

**T.C.  
BALIKESİR ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ  
BİYOLOJİ ANABİLİM DALI**



***RUSCUS ACULEATUS L. VE PUNICA GRANATUM L.*  
BİTKİLERİNİN EKSTRELERİNİN VE BOYANMIŞ KUMAŞ  
ÖRNEKLERİNİN ANTİMİKROBİYAL ÖZELLİKLERİNİN  
BELİRLENMESİ**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**PINAR ÇELİKBOYUN**

**BALIKESİR, MAYIS - 2015**

**T.C.  
BALIKESİR ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ  
BİYOLOJİ ANABİLİM DALI**



***RUSCUS ACULEATUS L. VE PUNICA GRANATUM L.*  
BİTKİLERİNİN EKSTRELERİNİN VE BOYANMIŞ KUMAŞ  
ÖRNEKLERİNİN ANTİMİKROBİYAL ÖZELLİKLERİNİN  
BELİRLENMESİ**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**PINAR ÇELİKBOYUN**

**BALIKESİR, MAYIS - 2015**

## KABUL VE ONAY SAYFASI

**Pınar ÇELİKBOYUN** tarafından hazırlanan “**RUSCUS ACULEATUS L. VE PUNICA GRANATUM L. BİTKİLERİNİN EKSTRELERİNİN VE BOYANMIŞ KUMAŞ ÖRNEKLERİNİN ANTİMİKROBİYAL ÖZELLİKLERİNİN BELİRLENMESİ**” adlı tez çalışmasının savunma sınavı 21.05.2015 tarihinde yapılmış olup aşağıda verilen jüri tarafından oy birliği / oy çokluğu ile Balıkesir Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalı Yüksek Lisans Tezi olarak kabul edilmiştir.

Jüri Üyeleri

İmza

Danışman

Doç. Dr. Tülin AŞKUN

Üye

Prof. Dr. Gülendir TÜMEN

Üye

Prof. Dr. Rengin ELTEM



Jüri üyeleri tarafından kabul edilmiş olan bu tez Balıkesir Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulunca onanmıştır.

Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürü

Doç. Dr. Necati ÖZDEMİR

.....

**Bu tez çalışması T.C. Bilim Sanayi ve Teknoloji Bakanlığı San-Tez Arge Destek Programı 0799.STZ.2011-1 nolu proje ve BAP tarafından 2013/54 nolu proje ile desteklenmiştir.**

## ÖZET

**RUSCUS ACULEATUS L. VE PUNİCA GRANATUM L. BİTKİLERİNİN  
EKSTRELERİNİN VE BOYANMIŞ KUMAŞ ÖRNEKLERİNİN  
ANTİMİKROBİYAL ÖZELLİKLERİNİN BELİRLENMESİ  
YÜKSEK LİSANS TEZİ  
PINAR ÇELİKBOYUN  
BALIKESİR ÜNİVERSİTESİ FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ  
BİYOLOJİ ANABİLİM DALI  
(TEZ DANIŞMANI: DOÇ. DR. TÜLİN AŞKUN)**

**BALIKESİR, MAYIS - 2015**

Çalışmamızda Balıkesir Merkez ilçesinden toplanan nar kabukları ve Balıkesir Havran ilçesinden toplanan tavşanmemesi bitkisinin köklerine ait etanol ekstralarının anti-mikrobiyal aktiviteleri, boyanmış kumaş örneklerinin antibakteriyal ve antifungal aktiviteleri ICP analizleri ile elementlerin miktarları ve HPLC analizleri ile de fenolik madde içerikleri belirlendi.

Çalışmamızda *P.granatum* ve *R.aculeatus* bitkilerine ait etanol ekstralarının antimikrobiyal aktiviteleri disk difüzyon ve mikrodilüsyon yöntemi ile incelendi ve minimum bakterisit/fungisit konsantrasyonu belirlendi.

Antimikrobiyal aktivitede *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538P), *Klebsiella pneumoniae* (CCM 2318), *Escherichia coli* (ATCC 11230), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853), *Proteus vulgaris* (ATCC 6897), *Bacillus cereus* (CCM 99), Metisiline dirençli *Staphylococcus aureus* (ATCC 33592), *Shigella sonnei* (ATCC25931), *Salmonella typhimurium* (ATCC 14028), *Aspergillus niger* van Tiegh (TA 47-), *Aspergillus flavus* Link (TA 41-17), *Aspergillus ochraceus* K. Wilh. (MUCL 39534), *Fusarium proliferatum* (Matsushima) Nirenberg (TA 18-2) ve maya olan *Candida albicans* (ATCC 10239) kullanıldı. Boyanan kumaş örneklerinin aktivitesinin belirlenmesi için ise AATCC 147 ve AATCC 100 standardına göre belirtilen 2 bakteri (*Staphylococcus aureus* ve *Klebsiella penumoniae*) kullanıldı.

Antimikrobiyal aktivite sonuçları incelendiğinde; *P.granatum* etanol ekstresi *P.vulgaris*(6.3 mg/mL), *S.aureus* (1.6 mg/mL), *P.aeuroginosa* (12.5 mg/mL), *K.pnemoniae* (12.5 mg/mL), *S.typhimurium* (25 mg/mL) bakterileri üzerinde bakterisit etki gösterdi. *R.acualetus* etanol ekstresi *P.aeuroginosa* (12.5 mg/mL), *K.pnemoniae* (25 mg/mL) ve MRSA (25 mg/mL) bakterileri üzerinde bakterisit etki gösterdi. *P.granatum* sadece *A.flavus* üzerinde fungusit etki gösterirken *R.acualetus* tüm funguslar üzerinde fungusit etki gösterdi. HPLC analizleri ile bitkilerin fenolik içerikleri belirlenmiştir.

**ANAHTAR KELİMELELER:** *Punica granatum*, *Ruscus aculeatus*, antimikrobiyal aktivite, doğal boya, tekstil

## ABSTRACT

### DETERMINING ANTIMICROBIAL ACTIVITY OF DIFFERENT SOLVENT EXTRACTS AND DYED FABRIC SAMPLE OF *PUNICA GRANATUM* AND *RUSCUS ACULEATUS*

MSC THESIS

PINAR ÇELİKBOYUN

BALIKESİR UNIVERSITY INSTITUTE OF SCIENCE

BIOLOGY

(SUPERVISOR: ASSOC. PROF. DR. TÜLİN AŞKUN )

BALIKESİR, MAY 2015

In our study, Balıkesir Central district collected from pomegranate peel and Balıkesir of the roots of the collected *Ruscus aculeatus* plant from Edremit district of ethanol extracts of anti- microbial activity , antibacterial and antifungal activities of dyed fabric samples with quantities and HPLC analysis of elements by ICP analysis identified phenolic contents .

In our study, the antimicrobial activity of ethanol extracts of *P.granatum* and *R.acualateus* were examined using the disc diffusion and microdilution methods, and a minimum bactericide/fungicide concentration was determined.

For the antimicrobial activity, *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538P), *Klebsiella pneumoniae* (CCM 2318), *Escherichia coli* (ATCC 11230), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853), *Proteus vulgaris* (ATCC 6897), *Bacillus cereus* (CCM 99), Metisilin resistant *Staphylococcus aureus* (ATCC 33592), *Shigella sonnei* (ATCC25931), *Salmonella typhimurium* (ATCC 14028), *Aspergillus niger* van Tiegh (TA 47-3), *Aspergillus flavus* Link (TA 41-17), *Aspergillus ochraceus* K. Wilh.(MUCL 39534), *Fusarium proliferatum* (Matsushima) Nirenberg (TA 18-2) and *Candida albicans* (ATCC 10239), which is a yeast, were used. The dyed fabric samples were assayed antibacterial activity against two bacteria (*Staphylococcus aureus* and *Klebsiella penumoniae*) according to standards of AATCC 147 and AATCC 100.

In our study, the antimicrobial activities, ethanol extracts of *P.granatum* had a bactericide effect *P.vulgaris*(6.3 mg/mL), *S.aureus*(1.6 mg/mL), *P.aeuroginosa* (12.5 mg/mL), *K.pnemoniae* (12.5 mg/mL), *S.typhimurium* (25 mg/mL). Ethanol extracts of *R.acualateus* had abactericide effect *P.aeuroginosa* (12.5 mg/mL), *K.pnemoniae* (25 mg/mL) ve MRSA (25 mg/mL). While *P. granatum* had a fungicide effect on *A.flavus*, *R.acualateus* had a fungicide effecton all fungus.

By means of HPLC analysis, phenolic compounds were determined in the extracts of the plant and the results were discussed.

**KEYWORDS:** *Punica granatum*, *Ruscus acualetus*, antimicrobial activity, natural dye, textile

# İÇİNDEKİLER

Sayfa

ÖZET.....	i
ABSTRACT .....	ii
İÇİNDEKİLER .....	iii
ŞEKİL LİSTESİ.....	v
TABLO LİSTESİ .....	vii
KISALTMA LİSTESİ .....	viii
ÖNSÖZ.....	ix
<b>1. GİRİŞ.....</b>	<b>1</b>
1.1 Bitkilerin Tıbbi Açısından Önemi .....	1
1.2 Bitkilerin Doğal Boyama Açısından Önemi .....	3
1.3 Punicaceae Familyası .....	6
1.3.1 Genel Özellikleri .....	6
1.3.2 Kullanım Alanları .....	6
1.4 <i>Punica</i> L. Cinsi .....	7
1.4.1 Genel Özellikleri .....	7
1.4.2 <i>Punica</i> Türlerinin Kimyasal İçerikleri ve Kullanım Alanları .....	7
1.5 <i>Punica granatum</i> L. ....	9
1.5.1 Morfolojik Özellikleri .....	11
1.5.2 <i>Punica granatum</i> L. Sistematikteki Yeri .....	12
1.5.3 Türün Türkiye ve Dünyadaki Yayılışı .....	12
1.5.4 Tür ile İlgili Biyolojik Aktivite Çalışmaları .....	13
1.5.5 Tür ile İlgili Doğal Boyama Çalışmaları .....	16
1.6 Rusceae Familyası .....	17
1.6.1 Genel Özellikleri .....	17
1.6.2 Kullanım Alanları .....	17
1.7 <i>Ruscus</i> L. Cinsi .....	18
1.7.1 Genel Özellikleri .....	18
1.7.2 <i>Ruscus</i> Türünün Kimyasal İçerikleri ve Kullanım Alanları .....	18
1.8 <i>Ruscus aculeatus</i> L. ....	20
1.8.1 Morfolojik Özellikleri .....	20
1.8.2 <i>Ruscus aculeatus</i> L. Sistematikteki Yeri .....	21
1.8.3 Türün Türkiye ve Dünyadaki Yayılışı .....	21
1.8.4 Tür ile İlgili Biyolojik Aktivite Çalışmaları .....	22
1.8.5 Tür ile İlgili Doğal Boyama Çalışmaları .....	23
<b>2. MATERYAL VE METOT .....</b>	<b>24</b>
2.1 Bitki Materyallerinin Hazırlanışı .....	24
2.2 Bitki Ekstrelerinin Hazırlanışı .....	25
2.3 Kullanılan Mikroorganizmalar.....	25
2.4 Kullanılan Besiyerleri .....	31
2.4.1 Antifungal ve Antibakteriyel Aktivitede Kullanılan Besiyerleri .....	31
2.4.2 Antitüberküloz Aktivitede Kullanılan Besiyerleri .....	33
2.5 Kullanılan Antibiyotikler .....	36
2.6 Serum Fizyolojik Hazırlanışı .....	37
2.7 İnokulum Süspansiyonunun Hazırlanışı .....	37

2.8	Ledanitrotetrazolium violet (INT);2-(4-Iodophenyl)-3-(4-nitrophenyl)-5-phenyl-2H-tetrazolium klorür Çözeltilsinin Hazırlanması .....	37
2.9	Antibakteriyel ve Antifungal Aktivite .....	38
2.9.1	Disk Diffüzyon Testleri .....	38
2.9.2	Minimum İnhibisyon Konsantrasyonunu Belirleme (MİK) .....	39
2.9.3	Minimum Bakterisit ve Fungisit Konsantrasyonunu Belirleme (MBK ve MFK) .....	39
2.10	Antitüberküloz (Antimikobakteriyel) Aktivite .....	40
2.11	Kumaşların Bitki Özütleri ile Boyanması .....	41
2.11.1	Boyama İşlemi: .....	41
2.12	Kumaş Örneklerinin Antibakteriyel Aktivitesinin Belirlenmesi .....	41
2.12.1	Paralel Çizgi Yöntemi (AATCC 147-2011) .....	42
2.12.2	Miktarsal Test Standardı ; Tekstilde Bitirme İşlemi (AATCC-100) .....	43
2.12.3	Tekstil Materyallerinde Antibakteriyel Aktivitenin Belirlenmesi Agar Difüzyon Testi (ISO 20645) .....	44
2.12.4	Tekstil Materyallerinde Antifungal Aktivite (AATCC30) .....	44
2.13	HPLC Analizi (High Pressure Liquid Chromatography).....	45
2.13.1	Kullanılan Shimadzu Marka HPLC Cihazı İle İlgili Özellikler ..	45
2.13.2	Gradient Programı: .....	46
2.14	İndüktif Eşleşmiş Plazma Optik Emisyon Spektroskopisi (ICP-OES) Analizleri.....	46
2.14.1	Kullanılan ICP-OES Cihazı ile İlgili Özellikler .....	46
2.15	Kullanılan Cihazlar .....	47
<b>3.</b>	<b>BULGULAR .....</b>	<b>48</b>
3.1	Bitki Eksterelerinin Antimikrobiyal Aktivitesine Ait Bulgular.....	48
3.1.1	Disk Difüzyon Testi Bulguları.....	48
3.1.2	Antibakteriyel, Antifungal ve Antitüberküloz Aktivite Bulguları .....	49
3.2	Kumaşların Bitki Özütleri ile Boyanması.....	54
3.3	Kumaş Örneklerinin Antimikrobiyal Aktivitesine Ait Bulgular .....	54
3.3.1	Paralel Çizgi Yöntemi Bulguları (AATCC 147) .....	54
3.3.2	Tekstilde Bitirme İşlemi Bulguları (AATCC-100).....	57
3.3.3	Tekstil Materyallerinde Antibakteriyel Aktivitenin Belirlenmesi- Agar Difüzyon Testi Bulguları- ISO 20645 .....	59
3.3.4	AATCC30-Tekstil Materyallerinde Antifungal Aktivite Testi Bulguları .....	61
3.4	HPLC Bulguları .....	63
3.5	ICP-OES Bulguları .....	65
<b>4.</b>	<b>SONUÇ VE ÖNERİLER .....</b>	<b>67</b>
<b>5.</b>	<b>KAYNAKLAR.....</b>	<b>73</b>
<b>6.</b>	<b>EKLER.....</b>	<b>91</b>



## ŞEKİL LİSTESİ

### Sayfa

Şekil 1. 1 : Flavanooid grupları. ....	3
Şekil 1. 2 : 2000 yılı itibari ile dünyada doğal boya kullanım alanları.....	4
Şekil 1. 3 : <i>P. granatum</i> L. ....	11
Şekil 1. 4 : <i>P.granatum</i> 'un illere göre yayılışı. ....	13
Şekil 1. 5 : <i>R. aculeatus</i> L.....	20
Şekil 1. 6 : <i>R. aculeatus</i> ' un illere göre yayılışı.....	22
Şekil 2. 1 : A) <i>P.granatum</i> L. B) <i>R.aculeatus</i> L. ....	24
Şekil 2. 2 : Döner buharlaştırıcı.....	25
Şekil 2. 3 : <i>A. niger</i> ' in SDA besiyerinde 3 nokta ekimi. ....	29
Şekil 2. 4 : <i>A. flavus</i> ' un SDA besiyerinde 3 nokta ekimi. ....	29
Şekil 2. 5 : <i>A. ochraceus</i> ' un SDA besiyerinde 3 nokta ekimi. ....	30
Şekil 2. 6 : <i>F. proliferatum</i> ' un SDA besiyerinde 3 nokta ekimi. ....	31
Şekil 3. 1 : <i>P. granatum</i> etanol ekstresine ait MİK fotoğrafları, A) ABC sırası; <i>B.cereus</i> ,DEF sırası; <i>S. aureus</i> , B) ABC sırası ; <i>E.coli</i> , DEF sırası; <i>K.pneumoniae</i> .....	51
Şekil 3. 2 : <i>R. acualetus</i> etanol ekstresine ait MİK fotoğrafları, A) ABC sırası; <i>B.cereus</i> , DEF sırası; <i>P. aureginosa</i> , B) ABC sırası ; <i>P. vulgaris</i> , DEF sırası; <i>K. pnemoniae</i> . ....	51
Şekil 3. 3 : <i>P. granatum</i> etanol ekstresine ait MİK fotoğrafları, A) ABC sırası; RA ,DEF sırası; RV, B) ABC sırası ; Hasta suşu-1, DEF sırası; Hasta suşu-2.....	52
Şekil 3. 4 : <i>R. acualetus</i> etanol ekstresine ait MİK fotoğrafları, A) ABC sırası; RA ,DEF sırası; RV, B) ABC sırası ; Hasta suşu-1, DEF sırası; Hasta suşu-2.....	52
Şekil 3. 5 : <i>P. granatum</i> ekstresini <i>Klebsiella pneumoniae</i> kullanılarak 147-2011 no'lu standarda göre paralel çizgi metodu (tekstil örnekleri için) ile antimikrobiyal aktivite tayini. A) mordan: bakırsülfat B) mordan: demir sülfat+tartarik asit C) mordansız, D) mordan: şap.....	55
Şekil 3. 6 : <i>P. granatum</i> ekstresini <i>S.aureus</i> kullanılarak 147-2011 no'lu standarda göre paralel çizgi metodu (tekstil örnekleri için) ile antimikrobiyal aktivite tayini. A) mordan: bakırsülfat B) mordan: demir sülfat+tartarik asit C) mordansız, D) mordan: şap.....	56
Şekil 3. 7 : <i>Ruscus aculeatus</i> yaprak etanol ekstresini <i>Klebsiella pneumoniae</i> kullanılarak 147-2011 no'lu standarda göre paralel çizgi metodu (tekstil örnekleri için) ile antimikrobiyal aktivite tayini. A) mordan: bakırsülfat B) mordan: demir sülfat+tartarik asit C) mordansız, D) mordan: şap.....	56
Şekil 3. 8 : <i>Ruscus aculeatus</i> yaprak etanol ekstresini <i>Staphylococcus aureus</i> kullanılarak 147-2011 no'lu standarda göre paralel çizgi metodu (tekstil örnekleri için) ile antimikrobiyal aktivite tayini. A) mordan: bakırsülfat B) mordan: demir sülfat+tartarik asit C) mordansız, D) mordan: şap. ....	56

<b>Şekil 3. 9 :</b>	A) <i>P.granatum</i> için AATCC 100 metoduna göre bakteri sayıları	
	B) <i>R.aculeatus</i> için AATCC100 metoduna göre bakteri sayıları...	59
<b>Şekil 3. 10:</b>	<i>P. granatum</i> etanol ekstresi ile boyanmış kumaşların	
	<i>K.pneumoniae</i> kullanılarak ISO 20645 metodu ile antimikrobiyal	
	aktivite tayini A) sol; boyalı kumaş,sağ; kontrol(boş) kumaş	
	(petri arka yüzeyi) B) sol; boyalı kumaş,sağ; kontrol(boş) kumaş	
	(petri ön yüzeyi). .....	60
<b>Şekil 3. 11:</b>	<i>P. granatum</i> etanol ekstresi ile boyanmış kumaşların <i>S.aureus</i>	
	kullanılarak ISO 20645 metodu ile antimikrobiyal aktivite tayini	
	A) sol; boyalı kumaş,sağ; kontrol(boş) kumaş (petri arka yüzeyi)	
	B) sol; boyalı kumaş,sağ; kontrol(boş) kumaş (petri ön yüzeyi). ..	60
<b>Şekil 3. 12:</b>	<i>R.acualetus</i> etanol ekstresi ile boyanmış kumaşların	
	<i>K.pneumoniae</i> kullanılarak ISO 20645 metodu ile antimikrobiyal	
	aktivite tayini A) sol; boyalı kumaş,sağ; kontrol(boş) kumaş	
	(petri arka yüzeyi) B) sol; boyalı kumaş,sağ; kontrol(boş) kumaş	
	(petri ön yüzeyi). .....	61
<b>Şekil 3. 13:</b>	<i>R.acualetus</i> etanol ekstresi ile boyanmış kumaşların <i>S.aureus</i>	
	kullanılarak ISO 20645 metodu ile antimikrobiyal aktivite tayini	
	A) sol; boyalı kumaş,sağ; kontrol(boş) kumaş (petri arka yüzeyi)	
	B) sol; boyalı kumaş,sağ; kontrol(boş) kumaş (petri ön yüzeyi). ..	61
<b>Şekil 3. 14:</b>	<i>P.granatum</i> etanol ekstresi ile boyanmış kumaşların <i>A.niger</i>	
	kullanılarak AATCC 30 metodu ile antifungal aktivite tayini A)	
	sol;Kontrol kumaş, sağ;boyalı kumaş (petri alt yüzeyi) B)	
	sol;kontrol kumaş, sağ; boyalı kumaş (petri üst yüzeyi) C)	
	sol;kontrol kumaş alt yüzeyi,sağ;boyalı kumaş alt yüzeyi. ....	62
<b>Şekil 3. 15:</b>	<i>R.acualetus</i> etanol ekstresi ile boyanmış kumaşların <i>A.niger</i>	
	kullanılarak AATCC 30 metodu ile antifungal aktivite tayini A)	
	sol;Kontrol kumaş, sağ;boyalı kumaş (petri alt yüzeyi) B)	
	sol;kontrol kumaş, sağ;boyalı kumaş (petri üst yüzeyi) C)	
	sol;kontrol kumaş alt yüzeyi,sağ;boyalı kumaş alt yüzeyi. ....	63
<b>Şekil 3. 16:</b>	<i>P granatum</i> bitkisinin element içeriği. ....	65
<b>Şekil 3. 17:</b>	<i>R. aculeatus</i> bitkisinin element içeriği. ....	65
<b>Şekil A. 1 :</b>	HPLC standart kromatogramı. ....	91
<b>Şekil A. 2 :</b>	<i>Punica granatum</i> (nar) için HPLC kromatogramı.....	92
<b>Şekil A. 3 :</b>	<i>Ruscus acualetus</i> (Tavşan memesi-kök) için HPLC	
	kromatogramı. ....	93

## TABLO LİSTESİ

### Sayfa

<b>Tablo 2. 1</b> : Bitki Veri Tablosu. ....	24
<b>Tablo 2. 2</b> : HPLC Gradient Programı. ....	46
<b>Tablo 3. 1</b> : <i>P.granatum</i> ve <i>R. aculeatus</i> Bitkilerinin Etanol Ekstrelerinin Bakteriler için Disk Difüzyon Testi Sonuçları. ....	48
<b>Tablo 3. 2</b> : <i>P.granatum</i> ve <i>R.acualetus</i> Bitkilerinin Etanol Ekstrelerinin Funguslar için Disk Difüzyon Testi Sonuçları. ....	49
<b>Tablo 3. 3</b> : <i>P.granatum</i> ve <i>R.aculeatus</i> Etanol Ekstrelerinin Antibakteriyal Aktivite Değerleri (mg/mL). ....	50
<b>Tablo 3. 4</b> : <i>P.granatum</i> ve <i>R.aculeatus</i> Etanol Ekstrelerinin Antifungal Aktivite Değerleri (mg/mL). ....	50
<b>Tablo 3. 5</b> : <i>P.granatum</i> ve <i>R.aculeatus</i> Etanol Ekstrelerinin Antimikobakteriyal Aktivite Değerleri (mg/mL). ....	51
<b>Tablo 3. 6</b> : Standart Antibiyotiklere Karşı Bakterilerin MİK ve MBK Değerleri. ....	52
<b>Tablo 3. 7</b> : Standart Antibiyotiklere Karşı Fungusların MİK ve MFK Değerleri. ....	53
<b>Tablo 3. 8</b> : Standart Antibiyotiklere Karşı Tüberküloz Bakterilerinin MİK Ve MBK Değerleri(µg/mL). ....	53
<b>Tablo 3. 9</b> : <i>P.granatum</i> ve <i>R.aculeatus</i> Bitkileri Ile Boyanmış Kumaşlar İçin Antibakteriyel Testi Sonuçları. ....	55
<b>Tablo 3. 10</b> : AATCC 100 Metoduna Göre <i>P.granatum</i> ile Boyanmış Kumaş Örneğinin Değerlendirilmesi. ....	57
<b>Tablo 3. 11</b> : AATCC 100 Metoduna Göre <i>P.granatum</i> ile Boyanmış Kumaş Örneğinde Zamana Göre Bakteri Sayısında Azalmanın Değerlendirilmesi. ....	58
<b>Tablo 3. 12</b> : AATCC 100 Metoduna göre <i>R.aculeatus</i> ile boyanmış kumaş örneğinin değerlendirilmesi. ....	58
<b>Tablo 3. 13</b> : AATCC 100 Metoduna göre <i>R.aculeatus</i> ile boyanmış kumaş örneğinde zamana göre bakteri sayısında azalmanın değerlendirilmesi. ....	58
<b>Tablo 3. 14</b> : AATCC 30 Tekstil Materyallerinde Antifungal Aktivitenin derecelendirilmesi. ....	62
<b>Tablo 3. 15</b> : Bitkilerle boyanmış kumaşların aatcc 30 standardına göre antifungal aktivitelerinin derecelendirilmesi. ....	62
<b>Tablo 3. 16</b> : HPLC Analizi Sonucunda Ekstrelerde Bulunan Fenolik Maddeler (µg/ml). ....	64
<b>Tablo 3. 17</b> : ICP Analiz sonuçları (µg/kg). ....	66

## KISALTMA LİSTESİ

<b>DMSO</b>	:Dimetilsülfoksit
<b>WHO</b>	:Dünya Sağlık Örgütü
<b>MİK</b>	:Minimum İnhibisyon Konsantrasyonu
<b>MBK</b>	:Minimum Bakterisit Konsantrasyonu
<b>MFK</b>	:Minimum Fungusit Konsantrasyonu
<b>HPLC</b>	:Yüksek Basınçlı Sıvı Kromatografisi

## ÖNSÖZ

Yüksek Lisans eğitimimin ilk gününden sonuna kadar geçen sürede, her aşamada desteğini esirgemeyen, bilgi birikimini, tecrübesini ve değerli zamanı benimle paylaşan, tezin oluşumunda, düzenlenmesinde ve değerlendirilmesinde her türlü katkıda bulunan danışman hocam sayın Doç. Dr. Tülin AŞKUN' a teşekkürlerimi sunarım.

Bilgi ve tecrübelerini benden esirgemeyen değerli hocam Prof. Dr. Gülendamar TÜMEN'e teşekkürlerimi bir borç bilirim.

Balıkesir Üniversitesi Temel Bilimler Araştırma Merkezi (BÜTAM) ve Sun TEKSTİL A.Ş. çalışanlarına teşekkür ederim.

Dört senedir yanımda olup hayatımı daha eğlenceli kılan ve yanımda olmaktan hiç vazgeçmeyen ve asla vazgeçmeyeceğini bildiğim sevgili nişanlım Sinan GÜNER' e çok teşekkür ederim.

Bugünlere gelmemde büyük emeği olan desteğini her zaman hissettiğim değerli aileme;

İdeallerimi gerçekleştirmem doğrultusunda hiçbir zaman desteğini esirgemeyen ve her konuda destek olan dünyada bir eşinin daha olmadığını bildiğim canım annem ve babam Tülin ve Özdemir ÇELİKBOYUN' a,

Hayatımın her anını paylaşmaktan mutluluk duyduğum, her zaman yanımda olan canımdan çok sevdiğim kardeşlerim Vasfi Can ÇELİKBOYUN ve Pelin DOĞRUL' a

Bize her konuda yol gösterici olan, bilgi ve tecrübelerini esirgemeyen canım dedem ve anneanneme çok teşekkür ederim.

Pınar ÇELİKBOYUN

# 1. GİRİŞ

## 1.1 Bitkilerin Tıbbi Açıdan Önemi

Tarihin en eski çağlarından beri, dünyanın hemen her yerinde, insanların bitkilerle ilgisi daha çok faydalanma yönünden olmuş, hangi bitkilerin besin maddesi olabileceği, hangilerinin tıbbi ve zehirli oldukları, hangi ağaçların odununun inşaatta veya silâhların yapılmasına elverişli olduğunu öğrenmişlerdir. Günümüzde bitkiler yıllardır tüm dünyada olduğu gibi ülkemizde de halk arasında çay, baharat ve tedavi amaçlı olarak kullanılmaktadır. Ülkemizin bitkisel çeşitlilik yönünden oldukça zengin bir floraya sahiptir. Bu zenginliğin nedeni, üç fitocoğrafik bölgenin kesiştiği bölgede bulunması, Güney Avrupa ile Güneybatı Asya floraları arasında köprü olması, pek çok cins ve seksiyonun, orijin ve farklılaşım merkezlerinin Anadolu oluşu ile tür endemizminin yüksek oluşudur [1]. Ülkemizde 9000 'e yakın doğal bitki türü bulunmaktadır ve bunların % 30' u endemiktir. Buna rağmen bu bitki zenginliğinden yeterince faydalanılamamaktadır [2]. Bitkilerin antimikrobiyal aktivitesi ve insan sağlığı için önemli olan özellikleri 1926 yılından bu yana araştırılmaktadır [3, 4]. Dünya Sağlık Örgütü'nün (WHO) araştırmalarına göre tedavi amaçlı kullanılan tıbbi bitkilerin sayısı 20.000 civarındadır [5].

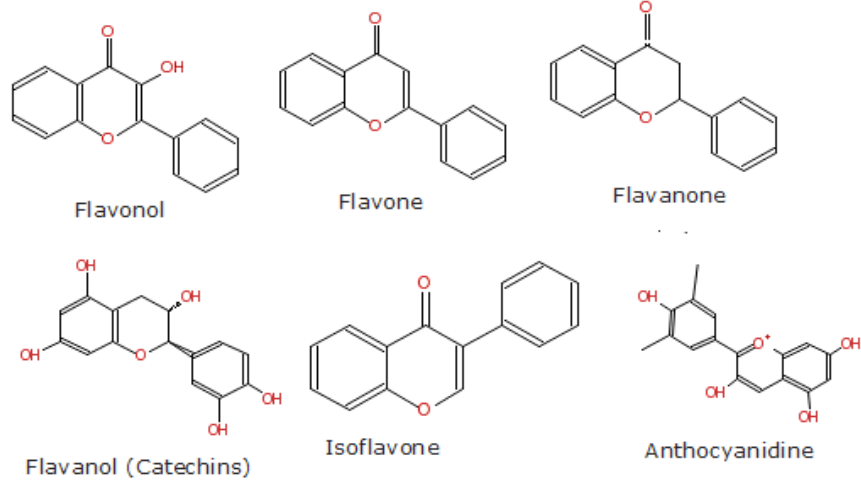
Bilinen tüm antibiyotiklere karşı direnç geliştirmekte olan bakterilerde, ilaç dirençliliği artmakta ve yayılmaktadır [6]. Antibiyotik direnci, son yıllarda küresel bir sorun haline gelmiştir. Bu sorun, bulaşıcı hastalıkların neden olduğu ölümlerin fazla olduğu gelişmekte olan ülkelerde büyük önem taşır [7]. Bu nedenle ilaçlara alternatif bazı geleneksel kullanıma sahip bitkiler antimikrobiyaller olarak kullanılmaktadır [6].

Günümüzde, tıbbi bitkiler, daha yavaş iyileşme sağlamasına rağmen yan etkilerinin az olması ve sentetik ilaçlara göre daha az olan mikrobiyal direnç nedeniyle popülerlik kazanmaktadır [8]. Bitkiler gibi doğal kaynaklardan elde edilen antimikrobiyal maddelerin gıda güvenliğini yüksek oranlarda korumayı başardığı

araştırılarak bulunmuştur [9]. Diğer taraftan toprağa, suya, havaya ve canlılara olumsuz etkisi olmayan doğal bitki ekstraterinden elde edilen maddeleri kullanarak patojen funguslara karşı etkili olan bitki türleri ve bu türlerin içerdikleri etken maddelerin belirlenmesi, dünyada tüm ülkelerin yoğun bir şekilde üzerinde çalıştığı biyolojik mücadele yöntemlerinden birisidir [10]. Abascal ve Yarnell [6] ilaçlara alternatif olarak geleneksel antimikrobiyal özellik gösteren bitkilerin kullanılabilirliğini belirtmişlerdir. Antimikrobiyal aktivite bitkinin sahip olduğu alkaloidler, flavonoidler, taninler, terpenoidler gibi sekonder metabolitler sayesinde ortaya çıkmaktadır. Bitkinin temel hayati işlevleri ile doğrudan ilişkisi olmayan sekonder metabolitler yüksek yapılı bitkiler tarafından üretilir. Sekonder metabolitlerin işlevleri tam olarak açıklanamamakla birlikte herbivorlardan, patojenlerden, UV ışığı gibi abiyotik çevresel streslerden korunmak için üretildiği düşünülmektedir [11].

Sekonder metabolitler çok sayıda bileşiği içeren zengin bir grup olup, bu grup içerisinde yer alan fenolik bileşikler, üstlenmiş oldukları roller nedeniyle son derece önemlidir. Fenolik bileşiklerin, antikanserojen ve antimikrobiyal etkiler göstererek insan sağlığı üzerinde olumlu etkilerde buldukları tespit edilmiştir. Ayrıca fenolik bileşiklerin, serbest radikaller olarak adlandırılan ve nükleik asitlere, somatik hücrelere ve bağışıklık sistemine saldırarak çeşitli zararlara neden olan bileşikleri kendilerine bağlayarak güçlü antioksidan etkiler gösterdikleri bilinmektedir [12-14].

Sekonder bileşiklerin önemli bir ögesi olan fenolik bileşikler fenolik asitler ve flavonoidler olarak iki gruba ayrılırlar (Şekil 1.1). Bitkilerde bulunan fenolik asitler, benzoik ve sinamik asitlerin hidroksillenmiş türevleridir [15, 16]. Flavonoidler ise, flavinler, flavinoller, flavaninler, flavanoller, izoflavinler ve antosiyaninler olarak altı kategoriye ayrılır [17].



**Şekil 1. 1:**Flavanoid grupları.

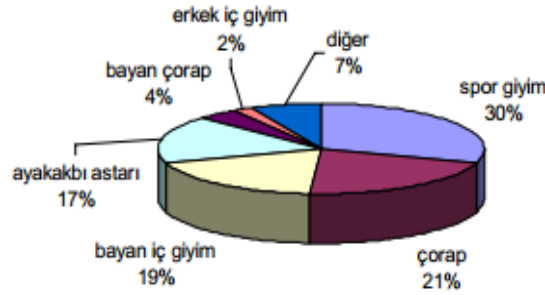
Flavonoidler ve fenolik asitlerin bitkilerde birçok fonksiyonu vardır. Bunlar hücre duvarının destek malzemesidir. Ayrıca tohum dağılımı ve tozlaşmada kuşlar ve böcekler için renkli olmaları nedeniyle cezbedicidirler [18]. Bunların dışında fenolik bileşikler yaralama, enfeksiyonlar, aşırı ışık veya UV ışınları gibi farklı çevresel stres koşullarında bitki savunma mekanizmalarında rol oynar [19, 20]. Flavonoidlerin antialerjik, anti-inflamatuar, antiviral ve antiproliferatif aktiviteye sahip olduğu belirlenmiştir [18, 21]. Ayrıca flavonoidlerin ve fenolik asitlerin, antioksidan [22, 23] ve antikanserojen etkileri vardır [24, 25].

## 1.2 Bitkilerin Doğal Boyama Açısından Önemi

İnsanların bin yıldır doğal maddeler kullanarak hastalıklarla mücadele etmesine rağmen antimikrobiyal maddeler sadece 20. yüzyılda üretilmeye başlanmış ve tekstil materyallerine eklenmeye başlanmıştır. Antimikrobiyal ürünler çeşitli endüstri alanlarında çok uzun yıllardan beri kullanılmaktadır. Fakat son yıllarda tekstil materyallerinde Antimikrobiyal uygulaması giderek önem kazanmıştır. Antimikrobiyal madde, mikroorganizmaları öldüren veya üremelerini önleyen madde olarak tanımlanabilmektedir. Antimikrobiyal (Antibakteriyal ve antifungal) kumaşlar, son yıllarda özellikle cerrahi giysilerde, bebek giysilerinde, iç



çamaşırlarında, vb. çok büyük önem kazanmışlardır. Bütün dünyada mikrobik enfeksiyon tehlikesi nedeniyle artan bir ilgi vardır (Şekil 1.2).



**Şekil 1. 2:** 2000 yılı itibari ile dünyada doğal boya kullanım alanları.

Doğadan elde edilen maddeler kullanılarak yapılan boyamaların, ilk olarak M.Ö.3000 yıllarına dayandığı bilimsel olarak tespit edilmiştir. Bu tarihlerdeki bir Çin kaynağında, doğal boyalardan söz edilmekte, Orta Krallık döneminde Mısır'da, sadece boyaların elde edilişleri değil, mordan maddelerinin dahi bilindiği belirtilmektedir [26].

Doğanın en güzel renklerini dokumalarına yansıtan kültürler arasında Hindistan, Çin, Japonya ve Mısır'da boyamacılık yüksek seviyelere ulaşmıştır. Tarihi bilgilere göre, MÖ 2000 yılında Çinliler indigo boyamacılığını bilmekte ve uygulamaktaydı. Mısır'da yapılan kazılarda ele geçen, MÖ 1600 yıllarından önceye ait olduğu belirlenen dokuma buluntularına göre, Mısırlıların aspir çiçekleri ile keten mumya kumaşı ve sargılarının boyamacılığında ileri oldukları anlaşılmaktadır. Romalıların yumuşakçaları kullanarak purpur rengine boyadıkları kumaşları, sadece rahipler, krallar ve yüksek memurların giysilerinde kullanılmasına izin verdikleri bilinmektedir. MÖ 3000 yıllarında Eski Mezopotamya'da kermes böceğinin ve yine MÖ 1500 yıllarında Hindistan'da lak böceğinin kırmızı renk elde etmede kullanıldığını, Meksika, Peru ve Afrika'da yerli halkın günlük yaşamlarını renklendirmede hayvansal ya da bitkisel kaynaklı doğal boyaları kullandıkları bilinmektedir [27-30].

Doğal boyacılık Türklerde de köklü bir geleneğe sahiptir. Orta Asya'da halı sanatı ile birlikte başlamış gelişmiş ve yine halı sanatı ile birlikte yaşanan göç sonucunda Anadolu'ya taşınmıştır. Anadolu'nun zengin bitki kaynaklarına

sahipolması avantajını da kullanarak, burada daha önce yaşamış uygarlıkların bilgi, gelenek ve görenekleri ile sentezlenerek güçlü bir Türk Doğal Boyacılık kültürü oluşmuştur [31].

Doğal boyarmaddeler hayvansal ve bitkisel olmak üzere ikiye ayrılır. Doğal boyarmaddeler arasında asıl geniş yer tutan bitkilerdir. Bunlar boya bitkileri denilen bitkilerden elde edilir. Boyarmaddeler bu bitkilerin çiçek, meyve, yaprak, gövde ve kök gibi kısımlarında bulunur [32-33]. Bitkilerdeki aktif boyarmaddenin azlığı, yetiştiği bölgelere göre değişiklik göstermesi, boyama tekniğinin zahmetli ve zaman alıcı olması, elde edilen renklerin sınırlı olması, sadece doğal lifleri boyayabilmeleri gibi olumsuz yönleri bitkisel boyalara olan talebi azaltmış ve kimyasal boyalarla rekabet edemeyecek duruma gelmişlerdir [34-36].

Günümüzde yeniden canlılık kazanan doğal boyacılık son 10 yıldır birçok araştırmacının dikkatini çekmiş, yeni çalışmalar özellikle doğal boyaların tekstil sanayinde kullanılma tekniklerin araştırmaya yoğunlaşmıştır. Nishida ve ark. [37]; doğal boyarmaddeleri ipek, pamuk, kaşmirde alum ve demir sülfat mordanı kullanarak ve yün ve sentetik liflerde (poliester, poliamid ve poliakrilik) renk yoğunluğu ve haslık özellikleri açısından çalışmışlardır [38]. Yine, Lockhande ve Dorugade [39] seçilmiş doğal boyarmaddeleri polyamide üzerinde değişik mordanlar (alum, demir sülfat, tannik asit, kalay klorür) kullanarak çalışmıştır. Sentetik boyarmaddelerin, doğal boyarmaddelerin yerini almasının nedeni daha kolay çalışabilir olması, ucuza mal edilmesi, renk çeşidinin çok fazla olması, tekstil boyama ünitelerinde kolay boyanma işleminin yapılması sayılabilir. Ancak sentetik boyarmaddelerinin suda parçalanmamaları nedeni ile çevre kirliliğine neden olması, insanlarda ve çevrede toksik etkilerinin görülmesi, dünyada yeniden doğal boyalara dönüşmesi gerektiği ciddi bir şekilde gündeme gelmiş ve gelecek 10 yıl içinde doğal boyarmaddelerin sentetik boyaların bir kısmının yerini alacağı artık kaçınılmaz olarak görülmektedir [40].

### **1.3 Punicaceae Familyası**

#### **1.3.1 Genel Özellikleri**

Nargiller, boyları 2 ila 5 m. arasında değişen çalı formunda olup ılıman yerlerde yetişen bitkilerdir. Nargiller gerçek bir çalı olduğu için doğal olarak tek bir gövde ve taç oluşturmaz.

Bitkinin genç sürgünleri kahverengi kırmızı renkli, 1–2 yıllık sürgünleri yeşilimsi gri, daha yaşlı dalları grimsi kahverengimsi sarı olan renklidir ve sürgünleri genellikle dikenlere sahiptir. Bu dikenler çok iri ve sert yapıdadır. Çok az çeşit az dikenli veya dikensiz özelliğine sahiptir. Bitki 4–8 tomurcuk yaprağı ile kaplanmış 6–7 primordial yaprağın bulunduğu küçük tomurcuklara sahiptir. Gövde, gri ve kahverengimsi çatlaklar bulunan bir kabukla kaplıdır ve 10–25 cm kalınlığa erişmektedir. Kabukla odun arasında kalan tabaka sarımsı yeşil bir renge sahiptir. Odun tabakası ise açık limon sarısı, öz kısmı ise kahverengidir [41]. Meyveleri çok daneli ve etli tohumlardan oluşan, koyu kırmızıdan beyaza kadar değişik tonlarda renklere sahiptir. Meyveler tatlı, ekşi ve mayhoşolarak gruplandırılır. Nargiller özellikle potasyum ve karbonhidrat açısından oldukça zengin bir meyvelere sahiptir [42].

#### **1.3.2 Kullanım Alanları**

Punicaceae familyasının ekonomiye büyük katkısı vardır. Küçük bir familya olan Punicaceae'nin üyeleri taze olarak tüketilebildiği gibi meyve suyuna, meyve suyu konsantresine, reçele, şaraba ve nar ekşisine ve liköre işlenebilmekte, çeşitli gıdalara renk verici ve tatlandırıcı olarak değerlendirilmektedir [43].

Türün meyve kabuğu [44], meyvesi [45] ve yaprakları [46] ishali önlemede; meyve özü [47] mide tedavisinde; meyve ve çiçekleri iltihap giderici [48] olarak halk arasında yaygın olarak kullanılmaktadır. Ayrıca, ılıman iklime sahip alanlarda süs bitkisi amacıyla da yetiştirilmektedir [49].

## 1.4 *Punica L. Cinsi*

### 1.4.1 Genel Özellikleri

Punicaceae familyasına ait tek cins *Punica* olup bu familyada yer alan bitkilerinin anavatanı Ortadoğu, Anadolu ve Kafkasya ile İran körfezi arasında kalan bölge olup binlerce yıldır üretimi ve tüketimi yapılmaktadır. Haziran-Temmuz aylarında kırmızı renkli çiçekler açan, iki ile beş metre boylarında ağaççıklardır. Yapraklar karşılıklı, parlak renkli, ince-uzun şekilli, kısa saplı ve kırmızı kenarlıdır. Çiçekler kısmen sapsız, tek tek ve birkaçı bir arada bulunur. Çanak yaprakları kırmızı renkli, dökülmeyen ve etlidir. Meyveleri küre şeklinde ve portakal büyüklüğünde, önceleri yeşil, olgunlukta kırmızımsı renkte, derimsi kabuklu, çok tohumlu ve etlidir [50,51].

Bu familyaya ait tek cins olan *Punica* en önemli türü *Punica granatum L.* ile temsil edilir. Diğer bir türü olan *Punica nana* ise bodur olup, süs bitkisi olarak saksıda yetiştirilmektedir [52]. *Punica protopunica* ise Yemen (Socotra) adası için endemik bir tür olup, diğer *Punica* türlerinden farkı çiçeklerinin pembe, meyvelerinin sarı-yeşil yada kırmızı-kahve olmasıdır [53].

### 1.4.2 *Punica* Türlerinin Kimyasal İçerikleri ve Kullanım Alanları

Nar günümüzde kanser önleyici [54,55], antiproliferatif, apoptotik [56], HIV-I inhibitör, mikrobisit [57], kardioprotektif [58], antihiperlipidemik [59] gibi önemli yararlı etkileriyle çok popüler olmuştur. Bunlara ilaveten bir çok araştırmada [60,61] nar ve nardan elde edilen yan ürünlerin güçlü bir serbest radikal süpürücü ve etkili bir antioksidan aktiviteye sahip olduğu belirtilmektedir. Saf nar suyu (NS) C vitamini ile antosiyaninler, punikalajin, ellajik ve gallik asit gibi polifenolik bileşikler içermektedir [56,62].

Sistematikte Punicaceae familyası içinde yer alan nar (*Punica granatum L.*), çalı formunda ılıman iklimlerde iyi yetişebilen bir türdür [63]. Kuraklığa dayanıklı olan tür, toprak erozyonunu önlemede önemli bir yer tutmaktadır [64].

Dünya’da nar üretimi 2010 yılı verilerine göre 2.5 milyon ton olup bunun 208.5 tonu Türkiye’de üretilmiştir [65]. Nar suyu üretimi sırasında nar kabuğu ve çekirdekten oluşan posa açığa çıkmaktadır. Narın toplam ağırlığının yaklaşık olarak % 48’i kabuktan, %52’si ise meyveden oluşmaktadır [43]. Meyvesinin % 78’i nar suyu, % 22’si ise çekirdek içermektedir [66].

Nar kabuğu ve çekirdeği ağırlıklı olarak punikalagin ve bunun izomerleri olan (2,3-hekzahidroksidifenol-4,6-gallagilglukoz) ellajitanenleri, az miktarda da punikalın (4,6-gallagilglukoz), gallik asit, ellajik asit ve ellajik asit glikozitleri (heksisid, pentosid, ramnosid) içerir [67]. Farklı meyvelerin kabuk, meyve eti ve çekirdeklerinin antioksidan etkilerinin araştırıldığı bir çalışmada [68] nar çekirdeği ve kabuğunun yüksek antioksidan aktiviteye sahip olduğu ve bunu sırasıyla üzüm çekirdeği ve alıç kabuğunun izlediği saptanmıştır. Nar kabuğu ve çekirdeği ekstraktının iki farklı yöntemle (DPPH ve  $\beta$ -karotenlinolate) göre antioksidan aktivitesinin saptandığı bir başka çalışmada [69] ise nar kabuğunun çekirdeğine göre daha yüksek aktivite gösterdiği ortaya konmuştur.

Ülkemizde özellikle Ege, Akdeniz ve Güneydoğu Anadolu bölgesinde nar meyvesinin preslenmesi, elde edilen nar suyunun durultulması ve tekniğine uygun olarak açıkta veya vakum altında koyulaştırılması ile elde edilen nar ekşisi, gıdalara çeşni vermek amacıyla kullanılmaktadır. Nar meyvesi ve bitkisinden ilaç, yağ, hayvan yemi, tanen, pektin, sirke, sitrik asit, boya, mürekkep. vb. ürünlerin elde edilebilmesi bu meyvenin gelecekte önemli bir endüstri bitkisi olacağı izlenimini vermektedir [70].

Son yıllarda gerek gıda gerekse de yem sektöründe antimikrobiyal kökenli doğal yem katkı maddeleri olarak polifenolik bileşiklerce zengin nar kabuğu veya ekstraktı dikkat çekmiştir. Bu ürünlerin yanı sıra nar suyu üretimi yan ürünü olarak elde edilen nar kabuğunun işlenmesiyle elde edilen ekstraktın gerek gram-negatif gerekse de gram-pozitif bakterilere karşı geniş spektrumlu antimikrobiyal aktiviteye sahip olduğu yapılan in vitro çalışmalarla ortaya konmuştur [71,72].

Nar çekirdeği, posası veya kabuğunun içerdiği polifenollerden olan kondense tanenlerin veya proantosiyanidinlerin; kolesterolün taşınmasını ve safra asidi atılımını artırarak, bağırsaktan kolesterolün emilimini azalttıkları bildirilmektedir

[73]. Shabtay ve ark. [74], Holstein Friesian besi danalarının rasyonuna yeni bir yem maddesi olarak taze nar kabuklarının ilavesinin, canlı ağırlık kazancı ile yem tüketimini ve plazmanın  $\alpha$ -tokoferol içeriğini önemli derecede artırdığını ifade etmişlerdir.

Alternatif protein kaynağı olarak "Tek Hücre Proteinlerinin" üretiminde nar kabuklarından yararlanılabilir ve bu şekilde elde edilen maya proteinleri, kanatlı hayvanların beslenmesinde soya küspesinin veya balık ununun yerine kullanılabilir. Khan ve ark. [75] nar kabuğundan elde edilen maya proteininde % 51.6 ham protein bulunduğunu bildirmişlerdir. Nar içerdiği biyoaktif bileşenler sayesinde yüzyıllardan beri halk arasında uygulanan geleneksel tedavi yöntemlerinde kullanılmıştır. Yabani narların suyundan farmasötik amaçlı sitrik asit ve sodyum sitrat eldesinde yararlanılmaktadır. Nar suyu dispepsi tedavisinde kullanılan preparatların bileşiminde yer almaktadır. Ayrıca cüzzam tedavisinde nar suyunun yararlı olduğu düşünülmektedir. Nar ağacının kabuk ve kökleri barsak kurtlarına karşı etkili bir alkaloid olan "isopelletierine" içermektedir [76].

Meyvenin bileşimi; çeşit, yetiştirme koşulları, iklim, olgunluk durumu ve depolama şartlarına bağlı olarak değişmektedir. Narın yenebilen kısmı önemli miktarda asitler, şekerler, vitaminler, polisakkaritler, polifenoller ve mineralleri içermektedir [77, 78, 79, 80]. Nar kabukları, ellagik asit, ellagitanen ve gallik asit içermektedir [81]. Nar kabuğu; punikalagin ve bunun izomerleri olan 2,3-hekzahidroksidifenol-4,6- gallagilglukoz gibi ellagitanenlerce zengin olup, punikalın (4,6-gallagilglukoz), gallik asit, ellagik asit ve ellagik asit glikozitleri (heksisid, pentosid, rhamnosid) ise daha az miktarda içermektedir [82]. Nar kabuğundan bulunan zengin tanen; deri işleme sanayinde ve meyve sularının durulaştırılmasında ve çinko zehirlenmelerinin önlenmesinde yoğun olarak kullanılır. Ayrıca nar kabuğu ve çiçeklerinden boya ve mürekkep imalinde yararlanılır. Sarı-gri, koyu hakikoyu kahve renk verir [83-86].

### **1.5 *Punica granatum L.***

Punicaceae familyasının *Punica* cinsine ait olup, en önemli türü *Punica granatum L.*'dur . Nar bilinen en eski meyve türlerinden olup, kültür tarihi M.Ö.

3000 yıl öncesine kadar gitmektedir. Anavatanı Güney Kafkasya, İran, Afganistan, Güney Asya, Batı Asya, Anadolu ve Akdeniz arasında kalan bölgeleri kapsamaktadır [87]. Nar, tropikal ve sub-tropikal iklimlerin bitkisi olup ülkemizde de Akdeniz ikliminin karakteristik bitkisi olarak başta Akdeniz Bölgesi olmak üzere Ege ve Güneydoğu Anadolu Bölgeleri'nde kıyıda 1000 metre yükseltiye kadar olan sahalarda yetiştirilmektedir [88].

Bu meyvenin ticari türü olan *Punica granatum* L. Ortaçağ'da çekirdekli elma anlamına gelen "*Pomuni granatum*"dan adını almıştır [89,90]. Bir Fenike kolonisi olan Kartacalılar Akdeniz havzasında nar ticaretini başlattıkları için eski kaynaklarda "Kartaca (Fenike) Elması" (The apple of Carthage /Carthaginian apple) adıyla geçmektedir [91]. Günümüzde A.B.D.'de çekirdekli elma (Seedy apple) olarak da bilinmektedir.

Narın kültür tarihi oldukça eskilere uzanmakta olup çeşitli kaynaklarda yetiştiricilik geçmişinin 5000 yıl öncesine dayandığı belirtilmektedir. Dolayısıyla kültüre alınan en eski tarım ürünlerinden olan nar bitkisi, insanlık tarihinde önemli bir yere sahiptir. Bu meyveyi tanıyan her topluluk ve medeniyet tarafından pek çok açıdan farklı değerler yüklenmiştir. Nar, tüm kutsal kitaplarda adından bahsedilen, Musevilik, Hıristiyanlık ve İslamiyet'te özel anlamlar yüklenen bir meyvedir. Nar ayrıca ibadethanelerde gravür ve tablolarla tasvir edilmiştir. Narın köklü tarihinin yanı sıra, sadece bir meyve olmaktan öte çeşitli kullanım sahaları da mevcuttur. Nar bazen milli bir sembol olmuş, hatta çeşitli yerleşim yerlerine adını vermiştir. Nar insan sağlığına olan yararının dışında pek çok kültürel faaliyette de yeri olan (Yün boyama ve süsleme) özel bir meyvedir. [90, 92, 93].

### 1.5.1 Morfolojik Özellikleri



**Şekil 1. 3:** *P. granatum* L.

Nar; nisan sonu ile haziran başı arasında çiçeklenmektedir. Çiçeklenme periyodu yaklaşık 1-1.5ay olup, meyve olgunlaşması ağustos sonu ile kasım ortasına kadar sürer. Andromonoik bitki özelliğine sahip olup böcek veya rüzgârla tozlanır. Genelde subtropik iklim bitkisi olmasına rağmen, -10 C°'ye kadar dayanabilmektedir. Nar pek çok iklim koşullarında sorunsuz yetiştirilebilen bir meyvedir. Yetiştiriciliğinin yapılacağı bölgede yazların uzun ve sıcak, kışların ılık ve yağışlı olması gerekmektedir. Narın soğuklama gereksinimi hemen hemen yok gibidir.

Meyvelerini olgunlaştırabilmek için vejetasyon dönemi içinde yüksek bir sıcaklık toplamı ister. Nar, ülkemizin serin iklim bölgelerinde (İç Anadolu gibi) mayısta, sıcak iklim bölgelerinde (Akdeniz gibi) ise nisanda çiçeklenmeye başlar. Çiçeklenme haziran ayına kadar sürmektedir. Yıllık ortalama 500 mm'lik yağış yetiştiricilik için yeterlidir. Yaz aylarındaki yağışlar meyve kalitesini bozmakta, özellikle olgunluğa yakın dönemlerde meyve çatlamalarına neden olmaktadır. Meyve oluşumu döneminde kuru hava koşulları, kaliteli meyvelerin oluşması bakımından önemlidir. Nar, pek çok meyve ağacından daha geniş toprak çeşidine uyum gösterebilir. Derin, alüvyal topraklar nar yetiştiriciliği için en uygun topraklardır. Fakat kumlu, killi, kireçli topraklarda da yetiştirilir. Tuzluluğa orta derecede dayanıklıdır [41].



### 1.5.2 *Punica granatum* L. Sistematikteki Yeri

<b>Kingdom</b>	Plantae
<b>Subkingdom</b>	Viridiplantae
<b>Division</b>	Tracheophyta
<b>Subdivision</b>	Spermatophytina
<b>Class</b>	Magnoliopsida
<b>Order</b>	Myrtales
<b>Family</b>	Punicaceae
<b>Sub family:</b>	Punicoideae
<b>Genus</b>	<i>Punica</i>
<b>Species</b>	<i>Punica granatum</i> L.

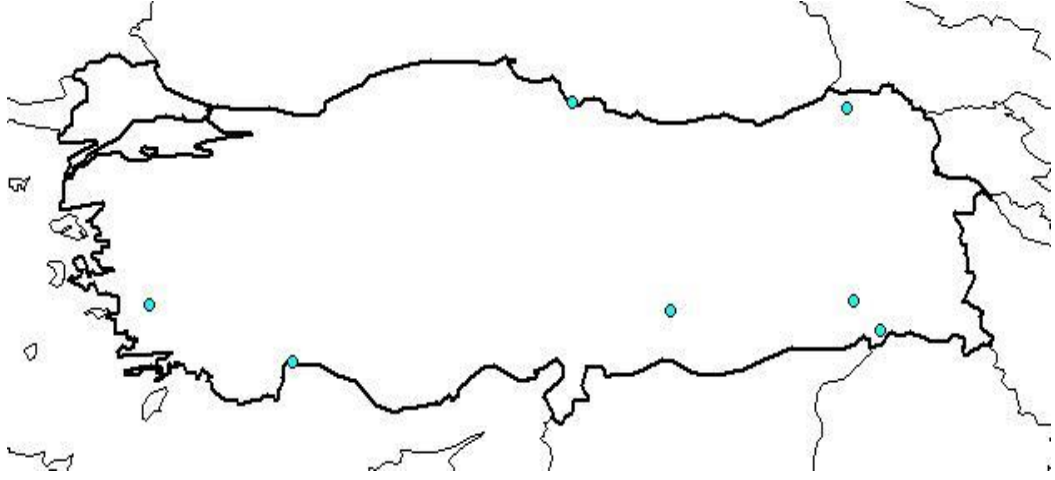
### 1.5.3 Türün Türkiye ve Dünyadaki Yayılışı

Nar bitkisinin yerküre üzerinde en yaygın olarak yetişme ortamı bulunduğu sahalarda genelde dönenceler ile 40° enlemleri arasında kalan ve Akdeniz yağış rejiminin etkili olduğu kışları yağışlı, yazları sıcak ve kurak olan bölgelerdir. Nar, tropikal ve sub-tropikal iklimlerin bitkisi olup ülkemizde de Akdeniz ikliminin karakteristik bitkisi olarak başta Akdeniz Bölgesi olmak üzere Ege ve Güneydoğu Anadolu Bölgeleri'nde kıydan 1000 m. yükseltiye kadar olan sahalarda en yaygın yetişme ortamı bulur.

Nar bitkisinin Türkiye'de ziraatının yapılması oldukça gerilere uzanmakla beraber meyvecilik sektöründeki gelişimini 2000'li yıllardan itibaren önem kazanmıştır. Nar Türkiye'nin güney kıyıları boyunca başta Antalya olmak üzere en fazla Muğla, Mersin ve Adana'da ziraatı yapılmaktadır (Şekil 1.3). Bununla beraber ortam şartlarına uyum yeteneğinin yüksek oluşu ve toprak çeşidi açısından fazlaca seçici olmamasıyla son yıllarda yayılış sahasında ciddi bir gelişme gözlenmiştir. Bununla birlikte nar -10°C'ye kadar direnç gösterebilmektedir [94].

Nar birçok ülkede yetişmekle birlikte Türkiye; en çok üretimin olduğu ülkeler olan İran, Hindistan ve Çin'in ardından dördüncü sırada yer almaktadır. 2005 yılında

meyve suyuna işlenen nar miktarı 17.000 ton, işlenen konsantre miktarı ise 2.700 ton dolayındadır. 2006 yılında ise 46.600 ton nar meyve suyuna işlenmiş ve işlenen konsantre miktarı ise 6.900 tonu bulmuştur [95].



Şekil 1. 4: *P.granatun* 'un illere göre yayılışı.

#### 1.5.4 Tür ile İlgili Biyolojik Aktivite Çalışmaları

Nar kabuğu ekstraktının antimikrobiyal etkisinin; yapısında bulunan gallotanenler ve ellagitanenler gibi hidrolize olabilir tanenlerden ileri geldiği ifade edilmektedir [96]. Nar kabuğundan elde edilen kondense tanenin antimikrobiyal etki mekanizması; patojen mikroorganizmaların enzim aktivitelerini ve mikroorganizmaların membranlarında elektron taşınma sistemini engellemeleri şeklinde açıklanmıştır [97]. Panichayupakaranant ve ark. [98] % 13 düzeyinde ellagik asit içeren nar kabuğuekstraktının gram-pozitif anaerob bir bakteri olan *Propionibacterium acnese* ve gram-pozitif fakültatif anaerob bakteri olan *Staphylococcus aureus* ve *Stahpylococcus epidermidis*'e karşı potansiyel bir bakteriostatik etki gösterdiğini saptamışlardır. Al-Zoreky [99] nar kabuğunun % 80'lik metanol ekstraktının in vitro koşullarda *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus*, *E. coli* ve *Yersinia enterocolitica*'nın gelişimini engelleyici etkiye sahip olduğunu saptamıştır.

Sweetie ve ark. [100] , nar kabuğu ekstraktının % 0.01 konsantrasyonda dahi *Staphylococcus aureus* ve *Bacillus cereus*'a karşı iyi bir antimikrobiyal etki

gösterdiğini, bu ekstraktın % 0.1 gibi yüksek konsantrasyonunun *Pseudomonas* gelişiminde etkili iken, *E. coli* ve *S. typhimurium*'a karşı etkisiz olduğunu bildirmişlerdir. Nar ekstraktında bulunan en önemli fenolik bileşik olan hidrolize veya kondense tanenlerin *Candida albicans*'a karşı kuvvetli bir antifungal aktivite gösterdiği de belirtilmektedir [101].

Nar kabuğu ekstraktının toplam fenolik, flavonoid ve proantosiyanidin içeriğinin daha fazla olması nedeniyle antioksidan aktivitesinin nar posasından daha yüksek olduğu [102] nar kabuğundaki hidrolize tanenlerden olan punikalajinin serbest radikallerin uzaklaştırılmasında ve lipid oksidasyonun önlenmesinde oldukça güçlü etkiye sahip olduğu, ayrıca kabukta  $\alpha$  ve  $\gamma$ -tokoferolün önemli düzeyde bulunduğu bildirilmektedir [103]. Negi ve Jayaprakasha [104] nar kabuklarının etil asetat, aseton, metanol ve su ile ekstraksiyonu sonucunda elde edilen ekstraktı sentetik bir antioksidan olan bütilhidroksitoluen ile karşılaştırmak amacıyla yaptıkları bir in vitro çalışmada, metanolla ekstrakte edilmiş nar kabuğu ekstraktının 50 mg/kg'lık düzeyinin antioksidan özelliğinin sentetik antioksidaninkinden daha üstün olduğunu saptamışlardır.

Poyrazoğlu ve ark. [105]' nın 13 farklı nar çeşidinin taze sıkılmış sularının bileşimini inceledikleri çalışmada, ortalama toplam asit 9.82g/L ve toplam şeker 148.75 g/L olarak bulunmuştur. Sitrik, L-malik, tartarik, okzalik, (-)- kuinik ve süksinik asit gibi organik asitlerin miktarlarını da belirlendiği araştırmada, sitrik asit 4.85 g/L ile ortamdaki hakim asit olarak saptanırken, bunu L- malik asit 1.75 g/L izlemiştir. Tartarik, okzalik, (-)- kuinik ve süksinik asidin miktarları sırasıyla 0.28-2.83, 0.02-6.72. 0.00-0.82 ve 0.00—1.54 g/L arasında değişmiştir. Poyrazoğlu ve ark. [105]' nın nar sularında belirlediği fenolik bileşikler; gallik asit 4.55 mg/L, protokateşik asit 0.84 mg/L, klorojenik asit 1.24 mg/L. kafeik asit 0.78 mg/L, ferulik asit 0.01 mg/L, o-kumarik asit 0.17 mg/L, p-kumarik asit 0.06 mg/L, kateşin 3.72 mg/L, ve kuersetin 2.50 mg/L'dir.

Fadavi ve ark. [106] ' nın Iran' da yetişen 10 farklı nar çeşidinin bileşimini araştırdıkları çalışmada, örneklerde toplam şeker, fruktoz, glukoz ve askorbik asit sırasıyla (%) (ortalama  $\pm$  standart sapma),  $7.46 \pm 0.38$ ,  $3.80 \pm 0.26$ ,  $3.66 \pm 0.25$  ve  $0.19 \pm 0.18$  olarak belirlenmiştir. Araştırmacılar örneklerde saptanan mineraller arasında potasyumun (80.0-160.6 mg/100g) en yüksek düzeyde bulunduğunu; bunu

sırasıyla sodyum (11.3-54.5 mg/100g), kalsiyum (13.05- 30.60 m g/100g), magnezyum (2.75-5.20 mg/1 OOg), demir (0.03-0.21 mg/100g), çinko (0.037-0.084), bakır (0.013-0.081 m g / 10Og) ve mangan' ın (0.012-0.021 mg/100g) izlediğini bildirmiştir. Markh ve Lysoger [107], meyvenin %0.22-1.05 düzeyinde antosiyaninler ve çeşitli fenolik asitlerden oluşan polifenollerini içerdiğini bildirmiştir.

Fenolik bileşikler nar suyuna renk, burukluk ve acılık vermektedir. Ayrıca bu bileşikler konsantreye işleme ve depolama sırasında görülen bulanıklığa yol açmaktadır [108]. Nar suyu buzdolabı sıcaklığında mikrobiyal bozulmaya oldukça dirençlidir. Bu durumun içerdiği polifenollerden kaynaklanması olasıdır [109]. Nar; antosiyaninler, ellagitanenler, antioksidan ve antitümör aktiviteleri ispatlanmış diğer fenolik maddelerce zengin bir meyvedir. Narın sahip olduğu flavanoid ve antosiyanin içeriğine bağlı olarak gösterdiği antioksidan aktivite, kırmızı şarap ve yeşil çaydan 3 kat daha fazladır [110].

Nar suyunun antioksidan düzeyi yabamersini ve portakaldan da yüksek bulunmuştur. Nar çekirdekleri fito-östrojenlerin iyi bir kaynağıdır [111]. Nar suyunun antioksidan ve damar sertliğini engelleyici aktivitesinin, içerdiği ellagitanenler, punicalagin ve ellajik asit gibi polifenollerden kaynaklandığı düşünülmektedir. Nar suyundaki en yüksek antioksidan kapasiteye sahip fenolik maddenin "punicalagin" olduğu bildirilmiştir [112].

Nar suyu tüketiminin LDL birikimine karşı hassasiyeti azalttığı ve serum paraoksanaz (lipid peroksidasyonuna karşı koruyucu olan HDL ile ilişkili bir esterase) aktivitesini arttırdığı ortaya konmuştur [113]. Nar suyunun makrofaj köpük hücre oluşumu ve atherosklerotik lezyon gelişimini engellediği yapılan araştırmalarla gösterilmiştir. Nar suyu, okside-LDL degradasyonunu ve makrofajlardaki kolesterolbiyosentezini baskılayarak, kolesterol birikiminin ve plak oluşturu köpük hücre oluşumunun azaltılmasında yardımcıdır [114].

Nar suyunun hem erken hem de ilerlemiş damar sertliğini engellediği yönündeki görüşler güçlenmektedir [115]. Prostat kanseri, birçok batı ülkesinde görüldüğü gibi Amerika' da erkeklerde kansere bağlı ölümlerde ikinci sırada yer alan bir kanser türüdür. Malik ve ark. [116], nar suyunun insanlarda prostat kanserini önleyici ve tedavi edici etki gösterebildiğini öne sürmektedir. Güçlü antioksidan ve

anti- enflamatuvar etkiye sahip olan nar suyunun kanser aktivitesini baskıladığı yapılan çalışmalarla ortaya konmuştur.

Tanen içeriğine bağlı olarak nar ağacı kabuğu, yaprakları, ham meyve ve meyve kabuğu ekstraktları ishal ve dizanteriyi durdurucu, kanamayı kesici özellik göstermektedir. Kurutulmuş ve pülverize edilmişçiçek tomurcukları bronşit tedavisinde kullanılmaktadır. Nar çiçeklerinin dekoksasyonu ile gargara yapılması ağız ve boğaz iltihaplanmalarını hafifletmektedir. Yapraklar, tohumlar, kök ve nar ağacı kabuğu tansiyonu düşürücü, spazm giderici etki göstermektedir [117]. AIDS hastalığının tedavisinde nar suyu tüketimi önerilmektedir [118].

Nar suyu; ACE denilen enzimi engellemek suretiyle tansiyon düşürücü bir etki gösterebileceği, kan damarlarında başlayan zararlanmayı önlemesinin yanında ilerlemiş durumdaki zararlanmaları da tersine çevirebildiği [119], prostat kanserine karşı etkili olabileceği [120], kemik eklemi iltihabını önlemede etkili olduğu [121], içerdiği β-karoten sayesinde fagosit hücreleri otooksidatif zarardan koruyabilmekte, ve doğal olarak tümörleri inhibe eden hücre kapasitesini artırmaktadır.

AIDS'e karşı etkili olabileceği, ateşli hastalıklarda ateş düşürücü etkisi olduğu [122], içerdiği şekerlerin antioksidanları tarafından tutularak kan şekeri seviyesinin düzenini sağlayabildiği [119] ve bunun gibi birçok araştırılmış yada araştırılmakta olan özellikleri sebebiyle nar ve nar suyu dünyada önemi giderek artan bir üründür. Farklı kaynaklarda; nar meyvesi ve nar suyunun genel bileşenleri [123],organik asit ve fenolik dağılımı [124], başlıca antosiyaninleri [125], ayrıntılı kimyasal bileşimi [126,127] konusunda bilgiler yer almaktadır.

#### **1.5.5 Tür ile İlgili Doğal Boyama Çalışmaları**

Harmancıoğlu [128] nar meyve kabuğu ile yün kumaşların mordansız boyanmasında toprak rengi, şap ile mordanlanmış kumaşta kanarya sarısı, bakır sülfat ile mordanlamada kına rengi, demir sülfat ile mordanlamada zenci saç ve toprak renkleri tonlarını elde etmiştir. Eyüboğlu [129], 1 kg. yünü 150 gr. saçkıbrıs ile mordanlayarak nar meyve kabuğu ile boyamada siyah, şap ve krom mordanlı yün ile ise sarı renk tonlarını elde etmiştir. Nar meyve kabuklarıyla yapılan boyamalarda

genellikle sarı ve siyah renkleri elde etmişlerdir. Şapla mordanlanmış yünler kızıl sarı, kızıl sarıya boyanan yünleresaçıkıbrıs ilavesiyle siyah renk elde etmişlerdir.

Kılıç [130] yün halı ipliğini nar meyve kabuğu ile boyamıştır. Farklı mordan ve meyvediş kabuğu oranları uygulayarak alüminyum şapı ile hardal, saman, asetik asit ile ayva tüyü, hardal, kirli sarı, acı sarı, bakır sülfat ile koyu sızma zeytinyağı, haki, demir sülfat ile toprakrengi, yeşil kahve, koyu kahve, krom şapı ile kirli sarı, acı sarı, hardal, yeşil sarı, potasyumbikromat ile açık sızma zeytinyağı, sitrik asit ile ayva tüyü, saman, acı sarı, hardal, sodyumklorür ile acı sarı, kirli sarı, hardal, sülfürik asit ile ayva tüyü, saman, acı sarı, hardal, şaraptaşı ile, hardal, acı sarı renklerini elde ederken, mordansız boyamada ise kirli sarı, ayva tüyü ve hardal renklerini elde etmiştir.

## **1.6 Ruscaceae Familyası**

### **1.6.1 Genel Özellikleri**

Genellikle çok yıllık otsu, nadiren çalı şeklinde bitkilerdir. Bitkiler daha çok rizom, yumru ya da soğanlıdır. Yapraklar basit, alternat, bazal, linear-lanseolat şeklindedir. Yapraklar bazılarında etlidir. Çiçekler hermafrodit, çok azı tek eşeyli ( bunlar monoik ), aktinomorf, nadiren zigomorf simetriye sahiptir. Çiçekler tek, bazen rasem veya simoz durumundadır. Çiçekler perigon, 2 dairede yer almış ve her dairede 3 tepal bulunur, tepaller serbest veya bileşik olabilirler. Androkeum 6 stamenli, 2 dairede yer alır. Ginekeum 3 bileşik karpelli, 3 lokulusludur. Meyve lokulusit veya septisit kapsül, nadiren bakka şeklindedir. Bu familyaya ait türlerin çoğu; süs, tıbbi veya bitkisel bitkilerdir [131].

### **1.6.2 Kullanım Alanları**

Ruscaceae familyası çeşitli kullanım alanlarına sahiptir. Bitkinin geleneksel olarak kaynatılarak hazırlanan meyve özü çıban ve siğillerin üzerine sürülerek kullanılırken ayrıca egzema, böbrek taşı ve böbrek iltihabı tedavisinde, taze

yaprakları Türkiye’de soğuk almış yada meme iltihabı olan çiftlik hayvanlarında kullanılır ve ayrıca kronik toplardamar hastalıkları, bacaklarda ağrı ve ağırlık, baldırlarda gece krampları, kaşıntılar ve şişmelerine ve de bağırsak rahatsızlıklarında kullanılır [132-133].

## **1.7 *Ruscus* L. Cinsi**

### **1.7.1 Genel Özellikleri**

*Ruscus cinsi* yaz kış yeşil kalabilen koyu yeşil ağaçcık veya çalılardır. Gerçek yaprakları yoktur, dallar yassılaşıp genişleyerek yaprak görünümü almıştır. Çiçekleri diğer bitkilerden farklı olarak yaprak ortasından çıkan küçük bir sap üzerinde ve yeşilimsi beyaz renktedir. Meyveleri yaprakların tam ortasında olup böylece ucu dikenli olan diğer yapraklardan korunur. Meyveleri koyukırmızı renkli küre şeklinde ve nohut büyüklüğündedir. En yaygın türlerinden biri olan adi tavşan memesi Karadeniz bölgesinde yabani olarak yetişir. Yeşil dalları yılbaşlarında yaprak uçlarına silcan ( *smilax excelsa* ) meyveleri bağlanarak "kokina" adıyla satılır. Çok soğuk olan yörelerde yetişmez çünkü dona karşı dayanıklı değildir. Vatanı Akdeniz ve Karadeniz ülkeleri olup zamanla orta Avrupa’ya kadar yayılmıştır.

Halk arasında Enir, kuzu memesi, sıçan dikenli, dişi kuşkonmaz, Yalova mercanı ve zirmek gibi isimlerle bilinir. *Ruscus aculeatus* L., *Ruscus colchicus* , *Ruscus hypoglossum* L. *Ruscus hypophyllum* L. cinsin bilinen önemli temsilcilerindendir [134].

### **1.7.2 *Ruscus* Türünün Kimyasal İçerikleri ve Kullanım Alanları**

*Ruscus aculeatus*’ un toprak altı parçaları uzun yıllardır geleneksel ilaç olarak kullanılır. Filistinde rizom ekstreleri halk tarafından deri hastalıklarına karşı kullanılır [135].

Yeşil dalları yılbaşlarında yaprak uçlarına silcan (*Smilax excelsa*) meyveleri bağlanarak "kokina" adıyla satılır. Türkiye’de kaynatılarak hazırlanan bitki özü egzema, böbrek taşı ve böbrek iltihabı tedavisinde kullanılır [132-133]. Bu bitkinin taze yaprakları Türkiye’de soğuk alması yada meme iltihabı olan çiftlik hayvanlarında kullanılır [133].

İtalya’nın bazı bölgelerinde aynı yöntemle hazırlanan bitki özü kolon tedavisinde ve ishalde kullanılır [136]. İtalya’nın merkezinde ise şişlik ve kabarıklık-şişlik tedavisinde kullanılır [137].

Tavşan memesinin aktif maddeleri steroid saponinlerdir. Bunların toplardamarlar üzerinde, kan dolaşımını artırmak gibi yararlı etkileri ve antienflamatuar özellikleri vardır [138]. Rusci rizoma (kurutulmuş, toz haline getirilmiş rizomlar ve su, etanol, metanol ekstraktları) bugünlerde geleneksel herbal ilaç ürünü olarak tanımlanmaktadır ve hemaroid ve küçük kan dolaşımı bozukluklarında kullanılır. Basur rahatsızlığı olan toplam 196 hasta üzerinde dört ayrı çalışma grubu ölmez diken veya fitili ile tedavi denemesi yapmışlardır. Bu tedavi denemelerinde (Cleres-Kaiser 1976’da, P. Salzmann, U. Ehresmann, U. Adler ve ekibi 1977’de, H. Barmig 1978’de ve de Nietsch ve ekibi 1982’de) hastaların iyileştiğini tespit etmiştir [139]. Steroidsaponinler %4-6 arasında olup bunlarda Spirostanol-Saponinler; Ruscin ve Furostanol-Saponinler; Ruscoide içerir. Ruscoide parçalanarak Ruscin, Ruscogenin ve Neoruscogenine dönüşür. Ruscin ise Neoruscogenin’e dönüşür. Esas belirleyici olan Ruscogenindir [139-140]. Bu bitkinin toprak üstü kısımları genellikle Akdeniz ülkelerinde ve Ortadoğu ülkelerinde diüretik olarak kullanılır [141]. *Ruscus aculeatus* yaprak ve gövdesinde temel fenolikler kuersetin ve p-kumarik asit olarak tanımlanmıştır [142].

Araştırılan diğer bir tür olan *Ruscus hypoglossum* L. her dem yeşil olup tırmanıcı rizomları vardır. Batı avrupadan İrana kadar yayılış gösterir [143]. İki *Ruscus* türünün toprak üstü kısımlarına ait (*R. aculeatus* ve *R. hypoglossum*) %70 lik metanol ekstraktlarında birçok flavonoid glikozidleri ve fenolik asitler tanımlanmıştır. *R. aculeatus* eksteresinde schaftosid, orientin, vitexin, vitexin-2 “ -O-d-glucopyranoside, vitexin-2 “ -O- $\alpha$ -l-rhamnoside, rutin, isoquercitrin, nicotiflorin, narcissin, caffeic ve p-coumaric acid, trans-feruloyl-2 “ -hexaracidlactone, trans-feruloyl-3 “ -hexaracidlactone, trans-feruloyl-methoxyhexaracid-lactone derivate,



(S)-Ntrans-caffeoyloctopamine, (S)-N-trans-cumaroyloctopamine, (S)-N-trans-feruloyloctopamine, N-trans-caffeoyltyramine, N-trans-cumaroyltyramine ve N-trans-feruloyltyramine tespit edilirken *R. hypoglossum* un % 70'lik metanol ekstresinde rutin, nicotiflorin, narcissine, caffeic ve p-coumaric acid bulunmuştur. *R. aculeatus* rizomlarına ait % 70'lik metanol ekstresinde p-coumaric acid hidroksisinnamik asit amidleri tespit edilirken hiçbir flavonoid belirlenmemiştir [141].

## 1.8 *Ruscus acualetus* L.

### 1.8.1 Morfolojik Özellikleri



Şekil 1. 5: *R. aculeatus* L.

Maki ormanlarında bulunan, 20-50 cm boylanmakta, kışın yapraklarını dökmeyen, eylül-nisan ayları arasında yeşilimsi veya açık pembemsi çiçekler açan, çok yıllık, yaprak biçimindeki dalları olan, sert ve batıcı ve çalı görünüşünde, ormanlık ve dağlık bölgelerde yayılış gösteren bir bitkilerdir. Kökleri uçucu yağ ve saponinlerce zengindir. Meyveler küre biçiminde, kırmızı renklidir. Güney, batı ve güney-batı Avrupa' da, Anadolu'da ve Kuzey Afrika'da yayılış gösterir.

Gerçek yaprakları yoktur, dallar yassılaşıp genişleyerek yaprak görünümü almıştır. Yapraklar oval şekilde, sivri uçlu, koyu yeşil renkil olup serttir. Bu dalcıkların tam ortasından veya bir kenarından açan küçük çiçekler daha, sonra kırmızı renkli nohut büyüklüğünde meyvelere döner. Tadı acı olduğundan bal, pekmez, veya şekerle tatlandırılarak içilir. Meyve ve kökünden yararlanır [134,144].

### **1.8.2 *Ruscus aculeatus* L. Sistematikteki Yeri**

**Kingdom** : Plantae

**Subkingdom** : Tracheobionta

**Division** : Magnoliophyta

**Class** : Liliopsida

**Subclass** : Liliidae

**Order**: Asparagales

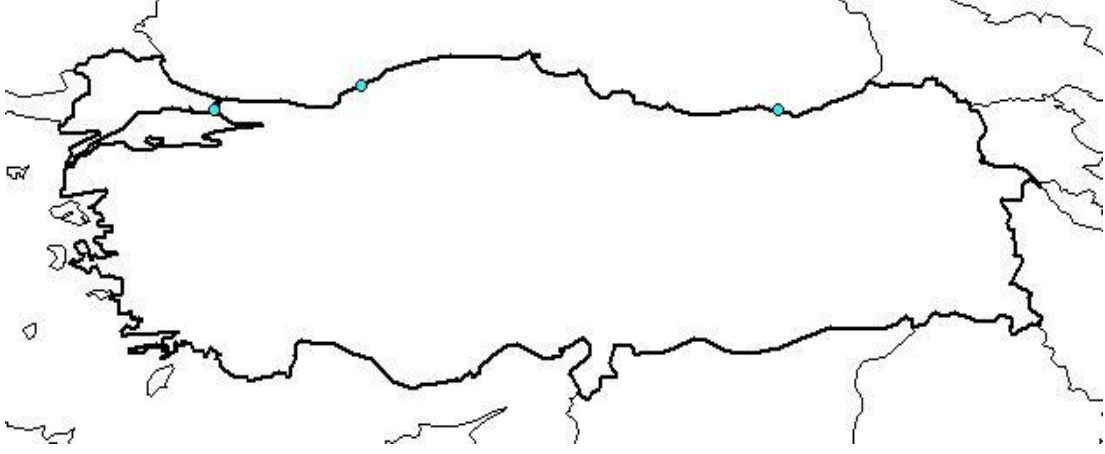
**Family**: Ruscaceae

**Genus**: *Ruscus*

**Species**: *Ruscus aculeatus* (L.)

### **1.8.3 Türün Türkiye ve Dünyadaki Yayılışı**

Tavşan memesi bitkisi yerküre üzerinde en yaygın olarak yetişme ortamı bulunduğu sahalar genelde kuzey, güney ve güney doğu Avrupa, Anadolu ve Kuzey Afrika'dır. Tavşan memesi soğuk olan bölgelerde yetişmez çünkü soğuğa karşı dayanıklı değildir ve hemen hemen her mevsimde yetişir [134,144,145]. Türkiye' de bitki en çok Akdeniz, Karadeniz ve Marmara bölgesinde yetiştirilir (Şekil 1.4).



Şekil 1. 6: *R. aculeatus*' un illere göre yayılışı.

#### 1.8.4 Tür ile İlgili Biyolojik Aktivite Çalışmaları

Yapılan çalışmalarda *R. aculeatus*'un *S. aureus* üzerine yaptığı bakteriostatik etkinin antibiyotiklerin yaptığı etkiye benzer olduğu bulunmuştur. Tavşan memesi ekstraktından sentezlenen rutin hidrat ve p-coumaric asitin *E. coli*, *P. aeruginosa*, *S. typhimurium*, *E. cloacae*, *L. Monocytogenes* ve *B. cereus* üzerine etkisi streptomisin ve özellikle ampicilinden daha yüksek olarak belirlenmiştir.

Antifungal aktivite sonuçlarında (*Trichoderma viride*, *Penicillium funiculosum*, *Aspergillus fumigatus*, *Aspergillus niger* ve *Aspergillus versicolor*) tavşan memesi için MİK değerleri 0,25-2 mg/mL ve MFK değerleri ise 0,5-3 mg/mL arasında bulunmuştur. Tavşan memesi BuOH fraksiyonu herba ekstresi *T. viride* 'ye karşı en yüksek antifungal aktiviteyi göstermiştir [141]. *R. hypoglossum* ekstresi toprak üstü kısımları antioksidan aktiviteye sahip değilken *R. aculeatus* toprak üstü kısımlarının ekstresi antioksidan aktiviteye sahiptir. Son yıllarda yapılan çalışmalarda *R. aculeatus* yapraklarının metanol ekstresi düşük fenolik içeriği (32,9 mg GA/g DM) ve düşük antioksidan aktivite gösterdiği bulunmuştur [142].

### 1.8.5 Tür ile İlgili Doğal Boyama Çalışmaları

*R.aculeatus* bitkisinin kurutulan meyveleri idrar artırıcı kum dökücü iştah açıcı, ateş düşürücü, meyveleri kahve olarak kullanılır [146,147]. Ayrıca bitkinin kökünden siyah boya elde edilir [148].

Karadeniz ve Doğu Anadolu'da yol kenarları, çayırıklar ve meşe çalılıklarında yayılış gösterir. Yaprak ve çiçeklerinden sarı, yeşil ve kahve tonları köklerinden siyah renk elde edilir [148,149].

## 2. MATERİYAL VE METOT

### 2.1 Bitki Materyallerinin Hazırlanışı

*Punica granatum* ve *R. aculeatus* 2013 yılında Balıkesir’den toplandı. Bitkinin teşhisi Prof. Dr. Gülendım TÜMEN ve Prof. Dr. Fatih SATIL tarafından yapıldı. Tr rnekleri Balıkesir Üniversitesi Biyoloji bölümü herbaryumunda bulunmaktadır. Tablo 2.1’de bitkiye ait veri tablosu yer almaktadır.

**Tablo 2. 1:** Bitki Veri Tablosu.

Bitkinin adı	Toplandığı Yer	Tarih	Herbaryum numarası	Yükseklik(m)
<i>P.granatum</i>	Balıkesir-Merkez	04.02.2013	FS1566	117 m
<i>R.aculeatus</i>	Balıkesir-Havran	08.11.2013	FS1567	33 m



**Şekil 2. 1:** A) *P. granatum* L. B) *R. aculeatus* L.

## 2.2 Bitki Ekstrelerinin Hazırlanışı

Bitki örnekleri (nar kabukları ve tavşan memesi kökü) iyice kurutulduktan sonra belli bir miktar tartılarak yaklaşık 20 gün boyunca çözücü içinde bekletildi. Bekleme sürecinin ardından vakumlu döner buharlaştırıcı (rotary evaporator) cihazı kullanılarak ekstre alım işlemi gerçekleştirildi (Şekil 2.2). Cihazın sıcaklığı çözücülerin kaynama noktasına bağlı olarak ayarlandı. Elde edilen ekstrede kalan çözücünün uzaklaştırılarak konsantre hale gelmesini sağlamak için kahverengi şişeler içinde çeker ocakta 1 - 2 gün boyunca bekletildi. Konsantre hale gelmiş ekstrede 0.5 gr tartılarak 5 mL DMSO (dimetilsülfoksit) içerisinde çözülüp son konsantrasyonun 100 mg/mL olması sağlandı. Bu stoktan 2 mL alınıp 0.22 µL' lik membran filtreden geçirilerek steril stok çözelti elde edildi. Elde edilen stok çözelti hemen ya da daha sonra kullanılmak üzere - 20 °C' de buzdolabında saklandı. Bitki iyice kurutulduktan sonra belli bir miktar tartılarak yaklaşık 20 gün boyunca çözücü içinde bekletildi.



Şekil 2. 2: Döner buharlaştırıcı.

## 2.3 Kullanılan Mikroorganizmalar

Antibakteriyel aktivite için Gram (+) bakterilerden *Staphylococcus aureus* (ATTC6538P), *Bacillus cereus* (CCM 99) Metisiline dirençli *Staphylococcus aureus*(ATCC 33592) ve Gram (-) bakterilerden *Klebsiella pneumoniae* (CCM

2318), *Escherichia coli* (ATCC 11230), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853), *Proteus vulgaris* (ATCC 6897), *Shigella sonnei* (ATCC25931), *Salmonella typhimurium* (ATCC 14028) kullanıldı.

Bitki ekstraları antitüberküloz aktivitede *Mycobacterium tuberculosis*' in H<sub>37</sub>Ra (ATCC 25177) ve H<sub>37</sub>Rv (ATCC 27294) suşlarına ve iki hasta suşuna karşı denendi.

Antifungal aktivitede, filamentli funguslar olan *Aspergillus niger* van Tiegh (TA 47-3), *Aspergillus flavus* Link (TA 41-17), *Aspergillus ochraceus* K. Wilh. (MUCL 39534), *Fusarium proliferatum* (Matsushima) Nirenberg (TA 18-2) ve *Candida albicans* (ATCC 10239) kullanıldı. Tüm mikroorganizma stokları Balıkesir Üniversitesi, Fen – Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü 'nde saklanmaktadır.

***Staphylococcus aureus*:** *Staphylococcus* genusunda bulunan bakteriler Gram boyaması ile Gram pozitif kok görünümündedir. Tekli, ikili, dörtdü hücreler halinde bulunabilirler, üç veya dört hücreden oluşan kısa zincirler yapabilirler ve düzensiz üzüm salkımı (Staphylo: Üzüm salkımı, Coccus: tanesi) benzeri şekiller oluştururlar. 0,8 – 1 µm büyüklükte, hareketsiz, spor oluşturmeyen, çoğunlukla katalaz pozitif, oksidaz negatif, kapsülsüz olup, fakültatif anaeropturlar. Nozokomiyal (hastane infeksiyonu) etkenidir. İnsan cilt florasında kommensal olarak da bulunur [150,151].

**Metisiline dirençli *Staphylococcus aureus*:** Metisiline dirençli *S. aureus* (MRSA), hafif cilt infeksiyonlarından, ciddi yara infeksiyonlarına ve bakteriyemiye kadar değişen genişlikte klinik tabloya neden olabilen, Stafilokokların patojen, humano ve zoonoz karaktere sahip bir tipidir [152]. MRSA'nın öncelikli yerleşim alanı insanlarda burun mukozası, hayvanlarda deri ve burun mukozası olarak bilinmektedir [153,154,155]. MRSA, tüm penisilinlere, sefalosporinlere, beta-laktamaz inhibitör kombinasyonlarına ve karbapenemlere antibiyotik duyarlılık testlerinde duyarlı bulunsa da in vivo uygulamada dirençli olan, hatta sıklıkla makrolid, aminoglikozit ve tetrasiklin direnci de göstermesi nedeniyle tedavi seçeneklerini son derece kısıtlayan bir *S. aureus* suşudur [156,157].

***Klebsiella pneumoniae*:** Kısa uçları yuvarlak, spor oluşturmeyen, hareketsiz bir bakteridir. 1 – 2 µm boyunda ve 0.5 – 0.8 µm enindedir. Etrafında polisakkarit

yapıda geniş bir kapsül bulunur. Gram negatif olup bakteriyolojik boyalarla iyi boyanırlar. Son yıllarda *K. Pneumoniae* nazokomiyal enfeksiyonlarda önemli bir patojen olmuştur. Normal flora olarak, ağız, deri ve bağırsakta olmasına rağmen, aspire edilmesi durumunda, akciğerde yıkıcı hasarlara neden olmaktadır [158,159].

***Escherichia coli:*** *E. coli*, diğer Enterobacteriaceae ailesindeki bakteriler gibi, gram negatif çomak şeklinde sporsuz bir bakteridir. Kapsül oluşturma nadirdir. Buna karşılık birçok suş polisakkarit yapısında M antijeni içeren bir mikrokapsül veya yine polisakkarit yapısında K antijenlerini içeren slime tabaka içerebilir [160]. Peptonlu su, buyyon ve jeloz gibi zenginleştirilmemiş besiyerlerinde fakültatif anaerob olarak ürerler. Optimal üreme 37 °C' de, nötral pH varlığında olur. İnsanın bir günde dışkı yoluyla vücudundan geçen *E. coli* bakteri sayısı 100 milyar ila 10 trilyon arasındadır [161]. Bazı *E. coli* tipleri içinde buldukları hayvan için zararsız olmalarına rağmen insana geçtiklerinde hastalık yapabilirler. Bu hastalıklar arasında başlıca ishalleri hastalıklar olmakla beraber idrar yolu enfeksiyonları, menenjit, peritonit, mastit, septisemi ve gram-negatif pnömoni de sayılabilir. *E. coli* 'nin, tavuk, dana ve başka hayvanlarda da hastalık yapabildiği gösterilmiştir.

***Pseudomonas aeruginosa:*** Gram negatif, 1.5 – 3 µm boyunda, 0.5 µm eninde, sporsuz veya kapsülsüz basil veya kokobasil şeklindedir. Polar flagellası ile hareketlidir. Zorunlu aéroptur, optimum 37 °C' de ürer ancak 42 °C' de üreyebilirler. İzolasyonları oldukça basit olup, adi besiyerlerde üreyebilirler [162,163]. *P. aeruginosa* özellikle, bağışıklık yetersizliği olan hastalarda solunum ve idrar yollarının, yanıkların ve açık yaraların fırsatçı patojenidir aynı zamanda kanda da enfeksiyonlar yapabilir. Nozokomial (hastane kaynaklı) enfeksiyonların onda biri *P. aeruginosa* sebebiyledir.

***Proteus vulgaris:*** Enterobacteriaceae familyasında yer alan *Proteus* bakterileri Gram negatif, 1 – 3 x 0.4 – 0.6 mikron boyutlarında, bazen daha uzun ya da kokobasil görünümünde, sporsuz ve kapsülsüz bakterilerdir. Toprakta, suda ve dışkıyla kontamine materyallerde bulunurlar [164].

***Bacillus cereus:*** Bacillaceae familyasına ait bir bakteri olan *Bacillus cereus* toprak ve bitki örtüsü üzerinde yaygın bir şekilde bulunmaktadır. 1 – 1.2 µm ile 3.0 – 5.0 µm arasında hücre boyutuna sahiptir. Genellikle 30 °C civarında optimum

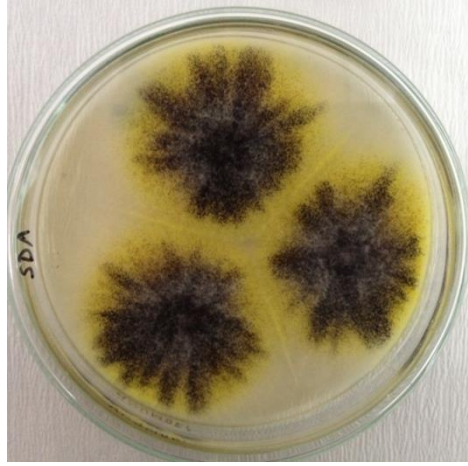


gelişme gösterir. Santral veya subterminal yapıda, elipsoidal sporlara sahip olan bakteri, peritrik flagellaları sayesinde hareketli ve aerobiktir [165].

***Shigella sonnei***: Gram-negatif, hareketsiz, spor oluşturmeyen, çubuk şekilli bir bakteri cinsidir. *Escherichia coli* ve *Salmonella* ile yakından ilişkilidir. Şigelloz hastalığının etmeni olan *Shigella*, diğer primatlarda da hastalık yapar ama diğer memelilere etki etmez [166].

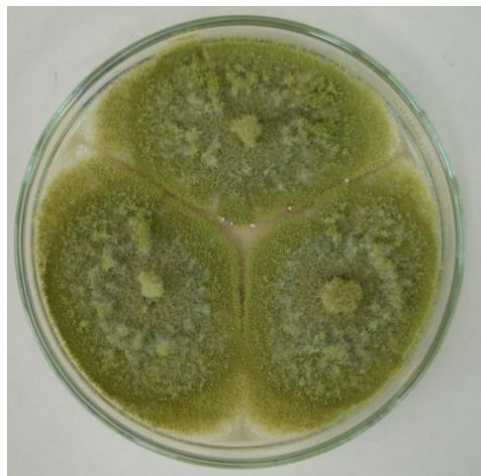
***Salmonella typhimurium*** : *Salmonella* Gram-negatif bir bakteridir. Klinik laboratuvarında genelde MacConkey agar, XLD agar, XLT agar, DCA agar, veya Önöz agar ile izole edilir. Bağırsak enfeksiyonuna neden oldukları ve sağlıklı bağırsakta bulunan diğer bakteriler çok daha fazla sayıda olduğu için, ilk izolasyonunda seçici (selektif) bir ortam kullanılması gerekir. Kan agarında 2-3 mm çaplı, nemli koloniler oluştururlar. Hücreler uzun süre 25-28 °C aralığında büyütüldükleri zaman bazı türler bir biyofilm oluştururlar, bu biyofilm karmaşık karbonhidratlar, selüloz ve proteinlerden oluşur [167].

***Aspergillus niger* van Tiegh**: Czapek Dox Agar besiyerinde koloniler yavaş gelişir ve 10 – 15 günde oda sıcaklığında 2.5 – 3.0 cm çapına ulaşmaktadır. Oldukça gevşek kompakt beyaz-hafif sarı bazal miselyum ve bol miktarda dik ve genellikle yığınlar halinde toplanmış konidi yapıları vardır. Tipik olarak karbon siyahına yakın renkte veya bazen koyu kahverengimsi siyah renktedir ve koloni yüzeyini dar bir kenar hariç tamamen kaplamaktadır (Şekil 2.3). Koloni altı genellikle renksiz, bazen merkezde soluk sarıdır. Konidi başları tipik olarak büyük ve siyah, önce globoz, daha sonra radyat veya yaşlandığında iki veya daha fazla gevşek – iyi belirlenmiş sütun halinde yarılmaktadır. Konidiyoforlar değişken uzunlukta, çeper düz, nispeten kalın, renksiz ve özellikle üst kısımda kahverengimsi tonlarda, vesiküller globoz veya globoza yakındır. Sterigmalar iki seri halindedir [168].



**Şekil 2. 3:** *A. niger'* in SDA besiyerinde 3 nokta ekimi.

***Aspergillus flavus* Link:** Czapek Dox Agar besiyerinde koloniler değişik şekillerde gelişmekte, 10 günde oda sıcaklığında hızla gelişerek 6 – 7 cm çapına ulaşmaktadır. Genellikle ince fakat sıkı yapılı bir misel keçesi oluşturmakta, çoğunlukla düz ancak bazı ırklarında ise radial olarak oluklu ya da beyin kıvrımlıdır. Çoğu ırklarında bol miktarda konidi yapıları gelişir. Genç konidi başları genellikle sarı tonlardadır fakat hızlı bir biçimde parlak koyu sarı – yeşil tonlara kaymakta ve sonunda koyu üzüm yeşili olmaktadır (Şekil 2.4). Koloni altı genellikle renksiz - pembemsi esmer renkte, fazla sklerosyum yapan ırklarda koyu kırmızı – kahverengidir. Kondiyoforlar kalın çepirli, renksiz, kaba şekilde pürüzlü genellikle 1 mm kısıdır [169].



**Şekil 2. 4:** *A. flavus'* un SDA besiyerinde 3 nokta ekimi.

***Aspergillus ochraceus* K. Wilh.:** Czapek Dox Agar besiyerinde koloniler sınırlı gelişerek 10 – 14 günde oda sıcaklığında 3 – 4 cm çapına ulaşmaktadır. Genellikle düz veya hafif oluklu, sıkı bir misel keçesi oluşturur. Koloniye karakteristik görünümünü veren açık okr – deve tüyü, bazı ırklarda daha açık ve sarı-okr renklerinde ve bol miktarda konidi yapıları geliştirir (Şekil 2.5). Koloni altı sarımsı – yeşilimsi kahverengi veya kırmızımsı mor tonlardadır [168].



**Şekil 2. 5:** *A. ochraceus*' un SDA besiyerinde 3 nokta ekimi.

***Fusarium proliferatum* (Matsushima) Nirenberg :** Patates Dekstroz Agar ve Patates Sukroz Agar besiyerinde oda sıcaklığında 4 günde 3.5 – 5.5 cm büyüklüğüne ulaşır. Havai miselleri yünsü yapıda, beyaz, soluk pembe veya grimsi menekşe rengindedir (Şekil 2.6). Konidiyoforları başlangıçta dallanmamıştır, daha sonra dallanır. Beauvericin, fumonissin, fusarin C, fusoproliferin, fusapiron, moniliformin ve naftokinon pigmentleri gibi toksik metabolitleri üretir. Orkide, incir, pirinç, mısır ve diğer tahıllardan izole edilebilir. Yiyeceklerde çürümelere ve yapraklarda beneklenmelere neden olur [169].



**Şekil 2. 6:** *F. proliferatum*' un SDA besiyerinde 3 nokta ekimi.

***Mycobacterium tuberculosis*:** *M. tuberculosis*, 0.2 – 0.5 µm eninde, 1 – 4 µm boyundadır. Tek tek küçük zincirler veya küçük demetler halinde bulunur. Kültürden hazırlanan preparatlarda kokoid veya filamentöz biçimlerde görülebilirler [170, 171]. Asit ve alkole dirençli, ince görümlü, granüler bir morfolojiye sahiptir. Optimum üreme sıcaklığı 37 °C' dir. Klinik örneklerden ilk izolasyonlarında üreyebilmesi için zenginleştirilmiş ortamlar gereklidir. Büyüme ve gelişimi için % 5 – 10 CO<sub>2</sub> içeren atmosfer koşulları uygundur. Yavaş ürer ve jenerasyonunu yaklaşık 15 saatte tamamlar. Bakteri, nonmikobakteriyel kontaminantların üremesini engelleyen malaşit yeşili katılmış % 60 homojenize yumurta içeren Löwenstein-Jensen besiyerinde 3 – 6 haftalık inkübasyonda ürer. Kolonileri deve tüyü renginde karnıbahar görümlüdür. Yüksek lipit içerikleri nedeniyle besiyeri yüzeyine sıkıca tutunurlar [171]. *M. tuberculosis* ısıya, güneş ışığına ve UV ışığına oldukça duyarlıdır. 60 °C' de 20 dakikada, 70 °C' de 5 dakikada ölür fakat kuruluğa karşı dirençlidir [172].

## **2.4 Kullanılan Besiyerleri**

### **2.4.1 Antifungal ve Antibakteriyel Aktivitede Kullanılan Besiyerleri**

Agar içeren besiyerleri petri ve tüpte olmak üzere 2 tipte hazırlandı. Kaynatma işleminden sonra petride besiyeri hazırlamak için öncelikle 20 dakika 121

°C’ de sterilizasyon işlemi yapıldı ve beg alevi yanında besiyeri 10 mL olacak şekilde petri plaklarına paylaştırıldı. Tüplerde yatık agar hazırlamak için ise besiyeri tüplere 6 mL olacak şekilde paylaştırıldıktan sonra otoklavlanma işlemi gerçekleştirildi. Sterilizasyon işleminden sonra tüpler yatık olarak yerleştirilerek donması sağlandı. Petri ve yatık besiyerleri daha sonra kullanılmak üzere + 4 °C’ de buzdolabında saklandı. Broth besiyerleri kaynatılma işleminden sonra tüplere paylaştırılarak 1.5 atm basınç altında 20 dakika 121 °C’ de steril edildi. Daha sonra kullanılmak üzere + 4 °C’ de buzdolabında saklandı.

#### **Fluka Nütrient agar (pH 6.8±0.2)**

Et ekstraktı.....	3.0 g
Pepton .....	5.0 g
Agar .....	15.0 g
Distile su.....	1000 mL

Antibakteriyel aktivite çalışmalarında ve yatık agarda kültüre alma işlemlerinde kullanılmıştır.

#### **Difco™ Nütrient Broth (pH 6.8±0.2)**

Pancreatic Digest of Gelatin .....	5.0 g
Et ekstraktı .....	3.0 g
Distile su.....	1000 mL

Antibakteriyel aktivite çalışmalarında kullanıldı.

#### **Oxoid Sabouraud dekstroz agar (pH 5.6±0.2)**

Pepton .....	10 gr
Glukoz .....	40 gr
Agar.....	15 gr

Distile su..... 1000 mL

Antifungal aktivite çalışmalarında kullanıldı.

### **Merck Sabouraud dekstroz Broth (pH 5.6±0.2)**

Dekstroz ..... 20 gr

Pancreatic digest of casein ..... 5 gr

Peptic digest of animal tissue ..... 5 gr

Distile su..... 1000 mL

Antifungal aktivitede MİK değerinin belirlenmesinde kullanıldı.

### **Merck Malt ekstrakt agar (pH 7.6±0.2)**

Malt ekstraktı ..... 30 gr

Pepton ..... 3 gr

Agar ..... 15 gr

Distile su..... 1000 mL

Antifungal aktivite çalışmalarında ve yatık agarda fungusların kültüre alınmasında kullanıldı.

## **2.4.2 Antitüberküloz Aktivitede Kullanılan Besiyerleri**

### **2.4.2.1 Middlebrook 7H9 Broth Base (pH 6.6 ± 0.2)**

Antitüberküloz aktivitede *Mycobacterium tuberculosis* kültürü ve pasajı için kullanılan özel besiyeridir. MGIT tüplerin dip kısmına gömülü olan silikon içerisinde oksijene duyarlı floresans sensörleri yer alır. Ortamda bakteri üremeden önce bulunan oksijen varlığı floresansı görmemizi engeller. Ancak bakteri üredikten

sonra ortamdaki oksijenin azalması nedeniyle UV ışığında (Wood'un lambası) 365 nm' de floresansın gözlemlenmesine olanak tanır. Böylelikle üremenin olup olmadığı kontrol edilir. Middlebrook 7H9 Broth Base antitüberküloz aktivitede kullanılan suşların pasajlanması ve aktivite tayininde kullanıldı.

Amonyum sülfat .....	0.5 g
L-Glutamik asit .....	0.5 g
Sodyum sitrat .....	0.1 g
Piridoksin .....	1.0 mg
Biotin.....	0.5 mg
Disodyum fosfat.....	2.5 g
Monopotasyum fosfat.....	1.0 g
Ferrik amonyum sülfat.....	0.04 g
Magnezyum sülfat.....	0.05 g
Kalsiyum klorür .....	0.5 mg
Çinko sülfat.....	1.0 mg
Bakır sülfat.....	1.0 mg
OADC.....	100,0 mL
Distile su.....	900 mL

#### **2.4.2.2 Middlebrook 7H10 Agar Base (pH 6.6 ± 0.2)**

Middlebrook 7H10 Agar, mikobakteri türlerinin gelişimini destekleyen gerekli besinleri sağlamak için oleik asit-albümin ile zenginleştirilmiş, gliserol, dekstroz ve inorganik bileşikleri içeren tanımlanmış bir besiyeridir. Katalaz,

besiyerinde bulunma ihtimali olan zehirli peroksitleri parçalar. Malakit yeşili kontamine edici bakterilerin kısmi inhibisyonunu sağlamak için inhibitör ajan olarak rol alır. Daha basit kimyasal formülasyonu sebebiyle, mikobakteriyel türlerin gelişimi için yaygın olarak kullanılan yumurta bazlı besiyerinden daha az kontaminant gelişimi riski taşır [173].

Magnezyum sülfat.....	0.05 g
Ferrik amonyum sülfat.....	0.04 g
Sodyum sitrat .....	0.4 g
Amonyum sülfat .....	0.5 g
Monosodyum Glutamat .....	0,5 g
Disodyum fosfat.....	1.5 g
Monopotasyum fosfat.....	1.5 g
Piridoksin .....	1.0 mg
Çinko sülfat.....	1.0 mg
Bakır sülfat.....	1.0 mg
Biotin.....	0.5 mg
Kalsiyum klorür .....	0.5 mg
Malakit Yeşili .....	0.25 mg
Agar .....	13.5 g
Gliserol .....	5.0 mL
OADC.....	100.0 mL



Besiyerlerini zenginleştirici olarak kullanılan OADC' nin içeriği şe  
şekildedir:

Polioksietilen stearat (POES) .....	8.5 g
Bovin albümin .....	50.0 g
Dekstroz .....	20.0 g
Katalaz.....	0.03 g
Oleik Asit .....	0.1 g

Besiyerlerinde oluşabilecek kontaminasyonları önlemek amacıyla PANTA  
antibiyotik karışımı kullanıldı. Liyofilize PANTA şişesi için yaklaşık formül:

Polimiksin B .....	6.000 ünite
Trimethoprim .....	600 µg
Amfoterisin B .....	600 µg
Azlosilin .....	600 µg
Nalidiksik asit .....	2.400 µg

## **2.5 Kullanılan Antibiyotikler**

Bitkilere ait etanol ekstralarının antifungal ve antibakteriyel aktivite sonuçları  
standart antibiyotik sonuçlarıyla karşılaştırıldı. Funguslar için standart antibiyotik  
olarak Fluka marka Amfoterisin B, bakteriler için ticari olarak satılan ve sefalosporin  
grubu bir antibiyotik olan İespor IM 1 gr flakon kullanıldı. Tüberküloz bakterileri  
için; Ethambutol, Streptomisin, İsoniazid ve Rifampicin kullanıldı.

## 2.6 Serum Fizyolojik Hazırlanışı

9 gr NaCl, 1 litre distile suda çözülerek hazırlandı. Tüplere paylaştırılarak otoklavda 20 dakika 121 °C’ de steril edildi. İnokulum süspansiyonunun hazırlanmasında kullanıldı.

## 2.7 İnokulum Süspansiyonunun Hazırlanışı

Antibakteriyel aktivitede bakteri süspansiyonları serum fizyolojik ile MacFarland 0.5 standardına göre hazırlandı. Aynı zamanda spektrofotometre ile 600 nm’ de 0.5 absorbans değeri okunarak doğruluğu teyit edildi. Antifungal aktivitede ise fungus inokulumu 450 nm’ de 0.6 absorbans değeri okunarak ayarlandı.

Antitüberküloz aktivite için Becton ve Dickinson üretici firmasının tavsiyelerine uyularak inokulum, BACTEC MGIT pozitif tüplerden prosedüre göre hazırlandı. Sıvı kültürden inokulum hazırlanırken BACTEC MGIT tüplerinin okunup pozitif çıkmasından sonraki gün, 1. gün olarak kabul edildi. Gün 1 ve gün 2 inokulum olarak kullanılabilirken 3, 4 ve 5. günlerde, kültürlerden 1 mL alınıp 4 mL serum fizyolojik ile sulandırılarak inokulum süspansiyonu hazırlandı.

## 2.8 Ledanitrotetrazolium violet (INT);2-(4-Iodophenyl)-3- (4-nitrophenyl)-5-phenyl-2H-tetrazolium klorür Çözeltisinin Hazırlanması

Bakteri ve fungus üremesinin kontrol edilmesinde Fluka marka Ledanitrotetrazolium violet üreme indikatörü kullanıldı. 0.04 gr Ledanitrotetrazolium violet tartılıp 10 mL steril distile su içerisinde çözülerek hazırlandı. Stoğun kontamine olmaması için 2 ml’ lik ependorf tüplerine aktarılarak çalışıldı. Çözelti + 4 °C’ de ışık almayan ortamda saklandı.

## 2.9 Antibakteriyel ve Antifungal Aktivite

### 2.9.1 Disk Diffüzyon Testleri

#### 2.9.1.1 Bakteriler için Disk Diffüzyon Yöntemi:

Kalitatif antibakteriyel aktivite testleri Mueller Hinton Agar (MHA, Difco) kullanılarak agar dilüsyon yöntemi (Kirby-Bauer) ile yapıldı. Bunun için aktivitesi belirlenecek maddenin belirli bir konsantrasyon serisi oluşturuldu ve bunlar steril kağıt disklerle emdirilerek daha önce bakteri ekilmiş olan petrilerin yüzeyine bitki ekstraları emdirilmiş diskler hafifçe bastırılarak aralarında 2 cm kalacak şekilde yerleştirildi. Bu şekilde hazırlanan petri kutuları 4°C’de 2 saat bekletildikten sonra bakteri aşılama plaklar 37±0.1°C’de 24 saat, maya aşılama plaklar 25±0.1°C’de 48 saat inkübe edildi. Süre sonunda besiyeri üzerinde oluşan inhibisyon zonları mm olarak değerlendirilerek ve standart antibiyotik diskleri ile karşılaştırılmıştır.

Bitkilere ait etanol ekstralarının antifungal ve antibakteriyel aktivite sonuçları standart antibiyotik sonuçlarıyla karşılaştırmak için disk difüzyon yönteminde bakteriler için Sulfametaxozole trimetoprim (SXT-25 µg) ve Piperacillin tazobactam (TZP-110 µg) antibiyotikleri kullanıldı. İnkübasyon sonunda oluşan zon çaplarından aktivite gösteren bileşiklerin kalitatif testleri aşağıdaki gibi yapıldı [174].

$$\%I = (Dc - Ds)/Dc * 100$$

% I= inhibisyon; Dc = Kontrol disk zonu; Ds = Örnek disk zonu

#### 2.9.1.2 Funguslar için Disk Diffüzyon Yöntemi:

Antifungal aktivite kalitatif testlerinde standart suşlar kullanılarak Sabouraud Dextroz Agarda disk difüzyon yöntemi kullanılarak yapıldı. Hesaplama yukarıda belirtildiği gibi yapıldı. Kontrol amaçlı kullanılacak disklerde standart olarak Amphotericin-B kullanıldı [175].

### **2.9.2 Minimum İnhibisyon Konsantrasyonunu Belirleme (MİK)**

Bakteriler, yatık Nutrient agarda 24 saat 37 °C 'de, funguslar ise yatık Malt agarda 72 – 96 saat süreyle 28 °C' de inkübasyona tabii tutularak yetiştirildiler. Taze kültürlerle inokulum süspansiyonu hazırlandı ve her bir mikroorganizma için well-plate üzerinde üç seri olarak çalışıldı. Besiyeri olarak küfler için Sabouraud Dekstroz Broth, bakteriler için Nutrient Broth kullanıldı. İlk kuyucuk hariç diğer bütün kuyucuklara 100 µl besiyeri konulduktan sonra birinci kuyucuğa 150 µl besiyeri ve 50 µl ekstre konuldu ve 10. kuyucuğa kadar bir önceki kuyucuktan 100 µl ekstre çözeltisi alınarak üç sıra seri şekilde seyreltme işlemi yapıldı. Seyreltme işlemi bittiğinde kuyucuklardaki son ekstre konsantrasyonu 25 mg/mL 'den 0.05 mg/mL' e arasında olacak şekilde hazırlanmış oldu. Seyreltme işleminden sonra negatif kontrol hariç bütün kuyucuklara 20 µl inokulum süspansiyonu aşılandı. İçerisinde bitki ekstresi, besiyeri ve inokulum süspansiyonu bulunan 96 - well plate'ler, bakteriler için 37 °C' de 24 saat, funguslar için ise 28 °C' de 72 – 96 saat inkübasyona tabi tutuldu. İnkübasyon süresinden sonra, üremenin gerçekleştiği konsantrasyondan yüksek olan bir önceki konsantrasyon MİK değeri olarak alındı [176,177].

MİK değerini saptamada Tetrazolium violet , üreme indikatörü olarak kullanıldı. Bu amaçla well plate çukurlarına 15 µL Ledanitrotetrazolium violet çözeltisi konuldu ve 3 – 4 saat etüvde 37 °C' de bekletildi. Bekleme sonrasında üremenin olduğu çukurcuklar mor renge boyandı. Boyanmanın görüldüğü ilk çukurcuktan bir önceki çukurcukta bulunan ekstre konsantrasyonu MİK değeri olarak alındı. Böylece minimum inhibisyon konsantrasyonu tespit edildi.

### **2.9.3 Minimum Bakterisit ve Fungisit Konsantrasyonunu Belirleme (MBK ve MFK)**

MİK değeri mikroorganizmaların statik aktivitesini yani mikroorganizmaların üremesini durduran konsantrasyon değerini belirtirken, bakterisit ve fungusit terimleri mikroorganizmaları öldüren konsantrasyon değeri olarak ifade edilir.

Bu yöntemde üremenin olmadığı well plate çukurcuklarından 20 µl alınarak funguslar için Sabouraud Dekstroz Agar, bakteriler için ise Nutrient Agar içeren petri

plakların üzerine ekim yapıldı. Yukarıda belirtilen koşullarda inkübasyona tabi tutulduktan sonra üremenin gerçekleşmediği konsantrasyon değeri bakterilerde MBK funguslarda MFK değeri olarak bulundu [176].

## 2.10 Antitüberküloz (Antimikobakteriyel) Aktivite

Bu yöntemde, MGIT (Becton Dickinson) içerisinde modifiye edilmiş 7 ml Middlebrook 7H9 Broth Base kullanıldı. Besiyeri içerisine 15 mL OADC (oleik asit, albumin, dekstroz, katalaz) ile sulandırılmış PANTA antibiyotiğinden 800 µL eklendi. 96 well-plate'lerin ilk kuyucuğuna 150 µL, diğer kuyucuklara 100 µL besiyeri konuldu. Ekstreden ilk kuyucuğa ,50 µL konularak konsantrasyonun 25 mg/mL olması sağlandı; seri dilüsyonlarla kuyucukların konsantrasyonları 25-0.05 mg/mL olarak hazırlandı. Ekstreler *Mycobacterium tuberculosis* H<sub>37</sub>Ra (ATCC 25177) ve H<sub>37</sub>Rv (ATCC 27294) suşlarına ve iki tane hasta suşuna karşı test edildi. İnokulumdan negatif kontrol hariç her kuyucuğa 20 µL ekildi. 3 seri olarak çalışıldı ve 37 °C' de 6 gün boyunca inkübasyona bırakıldı[178].

MİK sonuçlarını belirlemek için “Presto Blue” büyüme indikatöründen her bir çukurcuğa 15 µL konularak bir gün boyunca inkübasyona tabi tutuldu. Bu süreçten sonra üreme olmayan çukurcuklar mavi renkte kalırken, üremenin gerçekleştiği çukurcuklar pembe rengini aldı.

Bakteri ve funguslarda olduğu gibi üremenin olduğu çukurcuktan bir önceki çukur konsantrasyonu MİK değeri olarak belirlendi. Üremenin gerçekleşmediği çukurlardan 20 µL alınarak 80 µL taze besiyeri içeren çukurlara alındı ve tekrar inkübasyona bırakıldı. MBK değeri, üremenin gerçekleşmediği konsantrasyon değeri olarak tespit edildi.

## **2.11 Kumaşların Bitki Özüleri ile Boyanması**

### **2.11.1 Boyama İşlemi:**

Boyama işleminde kullanılacak tekstil materyali % 100 yün ve pamuklu dokuma kumaş olup belirli miktarlarda tartılarak kullanıldı. Flotte oranı ise 1:10'dur. Uygulama yöntemi olarak oda sıcaklığında kumaş, boya çözeltisi ve mordan birlikte numune boyama makinesine yerleştirilerek boyama işlemine başlandıktan sonra belirli bir sürede 90 °C ye çıkılıp sonra bu boyama sıcaklığında 60 dakika boyama işlemi yapıldı. Boyama işlemi bittikten sonra bol soğuk su ile taşmalı yıkama yapıp sonrasında kurutma işlemi yapılarak işlem tamamlandı. Aynı işlem farklı mordan maddeleri(şap, demir sülfat, tartarik asit ve bakır sülfat) ile yapıldı [179].

## **2.12 Kumaş Örneklerinin Antibakteriyal Aktivitesinin Belirlenmesi**

Mikroorganizmaların tekstil materyali üzerinde gelişerek üreyebildikleri uzun yıllardan beri bilinmektedir. Bakteri, mantar, küf gibi en önemli mikroorganizmalar, insan vücuduyla temas halinde bulunan bütün tekstil mamullerinde, sıcaklık ve nemin varlığında etkili ve hızlı bir biçimde çoğalmaları için ideal koşulları bulmaktadırlar. Özellikle hastanelerde ve okullarda, insanların sağlığı ve rahatı için çevreyi mikroorganizmaların neden olabileceği tehlikelere karşı kontrol altına almanın gereksinimi ortaya çıkmıştır. Bundan başka bütün giysiler ve ev tekstilleri, örneğin çoraplar, spor giysileri, çalışma elbiseleri, yatak takımları, yer kaplamaları gibi normal günlük kullanımda hijyenik problemlerle karşı karşıyadır. Bu nedenlerden dolayı, antimikrobiyal uygulamalara gerek duyulmuştur.

Antimikrobiyal korumalı ürünlere karşı artan talep kullanılan antimikrobiyal maddenin güvenliği hakkında sorular sorulmasına neden olmuştur. Dünya üzerinde mikroorganizmaları öldüren yüzlerce, hatta binlerce kimyasal bulunmaktadır. Bunlardan birçoğu arsenik, kurşun, kalay, civa, gümüş, bitki ekstraktı ve hayvansal ekstraktlar gibi doğal maddelerdir, fakat çoğu uygulamada insan ve çevreye karşı toksik olabilmektedirler. Bunun için tekstil endüstrisinde kullanılacak bir

antimikrobiyal madde sadece mikroorganizmaları öldürmekle kalmamalı, aynı zamanda insan ve çevre bakımından güvenli olmalı, tekstil materyallerinin diğer özelliklerini negatif yönde etkilememelidir [180].

### 2.12.1 Paralel Çizgi Yöntemi (AATCC 147-2011)

İşlenmiş tekstil materyallerinde difüzlenebilen antimikrobiyal ajanların antibakteriyal aktivitesinin belirlenmesinde kullanılan kalitatif bir standart (AATCC 147-2011) metottur. AATCC 147 standardı diğer antimikrobiyal etkinlik belirleme testlerine göre daha kolay ve hızlı uygulanabilen, nitel bir yöntemdir. Bu test metodunda tekstil numuneleri ile kimyasal bağ yapmayan antimikrobiyal ajanın varlığı araştırılmaktadır. Bu metotla ayrıca kumaşlara uygulanan antibakteriyel maddenin yıkama işlemi ile uzaklaşıp uzaklaşmayacağı da belirlenebilmektedir. Bu çalışmada *Staphylococcus aureus* ve *Klebsiella pneumoniae* bakterileri kullanılmıştır. Uygun olan besiyerleri nütrient agar/broth, tripton soy agar/broth, brain-heart infüzyon broth/agar ve müller hinton agar/brothtur. Kumaş örnekleri 25x50mm olarak kesildi. Hazırlanan inokulumla agar yüzeyine 60 mm uzunluğunda 5 çizgi çizildi. Kumaş örneği, 5 çizgiyi ortalayacak şekilde yerleştirildi. Petriler 37 C’de 18-24 saat inkübe edildi.

Numune kumaşın altında ve etrafında oluşan inhibisyon bölgesinin genişliği antimikrobiyal etkinliğin büyüklüğünü göstermektedir. Antimikrobiyal özellik kazandırılmış numune kumaş çevresinde ve altında bakteri kolonilerinin gözlemlenmemesi beklenir. Fakat antimikrobiyal ajan numune kumaş ile kimyasal bağ yapmışsa numunenin sadece altında organizma gelişmesi gözlenmez. Numune kumaşa bağlı olarak etkinlik gösterebilen antimikrobiyal ajanlar kumaş etrafına yayılamayacağı için numunenin etrafında mikroorganizmaların çoğalmaya devam etmesi beklenir.

İnkübasyondan sonra, kumaşların kenarlarındaki temiz üreme alanları ölçüldü. Test örneğinin her iki tarafındaki zon çapları ölçülerek ortalama alındı ve sonuçlar elde edildi. Eğer zon varlığı tespit edilmemiş ise kumaş pensetle kaldırılarak altında bakteriyel kolonizasyonun olup olmadığına bakılarak değerlendirme yapıldı.

Ancak bu test yöntemi, kumaşın bakterilere karşı hangi miktarda etkili olduğunu göstermekte yetersizdir. Sonuçta öncelikle AATCC 147 uygulanıp, antibakteriyel aktivitenin varlığı nitel olarak tespit edildikten sonra, antibakteriyel aktivitenin hangi oranda etkin olduğunu belirlemek için AATCC 100 test metodunu uygulamak gerekmektedir [181].

### **2.12.2 Miktersal Test Standardı ; Tekstilde Bitirme İşlemi (AATCC-100)**

Tekstil yüzeylerindeki antibakteriyellik oranını ortaya çıkarmak için uygulanan, AATCC 147 metodu ile elde edilemeyen nicel sonuçlara bu metot ile ulaşılmaktadır. Kantitatif değerlendirme tekstil ürünlerinde kullanılan antibakteriyel maddenin, bakteriler üzerinde etkili olup olmadığı hakkında önemli bilgiler vermektedir. Test numunesi ile beraber, işlem görmemiş numune ve antimikrobiyal aktivitesinden emin olunan bir kontrol numunesi beraber çalışılmalıdır. Bu çalışmada *Staphylococcus aureus* ve *Klebsiella pneumoniae* bakterileri kullanıldı. Uygun olan besiyerleri nütrient, tripton soy ya da brain-heart infüzyon agar/brothtur. Kumaş örnekleri 4,8 ±0,1 cm dairesel kumaş örnekleri kesildi. Sterilizasyon için kullanılacak metot kullanılan kumaş tipine ve lif yapısına göre değişir. Pamuklu örnekler, asetatlı ve fabrikasyon ürünleri otoklavda steril edildi. AATCC 100 standart testi için hazırlanan numune kumaşlar numune içeriğinde 10<sup>6</sup> cfu/ml yoğunlukta mikroorganizma bulunan 1 ml çözelti ile ıslatıldı. Vida kapaklı tüpler içinde gerçekleştirilen kumaş- organizma temas süresi deney planında belirlenen süre kadar devam ettirildi (Bu çalışmada 6 saat ve 18 saatlik temas sürelerinde çalışılmıştır) [182].

Vida kapaklı tüpten çıkarılan kumaş numunesi daha sonra sıvı besiyerinin (Müler-Hintton sıvı besiyerine) içine atılarak, vorteks ile iyice karıştırıldı. Kumaş numunesi yüzeyine kolonize olmuş mikro-organizmalar bu sayede sıvı besiyerine geçiş yapması sağlandı. Bu besiyeri içindeki canlı organizmaları sayabilmek için azaltma yöntemindeki gibi çözelti belli dilüsyonlara (1/1, 1/10, 1/100, 1/1 000, 1/10 000 kadar) seyreltilerek katı besiyeri üzerine ekim yapıldı. Bu işlemin amacı bakteri sayısını sayılabilecek düzeye indirmektir. Ekim yapılan tüm petripler 37 °C' de 24



saat etüvde bekletildi. İlgili dilüsyonlardaki üreme miktarları üreyen koloni sayısının dilüsyon oranı ile çarpılması sonucu elde edildi [183].

### **2.12.3 Tekstil Materyallerinde Antibakteriyal Aktivitenin Belirlenmesi- Agar Difüzyon Testi (ISO 20645)**

Çalışmada kullanılan 4 °C’de muhafaza edilen test bakterileri (*S.aureus* ve *K.pneumoniae*) Nutrient Broth’a aşılansak 37 °C de 24 saat inkübe edilerek aktive edildi. Daha sonra deney tüplerinde sterilize edilen ve 45-50 °C ye kadar soğutulan Müeller Hinton Agar, yukarıda belirtildiği şekilde hazırlanan bakteri suşlarının 24 saatlik (0.1 ml de 10<sup>8</sup> adet) ve 48 saatlik kültürü ile aşılansak (Bakteriler için 10<sup>8</sup> kob/ml); Vortex tüp karıştırıcıda iyice çalkalandıktan sonra 9.0 cm çapındaki steril petri kutularına 15'er ml dağıtıldı ve besiyerinin homojen bir şekilde petri içinde dağılması sağlandı [184,185].

Katılaşılan agar üzerine uygun aralıklarla kumaş örnekleri yerleştirildi ve bakteri aşılansak plaklar 37 °C de 24 saat süre ile inkübe edildi. Süre sonunda besiyeri üzerinde oluşlan inhibisyon zonları mm olarak değerlendirildi [186].

### **2.12.4 Tekstil Materyallerinde Antifungal Aktivite (AATCC30)**

Antifungal madde ile işlem görmüş tekstil materyalinin *Aspergillus Niger* kullanılarak anti-fungal aktivitesinin değerlendirilmesi esasına dayanır. Test, fungi organizmalarının en kolay ve maksimum seviyede üreyebildikleri ortam koşulları altında gerçekleştirildi. Test yapılması istenen tekstil materyali petri yüzeyine yerleştirildi. Seçilmiş olan fungal spor süspansiyonu petri yüzeyine konularak 7 gün 28°C’de bekletildi. 7 gün sonunda değerlendirme yapıldı. Antifungal madde ile işlem görmemiş veya az etkili işlem görmüş tekstil materyali üzerinde veya etrafında engelleme alanı oluşmazken küflenme meydana geldiği görülürken, yeterli derecede antifungal madde ile işlem görmüş tekstil mamulünün sadece yüzeyinde engelleme alanı oluştuğu görüldü [187].

## **2.13 HPLC Analizi (High Pressure Liquid Chromatography)**

Yüksek basınçlı sıvı kromatografisi olarak ifade edilir. Kolon kromatografi çeşitlerinden bir tanesidir. Sıklıkla biyokimya ve analitik kimya alanlarında ayırma, tanımlama ve bileşenlerin miktarını belirleme gibi amaçlarla kullanılmaktadır. Kolon kromatografisi durgun faz yani paketlenmiş materyal, çözügen olarak ifade edilen hareketli faz, hareketli fazı kolona taşıyan pompa ve moleküllerin tutulma zamanını gösteren dedektör kısımlarından oluşur. Bitki ekstraktlarının fenolik bileşenlerini tayin etme amaçlı bu yöntem kullanılır.

### **2.13.1 Kullanılan Shimadzu Marka HPLC Cihazı ile İlgili Özellikler**

Dedektör: DAD dedektör ( $\lambda_{max} = 278$ ) ; Auto sampler: SIL-10AD vp ; System controller: SCL – 10Avp ; Pump: LC-10ADvp ; Degasser: DGU – 14A ; Column oven: CTO – 10Avp ; Kolon : Agilent Eclipse XDB – C18 (250 x 4.60 mm) 5 mikron ; Mobil faz : A: %3 asetik asit, B: Metanol ; Akış Hızı: 0.8 mL / dakika ; Kolon sıcaklığı: 300 °C ; Enjeksiyon hacmi: 20 mikrolitre.

### 2.13.2 Gradient Programı:

Tablo 2. 2: HPLC Gradient Programı.

Süre(dk)	A	B
	Konsantrasyonu(%)	Konsantrasyonu(%)
0	0	100
3	5	95
18	20	80
25	20	80
30	25	75
35	30	70
40	40	60
55	50	50
65	60	40
67	0	100
68	0	100

### 2.14 İndüktif Eşleşmiş Plazma Optik Emisyon Spektroskopisi (ICP-OES) Analizleri

Bitkilerin mineral içeriğinin analizi için Balıkesir Üniversitesi Temel Bilimler Araştırma Merkezinde (BÜTAM) bulunan İndüktif Eşleşmiş Plazma Optik Emisyon Spektroskopisi (ICPOES) (Perkin Elmer optime 3100XL mod.) kullanılmıştır.

#### 2.14.1 Kullanılan ICP-OES Cihazı ile İlgili Özellikler

Torç türü: aksiyal; Rekalibrasyon sistemi: Hg lambası, Detektör: Bölünmüş eşleşmiş düzenli yük belirleme dedektörü, RF jeneratörü:40 MHz, serbest çalışma, 750-1000 Watts, Atomlaştırıcı (Nebuliser):Çapraz akış, Plazma gaz akışı:15 L· d-1, Auxiliary gaz akışı: 0.5 L· d-1, Atomlaştırıcı gaz akışı: 0.5 L· d-1, View height:15 mm, Örnek akış hızı: 1.5 mL· d-1, Örnek yıkama zamanı: 4 s.,Örnek yıkama hızı:4.0 mL· d-1, Gecikme hızı:60 s, Yıkama hızı: 1.5 mL· d-1, Yıkama zamanı:30 s.

**Dalga boyları (nm):** 317.933 (Ca); 285.213 (Mg); 257.610 (Mn); 206.200 (Zn); 267.716 (Cr); 238.204 (Fe); 228.616 (Co); 231.604 (Ni); 327.393 (Cu); 308.215 (Al); 228.802 (Cd) ; (Pb) 220.349; 202.031 (Mo) ; 189.927 (Sn); 290.880 (V); 233.527 (Ba).

## **2.15 Kullanılan Cihazlar**

Ekstrelerin alınması işleminde rotary evaporator kullanıldı. Ekstrelerin antitüberküloz aktivite çalışmaları kapsamında Bilser marka W-lamp hepafiltreli laminaflow kullanıldı. Mikroorganizmaların uygun sıcaklıklarda inkübasyonu için Elektro-Mag marka etüv kullanıldı. Çözeltilerin ve inokulumların homojen karışması için Elektro-Mag marka vortex kullanıldı.

### 3. BULGULAR

#### 3.1 Bitki Ekstrelerinin Antimikrobiyal Aktivitesine Ait Bulgular

##### 3.1.1 Disk Difüzyon Testi Bulguları

Bu yöntemde 6 mm çapa sahip diskler kullanıldı. 1 mg/mL konsantrasyonlarında olan bitki ekstraları disklerle emdirilerek çeşitli bakteri ve küflere karşı denendi. İnkübasyon süresinden sonra inhibisyon zon çapları ölçüldü ve sonuçlar tablo 3.1 ve 3.2 'de mm cinsinden verildi.

**Tablo 3. 1:** *P.granatum* ve *R. aculeatus* Bitkilerinin Etanol Ekstrelerinin Bakteriler için Disk Difüzyon Testi Sonuçları.

	Disk zon çapları (mm)			
	<i>P.granatum</i>	<i>R.aculeatus</i>	SXT (25 µg)	TZP (110 µg)
<i>P. vulgaris</i>	15±0.80	8±0.82	21.5 ± 1.50	41.5 ± 1.91
<i>B. cereus</i>	14±4.20	8±0.81	-	31.75 ±1.5
<i>S. aureus</i>	18.7 ±0.5	10.25±0.95	36.2 ± 4.8	39.5 ± 1.29
<i>P.aeuroginosa</i>	16.0±0.80	-	-	33.5±0.57
<i>K. pneumoniae</i>	16.4±1,51	-	58.7 ± 2.5	38.2 ± 1.50
<i>E. coli</i>	-	7.5±0.58	31.5±1.91	35.25 ± 0.95
<i>S. sonnei</i>	8.25±0.95	-	-	29.25±0.95
<i>MRSA</i>	18.5±1.29	7.5±0.57	35.7±1.70	22.7±2.21
<i>S.typhimurium</i>	-	8.75±0.96	-	36.0±1.41

**Tablo 3. 2:** *P.granatum* ve *R.acualetus* Bitkilerinin Etanol Ekstrelerinin Funguslar için Disk Difüzyon Testi Sonuçları.

	Disk zon çapları (mm)		
	<i>P.granatum</i>	<i>R.aculeatus</i>	Amphotericin B (25µg)
<i>C. albicans</i>	15.25±1.25	-	-
<i>A. niger</i>	-	10±1.82	20.25±1.25
<i>A. flavus</i>	-	9.5±0.57	17±1
<i>A.ochraceus</i>	-	-	13.5±1.29
<i>F.proliferatum</i>	9.5±0.57	8±0.82	15.75±1.70

### 3.1.2 Antibakteriyel, Antifungal ve Antitüberküloz Aktivite Bulguları

Minimum inhibisyon konsantrasyon değeri olarak ifade edilen MİK, bitki etanol ekstrelerinin, mikroorganizmaların üremesini inhibe eden konsantrasyon değeri olarak, MBK ve MFK değerleri ise bakterisit/fungisit konsantrasyon değeri olarak mg/mL cinsinden Tablo 3.3, 3.4 ve 3.5 ' de verildi. Şekil 3.1 - 3.4' de ise MİK değerlerine ait fotoğraflar yer almaktadır. Standart ilaçların MİK ve MBK/MFK değerleri ise Tablo 3.6, 3.7 ve 3.8' de verildi.

**Tablo 3. 3:** *P.granatum* ve *R.aculeatus* Etanol Ekstrelerinin Antibakteriyal Aktivite Değerleri (mg/mL).

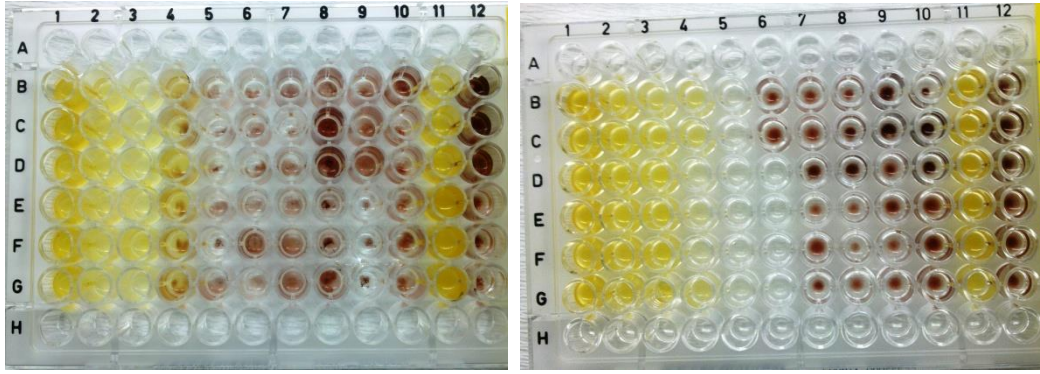
	<i>P.granatum</i>		<i>R.aculeatus</i>	
	MİK	MBK	MİK	MBK
<i>Proteus vulgaris</i>	1.6	6.3	6.3	>25
<i>Bacillus cereus</i>	0.8	>25	12.5	>25
<i>Staphylococcus aureus</i>	0.8	1.6	25	>25
<i>Pseudomas aeuroginosa</i>	6.3	12.5	12.5	12.5
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	0.2	12.5	6.3	25
<i>Esherichia coli</i>	6.3	>25	12.5	>25
<i>Shigella sonnei</i>	6.3	>25	25	>25
MRSA	3.1	>25	12.5	25
<i>Salmonella typhimurium</i>	6.3	25	12.5	>25

**Tablo 3. 4:** *P.granatum* ve *R.aculeatus* Etanol Ekstrelerinin Antifungal Aktivite Değerleri (mg/mL).

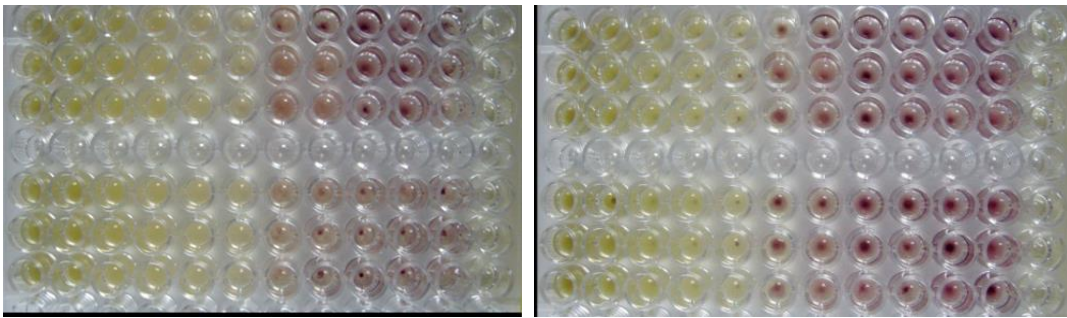
	<i>P.granatum</i>		<i>R.aculeatus</i>	
	MİK	MFK	MİK	MFK
<i>Candida albicans</i>	3.1	>25	12.5	12.5
<i>Aspergillus niger</i>	>25	-	3.1	25
<i>Aspergillus flavus</i>	6.3	12.5	12.5	25
<i>Aspergillus ochraceus</i>	12.5	>25	6.3	25
<i>Fusarium proliferatum</i>	12.5	>25	6.3	25

**Tablo 3. 5:** *P.granatum* ve *R.aculeatus* Etanol Ekstrelerinin Antimikobakteriyal Aktivite Değerleri (mg/mL).

	<i>P.granatum</i>		<i>R.aculeatus</i>	
	MİK	MBK	MİK	MBK
<i>M. tuberculosis</i> (RA)	0.8	12.5	0.4	12.5
<i>M. tuberculosis</i> (RV)	1.6	25	0.4	25
Hasta suşu-1	0.4	25	1.6	>25
Hasta suşu-2	0.4	>25	1.6	>25

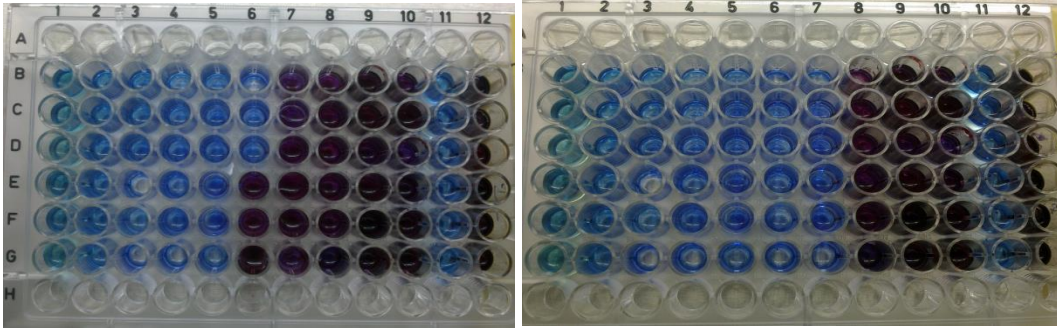


**Şekil 3. 1:** *P. granatum* etanol ekstrelerine ait MİK fotoğrafları, A) ABC sırası; *B.cereus* DEF sırası; *S. aureus*, B) ABC sırası ; *E.coli*, DEF sırası; *K.pneumoniae*.

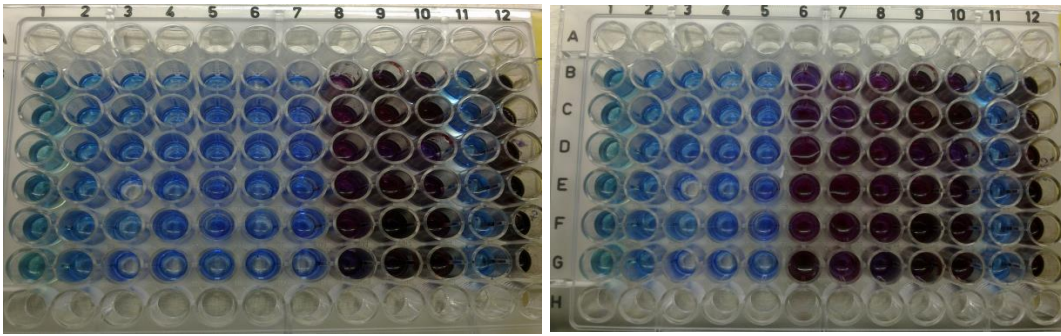


**Şekil 3. 2:** *R. aculeatus* etanol ekstrelerine ait MİK fotoğrafları, A) ABC sırası; *B.cereus*, DEF sırası; *P. aureginosa*, B) ABC sırası ; *P. vulgaris*, DEF sırası; *K. pneumoniae*.





**Şekil 3. 3:** *P. granatum* etanol ekstresine ait MİK fotoğrafları, A) ABC sırası; RA ,DEF sırası; RV, B) ABC sırası ; Hasta suşu-1, DEF sırası; Hasta suşu-2.



**Şekil 3. 4:** *R. aculeatus* etanol ekstresine ait MİK fotoğrafları, A) ABC sırası; RA ,DEF sırası; RV, B) ABC sırası ; Hasta suşu-1, DEF sırası; Hasta suşu-2.

**Tablo 3. 6:** Standart Antibiyotiklere Karşı Bakterilerin MİK ve MBK Değerleri.

	Standart Antibiyotik ( $\mu\text{g/mL}$ )	
	MİK	MBK
<i>Proteus vulgaris</i>	0.4	0.4
<i>Bacillus cereus</i>	10	10
<i>Staphylococcus aureus</i>	0.4	0.4
<i>Pseudomas aeuroginosa</i>	10	10
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	10	10
<i>Esherichia coli</i>	0.4	0.4
<i>Shigella sonnei</i>	10	10
MRSA	10	20
<i>Salmonella typhimurium</i>	10	10

**Tablo 3. 7:** Standart Antibiyotiklere Karşı Fungusların MİK ve MFK Değerleri.

	Standart Antibiyotik (µg/mL)	
	MİK	MFK
<i>Candida albicans</i>	0.4	0.4
<i>Aspergillus niger</i>	10	10
<i>Aspergillus flavus</i>	0.4	0.4
<i>Aspergillus ochraceus</i>	10	10
<i>Fusarium proliferatum</i>	10	10

**Tablo 3. 8:** Standart Antibiyotiklere Karşı Tüberküloz Bakterilerinin MİK Ve MBK Değerleri (µg/mL).

	H <sub>37</sub> Rv		H <sub>37</sub> Ra		Hasta suşu-1		Hasta suşu-2	
	MİK	MBK	MİK	MBK	MİK	MBK	MİK	MBK
Streptomisin	0.65	0.65	0.65	1.29	2.59	5.18	0.65	-
İzoniazid	0.13	1.03	0.51	1.03	0.51	1.03	0.51	0.51
Rifampin	0.65	5.18	0.32	2.59	0.65	0.65	0.65	5.18
Ethambutol	0.65	0.65	0.65	1.29	2.59	5.18	0.65	-

### 3.2 Kumaşların Bitki Özütleri ile Boyanması

Boyarmadde Mordan Malzemesi	Nar Kabuğu ile Boyama	Tavşan memesi ile Boyama
<b>Mordansız Boyama</b>		
<b>Şap Mordan Malzemesi ile Mordanlama</b>		
<b>Bakırsülfat</b>		
<b>Demirsülfat+ Tartarik Asit</b>		

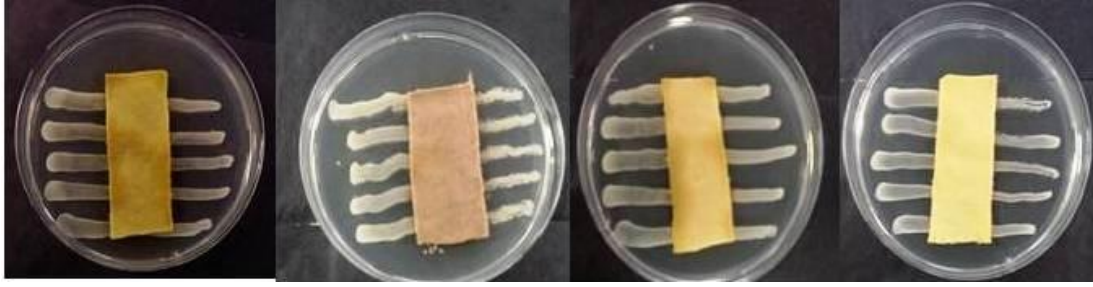
### 3.3 Kumaş Örneklerinin Antimikrobiyal Aktivitesine Ait Bulgular

#### 3.3.1 Paralel Çizgi Yöntemi Bulguları (AATCC 147)

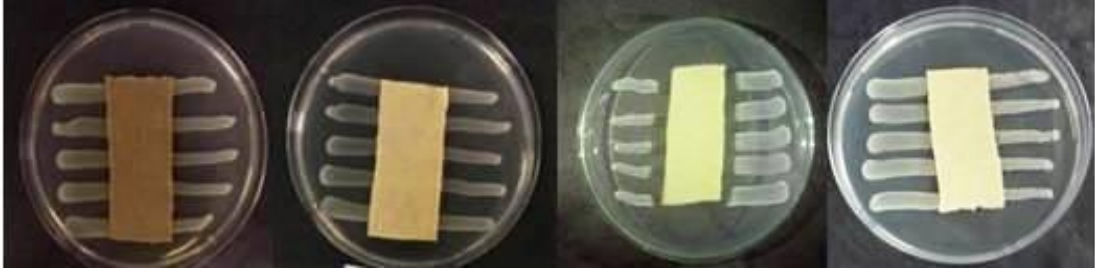
Kalitatif antimikrobiyal aktivitenin belirlenmesin AATCC 147 metodu olan “Paralel çizgi metodu” kullanıldı. *S. aureus* bakterisine karşı *P. granatum* ile boyanmış kumaşta zon oluşumu görülmüştür. Kullanılan diğer kumaşların etrafında herhangi bir inhibisyon zonu oluşmamasına rağmen kumaşların alt kısımlarında organizma mevcudiyetinin azalma yönünde etkilendiği görülmüştür. Test sonuçları Tablo 3.9’da ve Şekil 3.5 ve 3.8 arasında verilmiştir.

**Tablo 3. 9:** *P.granatum* ve *R.aculeatus* Bitkileri Ile Boyanmış Kumaşlar İçin Antibakteriyel Testi Sonuçları.

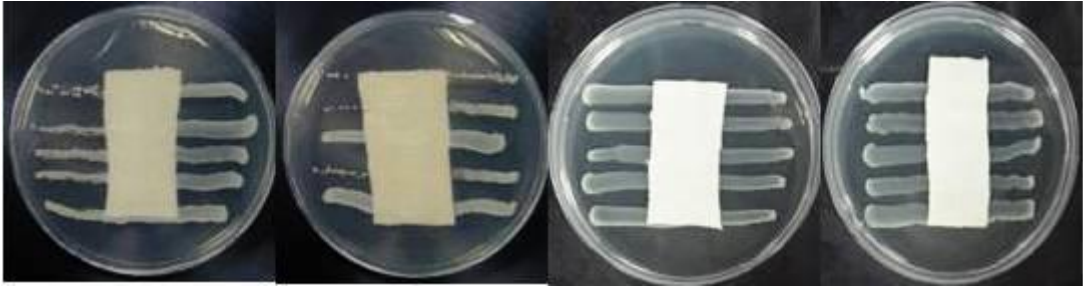
		Inhibisyon zonu (mm)					
		Yıkamasız		1 Yıkama		10 Yıkama	
		S.A	K.P.	S.A	K.P.	S.A	K.P
<i>P.granatum</i>	Mordansız	3.1	Etkinlik var	0	0	0	0
	Bakır Sülfat	Etkinlik var	Etkinlik var	0	0	0	0
	Demir Sülfat+Tartarik Asit	0	0	0	0	0	0
	Şap	0	0	0	0	0	0
<i>R.aculeatus</i>	Mordansız	Etkinlik var	0	0	0	0	0
	Bakır Sülfat	Etkinlik var	Etkinlik var	0	0	0	0
	Demir Sülfat+Tartarik Asit	0	0	0	0	0	0
	Şap	0	0	0	0	0	0



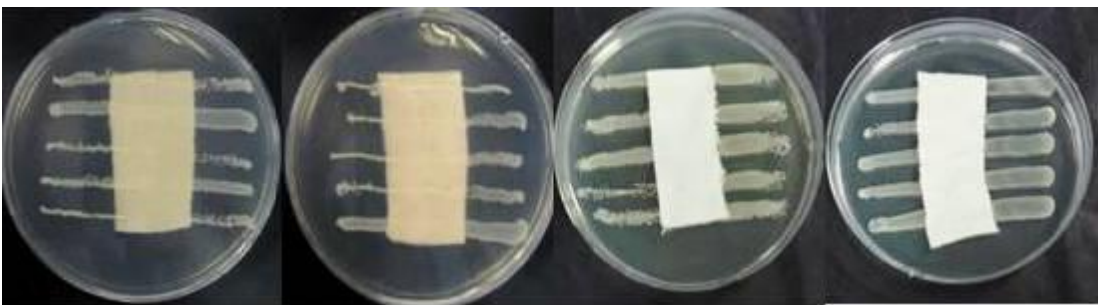
**Şekil 3. 5:** *P. granatum* ekstresini *Klebsiella pneumoniae* kullanılarak 147-2011 no'lu standarda göre paralel çizgi metodu (tekstil örnekleri için) ile antimikrobiyal aktivite tayini. A) mordan: bakırsülfat B) mordan: demir sülfat+tartarik asit C) mordansız, D) mordan: şap.



**Şekil 3. 6:** *P. granatum* ekstresini *S.aureus* kullanılarak 147-2011 no'lu standarda göre paralel çizgi metodu (tekstil örnekleri için) ile antimikrobiyal aktivite tayini. A) mordan: bakırsülfat B) mordan: demir sülfat+tartarik asit C) mordansız, D) mordan: şap.



**Şekil 3. 7:** *Ruscus aculeatus* yaprak etanol ekstresini *Klebsiella pneumoniae* kullanılarak 147-2011 no'lu standarda göre paralel çizgi metodu (tekstil örnekleri için) ile antimikrobiyal aktivite tayini. A) mordan: bakırsülfat B) mordan: demir sülfat+tartarik asit C) mordansız, D) mordan: şap.



**Şekil 3. 8:** *Ruscus aculeatus* yaprak etanol ekstresini *Staphylococcus aureus* kullanılarak 147-2011 no'lu standarda göre paralel çizgi metodu (tekstil örnekleri için) ile antimikrobiyal aktivite tayini. A) mordan: bakırsülfat B) mordan: demir sülfat+tartarik asit C) mordansız, D) mordan: şap.

### 3.3.2 Tekstilde Bitirme İşlemi Bulguları (AATCC-100)

Kumaş numunelerinin antimikrobiyal etkinliklerinin kantitatif olarak belirlenmesinde AATCC 100 standardı kullanılmıştır. İlgili standartta aşağıda verilen formül üzerinden hesaplama yapıldı.

$$R(\%) = 100 (B-A)/B,$$

Burada;

R = oransal azalma,

B = başlangıç anında numune ile temas etmiş olan çözeltideki organizma sayısı

A = numune ile temas etmiş olan nötralizasyon çözeltisi içinde bulunan organizma sayısını göstermektedir.

Bu yöntemle elde edilen R değerlerinin büyüklüğü antimikrobiyal etkinlik

$R \geq 99.99$  ise “mükemmel”,

$99 < R < 99.99$  ise “iyi”,

$0 < R < 99$  ise “ kabul edilebilir ”olarak ölçeklendirilmektedir. Sonuçlar tablo 3.10 ve 3.13 arasında ve Şekil 3.9 ‘da verildi.

**Tablo 3. 10:** AATCC 100 Metoduna Göre *P.granatum* ile Boyanmış Kumaş Örneğinin Değerlendirilmesi (kob/mL).

Bakteri sayısı	0.saat(temas anı) koloni sayısı				6.saat koloni sayısı				18.saat koloni sayısı			
	$10^{-1}$	$10^{-2}$	$10^{-3}$	$10^{-4}$	$10^{-1}$	$10^{-2}$	$10^{-3}$	$10^{-4}$	$10^{-1}$	$10^{-2}$	$10^{-3}$	$10^{-4}$
<i>S.aureus</i>	2464	464	396	49	1051	358	124	16	76	57	16	0
<i>K.pnemonia</i>	1648	668	112	30	1352	618	19	9	79	45	12	3

**Tablo 3. 11:** AATCC 100 Metoduna Göre *P.granatum* ile Boyanmış Kumaş Örneğinde Zamana Göre Bakteri Sayısında Azalmanın Değerlendirilmesi (kob/mL).

% azalma	0.saatten sonra				6.saatten sonra				18.saatten sonra			
Bakteri sayısı	$10^{-1}$	$10^{-2}$	$10^{-3}$	$10^{-4}$	$10^{-1}$	$10^{-2}$	$10^{-3}$	$10^{-4}$	$10^{-1}$	$10^{-2}$	$10^{-3}$	$10^{-4}$
<i>S.aureus</i>	16	83	86	98	63	87	95	99	97	98	99	100
<i>K.pneumoniae</i>	45	77	97	99	55	79	98	99	97	97,5	98	99

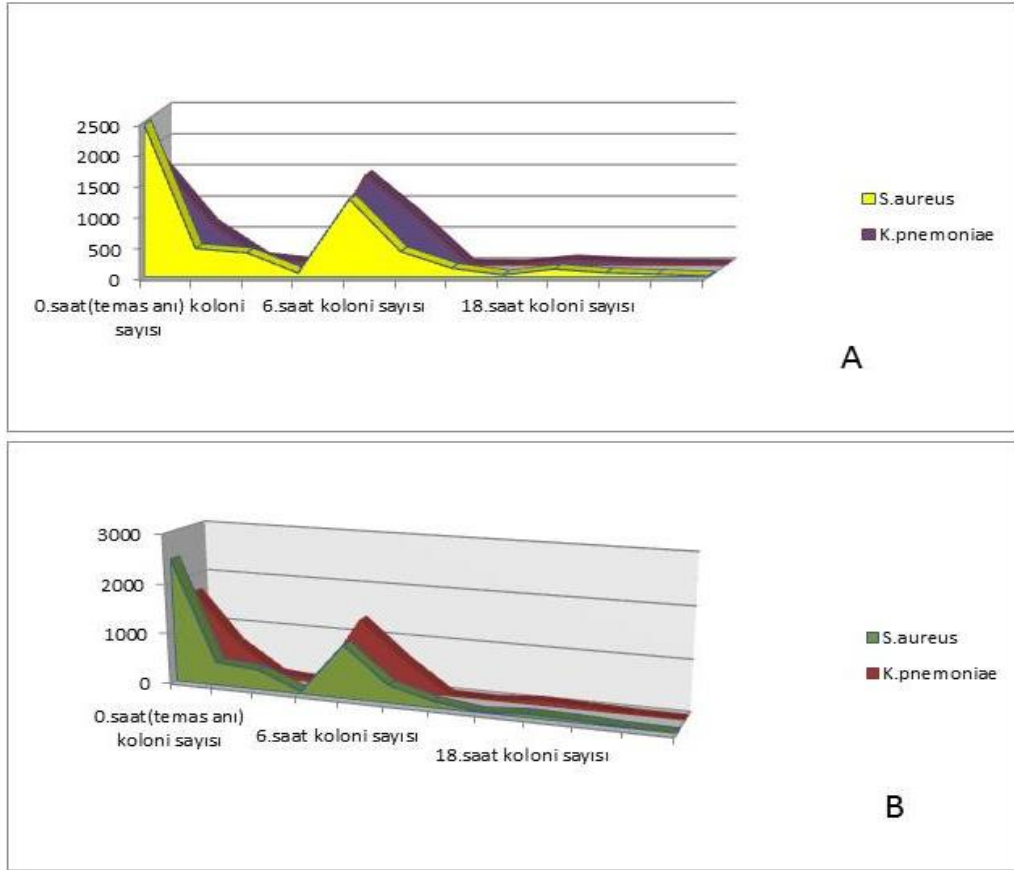
**Tablo 3. 12:** AATCC 100 Metoduna göre *R.aculeatus* ile boyanmış kumaş örneğinin değerlendirilmesi (kob/mL).

	0.saat(temas anı) koloni sayısı				6.saat koloni sayısı				18.saat koloni sayısı			
Bakteri sayısı	$10^{-1}$	$10^{-2}$	$10^{-3}$	$10^{-4}$	$10^{-1}$	$10^{-2}$	$10^{-3}$	$10^{-4}$	$10^{-1}$	$10^{-2}$	$10^{-3}$	$10^{-4}$
<i>S.aureus</i>	2454	458	390	65	1254	411	142	35	98	68	45	16
<i>K.pneumoniae</i>	1648	668	132	46	1458	785	29	17	97	58	32	23

**Tablo 3. 13:** AATCC 100 Metoduna göre *R.aculeatus* ile boyanmış kumaş örneğinde zamana göre bakteri sayısında azalmanın değerlendirilmesi (kob/mL).

% azalma	0.saatten sonra				6.saatten sonra				18.saatten sonra			
Bakteri sayısı	$10^{-1}$	$10^{-2}$	$10^{-3}$	$10^{-4}$	$10^{-1}$	$10^{-2}$	$10^{-3}$	$10^{-4}$	$10^{-1}$	$10^{-2}$	$10^{-3}$	$10^{-4}$
<i>S.aureus</i>	16	83	86	90	63	87	90	91	63	88	91	93
<i>K.pneumoniae</i>	45	77	82	85	55	79	83	87	68	79	85	90



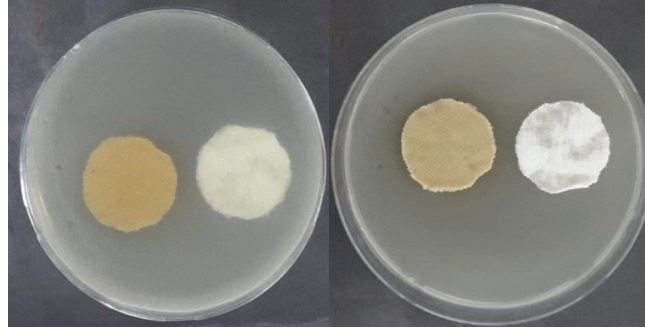


**Şekil 3. 9:** A) *P.granatum* için AATCC 100 metoduna göre bakteri sayıları B) *R.aculeatus* için AATCC100 metoduna göre bakteri sayıları.

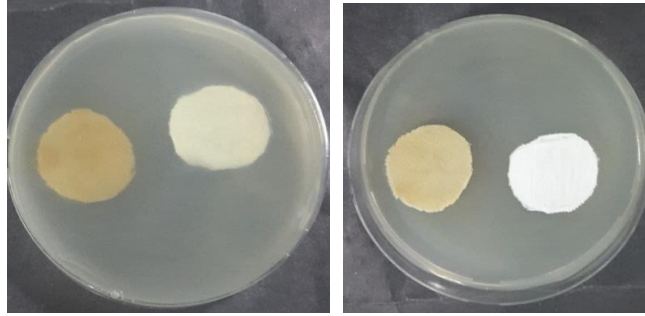
### 3.3.3 Tekstil Materyallerinde Antibakteriyal Aktivitenin Belirlenmesi- Agar Difüzyon Testi Bulguları- ISO 20645

Bu yöntemle yapılan çalışmada boyanmış kumaşlara diffüzenmiş antimikrobiyal özellikteki maddelerin varlığı amaçlanmaktadır. Yapılan çalışmalar şekil 3.10 ve 3.13 arasında verilmiştir.

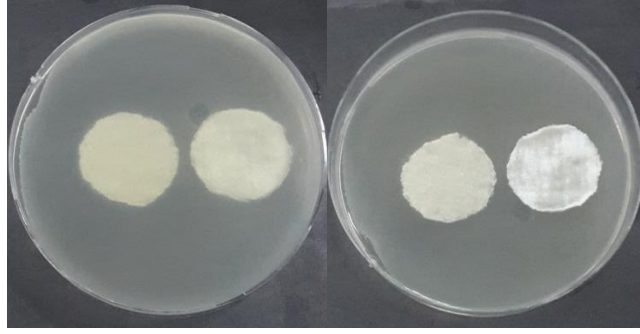




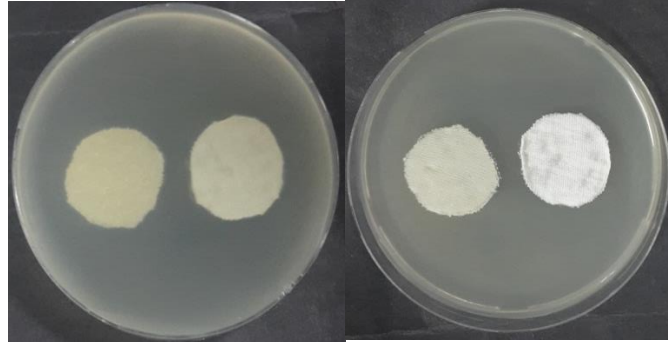
**Şekil 3. 10:** *P. granatum* etanol ekstresi ile boyanmış kumaşların *K.pneumoniae* kullanılarak ISO 20645 metodu ile antimikrobiyal aktivite tayini A) sol; boyalı kumaş,sağ; kontrol(boş) kumaş (petri arka yüzeyi) B) sol; boyalı kumaş,sağ; kontrol(boş) kumaş (petri ön yüzeyi).



**Şekil 3. 11:** *P. granatum* etanol ekstresi ile boyanmış kumaşların *S.aureus* kullanılarak ISO 20645 metodu ile antimikrobiyal aktivite tayini A) sol; boyalı kumaş,sağ; kontrol(boş) kumaş (petri arka yüzeyi) B) sol; boyalı kumaş,sağ; kontrol(boş) kumaş (petri ön yüzeyi).



**Şekil 3. 12:** *R.acualetus* etanol ekstresi ile boyanmış kumaşların *K.pneumoniae* kullanılarak ISO 20645 metodu ile antimikrobiyal aktivite tayini A) sol; boyalı kumaş,sağ; kontrol(boş) kumaş (petri arka yüzeyi) B) sol; boyalı kumaş,sağ; kontrol(boş) kumaş (petri ön yüzeyi).



**Şekil 3. 13:** *R.acualetus* etanol ekstresi ile boyanmış kumaşların *S.aureus* kullanılarak ISO 20645 metodu ile antimikrobiyal aktivite tayini A) sol; boyalı kumaş,sağ; kontrol(boş) kumaş (petri arka yüzeyi) B) sol; boyalı kumaş,sağ; kontrol(boş) kumaş (petri ön yüzeyi).

### 3.3.4 AATCC30-Tekstil Materyallerinde Antifungal Aktivite Testi Bulguları

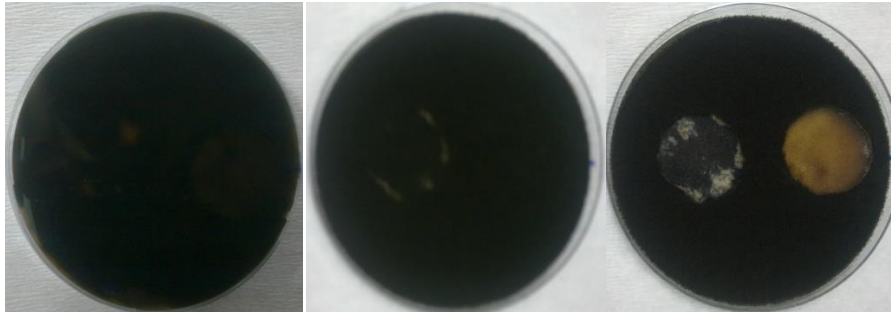
Bu yöntemde fungus suşu olarak *A. niger* Van Tiegh (TA-47-3) kullanıldı. Sonuçlar Tablo 3.14 ve 3.15' te ve şekil 3.14 ve 3.15'te verildi. Yuvarlak şekilde kesilen Boyanmış ve boyanmamış kumaş örnekleri *A. niger* taze kültürü ( $10^5$  mg/mL) ekilmiş petrilere yerleştirildi ve 7-14 gün 28 °C' de inkübasyondan sonra sonuçlar aşağıdaki listede verildiği şekilde değerlendirildi.

**Tablo 3. 14:** AATCC 30 Tekstil Materyallerinde Antifungal Aktivitenin derecelendirilmesi.

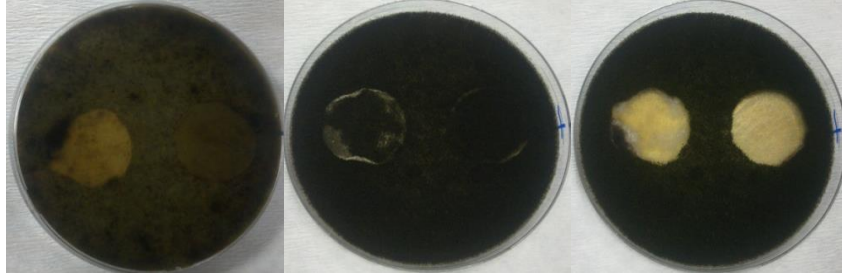
Kumaş kaldırıldıktan sonra petri yüzeyi %100 temiz ise	5+
Kumaş kaldırıldıktan sonra petri yüzeyi %80 temiz ise	4+
Kumaş kaldırıldıktan sonra petri yüzeyi %60 temiz ise	3+
Kumaş kaldırıldıktan sonra petri yüzeyi %30 temiz ise	2+
Kumaş kaldırıldıktan sonra petri yüzeyi %5-10 temiz ise	1+
Kumaş kaldırıldıktan sonra petri yüzeyi %0 temiz ise	0

**Tablo 3. 15:** Bitkilerle boyanmış kumaşların aatcc 30 standardına göre antifungal aktivitelerinin derecelendirilmesi.

<i>Bitki</i>	<i>Derecelendirme</i>	<i>%oran</i>
<i>P.granatum</i>	4+	%80
<i>R.aculeatus</i>	5+	%100



**Şekil 3. 14:** *P.granatum* etanol ekstresi ile boyanmış kumaşların *A.niger* kullanılarak AATCC 30 metodu ile antifungal aktivite tayini A) sol;Kontrol kumaş, sağ;boyalı kumaş (petri alt yüzeyi) B) sol;kontrol kumaş, sağ; boyalı kumaş (petri üst yüzeyi) C) sol;kontrol kumaş alt yüzeyi,sağ;boyalı kumaş alt yüzeyi.



**Şekil 3. 15:** *R.acualetus* etanol ekstresi ile boyanmış kumaşların *A.niger* kullanılarak AATCC 30 metodu ile antifungal aktivite tayini A) sol;Kontrol kumaş, sağ;boyalı kumaş (petri alt yüzeyi) B) sol;kontrol kumaş, sağ;boyalı kumaş (petri üst yüzeyi) C) sol;kontrol kumaş alt yüzeyi,sağ;boyalı kumaş alt yüzeyi.

### 3.4 HPLC Bulguları

Bitkilerin antimikrobiyal etki göstermesinde rol oynayan fenolik, flavonoid profilinin belirlenmesinde 33 standart kullanıldı Standartlar Sigma, Aldrich ve Fluka'dan temin edildi. HPLC analizlerinde kullanılan standartlar gallik asit, klorojenik asit, 4-hidroksi benzaldehit, vanilik asit, kafeik asit epikateşin, şiringik asit, ekinokozit, p-kumarik asit, ferrulik asit, benzoik asit, 2-hidroksi sinnamik asit, hesperidin, rutin hidrat, resveratrol, rosmarinik asit, trans sinnamik asit, kuarsetin, neoklorojenik asit, kuromanin klorid, 4-O-kafeolkuinik asit, taksifolin, şikorik asit, ellagik asit, oleuropein, mirisetin, luteolin, ursolik asit, naringenin, apigenin 7-glukosid, juglon, naringin ve kaemferol' dür.

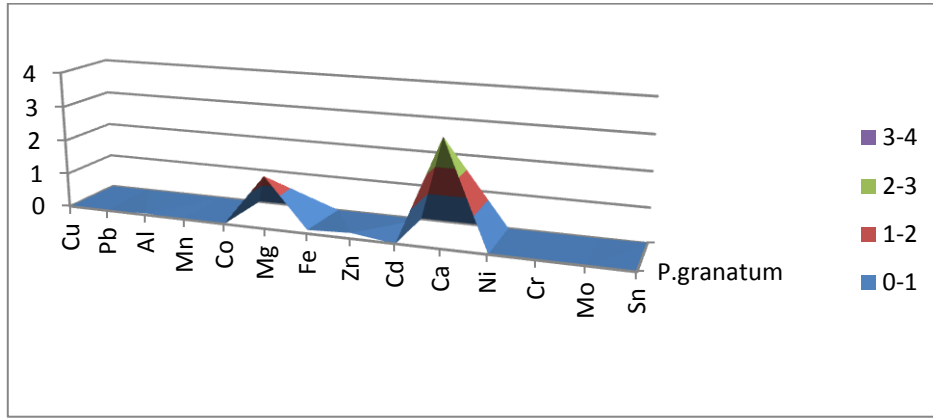
Standartlar materyal metotta belirtildiği gibi hazırlandı. Herbir standart maddenin grafiği ve alıkonma zamanı (RT) belirlendi. Alıkonma zamanları ve Bitki ekstralarının HPLC analizleri ile fenoliklerinin belirlenmesi (Tablo 3.16) ve standart kromatogram (ŞekilA.1) ekler bölümünde verildi.

**Tablo 3. 16:** HPLC Analizi Sonucunda Ekstrelerde Bulunan Fenolik Maddeler  
( $\mu\text{g/ml}$ ).

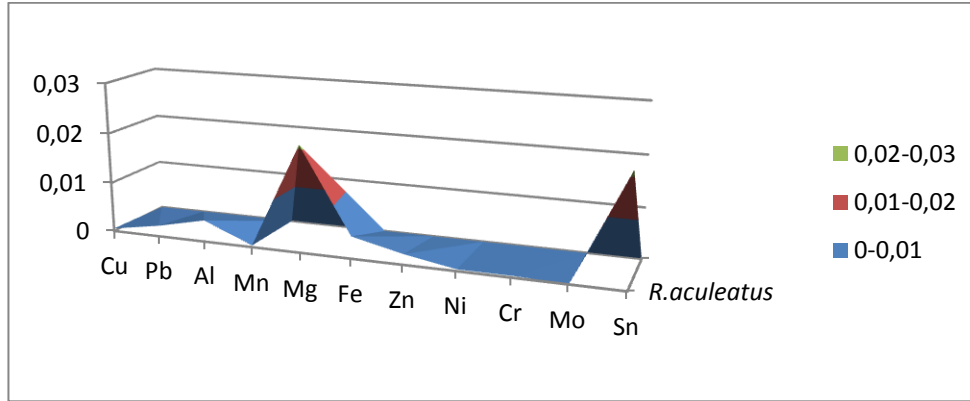
No	Standard adı	Alikonma Zamani	<i>P.granatum</i>	<i>R.acualetus</i>
1	Gallic Acid	9.00	5,06	0,46
2	Chlorogenic Acid	27.52	5,01	*
3	4hydroxybenzaldehyde	29.36	*	0,43
4	Vanilic Acid	33.00	*	*
5	Cafeic Acid	33.66	*	*
6	Epicatechin	34.44	*	*
7	Syringic Acid	37.26	*	*
8	Echinocside	41.89	70,21	*
9	P-Coumaric Acid	40.70	5,20	0,44
10	Ferrulic Acid	43.16.	*	*
11	Benzoic Acid	48.14	*	*
12	2-Hydroxycinnamic Acid	48.73	*	*
13	Hesperidine	49.55	*	*
14	Rutin Hydrate	50.42	*	*
15	Resveratrol	52.24	*	*
16	Rosmarinic Acid	52.89	*	93,69
17	Transcinnamic Acid	59.12	*	*
18	Quercetine	61.74	*	*
19	Neochlorogenic Acid	18.26	*	*
20	Kuromanin Chloride	25.39	*	*
21	4-O-Caffeolquinic Acid	28.67	*	*
22	Taxifolin	42.63	*	5,92
23	Chicoric Acid	48.61	*	*
24	Ellagic Acid	50.99	5,91	*
25	Oleuropein	51.93	*	*
26	Myricetin	53.55	16,41	*
27	Luteolin	64.25	*	141,51
28	Ursolic Acid	46.41	*	8,70
29	Naringenin	62.92	932,79	4,27
30	Apigenin-7-Glukozit	52.45	*	3,38
31	Juglon	57.86	*	*
32	Naringin	48.10	98,93	90,29
33	Kaempferol	68.25	34,35	3,49

### 3.5 ICP-OES Bulguları

Bitki ekstralarının ICP analizleri materyal ve metot bölümünde bahsedildiği gibi yapıldı (Tablo 3.17). ICP analizi ile bakır, kurşun, alüminyum, manganez, kobalt, magnezyum, demir, çinko, kadmiyum, kalsiyum, nikel, krom, molibden ve kalay elementlerinin varlığı ve miktarı araştırıldı (Şekil 3.16 ve 3.17).



Şekil 3. 16: *P granatum* bitkisinin element içeriği.



Şekil 3. 17: *R. aculeatus* bitkisinin element içeriği.

**Tablo 3. 17:** ICP Analiz sonuçları ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ ).

	<i>R. aculeatus</i>	<i>P. granatum</i>
<b>Cu</b>	0,00054	0,0094
<b>Pb</b>	0,00217	0,0057
<b>Al</b>	0,00432	0,049
<b>Mn</b>	0,00035	0,0029
<b>Co</b>	-	-
<b>Mg</b>	0,021	1,5208
<b>Fe</b>	0,00439	0,106
<b>Zn</b>	0,00208	0,164
<b>Cd</b>	-	0,0001
<b>Ca</b>	-	3,0462
<b>Ni</b>	0,00035	0,0044
<b>Cr</b>	0,00035	0,0013
<b>Mo</b>	0,00010	0,003
<b>Sn</b>	0,02159	0,0025

#### 4. SONUÇ VE ÖNERİLER

Çalışmamızda *P.granatum* ve *R.aculeatus* bitki türlerinin ekstrlerinin ve boyanmış kumaş örneklerinin antimikrobiyal aktiviteleri ve bu türlere ait ekstrlerin HPLC ve ICP-OES sonuçları incelendi.

*P. granatum* (nar) için disk difüzyon yöntemi sonuçları incelendiğinde; en büyük zon çapı *S. aureus* (18.7 ±0.5 mm) ve MRSA'ya (18.5±1.29mm) karşı belirlendi. Yapılan mikrodilüsyon testi çalışmalarında nar kabuğunun etanol ekstresi *S. aureus* (1.6 mg/mL), *S. typhimurium* (25 mg/mL), *P. vulgaris* (6.3 mg/mL) ve *P. aeruginosa* (12.5 mg/mL) üzerine bakterisidal etki gösterdi. Antifungal aktivite çalışmalarında ise bitki ekstresi kullanılan dört fungustan sadece *A. flavus*'a karşı 12.5 mg/mL değerinde fungisidal etkisi belirlendi. Antitüberküloz aktivite çalışmalarında bitki ekstresi virülant (RV) ve avirülant (RA) suşa karşı 25 mg/mL ve 12.5 mg/mL değerlerinde bakterisidal etki gösterirken hasta suşlarına karşı 25 mg/mL değerinde mycobakterisidal etki gösterdi.

*R.aculeatus* (tavşan memesi) için antibakteriyal aktivite çalışmalarına göre bitkinin etanol ekstresi bakterilerde en iyi etkiyi *P. aeruginosa* (MIK: 12.5 mg/mL, MBK: 12.5 mg/mL), *C. albicans* (MIK: 12.5 mg/mL, MBK: 12.5 mg/mL), *K. pneumoniae* (MIK: 6.3 mg/mL, MBK: 25 mg/mL), MRSA (MIK: 12.5 mg/mL, MBK: 25 mg/mL)'a karşı gösterdi. Antifungal aktivite çalışmalarında ise bitki ekstresi kullanılan dört fungustan hepsine karşı fungisidal etki gösterdi. *A. flavus* için MIK: 12.5 mg/mL, MFK: 25 mg/mL, *A. niger* MIK: 3.1 mg/mL, MFK: 25 mg/mL, *A. ochraceus* için MIK: 6.3 mg/mL, MFK: 25 mg/mL ve *F. proliferatum* MIK: 6.3 mg/mL, MFK: 25 mg/mL olarak bulundu. Antitüberküloz aktivite çalışmalarında bitki ekstresi virülant (RV) ve avirülant (RA) suşa karşı 0.4 mg/mL değerinde mycobakterisidal etki gösterirken hasta suşlarına karşı 1.6 mg/mL değerinde mycobakterisidal etki gösterdi.

Bakteriler için kullandığımız antibiyotiklerden Sulfametaxozole trimethoprim; *K.pneumoniae* (58.7 ± 2.5mm), *S.aureus* (36.2 ± 4.8mm), *E.coli* (31.5±1.91mm), MRSA(35.7±1.70mm) ve *P.vulgaris* üzerinde Cephalotrin,



*K.pneumoniae* ( $43.5 \pm 1.29\text{mm}$ ), *S.aureus* ( $43.5 \pm 2.64\text{mm}$ ), *E.coli*, *B.cereus*, *S. Sonnei*, *S. Typhimurium*, MRSA ve *P.vulgaris* üzerinde Piperacillin tazobactam *P.aureginosa* dışında tüm bakteriler üzerinde Tetracyclin, Rifampisin ve Tobramycin ise *S. Sonnei* dışında tüm bakteriler üzerinde bakterisit etki göstermiştir. Amphotericin B antibiyotiği için en büyük zon çapı *A. Niger* 'e ( $20.25 \pm 1.25\text{mm}$ ) karşı belirlendi. Tüberküloz bakterileri için kullandığımız antibiyotiklerden streptomisin, izoniazid, rifampin ve ethambutol H<sub>37</sub>Rv ve H<sub>37</sub>Ra üzerinde bakterisidal etki göstermiştir. İzoniazid antibiyotiğinin H<sub>37</sub>Ra ve H<sub>37</sub>Rv üzerinde bakterisidal etkisi 1.03 µg/ml'dir.

Dülger ve ark. (1999), çeşitli bitki yağlarının ve ekstralarının antimikrobiyal etkilerinin farklı olduğunu göstermektedir [188, 189]. Çalışmamızda *Punica granatum* L. bitkisinin meyve kabuklarından hazırlanan ekstraktların, özellikle cilt florası ve burun mukozasında bulunan *Staphylococcus aureus* bakterisine karşı güçlü antibakteriyel etki gösterdiği gözlenmiştir.

Aşkun ve arkadaşlarının (2008) yaptıkları bir çalışmada antifungal aktivite sonuçlarının antimikobakteriyel aktivite sonuçlarına paralel olabileceğini bulmuşlardır [190]. Çalışmamızda elde ettiğimiz iki bitkiye ait etanol ekstralarında görülen yüksek antifungal ve antimikobakteriyel aktivite bu sonuçla paralellik göstermektedir.

Dağcı ve arkadaşları (2005) tarafından araştırılan çalışmada; *P. granatum* aseton, etil alkol ve sulu ekstraktlarının test edilen mikroorganizmalar üzerinde 12-34 mm inhibisyon zonu ile en etkili bitki olduğu tespit edilmiştir. *P. granatum* etil alkol, aseton ve sulu ekstraktlarının *E. coli*'ye karşı sırasıyla 12, 14, 0 mm, *E. faecalis*'e karşı 20, 19, 15 mm ve *S. aureus*'a karşı 17, 16, 24 mm inhibisyon zonu meydana getirdiği belirlenmiştir [191]. Çalışmamızda elde ettiğimiz sonuçlar *P.granatum* türünün 18-8 mm arasında inhibisyon zonu oluşturduğunu göstermiştir.

*Punica granatum* L. bitkisinin kurutulmuş yapraklarının ve meyve kabuklarının antimikrobiyal aktivitesinin belirlendiği bir çalışmada; hazırlanan hekzan, etil alkol, etil asetat, metanol ve su ekstraktlarının *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium*, *Bacillus subtilis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae* bakterilerine karşı inhibitör etkileri incelenmiştir

[192]. Bu çalışmanın sonuçları ile bizim çalışmamızın sonuçları bazı bakteriler için paralellik göstermiştir.

Nar meyve kabuğunun yapısındaki fenolik bileşiklerin antibakteriyel etkilerinin araştırılması amacı ile yapılan bir çalışmada elde edilen % 13 ellagik asit içeren standardize kuru nar kabuğu ekstraktının gram pozitif bakterilerden *S. aureus*'a karşı 15.2 -19.4 mm ve *S. epidermidis*'e karşı 19.1 mm inhibisyon zon çapı oluşturduğu, gram negatif bakterilerden *E. coli* ve *S. typhimurium*'a karşı inhibitör etki göstermediği saptanmıştır [193]. Bu çalışmanın sonuçları ile bizim çalışmamızın sonuçları paralellik göstermiştir. Çalışmamızda *S. aureus*'a karşı 18.7 ±0.5mm inhibisyon zon çapı gözlenirken, *S. typhimurium*'a karşı inhibitör etki gözlenmemiştir.

Tablo 3.16'da verilen fenolik madde analiz sonuçları incelendiğinde *P. granatum* etanol ekstresinin gallic acid 5,06 (µg/ml), chlorogenic acid (µg/ml), p-coumaric acid (µg/ml) ellagic acid (5,91 µg/ml) , Echinococside(70,21 µg/ml), kaempferol(34,35 µg/ml), myricetin (16,41 µg/ml) ve naringenin(932,79 µg/ml) bileşimini içerdiği bulunmuştur. *R. acualetus* etanol ekstresinin ise gallic asit (0,46 µg/ml), 4-hydroxybenzaldehyde (0,43 µg/ml), p-coumaric asit (0,44 µg/ml), rosmarinic acid (93,69 µg/ml), taxifolin (5,92 µg/ml), luteolin (141,51 µg/ml), ursolic acid (8,70 µg/ml), naringenin (4,27 µg/ml), apigenin-7-glukozit (3,38 µg/ml), naringin (90,29 µg/ml), kaempferol (3,49 µg/ml) bileşimini içerdiği bulunmuştur.

*Punica granatum* bitkisinin en yüksek toplam fenolik bileşik içeriğine (22.6 gr gallik asit/100 gr kuru ağırlık) sahip olduğu belirlenmiş ve antibakteriyel aktivite ile fenolik bileşik içeriği arasında bir ilişkinin var olduğu ileri sürülmüştür [194].

Çeşitli fenolik maddelerin (kafeik asit, protocatechuic, p-kumarik asit, oleuropein p-hidroksi benzoik, vanillik, syringic, ve quercetin) antifungal ve antibakteriyel aktivitelerinin incelenmiş olduğu bir makalede caffeic ve protocatechuic asitlerinin (0.3 mg/ml) *E. coli* ve *K. pneumoniae* bakterilerine; syringic acid (0.5 mg/ml)' in *B. cereus* bakterisine karşı üreme inhibisyonu gösterdiği bulunmuştur [195].

Antibiyotikler yem endüstrisinde özellikle büyütme faktörü, tedavi edici ve patojen mikroorganizmaların eliminasyonu gibi amaçlarla yıllardır kullanılmaktadır. Ancak günümüzde antibiyotiklerin çok yüksek dozlarda kullanılmasının, mikroorganizmaların bunlara karşı direnç kazanmasına sebep olduğu fark edilmiştir [196]. Bu nedenle özellikle antibiyotiklere bir alternatif olarak, bazı bitkilerde bulunan yüksek miktarları toksik etkili olan, genellikle antinutrisyonel faktör olarak kabul edilen fitokimyasallardan biri olan saponinler üzerinde yoğunlaşılacak bir bitkisel içeriktir. *R. acualetus*'un antifungal ve antibakteriyal aktivite göstermesi çalışmalara paralellik göstermiştir [197].

ICP analizi sonuçları incelendiğinde Mg elementi *P.granatum*'da 1,52 µg/kg, *R.acualetus*'ta 0,02µg/kg olarak belirlenirken Ca elementi sadece *P.granatum*' da (3,04 µg/kg) belirlenmiştir.

Antimikrobiyal (antibakteriyal ve antifungal) kumaşlar, son yıllarda özellikle cerrahi giysilerde, bebek giysilerinde, iç çamaşırlarında, vb. çok büyük önem kazanmışlardır. Bütün dünyada mikrobik enfeksiyon tehlikesi nedeniyle artan bir ilgi vardır.

Bitki ekstraktları ile yapılan boyama çalışmalarında *P.granatum* bitkisinin açık sarı ve haki renkleri arasında boyama özelliğine sahip olduğu *R.acualetus* bitkisinin ise krem tonlarında boyama özelliğine sahip olduğu belirlenmiştir.

Antibakteriyel maddeler, bakterileri öldüren (bakterisidler) veya çoğalmalarını, gelişmelerini veya aktivitelerini engelleyen (bakteriostat) kimyasal maddelerdir. Geleneksel antimikrobiyal maddeler life de eklense, kimyasal binderlerle de yapıştırılsa, basitçe bitim işlemlerinde kumaşlara da eklense işlevleri aynı kalacaktır. Her durumda geleneksel antimikrobiyal teknolojileri bir öldürme alanı ya da mikroorganizma faaliyetlerini ve çoğalmasını engelleme bölgesi oluşturacaktır. Bu alan, işlem görmüş malzeme çevresindeki antimikrobiyal maddenin aktığı ya da yöneldiği bölgedir. Geleneksel antimikrobiyal maddelerin öldürme ya da engelleme etkisi AATCC 147 testi ile belirlenmektedir [180].

Yapılan paralel çizgi çalışmalarında; *P.granatum* bitkisi ile mordansız boyanmış kumaş örneğinin *S.aureus* üzerine bakterisidal etki gösterdiği

belirlenirken, bakır sülfat ile mordanlanarak boyanmış kumaş örneklerinde, kumaşların etrafında herhangi bir inhibisyon zonu oluşmamasına rağmen kumaşların alt kısımlarında organizma mevcudiyetinin azalma yönünde etkilendiği görülmüştür.

*R. acualetus* bitkisi ile boyanmış kumaş örneklerinde zon çapı oluşumu görülmemiş buna rağmen *K. pnemoniae* ile yapılan çalışmalarda kumaşların alt kısımlarında organizma mevcudiyetinin azalma yönünde etkilendiği görülmüştür.

Çalışmamızda AATCC 100 metodu ile kumaşlarda antimikrobiyal etkinlik kantitatif olarak belirlenmiştir ve bakterilerin oransal azalması *P. granatum* için 18. saatte *S. aureus* üzerinde %100 mükemmel olarak belirlenmiştir. *R. acualetus* için ise 18. saatte *K. pnemoniae* üzerinde %90 kabul edilebilir olarak belirlenmiştir.

Tekstil materyallerinde boyanmış kumaşlara diffüzlenmiş antibakteriyal aktivitenin belirlenmesi için kullanılan agar difüzyon test metodunda agara difüzlenme özelliğine sahip madde belirlenmemiştir. Ancak kumaş arka yüzeylerinde bakteri üremesinin engellendiği tespit edilmiştir.

Tekstil materyallerinde antifungal aktivitenin belirlenmesi için yaptığımız çalışmalarda *A.niger*'e karşı *R. acualetus* ile boyanmış kumaş arka yüzeyinde tamamen üremenin durduğu tespit edilirken, *P. granatum*'un % 80 oranında üremeyi durduğu belirlenmiştir.

Lee ve arkadaşları (1999), pamuklu ve nonwoven kumaşlar için kitosan ve floropolimer esaslı antimikrobiyal bitim işlemlerini araştırmışlardır. Antimikrobiyal aktivite, *S. aureus* kolonilerinin sayıları ölçülerek kantitatif olarak analiz edilmiştir. Sadece kitosan ile işlem görmüş numunelerde, koloni sayısında yüksek bir azalma oranı görülmüştür. % 1,1 kitosan konsantrasyonu ile iki kez işlem görmüş numunelerde, koloni sayısında % 90'ı aşan azalmalar gözlenmiştir. Bu sonuçlar bizim çalışmalarınız ile paralellik göstermiş ve *S. aureus* için % 95' i aşan azalmalar gözlenmiştir [198].

Nakashima ve arkadaşları (2001), selülozik kumaşlarda metalik tuz işleminin 3 çeşit bakteriye karşı antibakteriyel aktivitesi üzerindeki etkisini araştırmışlardır. İki çeşit selülozik kumaş  $CuSO_4$  ve  $ZnSO_4$  metalik tuzları ile muamele edilmişlerdir

[199]. Yaptığımız çalışmalarda kullanılan mordanlar ve ICP analizi sonuçları benzerlik göstermektedir ve antibakteriyal aktivite oluşumunda etkili olmuştur.

Borsa ve arkadaşları (2004), çalışmalarında, hastanede kullanılan pamuklu kumaşların gördükleri yıkamaya dayanıklı antimikrobiyal bitim işlemlerini incelenmiş, AATCC standard test metotları kullanarak, modifiye kumaşın *E.coli* ve *S.aureus* bakterilerine karşı etkili olduğu kanıtlanmıştır. *S. aureus* ile 24 saatlik temas sonunda tüm numunelerde R(%)-(oransal azalma) değeri;  $R \geq 99.99$  olduğu için “mükemmel” etkinlik ortaya çıkmıştır. *E. coli* ile temas sonunda numunelerde “mükemmel” etkinlik, sonucu ortaya çıkmıştır [200]. Bu sonuçlar bizim çalışmalarımız ile karşılaştırıldığında benzerlik göstermektedir.

Çalışmamız sonucunda *P. granatum* ve *R. acualetus* bitkileri için hem etanol ekstralarının hem boyanmış kumaş örneklerinin antimikrobiyal özellikler belirlenmiştir ve literatürde özellikle antitüberküloz aktiviteleri ile ilgili çalışmalarına rastlanmadığından çalışmamız literatüre katkıda bulunacaktır. Doğal boyama karakterli bitkisel ekstralardan farklı mordanlar kullanılarak renk skalaları oluşturuldu. Renkler kumaşlar üzerine uygulandı ve çeşitli testler uygulanarak performans özellikleri test edildi. Ayrıca elde edilen boyarmaddelerin antibakteriyal, antifungal etkinlik çalışmaları da yapılarak farklı kullanım alanları için boyalı tekstil ürünlerine dönüşebilme durumu ortaya çıkmıştır. Ayrıca HPLC sonuçları ile bitkilerin (*P.granatum* ve *R.acualetus*) içeriğindeki fenolik maddeleri tespit edildi.

## 5. KAYNAKLAR

- [1] Tan, A., “Türkiye’de Bitkisel Çeşitlilik ve Bitki Genetik Kaynakları”, *Anadolu J. of AARI*, MARA, İzmir, 2, 50-64, (1992).
- [2] İlçim, A., Dığrak, M. and Bağcı, E., “Bazı Bitki Ekstraktlarının Antimikrobiyal Etkilerinin Araştırılması”, *Tr. J. of Biology*, 22, 119-125 (1998).
- [3] Vonderbank, H., “*Ergebnisse der Chemotherapie der Tuberculose. Pharmazie*”, 4, 198-207, (1949).
- [4] Dığrak, M., İlçim, A. ve Alma, M.H., “Antimicrobial activities of several parts of *Pinus brutia*, *Juniperus oxycedrus*, *Abies cilicia*, *Cedrus libani* and *Pinus nigra*”, *Phytotherapy Research*, 13, 584-587, (1999).
- [5] Kalaycıoğlu, A. ve Öner, C., “Bazı bitki ekstraktlarının antimutajenik etkilerinin Amest- Salmonella test sistemi ile araştırılması”, *Tr. Botany.*, 18, 117-122, (1994).
- [6] Abascal, K. and Yarnell, E., “Herbs and Drug Resistance. Potential of Botanical in Drug-Resistant Microbes”, *Alternative & Complementary Therapies*, 1, 237-241, (2002).
- [7] Solanki, R., “Some Medicinal Plants With Antibacterial Activity”, *Pharmacie Globale (IJCP)* Vol. 01, Issue 04, ISSN 0976-8157, (2010).
- [8] Seyyednejad, S. M., Motamedi, H.; “A review on native medicinal plants in Khuzestan, Iran with antibacterial properties”, *Int J Pharmacol*, 6(50): 551-560, (2010).
- [9] Alzoreky, N.S., Nakahara, K., “Antibacterial activity of extracts from some edible plants commonly consumed in Asia”, *International Journal of Food Microbiology*, 80: 223-230, (2003).
- [10] Torođlu, S., Çenet, M., “Tedavi Amaçlı Kullanılan Bazı Bitkilerin Kullanım Alanları ve Antimikrobiyal Aktivitelerinin Belirlenmesi İçin Kullanılan Metodlar”, *KSÜ. Fen ve Mühendislik Dergisi*, 9(2), (2006).
- [11] Bouwmeester, J., Matusova, R., Zhongkui S. and Beale, M.H., "Secondary Metabolite Signalling in Host–Parasitic Plant Interactions," *Curr. Opin. Plant Biol.*, 6: 358-364, (2003).

- [12] Zhao, J., Wang, J., Chen, Y. and Agarwal, R., “Anti-tumor promoting activity of a polyphenolic fraction isolated from grape seeds in the mouse skin two stage initiation promotion protocol and identification of procyanidin B5-3-gallate as the most effective antioxidant constituent”. *Carcinogenesis*, 20, 1737-1745, (1999).
- [13] Göktürk Baydar, N., Özkan G. and Sağdıç, O., “Total phenolic contents and antibacterial activities of grape (*Vitis vinifera* L.) extracts”, *Food Control*, 15, 335-339, (2004).
- [14] Khalil, M.Y., Moustafa, A.A. and Naguib, N.Y., “Growth, phenolic compounds and antioxidant activity of some medicinal plants grown under organic farming condition” *World Journal of Agricultural Sciences*, 3 (4), 451-457, (2007).
- [15] Herrmann K., “Occurrence and content of hydroxycinnamic and hydroxybenzoic acid compounds in food”, *Crit Rev Food Sci Nutr.*, 28, 315–347, (1989).
- [16] Shahidi F., Naczki M., *Food Phenolics. Sources, Chemistry, Effects, Applications*. Lancaster, USA: Technomic Publishing Company, Inc., (1995).
- [17] Lattanzio, V., Lattanzio, V.M.T., Cardinali A., “Role of phenolics in the resistance mechanisms of plants against fungal pathogens and insects”, *Phytochemistry: Advances in Research*, 23-67 ISBN: 81-308-0034-9, (2006).
- [18] Harborne JB., *The Flavonoids: Advances in Research Since 1986*, London, UK: Chapman & Hall, (1994).
- [19] Bennet R.C., Wallsgrave R.M., “Secondary metabolites in plant defence mechanisms”, Tansley, Review No. 72, *New Phytol.*, 127, 617–633, (1994).
- [20] Dixon R.A., Paiva N.L., Stress-induced phenylpropanoid metabolism, *Plant Cell*, 7, 1085–1097, (1995).
- [21] Kühnau J., “The flavonoids. A class of semi-essential food components: Their role in human nutrition”, In: Bourne GH, ed. *World Rev Nutr Diet. Basel, Switzerland: S. Karger*, Vol 24, p. 117–120, (1976).
- [22] Osawa T., Ide A., Su J-D., and Namiki M., “Inhibition of lipid peroxidation by ellagic acid”, *J Agric. Food Chem.*, 35, 808–812, (1987).
- [23] Robards K., Prenzler P.D., Tucker G., Swatsitang P. and Glover W., “Phenolic compounds and their role in oxidative processes in fruits”, *Food Chem.* 66, 401–436, (1999).

- [24] Hayatsu H., Arimoto S. and Negishi T., “Dietary inhibitors of mutagenesis and carcinogenesis”, *Mutat. Res.*, 202, 429–446, (1988).
- [25] Stavric B., “Quercetin in our diet: from potent mutagen to probable anticarcinogen”, *Clin. Biochem.*, 27, 245–248, (1994).
- [26] Uğur, G. *Türk Halılarında Doğal Renkler ve Boyalar*. Türkiye İş Bankası Kültür Yayınları, Genel Yayın No:289, Sanat Dizisi:42, Ankara. (1988).
- [27] Dölen, E., *Tekstil Tarihi*. Marmara Üniversitesi Teknik Eğitim Fakültesi. Matbaa Eğitimi Bölümü Yayın No:6. İstanbul,(1992).
- [28] Eyüboğlu, Ü., Okaygün, I., ve Yaraş, F., *Doğal Boyalarla Yün Boyama*. İstanbul, (1983).
- [29] Karadağ, R., “ *Doğal BoyamacılığınGünümüzdeki El Sanatlarındaki Yeri ve Önemi*”Uluslararası Geleneksel Sanatlar Sempozyumu. 16- 18 Kasım, İzmir, (2006).
- [30] Karadağ, R., *Doğal Boyamacılık*. T.C. Kültür ve Turizm Bakanlığı. Döner Sermaye İşletmesi Merkez Müdürlüğü. Ankara, (2007).
- [31] Arlı, M., ‘Doğal Bitkisel Boyalarla Boyama Yöntemleri Üzerinde Düşünceler’. 2. *Ulusal El Sanatları Sempozyumu Bildirileri* . Dokuz Eylül Üniversitesi Güzel Sanatlar Fakültesi Yayınları No: 19.İzmir, (1984).
- [32] Harmancıoğlu, M. *Lif Teknolojisi*. Cilt 1. E.Ü. Ziraat Fak. İzmir, (1973).
- [33] Harmancıoğlu, M., *Türkiye’de Bulunan Önemli Bitki Boyalarından Elde Olunan Renklerin Çeşitli Müessirlere Karşı Yün Üzerindeki Haslık Dereceleri*, Ankara Üniversitesi Ziraat Fakültesi Yayınları:77, Çalışmalar:41, Ankara Üniversitesi Basımevi , Ankara, (1955).
- [34] Anmaç,E., ‘İngiliz Sermayesinin BatıAnadolu Halıcılığına Etkisi ve Şark Halı Kumpanyası’ . *Kamu ve Özel Kuruluşlarla Orta Öğretimde, Üniversitelerde El Sanatlarına Yaklaşım ve Sorunları Sempozyumu Bildirileri*. Türk Tarih Kurumu Basımevi. İzmir, (1994).
- [35] Enez, N., *Doğal Boyamacılık*. Marmara Üniversitesi Yayın No: 449. Güzel Sanatlar Fakültesi Yayın No:1. İstanbul,(1988).
- [36] Deniz, B., *Türk Dünyasında Halı ve Düz Dokuma Yaygıları*. Atatürk Yüksek Kurumu. Atatürk Kültür Merkezi Yayını:215. Ankara . (2000).
- [37] Nishida K, Kobayashi K. Dyeing properties of natural dyes from vegetable sources. Part 2. *Am Dyst Rep*;81(9):26. (1992).



- [38] Brückner U, Struckmeier S, Dittrich J-H, Reunmann R-D, Zur Echtheit von Färbungen mit ausgewählten Naturfarbstoffen auf Synthefasergeweben. *Textilveredlung*; 32:112-5. (1997).
- [39] Lockhande HT, Dorugade VA..Dyeing nylon with naturel dyes. *Am Dyest Rep*, 88(2):29-34. (1999).
- [40] Bechtold T., Turcanu A., Ganglberger E., Geissler S., Natural dyes in modern textile dyehouses- how to combine experiences of two centuries to meet the demands of the future. *Journal of Cleaner Production* 11 499-509. (2003).
- [41] Özgüven, A., Yılmaz, C., Güneydoğu Anadolu Bölgesinde Nar Yetiştiriciliği, TÜBİTAK TARP Yayını makalesi. (2006).
- [42] Ebcioğlu, N. Sağlığımızın Yapıtaşları Sebze ve Meyveler Tanımları, Besin Değerleri, Yararlı Etkileri, Üretimleri ve Yetiştirilmeleri, Remzi Kitabevi, s. 208, İstanbul. (2003).
- [43] Sarıca, Ş. Nar suyu yan ürünlerinin hayvan beslemede kullanım olanakları. *Gaziosmanpaşa Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi* 28(2): 97-101, (2011).
- [44] Voravuthikunvhai, S. P., Sririrak, T., Limsuwan, S., Supawita, T., Lida, T., Honda, T., Inhibitory Effects of Active Compounds from *Punica granatum* Pericarp on Verocytotoxin Production by Enterohemorrhagic *Escherichia Coli* 0157:H7. *Journal of Health Science*, 51 (5):590-596, (2005).
- [45] Göktürk, A., Ölmez, Z., Temel, F., Some Native Plants for Erosion Control Efforts in Çoruh River Valley, Artvin, Turkey. *Pakistan J. Of Biological Sciences*, 9 (4):667-673, (2006).
- [46] Anesini, C., Perez, C., Screening of Plants Used in Argentine Folk Medicine for Antimicrobial Activity. *J. Ethnopharmacol.*, 39:119-128, (1993).
- [47] Sudheesh, S., Vijayalakshmi, N. R., Flavonoids nfrom *Punica granatum*– Potential Antiperoxidative Agents. *Fitoterapia*, 76:181-186, (2005).
- [48] Mahmoud, A., Nawwar, M., Sahar, A., Hussein, M., Merfort, I., NMR Spectral Analysis of Polyphenols from *Punica granatum*. *Phytochemistry*, 36:793-798. (1994).
- [49] Aslam,M., Cultivation, Conservation and Propagation of Medicinal Herbs. *Introduction of Medicinal Herbs and Species as Crop Ministry of Food, Agriculture and Livestock*, p. 104, Islamabad, (2006).
- [50] Özgüven, A., Yılmaz, C., Gökçeli Fidancılık WEB Sayfası Nar Yetiştiriciliği makale,(2000).

- [51] Özgüven, A., Yılmaz, C., ÇÜ Tarımsal Yayım, Haberleşme Araştırma ve Uygulama Merkezi Çiftçi Broşürü makale,(2000).
- [52] Vardin, H., Harran ovasında yetişen değişik nar çeşitlerinin gıda sanayinde kullanım olanakları üzerine bir çalışma, Doktora Tezi, Çukurova Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü. Adana, 130s, (2000).
- [53] Miller, A. *Punica protopunica*. 2006 IUCN Red List of Threatened Species, (2004).
- [54] Afaq F, Saleem M, Krueger CG, Reed JD, Mukhtar H. Anthocyanin- and hydrolyzable tannin-rich pomegranate fruit extract modulates MAPK and NF- $\kappa$ B pathways and inhibits skin tumorigenesis in CD-1 mice. *Int J Cancer*, 113: 423-433, (2005).
- [55] Lansky EP, Harrison G, Froom P, Jiang WG. Pomegranate (*Punica granatum*) pure chemicals show possible synergistic inhibition of human PC-3 prostate cancer cell invasion across Matrigel<sup>TM</sup>. *Invest New Drugs*; 23: 121-122, (2005).
- [56] Seeram NP, Adams LS, Henning SM, et al. In vitro antiproliferative, apoptotic and antioxidant activities of punicalagin, ellagic acid and a total pomegranate tannin extract are enhanced in combination with other polyphenols as found in pomegranate juice. *J Nutr Biochem*; 16: 360-367, (2005).
- [57] Neurath AR, Strick N, Li Y-Y, Debnath AK. *Punica granatum* (pomegranate) juice provides an HIV-I entry inhibitor and candidate topical microbicide. *BMC Infect Dis*; 4: 1-12, (2004).
- [58] Sumner MD, Elliott-Eller M, Weidner G, et al. Effects of pomegranate juice consumption on myocardial perfusion in patients with coronary heart diseases. *Am J Cardiol*; 96: 810-814, (2005).
- [59] Fuhrman B, Volkova N, Aviram M. Pomegranate juice inhibits oxidized LDL uptake and cholesterol biosynthesis in macrophages. *J Nutr Biochem*; 16: 570-576, (2005).
- [60] de Nigris F, Williams-Ignarro S, Lerman LO, et al. Beneficial effects of pomegranate juice on oxidation-sensitive genes and endothelial nitric oxide synthase activity at sites of perturbed shear stress. *Proc Natl Acad Sci USA*; 102: 4896-4901, (2005).

- [61] Rosenblat M, Hayek T, Aviram M. Anti-oxidative effects of pomegranate juice (PJ) consumption by diabetic patients on serum and on macrophages. *Atherosclerosis*; 187: 363-371, (2006).
- [62] Lansky EP. Beware of pomegranates bearing 40% ellagic acid. *J Med Food* ; 9: 119-122, (2006).
- [63] Shukla, M., Gupta, K., Rasheed, Z., Khan, K. A., Haqqi, T. M., Bioavailable constituents/metabolites of pomegranate (*Punica granatum* L) preferentially inhibit COX2- activity ex vivo and IL-1beta-induced PGE2 production in human chondrocytes in vitro. *Journal of Inflammation*,5:9, (2008).
- [64] Güngör, I., Atatoprak, A., Özer, F., Akdağ, N., Kandemir, N.I., *Bitkilerin Dünyası (In Turkish).Lazer Ofset Matbaa, Ankara, (2002).*
- [65] Kurt, H. Bir ziraat coğrafyası çalışması: Türkiye’de nar (*Punica granatum* L.) tarımı. *Marmara Coğrafya Dergisi* 27: 551-574, (2013).
- [66] Zarei, M., Azizi, M., Zeinolabedin, B. S. Evaluation of physicochemical characteristics of pomegranate (*Punica granatum* L.) fruit during ripening. *Fruits* 66: 121-129, (2011).
- [67] Gil, M. I., Tomas-Barberan, F. A., Hess-Pierce, B., Holcroft, D. M., Kader, A. A. Antioxidant activity of pomegranate juice and its relationship with phenolic composition and processing. *J. Agric. Food Chem.* 48: 4581-4589, (2000).
- [68] Guo, C., Yang, J., Wei, J., Li, Y., Xu, J., Jiang, Y. Antioxidant activities of peel, pulp and seed fractions of common fruits as determined by Frap Assay. *Nutr. Res.* 23: 1719-1726, (2003).
- [69] Singh, R.P., Chidambara-Murthy, K.N., Jayaprakasha, G.K. Studies on the antioxidant activity of pomegranate (*Punica granatum*) peel and seed extracts using in vitro models. *J Agric. Food Chem.* 50(1): 81-86, (2002).
- [70] Vardin. H., Abbasoğlu. M.. 2004. Nar Ekşisi ve Narın Diğer Değerlendirmeye Olanakları. *Geleneksel Gıdalar Sempozyumu*. 23-24 Eylül Van. 165-169, (2004).
- [71] Prashanth, D., M. K.Asha and A. Amit, Antibacterial Activity of *Punica Granatum*. *Fitoterapia*, 72, 171-173, (2001).
- [72] Negi, P. S. and G. K. Jayaprakasha, Antioxidant and Antibacterial Activities of *Punica Granatum* Peel Extracts. *Journal of Food Science*, 68, 1473-1477, (2003).

- [73] Nakamura, Y. and Y. Tonogai, Effect of Grape Seed Polyphenols on Serum and Hepatic Lipid Contents and Fecal Steroid Excretion in Normal and Hypercholesterolemic Rats. *Journal of Health Science*, 48 (6), 570-578, (2002).
- [74] Shabtay, A., H. Eitam, Y. Tadmor, A. Orlov, A. Meir, P. Weinberg, Z. G. Weinberg, Y. Hen, A. Brosh, I. Izhaki and Z. Kerem, Nutritive and Antioxidative Potential of Fresh and Stored Pomegranate Industrial By-Product as a Novel Beef Cattle Feed. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 56(21), 10063-10070, (2008).
- [75] Khan, M., S. S. Khan, Z. Ahmed and A. Tanveer, Production of Fungal Single Cell Protein Using *Rhizopus Oligosporus* Grown on Fruit Wastes. *Biological Forum-An International Journal*, 1(2), 32- 35, (2009).
- [76] Li. Y., Guo. C., Yang, J., Wei. J., Xü. J. , Cheng, S.. Evaluation of Antioxidant Properties of Pomegranate Peel Extract in Comparison vwith Pomegranate Pulp Extract. *Food Chemistry*. Vol:96 Issue 2. 254-260, (2006).
- [77] Cemeroglu, B., Artık, N. , Yüncüler, O., Nar Suyu Üzerinde Araştırmalar. *Do ğa*. 12(3): 322-334, (1988).
- [78] Cemeroglu. B., Artık. N., Erbaş. S., Gewinnung Von Granatapfelsaft Und Seine Zusammensetzung. *Flüssiges Obst* 59. 335-340, (1992).
- [79] Ünal, Ç., Velioglu, S., Cemeroglu, B., Türk Nar Sularının Bileşim Ögeleri. *Gıda*. 20(6):339-345, (1995).
- [80] Melgarejo. P., Salazar, D.M., Artes, F., Organic Acids and Sugars Composition of Harvested Pomegranate Fruits. *Eur. Food Res. Technol.* 211(3), 185-190, (2000).
- [81] Nasr, C. B., N. Ayed and M. Metche, Quantitative Determination of the Polyphenolic Content of Pomegranate Peel. *Zeitschrift für Lebensmitteluntersuchung und Forschung A*, 203, 374-378, (1996).
- [82] Gil, M. I., F. A. Tomas-Barberan, B. Hess-Pierce, D. M. Holcroft, and A. A. Kader, Antioxidant Activity of Pomegranate Juice and Its Relationship with Phenolic Composition and Processing. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 48, 4581-4589, (2000).
- [83] Baytop, T., Türkiye’de Bitkilerle Tedavi; Geçmişte ve Bugün Nobel Tıp Kitap Evleri, İstanbul, 480s, (1999).

- [84] Karadağ, R., Doğal Boyamacılık, Geleneksel El Sanatları ve Mağazalar İşletme Müdürlüğü Yayınları, Ankara, (2007).
- [85] Kazan D., Ortaca (Muğla) ilçesinin Etnobotaniği , Yüksek lisans tezi, Muğla Üniversitesi Fen bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalı, (2007).
- [86] Etikan, S., Sergil (*Plumbago europeae* L.)’den Elde Edilen Renkler ve Bu Renklerin Yün Halı İplikleri Üzerindeki Isık ve Sürtünme Haslıkları. Ankara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Yüksek Lisans Tezi (Basılmamıs), (1996).
- [87] Vardin, H. ve Abbasoğlu, M., Nar ekşisi ve narın diğer değerlendirme olanakları. Geleneksel Gıdalar Sempozyumu (23-24 Eylül 2004, Van) bildirileri, 165-169, (2004).
- [88] Kurt, H. ve Şahin, G., Bir ziraat coğrafyası çalışması: Türkiye’de nar (*Punica granatum* L.) tarımı.Marmara Coğrafya Dergisi, 27: 551-574, (2013).
- [89] LaRue, J. H. Growing Pomegranates in California, University of California, California Agriculture and Natural Resources Leaflet, No: 2459, s. 8, (1980).
- [90] Oğuz, H. İ., Ukav, İ., Eroğlu, D. “Güneydoğu Anadolu Bölgesi’nde Nar (*Punica granatum* L.) Üretimi ve Pazarlanması”, GAP VI. Tarım Kongresi, 09 – 12 Mayıs 2011, s. 108 – 112, Şanlıurfa, (2011).
- [91] Horowitz, S. Apple of Carthage, <http://wiesedruck.com/index.php?/project/apple-of-carthage> (Son erişim: 24.11.2012), (2001).
- [92] Glozer, K., Ferguson, L. Pomegranate Production in Afghanistan, UCDAVIS College of Agricultural & Environmental Sciences, s. 32.,(2008).
- [93] Ünal, A. Bahçe Tarımı – II., Yumuşak Çekirdekli Meyve Türleri ve Nar Yetiştiriciliği, (Editörler: Vedat Şeniz, Veli Erdoğan), T.C. Anadolu Üniversitesi Yayını No: 2358, s. 16 – 19, Eskişehir, (2011).
- [94] Şahin, A. Nar Bahçesi Tesisi, BATEM Yayınları, Yayın No: 28, Antalya, (2006).
- [95] Ekşi, A. ve Akdağ, E. Türkiye’de Meyve Suyu Üretimi ve Tüketimi 2006. 4 Mevsim Meyve Suyu, 5(1); 2-4, (2007).
- [96] Prashanth, D., M. K.Asha and A. Amit, Antibacterial Activity of *Punica Granatum*. *Fitoterapia*, 72, 171-173, (2001).
- [97] Scalbert, A. Antimicrobial Properties of Tannins. *Phytochemistry*, 30, 3875-3878, (1991).

- [98] Panichayupakaranant, P., S. Tewtrakul and S. Yuenyongsawad, Antibacterial, AntiInflammatory and Anti-Allergic Activities of Standardised Pomegranate Rind Extract. *Food Chemistry*, 123, 400-403, (2010)
- [99] Al-Zoreky, N. S. Antimicrobial Activity of Pomegranate (*Punica granatum* L.) Fruit Peels. *International Journal of Food Microbiology*, 134(3), 244-248, (2009).
- [100] Sweetie, R. K., C. Ramesh and S. Arun, Antioxidant and Antimicrobial Activity of Pomegranate Peel Extract Improves the Shelf Life of Chicken Products. *International Journal of Food Science and Technology*, 45, 216-222, (2010).
- [101] Vasconcelos, L. C., F. C. Sampaio, M. Sampaio, C. Pereira, S. Mdo, J. S. Higino and M. H. Peixoto, Minimum Inhibitory Concentration of Adherence of *Punica Granatum* L, (pomegranate) Gel against *S. Mutants*, *S. Mitis* and *C. Albicans*. *Brazilian Dent Journal*, 17, 223-227, (2006).
- [102] Li, Y., C. Guo, J. Yang, J. Wei, J. Xu and S. Cheng, Evaluation of Antioxidant Properties of Pomegranate Peel Extract in Comparison with Pomegranate Pulp Extract. *Food Chemistry*, 96(2), 254-260, (2006).
- [103] Shabtay, A., H. Eitam, Y. Tadmor, A. Orlov, A. Meir, P. Weinberg, Z. G. Weinberg, Y. Hen, A. Brosh, I. Izhaki and Z. Kerem, Nutritive and Antioxidative Potential of Fresh and Stored Pomegranate Industrial By-Product as a Novel Beef Cattle Feed. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 56(21), 10063-10070, (2008).
- [104] Negi, P. S. and G. K. Jayaprakasha, Antioxidant and Antibacterial Activities of *Punica Granatum* Peel Extracts. *Journal of Food Science*, 68, 1473-1477, (2003).
- [105] Poyrazoğlu. E.. Gökmen, V.. Artık, N., Organic Acids and Pfenolic Compo unds in Pom egranates (*Punica granatum* L.) Grown in Turkey. *Journal of Food Com position and Analysis*. 15. 567-575, (2002).
- [106] Fadavi. A., Barzegar. M.. Azizi. M.H.. Bayat, M., Physicochemical Composition ot Ten Pomegranate Cultivars (*Punica granatum* L.) Grovvn in Iran. *Food Sci Tech Int* 2005; 11(2):113-119, (2005).
- [107] Markh, A. T. ,, Lysoger, T. A., *Izv. Vyssh. Uchebn. Pishch. Tekhnol.*, 2, 36-38, (1973).

- [108] Alper. N., Bahçeci. K.S., Acar. J.. Influence of Processing and Pasteurization on Color Values and Total Phenolic Compounds of Pomegranate Juice. *Journal of Food Processing and Preservation*. 29. 57-368, (2005).
- [109] Bayındırlı, L., Şahin, S., Artık, N., The Effects of Clarification Methods On Pomegranate Juice Quality. *Fruit Process* 3, 267-270, (1994).
- [110] Perez-Vicente. A., Serrano P., Abellan, P., Garcia-Viguera, C., Influence of Packaging Material on Pomegranate Juice Colour and Bioactive Compounds, During Storage. *J. Sci. Food Agric.* 84: 639-644, (2004).
- [111] Mori-Okamoto. J., Otawara-Hamamoto, Y., Yamato. H., Yoshimura, H. Pomegranate Extract Improves a Depressive Menopausal Syndrome Model Ovariectomized Mice. *J. Ethnopharmacology*. 92. 93-101, (2004).
- [112] Seeram. N.P., Adams. L.S., Henning, S.M., Niu. Y.T., Zhang, Y.J., Nair. M.G., Heber D.. In vitro Antiproliferative, Apoptotic and Antioxidant Activities of Punicalagin, Ellagic Acid and a Total Pomegranate Tannin Extract are Enhanced in Combination with other Polyphenols as Found in Pomegranate Juice. *Journal of Nutritional Biochemistry* 16(6): 360-367, (2005).
- [113] Martı, N., Perez-Vicente, A., Garcia-Viguera. C., Influence of Storage Temperature and Ascorbic Acid Addition on Pomegranate Juice. *J. Sci. Food. Agric.* 82:217-221, (2001).
- [114] Fuhrman. B., Volkova, N., Aviram. M., Pomegranate Juice Inhibits Oxidized LDL Uptake and Cholesterol Biosynthesis in Macrophages. *Journal of Nutritional Biochemistry*. 16(9): 570-576, (2005).
- [115] De Nigris. F., Williams-Ignarro. S., Lerman, L.O., Crimi, E., Botti, C., Mansueto, G., D'armiento. F.P., De Rosa. G., Sica. V., Ignarro. L.J., NAPOLI, C.. Beneficial Effects of Pomegranate Juice on Oxidation-Sensitive Genes and eNos Activity at Sites of Perturbed Shear-Stress. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 102 (13): 4896-4901, (2005).
- [116] Malik, A., Afaq. F., Sarfaraz, S., Adhami, V.M., Syed. D.N., Mukhtar, H., Pomegranate Fruit Juice for Chemoprevention and Chemotherapy of Prostate Cancer. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 102 (41): 14813-14818, (2005).
- [117] Morton. J., Pomegranate. In: *Fruits of Warm Climates Creative Resource Systems, Inc.* Box 890, Winterville, N.C. 28590 p.352-355, (1987).

- [118] Perez-vicente. A., Serrano P., Abellan, P., Garcia-viguera, C Influence of Packaging Material on Pomegranate Juice Colour and Bioactive Compounds, During Storage. *J. Sci. Food Agric.* 84: 639-644, (2004).
- [119] Aviram, M., Rosenblat, M., Volkova, N. and Coleman, R. Pomegranate by product administration to apolipoprotein e-deficient mice attenuates atherosclerosis development as a result of decreased macrophage oxidative stress and reduced cellular uptake of oxidized low-density lipoprotein. *J. Agric. Food Chemistry*, 54; 1928-1935, (2006).
- [120] Malik, A., Afaq, F., Sarfaraz, S., M.Adhami, V., Syed, D., Mukhtar, H. Pomegranate fruit juice for chemoprevention and chemotherapy of prostate cancer. Department of Dermatology, University of Wisconsin, Madison, WI 53706, (2005).
- [121] Okamoto, L.M., Hamamoto, Y.O., Yamato, H. and Yoshiruma, H. Pomegranate extract improves a depressive state and bone properties in menopausal syndrome model ovariectomized mice. *Journal of Ethnopharmacology*, 92; 93-101, (2004).
- [122] Coşkun, F. Gıdalarda bulunan doğal koruyucular. *Gıda teknolojileri elektronik dergisi* 2006 (2) 27-33, ISSN:1306-7648 [www.teknolojikarastirmalar.org](http://www.teknolojikarastirmalar.org) (13.01.2007), (2006).
- [123] Schobinger, U. *Frucht-und Gemüsesäfte*. Eugen Ulmer GmbH. 637 s. Stuttgart, (1987).
- [124] Poyrazoğlu. E., Gökmen, V. and Artık, N. Organic acids and phenolic compounds in pomegranate (*Punica Granatum L.*) grown in Turkey. *J. Food Composition and Analysis*, 15, 567-575, (2002).
- [125] Mazza, G. and Miniati, E.. *Anthocyanins in fruits, vegetables and grains*. CRC Press. 362 p. London, (1993).
- [126] Ünal, Ç., Velioglu, S. ve Cemeroğlu, B.. Nar sularının bileşim öğeleri. *Gıda*, 20(6), 339-345, (1995).
- [127] Fischer-Zorn, M. and Ara, V. Pomegranate juice- chemical composition and potential adulteration. *Science & Research*, volume 17, 4s, 204-213, (2007).
- [128] Harmancıoğlu, M., Türkiye’de Bulunan Önemli Bitki Boyalarından Elde Olunan Renklerin Çeşitli Müessirlere Karşı Yün Üzerindeki Haslık Dereceleri, Ankara Üniversitesi Ziraat Fakültesi Yayınları:77, Çalışmalar:41, Ankara Üniversitesi, (1955).



- [129] Eyüboğlu, Ü., D. Okaygün, F., Yaraş, Doğal Boyalarla Yün Boyama. Uygulamalı ve Geleneksel Yöntemler, Özkur Basımevi, İstanbul, (1983).
- [130] Kılıç, B., Nar (*Punica granatum L.*) Meyve Kabuğundan Elde Edilen Renkler ve Bu Renklerin Yün Halı Đplikleri Üzerindeki Işık ve Sürtünme Haslıkları. Ankara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Yüksek Lisans Tezi (Basılmamış), (1994).
- [131] Simson, M.G. *Plant Systematics*. Elsevier Academic Pres. California, (2006).
- [132] Tuzlaci, E., Aymaz, P.E., Turkish folk medicinal plants, Part IV: Gönen (Balıkesir). *Fitoterapia* 72, 323–343, (2001).
- [133] Kùltür, S., Medicinal plants used in Kırklareli Province (Turkey). *J. Ethnopharmacol.* 111, 341–364, (2007).
- [134] Grieve, M., *A Modern Herbal*. Penguin, London, UK, (1984).
- [135] Ali-Shtayeh, M.S., Reem, M.R., Yaghmour, Y.R., Salem, F.K., Al-Nuri, M.A., Antimicrobial activity of 20 plants used in folkloric medicine in the Palestinian area. *J. Ethnopharmacol.* 60, 265–271, (1998).
- [136] Shi, H., Noguchi, N. and Niki, E., “Introducing Natural Antioxidants. In *Antioxidants in food*” *CRC Press*, ISBN 1 85573 463, USA, (2001).
- [137] Fukumoto, L. R. and Mazza, G., “Assessing antioxidant and prooxidant activities of phenolic compounds”, *J. Agric. Food Chem*, 48, 3597-3604, (2000).
- [138] Vieira, A., A comparison of traditional anti-inflammation and anti-infection medicinal plants with current evidence from biomedical research: results from a regional study. *Pharmacognosy Res.* 2, 293–29, (2010).
- [139] EMEA, European Medicines Agency, Committee on Herbal Medicinal Products (HMPC). Final community herbal monograph on *Ruscus aculeatus L. rhizome*. EMEA, London, Doc. Ref. EMEA/HMPC/261938/2007, (2008).
- [140] ESCOP (European Scientific Cooperative on Phytotherapy), *Butcher’s Broom*. Thieme, Stuttgart, Germany, (2003).
- [141] Hadzifejzovic, N., Flavonoide und Hydroxyzimtsäureamide in *Ruscus aculeatus L.* und in anderen verwandten Arten. *Strukturaufklärung, Verteilung und physiologische Bedeutung*. University of Münster, Germany (PhD Thesis), (2006).

- [142] Luís, Â., Domingues, F., Duarte, A.P., Bioactive compounds, RP-HPLC analysis of phenolics, and antioxidant activity of some Portuguese shrub species extracts. *Nat. Prod. Commun.* 6, 1863–1872, (2011).
- [143] Vukićević, E., *Rod Ruscus L. In Flora SR Srbije, Vol. VII. In: Josifović, M, (Ed.), SANU. Odeljenje prirodno matematičkih nauka, Beograd, (1975).*
- [144] Silić, C., *Atlas drveća i grmlja. Zavod za izdavanje udžbenika, Sarajevo, (1973).*
- [145] Martínez-Pallé E, Aronne G. *Bot J Linn Soc*;134:443, (2000).
- [146] Baytop, T., *Türkiye’de Bitkilerle Tedavi; Geçmişte ve Bugün Nobel Tıp Kitap Evleri, İstanbul, (1999).*
- [147] Eşen, B., *Aydınlar Köyü ve çevresinin (Erdeмли / Mersin) Etnobotanik Özellikleri, Yüksek Lisans Tezi, Selçuk Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Konya, (2008).*
- [148] Polat, R. *Havran Burhaniye (Balıkesir) Çevresinde Tarımsal Biyoçeşitlilik ve Etnobotanik Araştırmalar Balıkesir Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Bilim Dalı, Yayınlanmamış Doktora Tezi, Balıkesir, (2010).*
- [149] Enes, N., *Doğal Boyamacılık, Anadolu’da Yün Boyamacılığında Kullanılmış Olan Bitkiler ve Doğal Boyalarla Yün Boyamacılığı, Marmara Ün. Yayın No: 449, Fatih Yayınevi, İstanbul (1987).*
- [150] Waldvogel FA., “Staphylococcus aureus (Including Staphylococcal Toxic Shock)” Mandell GL, Bennett JE, Dolin R (eds). *Mandell, Douglas and Bennet’s Principles and Practice of Infectious Diseases, New York: Churchill Livingstone; 2, 2069-2092, (2000).*
- [151] Cengiz A.T. ve Ustacelebi Ş., “Staphylococcus”, *Temel ve Klinik Mikrobiyoloji, Güneş Kitabevi, Ankara; 339-346, (1999).*
- [152] Morgan, M., *Methicillin-resistant Staphylococcus aureus and animals: zoonosis or humanosis J Antimicrob. Chemother. 62: 1181-1187,(2008).*
- [153] Akan, M. *Staphylococcus İnfeksiyonları. 5-13. İlke-Emek Yayınları, Ankara. 332, ( 2006).*
- [154] Peacock, S. *Staphylococcus aureus. 73-98. John Wiley&Sons Ltd, England. 605., (2006).*
- [155] Leonard, F.C., Markey, B.K, *Meticillin-resistant Staphylococcus aureus in animals: A review. Vet J. 175: 27-36, (2008).*

- [156] Gordon, R.J., Lowy, F.D. Pathogenesis of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infection. *Clin. Infect. Dis.* 46: 350-359, (2008).
- [157] de Jonge, B.L., Tomasz, A. Abnormal peptidoglycan produced in a methicillin-resistant strain of *Staphylococcus aureus* grown in the presence of methicillin: functional role for penicillin-binding protein 2A in cell wall synthesis. *Antimicrob. Agents Chemother.* 37: 342-346, (1993).
- [158] Erdem B. ve Ustacelebi, Ş., “Enterobacteriaceae”, Temel ve Klinik mikrobiyoloji, Guneş Kitabevi, 1. Baskı, 471-515, (1999).
- [159] Bilgehan H., “Klebsiella” Prof. Dr. Hakkı Bilgehan, Klinik mikrobiyoloji- Özel Bakteriyoloji ve Bakteri Enfeksiyonları, Barış yayınları, 10. Baskı, 59-68, (2000).
- [160] Toreci K., Topcu, A., Soyletir, vG., Doğanay, “*Escherichia* türleri” infeksiyon hastalıkları ve mikrobiyolojisi, Nobel tıp kitapevleri, cilt 2,: 1564-1574, (2002).
- [161] Bilgehan H., “*Escherichia*” Prof. Dr. Hakkı Bilgehan, klinik mikrobiyoloji- Özel Bakteriyoloji ve Bakteri Enfeksiyonları, Barış yayınları, 10. Baskı, 3-17, (2000).
- [162] Vahaboğlu H. ve Akhan S.C., “*Pseudomonas aeruginosa* ve Diğer *Pseudomonas* türleri” , Nobel Tıp Kitapevleri,1608- 1616, (2002).
- [163] Erdem B., “*Pseudomonaslar*” Prof. Dr. Şemsettin Ustacelebi, “Temel ve Klinik mikrobiyoloji”, Guneş Kitabevi, 1. Baskı, 551-558, (1999).
- [164] Bilgehan H., “Klinik Mikrobiyoloji”, Özel Bakteriyoloji ve Bakteri Enfeksiyonları, Fakülteler Kitabevi, İzmir, 70-75, (1996).
- [165] Granum, P.E., Lund, T., “*Bacillus cereus* and its food poisoning toxins”, *FEMS Mic. Letters* 157, 223-228, (1997).
- [166] Ryan KJ; Ray CG (editors) *Sherris Medical Microbiology*, 4th ed., McGraw Hill. ISBN 0-8385-8529-9, (2004).
- [167] Giannella RA "Salmonella". Baron S et al (eds.). *Baron's Medical Microbiology* (4th ed. bas.). ISBN 0-9631172-1-1.,(1996).
- [168] Hasenekoglu, M., “Toprak Mikrofungusları, 1”, Atatürk Üniversitesi Yayınları, Erzurum, 309-310, (1991).
- [169] Samson, R.A., Hoekstra, E.S., Frisvad, J.C. and Filtenborg, O., “Introduction to food- and airborne fungi”, *Centraalbureau Voor Schimmelcultures*, Utrecht, ISBN 90-7031-42-0, 72, (2002).

- [170] Gedikoglu, S., “Mycobacterium tuberculosis’in hücre yapısı”, *İnfeksiyon Derg.*, 11, 13-18, (1998).
- [171] Kocagöz, T., “Mikobakteri genetiği araştırmalarının, hastalık biyolojisi, tanı ve tedavine getirmekte olduğu önemli gelişmeler,” 2. Ulusal Mikobakteri Sempozyum Kitabı, Ankara, 20-25, (1998).
- [172] Mcfadden, J. and Stoker, N., “Mycobacteria, Ed: MEYERS, R.A.: Molecular Biology and Biotechnology : a comprehensive desk reference”, VCH Publishers, New York, 582-585, (1995).
- [173] Kent, P.T. and Kubica, G.P., “Public health mycobacteriology: a guide for the level III laboratory”, USDHHS. Centers for Disease Control, Atlanta, (1985).
- [174] Milardovic, S., Ivekovic, D., Grabaric, B.S., “A novel amperometric method for antioxidant activity determination using DPPH free radical”, *Bioelectrochemistry*, 68, 175–180, (2006).
- [175] Clinical Laboratory Standards Institute. Performance standards for antimicrobial disk susceptibility tests; Approved standard—9th ed. CLSI document M2-A9. 26:1. Clinical Laboratory Standards Institute, Wayne, PA, (2006).
- [176] National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS). Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria that Grow Aerobically, IV. Ed., Approved Standard M7-A4, Wayne, P.A, (1997).
- [177] National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS). Reference method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Yeasts, Approved Standard M27-A, Wayne, P.A, (1997).
- [178] Becton, Dickinson and Company Newsletter, “BD Bactec MGIT 960 SIRE kit now FDA-cleared for susceptibility testing of Mycobacterium tuberculosis” *LAB O Microbiology News & ideas* ,13, 4-4, (2002).
- [179] Duran Kerim, *Tekstilde Renk Ölçümü Ve Reçete Çıkarma*, E.Ü. Tekstil Ve Konfeksiyon Araştırma-Uygulama Merkezi, Bornova/İzmir, (2001).
- [180] Devrent, N., Yılmaz, N.,D., *Tekstil Endüstrisinde Kullanılan Antimikrobiyal Lifler. Nonwoven Technical Textiles Technology Dergisi*, 4.sayı, 48-55, (2004).
- [181] Palamutçu, S., Keskin, R., Devrent, N., Şengül, M., Haşçelik, B., *Fonksiyonel Tekstiller II: Antimikrobiyal Tekstiller*, *Tekstil Teknolojileri Elektronik Dergisi Cilt: 3, No: 3*, (2009).

- [182] Gang, S., , Durable and Regenerable Antibacterial of Fabrics, Biocidal Properties, Textile Chemist and Colorist, 6, 26-30,(1998).
- [183] Shao, H., Jiang, L., Meng, W., Qing, F., , Synthesis and Antimicrobial Activity of a Perfluoroalkyl-containing Quaternary Ammonium Salt. Journal of Fluorine Chemistry, 124, 89-91, (2003).
- [184] Seeley, W.,H., VanDemark P.,J., Microbes in Action a Laborotory Manuel of Microbiology, Third Edition , W.H. Freeman and Company, 386s, (1981).
- [185] CollinS, C., H. and LYNE, P., M., Microbiological Methods. Butterworths & Co. (Publishers) Ltd. London, 450s. ,(1989).
- [186] Uruş, S., Serindağ, O., Dığrak, M.,. Synthesis, Characterization and antimicrobial activities of Cu(I), Ag(I) and Co(II) Complexes with [CH<sub>3</sub>N(CH<sub>2</sub>PPh<sub>2</sub>)<sub>2</sub>]. Heteroatom Chem., 16, 6, 484-491,(2005).
- [187] Şahin, Ö., Bulgun, E.Y., Kayacan, O., Isıtma Fonksiyonlu Akıllı Giysiler. ASYUINISTA, Akıllı sistemlerde Yenilikler ve Uygulamaları Sempozyumu, İstanbul,(2004).
- [188] Dülger, B., Ceylan, M., Alıtsaous, M., Uğurlu, E., “Artemisia absinthium L. (Pelin)’un Antimikrobial Aktivitesi”, Tr. J. Biology, 23: 377-384, (1999).
- [189] Askun, T, Tumen, G., Satil, F., Ates M., “In vitro activity of methanol extracts of plants used as spices against Mycobacterium tuberculosis and other bacteria”, Food Chemistry, 116, 289–294, (2009).
- [190] Askun, T., Tumen, G., & Satil, F. A. “Characterization of the phenolic composition of five plant methanol extracts and their antimicrobial activities.” Pharmaceutical Biology, 46(10–11), 688–694, (2008).
- [191] Dağcı, E. K., Dığrak, M., Bazı Meyve Ekstraktlarının Antibakteriyel ve Antifungal Aktiviteleri, KSÜ Fen ve Mühendislik Dergisi, 8(2), (2005).
- [192] Omoregie, E. H., Folashade, K. O., Ibrahim, I., Nkiruka, O. P., Sabo, A. M., Koma, O. S., Ibumeh, O. J., Phytochemical Analysis and Antimicrobial Activity of Punica granatum L. (fruit bark and leaves), New York Science Journal, 3(12), (2010).
- [193] Panichayupakaranant, P., Tewtrakul, S., Yuenyongsawad, S., Antibacterial, Antiinflammatory and Anti-allergic Activities of Standardised Pomegranate Rind Extract, Food Chemistry, 123: 400-403, (2010).

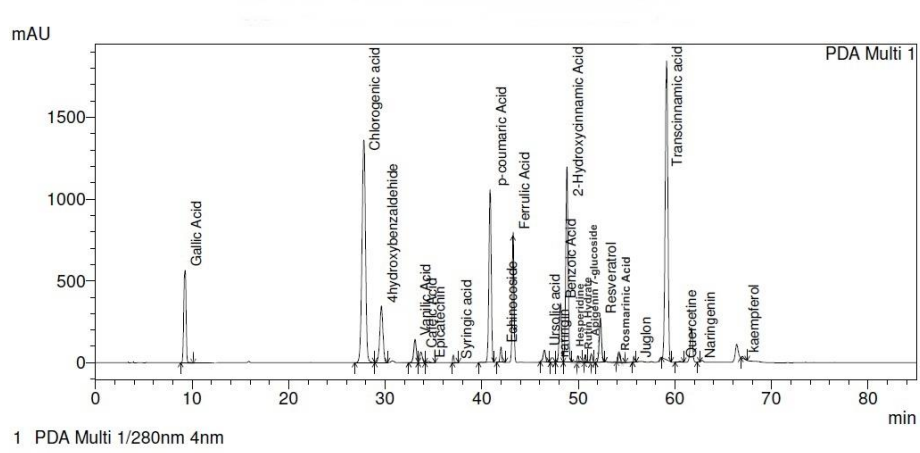
- [194] Shan, B., Cai, Y-Z., Brooks, J. D. Corke, H., The in vitro Antibacterial Activity of Dietary Spice and Medicinal Herb Extracts, *International Journal of Food Microbiology*, 117: 112-119, (2007).
- [195] Aziz, N.H., Farag, S.E., Mousa, L.A.A. and Abo-Zaid, M.A., “Comparative antibacterial and antifungal effects of some phenolic compounds”, *Microbios*, 93, 374, 43-54, (1998).
- [196] Ferket PR Alternatives to antibiotics in poultry production: responses, practical experience and recommendations. *Proceedings of Alltech’s 20th Ann Symp*, Alltech Technical Publications, Nottingham University Press. Nicholasville, KY, pages:57–67, (2004).
- [197] Aslan R, Dündar Y, Eryavuz A, Bülbül A, Küçükkurt İ, Fidan AF, Akıncı Z Effects of Different Dietary Levels of Yucca Shidigera powder (deodorase) added to diets on performance, some hemotological and biochemical blood parameters and total antioxidant capacity of laying hens. *Revue Méd Vét*, 156 (6):350-355, (2005).
- [198] Lee, S., Cho, J., Cho, G., Antimicrobial and Blood Repellent Finishes for Cotton and Nonwoven Fabrics Based on Chitosan and Fluoropolymers, *Textile Research Journal*, 69(2), s104-112, (1999).
- [199] Nakashima, T., Sakagami, Y., Ito, H., Matsuo, M., Antimicrobial Activity of Cellulose Fabrics Modified with Metallic Salts, *Textile Research Journal*, 71(8), s688-694,(2001).
- [200] Borsa, J., Lazar, K., Kiss, K., Zala, J., Hastanelerde Kullanılan Pamuklu Kumaşlar.n Y.kamaya Dayan.kl. Antimikrobiyal Bitim İşlemi, 10. Uluslararası. İzmir Tekstil ve Hazır Giyim Sempozyumu, İzmir, (2004).

# **EKLER**

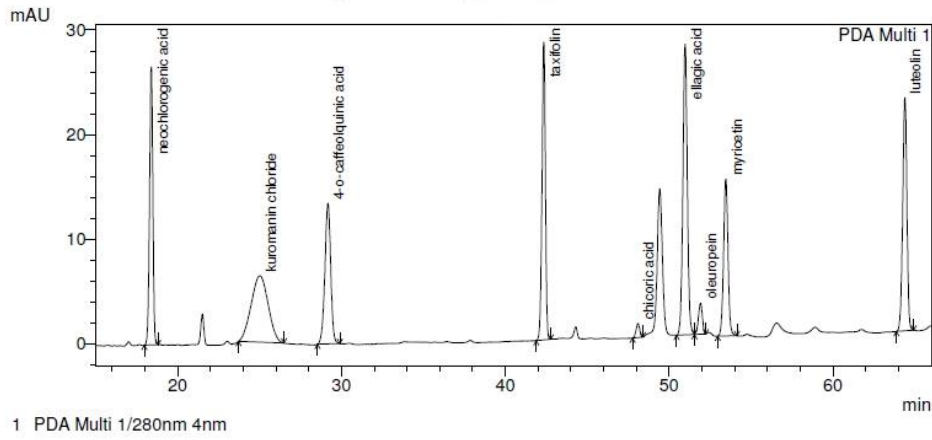
## 6. EKLER

### EK A : HPLC Kromatogramları

#### <Chromatogram>



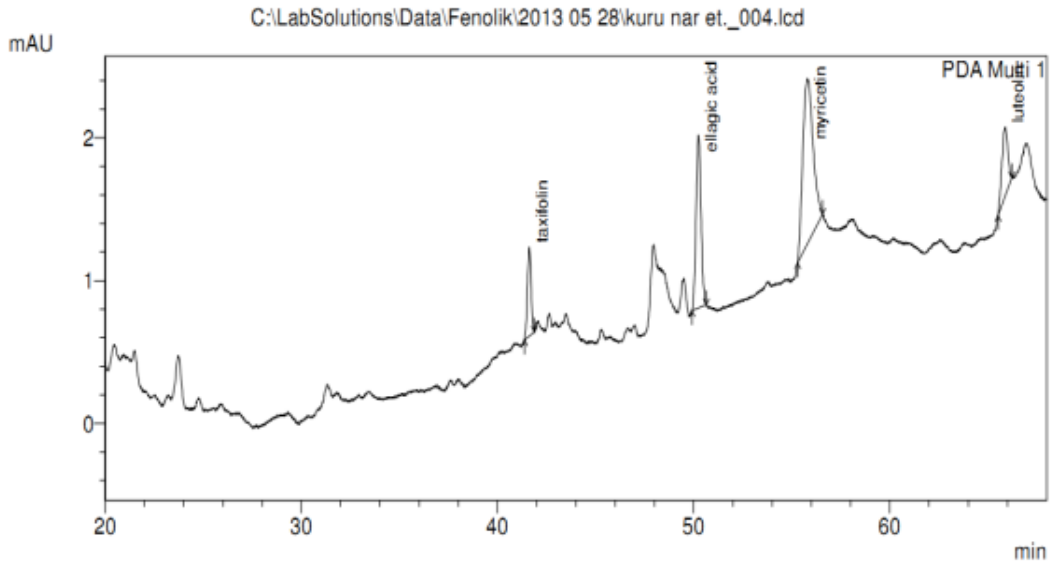
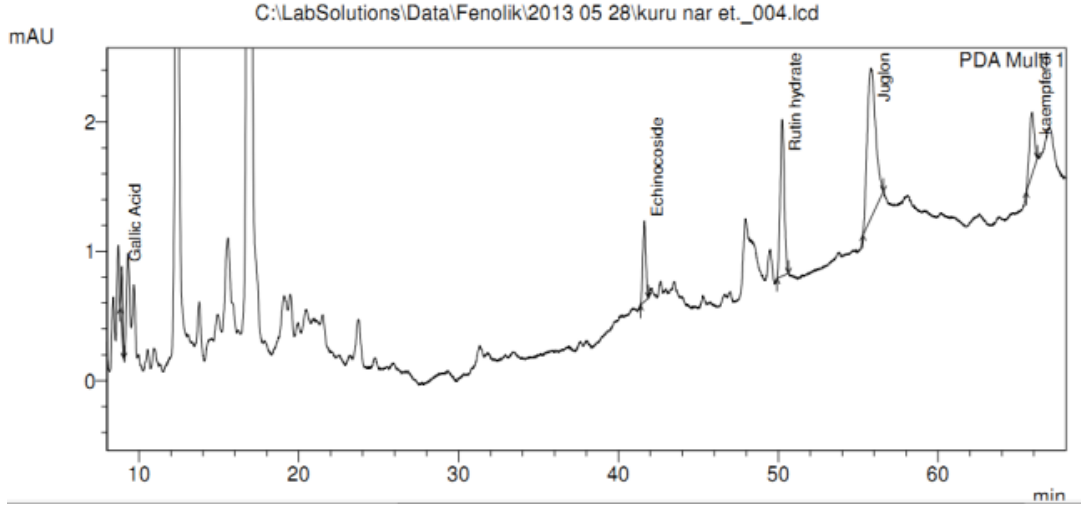
#### <Chromatogram>



Şekil A. 1: HPLC standart kromatogramı.

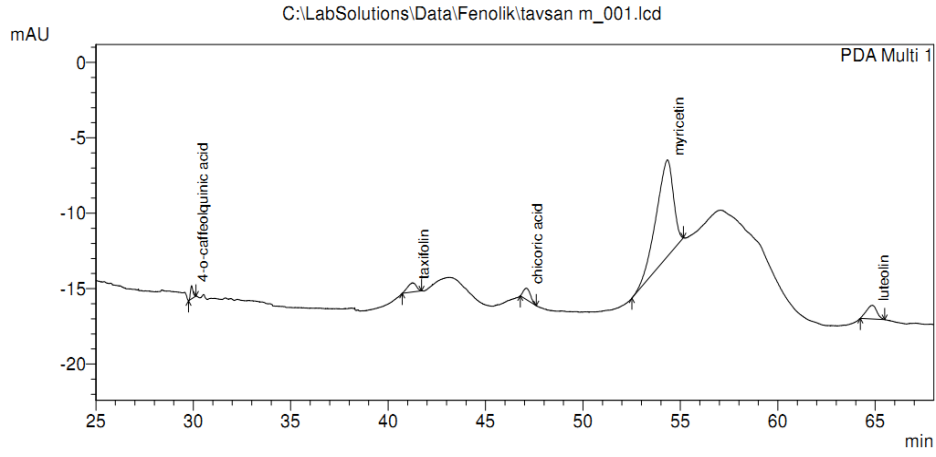
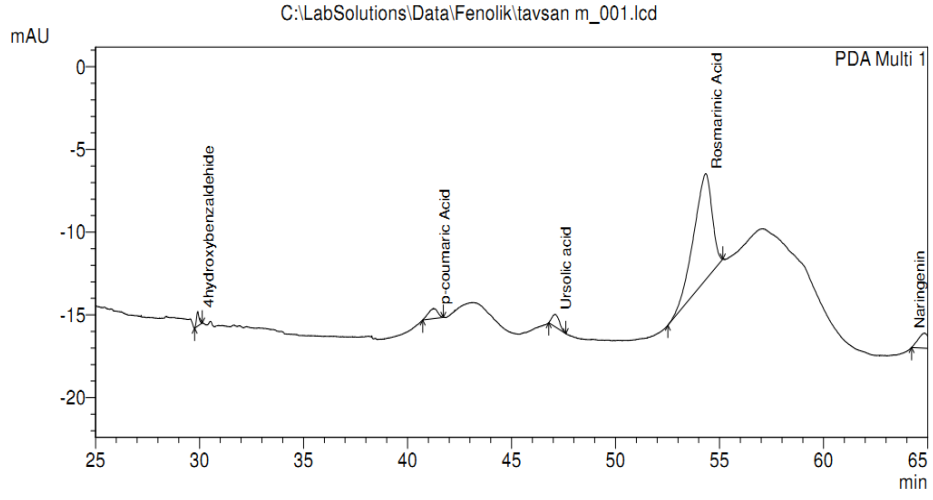
**Standartlar ;** 1, Gallic asit, 2, klorogenik asit , 3, 4-hydroxybenzaldehit ,4,vanillik asit, 5,kafeik asit , 6,epicatechin , 7,syringic asit , 8,echinococside , 9,p-coumaric asit , 10, Ferrulic Acid , 11, Benzoic Acid ;12, 2-Hydroxycinnamic asit, 13,hesperidin , 14, Rutin Hydrate , 15,resveratrol ,16,rosmarinic asit ,17,transcinnamic asit, 18,quercetine, 19, juglon, 20, apigenin-7-glukozit, 21, naringin, 22, naringenin, 23, kaempferol, 24, ellagic asit, 25, neoklorogenik asit, 26, oleuropein, 27, myricetin, 28, luteolin, 29, taxifolin, 30, 4-o-caffeoylquinic asit, 31, kuromanin chloride, 32, chicoric asit, 33, ursolic acid.





**Şekil A. 2:** *Punica granatum* (nar) için HPLC kromatogramı.

<Chromatogram>



Şeki A. 3: *Ruscus aculeatus* (Tavşan memesi-kök) için HPLC kromatogramı.