönüştüren ROS detoksifikasyonu için tetramerik hem içeren bir enzimdir.

Sentetik antioksidanlar ise, çeşitli teknikler kullanılarak yapay olarak üretilir veya sentezlenir. Temelde polifenolik bileşikler de, esas olarak serbest radikalleri yakalayan ve zincirleme reaksiyonları durduran bileşiklerdir. Polifenolik türevler genellikle birden fazla hidroksil veya metoksi grubu içerir (Hasanuzzaman ve ark.,

2020). Sentetik antioksidanlar, doğal antioksidanların sadece bir analogunu oluştururlar ve doğal antioksidanın en etkin analogunu taklit edecek şekilde geliştirilirler. Çoğunlukla bildirilen sentetik fenolik antioksidanlar *p*-konumludur, oysa doğal fenolik bileşikler çoğunlukla *o*-konumludur. *P*-konumlu maddeler, daha düşük toksisiteleri nedeniyle tercih edilmektedir. Sentetik fenolik antioksidanlar, katı ve sıvı yağlarda çözünürlüklerini iyileştirmek ve toksisitelerini azaltmak için her zaman alkil grupları taşır (Wanasundara ve Shahidi 2005). Antioksidan aktiviteye sahip bu sentetik bileşikler, farmasötiklerde, kozmetikler için koruyucu olarak ve gıdalardaki yağı, yağı ve lipidleri stabilize etmek için yaygın olarak kullanılmaktadır (Gupta ve Sharma 2006). Bu sentetik antioksidanların fenolik bileşik olmaları, onların etkili birer antioksidan olmalarını sağlamaktadır. Maliyet nedeniyle doğal kaynaklı antioksidanlar yerine sentetik antioksidanlar yirminci yüzyılın başlarından beri kullanılmaktadır. Ancak sentetik antioksidanların toksik ve kanserojen olabileceğini ortaya koyan çalışmalar sonucunda bazı ülkelerde kullanılmalarına dair ciddi sınırlama veya yasaklar getirilmiştir (Öğüt, 2014).

### **Antioksidan Aktivite Tayin Yöntemleri**

İki yöntem izlenir:

- a) Hidrojen atomu transferi reaksiyonuna dayananlar (HAT)
- b) Tek elektron transferi reaksiyonlarına dayananlar (ET)

HAT temelli yöntemlerin birçoğu, azo bileşiklerin bozulması ile oluşan peroksil radikalleri için antioksidan ve substratın rekabetine dayanan yarışmacı reaksiyonlardır. ET temelli yöntemler antioksidanın oksidantı indirgenme yeteneğini renk değişimi ile ölçen yöntemlerdir (Okan ve ark., 2013).

HAT analiz yöntemleri: a) İndüklenmiş düşük yoğunluklu lipoprotein otooksidasyonu, b) Oksijen radikal absorban kapasitesi (ORAC), c) Total radikal yakalama antioksidan kapasitesi (TRAP), d) Crocin bleaching deneyleri olarak sıralanabilir. ET esaslı analiz yöntemleri, antioksidan maddenin indirgendiğinde renk değiştiren bir oksidant maddeyi indirgeme kapasitesinin ölçümüne dayanır. Renk değişiminin derecesi örnekteki antioksidan derişimi ile bağlantılandırılır.

ET esaslı analiz yöntemleri: a) Folin-Ciocalteu reaktifi (FCR) ile toplam fenolik madde analizi, b) Trolox eşdeğeri antioksidan kapasite (TEAC) ölçümü, c) Ferrik iyonu indirgeme antioksidan gücü (FRAP) ölçümü, d) Cu (II) kompleksini oksidant olarak kullanılan “toplam antioksidan potansiyel” ölçüm yöntemi, e) DPPH kullanarak

“toplam antioksidan potansiyel” ölçüm yöntemi, f) CUPRAC (Bakır(II) İndirgeyici Antioksidan Kapasite) yöntemi olarak sıralanabilir (Aydın, 2012).

## 2.5. Antimikrobiyal Madde

Mikroorganizmaların gelişmesini durdurucu veya onları öldürücü ajanlara ‘antimikrobiyal madde’ denir. Bu maddeler çok geniş bir grup olup bunlara antibiyotikler, dezenfektanlar, antiseptikler vb. dâhildir. Bakterilerin neden olduğu enfeksiyonlar, antibiyotikler olarak bilinen antibakteriyel bileşikler grubu aracılığıyla önlenabilir, yönetilebilir ve tedavi edilebilir. Antibiyotikler, bakterileri öldüren veya büyümesini engelleyen doğal, yarı sentetik veya sentetik bileşiklerdir.

Bitkilerin iyileştirici potansiyeli binlerce yıldır bilinmektedir. Bitkilerin ve ürünlerinin tıbbi kullanımı, dünyanın çeşitli yerlerinde nesilden nesile aktarılmıştır. Dünya tarihi boyunca ve farklı geleneksel tıp sistemlerinin gelişimine önemli ölçüde katkıda bulunmuştur. Bugün bile Dünya Sağlık Örgütü (WHO), küresel nüfusun yaklaşık %80'inin standart sağlık hizmetlerinin bir parçası olarak geleneksel bitkisel ilaçlara güvendiğini tahmin etmektedir (Foster ve ark., 2005). Hâlihazırda doktorlar tarafından reçete edilen birçok ilaç ya doğrudan bitkilerden izole edilmekte ya da doğal ürünlerin yapay olarak değiştirilmiş versiyonlarıdır. Batı ülkelerinde kullanılan ilaçların yaklaşık %25'i doğal bitki kökenlidir (Payne ve ark., 1991).

Bitkilerin antimikrobiyal aktiviteye sahip çok sayıda sekonder metabolit ürettiği *in vitro* deneylerle bilinmekte ve kanıtlanmaktadır (Rios ve Recio, 2005; Cos ve ark., 2006). Bu bitkilerden oluşan antibiyotikler, önceden oluşturulmuş engelleyici bileşikler olan fitoantikipinler veya mikrobiyal saldırıya yanıt olarak de novo sentez yoluyla öncülerden türetilen fitoaleksinler olarak sınıflandırılmıştır (VanEtten ve ark., 1994).

Gümüş iyonu  $Ag^+$ 'nin antimikrobiyal özelliklerinden biyomedikal alanında uzun süredir yararlanılmaktadır. Gümüş iyonunun önemli özelliği, biyomateriyale ilgili enfeksiyonlarla bağlantılı polimikrobiyal kolonizasyon için özellikle önemli olan geniş spektrumlu antimikrobiyal özelliğidir.

### Antimikrobiyal Aktivite Tayin Yöntemleri

Bir ekstraktın veya bir saf bileşiğin *in vitro* antimikrobiyal aktivitesini değerlendirmek veya taramak için çeşitli laboratuvar yöntemleri kullanılabilir. Bu yöntemlerle, maddenin antimikrobiyal aktiviteye sahip olup olmadığı, aktivitesi varsa Minimal İnhibisyon Konsantrasyonu (MİK) ve mikroorganizma spektrumu belirlenir. *In vitro* antimikrobiyal aktivite testleri içinde amaca en uygununu seçmek gerekir.

Yöntemin seçiminde; maddelerin sayısı, miktarı, çözünürlüğü ayrıca kullanılacak mikroorganizma cinsi, özelliği ve yoğunluğu rol oynar. Sonuçların güvenilir ve tekrarlanabilir olmasına ilaveten en az emekle en kısa sürede, en ekonomik olan yöntem tercih edilmelidir (Abbasoğlu, 1996). Ancak en bilinen yöntemler genelde Difüzyon ve Dilüsyon testleridir.

Antibiyotik duyarlılık testleri içinden en sık kullanılanlar:

Difüzyon testleri

Disk-difüzyon testi

E-test

2. Dilüsyon testleri

2.1. Agar dilüsyon testleri (katı besiyerinde sulandırım testi)

2.2. Broth dilüsyon testleri

#### **Disk-difüzyon testi:**

Esansiyel yağların antimikrobiyal aktivitesinin belirlenmesinde en sık kullanılan yöntem disk difüzyon yöntemidir. Ucuz ve uygulaması basit olan bu yöntem KirbyBauer tarafından geliştirilmiştir ve Kirby- Bauer ismiyle de anılmaktadır. Bu test, kâğıt disklere emdirilen antimikrobiyal maddenin, duyarlılığı araştırılan organizmanın inoküle edildiği besiyerine difüze olması temeline dayanmaktadır. Bu amaçla; agarlı besiyeri üzerine, çalışılacak uygun dilüsyondaki mikroorganizma kültüründen ekim yapılarak agarın bakteri süspansiyonunu emmesi sağlanmakta, ardından antimikrobiyal madde emdirilmiş steril diskler yerleştirilmektedir. Uygun sıcaklık ve inkübasyon süresi sonunda inhibisyon zon çapları ölçülerek yağın çalışılan mikroorganizma üzerine antimikrobiyal etkisi değerlendirilmektedir. İnhibisyon zonunun çapı diskteki antimikrobiyal maddenin miktarı ve difüzyon yeteneği, petri kutularındaki agarın kalınlığı gibi etmenlere bağlı olarak değişebilmektedir. Bu nedenle bu yöntem, esansiyel yağların antimikrobiyal etkinliğin varlığının belirlenmesi için uygun olsa da elde edilen sonuçların yayımlanmış verilerle karşılaştırılması için uygun değildir (Turhan, 2015).

#### **Dilüsyon testi:**

Sıvı ve katı besiyerinde dilüsyon teknikleri, bakterilere karşı antimikrobiyal maddenin *in vitro* aktivitesinin kantitatif ölçümüdür. Esas olarak, bir seri tüpe sıvı besiyeri veya petriye katı besi yeri konur. Antimikrobiyal madde çeşitli konsantrasyonlarda ilave edilir. Standardize edilmiş mikroorganizma süspansiyonu

(MacFarland 0.5) inokule edilir. Bir gece, 35°C'deki inkubasyondan sonra üremeyi engelleyen en madde konsantrasyonu (MİK) belirlenir (Abbasoğlu, 1996).

### **Mikroorganizmalar**

***Escherichia coli***: Gram negatif, spor oluşturmeyen, fakültatif anaerob, çubuk formunda bakterilerdir. Tipik bir mezofilik bakteri olan *E.coli* 7-45° C'leri arasında ürer. Sıcaklığa direnç göstermez. Etken uzun süreli soğuk ve donmuş muhafaza ortamında canlılığını korur. *E. coli*'nin optimal pH değeri nötre yakın olmakla birlikte diğer koşulların uygun olması halinde pH 4.4 gibi oldukça asidik değerlerde üreyebilir. *E.coli* suşlarının çoğu normal barsak florasında apatojen olmasına karşın, insan ve hayvanlardan çevreye yayılan *E.coli*'nin değişik vasıtalarla vücuda alınması halinde immun sistemi baskılanmış konaklarda veya bakterinin gastrointestinal bariyeri aşması halinde bu suşlarda enfeksiyona neden olabilirler (Uçar ve ark., 2015).

***Bacillus cereus***: Hareketli, spor oluşturan, Gram pozitif bakterilerdir. Endosporları geniş ölçüde, oval şekilli veya bazen silindirik veya yuvarlaktır. Uygun olmayan koşullara karşı dirençlidir. Toprakta doğal olarak bulunur ve çeşitli gıdalarda sıklıkla tespit edilmiştir. *B.cereus* sporları, biyofilm oluşumu yoluyla güçlü yapışma özelliklerine sahip olduklarından, işleme sırasında gıda kontaminasyonu meydana gelebilir. Emetik (kusma) ve ishal olarak adlandırılan iki ana bağırsak hastalığı tipine neden olur. Ayrıca, bakteri hem bağışıklığı baskılanmış hem de bağışıklığı yeterli bireylerde çeşitli sistemik ve lokal enfeksiyonlara neden olur. Bunlar fulminan sepsis, ilerleyici pnömoni benzeri şarbon ve merkezi sinir sisteminin yıkıcı enfeksiyonlarını içerir. *B.cereus* büyümesi, yüksek sıcaklık (> 105°C) ve 4°C'nin altında konserve ve depolama ile engellenebilir (Gharib ve ark., 2020).

***Candida albicans***: İnsanların yaklaşık %70'inde ve kadınların yaklaşık %75'inde yaşamları boyunca en az bir kez gastrointestinal ve genitoüriner sistemde zararsız bir kommensal olarak bulunan fırsatçı bir mantar patojenidir. Bununla birlikte, bağışıklığı baskılanmış hastalar, bazı immünolojik olarak zayıf bireyler ve hatta sağlıklı kişiler için fırsatçı patojen haline gelir. *C.albicans*'ın neden olduğu enfeksiyon genellikle kandidiyaz olarak bilinir. Sistemik Candida enfeksiyonları, HIV ile enfekte hastalar, transplant alıcıları, kemoterapi hastaları ve düşük doğum ağırlıklı bebekler dahil olmak üzere bağışıklığı baskılanmış bireylerde yaygındır (Kabir ve ark., 2012).

## 2.6. *P.lentiscus* L. Türü Üzerinde Yapılan *In vitro*, Biyolojik Aktivite ve Elisitasyon Çalışmaları

**Benhammou ve ark. (2008)**, *P.lentiscus* L. ve *P.atlantica* Desf. yapraklarına ait ekstraktların antimikrobiyal aktivitesi ve antioksidan özelliklerini 8 bakteri, 5 küf ve mayaya karşı incelemişlerdir. Sonuç olarak güçlü bir antifungal aktivite ancak zayıf bir antibakteriyel aktivite gözlemlendiğini rapor etmişlerdir.

**Piluzza ve Bullitta (2011)**, hayvanların sağlığı için geleneksel olarak kullanılan yabani ve ekili bitki türlerinden 24 ekstrakt hazırlayarak, bu ekstrelerin fenolik içerik ve antioksidan aktiviteleri bakımından karşılaştırmalı olarak yaptıkları çalışmalarında, Gallik asit eşdeğeri (GAE) olarak hesaplanan toplam fenoliklerin, 3.18 (*A.sativum* L.) ile 147.68 (*P.lentiscus* L.) mgGAE/g kuru ağırlık (DW) arasında değişiklik gösterdiğini, bu bağlamda, yüksek antioksidan aktiviteye sahip bitkilerin yüksek toplam fenolik içeriğe, düşük antioksidan aktiviteye sahip bitkilerin de düşük toplam fenolik içeriğe sahip olduklarını saptamışlardır.

**Kılınç (2013)**, %20'lik NaOCl te yüzey sterilizasyonuna tabi tuttuğu sakız tohumlarını inoküle ettiği MS besi ortamından %100 oranında sürgün proliferasyonu, 1 mgL<sup>-1</sup> BA ve 2iP destekli MS besi ortamından en uzun sürgünleri ve IBA'nın çalışılan en yüksek konsantrasyonunda ise güçlü bir köklenme elde ettiğini bildirmiştir.

**Saliha ve ark. (2013)**, ham kloroform, etil asetat ve sulu yaprak ekstrelerinin antioksidan aktivitelerini değerlendirmek için farklı antioksidan testleri uyguladıkları *P.lentiscus* bitkisinde, toplam fenolik miktarının, sırasıyla kloroform ekstraktı (CHE) ve ham metanolik ekstrakt (CE) için gallik asit eşdeğerleri olarak ifade edilen, 207±0.021 ve 390±0.005 mg/g kuru ağırlık arasında değiştiğini; toplam flavonoid içeriklerinin sulu ekstrakt (AQE) ve etil asetat ekstraktı (EAE) için sırasıyla 13±0.003 ve 82.37±0.0043 mg quercetin eşdeğeri/g kuru ağırlık arasında olduğunu ve etil asetat özütünün, sırasıyla 0.0068±0.0013 mg/ml, 0.16±0.0082 mg/ml ve 1.55±0.025 mg/ml IC<sub>50</sub> değeri ile DPPH, hidroksil radikal süpürme ve indirgeme gücü kullanılarak en yüksek antioksidan aktiviteyi gösterdiğini, ayrıca ham metanolik ekstraktın %94 inhibisyon ile en yüksek antioksidan aktiviteye sahip olduğunu bildirmişlerdir.

**Koç ve ark. (2014)**, *P.lentiscus*'un *in vitro* çimlendirilmiş tohumlarından elde ettikleri apikal ve nodal sürgün uçlarını eksplant kaynağı olarak kullandıkları çalışmalarında apikal sürgün uçlarının, çoklu sürgün oluşumuna daha iyi yanıt verdiğini, test edilen tüm GA<sub>3</sub> konsantrasyonlarının 1.0 mg/l BA ile kombinasyonunun

çoklu sürgün oluşumunu arttırdığını, eksplant başına maksimum sürgün sayısının (3.95) 1.0 mg/l BA ve 0.3 mg/l GA<sub>3</sub> içeren MS ortamından kaydedildiğini, buna karşılık, JA'nın çoklu sürgün oluşumu üzerinde olumsuz bir etki yaratırken, AgNO<sub>3</sub>'ün kaydadeğer bir değişikliğe yol açmadığını belirtmişlerdir. Sentetik tohum üretimi açısından kapsüllenen sürgün uçlarının, 4 °C'de karanlıkta 6 aya kadar %87.5 oranında rejenere edildiğini, ayrıca sentetik tohumlardan türetilen bitkiler dâhil olmak üzere *in vitro* çoğaltılan mikro sürgünlerin, köklenme için indol bütirik asit içeren MS ortamına aktarıldığını ve *ex vitro* koşullara başarılı bir şekilde alıştırıldığını son olarak çalışmalarının sentetik tohum üretimi yoluyla verimli bir *in vitro* rejenerasyon sistemi ve koruma önerdiğini rapor etmişlerdir.

**Mezni ve ark. (2014)**, Tunus'ta yetişen ve 6 farklı lokasyondan temin ettikleri sakız meyve yağlarının antimikrobiyal aktivite tayinini, disk difüzyon ve dilüsyon yöntemi ile test etmişlerdir. Kbouch ve Sidi Zid varyetelerine ait meyve yağlarının, 9.33 mm'lik bir inhibisyon bölgesi ile sırasıyla en fazla *S.aureus* ve *A.niger*'e karşı gösterdiğini tespit etmişlerdir. Fenolik ekstraktların, en geniş duyarlı mikroorganizma spektrumuna sahip olduğunu ayrıca tüm suşların hem yağ hem de ekstraktları tarafından inhibe edildiğini belirtmişlerdir.

**Bendifallah ve ark. (2014)**, Cezayir'in kuzeyindeki dağlık Boumerdes bölgesinden topladıkları *P.lentiscus* yapraklarını materyal kaynağı olarak kullanmışlar ve antimikrobiyal aktiviteleri için tanen ve polifenollerini, 3 patojenik bakteri suşuna ve 1 patojenik maya suşuna karşı incelemişlerdir. Fitokimyasal analiz sonuçları, tanen, lükoantosiyenin, glukozidler, alkaloidler, flavonoidler ve saponosidler gibi kimyasal bileşenlerin dikkate değer bir kombinasyonunu içerdiğini, ayrıca tanenler ve polifenollerin, bazı türlere karşı güçlü antimikrobiyal aktivite sergilediğini tespit etmişlerdir.

**Arab ve ark. (2014)**, *P.lentiscus*'un fenolik bileşikleri ve uçucu yağlarının fitokimyasal olarak incelenmesini ve antioksidan aktivitesini nicel ve nitel olarak değerlendirmeyi amaçladıkları çalışmalarından elde edilen sonuçlardan, yaprak ve meyvelerin antioksidan gücü yüksek maddelerden zengin olduğunu görmüşlerdir. 10 gr ağırlığındaki kuru bitkiden elde ettikleri fenolik bileşiklerin yapraklarda % 116.49 ve meyvelerde % 61.34 oranında bulunduğunu, yine 100 g ağırlığındaki kuru bitkiden elde ettikleri uçucu yağların ise % 0.253 ± 0.131 oranında olduğunu tespit etmişlerdir. *P.lentiscus*'un uçucu yağının kromatografik profilinde, monoterpenlerin ana bileşik olduğunu belirtmişlerdir (tanımlanan moleküllerin %9.675'i). Elde edilen ekstraktların

güçlü antioksidan aktivitesinin, sadece bu bitkinin yerel halk tarafından geleneksel kullanımını doğruladığını bildirmişlerdir.

**Akdemir ve ark. (2015)**, *P.lentiscus*'un tohumlarından itibaren hem *in vitro* olarak yetiştirilen hem de *in vivo* organlarından elde edilen yağ ekstraktlarının yağ asidi kompozisyonunu karşılaştırmalı olarak araştırdıkları çalışmalarında meyvelerde, reçinelerde, hem *in vivo* hem de *in vitro* olarak yetiştirilen erkek veya dişi ağacın kök, yaprak ve gövde ekstraktlarında, ana yağ asitlerinin linoleik, palmitik, oleik ve linolenik asitler olduğunu, başlıca yağ asitlerinin, *in vivo* olarak yetiştirilen erkek ağacın kök, yaprak ve gövde kısmında sırasıyla %56.94, %64.44 ve %55.57'yi oluşturan çoklu doymamış yağ asitleri ile temsil edildiğini ve incelenen iki genotipin de yağlarında oleik ve linolenik yağ asidinin olduğunu tespit etmişlerdir.

**Yemmen ve ark. (2017)**, Tunus'ta yetişen *P.lentiscus*'un yaprağı, meyvesi ve gövdesinden elde ettikleri polifenolle zenginleştirilmiş ekstraktların anti-proliferatif ve antioksidan aktivitesini değerlendirmek üzere yaptıkları çalışmada, en yüksek polifenol bileşenlerinin, toplam antioksidan kapasitenin ve sitotoksik etkinin, yaprak metanol ekstraktlarından elde edildiğini, ayrıca RP-HPLC analizine göre, *P.lentiscus* yaprağı, meyvesi ve gövdesinde ana fenolikler olarak tannik asit, gallik asit, quercetin, digalloil kinik asit türevi ve p-kumarik asit dâhil olmak üzere çeşitli fenolik bileşiklerin bulunduğunu saptamışlardır.

**Belhachat ve ark. (2017)**, *In vitro* yetiştirdikleri *P. lentiscus*'un meyvelerinden hazırladıkları etanol ekstraktlarının fitokimyasal bileşimi, toplam fenolik ve flavonoid içeriği ve antioksidan potansiyeli üzerine yaptıkları çalışmalarında, meyvelerin fenolik bileşikler, flavonoidler, antosiyaninler, lokoantosiyaninler, flobotaninler, tanenler, saponinler, terpenoidler, proteinler ve müsilaj içerdiğini, ancak alkaloid, kinon ve karotenoidlerin ise bulunmadığı, yine meyve ekstraktlarında yüksek miktarda toplam fenol, flavonoid içerdiğinin bulunduğunu ve güçlü bir serbest radikal süpürme aktivitesine sahip olduğunu rapor etmişlerdir.

**Erdönmez (2018)**, İzmir ilinin farklı ilçeleri ve Sakız Adası'ndan temin ettiği damla sakızı örneklerinin toplam fenolik madde miktarları ve antioksidan kapasitelerini araştırdığı çalışmada, damla sakızı örneklerinin antioksidan aktivitelerinin  $213,15 \pm 19,79$  ile  $330,62 \pm 5,50$   $\mu\text{mol}$  troloks eşdeğeri (TE)  $\text{g}^{-1}$  arasında değiştiğini, örneklerin % inhibisyon değerlerinin  $33,00 \pm 1,414$  ile  $52,50 \pm 0,707$  arasında olduğunu ve D1 (Yunanistan, Sakız adası) örneğinin antioksidan aktivite ve % inhibisyon değerinin

diğer örneklerle kıyaslandığı zaman ikinci sırada olduğunu, ancak diğer örneklerle kıyaslandığında istatistiksel bir farklılık göstermediğini tespit etmiştir.

**Alhadi ve ark. (2018)**, yaptıkları çalışmada, *P.lentiscus* ve *Phyllanthus anderssonii*'nin yaprak ve gövdeleri ile *Cinnamomum verum*'un yaprağını materyal kaynağı olarak kullanmışlardır. Etanol (%80) ekstreleri hazırlayarak bu ekstrelerin fitokimyasal tarama, antioksidan ve antimikrobiyal aktiviteleri bakımından değerlendirmişlerdir. Buna göre, *P.lentiscus* yaprağının etil asetat ekstrelerinin, ham etanol ekstrelerine oranla *B.subtilis* (19 mm), *S.aureus* (18 mm), *E.coli* (20 mm) ve *P.aeruginosa*'ya (22 mm) karşı daha yüksek bir antimikrobiyal aktivite gösterirken, sulu ekstrelerinin ise *S.aureus*'a (21 mm) karşı en yüksek antimikrobiyal aktivite gösterdiğini, gövde ekstrelerinin ise *B.subtilis* (etil asetat, bütanol ve sulu ekst. 19 mm), *P.aeruginosa* (etil asetat ekst. 18 mm) ve *C.albicans*'a (etil asetat ekst. 20 mm) karşı yine yüksek oranda antimikrobiyal aktivite sergilediğini, ayrıca antioksidan aktivite bakımından da *P.lentiscus* yaprağının %95 oranında en yüksek DPPH süpürme aktivitesine sahip olduğunu belirtmişlerdir.

**Tilkat ve ark. (2018)**, sakız ağacına ait tohumları başarılı bir şekilde çimlendirmiş ve elde ettikleri aksenik stok materyallerden, yaklaşık 1 cm uzunluğunda aldıkları sürgünleri, biyotik ve abiyotik olmak üzere 25 farklı elisitör uygulamasına tabi tutmuşlardır. Test ettikleri elisitasyon çalışmalarında, uygulamaların çoğunda genellikle sekonder metabolit oluşumunu hem miktar hem de çeşit bakımından tetiklediğini, özellikle 4 mg/l AgNO<sub>3</sub> uygulamasının Ursolik Asit (2.915 ppm) gibi triterpenoitlerin miktarlarında belirgin derecede artış sağladığını ve 1 mg/l MeJA uygulamasının ise kontrol grubunda tespit edilemeyen farklı triterpenoitlerin oluşumuna (Oleonolik Asit ve Mastikadienolik Asit) yol açtığını rapor etmişlerdir.

**Salhi ve ark. (2019)**, farklı *P.lentiscus* yaprakları ekstraktlarının toplam fenolik (TPC), toplam flavonoid (TF) ve flavonol (FV) içeriklerinin yanı sıra antioksidan ve antimikrobiyal aktivitelerini araştırdıkları çalışmalarında, antimikrobiyal aktivite sonuçlarını, gram pozitif bakterilere (*Micrococcus luteus*, *Bacillus subtilis* ve *Listeria innocua*), gram negatif bakterilere (*Escherichia coli*) ve mantarlara (*Candida pelliculosa* ve *Fusarium oxysporum albidinis*) karşı değerlendirmişlerdir. Genel olarak, etanol ekstrelerini en yüksek TPC, TF, FV içeriğine sahip olup en yüksek radikal süpürücü etki gösterdiğini, metanol ekstresinin ise en yüksek ferrik azaltıcı aktivite (FRAP) gösterdiğini belirtmişlerdir. Ayrıca ekstraktların antioksidan aktivitelerinin TP, TF ve flavonoller ile güçlü pozitif korelasyon sergilediğini ve elde edilen ekstraktların,

test edilen bakteri ve mantar türlerinin çoğuna karşı iyi bir inhibitör etki göstererek *P.lentiscus*'un tıbbi veya tarımsal sanayi sektörlerinde antimikrobiyal ajanlar olarak kullanılabileceğini rapor etmişlerdir.

**Barbouchi ve ark. (2020)**, Fas'ın iki farklı bölgesi; Moulay Idriss Zerhoun (MIZ) ve Melloussa (MLS) bölgelerinde yetişen *P.lentiscus*'un farklı kısımlarını (meyveler, dallar ve yapraklar) kullanarak hazırladıkları 30 ekstrenin fitokimyasal bileşenleri, toplam fenolik içeriğindeki varyasyonları ve antioksidan kapasitelerini araştırmışlardır. Tarama testleri sonucunda ekstrelerin tanenler, flavonoidler, saponinler, steroller, triterpenler, ozlar, holosidler, indirgeyici şekerler ve müsilajları barındırdığı, kantitatif analiz sonucunda ise, tüm bitkinin yüksek miktarda toplam fenolik içerdiğini, ayrıca kullanılan ekstraksiyon çözücülerinin polaritesine bağlı olarak bu içeriğin arttığını ve dolayısıyla neredeyse bitkinin tüm kısımlarının, doğal olarak oluşan antioksidanların büyük bir kaynağı olarak kullanılabileceğini bildirmişlerdir.

**Bakli ve ark. (2020)**, *P.lentiscus* L. yapraklarından hazırladıkları ekstreleri öncelikle fenolik içeriği açısından analiz etmişler, akabinde ise flavonoidlerini 14 bakteri, 2 mantar ve 1 mayaya karşı difüzyon yöntemiyle antimikrobiyal kapasiteleri açısından test etmişlerdir. Sonuç olarak ekstrelerin çeşitli diğer fenolik grupları içerdiğini, antibakteriyel testlerin suşlara bağlı olarak farklı aktiviteler sergilediğini, MIC ve MBC sonuçlarına göre, flavonoid özütünün *Candida albicans* ve *Vibrio cholerae*'ye karşı en yüksek aktiviteyi gösterdiğini belirterek bu bitkinin terapötik amaçlar için kullanılabileceğini belirtmişlerdir.

### 3.MATERYAL VE YÖNTEM

#### 3.1. Materyal

##### 3.1.1. Bitkisel materyal

Bu çalışmada, materyal kaynağı olarak İzmir'in Çeşme ilçesinde bulunan Çiftlikköy beldesi civarında doğal olarak yetişen *P.lentiscus* L. ağaçlarından toplanan tohumlar kullanıldı (Şekil 3.1). Tohumlar, kültüre alınana kadar +4°C'de buzdolabında muhafaza edildi.



Şekil 3.1. *P.lentiscus* L. tohumları

#### 3.2.Yöntem

##### 3.2.1. *In vitro* çalışmalar

###### Ön hazırlıklar

*In vitro* çalışmalar, mikroorganizmalardan (bakteri, mantar, virüs) ve diğer bitki zararlılarından arındırılmış ortamlarda yapılır ve besin maddeleri ve hormon faktörleri gibi çevre faktörleri ile optimize edilir. Bu bağlamda başarılı bir kültür başlatılması için, çalışma öncesinde kültür odası başta olmak üzere, kullanılan tüm alet, ekipman ve cam malzemelerin fiziksel özelliklerine göre steril edilmeleri sağlandı.

Çalışma öncesinde steril kabinin iç ve dış yüzeyi % 96'lık alkol ile, kabin dışındaki yerler ise seyreltilmiş NaOCI ile temizlendikten sonra zaman ayarlı ultraviyole lambası açılarak odanın genel sterilizasyonu yapıldı. Cam malzemeler (erlenmayer, cam şişe, mezür, balon joje, pipet vb.) sıcak su ile yıkandıktan sonra üç defa saf sudan geçirilerek 180°C'de etüvde 3 saat bekletildi. Pens ve bisturiler, % 96'lık etil alkol (EtOH) ile temizlendikten sonra boncuklu sterilizatörde (Steri 350 swiss

made) 10 dk süre ile 250 °C’de, Magenta GA-7 kültür kapları, 121°C’de, 1 atm. basınç altında, 25 dakika süre ile otoklavda ve son olarak distile sular ise, 121°C’de 15 psi basınç altında 3 saat boyunca etüvde bekletilerek sterilize edildi.

Yaptığımız literatür taramaları ışığında tez çalışmamız süresince kullanılacak bitki büyüme düzenleyicileri (BBD) belirlendi. Bitki büyüme düzenleyicilerine (BA, GA<sub>3</sub>, IBA) ait stok çözeltiler (mg/ml), uygun çözücüler ve bir magnet kullanılarak hazırlandı. Hazırlanan stok solüsyonlar buzdolabında 4 °C’de saklandı. Tüm *In vitro* çalışmalarda modifiye MS (Murashige ve Skoog, 1962) besi yeri kullanıldı. MS besi ortamının hazırlanmasında kullanılan solüsyonlar ve miktarları, standart bir MS besi ortam içeriği (g/l) ve konsantrasyonları sırasıyla **Çizelge 3.1.**, ve **3.2.**’de sunuldu.

**Çizelge 3.1.** MS besi ortamının hazırlanmasında kullanılan solüsyonlar ve miktarları

| <b>MS (Makro Elementler) Ana Solüsyonu</b>          |                        |
|-----------------------------------------------------|------------------------|
| NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>                     | 16.5g                  |
| KNO <sub>3</sub>                                    | 19.0 g                 |
| CaCl <sub>2</sub> .2H <sub>2</sub> O                | 4.4 g                  |
| MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O                | 3.7 g                  |
| KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>                     | 1.7 g                  |
| Distile Su                                          | 1000 ml’ye tamamlanır. |
| <b>MS (Mikro Elementler-1) Ana Solüsyonu</b>        |                        |
| H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>                      | 620 mg                 |
| MnSO <sub>4</sub> .4H <sub>2</sub> O                | 1695 mg                |
| ZnSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O                | 860 mg                 |
| KI                                                  | 83 mg                  |
| Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> .2H <sub>2</sub> O | 35 mg                  |
| Distile Su                                          | 1000 ml’ye tamamlanır. |
| <b>MS (Mikro Elementler-2) Ana Solüsyonu</b>        |                        |
| CuSO <sub>4</sub> .5H <sub>2</sub> O                | 25 mg                  |
| CoCl <sub>2</sub> .6 H <sub>2</sub> O               | 25 mg                  |
| Distile Su                                          | 200 ml’ye tamamlanır.  |
| <b>Komplex Kelatör Ana Solüsyonu</b>                |                        |
| FeSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O                | 3,725 g                |
| Na <sub>2</sub> EDTA                                | 2,785 g                |
| Distile su                                          | 1000 ml’ye tamamlanır. |
| <b>Vitamin Karışımı Ana Solüsyonu</b>               |                        |
| Nikotinik asit                                      | 50 mg                  |
| Glisin                                              | 200 mg                 |
| Pridoksin HCl                                       | 50 mg                  |
| Distile su                                          | 100 ml’ye tamamlanır.  |

| <b>B<sub>1</sub> Vitamini Ana Solüsyonu (10<sup>-3</sup>)</b> |                        |
|---------------------------------------------------------------|------------------------|
| Tiamin HCl                                                    | 10 mg                  |
| Distile Su                                                    | 100 ml'ye tamamlanır.  |
| <b>Myo-inositol (10<sup>-3</sup>)</b>                         |                        |
| myo-inositol                                                  | 100 mg                 |
| Distile Su                                                    | 1000 ml'ye tamamlanır. |

**Çizelge 3.2.** Standart MS besi ortam içeriği\* (g/l)

|                                       |                         |
|---------------------------------------|-------------------------|
| MS ana solüsyonu (Makro elementler)   | 100 ml                  |
| MS mikroelementler-1                  | 10 ml                   |
| MS mikroelementler-2                  | 1 ml                    |
| Komplex kelatör                       | 10 ml                   |
| Vitamin karışımı                      | 1 ml                    |
| B <sub>1</sub> vitamini ana solüsyonu | 1 ml                    |
| Sakkaroz                              | 30 g                    |
| Agar                                  | 6.2 g                   |
| Distile su                            | 1000 cc.'ye tamamlanır. |

\* Tez çalışmasında Sigma Ltd. kimyasalları kullanılmıştır.

### **Tohumların *In vitro* şartlarda yetiştirilmesi**

Olgun tohumlar sert kabuklarından bir kırıcı yardımıyla ayrılarak, % 20'lik Sodyum hipoklorit (NaOCl-ACE) içerisinde 20 dk çalkalandı. Akabinde 3 defa 5' er dakika steril distile ile çamaşır suyu bulaşığından arındırıldı.

Yüzey sterilizasyonu tamamlanan tohumlar öncelikle 1 mg/l IBA destekli MS besi ortamında çimlendirilerek elde edilen aksenik gövdelerin çoğaltımı, 2 mg/l BA, 0.5 mg/l GA<sub>3</sub> ile destekli MS besi ortamında gerçekleştirildi. Elde edilen juvenil sürgünlerin proliferasyonu için ise, 1 mg/l BA, 50 mg/l valin, 30 g şeker ve 5.4 gr agar içeren MS besi ortamı temel proliferasyon ortamı olarak kullanılarak stok kültürler üretildi (Yıldırım, 2012; Onay ve ark., 2014; Kılınç ve ark., 2015). Tüm kültürler 25±2 °C ve 16/8 saat ışık/karanlık fotoperiyodu uygulanan kontrollü bitki büyüme odasında ortalama 28 gün boyunca kültüre alındı.

### **AgNP'lerin hazırlanması ve kültür ortamına ilave edilmesi**

AgNP konsantrasyonu 1, 2 ve 4 mg/l olacak şekilde steril distile suda çözülerek, 0.20 µm'lik filtreden geçirilerek steril edildi. Filtreden geçirilen AgNP çözeltisi 2 mg/l BA ve 0.5 mg/l destekli MS besi ortamına otoklav sonrasında 1,2 ve 4 ml olacak şekilde eklenerek besi ortamları oluşturuldu.

Farklı konsantrasyonlarda AgNP ilave edilen besi ortamlarında inkübe edilen sürgünlerin proliferasyon çalışmalarında, veriler kültürün 28. gününde toplam 30 eksplantın ortalamasından elde edilmiştir. Yapılan gözlemler ve alınan ölçümler şu şekildedir: Eksplant başına oluşan gövde sayısı, ortalama gövde uzunlukları ve gövde oluşturma kapasitesi (GOK) hesaplanmıştır. GOK, Lambardi ve ark. (1993)'nın rapor ettikleri formüle göre hesaplanmıştır:

G.O.K indeksi= Rejenere olan eksplant başına oluşan ortalama gövde sayısı  $\times$  rejenere olan eksplant yüzdesi / 100

### 3.2.2. Biyolojik aktivite çalışmaları

#### 3.2.2.1. Antioksidan aktivite tayini

Ekstrelerin antioksidan aktivitelerini belirlemek için DPPH serbest radikali giderim aktivitesi yöntemi, ABTS yöntemi (katyon radikali giderim aktivitesi) ve CUPRAC yöntemi (bakır (II) iyonu indirgeme antioksidan kapasitesi) olmak üzere üç farklı yöntem çalışıldı.

#### Ekstraksiyon

Farklı AgNP konsantrasyonlarında *in vitro* olarak üretilen sürgünler ve AgNP uygulanmamış kontrol grubuna ait sürgünler ayrı ayrı olacak şekilde yaş ve kuru ağırlıkları alındı. Akabinde her bir grup ayrı ayrı kurutulup öğütüldükten sonra 10 ml etanolde 24 saat  $\times$  3 kez masere edildi. Evaporatör kullanılarak etanolün uzaklaştırılması ile ham ekstratlar elde edildi. Elde edilen ekstre miktarları ve % verim oranları **Çizelge 3.3.**'te sunuldu. Cam şişelere alınıp etiketlenen ekstratlar +4 °C'de muhafaza edildi.

**Çizelge 3.3.** Ekstre miktarları ve % verim oranları

| Ekstreler   | Ekstre Miktarı (µl) | % Verim <sup>a</sup> |
|-------------|---------------------|----------------------|
| Kontrol     | 5680                | 17,27                |
| 1 mg/l AgNP | 2690                | 14,90                |
| 2 mg/l AgNP | 2700                | 15,53                |
| 4 mg/l AgNP | 2320                | 16,67                |

<sup>a</sup>: % verim = (Ekstre miktarı/Kuru ağırlık)  $\times$  100

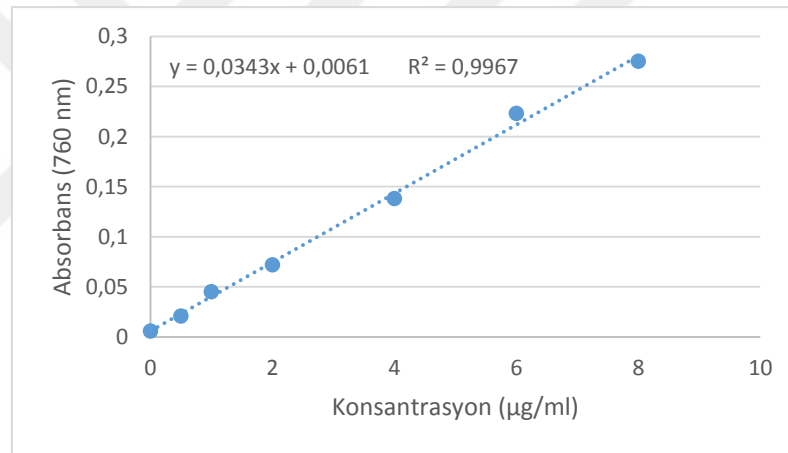


### Şekil 3.2. Ekstraksiyon işlemi

#### Ekstrelerin Toplam Fenolik Madde Miktar Tayini

Ekstrelerin toplam fenolik içerikleri Folin-Ciocalteu reaktifi kullanılarak gallik asit eşdeğer olarak belirlendi (Slinkard ve Singleton 1977). 100 µL FCR'ye 1000 ppm konsantrasyondaki ekstrelerden 100 µL ve son hacmi su ile 5 mL'ye tamamlanarak 3 dakika inkübasyona bırakıldı. Ardından 300 µL %2'lik Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> eklenerek oda sıcaklığında 2 saat inkübasyona bırakıldı. Farklı konsantrasyonlardaki gallik asit çözeltileri için de aynı işlem uygulanarak inkübasyon sonrasında 760 nm'de spektrofotometrik ölçüm alındı. Ekstrelerin toplam fenolik içerikleri standart gallik asit grafiğinden elde edilen aşağıdaki eşitlik kullanılarak belirlendi (Şekil 3.3) . Her bir örnekten üç paralel ölçüm yapıldı.

Gallik asite eşdeğer fenolik içerik ( $y=0.0343x-0.0061$   $R^2=0.9967$ ).

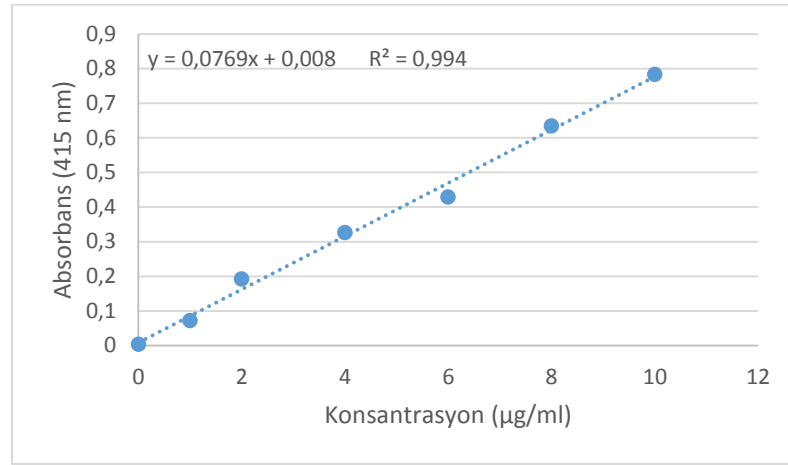


Şekil 3.3. Gallik asit ölçü grafiği

#### Ekstrelerin Toplam Flavonoit Miktar Tayini

Ekstrelerin toplam flavonoit miktarları kersetin eşdeğer olarak alüminyum nitrat yöntemi ile belirlendi (Moreno ve ark. 2000). 100 µl 1 M potasyum asetat çözeltisine 1000 ppm konsantrasyondaki ekstrelerden 100 µl eklendi ve son hacmi etanol ile 4.8 ml'ye tamamlanarak 1 dakika inkübasyona bırakıldı. Ardından 100 µl %10'luk Al(NO<sub>3</sub>)<sub>3</sub> eklenerek oda sıcaklığında 40 dakika inkübasyona bırakıldı. Farklı konsantrasyonlardaki kersetin çözeltileri için de aynı işlem uygulanarak inkübasyon sonrasında 415 nm dalga boyunda spektrofotometrik ölçüm alındı. Ekstrelerin toplam flavonoit miktarları standart kersetin grafiğinden elde edilen aşağıdaki eşitlik kullanılarak belirlendi (Şekil 3.4). Her bir örnekten üç paralel ölçüm yapıldı.

Kersetine eşdeğer flavonoit içerik ( $y=0.0769x-0.008$   $R^2=0.994$ )



Şekil 3.4. Kersetin ölçü grafiği

#### DPPH Serbest Radikali Giderim Aktivitesi Yöntemi

Ekstrelerin serbest radikal giderim aktiviteleri 1,1-difenil-2-pikrilhidrazil (DPPH) serbest radikali kullanılarak belirlendi (Blois 1958). 4 ml 0.1 mM DPPH çözeltisine farklı konsantrasyonlardaki bitki ekstratlarından 1 ml eklenerek karanlıkta oda sıcaklığında 30 dakika bekletildi. Ardından 517 nm'de spektrofotometrik ölçüm alındı. Aynı işlem pozitif kontrol olarak kullanılan BHT, BHA, ve Askorbik Asit için de uygulandı. Elde edilen absorbans değerleri aşağıdaki formülde yerine yerleştirilerek inhibisyon yüzdesi (%I) hesaplandı.

$$\%I = (A_{\text{kontrol}} - A_{\text{örnek}}/A_{\text{kontrol}}) \times 100$$

$A_{\text{kontrol}}$  kontrol tüpünün (test bileşikleri dışında tüm ayıraçları içeren tüp) absorbans değerini,  $A_{\text{örnek}}$  ise her bir konsantrasyon için hazırlanan tüpün absorbans değerini ifade etmektedir. Her test farklı zamanlarda 3 tekrar halinde gerçekleştirildi.

#### ABTS (Katyon Radikali Giderim Aktivitesi) Yöntemi

Ekstrelerin ABTS katyon radikal giderim aktiviteleri 2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolin-6-sülfonik asit) kullanılarak belirlendi (Re ve ark. 1999). ABTS,  $K_2S_2O_8$ ,  $MnO_2$ ,  $H_2O_2$  gibi güçlü yükseltgenler ile tepkimeye sokulup  $ABTS^{+}$  oluşturulur. 7 mM 5 ml ABTS çözeltisi üzerine 3.3 mg  $K_2S_2O_8$  eklendi ve oda sıcaklığında karanlıkta 16 saat bekletildi. Ardından 734 nm dalga boyunda absorbansı 0.7 olacak şekilde etanol ile seyreltildi. 4 ml  $ABTS^{+}$  reaktifine 1 ml farklı konsantrasyonlardaki örneklerden eklenerek karanlıkta bekletildi. 6, 15 ve 30. dakikalarda 734 nm dalga boyunda ölçüm alındı. Örneklerin absorbans değerleri

kontrole karşı değerlendirildi. ABTS kation radikal giderim aktivitesi (% inhibisyon) aşağıdaki eşitlik kullanılarak hesaplandı.

$$\% \text{ İnhibisyon} = (A_{\text{kontrol}} - A_{\text{örnek}}) / A_{\text{kontrol}} \times 100$$

Her bir örnekten üç paralel çalışma yapıldı. Standart olarak BHT, BHA ve askorbik asit kullanıldı.

### **CUPRAC Yöntemi (Bakır (II) İyonu İndirgeme Antioksidan Kapasitesi)**

CUPRAC yönteminde, örneklerdeki antioksidan bileşikler varlığında Cu(II)-Neokuproin (Nc) kompleksi, renkli Cu(I)-Nc kelatına indirgenir ve bu kelatın 450 nm dalga boyunda absorbansı ölçülür (Apak ve ark. 2004). 1 ml örnek üzerine 1 ml CuCl<sub>2</sub>.2H<sub>2</sub>O, neokuprin ve amonyum asetat tamponu eklendi ve 1 saat sonra 450 nm dalga boyunda absorbans ölçüldü. Örneklerin absorbans değerleri kontrole karşı değerlendirildi.

### **3.2.2.2. Antimikrobiyal aktivite tayini**

Ekstrelerin antimikrobiyal aktiviteleri, Gram negatif (*Escherichia coli* ATCC 25922), Gram pozitif (*Bacillus cereus* DSSM 4312) bakteri ve mantar (*Candida albicans* ATCC 10231) üzerinde çalışılarak belirlendi. Antimikrobiyal aktiviteyi tespit etmek için disk difüzyon yöntemi uygulandı (NCCLS 1997) (Şekil 3.5). Her mikroorganizmadan öze ile aşılama yöntemiyle ekim yapılan Nutrient broth (NB) sıvı besiyeri 12-16 saat 37 °C’de inkübasyona bırakıldı. Gecelik kültürü hazırlanan test mikroorganizmalarından 100 µl alınarak nutrient agar katı besiyeri üzerine yayma ekim yapıldı. Ardından tüm ekstrelerin hazırlanmış farklı konsantrasyonlarından 10 µl alınarak yayma ekim yapılan petrilere yerleştirilmiş steril kağıt disklere emdirildi. Bakteriler için 37 °C’de 24 saatlik inkübasyon, mantar için 30 °C’de 48 saatlik inkübasyondan sonra inhibisyon zon çapları ölçüldü. Aynı işlem pozitif (bakteri için imipenem, mantar için fluconazole) ve negatif kontrol (etanol ve su) için de tekrarlandı. Her test farklı zamanlarda 3 tekrar halinde gerçekleştirildi.



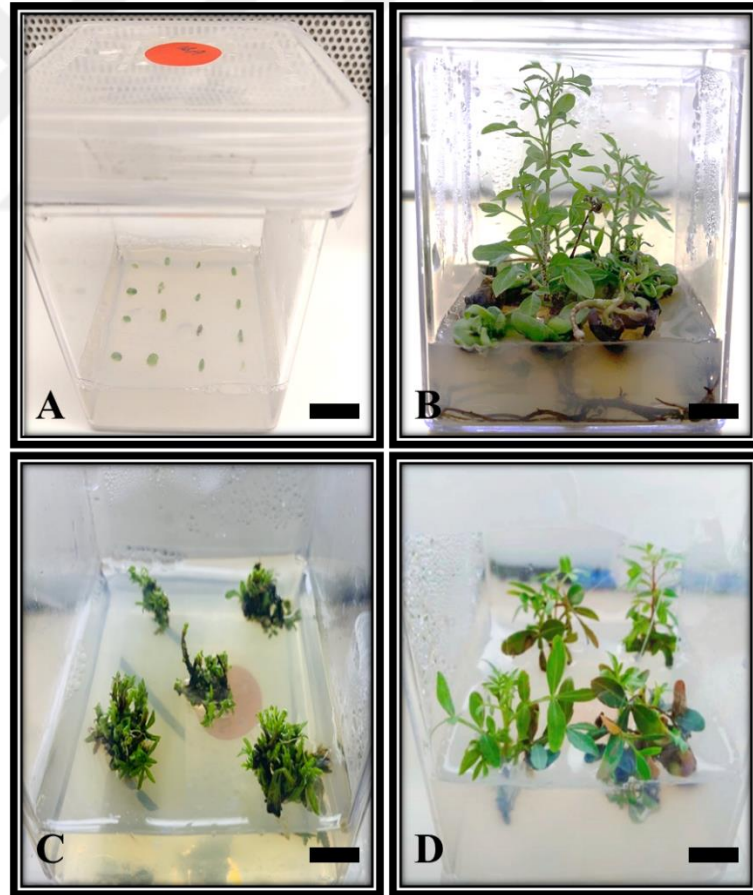
**Şekil 3.5.** Antimikrobiyal aktivite tayin çalışması



#### 4. ARAŞTIRMA SONUÇLARI VE TARTIŞMA

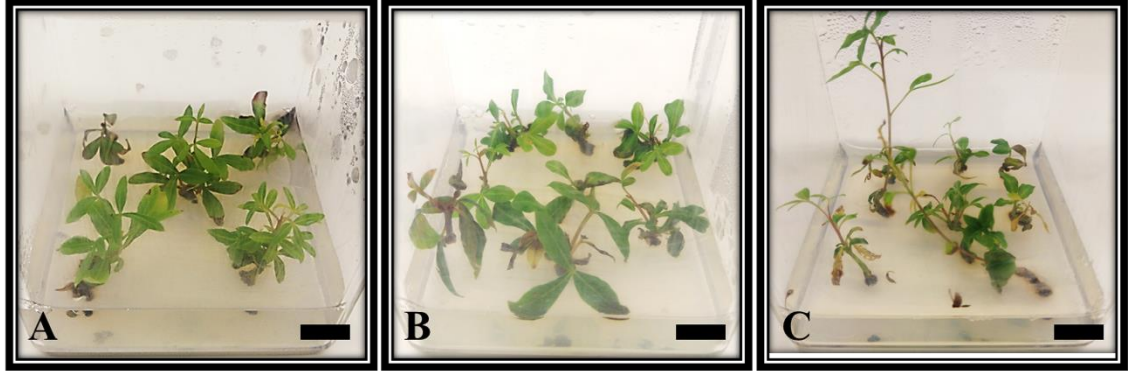
##### 4.1. *In vitro* Çalışmalara Ait Sonuçlar ve Tartışma

*P.lentiscus* L.'un tohumlarının materyal kaynağı olarak kullanıldığı bu tez kapsamında, uygulanan yöntem bakımından başarılı bir doku kültürü çalışması gerçekleştirilmiştir. Bu bağlamda, yüzey sterilizasyonu tamamlanmış tohumlar 1 mg/l IBA destekli MS besisi ortamında inkübasyona bırakılmış (Şekil 4.1.A) ve tohumların çimlenmesi sonucu oluşan aksenik sürgünler, 28 günlük bir kültür süresi sonunda sürgün çoğaltımı ve stok kültürlerin eldesi için eksplant kaynağı olarak kullanıldı (Şekil 4.1.B) Sürgünlerin proliferasyonu çalışmalarında ortalama 0.5 – 1 cm boyundaki sürgünler 2 mg/l BA, 0.5 mg/l GA<sub>3</sub> ile destekli MS besisi ortamında çoğaltılmıştır (Şekil 4.1.C). Prolifere edilen juvenil sürgünler 1 mg/l BA, 50 mg/l valin, 30 g şeker ve 5,4 g/l agar içeren MS besisi ortamına aktarılmış ve kontrol grubu için yeterli sayıda stok kültürler elde edilmiştir (Şekil 4.1.D).



**Şekil 4.1.** (A) 1 mg/l IBA destekli MS besisi ortamında çimlenmeye bırakılan tohumlar, (B) 28 günlük kültür süresi sonunda elde edilen fideler, (C) 2 mg/l BA, 0.5 mg/l GA<sub>3</sub> ile destekli MS besisi ortamında çoğaltılan sürgünler, (D) 1 mg/l BA içeren MS besisi ortamında gelişen stok kültürler Bar:1,2cm

1, 2 ve 4 mg/l konsantrasyonlarında hazırlanan AgNP'lerin ilave edildiği MS besi ortamından elde edilen sürgünler (Şekil 4.2. A, B, C) bir kontrol grubuyla birlikte kurutulmuş ve biyolojik aktivite çalışmalarında kullanılmıştır.



Şekil 4.2. Farklı konsantrasyonlarda hazırlanan AgNP destekli besi yerinde gelişen sürgünler (A) 1 mg/l (B) 2 mg/l ve (C) 4 mg/l AgNP ekli MS Besi ortamı, Bar: 1 cm

Çizelge 4.1. Farklı AgNP konsantrasyonlarının (1, 2, 4 mg/l) sürgünlerin morfolojik gelişimleri üzerine etkisi.

| AgNP Konsantrasyonu | Rejenerasyon (%) | Gövde/Eksplant (Ort±SH) | Gövde Uzunluğu (Ort±SH cm) | G.O.K. |
|---------------------|------------------|-------------------------|----------------------------|--------|
| Kontrol             | 100              | 1.70±0.20c              | 1.75±0.20a                 | 1.70   |
| 1 mg/l              | 100              | 2.36±0.19b              | 1.34±0.11b                 | 2.36   |
| 2 mg/l              | 100              | 2.59±0.17ab             | 0.95±0.06c                 | 2.59   |
| 4 mg/l              | 100              | 2.67±0.21a              | 1.26±0.09b                 | 2.67   |

Veriler kültür başlatılmasından 4 hafta sonra toplanmıştır. Her bir deneme 30 eksplant kullanılarak yapılmıştır. Her sütunda yer alan birbirinden farklı harfler, Post Hoc çoklu karşılaştırılmalı teste göre belirgin bir fark ( $P \leq 0.05$ ) oluşturmaktadır. Ort: Ortalama, SH: standart hata. G.O.K: Gövde Oluşturma Kapasitesi (Rejenere olan eksplant başına oluşan ortalama gövde sayısı  $\times$  rejenere olan eksplant yüzdesi / 100)

Çizelge 4.1. irdelendiğinde, 2 mg/l BA ve 0.5 GA<sub>3</sub> destekli MS besi ortamına eklenen AgNP uygulamalarından elde edilen sürgünlerin kontrol grubuna oranla eksplant başına düşen gövde sayısında artış tespit edilmiştir. En yüksek gövde/eksplant oranı 4 mg/l AgNP ilave edilen 2 mg/l BA ve 0.5 GA<sub>3</sub> destekli MS besi ortamında hesaplanırken ( $2.67 \pm 0.21$ ), en düşük gövde/eksplant oranı ise kontrol grubundan (2 mg/l BA ve 0.5 GA<sub>3</sub> destekli MS besi ortamında) elde edilmiştir ( $1.70 \pm 0.20$ ). İstatistiksel olarak değerlendirildiğinde, 4 mg/l AgNP uygulanan sürgün kültürlerinin hesaplanan Gövde/Eksplant oranı ile 2 mg/l AgNP uygulanan sürgün kültürleri arasında Gövde/Eksplant oranı bakımından istatistiksel olarak fark tespit edilmezken, kontrol ve 1 mg/l AgNP uygulanan kültürler arasında Gövde/Eksplant oranı bakımından istatistiksel bir fark tespit edildi ( $P \leq 0.05$ ). Gövde uzunluğu bakımından en yüksek ortalama gövde uzunluğu kontrol grubunda hesaplanırken ( $1.75 \pm 0.20$ ), en düşük ortalama gövde uzunluğu ise 1 mg/l AgNP ilave edilmiş MS besi ortamında hesaplandı

( $1.34 \pm 0.11$ ). Gövde oluşturma kapasitesi ise (GOK) kontrol, 1 mg/l, 2 mg/l, 4 mg/l'de sırasıyla 1.70, 2.36, 2.59, 2.67 tespit edildi. Morfolojik olarak değerlendirildiğinde artan AgNP konsantrasyonunda gövde oluşumu gözlenirken, yine artan AgNP konsantrasyonlarında gövdelerde sararma ve kızarma gözlemlenmiştir. Ayrıca yine artan AgNP konsantrasyonlarında yaprak şekillerinde ve yaprak dizilişlerinde varyasyonlar tespit edilmiştir (Şekil 4.3).



Şekil 4.3. 4 mg/l AgNP uygulanan sürgün kültürlerinin yaprak dizilişlerinde görülen varyasyonlar.

AgNPlerin farklı konsantrasyonlarının (0, 0.5, 1.5, 10, 25, 40 ppm) fesleğen (*Ocimum basilicum* L.)'nin morfolojik ve fizyolojik parametreleri üzerindeki etkilerinin incelendiği bir çalışmada konsantrasyon artışının kök ve sürgünlerin kuru ağırlık ve boy uzunlukları üzerinde olumsuz bir etki gösterdiği bildirilmiştir (Yosefzaei ve ark., 2016).

*Lemna minor* bitkisinin büyüme ve gelişmesi üzerine  $\text{TiO}_2\text{NP}$  uygulamalarının etkisinin araştırıldığı Song ve ark., (2012) tarafından yapılan başka bir çalışmada ise,  $\text{TiO}_2\text{NP}$ 'lerinin, düşük konsantrasyonlarda bitki büyümesini uyardığı, ancak yüksek konsantrasyonlarda bitki büyümesini engellediği rapor edilmiştir. Mohammadi ve ark., (2016)'nın farklı konsantrasyonlarda  $\text{TiO}_2\text{NP}$ 'leri (0, 10 ve 40 ppm) ve kuraklığın *Dracocephalum moldavica* L. üzerindeki etkilerini araştırdıkları çalışmalarında normal sulanan bitkilere yapraktan 10 ppm  $\text{TiO}_2\text{NP}$  uygulamasının, bitki sürgün kuru ağırlığı ve uçucu yağ içeriğini artırdığını belirtmişlerdir. Bitkilerin NP uygulamalarına yanıtlarının, bitkinin genotipine, NP çeşidine, uygulama süresine ve uygulanan doku veya organın yapısına bağlı olarak değiştiği bilindiğinden, *in vitro* yetiştirilen ve ilk kez *P.lentiscus* sürgünlerine uygulanan AgNP'lerinin sürgün gelişimi üzerindeki etkilerini araştırdığımız bu tez kapsamında, bulgularımızın yukarıda verilen literatür sonuçlarına benzer şekilde artan AgNP konsantrasyonlarında sürgün sayısının kademeli olarak

arttığı, bunun yanı sıra sürgün boyu ve yaprak morfolojisinin ise olumsuz yönde etkilendiği tespit edilmiştir.

## 4.2. Antioksidan Aktivitelere Ait Sonuçlar ve Tartışma

### 4.2.1. Toplam fenolik ve flavonoid içeriklerine ait sonuçlar

Tüm ekstrelerin toplam fenolik miktarı gallik asite, toplam flavonoid içeriği ise kersetine (quercetin) eşdeğer olarak belirlenmiştir. Kontrol grubu ile birlikte, elisitör olarak besi ortamına ilave edilen 1, 2 ve 4 mg/l AgNP uygulamalarının, toplam fenolik ve flavonoid içeriğine etkisinin sunulduğu **Çizelge 4.1.** irdelendiğinde, besi ortamına ilave edilen farklı konsantrasyonlardaki AgNP uygulamalarının genel anlamda hem fenolik hem de flavonoid madde miktarında kontrol grubuna oranla artışa yol açtığı tespit edilmiştir. Çalışılan ekstreler arasında en yüksek toplam fenolik içerik  $67.63 \pm 0.014$   $\mu\text{g}/\text{mg}$  ile 1 mg/l AgNP uygulamasından elde edilirken, bunu sırasıyla 2 mg/l ( $63.99 \pm 0.000$ ) ve 4 mg/l AgNP ( $59.62 \pm 0.029$ ) uygulamalarının takip ettiği gözlenmiştir. En yüksek toplam flavonoid içerik ise,  $18.53 \pm 0.006$   $\mu\text{g}/\text{mg}$  ile 2 mg/l AgNP uygulamasından elde edilmiştir. Yine 1 mg/l ( $17.23 \pm 0.071$ ) ve 4 mg/l AgNP ( $11.70 \pm 0.013$ ) uygulamalarının toplam flavonoid içerik bakımından bu sıralamayı takip ettiği belirlenmiştir.

**Çizelge 4.1.** Toplam fenolik ve flavonoid içerikleri<sup>a</sup>

| Ekstreler          | Fenolik içerik<br>( $\mu\text{gGAs}/\text{mg}$ ekstre) <sup>b</sup> | Flavonoid içerik<br>( $\mu\text{g QEs}/\text{mg}$ ekstre) <sup>c</sup> |
|--------------------|---------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------|
| <b>Kontrol</b>     | $42.12 \pm 0.029\text{d}$                                           | $5.52 \pm 0.019\text{d}$                                               |
| <b>1 mg/l AgNP</b> | <b><math>67.63 \pm 0.014\text{a}</math></b>                         | $17.23 \pm 0.071\text{b}$                                              |
| <b>2 mg/l AgNP</b> | $63.99 \pm 0.000\text{b}$                                           | <b><math>18.53 \pm 0.006\text{a}</math></b>                            |
| <b>4 mg/l AgNP</b> | $59.62 \pm 0.029\text{c}$                                           | $11.70 \pm 0.013\text{c}$                                              |

<sup>a</sup> Değerler 3 paralel ölçümün ortalaması ve standart sapması şeklinde verilmiştir. <sup>b</sup> Gallik asite eşdeğer fenolik içerik miktarı. <sup>c</sup> Kersetine eşdeğer flavonoid içerik miktarı

### 4.2.2. DPPH radikal giderme aktivitesine ait sonuçlar

Çalışmada kullanılan ekstrelerin DPPH serbest radikal giderme aktivitesi % inhibisyon olarak değerlendirilmiş ve standart olarak kullanılan AA ve BHA'nın serbest radikal giderme aktivitesi ile karşılaştırılmıştır. Ekstre ve standartların DPPH serbest radikali giderim aktivitesi farklı konsantrasyon (10, 25, 50, 100, 150, 200 ve 250  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) ortamlarında değerlendirmeye alınmıştır. Kontrol grubu ile birlikte besi ortamına ilave edilen 1, 2 ve 4 mg/l AgNP uygulamalarının, DPPH serbest radikal giderme aktivitesi üzerine etkisinin sunulduğu **Çizelge 4.2.** irdelendiğinde, besi ortamına ilave edilen farklı

konsantrasyonlardaki AgNP uygulamalarının genel anlamda kontrol gruplarına oranla çok daha yüksek değerlere sahip olduğu, 250µg/ml konsantrasyon ortamında  $94.38 \pm 0.26$  ile en yüksek değere ulaştığı tespit edilmiştir.

**Çizelge 4.2.** DPPH serbest radikal giderim aktivitesi (% inhibisyon)<sup>a</sup> sonuçları

| Ekstreler                 | 10 µg/ml          | 25 µg/ml          | 50 µg/ml          | 100 µg/ml         | 150 µg/ml         | 200 µg/ml         | 250 µg/ml         |
|---------------------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|
| <b>Kontrol</b>            | 5.56±0.21         | 10.00±2.62        | 27.86±1.55        | 45.56±0.32        | 63.04±1.12        | 82.35±1.06        | 89.89±0.36        |
| <b>1 mg/l AgNP</b>        | <b>10.53±0.58</b> | <b>18.93±5.02</b> | <b>43.74±0.96</b> | <b>71.60±0.26</b> | <b>84.27±1.06</b> | <b>93.95±0.16</b> | <b>94.38±0.26</b> |
| <b>2 mg/l AgNP</b>        | 9.89±0.05         | 17.75±2.45        | 37.96±0.21        | 60.96±4.17        | 73.58±4.49        | 84.65±0.26        | 91.81±0.16        |
| <b>4 mg/l AgNP</b>        | 9.57±0.37         | 16.68±1.59        | 39.35±2.13        | 59.14±2.67        | 68.71±1.55        | 79.83±0.69        | 87.37±0.53        |
| <b>Pozitif Kontroller</b> |                   |                   |                   |                   |                   |                   |                   |
| <b>AA</b>                 | <b>1 µg/ml</b>    | <b>2 µg/ml</b>    | <b>4 µg/ml</b>    | <b>6 µg/ml</b>    | <b>8 µg/ml</b>    | <b>10 µg/ml</b>   | <b>12 µg/ml</b>   |
|                           | 10.16±1.17        | 22.99±0.85        | 38.44±1.12        | 62.51±0.48        | 79.35±0.21        | 93.95±0.26        | 94.75±0.21        |
| <b>BHA</b>                | <b>2 µg/ml</b>    | <b>5 µg/ml</b>    | <b>10 µg/ml</b>   | <b>20 µg/ml</b>   | <b>30 µg/ml</b>   | <b>40 µg/ml</b>   | <b>50 µg/ml</b>   |
|                           | 24.22±0.69        | 45.77±0.64        | 64.75±0.48        | 83.42±0.42        | 87.54±0.48        | 94.97±0.21        | 96.68±0.21        |

<sup>a</sup> Değerler 3 paralel ölçümün ortalaması ve standart sapması şeklinde verilmiştir.

BHA: Bütillenmiş hidroksianisol, AA: Askorbik asit.

#### 4.2.3. ABTS radikal giderme aktivitesine ait sonuçlar

ABTS radikal giderme aktivitesi yöntemine göre elde edilen değerler **Çizelge 4.3**'te sunulmuştur. Ekstre ve standartların ABTS yöntemiyle antioksidan aktivitesi farklı konsantrasyon ortamlarında (2, 4, 8, 12, 16 ve 20 µg/ml) belirlenmiştir. Bir kontrol grubu ile birlikte besi ortamına ilave edilen 1, 2 ve 4 mg/l AgNP uygulamalarının, ABTS radikal giderme aktivitesi üzerine etkisinin sunulduğu **Çizelge 4.3.** irdelendiğinde, DPPH serbest radikal giderme aktivitesi sonuçlarına benzer değerlerin görüldüğü gözlenmiştir.

AgNP elisitasyonuna bırakılan ekstrelerin kontrol grubuna oranla daha yüksek değerler taşıdığı, ancak NP uygulanan ekstreleri kendi içlerinde değerlendirdiğimizde konsantrasyon artışına bağlı olarak ABTS radikal yakalama aktivitesinde düşüşler gözlemlendiği tespit edilmiştir. Bu bağlamda NP uygulamaları arasında, özellikle 1 mg/l AgNP uygulanmış ekstrelerin 20 µg/ml konsantrasyon ortamında  $99.31 \pm 0.09$  ile maksimum değeri verdiği dolayısıyla test edilen diğer parametrelere oranla daha yüksek bir antioksidan aktiviteye sahip olduğu sonucuna varılmıştır.

**Çizelge 4.3.** ABTS yöntemiyle antioksidan aktivite sonuçları (% inhibisyon)<sup>a</sup>

| Ekstreler                 | 2 µg/ml           | 4 µg/ml           | 8 µg/ml           | 12 µg/ml          | 16 µg/ml          | 20 µg/ml          |
|---------------------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|
| <b>Kontrol</b>            | 9.60±0.19         | 30.78±1.56        | 36.27±1.17        | 57.84±0.78        | 65.68±3.72        | 82.25±0.88        |
| <b>1 mg/l AgNP</b>        | <b>28.92±1.07</b> | <b>39.31±0.29</b> | <b>56.47±0.39</b> | <b>83.03±1.86</b> | <b>97.02±2.32</b> | <b>99.31±0.09</b> |
| <b>2 mg/l AgNP</b>        | 16.07±0.98        | 31.07±2.45        | 55.19±0.88        | 78.13±0.29        | 91.17±0.00        | 95.98±0.49        |
| <b>4 mg/l AgNP</b>        | 15.68±3.92        | 30.58±2.35        | 48.82±2.35        | 77.05±0.78        | 90.98±0.19        | 93.33±0.19        |
| <b>Pozitif Kontroller</b> |                   |                   |                   |                   |                   |                   |
| <b>AA</b>                 | <b>0.5 µg/ml</b>  | <b>1 µg/ml</b>    | <b>2 µg/ml</b>    | <b>3 µg/ml</b>    | <b>4 µg/ml</b>    | <b>5 µg/ml</b>    |
|                           | 19.90±1.27        | 35.98±1.07        | 61.07±0.68        | 83.72±0.78        | 94.90±0.39        | 99.21±0.19        |
| <b>BHA</b>                | <b>10 µg/ml</b>   | <b>20 µg/ml</b>   | <b>40 µg/ml</b>   | <b>60 µg/ml</b>   | <b>80 µg/ml</b>   | <b>100 µg/ml</b>  |
|                           | 11.27±0.68        | 26.37±1.07        | 46.07±0.78        | 72.45±0.88        | 84.11±1.17        | 95.58±0.49        |

<sup>a</sup> Değerler 3 paralel ölçümün ortalaması ve standart sapması şeklinde verilmiştir.

BHA: Bütillenmiş hidroksianisol, AA: Askorbik asit.

#### 4.2.4. CUPRAC radikal giderme aktivitesine ait sonuçlar

Bir kontrol grubu ile besi ortamına ilave edilen 1, 2 ve 4 mg/l AgNP uygulamalarından elde edilen, *P.lentiscus* L. ekstreleri için CUPRAC değerleri Çizelge 4.4'te verilmiştir.

Çizelge 4.4 irdelendiğinde, yukarıda değinilen DPPH ve ABTS yöntemlerinden elde edilen sonuçlara yakın bulguların gözlemlendiği, yine maksimum değerlerin 1 mg/l AgNP elisitasyonuna ait ekstrelerden alındığı, bu değerlerin 0.27±0.03 ile 2.94±0.19 arasında değiştiği ve artan konsantrasyon ortamlarına paralel şekilde arttığı görülmüştür. En yüksek CUPRAC değerinin 200 µg/ml konsantrasyon ortamında 2.94±0.19 ile alındığı tespit edilmiştir. Minimum değerlerin ise, 4 mg/l AgNP elisitasyonuna ait ekstreler için olduğu tespit edilmiştir.

Elisitasyon ekstrelerinin CUPRAC sonuçlarının aynı konsantrasyon ortamlarında birbirine yakın derecede yüksek sonuçlar vermesi AgNP uygulamasının antioksidan aktiviteyi pozitif yönde etkilediği sonucuna varırmıştır.

Çizelge 4.4. CUPRAC yöntemiyle antioksidan aktivite sonuçları (Absorbans)<sup>a</sup>

| Ekstreler                 | 10 µg/ml         | 25 µg/ml         | 50 µg/ml         | 75 µg/ml         | 100 µg/ml        | 150 µg/ml        | 200 µg/ml        |
|---------------------------|------------------|------------------|------------------|------------------|------------------|------------------|------------------|
| <b>Kontrol</b>            | 0.22±0.02        | 0.38±0.05        | 0.68±0.10        | 1.09±0.07        | 1.36±0.01        | 1.79±0.19        | 2.11±0.18        |
| <b>1 mg/l AgNP</b>        | <b>0.27±0.03</b> | <b>0.55±0.09</b> | <b>1.04±0.17</b> | <b>1.57±0.06</b> | <b>1.73±0.22</b> | <b>2.46±0.28</b> | <b>2.94±0.19</b> |
| <b>2 mg/l AgNP</b>        | 0.25±0.03        | 0.52±0.08        | 0.94±0.05        | 1.48±0.02        | 1.64±0.19        | 2.15±0.12        | 2.81±0.21        |
| <b>4 mg/l AgNP</b>        | 0.25±0.04        | 0.48±0.09        | 0.87±0.06        | 1.39±0.03        | 1.55±0.19        | 1.86±0.04        | 2.41±0.06        |
| <b>Pozitif Kontroller</b> |                  |                  |                  |                  |                  |                  |                  |
| <b>AA</b>                 | <b>2 µg/ml</b>   | <b>5 µg/ml</b>   | <b>10 µg/ml</b>  | <b>20 µg/ml</b>  | <b>30 µg/ml</b>  | <b>40 µg/ml</b>  | <b>50 µg/ml</b>  |
|                           | 0.21±0.01        | 0.35±0.01        | 0.54±0.03        | 0.80±0.02        | 1.10±0.01        | 2.01±0.06        | 3.17±0.02        |
| <b>BHA</b>                | <b>5 µg/ml</b>   | <b>10 µg/ml</b>  | <b>20 µg/ml</b>  | <b>40 µg/ml</b>  | <b>60 µg/ml</b>  | <b>80 µg/ml</b>  | <b>100 µg/ml</b> |
|                           | 0.14±0.02        | 0.24±0.04        | 0.49±0.05        | 0.94±0.02        | 1.45±0.05        | 1.95±0.01        | 2.39±0.02        |

<sup>a</sup> Değerler 3 paralel ölçümün ortalaması ve standart sapması şeklinde verilmiştir.

BHA: Bütillenmiş hidroksianisol, AA: Askorbik asit.

Tez çalışmamızda *in vitro* şartlarda çimlendirilen *P.lentiscus* L. tohumlarına 1, 2 ve 4 mg/l konsantrasyonlarında AgNP elisitasyonu yapılmıştır. Elisitör; canlı bir sisteme düşük miktarlarda uygulandığında, bitkilerin stresli koşullara adaptasyonunda önemli bir role sahip olan spesifik bileşik/bileşiklerin biyosentezini indükleyen veya geliştiren bir madde olarak tanımlanmaktadır (Erkoyuncu ve Yorgancılar, 2015). Uygulanan elisitörün etkisinin, kültürün çeşidine, uygulanan elisitörün zamanlamasına, konsantrasyonuna ve uygulama süresine bağlı olarak metabolit üretimini etkilediği bilindiğinden (Erkoyuncu ve Yorgancılar, 2015) bu tez kapsamında 3 farklı konsantrasyonda AgNP uygulaması denenmiş ve elisitasyon uygulaması yapılan *in vitro* sürgünler bir kontrol grubu ile birlikte kültüre alınmıştır. Yaptığımız literatür taramalarında, *Pistacia* türlerinin antioksidan ve antimikrobiyal aktiviteleri üzerine çok sayıda araştırma tespit edilmiştir. Ancak NP elisitasyonu ile ilgili cins bazında herhangi bir çalışmaya rastlanmadığından tartışma bölümünde, farklı bitkiler üzerinde denenmiş NP uygulamalarına yönelik çalışmalara değinilmiştir.

AgNP'ler, arzu edilen fiziko-kimyasal özellikleri nedeniyle tıpta, biyoteknolojide ve tarımda yaygın olarak kullanılmaktadır (Kruszka ve ark., 2020). Farklı NP'ler arasında, AgNP'lerin, *in vitro* kültürlerde yeni bir flavonoid elisitörü olarak geniş çapta kullanıldığı rapor edilmektedir. Acı kabak olarak bilinen *Momordica charantia*'nın hücre süspansiyon kültürleri üzerine yapılan bir çalışmada, *Bacillus licheniformis* ile birlikte 5 mg/l AgNP (50 nm) elisitasyonu sonucunda quercetin, kaempferol, catechin, myricetin, rutin, naringenin ve biochanin A dâhil olmak üzere farklı flavonoidlerin miktarlarında artış gözlenmiştir (Chung ve ark., 2018a). Başka bir

çalışmada ise, *Cucumis anguria*'nın saçak kök kültürlerinde AgNP uygulaması sonucunda, fenolik bileşiklerin yanı sıra flavonoid bileşiklerin birikiminde de artış görüldüğü, AgNP kullanılan kültürlerde, kullanılmayan kontrol guruplarına kıyasla daha yüksek miktarda flavonol (3136.20 µg/g) üretildiği tespit edilmiştir (Chung ve ark., 2018b). Benzer şekilde, 50, 100 ve 150 mg/l konsantrasyonlarında AgNP uygulamalarının, *Brassica rapa*'nın saçak kök kültürlerinde sekonder metabolitlerin miktarlarında artışa yol açtığı, 100 mg/l AgNP solüsyonu uygulanan saçak köklerde, toplam fenolik (TPC) ve toplam flavonoid içeriği (TFC) konsantrasyonunda kademeli bir artış gözlenirken, 150 mg/l uygulamalarında ise TPC ve TFC'nin azaldığı tespit edilmiştir. Ayrıca, dokuz farklı flavonoid bileşiğin (myricetin, naringenin, kateşin, quercetin, rutin, kaempferol, biochanin A, formononetin ve hesperidin) AgNP uygulanan kültürlerde daha yüksek miktarda biriktiği görülmüştür (Chung ve ark., 2018c).

Çalışma bulgularımızda ise yukarıda atıfta bulunduğumuz çalışmalara benzer olarak, farklı konsantrasyonlarda AgNP uyguladığımız sürgün kültürlerinde de özellikle 1mg/l AgNP elisitasyonunun, kontrol gruplarına ve test edilen diğer parametrelere oranla antioksidan aktiviteyi önemli ölçüde arttırdığı tespit edilmiştir. AgNP uygulamasının Toplam fenolik (TPC), toplam flavonoid içeriği(TFC)'ni de arttırdığı, yapılan ABTS, CUPRAC ve DPPH aktivite testleri sonucunda belirlenmiştir. Chung ve ark., (2018a)'nın yaptığı çalışmaya paralel olarak tez çalışmamızda da belirli bir konsantrasyonun (1 mg/l) üzerinde uygulanan AgNP uygulamalarının, genel anlamda antioksidan aktiviteyi düşürdüğü, ancak kontrol gruplarına kıyasla bu değerlerin yine daha yüksek oranlara sahip olduğu tespit edilmiştir.

Literatür taramalarımız ışığında AgNP dışında diğer metal NP uygulamalarının da antioksidan aktiviteyi arttırdığı çalışmalara rastlanmıştır. Örneğin, López-Vargas ve ark., (2018)'nin yaptığı bir çalışmada, domates fidelerinin yapraklarına farklı konsantrasyonlarda (50, 125, 250, 500 mg/l) CuNP solüsyonlarının doğrudan püskürtülmesinin, domates meyvelerinin flavonoid içeriğinde artışa yol açtığı rapor edilmiştir. Yapılan çalışmada domates meyvelerinde 50 mg/l CuNP uygulamasının kontrol gruplarına oranla flavonoid içeriğini %36.14 oranında arttırdığı bildirilmiştir. *Stevia rebaudiana* ve *Lilium ledebourii*'nin sürgün kültürlerinin kullanıldığı bir diğer çalışmada ise, ZnONP elisitasyonu sonrasında toplam fenolik içeriğin arttığı gözlenmiştir (Chamani ve ark., 2015; Javed ve ark., 2017). *Dracocephalum kotschy* saçak köklerinin silisyum dioksit NP'leri (SiO<sub>2</sub>NP'ler) ile elisitasyonu, cirsimaritin,

ksantomikrol ve izokaempferid gibi antikanser flavonoidleri de dahil olmak üzere önemli farmasötik bileşiklerin indüksiyonunda ve üretiminde önemli bir artışa yol açtığı bildirilmiştir (Nourozi ve ark., 2019). Tian ve ark., (2018) tarafından yapılan başka bir çalışmada ise, manganez oksit NP'lerinin ( $Mn_2O_3$ NP'ler) düşük konsantrasyonlarda *Atropa belladonna in vitro* bitki kültürlerinde büyümeyi teşvik ettiği ve spesifik antioksidan enzimlerin aktivasyonu ile farmakolojik olarak aktif metabolitlerin düzenlenmesinin biyosentezini güçlendirdiği, yüksek konsantrasyonlarda (50-200 mg/l) ise, ölümcül oksidatif stres ve toksisite sergilediği de belirtilmiştir.

#### 4.3. Antimikrobiyal Aktivitelere Ait Sonuçlar ve Tartışma

Kontrol grubu ile birlikte, elisitör olarak besi ortamına ilave edilen 1, 2 ve 4 mg/l AgNP uygulamalarından elde edilen ekstrelerin antimikrobiyal aktivite sonuçları **Çizelge 4.5**'te verilmiştir. Ekstrelerin antimikrobiyal aktiviteleri, *E.coli* (ATCC 25922), *B.cereus* (DSSM 4312) bakterileri ile *C.albicans* (ATCC 10231) mantarı üzerinde denenmiştir. Sonuçlar, diskin etrafında oluşan zon çaplarını mm cinsinden ifade etmektedir. **Çizelge 4.5** irdelendiğinde, çalışılan 100, 250, 750 ve 1000 µg/disk ekstre miktarlarından 100 ve 250 µg/disk tüm mikroorganizmalara karşı antimikrobiyal aktivite göstermediği, ancak 750 ve 1000 µg/disk ekstre miktarlarının ise, farklı düzeylerde aktivite sergilediği tespit edilmiştir.

Ekstrelerin *E.coli* üzerindeki antimikrobiyal aktiviteleri düşük düzeyde olup zon çapları 7-10 mm (zon çapı < 12 mm) arasında değişiklik göstermiştir. Ayrıca negatif kontrolün *E.coli* üzerindeki etkisi göz önünde bulunduğunda, elde edilen zon değerlerinin negatif kontrol kaynaklı olabileceğini de akla getirmektedir.

Ekstrelerin *B.cereus* üzerindeki antimikrobiyal aktiviteleri incelendiğinde ise, yine düşük aktivite düzeyi görülmüştür. Zon çaplarının 6-14 mm arasında değişiklik gösterdiği ve ayrıca 4 mg/l AgNP uygulamasından elde edilen ekstrenin 1000 µg/disk miktarında 14 mm' lik zon çapıyla *B.cereus*'a karşı orta düzeyde aktivite sergilediği belirlenmiştir.

Ekstreler en yüksek aktiviteyi *C.albicans*'a karşı sergilemişlerdir. Zon çapları 8-18 mm arasında değişiklik göstermektedir. En yüksek aktivite 1 mg/l AgNP uygulamalarından elde edilen ekstrenin 1000 µg/disk miktarında 18,33 mm zon çapı ile ve 2 mg/l AgNP ekstresinin 1000 µg/disk miktarında 16 mm zon çapı ile orta düzeyde aktivite elde edilmiştir. Düşük doz AgNP uygulamalarının *C.albicans* suşları üzerinde

antimikrobiyal aktiviteyi arttırdığı, AgNP miktarı arttıkça söz konusu aktivitenin azaldığı belirlenmiştir.

**Çizelge 4.5.** Antimikrobiyal aktivite sonuçları

| Ekstreler          |                 | <i>E.coli</i> | <i>B.cereus</i> | <i>C.albicans</i> |
|--------------------|-----------------|---------------|-----------------|-------------------|
| <b>Kontrol</b>     | 100 µg/disk     | <b>A.D.</b>   | <b>A.D.</b>     | <b>A.D.</b>       |
|                    | 250 µg/disk     | <b>A.D.</b>   | <b>A.D.</b>     | <b>A.D.</b>       |
|                    | 750 µg/disk     | 8.33±0.57     | 6.66±0.57       | 8.33±0.57         |
|                    | 1000 µg/disk    | 10.66±0.57    | 10.33±0.57      | 9.00±0            |
| <b>1 mg/l AgNP</b> | 100 µg/disk     | <b>A.D.</b>   | <b>A.D.</b>     | <b>A.D.</b>       |
|                    | 250 µg/disk     | <b>A.D.</b>   | <b>A.D.</b>     | <b>A.D.</b>       |
|                    | 750 µg/disk     | 7.00±0        | 7.00±0          | 12.66±1.15        |
|                    | 1000 µg/disk    | 11.66±0.57    | 12.33±0.57      | 18.33±1.15        |
| <b>2 mg/l AgNP</b> | 100 µg/disk     | <b>A.D.</b>   | <b>A.D.</b>     | <b>A.D.</b>       |
|                    | 250 µg/disk     | <b>A.D.</b>   | <b>A.D.</b>     | <b>A.D.</b>       |
|                    | 750 µg/disk     | 8.33±0.57     | 7.00±0          | 10.66±0.57        |
|                    | 1000 µg/disk    | 9.33±0.57     | 11.66±0.57      | 16.00±3.00        |
| <b>4 mg/l AgNP</b> | 100 µg/disk     | <b>A.D.</b>   | <b>A.D.</b>     | <b>A.D.</b>       |
|                    | 250 µg/disk     | <b>A.D.</b>   | <b>A.D.</b>     | <b>A.D.</b>       |
|                    | 750 µg/disk     | 7.00±0        | 7.33±0.57       | 12.33±0.57        |
|                    | 1000 µg/disk    | 9.66±0.57     | 14.00±0         | 13.00±0           |
|                    | Pozitif kontrol | 24.00±0       | 25.00±0         | 30.00±0.30        |
|                    | Negatif kontrol | 11.66±0.57    | 7.00±0          | <b>A.D.</b>       |

Sonuçlar ortalama (mm) ±standart sapma olarak verilmiştir. Pozitif kontrol bakteri için İmipenem (10µg/disk), mantar için fluconazole (10µg/disk) kullanılmıştır. Negatif kontrol olarak etanol kullanılmıştır. A.D: Aktif değil.

Fenolikler ve polifenoller, antimikrobiyal aktivite sergileyen en büyük sekonder metabolit gruplarından biridir. Fenol grubu üzerindeki hidroksil gruplarının yer(ler)i ve sayısının mikroorganizmalara yönelik toksisiteleriyle ilişkili olduğu düşünülür ve artan hidroksilasyonun artan toksisite ile sonuçlandığına dair kanıtlar vardır.

Eren ve Baran (2019), *P.vera* L. bitki ekstraktı kullanarak, yeşil sentez yöntemi ile AgNP sentezlemişlerdir. Sentezlenen AgNP'lerin antimikrobiyal etkisini *S.aureus* (ATCC 29213) *E.coli* (ATCC 25922) bakterileri ile *C.albicans* mantar suşları üzerinde değerlendirdikleri çalışmalarında sonuç olarak, sentezlenen gümüş nanopartiküllerin antimikrobiyal etki gösterdiğini bildirmişlerdir. Yine, *Carica papaya* yapraklarından sentezlenen AgNP'lerin, Luria Bertani broth kültürlerinde hem Gram pozitif hem de Gram negatif bakterilere karşı MIC ve MBC >25 µg/mL olduğu ve antibakteriyal

aktiviteye sahip olduğunu rapor etmişlerdir (Banala ve ark., 2015). Bryaskova ve ark. (2011) polivinil pirolidon (PVP) ile stabilize edilmiş AgNP'lerin *C.albicans*, *C.krusei*, *C.tropikalis*, *C.glabrata* ve *A.brasiliensis* gibi farklı maya ve küflere karşı mantar öldürücü aktivitelerinin olup olmadığını test ettikleri başka bir çalışmada ise, AgNP'lerin test edilen bakteri ve mantar suşlarına karşı güçlü bir antimikrobiyal etki gösterdiği ve bu nedenle biyoteknolojik ve biyomedikal alanlar için bir potansiyele sahip olduklarını rapor etmişlerdir. Keza çalışmamızda yukarıda değinilen literatür çalışmalarına benzer şekilde AgNP uygulanmış ekstrelerin *E.coli* üzerinde orta, *B.cereus* bakterileri üzerinde ise düşük düzeyde antimikrobiyal aktivite gösterdiği tespit edilmiştir.

Yine test edilen parametreler arasında maksimum antimikrobiyal aktivitenin bir mantar olan *C.albicans*'a karşı 1 mg/l AgNP uygulamasından elde edildiği ve orta düzeyde antimikrobiyal aktivite gösterdiği belirlenmiştir. AgNP uygulamasının düşük konsantrasyonlarda *C.albicans* üzerinde antimikrobiyal aktiviteyi arttırdığını, artan konsantrasyonlarda ise aktiviteyi düşürdüğü görülmüştür.

## 5. SONUÇLAR VE ÖNERİLER

### 5.1 Sonuçlar

Tıbbi ve ekonomik öneme sahip *Pistacia* cinsinin önemli bir türü olan *Pistacia lentiscus* L., içermiş olduğu değerli sekonder metabolitleri dolayısıyla geleneksel tıpta yüzyıllar boyunca hammadde olarak kullanılmıştır. Bu moleküllerin doğal kaynaklardan ticari olarak üretilmesi çok verimli değildir. Biyoaktif maddeler genellikle kuru bitki ağırlığının %1'nden azdır. Bu yüzden bitki hücre ve doku kültürü teknolojisi yüksek değerli bu moleküllerin üretiminde alternatif üretim sistemi olarak görülmektedir. Günümüze kadar, bitki doku kültürü teknikleri kullanılarak ta birçok bitkinin farmasotik özellikleri ortaya konmuş aynı zamanda bitkilerin büyüme ortamlarına elisitör ve öncül bileşikler ilavesi yoluyla sahip oldukları farmasötik bileşiklerin miktar ve çeşitleri arttırılmaya çalışılmıştır. Bu bağlamda, bu tez kapsamında antikanser özellik içeren bileşikler başta olmak üzere daha pekçok farmasotik bileşiği bünyesinde barındıran *P.lentiscus* L. bitkisinin, *in vitro* ortamda başlatılan sürgün kültürlerine son yıllarda kullanımı yaygınlaşan NP uygulamaları yoluyla fenolik ve flavonoid içeriklerinin yanısıra, antioksidan ve antimikrobiyal aktiviteleri üzerine etkileri de araştırılmıştır.

Yapılan çalışmalardan elde edilen sonuçlar kısaca aşağıda maddeler halinde sunulmuştur.

- Yüzey sterilizasyonu yapılan tohumlar 1 mg/l IBA destekli MS besi ortamında çimlendirilmiş ve aksenik sürgün kültürleri başlatılmıştır. Sürgünlerin proliferasyonu ise 2 mg/l BA, 0.5 mg/l GA<sub>3</sub> ile destekli MS besi ortamında ise gerçekleştirilmiştir.

- Besi ortamına ilave edilen 1, 2 ve 4 mg/l AgNP uygulamaları ile NP konsantrasyonunun artışına paralel olarak, gövde/eksplant oranının arttığı, sürgün uzunluğunun ise azaldığı tespit edilmiştir.

- Gövde/eksplant oranı bakımından 4 mg/l AgNP uygulanan sürgün kültürleri ile 2 mg/l AgNP uygulanan sürgün kültürleri arasında istatistiksel bir fark gözlenmemiştir ancak, kontrol grubu ile 1 mg/l AgNP uygulanan kültürler arasında istatistiksel bir fark tespit edilmiştir ( $P<0.05$ ).

- Morfolojik olarak değerlendirildiğinde ise artan AgNP konsantrasyonlarında gövdelerde sararma, kızarma, yaprak şekillerinde ve yaprak dizilişlerinde varyasyonlar tespit edilmiştir.

- Tüm ekstrelerde AgNP uygulamaları toplam fenolik ve flavonoid içeriğini kontrol grubuna oranla arttırmıştır. En yüksek total fenolik içeriği 1 mg/l AgNP

uygulamalarından elde edilirken, en yüksek flavonoid içeriği ise 2 mg/l AgNP uygulamalarından elde edilmiştir.

- Antioksidan aktivitenin belirlenmesi kapsamında kullanılan tüm testlerde (ABTS, DPPH, CUPRAC) serbest radikal giderme aktivitesi bakımından AgNP uygulamalarının genel anlamda kontrol gruplarına oranla daha yüksek değerlere sahip olduğu, dolayısıyla elisitör olarak besi yerine ilave edilen AgNP uygulamalarının sürgünlerde antioksidan kapasiteyi arttırdığı tespit edilmiştir. Genel anlamda 1 mg/l AgNP uygulamalarının, 2 ve 4 mg/l AgNP uygulamalarına kıyasla antioksidan aktivite bakımından daha iyi sonuçlara sahip olduğu belirlenmiştir.

- Tüm ekstrelerin antimikrobiyal aktiviteleri *E.coli* (ATCC 25922), *B.cereus* (DSSM 4312) bakterileri ile *C.albicans* (ATCC 10231) mantarı üzerinde denenmiştir. Sonuç olarak farklı AgNP konsantrasyonları ilave edilen sürgün kültürlerine ait ekstrelerin, 100 ve 250 µg/disk tüm suşlara karşı antimikrobiyal aktivite göstermediği, ancak 750 ve 1000 µg/disk ekstre miktarlarının ise, farklı düzeylerde aktivite sergilediği tespit edilmiştir.

- Test edilen tüm ekstrelerin *E.coli* üzerindeki antimikrobiyal aktivitelerinin düşük düzeyde; *B.cereus* üzerindeki antimikrobiyal aktivitelerinin ise, 4 mg/l AgNP uygulamasından elde edilen ekstrelerin 1000 µg/disk miktarında orta düzeyde; ve *C.albicans*'a karşı 1 mg/l ve 2 mg/l AgNP ekstrelerinin ise orta düzeyde antimikrobiyal aktiviteye sahip olduğu belirlenmiştir.

## 5.2 Öneriler

Tez kapsamında farklı konsantrasyonlar AgNP uygulamaları yapılmış olan *P.lentiscus* L.'nin sürgün kültürlerinden elde edilen ekstrelerin, genel anlamda antioksidan ve antimikrobiyal aktiviteyi pozitif yönde arttırdığı tespit edildiğinden, diğer NP uygulamalarına temel teşkil edecek bilgiler elde edilmiştir. Yapılan bu çalışmanın, gerek tür gerekse de cins düzeyinde yapılacak olan NP elisitasyonu çalışmalarına örnek teşkil edeceği kanaatindeyiz.

## KAYNAKLAR

- Abbasoğlu, U., 1996, Antimikrobiyal Aktivite Araştırma Yöntemleri FABAD, *J. Pharm. Sci.*, 22, 111-118.
- Abdelkader, H., Nadia, K., Salima, B., 2016, Chemical Composition and Antioxidant Potential of *Pistacia lentiscus* L. Essential Oil from Oran (Algeria), *Advances in Bioscience and Biotechnology*, 7, 539-544.
- Akdemir, O.F., Tilkat, E., Onay, A., Keskin, C., Bashan, M., Kılınç, F.M., Kizmaz, V., Süzerer, V., 2015, Determination of Fatty Acid Composition of the Fruits, Resins and Organs of Lentisk (*Pistacia lentiscus* L.), *Journal of Essential Oil Bearing Plants*, 18(5), 1224-1233.
- Akdemir, Ö.F., 2019, Bazı Nanopartiküllerin *In Vitro* Ortamda Yetiştirilen *Hypericum perforatum* L. ve *Hypericum retusum* Aucher'in Hiperisin Bileşiklerinin Miktarı Üzerine Etkileri, Dicle Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyoloji Anabilim Dalı, Doktora Tezi.
- Akdemir, Ö.F., Tilkat, E., Onay, A., Kılınç, M. F., Süzerer, V., Çiftçi Özden, Y., 2013, Geçmişten günümüze sakız ağacı *Pistacia lentiscus* L., *Batman Üniversitesi Yaşam Bilimleri Dergisi*, 3 (2), 1-28.
- Alhadi, E.A., Hamdi, O.A.A., Ayoub, S.M.H., Yagi, S., 2018, *In vitro* antioxidant and antimicrobial activities of *Pistacia lentiscus*, *Phyllanthus anderssonii* and *Cinnamomum verum* crude extracts and fractions. *Journal of Medicinal Plants Research*, 12(16), 186-193.
- AL-Saghir, M.G., Porter, D.M., 2012, Taxonomic revision of the genus *Pistacia* L. (Anacardiaceae). *AJPS*, 3(1), 12-32.
- Amer, A., 2019, Biotechnology approaches for *in vitro* production of flavonoids, *J. Microbiol. Biotechnol. Food Sci.* 457–468.
- Anonymous, 2016, Codif Recherche & Nature 70 Rue Du Commandant L'herminier – Cs 11781 35417 Saint Malo Cedex France, <http://www.codif-tn.com/wp-content/uploads/2016/02/LAKESIS-FICHE-BOTANIQUE-GB.pdf>
- Anonymous, 2017, Royal Botanic Gardens, KEW, Plants of the World Online <http://www.plantsoftheworldonline.org/taxon/urn:lsid:ipni.org:names:70253-1>.
- Apak, R., Güçlü, K., Özyürek, M., 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, 7970-7981.
- Arab, K., Bouchenak, O., Yahiaoui, K., 2014, Phytochemical study and evaluation of the antimicrobial and antioxidant activity of essential oils and phenolic compounds of *Pistacia lentiscus* L., *J Fundam Appl Sc.*, 6 (1), 79-93.
- Aydın, Ç., 2012, Denizli İlinde Yayılış Gösteren Bazı Endemik *Allium* L. Taksonlarının Ekstraktlarının Aktif Bileşenlerinin Karakterizasyonu, Antioksidan ve Antibakteriyal Etkilerinin Belirlenmesi, Pamukkale Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyoloji Anabilim Dalı, Yüksek Lisans Tezi.
- Bakli, S., Daoud, H., Amina, Z., Nouari, S., Asma, B., Soufiane, G., Oumaima, N., 2020, Antimicrobial and Antioxidant Activities of Flavonoids Extracted from *Pistacia lentiscus* L., Leaves. *Journal of Drug Delivery & Therapeutics*. 10(1), 83-89.
- Banala, R.R., Nagati, V.B., Karnati, P.R., 2015, Green synthesis and characterization of Carica papaya leaf extract coated silver nanoparticles through X-ray diffraction, electron microscopy and evaluation of bactericidal properties, *Saudi Journal of Biological Sciences*, 22(5), 637-644.

- Barbouchi, M., Elamrani, K., El Idrissi, M., Choukrad, M., 2020, A comparative study on phytochemical screening, quantification of phenolic contents and antioxidant properties of different solvent extracts from various parts of *Pistacia lentiscus* L, *Journal of King Saud University - Science*, 32(1), 302-306.
- Belhachat, D., Aid, F., Mekimene, L., Belhachat, M., 2017, Phytochemical screening and *in vitro* antioxidant activity of *Pistacia lentiscus* berries ethanolic extract growing in Algeria, *Mediterranean Journal of Nutrition and Metabolism*, 10, 273-285.
- Bendifallah, L., Benmahfoud, A.E., Hameni. Y., Mameche, S., 2014, Phytochemical study and *in vitro* antimicrobial activity of *Pistacia lentiscus* L in boumerdes region (Algeria), *J. Fundam Appl Sci.*, 6(2), 229-237.
- Benhammou, N., AlikBenkkara, F., Panovska, T.K., 2008, Antioxidant and antimicrobial activities of the *Pistacia lentiscus* and *Pistacia atlantica* extracts, *African Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 2(2), 022-028.
- Beykaya, M., Çağlar A., 2016, Bitkisel Özütler Kullanılarak Gümüş-Nanopartikül (AgNP) Sentezlenmesi ve Antimikrobiyal Etkinlikleri Üzerine Bir Araştırma, *AKÜ FEMÜBİD*, 035403, 631-641.
- Blois, M.S., 1958, Antioxidant determinations by the use of a stable free radical. *Nature*, 29, 1199-1200.
- Bozorgi, M., Memariani, Z., Mobli, M., 2013, Five *Pistacia* species (*P. vera*, *P. atlantica*, *P. terebinthus*, *P. khinjuk*, and *P. lentiscus*): a review of their traditional uses, phytochemistry, and pharmacology, *Sci World J*, 219815. <https://doi.org/10.1155/2013/219815>.
- Bryaskova, R., Pencheva, D., Nikolov, S., Kantardjiev, T., 2011, Synthesis and comparative study on the antimicrobial activity of hybrid materials based on silver nanoparticles (AgNps) stabilized by polyvinylpyrrolidone (PVP), *Journal of Chemical Biology*, 4(4), 185-191.
- Chamani, E., Karimi Ghalehtaki, S., Mohebodini, M., Ghanbari, A., 2015, The effect of Zinc oxide nano particles and Humic acid on morphological characters and secondary metabolite production in *Lilium ledebourii* Bioss., *Iran. J. Genet. Plant Breed.* 4, 11-19.
- Chung, I.M., Rekha, K., Rajakumar, G., Thiruvengadam, M., 2018a, Elicitation of silver nanoparticles enhanced the secondary metabolites and pharmacological activities in cell suspension cultures of bitter melon. *3 Biotech*, 8, 412.
- Chung, I.M., Rajakumar, G., Thiruvengadam, M., 2018b, Effect of silver nanoparticles on phenolic compounds production and biological activities in hairy root cultures of *Cucumis anguria*, *Acta Biol. Hung.* 69, 97-109.
- Chung, I.M., Rekha, K., Rajakumar, G., Thiruvengadam, M., 2018c, Influence of silver nanoparticles on the enhancement and transcriptional changes of glucosinolates and phenolic compounds in genetically transformed root cultures of *Brassica rapa* ssp. *rapa*., *Bioprocess Biosyst. Eng.* 41, 1665-1677.
- Coppen, J.J., 1995, Gums, resins and latexes of plant origin, *FAO*., ISO 690.
- Cos, P., Vlietinck, A.J., Berghe, D.V., Maes, L. 2006, Anti-infective potential of natural products: How to develop a stronger *in vitro* proof-of-concept, *Journal of Ethnopharmacology*, 106(3), 290-302.
- Cowan, M.M., 1999, Plant Products as Antimicrobial Agents, *Clinical Microbiology Reviews*, 12(4) 564-582.
- Çalışkan, T., Hatipoğlu, R., Kırıcı, S., 2019, Production of Plant Secondary Metabolites from Cell and Organ Cultures under *In vitro* Conditions, *Turkish Journal of Agriculture - Food Science and Technology*, 7(7), 971-980.

- Çavdar, C., Sifil, A., Çamsarı, T., 1997, Reaktif Oksijen Partikülleri ve Antioksidan Savunma, *Türk Nefroloji Diyaliz ve Transplantasyon Dergisi* 3(4), 92-95.
- Desai, C.V., Desai, H.B., Suthar, K.P., Singh, D., Patel, R.M., Taslim, A., 2015, Phytotoxicity of zincnanoparticles and its influence on stevioside production in *Stevia rebaudiana* Bertoni, *Appl. Biol. Res.*, 17, 1-7.
- Dixon, R.A., 2001, Natural products and plant disease resistance, *Nature*, 411, 843-847.
- Dreaden, E.C., Alkilany, A.M., Huang, X., Murphy, C.J., El-Sayed, M.A., 2012, The golden age: gold nanoparticles for biomedicine, *Chem. Soc. Rev.* 41, 2740-2779.
- Dubchak, S., Ogar, A., Mietelski, J.W., Turnau, K., 2010, Influence of silver and titanium nanoparticles on arbuscular mycorrhiza colonization and accumulation of radiocaesium in *Helianthus annuus*, *Span. J. Agric. Res.* 1, 103-108.
- Durán, N., Durán, M., de Jesus, M.B., Seabra, A.B., Fávaro, W.J., Nakazato, G., 2016, Silver nanoparticles: a new view on mechanistic aspects on antimicrobial activity, *Nanomed Nanotechnol Biol Med.*, 12, 789-99.
- Erdönmez, E., 2018, Damla Sakızının (*P.lentiscus* L.) Antioksidan Aktivitesinin Belirlenmesi, Uludağ Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı, Yüksek Lisans Tezi.
- Eren, A., Baran, M.F., 2019, Fıstık (*Pistacia vera* L.) Yaprağından Gümüş Nanopartikül (AgNP)'lerin Sentezi, Karakterizasyonu ve Antimikrobiyal Aktivitesinin İncelenmesi, *Türkiye Tarımsal Araştırmalar Dergisi*, 6 (2), 165-173.
- Eroğlu, H., 2019, Ağır Metal Nanopartiküllerinin Sinirli Ot (*Plantago*) Bitkileriyle Fitoremediasyonu, İstanbul Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyoloji Anabilim Dalı, Yüksek Lisans Tezi.
- Erol Demirbilek, M., 2015, Tarımda Ve Gıdada Nanoteknoloji, *Gıda ve Yem Bilimi - Teknolojisi Dergisi*, 15, 46-53.
- Fitlamak, K., 2014, İzmir Çeşme Yöresi'ndeki Yabani ve Aşılانmış Sakız Ağaçlarında (*Pistacia Lentiscus* L.) Sakız Üretim Şekilleri ile Yaprak Uçucu Yağ İçeriği ve Bileşenlerinin Belirlenmesi, Süleyman Demirel Üniversitesi, Orman Mühendisliği Anabilim Dalı, Fen Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi.
- Foster, B.C., Arnason, J.T., Briggs, C.J., 2005, Natural health products and drug disposition, *Annual review of pharmacology and toxicology*, 45, 203-226.
- Gharib, A.A., El-Hamid, M.I.A., El-Aziz, N.K.A., Yonan, E.Y., Allam, M.O., 2020, *Bacillus cereus*: Pathogenicity, viability and adaptation, *Adv. Anim. Vet. Sci.* 8, 34-40.
- Ghasemi, B., Hosseini, R., Dehghan Nayeri, F., 2015, Effects of cobalt nanoparticles on artemisinin production and gene expression in *Artemisia annua*, *Turk J Bot.*, 39, 769-777.
- Gupta, V.K., Sharma, S.K., 2006, Plant as natural antioxidant. *Nat Product Radiance* 5(4), 326-334.
- Hafsé, M., Fikri, K., Farah, A., 2015, Enquête ethnobotanique sur l'utilisation de *Pistacia lentiscus* au Nord du Maroc (Taounate), *Int. J. Innov. Appl. Stud.*, 13(4), 864-872.
- Halliwell, B., 2001, Free Radicals and other reactive species in disease, *Nature Encyclopedia of life sciences.* 1-7.
- Hasanuzzaman, M., Bhuyan, M.H.M.B., Zulfiqar, F., Raza, A., Mohsin, S.M., Mahmud, J.A., Fujita, M., Fotopoulos V., 2020, Reactive Oxygen Species and Antioxidant Defense in Plants under Abiotic Stress: Revisiting the Crucial Role of a Universal Defense Regulator. *Antioxidants*, 9(8), 681.
- Ierapetritis, D.G., 2010, The Geography of the Chios Mastic Trade from the 17th through to the 19th Century, *Ethnobotany Research & Applications*, 8, 153-167.

- Javed, R., Usman, M., Yucesan, B., Zia, M., Gürel, E., 2017, Effect of zinc oxide (ZnO) nanoparticles on physiology and steviol glycosides production in micropropagated shoots of *Stevia rebaudiana* Bertoni. *Plant Physiol Biochem.*, 110, 94-99.
- Kabir, M.A., Hussain, M.A., Ahmad, Z., 2012, *Candida albicans*: a model organism for studying fungal pathogens, *ISRN Microbiol.*, 538-694.
- Karabulut, H., Gülay, M., 2016, Antioksidanlar, *MAE Vet Fak Derg.*, 1 (1) , 65-76.
- Keçeci, A., 2019, Çeşme Yarımadasında Yetişen Yabani (*Pistacia lentiscus* L.) ve Kültür Sakızı (*Pistacia lentiscus* var. Chia. Duham.) Ağaçlarının Yapraklarındaki Uçucu Yağ Özelliklerinin Belirlenmesi, Tekirdağ Namık Kemal Üniversitesi, Tarla Bitkileri Anabilim Dalı, Fen Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi.
- Khan, A.K., Kousar, S.;Tungmunthum, D.; Hano, C.;Abasi, B.H.; Anjum, S.Nano-Elicitation as an Effective and Emerging Strategy for *In vitro* Production of Industrially Important Flavonoids. *Appl. Sci.* **2021**, 11, 1694.
- Kılıç, M.U., 2019, Sakız Ağacı, Yetiştiriciliği Ve Türkiye'deki Varlığı, Ege Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Bahçe Bitkileri Bölümü, Yüksek Lisans Tezi.
- Koç, İ., Onay, A., Çiftçi, Y., 2014, *In vitro* regeneration and conservation of the lentisk (*Pistacia lentiscus* L.), *Turkish Journal of Biology*, 38 (5), 653-663.
- Kohen, R., Nyska, A., 2002, Invited review Oxidation of Biological Systems: Oxidative Stress Phenomena, Antioxidants, Redox Reactions, and Methods for Their Quantification, *Toxicol Pathol.* 30(6), 620-50.
- Kovacevic, N., 2004, Osnovi farmakognozije, Srpska školska knjiga, ISBN 86-83565-19-X, Beograd.
- Kruszka, D., Sawikowska, A., Kamalabai Selvakesavan, R., Krajewski, P., Kachlicki, P., Franklin, G., 2020, Silver nanoparticles affect phenolic and phytoalexin composition of *Arabidopsis thaliana*, *Sci. Total Environ*, 716, 135361.
- Lambardi, M., Sharma, K.K., Thorpe, T.A., 1993, Optimization of *in vitro* bud induction and plantlet formation from mature embryos of Aleppo pine (*Pinus halepensis* Mill.), *In Vitro Cell. Dev. Biol-Plant*, 29: 189-199.
- Landau, S., Muklada, H., Markovics, A., Azaizeh, H. 2014, Traditional Uses of *Pistacia lentiscus* in Veterinary and Human Medic,ine. In: Yaniv Z, Dudai N, editors. *Medicinal and Aromatic Plants of the Middle-East. Med. Arom. Plant World.* (2). Springer; Netherland, 163-80.
- Laurent, S., Forge, D., Port, M., Roch, A., Robic, C., Vander Elst, L., Muller, R.N., 2010, Magnetic iron oxide nanoparticles: synthesis, stabilization, vectorization, physicochemical characterizations, and biological applications, *Chem. Rev.*, 110.
- López-Vargas, E., Ortiz, H., Cadenas-Pliego, G., De Alba Romenus, K., De la Fuente, M., Benavides-Mendoza, A., Juárez Maldonado, A., 2018, Foliar Application of Copper Nanoparticles Increases the Fruit Quality and the Content of Bioactive Compounds in Tomatoes. *Appl. Sci.* 8, 1020.
- Lushchak, V.I., 2014, Free radicals, reactive oxygen species, oxidative stress and its classification, *Chemico-Biological Interactions*, 224,164-175.
- Mahmud, J.A., Bhuyan, M.H.M.B., Anee, T.I., Nahar, K., Fujita, M., Hasanuzzaman, M., 2019, Reactive oxygen species metabolism and antioxidant defense in plants under metal/metalloid stress. In Plant Abiotic Stress Tolerance; Hasanuzzaman, M., Hakeem, K., Nahar, K., Alharby, H., Eds.; Springer: Cham, Switzerland, 221-257.
- Mezni, F., Aouadhi, C., Khouja, M.L., Khaldi, A., Maaroufi, A., 2015, *In vitro* antimicrobial activity of *Pistacia lentiscus* L. edible oil and phenolic extract, *Natural Product Research*, 29(6), 565-570.

- Moreno, M.I.N., Isla, M.I., Sampietro, A.R., Vattuone, M.A., 2000, Comparison of the free radical-scavenging activity of propolis from several regions of Argentina, *Journal of Ethnopharmacol*, 71,109-114.
- Nahida, A., Siddiqui, A.N., 2012, *Pistacia lentiscus*: A review on phytochemistry and pharmacological properties, *Int J Pharm Pharm Sci*, 4, 16-20.
- NCCLS (National Committee for Clinical Laboratory Standards), 1997, Performance standards for antimicrobial disk susceptibility test, 6th ed, Approved Standard, Wayne Pa, M2-A6.
- Nourozi, E., Hosseini, B., Maleki, R., Mandoulakani, B.A., 2019, Pharmaceutical important phenolic compounds overproduction and gene expression analysis in *Dracocephalum kotschy* hairy roots elicited by SiO<sub>2</sub> nanoparticles, *Ind. Crops Prod.*, 133, 435-446.
- Okan, T.O., Varlıbaş, H., Öz, M., Deniz, İ., 2013, Antioksidan analiz yöntemleri ve doğu karadeniz bölgesinde antioksidan kaynağı olarak kullanılabilecek odun dışı bazı bitkisel ürünler, *Kastamonu Üniversitesi Orman Fakültesi Dergisi*, 13, 48-59.
- Onay, A., Yıldırım, H., Yavuz, M.A., 2016, Sakız Ağacı (*Pistacia lentiscus* L.) Yetiştiriciliği ve Reçinesi, *Batman Üniversitesi Yaşam Bilimleri Dergisi*; 6(2),1-5.
- Öğüt, S., 2014, Doğal antioksidanların önemi, *Journal of Adnan Menderes University Agricultural Faculty*, 11, 25-30.
- Pachi, V.K., Mikropoulou, E.V., Gkiouvetidis, P., Siafakas, K., Argyropoulou, A., Angelis, A., Mitakou, S., Halabalaki, M., 2020, Traditional uses, phytochemistry and pharmacology of Chios mastic gum (*Pistacia lentiscus* var. Chia, Anacardiaceae): A review, *Journal of Ethnopharmacology*, 254,112485.
- Paciolla, C., Paradiso, A., de Pinto, M.C., 2016, Cellular redox homeostasis as central modulator in plant stress response, In *Redox State as a Central Regulator of Plant-Cell Stress Responses*; Gupta, D., Palma, J., Corpas, F., Eds.; Springer: Cham, Switzerland, 1-23.
- Pathak, S.R., Hendre, S.A., 2015, Sunlight induced green synthesis of silver nanoparticles using sundried leaves extract of *Kalanchoepinnata* and evaluation of its photocatalytic potential, *Der Pharmacia Lettre*, 7(5), 313-324.
- Patil Shriniwas, P., Kumbhar Subhash, T., 2017, Antioxidant, antibacterial and cytotoxic potential of silver nanoparticles synthesized using terpenes rich extract of *Lantana camara* L. leaves, *Biochem Biophys Rep.* 10, 76–81.
- Payne, G.F., Bringi, V., Prince, C., Shuler, M.L., 1991, Plant Cell and Tissue Culture in Liquid Systems, *Hanser Publishers*, ISBN 9783446158306
- Piluzza, G., Bullitta, S., 2011, Correlations between phenolic content and antioxidant properties in twenty-four plant species of traditional ethnoveterinary use in the Mediterranean area, *Pharmaceutical Biology*, 49(3), 240-247.
- Rai, M.K., Yadav, A.P., Gade, A.K., 2009, Silver nanoparticles as a new generation of antimicrobials, *Biotech Adv*, 27 (1), 76-82.
- Re, R., Pellegrini, N., Proteggente, A., Pannala, A., Yang, M., Rice-Evans, C., 1999, Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay, *Free Radic Biol Med*, 26, 1231-1237.
- Reiss, R., Johnston, J., Tucker, K., DeSesso, J.M., Keen, C.L., 2012, Estimation of cancer risks and benefits associated with a potential increased consumption of fruits and vegetables, *Food Chem. Toxicol.*, 50, 4421-4427.
- Rios, J.L., Recio, M.C., 2005, Medicinal plants and antimicrobial activity, *Journal of Ethnopharmacology*, 100(1-2), 80-84.

- Rivero-Montejo, S.D.J., Vargas-Hernandez, M., TorresPacheco, I., 2021, Nanoparticles as Novel Elicitors to Improve Bioactive Compounds in Plants, *Agriculture*, 11, 134.
- Roy, A., Bharadvaja, N., 2019, Establishment of root suspension culture of *Plumbago zeylanica* and enhanced production of plumbagin. *Ind. Crops. Prod.*, 137, 419-427.
- Sakız Eylem Planı 2014 - 2019, Orman ve Su İşleri Bakanlığı Orman Genel Müdürlüğü <https://web.ogm.gov.tr/ekutuphane/Yayinlar/Sak%C4%B1z%20Eylem%20Plan%C4%B1.pdf>
- Salhi, A., Bellaouchi, R., El Barkany, S., Rokni, Y., Bouyanzer, A., Asehrou, A., Amhamdi, H., Zarrouk A., Hammouti, B., 2019, Total phenolic content, antioxidant and antimicrobial activities of extracts from *Pistacia lentiscus* leaves, *Caspian J. Environ. Sci.*, 17(3), 189-198.
- Saliha, D., Seddik, K., Djamila, A., Abdrrahmane, B., Lekhmici, A., Noureddine, C., 2013, Antioxidant proprieties of *Pistacia lentiscus* L. leaves extracts, *Pharmacogn. Commun*, 3, 28.
- Sarantinidis, M., Smyrnioudis, I., 2011, Chios Mastiha, Web: [http://webcache.googleusercontent.com/search?q=cache:ijMFLw3VmisJ:www.gummastic.gr/public/Leaflets/ENG\\_Mastiha\\_Presentation\\_Sept\\_2011\\_no\\_video.pptx+&cd=3&hl=tr&ct=clnk&gl=tr](http://webcache.googleusercontent.com/search?q=cache:ijMFLw3VmisJ:www.gummastic.gr/public/Leaflets/ENG_Mastiha_Presentation_Sept_2011_no_video.pptx+&cd=3&hl=tr&ct=clnk&gl=tr), Erişim tarihi:31.05.2018.
- Sekmen, E, 2019, Bazı Metal Nanopartiküllerin Çeşitli Biyoekstreler ile Yeşil Sentezi, Karakterizasyonu ve Grafit Elektrot Modifikasyonunda Kullanımı, Gazi Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Kimya Ana Bilim Dalı, Yüksek Lisans Tezi.
- Shang, Y., Hasn, M.D.K., Ahammed, G.J., Li, M., Yin, H., Zhou, J., 2019, Applications of Nanotechnology in Plant Growth and Crop Protection: A Review. *Molecules*, 24, 2558.
- Sharma, G., Jagetiya, S., Dashora, R., 2015, General Techniques of Plant Tissue Culture, ISBN; 978-1-329-73251-3.
- Shin, W.K., Cho, J., Kannan, A.G., Lee, Y.S., Kim, D.W., 2016, Cross-linked composite gel polymer electrolyte using mesoporous methacrylate-functionalized SiO<sub>2</sub> nanoparticles for lithium-ion polymer batteries, *Sci. Rep.* 6, 26332.
- Slavin, J.L., Lloyd, B., 2012, Health benefits of fruits and vegetables, *Adv. Nutr.*, 3, 506–516.
- Slawson, R.M., Trevors, J.T., Lee, H., 1992, Silver accumulation and resistance in *Pseudomonas stutzeri*, *Arch Microbiol.*, 158, 398-404.
- Slinkard, K. and Singleton, V.L., 1977, Total Phenol Analysis Automation and Comparison with Manual Methods, *American Journal of Enology and Viticulture*, 28, 49-55.
- Sohn, E.K., Johari, S.A., Kim, T.G., Kim, J.K., Kim, E., Lee, J.H., 2015, Aquatic toxicity comparison of silver nanoparticles and silver nanowires, *BioMed Res Int.* 893049.
- Song, G., Gao, Y., Wu, H., Hou, W., Zhang, C., Ma, H., 2012, Physiological effect of anatase TiO<sub>2</sub> nanoparticles on *Lemna minor*, *Environ Toxicol Chem.*, 31(9),2147-52.
- Suriyakalaa, U., Antony, J.J., Suganya, S., Siva, D., Sukirtha, R., Kamalakkannan, S., Pichiah, P.B., Achiraman S., 2013, Hepatocurative activity of biosynthesized silver nanoparticles fabricated using *Andrographis paniculata*. *Colloids Surf. B Biointerfaces*. 102,189-194.

- Tian, H., Ghorbanpour, M., Kariman, K., 2018, Manganese oxide nanoparticle-induced changes in growth, redox reactions and elicitation of antioxidant metabolites in deadly nightshade (*Atropa belladonna* L.), *Ind. Crops Prod.*, 126, 403-414.
- Tilkat, E., Ertas, A., Surmuş-Aşan, H., Yılmaz, M.A., Onay, A., Süzer, V., 2018, *Pistacia lentiscus* L.'nin *in vitro* sürgün, kallus ve hücre süspansiyon kültürlerinde antikanser aktivite gösteren kimyasal bileşenlerin üretilmesi, TÜBİTAK 114Z842 No'lu Proje Sonuç Raporu, Ankara.
- Turhan, D., 2015, Bazı Esansiyel Yağların *Staphylococcus aureus* ve *Escherichia coli* Üzerine Antimikrobiyal Etkisinin Araştırılması, İstanbul Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı, Yüksek Lisans Tezi.
- Uçar, G., Yörük, N.G., Güner, A., 2015, *Escherichia coli* Enfeksiyonları, *Türkiye Klinikleri J Food Hyg Technol-Special Topics*, 1(3).
- VanEtten, H.D., Mansfield, J.W., Bailey, J.A., Farmer, E.E., 1994, *Plant Cell* 6: 1191–1192.
- Vargas-Hernandez, M., Macias-Bobadilla, I., Guevara-Gonzalez, R.G., Rico-Garcia, E., Ocampo-Velazquez, R.V., Avila-Juarez, L., Torres-Pacheco, I., 2020, Nanoparticles as Potential Antivirals in Agriculture, *Agriculture*, 10, 444.
- Wafula, W.G., Arnold, O., Calvin, O., Moses, M., 2017, Reactive oxygen species (ROS) generation, impacts on tissue oxidation and dietary management of non-communicable diseases: A review, *African Journal of Biochemistry Research*, 11(12), 79-90.
- Wanasundara, P.K.J.P.D., Shahidi, F., 2005, Bailey's industrial oil and fat products, In: Bailey's Industrial Oil and Fat Products, 431-489.
- Yavaşer, R., 2011, Doğal ve sentetik antioksidan bileşiklerin antioksidan kapasitelerinin karşılaştırılması, Adnan Menderes Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Kimya Anabilim Dalı, Yüksek Lisans Tezi.
- Yemmen, M., Landolsi, A., Ben Hamida, J., Mégraud, F., Trabelsi Ayadi, M., 2017, Antioxidant activities, anticancer activity and polyphenolics profile, of leaf, fruit and stem extracts of *Pistacia lentiscus* from Tunisia, *Cell Mol Biol (Noisy-le-grand)*, 63(9), 87-95.
- Yosefzaei, F., Poorakbar, L., Farhadi, K., 2016, The effect of silver nanoparticles on morphological and physiological indexes of *Ocimum basilicum* L., *Iranian Journal of Plant Physiology and Biochemistry*, 1(2), 63-73.
- Zhao, G., Stevens, S.E., 1998, Multiple parameters for the comprehensive evaluation of the susceptibility of *Escherichia coli* to the silver ion, *BioMetals*, 11, 27-32.