T.C.

TRAKYA ÜNİVERSİTESİ

FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

Pyrus elaeagrifolia BİTKİSİ EKSTRELERİNİN FENOLİK MADDE İÇERİKLERİ, DPPH RADİKALİ GİDERME AKTİVİTELERİ VE İN VİTRO ANTİMİKROBİYAL ETKİLERİNİN BELİRLENMESİ

FULYA GÜDÜCÜ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

Tez Danışmanı: PROF. DR. FİGEN ERTAN

EDİRNE-2014

T.Ü. Fen Bilimleri Enstitüsü onayı

Prof. Dr. Mustafa ÖZCAN
Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürü

Bu tezin Yüksek Lisans tezi olarak gerekli şartları sağladığını onaylarım.

Prof. Dr. Yılmaz ÇAMLITEPE
Anabilim Dalı Başkanı

Bu tez tarafımca okunmuş, kapsamı ve niteliği açısından bir Yüksek Lisans tezi olarak kabul edilmiştir.

Prof. Dr. Figen ERTAN
Tez Danışmanı

Bu tez, tarafımızca okunmuş, kapsam ve niteliği açısından Biyoloji Anabilim Dalında bir Yüksek Lisans tezi olarak oy birliği ile kabul edilmiştir.

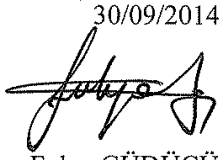
Jüri Üyeleri	İmza
Prof. Dr. Figen ERTAN	
Doç. Dr. Şebnem SELEN İŞBİLİR	
Yrd. Doç. Dr. Filiz SANAL	

Tarih: 30/09/2014

T.Ü. FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
BİYOLOJİ ANABİLİM DALI YÜKSEK LİSANS PROGRAMI
DOĞRULUK BEYANI

İlgili tezin akademik ve etik kurallara uygun olarak yazıldığını ve kullanılan tüm literatür bilgilerinin kaynak gösterilerek ilgili tezde yer aldığını beyan ederim.

30/09/2014



Fulya GÜDÜCÜ

Yüksek Lisans Tezi

***Pyrus elaeagrifolia* Bitkisi Ekstrelerinin Fenolik Madde İçerikleri, DPPH Radikali Giderme Aktiviteleri ve İn vitro Antimikrobiyal Etkilerinin Belirlenmesi**

T.Ü. Fen Bilimleri Enstitüsü

Biyoloji Anabilim Dalı

ÖZET

Bu çalışmada *Pyrus elaeagrifolia* halk dilinde yabani armut ya da ahlat olarak bilinen bitki ekstrelerinin fenolik madde içerikleri, DPPH radikali giderme aktiviteleri, indirgeme gücü, lipid peroksidsyonu ve in vitro antimikrobiyal etkilerinin belirlenmesi amaçlanmıştır. Bu amaçla mevsiminde toplanan meyveler öğütüldükten sonra aseton ve metanol çözücüleri kullanılarak ekstraksiyonları yapıldı. Her ekstraktın toplam fenolik madde tayini; DPPH radikali giderme, indirgeme gücü ve ferrik tiyosiyonat (FTC) metodları kullanılarak antioksidan aktivitesi tayin edildi. Elde edilen sonuçlar BHT, BHA ve C vitamini standart maddeleriyle kıyaslanarak değerlendirildi. Aseton ve metanol çözücüleriyle gerçekleştirilen ekstraksiyonlar sonucunda, ekstrakte edilebilen madde miktarı %11-21g arasında bitki materyali olarak bulundu. Toplam fenolik madde tayini sonucunda, ekstraktlarda bulunan fenolik madde miktarları gallik asit eşdeğeri olarak metanol için 28,91 ±3,6 mg/g, aseton için 49,81±0,81 mg/g olarak belirlendi. Serbest radikal giderme aktivitesinden elde edilen verilere göre sadece aseton ekstraktının yüksek konsantrasyonlarının standart maddelerle karşılaştırılabilir düzeyde DPPH radikali giderme aktivitesi gösterdiği tespit edildi. İndirgeme kapasitesi tayini yönünden; her iki bitki ekstraktının da standartlarla kıyaslanabilir düzeyde yüksek aktiviteye sahip olmadığı gözlendi. Bitki ekstraktlarının toplam antioksidan aktivitesi linoleik asit emülsiyonu kullanılarak tayin edildi. Ve lipid peroksidasyonunu önlemede zayıf olduğu belirlendi.

Pyrus elaeagrifolia bitkisinden hazırlanan ekstraktların denenen mikroorganizmalar üzerinde antimikrobiyal etkiye sahip olmadıkları belirlendi.

Yıl : 2014

Sayfa Sayısı : 55

Anahtar Kelimeler :*Pyrus elaeagrifolia*, Rosaceae, DPPH radikali, fenolik madde, antimikrobiyal aktivite

Master Thesis

Determination of the in vitro antimicrobial effects and DPPH free radical scavenging activities, phenolic compound contents of *Pyrus elaeagrifolia* plant extracts.

Trakya University Institute of Natural Sciences

Department of Biology

ABSTRACT

In this study, phenolic contents of plant extracts, DPPH free radical scavenging activity, reducing power, lipid peroxidation and in vitro antimicrobial activity effects of *Pyrus elaeagrifolia,* colloquially known as prickly-pear, was aimed to determine. For this reason, fruits that harvested in season were ground and extracted by using acetone and methanol solvents. The Antioxidant activity of each extract was investigated by the methods of total phenolic compound determination, DPPH free radical scavenging activity and reducing power assay and ferric thiocyanate (FTC). The obtained results were evaluated by comparing them with BHT, BHA and vitamin C standards. Extractble matter content was found to be %11 and %21 of plant material for acetone and methanol extractions, respectively. The determination of total phenolic compounds figured out that phenolic compounds found in the extracted amounts as gallic acid equivalent were 28.91±3,6 mg/g in methanol and 49.8±0,81 mg/g in acetone. The data obtained from the free radical scavenging activity revealed that only extractions with high concentrations of acetone showed DPPH free radical scavenging activity being able to comparable with standards. According to free radical scavenging capacities, not all plant extracts have activity higher enough to compare with the standards. The total Antioxidant activity of plant extracts was determined by linoleic acid emulsion. They were found to be poor in preventing linoleic acid peroxidation.

The extracts prepared from *Pyrus elaeagrifolia* didn't show the antimicrobial activity against tested microorgnisms.

Year : 2014
Number of Pages : 55
Keywords : *Pyrus elaeagrifolia*, Rosaceae, DPPH radical, phenolic compound, antimicrobial activity.

TEŞEKKÜR

Beni yüksek lisans öğrencisi olarak kabul eden ve eğitimim süresince desteğini, yardımını, bilgisini ve en çok da anlayışını ve hoşgörüsünü esirgemeyen değerli tez hocam sayın Prof. Dr. Figen ERTAN' a;

Kimya Bölümü Biyokimya Laboratuvarı'nda gerçekleştirilen deneysel çalışmalarım sırasında yardımını hiçbir zaman esirgemeyen Trakya Üniversitesi Kimya Bölümü öğretim üyesi hocam, sayın Doç. Dr. Şebnem SELEN İŞBİLİR' e;

Tez çalışmamda kullandığım bitkinin teşhis edilmesinde botanik bilgisinden yararlandığım Trakya Üniversitesi Biyoloji Bölümü öğretim üyesi sayın hocam Yrd. Doç. Dr. Necmettin GÜLER' e;

Tezimin laboratuvar çalışmalarının pek çok aşamasında yanımda olan, bilgisini, deneyimini ve çalışma ortamını benimle paylaşan sevgili arkadaşım Özge ÖZCAN' a çok teşekkür ederim.

Ayrıca bugünlere gelmemi sağlayan, maddi ve manevi desteklerini esirgemeyen, her zaman yanımda olan ve bana güvenen aileme sonsuz teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

BEYAN I
ÖZET II
ABSTRACT III
TEŞEKKÜR VI
İÇİNDEKİLER VII
SİMGELER VE KISALTMALAR X
ŞEKİLLER LİSTESİ XI
TABLOLAR LİSTESİ XII
1. GİRİŞ 1
2. GENEL BİLGİLER 4
2.1. Rosaceae (Gülgiller) Familyası 4
2.2. *Pyrus elaeagrifolia* 4
2.3. Antioksidan Maddeler ve Serbest Radikaller 6
2.3.1. Serbest Radikal Oluşturan Başlıca Mekanizmalar 10
2.3.1.1. Otooksidasyon 10
2.3.1.2. Geçiş Metal İyonlarının Etkisi 10
2.3.1.3. Fotooksidasyon 11
2.3.1.4. Enzimatik Oksidasyonlar 12
2.3.1.4.1. Ksantin oksidaz (XOD) 12
2.3.1.4.2. NADPH oksidaz 12
2.3.1.4.3. Nötrofil miyeloperoksidaz (MPO) 12
2.3.1.5. Halojenlenmiş Hidrokarbonlar 12
2.3.2. Enzimatik ve Peptid Savunma Sistemleri 13
2.3.2.1. Katalaz ve Peroksidaz 13
2.3.2.2. Süperoksit dismutaz enzimi (SOD) 13

2.3.2.3. Glutatyon ve Glutatyon Peroksidaz (GSHPx) 14
2.3.3. Beslenmenin Antioksidan Savunma Sistemi Üzerine Etkisi 14
2.3.4. Antioksidan Aktivite Tayin Metodları 15
2.3.4.1. Hidrojen transferine dayanan reaksiyonlar (HAT) 15
2.3.4.2. Tek elektron transferine dayanan reaksiyonlar (SET) 16
2.4. Antimikrobiyal Maddeler ve Özellikleri 17
2.4.1. Gıdalarda Koruyucu Olarak Kullanımı 17
2.4.2. Tıbbı Amaçlı Kullanımı 18
3. MATERYAL VE METOD 21
3.1. Materyal 21
3.1.1. Bitki Örneği 21
3.1.2. Kullanılan Bakteriler 21
3.1.2.1. *Enterobacter cloacae* 22
3.1.2.2. *Enterococcus faecalis* 22
3.1.2.3. *Escherichia coli* 23
3.1.2.4. *Klebsiella pneumoniae* 23
3.1.2.5. *Pseudomonas aeruginosa* 24
3.1.2.6. *Serratia marcescens* 24
3.1.2.7. *Staphylococcus aureus* 24
3.1.3. Kullanılan Kimyasal Madde ve Ekipmanlar 25
3.1.4. Çözeltilerin ve Besiyerinin Hazırlanması 26
3.1.4.1. Antioksidan Aktivite Tayininde Kullanılan Çözeltilerin Hazırlanması . 26
3.1.4.2. Antibakteriyel Aktivite Tayininde Kullanılan Besiyeri ve Çözeltiler 27
3.2. Metod 28
3.2.1. Ekstrelerin Hazırlanması 28
3.2.2. Antioksidan Aktivitenin Belirlenmesi 28
3.2.2.1. Toplam Fenolik Madde Tayini 28
3.2.2.2. DPPH Radikali Giderme Aktivitesi Tayini 29

3.2.2.3. Linoleik Asit Sisteminde Ferrik Tiyosiyanat (FTC) Metodu ile Toplam Antioksidan Aktivite Tayini İndirgeme Kapasitesi Tayini 29
3.2.2.4. İndirgeme Kapasitesi Tayini 30
3.2.3. Antibakteriyal Aktivite Tayin Yöntemi 31
3.2.3.1. Bakteri Kültürlerinin Hazırlanması 31
3.2.3.2. Disk Difüzyon Yöntemi 31
4. BULGULAR 32
4.1. Toplam Fenolik Madde Miktar Tayini 32
4.2. DPPH Radikali Giderme Aktivitesi 33
4.3. Linoleik Asit Sisteminde Ferrik Tiyosiyanat (FTC) Metodu ile Toplam Antioksidan Aktivite Tayini 36
4.4. İndirgeme Gücü Tayini 40
4.5. Antimikrobiyal Aktivite Tayini 41
5. TARTIŞMA 43
6. KAYNAKLAR 47
ÖZGEÇMİŞ 55

SİMGELER VE KISALTMALAR

AA	Aseton Ahlat Ekstraktı
ABTS	2,2'-Azinobis(3-etilbenzotiazolin-6-sülfonat)
BHA	Bütillenmiş hidroksi anisol
BHT	Bütillenmiş hidroksi toluen
DMSO	Dimetil sülfoksit
DPPH	1,1-difenil-2-pikrilhidrazil
ETS	Elektron taşıma sistemi
FCR	Folin Ciocalteu reaktifi
FRAP	Demir(III)'ü indirgeyici antioksidan güç
$FADH_2$	Flavin adenin dinükleotit (hidrokinon formu)
GAE	Gallik asit eşdeğeri
GPx	Glutatyon peroksidaz
MA	Metanol Ahlat Ekstraktı
NADH	Nikotin adenin dinükleotid
OFX	Oflaxacin
ORAC	Oksijen radikali absorblama kapasitesi
PG	Propil gallat
ROS (ROT)	Reaktif oksijen türleri
SOD	Süperoksit dismutaz
TBHQ	t-bütil hidroksikinon
TEAC	Trolox ekivalenti antioksidan kapasite
TRAP	Toplam radikal absorbsiyon kapasitesi

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 2.2.1. Ahlat meyvesi 5

Şekil 2.3.1. Antioksidanların serbest radikallere etkisi 6

Şekil 2.3.2. Oksidatif stresin etkileri 7

Şekil 4.1.1. Gallik asit standart grafiği 33

Şekil 4.2.1. *Pyrus elaeagrifolia* ekstrelerinin DPPH radikalini giderme aktivitesi değerleri (%Inhibisyon) 34

Şekil 4.3.1. Linoleik asit peroksidasyonunu önlemede BHA nin etkisi 37

Şekil 4.3.2. Linoleik asit peroksidasyonunu önlemede BHT nin etkisi 37

Şekil 4.3.3. Linoleik asit peroksidasyonu üzerinde aseton ekstresinin etkisi 38

Şekil 4.3.4. Linoleik asit peroksidasyonu üzerinde metanol ekstresinin etkisi 38

Şekil 4.3.5. Ekstrelerin ve standart maddelerin lipid peroksidasyonunu inhibe etme oranları (%) 39

Şekil 4.4.1. *Pyrus elaeagrifolia* ekstrelerinin Fe^{+3}'ü Fe^{+2}'ye indirgeme kapasitesi ... 40

Şekil 4.5.1. *Pyrus elaeagrifolia* bitki ekstrelerinin antimikrobiyal aktivitesi 42

Şekil 4.5.2. *Pyrus elaeagrifolia* bitki ekstrelerinin antimikrobiyal aktivitesi 42

TABLOLAR LİSTESİ

Tablo 2.3.1. Antioksidanların çeşitleri 8

Tablo 3.1.2. Kullanılan Bakteriler ve Kodları 21

Tablo 4.1.1. Ekstrelerin Gallik asit eşdeğeri cinsinden toplam fenolik madde miktarı 32

Tablo 4.2.1. *Pyrus elaeagrifolia* bitkisinin aseton ve metanol ekstrelerinin ve BHT, BHA, C vitamini standartlarının DPPH giderme oranları (%inhibisyon) 35

Tablo 4.3.1. Ekstrelerin ve standart maddelerin lipid peroksidasyonunu inhibe etme oranları(%inhibisyon) 39

Tablo 4.4.1. *Pyrus elaeagrifolia* ekstrelerinin Fe^{+3}'ü Fe^{+2}'ye indirgeme kapasitesi….40

Tablo 4.5.1. *Pyrus elaeagrifolia'* dan hazırlanan ekstrelerin (200 mg/mL) test mikroorganizmaları üzerindeki antimikrobiyal etkileri 41

1.GİRİŞ

Doğadaki bütün hayvanlar, bitkiler ve insanlar bir dengenin ürünüdürler. Mitolojide bitkiler Allah' ın insana verdiği en değerli armağan olarak kabul edilmiştir. Tüm bitkiler insanların hizmetindedir ve insanların varoluşu itibari ile bitkilerle olan ilişkisi başlamıştır. İlk çağlarda bulunan arkeolojik bulgulara göre insanlar, besin elde etmek ve sağlık sorunlarını çözmek için öncelikle bitkilerden faydalanmışlardır [1].

Bitkiler biyolojik aktiviteye sahip pek çok bileşik sentezledikleri için, tıp ve biyoteknoloji ile ilgili alanlarda hep göz önünde olmuşlardır. Kanser, mikroorganizmaları yok etme, tropikal hastalıklar gibi pek çok hastalığa karşı bitkisel sekonder metabolitlerin saptanması amacı ile pek çok çalışma yapılmaktadır. Flavonoidler, fenoller, doymamış laktonlar, sülfür bileşikleri, fenolik glikozitler, siyanojenik glikozitler bu metabolitlerin en iyi bilinen çeşitleridir [2].

1957-1961 yılları arasında Kuzey Irak'ta Şanidar Mağarası'nda yapılan kazılarda bulunan mezarda Neandertal insan kalıntıları yanında bulunanlar, bitkilerle insanların ilişkisinin başlangıcına ait ilk veri olarak kabul edilir. Bir şamana ait olduğu ve 60 bin yıl öncesinden günümüze geldiği düşünülen bu mezarda, gül hatmi, civanperçemi, kanarya otu, mor sümbül, efedra ve peygamber çiçeği gibi bitki türleri tespit edilmiştir. Ölenlerin gömülmeye başlandığı bu toplumda, ölen kişilerin tekrar yaşama döndüğünde kullanabileceği düşüncesiyle mezara konulduğu düşünülen bu bitkiler, yenilebilen ve şifalı olanlar olarak ayrılmaya başlandığının da bir göstergesi olarak düşünülmektedir. Çünkü bu bitkiler günümüzde de tıbbi bitki olarak önemlidir [3,4].

Türkiye coğrafi konumu, tarımsal potansiyeli, bitki ve iklim çeşitliliği, geniş yüz ölçümü sayesinde aromatik ve tıbbi bitkiler ticaretinde önemli ülkelerden biridir. Türkiye'nin bu önemi; gelişmiş ülkelerdeki bitki kimyasalları, gıda ve katkı maddeleri, bitkisel ilaç, parfümeri ve kozmetik sanayilerinin gelirini oluşturan pek çok önemli bitkisel ürünü veren bitkilerin ülkemizin florasında bulunmasından kaynaklanmaktadır. Bu bitkiler çoğunlukla doğal ortamdan toplanarak pazarlanmaktadır. Aromatik ve tıbbi

bitkiler çoğunlukla Akdeniz, Marmara, Ege, Güneydoğu Anadolu ve Doğu Karadeniz Bölgelerinden toplanmaktadır [5].

Aromatik bitkiler yüzyıllardır baharat olarak besinlerin lezzet ve kokusunu arttırmak için kullanılmaktadır. Aynı zamanda, bu bitkiler gıdaların raf ömrünü uzatmak için bir stabilizer ajan olarak da iş görmektedir [6,7]. Besin koruyucusu olarak kaynak sağlayan bitkiler modern tarım ve geleneksel besinler için de öneme sahiptirler. Halofit bitki türleri, beslenme, tıp ve ekonomi açısından son derece önemli türlerdir. Çünkü; ekstrem çevre şartlarında (tuzluluk, kuraklık, aşırı sıcak gibi) gelişen bitkiler, savunma mekanizmalarının devreye girmeleri sonucu çeşitli sekonder metabolitleri sentezlerler [8,9,10,11].

Yenilebilir yabani bitkiler, ucuz protein kaynağı olmaları, insan diyetinde yer almaları, vitamin, mineral, esansiyel aminoasitleri içerdikleri için oldukça büyük öneme sahiptirler. Aynı zamanda bu bitkiler, kanser, inflamasyon, hepatit, romatizma ve yılan zehiri zehirlenmelerine karşı halk tarafından uzun yıllardan beri kullanılmaktadır. Sebzeler ve bitki içerikli doğal ürünler antioksidan ve antimikrobiyal aktivite de sergilerler. Doğal antioksidanlar kardiyovasküler hastalıklar ve bazı kanser türlerinin oluşma riskini düşürmektedir [12].

Yüzyıllardan beri süren insan ve bitki arasındaki bu ilişki sonucunda, ciddi araştırmaların yapıldığı ve günümüzde bütün dünyanın kabul ettiği Etnobotanik bilim dalı doğmuştur [1]. Etnobotanik alanında tıbbi bitkiler olarak gruplanan pek çok bitki çeşitli hastalıklara karşı halk arasında ilaç olarak yerini almıştır. Bu nedenden dolayı bitkilerde antimikrobiyal maddelerin varlığının araştırılması, varolanların aktivitelerinin geliştirilmesi önemli araştırma konularını oluşturmaktadır [13,14].

Antioksidanlar oksidasyonu azaltan veya engelleyen ve dokularda meydana gelen serbest radikallerin zararlarını önleyerek damar sertliği, kalp krizi, kanser gibi hastalıklara karşı koruyucu etkisi olan moleküllerdir. Besin endüstrisinde de paketleme, depolama ve üretim aşamalarında mikroorganizmaların aktivitesinin ya da oksidasyon sonucunda besinlerin bozulmasının engellenmesi en önemli konularından biridir. Antioksidan grubu katkı maddeleri bu işlemler sırasında meydana gelebilecek otooksidasyondan kaynaklanan zararları önleyici önemli katkı maddeleridir.

Doğal antioksidanlardan en çok bilinen tokoferollerdir. Bununla birlikte askorbik palmitat, sülfitler, askorbik asit, glukoz oksidaz gıdalarda sık kullanılan diğer doğal antioksidanlardır. Antioksidanlar, düşük kalitede olan gıda maddesinin kalitesini diğer stabilizatörler gibi arttırmazlar ve gıdalara herhangi bir koku ve yabancı tat vermezler. Bu maddeler uygun üretim tekniği, ambalajlama, depolama yöntemleri ve iyi kalitede hammadde ile birlikte kullanıldığında gıdalardaki oksidasyon problemini ortadan kaldırarak ürünün kalitesini korurlar [7,15].

Antioksidanlar serbest radikallerin ve reaktif oksijen türlerinin etkilerini önleyerek insan vücudunu korumaktadır. Günümüzde en sık kullanılan sentetik antioksidanlar BHT, BHA, propil gallat ve tert-bütil hidrokinondur [16]. Fakat bu sentetik antioksidanların, toksik olmaları, karaciğer harabiyetine neden olmaları ve karsinojenik etkilerinden dolayı güvenilirliliği tartışılmaktadır. Bu nedenle yeni ve güvenilir, sağlığa zararı olmayan antioksidanların doğal kaynaklardan elde edilmesi son yıllarda en çok araştırılan konulardandır [17].

Bu tez kapsamında ülkemizde yetişen Rosaceae (Gülgiller) familyası üyesi olan, halk arasında ahlat olarak bilinen ve çeşitli şekillerde kullanılan doğal bir kaynak olan *Pyrus elaeagrifolia* bitkisinin toplam fenolik madde tayininin yapılması; serbest radikal giderme, indirgeme gücü ve linoleik asit peroksidasyonu testi metodları ile antioksidan aktiviteye sahip olup olmadığının incelenmesi; ayrıca in vitro antimikrobiyal testlerle de antimikrobiyal aktivite gösterip, göstermediğinin incelenmesi amaçlanmıştır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Rosaceae (Gülgiller) Familyası

Rosaceae (Gülgiller) familyasının, 100-120 cinsi bulunmaktadır. 3000-4000 türü içeren büyük bir familyadır. Çalı, otsu ve ağaç formunda bitkilerdir. Yapraklar alternat, nadiren karşılıklıdır. Çiçekleri genellikle erdişi, nadiren tek cinsli, aktinomorf (ışınsal) simetrilidir. Sepaller kaidede birleşik 5 (bazen 4), petaller 5 (bazen 4) veya tamamen körelmiştir. Stamenler genellikle çok sayıdadır. Nadiren 1.ovaryum orta veya üst durumludur. Daha çok kuzey yarım kürede yayılış gösteren bu familyanın 115 cinsi ve 3500 kadar türü bulunmaktadır. Ülkemizde ise sadece 36 cins ve 250 türü bulunmaktadır. Ekonomik bitkiler açısından önemli bir familyadır [18].

2.2. *Pyrus elaeagrifolia*

Pyrus elaeagrifolia, Anadolu'da yaygın olarak yetişmekte olan yabani bir armut türüdür. Genel olarak ahlat adı ile bilinmektedir. Bazı yörelerde çördük, çakal armudu gibi yöresel isimleri de bulunmaktadır. Anayurdu Anadolu olarak bildirilen ahlatın (*P. elaeagrifolia*) dağılım alanı Türkiye, Ukrayna ve Güneydoğu Avrupa'dır [19,20]. Bu türün Anadolu'nun farklı bölgelerinde ak ve boz görünümünde değişik çeşitleri bulunmaktadır. Ahlat sık dikenli dalları, ufak kargı biçimindeki yaprakları, derine giden kazık kökü ve boz tüylü dalcıkları ile kserofit bitki özelliğini taşımaktadır [21,22]. Ayrıca kış aylarındaki soğuklara ve yetiştirildiği yerden yüksek seviyede demir ve çinko alabilme yeteneği ile kloroza, diğer bir ifade ile yüksek pH'ya fazla dayanıklıdır. Bu nedenle iklim ve toprak özellikleri diğer *Pyrus* türlerinin yetiştirilmesi için uygun olmayan kurak ve kireçli koşullara fazlasıyla uyum sağlamıştır [23].

Ağaç boyu yaklaşık olarak 2-5 metre arasında, yaprakları koyu yeşil renkli ve kalın ve dalları dikenlidir. Meyveleri yuvarlak ve pütürlüdür. İlkbahar aylarında beyaz renkte küçük çiçek açmaktadır. Ahlat cinsinin botanikçiler tarafından günümüze kadar 24 türden fazla ahlat türünün teşhis edildiği belirtilmektedir [24].

Rahim iltihabı ve akıntılarında, ishali kesmede, böcek sokmalarında, böbrek ve idrar yolları iltihabında, balgam söktürmede, ateşi düşürmede, karaciğeri kuvvetlendirmede, astım ve bronşitte ve şeker hastalığında halk arasında çok önceden beri kullanılmaktadır. Şeker hastaları rahatlıkla tüketebilir, fakat fazla tüketilmesi durumunda kabızlık yapmaktadır. Olgunlaşmış meyveleri yenir, kompostosu yapılarak tüketilebilmektedir. Yaprakları kaynatılarak suyu içilebilir. Meyveleri kurutulup sade olarak ya da bala, pekmeze karıştırılarak yenilebilmektedir [25].



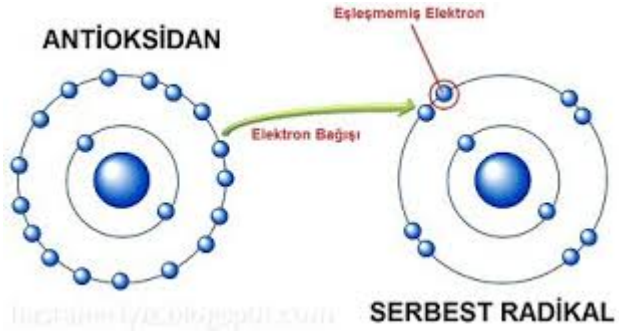
Şekil 2.2.1. Ahlat meyvesi [26].

2.3. Antioksidan Maddeler ve Serbest Radikaller

Serbest radikaller, dış orbitallerinde bir veya daha fazla çift oluşturmamış elektron içeren yüksek enerjili bileşiklerdir. Bu çiftlenmemiş elektronlar serbest radikallere çok büyük reaktiflik kazandırarak lipid, DNA, protein ve nükleotid koenzimler gibi biyolojik materyallere zarar vermelerine neden olmaktadır. Bu zararın yaşlanmayı hızlandırdığı ve ayrıca çeşitli kanser türleri, kalp-damar hastalıkları, bağışıklık sisteminde zayıflama, sinir sistemi dejeneratif hastalıkları, katarakt gibi pek çok hastalığa neden olduğuna dair bilgiler bulunmaktadır [27].

Serbest radikallerin başlıcaları; hidroksi ($OH^{\bullet}$), peroksi ($ROO^{\bullet}$), süperoksit anyonu ($^{\bullet}O_2^-$), tekli oksijen ($1O^2$), alkoksi ($RO^{\bullet}$), azot monoksit ($NO^{\cdot}$) radikalleridir [28].

Kararlı bir oksijen atomunun 8 elektronu bulunmaktadır. Oksijen atomu 1 elektronunu yitirip serbest radikal oluşturmaktadır. Antioksidan maddeler, serbest radikalleri nötralize etmek için üzerlerindeki bir elektronu serbest radikale verip onu etkisiz hale getirmektedir (Şekil 2.3.1).



Şekil 2.3.1. Antioksidanların serbest radikallere etkisi [29].

Serbest radikallerin sebep olduğu oksidasyonları önleyen, serbest radikalleri stabilize etme ve yakalama kabiliyetine sahip maddelere “antioksidan” adı verilir [30].

Antioksidan maddeler endojen ve eksojen kaynaklı olup, oluşan oksidan moleküllerin sebep olduğu hasarı hücre içi ve hücre dışı savunma sistemi ile etkisiz hale getirmektedirler. Hücre içi savunmayı serbest radikal toplayıcı enzimler sağlamaktadır. Hücre dışı savunma, transferin, albümin, seruloplazmin, ürik asit ve bilirubin gibi moleküller ile sağlanmaktadır [31]. Antioksidanların çeşitleri Tablo 2.3.1' de gösterilmektedir.

Tablo 2.3.1. Antioksidanların çeşitleri [32].

<table>
<tr><td rowspan="4">ANTİOKSİDANLAR</td><td rowspan="3">DOĞAL ANTİOKSİDAN</td><td>ENZİMATİK</td><td colspan="2">• SOD
• Katalaz
• Glutatyon Peroksidaz
• Glutatyon S transferaz
• Sitokrom oksidaz</td></tr>
<tr><td rowspan="2">ENZİMATİK OLMAYAN</td><td>Endojen</td><td>Glutatyon, Bilirubin, Ferritin, Ürik asit, Laktoferin, Serüloplazmin, Albümin, Haptoglobinler</td></tr>
<tr><td>Eksojen</td><td>E Vitamini, β-Karoten, Askorbik asit, Flavonoidler</td></tr>
<tr><td>YAPAY ANTİOKSİDAN</td><td colspan="3">BHT, BHA, Troloks, SOD mimikleri ve çeşitli şelat oluşturucu maddeler</td></tr>
</table>

Reaktif oksijen türleri (ROS) aktive olmuş oksijenin çeşitli formlarıdır. Bu moleküller, çeşitli fizyolojik olaylar boyunca sürekli üretilirler ve membranda yer alan lipidlerin peroksidasyonunu kolaylıkla başlatmaktadırlar. Ayrıca lipid peroksidlerin birikimine neden olmaktadırlar. Bu bileşikler, antioksidan savunma sistemi ile uzaklaştırılmaktadırlar. Organizmaların sahip olduğu antioksidan savunma sistemi ile ROS'ların oluşumu ve uzaklaştırılması bir denge halinde çalışmaktadır. Bu denge bozulduğunda oksidatif stres meydana gelmektedir. ROS'ların aşırı üretimine karşı

endojen antioksidanların yetersiz kalması sonucu bazı istenmeyen patolojik durumlar ortaya çıkmaktadır [33, 34, 35, 36].

Biyolojik sistemlerde meydana gelen oksidatif stres; lipidler, DNA, proteinler gibi hücre bileşenlerini etkilemektedir. Bu etkilerin sonucunda yaşlanma, damar sertliği gibi kardiyovasküler hastalıklar, astım, allerji, romatoid artirt gibi inflamatuar hastalıklar ortaya çıkmaktadır [37]. Şekil 2.3.2 bu hastalıkları göstermektedir.



Şekil 2.3.2. Oksidatif Stresin Etkileri [38].

Günümüzde BHT (bütillenmiş hidroksi toluen), BHA (bütillenmiş hidroksi anisol), TBHQ (tert- bütil hidroksi kinon), PG (propil gallat) en sık kullanılan sentetik antioksidanlardır. BHT ve BHA'nın kökeni petrol olup çiklet, margarin, yenilebilen yağlarda, fındık ve patates ürünleri ve polietilen gıda ambalajlamalarında kullanılmaktadır. BHA kızartma ve fırınlama gibi yüksek sıcaklık uygulanan yağlarda kullanıldığı zaman kolaylıkla hissedilebilen fenolik bir koku oluşturmaktadır. BHA ile BHT sinerjist etki göstermektedir. Propil gallatlar salata sosunda, yağ ve margarinde kullanılmaktadır. İngiltere'de bitkisel ve hayvansal yağlarda en çok kullanılan antioksidan olan propil gallat, katı bir halde beyaz kristaller şeklinde bulunmaktadır. TBHQ'nın kökenide petrol olup margarin ve yağlarda kullanılmaktadır. TBHQ'un

bitkisel yağlarda stabiliteyi arttırması amacı ile kullanılmasına birçok ülke izin vermektedir. TBHQ'un bitkisel yağlardaki antioksidan etkisi diğer antioksidanlara göre daha fazladır [39].

Sentetik antioksidanlar 1940'lı yıllardan beri gıda endüstrisinde kullanılmaktadır. Ancak, son yıllarda insan sağlığı ile ilgili kuruluşların tercihi, doğal kaynakların antioksidan ve antimikrobiyal ajan olarak kullanılmasından yanadır [10,40]. Yapay antioksidanların insan sağlığı için toksik etki oluşturduğunun bilinmesi ile tüketici tercihini değiştirip doğal tarımsal ürünlere yöneltmiştir. Bunun sonucunda da gıdalarda kalite, güvenlik ve sağlık arayışını ön plana çıkarmıştır. Gıda bilimcileri ve araştırmacılar sentetik antioksidanların yerine geçebilecek, doğal antioksidanlar arayışı içine girmişlerdir. Bu nedenle yeryüzünde geniş alanlara dağılış gösteren bitkisel kaynaklara yönelip bu kaynaklardan elde edilen doğal antioksidanların gıdaların işlenmesinde yapay antioksidanların yerine gıdalara eklenmesi amaçlanmaktadır [41,42].

İyi bir antioksidan şu özellikleri taşımalıdır:

• Küçük konsantrasyonlarda etkili olabilmelidir.

• Yağ veya yağlı ürünlerin tadına, kokusuna ve görünüşüne etki etmemelidir.

• Yemeklerin pişirilmesi sırasında yağa ve bununla hazırlanmış besinlere etki etmemeli ve aktif kalmalıdır.

• Yağda yeterli miktarda çözünmeli ve yağ ile karışabilmelidir.

• Fizyolojik olarak zararsız olmalıdır.

• Kolay elde edilebilmelidir ve ucuz olmalıdır [43].

2.3.1. Serbest Radikal Oluşturan Başlıca Mekanizmalar

2.3.1.1. Otooksidasyon

Otooksidasyon, atmosferik oksijenin katalizlediği serbest radikal zincir reaksiyonudur [44]. Serbest radikallerin oksijen ile reaksiyonu oldukça hızlıdır ve bu reaksiyonların başlaması için birçok mekanizma tanımlanmıştır. Özellikle fosfolipidler ve çoklu doymamış yağ asitleri (PUFA) otooksidasyona eğilimlidir. Otooksidasyonda ilk oluşan ürünlerin hidroperoksit (ROOH) ürünleri olarak düşünülmektedir [45]. Hidroperoksitlerin zincir reaksiyonunu başlatabilmesi için 3 ana mekanizma önerilmektedir [46].

1. Hidroperoksit, zincir reaksiyonuna katılabilen bir peroksi radikalini ($ROO^{\bullet}$) oluşturmak için başlatıcı bir radikal (X) ile reaksiyona girebilir.

$$ROOH + X^{\bullet} \rightarrow ROO^{\bullet} + XH$$

2. Hidroperoksit, bir indirgen veya bir metal iyonu ile alkoksi ($RO^{\bullet}$) radikalini (veya hidroksi ($^{\bullet}OH$) radikalini) oluşturmak için indirgenebilir.

$$ROOH \rightarrow RO^{\bullet} + OH^{-} \text{ (veya } RO + {}^{\bullet}OH \text{)}$$

3. Diğer mekanizmalara kıyasla daha az önemli olan, yüksek sıcaklık olmadan oda sıcaklıklarında hidroperoksitte bulunan O-O bağı parçalanarak hidroksi ve alkoksi radikallerine dönüşebilmektedir.

$$ROOH \rightarrow RO^{\bullet} + {}^{\bullet}OH$$

2.3.1.2. Geçiş Metal İyonlarının Etkisi

Bakır ve demir gibi metal iyonları da canlı sisteminde serbest radikal oluşturan kuvvetli birer oksidatif katalist olarak bulunmaktadırlar. Bakır katalizli reaksiyonlar tam olarak açıklanamamıştır. Fakat demirin oksidatif reaksiyonları güçlendirmede daha etkili bir metal olduğu görülmektedir [47].

$$O_2^{\cdot-} + H_2O_2 \rightarrow {}^{\cdot}OH + OH^{-} + O_2$$

Biyolojik sistemlerde ATP üretimi, DNA ve klorofil sentezi ve oksijenin taşınmasında önemli görevi olan demirin serbest formları hücrelerde toksik etki yapabilmektedir. Bu toksisite sonucunda meydana gelen aktif oksijen türleri DNA moleküllerine saldırabilmekte veya lipid oksidasyonunu teşvik edebilmektedir. Tüm canlı hücreler serbest formdaki demirin toksik etkisini yok edebilen ve fazla demiri toksik olmayan formlarda hücrenin içerisinde depolayan mekanizmalara sahiptir [48].

2.3.1.3. Fotooksidasyon

Oksidasyonda başlatıcı görev yapan peroksitlerin oluşumunda fotokimyasal iz olayları oldukça önemlidir. Işığın bir molekül tarafından absorbe edilmesi, süperoksit anyonu üretebilen elektron transferine neden olabilmektedir.

Fotosensitize prosesler ise, muhtemelen fotokimyasal reaksiyonlardan daha önemlidir. Böyle indirekt reaksiyonlarda sensitizer adı verilen bir molekül ışığı absorbe edip diğer türlerin oksidasyonuna sebep olmaktadır. Bu reaksiyonlarda genellikle ışığı absorbe eden molekül aktif forma dönüşmektedir [46].

Hemoglobin, miyoglobin, klorofil-a, feofitin-a gibi bazı pigmentler ve eritrosin (sentetik bir boya) tekli oksijen üretebilen fotosensitizerlerdendir [44]. Fotooksidasyon reaksiyonları Tip 1 ve Tip 2 olarak iki gruba ayrılmaktadır.

Tip 1 reaksiyonda; aktif haldeki sensitizer, substratla elektron vermek ya da hidrojen atomu transferi yapmak üzere reaksiyona girerek radikaller üretmektedir. Bu radikallerde oksijenle reaksiyona girmektedir.

Tip 2 reaksiyonda; aktif sensitizer O_2 ile reaksiyona girerek tekli oksijen üretir ve bu oksijen de substratla reaksiyona girmektedir.

Riboflavin gibi flavinler Tip 1 reaksiyonu için uygun bir sensitizerdir, klorofil gibi porfirinler de Tip 2 reaksiyona uyan sensitizerler arasındadır.

2.3.1.4. Enzimatik Oksidasyonlar

2.3.1.4.1. Ksantin oksidaz (XOD)

Canlılarda ROS oluşturan enzimatik kaynaklardan biridir. XOD'ın aktivitesi sonucunda hidroperoksit radikalleri ve süperoksit anyonu oluşmaktadır. Ksantin oksidazın beyinde ödem, damar geçirgenliğinde değişkenlik, iskemi gibi oksidatif hasara sebep olduğu, ayrıca hepatit ve beyin tümörü gibi vakalarda da XOD'ın serum seviyelerinin arttığı aktarılmaktadır [49].

2.3.1.4.2. NADPH oksidaz

Serbest radikal oluşturan bir diğer enzimdir ve nötrofillerin plazma zarında bulunmaktadır. Monositleri ve makrofajları içeren fagosit hücrelerde O_2 alımı ile aktiflik kazanan NADPH oksidaz, bu oksijeni süperoksit anyonuna dönüştürüp ekstraselüler sıvılardaki miktarını artırmaktadır [50].

2.3.1.4.3. Nötrofil miyeloperoksidaz (MPO)

Canlılardaki bir diğer güçlü oksidan kaynağı hipoklorik asit üretimini katalizleyebilen "Nötrofilik miyeloperoksidaz" enzimidir. Bu reaksiyonun toksik etkisi savunma sistemindeki bakterilerin öldürülmesidir. Bununla beraber, oluşan hipoklorik asit ayrıca α1-antiproteinaz'ı inaktive etmektedir ve sağlıklı insan dokusunu da zarara uğratarak iltihaplanmalara neden olmaktadır [49].

2.3.1.5. Halojenlenmiş Hidrokarbonlar

Serbest radikal oluşturan diğer olaylar ise; kontamine içme sularında bulunan hava kirleticileri ve toksik etkili halojenlenmiş hidrokarbonlar olarak tanımlanan oksitlerdir. Bromotriklorometan ($CBrCl_3$) ve karbontetraklorür (CCl_4) gibi hidrokarbonların canlı sistemindeki oksidatif hasara sebep oldukları bilinmektedir. Triklorometil peroksil, triklorometil radikalleri gibi güçlü reaktif türler, sitokrom P-450 monooksijenaz

enziminin doymamış yağlar ve çeşitli aminoasitlerle reaksiyonu sonucu CCl_4'ün metabolizmasında üretilmektedir. Bunun sonucunda lipid peroksidasyonları ve protein denatürasyonları oluşmaktadır [51].

2.3.2. Enzimatik ve Peptid Savunma Sistemleri

2.3.2.1. Katalaz ve Peroksidaz

Bir metallo enzim olan katalaz enzimi redoks reaksiyonunu gerçekleştiren en etkili protein katalistlerindendir [52]. Süperoksit dismutaz (SOD) enzimi faaliyeti sonucunda oluşan toksik hidrojen peroksit (H_2O_2), "katalaz" enzimi etkisiyle oksijene ve suya dönüştürülmektedir [50].

$$2H_2O_2 \rightarrow 2H_2O + O_2$$

Hidrojen peroksit (H_2O_2), biyolojik önemi olan moleküllerin birçoğu ile reaksiyona girmemekle birlikte, OH radikali gibi daha reaktif olan oksidanların oluşumunda öncü madde olarak rol oynamaktadır. Peroksidazlar da katalaz enzimi ile aynı özelliklere sahiptir [52].

2.3.2.2. Süperoksit dismutaz enzimi (SOD)

Bu enzim, süperoksit anyonunun ($O_2^{\bullet -}$), oksijene ve hidrojen perokside (H_2O_2) dönüşümünü katalizleyerek bu radikalin etkisini azaltmaktadır. Bu reaksiyonda SOD enzimine ait aktif bölgeyi oluşturan Zn önemli bir mineraldir.

$$2O_2^{\bullet -} + 2H^+ \rightarrow H_2O_2 + O_2$$

Süperoksit anyonu ($^{\cdot}O^{2-}$) da, hidrojen peroksit gibi bir oksidan olarak birçok organik bileşik ile direkt olarak reaktif değildir fakat yüksek toksisiteye sahip ve daha reaktif oksijen türlerinin oluşmasına neden olmaktadır [52].

2.3.2.3. Glutatyon ve Glutatyon Peroksidaz (GSHPx)

Tiyol grupları, serbest radikalleri yakalamak suretiyle ve enzimatik reaksiyonlar aracılığıyla görev yapan hücresel antioksidanlardır. Bir tripeptid olan ve tiyol grubu taşıyan glutatyon, serbest radikallerin yıkıcı etkilerini engelleyen veya azaltan peroksidazlar, transferazlar gibi enzimlerin substratı olarak görev yapmaktadır. Birçok hücrede yüksek konsantrasyonlarda bulunan ve suda çözünebilen bir tiyol olan glutatyon, biyolojik membranları lipid peroksidasyonuna karşı korumaktadır. Bu koruma ise, enzimatik olarak gerçekleştirmektedir [53].

$$ROOH + 2GSH \rightarrow GSSG + ROH + H_2O$$

2.3.3. Beslenmenin Antioksidan Savunma Sistemi Üzerine Etkisi

Vücudun antioksidan dengesi besinlerimizden büyük ölçüde etkilenmektedir. Yetersiz beslenme nedeniyle vücudun savunma sistemleri tahrip olduğu zaman patolojik sorunlar oluşabilmektedir. Reaktif oksijen çeşitlerindeki artış ve savunma sistemlerindeki yetersizlik "oksidatif stres" oluşmasına ve vücuttaki antioksidan dengesinin bozulmasına neden olmaktadır. Antioksidan savunma sisteminin etkinliği; iz minerallerini içeren gıdaların yeterince alınmasına ve C vitamini, E vitamini, flavonoidler ve karotenoidler gibi antioksidan bileşenlerin alınımına bağlı olmaktadır [50]. Bu tür gıda bileşenleri beraber çalışarak hastalık ve hasarlara sebep olan zararlı reaktif oksijen türlerinin olumsuz etkisini yok etmektedir.

E vitamini, tüm hücre membranlarında bulunan, yağda çözünebilen ve çoklu doymamış yağ asitlerini oksidasyona karşı koruyan başlıca antioksidanlardandır [28]. E vitamininin fazla dozlarda diyete eklenmesinin LDL düzeylerini büyük ölçüde artırdığı, oksidatif strese karşı da oldukça koruyucu olduğu bilinmektedir [54].

Askorbik asit suda çözünebilen ve vücudun ekstraselüler sıvılarında bulunan önemli antioksidanlardandır. Vücutta sentezi gerçekleşmediği için gıdalarla dış ortamdan alınması gerekmektedir. Askorbik asit E vitaminini rejenere edebilme özelliğine de sahiptir [28].

Karotenoidler ise; antioksidan aktivitelerini serbest radikal reaksiyonlarında, reaksiyona katılarak zararlı hidrojen peroksitlerin oluşma hızını azaltarak gösterirler [53]. Önemli karotenoidlerinden β-karoten; yeşil sebzelerde, turuncu, sarı sebze ve meyvelerde, lutein; brokoli ve lifli yeşil sebzelerde ve likopen; domateste bulunmaktadır.

Bitkisel gıdalarda var olan fenolik bileşikler de hidrojen verici, indirgen ajan ve tekli oksijen yakalayıcı olmaları sebebiyle önemli antioksidanlar arasında yer almaktadır. Çinko, bakır, magnezyum, selenyum gibi mineraller de koruyucu enzimlerin katalitik aktiviteleri ve yapıları için gereklidir [28].

2.3.4. Antioksidan Aktivite Tayin Metodları

Antioksidan kapasite ve antioksidan aktivite terimleri birbirlerinin yerine kullanılmaktadır; fakat farklı anlamlara sahiptirler. Kapasite; bir numunenin süpürdüğü belirli bir serbest radikal miktarının ölçüsüdür. Yani bileşenin antioksidan kapasitesini ölçmez. Aktivite; bir antioksidan ve oksidan arasındaki reaksiyonun hız sabitidir [55].

Ölçümlerde analizin oluşturduğu şartlar ve kullanılan analitik metodlar aynı gıda türü için, farklı sonuçlara sebep olabilmektedir. Günümüze kadar pek çok farklı metodla in vitro ve in vivo oksidasyon ölçüm teknikleri uygulanmış ve geliştirilmiştir.

Reaksiyonların mekanizmalarına göre antioksidan kapasite tayinleri 2 gruba ayrılabilir:

- Hidrojen transferine dayanan reaksiyonlar (HAT)
- Tek elektron transferine dayanan reaksiyonlar (SET) [56,57].

2.3.4.1. Hidrojen transferine dayanan reaksiyonlar (HAT)

HAT mekanizmasına dayanan tayinlerin birçoğu yarışmalı reaksiyon kinetiğini izler. HAT metotları genellikle sentetik bir radikal üreticisinden, yükseltgenebilir moleküler problardan ve bir antioksidan bileşikden oluşur. TRAP, ORAC gibi HAT

metodlarında peroksil radikali ($ROO^{\bullet}$) sentezlemek üzere radikal başlatıcı kullanılır. Ortama eklenen antioksidan, radikaller için ortamda bulunan substrat ile yarışır. $ROO^{\bullet}$ genellikle antioksidandan bir hidrojen atomunu alır. Sonuçta $ROO^{\bullet}$ ve hedeflenen molekül arasındaki reaksiyon geciktirilir veya inhibe edilir.

HAT analiz metodları:

a) Oksijen radikal absorbans kapasitesi (ORAC)

b) Total radikal yakalama antioksidan kapasitesi (TRAP)

c) İndüklenmiş düşük yoğunluklu lipoprotein otooksidasyonu,

d) Crocin ağartma deneyleri olarak sıralanabilir [56,58].

2.3.4.2. Tek elektron transferine dayanan reaksiyonlar (SET)

Spektrofotometrik ET-dayanan metotlar; reaksiyon karışımında iki bileşeni içerir. Antioksidan ve oksidan. Oksidan antioksidandan bir elektron (e^-) alır ve bu oksidanda renk değişimine sebep olur. Renk değişiminin derecesi, antioksidan derişimiyle orantılıdır.

$$\text{Oksidan} + e^- \text{(antioksidan)} \rightarrow \text{indirgenmiş oksidan} + \text{yükseltgenmiş antioksidan}$$

SET analiz metodları:

a) DPPH kullanarak “toplam antioksidan potansiyel” ölçüm yöntemi

b) Folin-Ciocalteu reaktifi (FCR) ile toplam fenolik madde analizi

c) Ferrik iyonu indirgeme antioksidan gücü (FRAP) ölçümü

d) Troloks eşdeğeri antioksidan kapasite (TEAC) ölçümü

e) CUPRAC (Bakır(II) İndirgeyici Antioksidan Kapasite) Yöntemi

f) Cu (II) kompleksini oksidan olarak kullanılan “toplam antioksidan potansiyel” ölçüm yöntemi olarak sıralanabilir [56].

2.4. Antimikrobiyal Maddeler ve Özellikleri

Antimikrobiyal maddeler, çok az yoğunlukta bile mikroorganizma gelişimini engelleyen, biyolojik kökenli, ikincil metabolitlerdir. Bunlar, mikroorganizmanın ölmesine sebep olan "bakterisit" ve "fungisit" olabildikleri gibi; mikroorganizmanın çoğalmasını engelleyen "bakteriostatik" veya "fungustatik" maddeler de olabilmektedirler. Mikroorganizmalar tarafından üretilen, organik doğal ürün ve düşük moleküler ağırlıklı olan antimikrobiyaller, düşük konsatrasyonlarda bile seçici toksititeye sahip oldukları için makroorganizmaya zarar vermeden mikroorganizmaya zarar verebilirler [59,60].

Bitki kökenli antimikrobiyal bileşenler bitkinin yaprak, kök, tohum, çiçek veya meyvesinden elde edilebilir [61]. Bitkilerin antimikrobiyal aktivitesi ile ilgili yapılan eski çalışmalar çoğunlukla kök, gövde, rizom ve yaprak ekstratlarıyla gerçekleştirilmiştir. Hammaddelerin işlenmesi ve depolanması sırasında oluşan lipid oksidasyonu, gıdalarda ekşime ve bayatlamaya sebep olan temel nedendir [62].

2.4.1. Gıdalarda Koruyucu Olarak Kullanımı

Gelişmekte olan ülkelerde ve hatta gelişmiş ülkelerde bile gıda kaynaklı hastalıklar önemli bir sorundur. 81 milyon hastalık vakasından 6 milyonun nedeni besin kaynaklı olup, yalnızca Amerika'da yılda 9000'in üzerinde insan gıda kaynaklı mikrobiyal ajanlardan ölmektedir [63]. Gıda zehirlenmeleri kullanılan koruyucu yöntemlere rağmen halen hem gıda endüstrisini hem de tüketicileri tehdit etmektedir. Bu yüzden tüketicilerin, koruyucu kullanılmasına rağmen gıdaların güvenliği konusunda endişeleri bulunmaktadır. Bu sebepten dolayı gıda kaynaklı hastalıkların artmaması ve azalması için yeni ve daha etkili tekniklere büyük bir ilgi vardır. Bitkilerden elde edilen doğal kaynaklı antimikrobiyal maddelerin gıda güvenliğini büyük ölçüde sağladığı bulunmuştur [64]. Zencefil, tarçın, köri, fesleğen, sarımsak, hardal ve diğer bazı bitkilerin koruyucu özellik gösterdiği bilinmektedir [65].

2.4.2. Tıbbı Amaçlı Kullanımı

İnsanlar yüzyıllardan beri bitkileri çeşitli hastalıklardan korunmada ve tedavide kullanmıştır [66]. Bugüne kadar yeryüzünde var olan bitki türleri 250.000-500.000 arasında olduğu kabul edilmektedir. Dünya Sağlık Örgütü'ne (WHO) göre dünya nüfusunun yaklaşık %80'i hastalıkların önlenmesinde ve tedavi edilmesinde bitkilerden faydalanmaktadır. Faydalanılan tıbbi bitki türünün yaklaşık 70.000 olduğu düşünülmektedir. WHO'ya göre 21.000 bitki türü ilaç yapımında kullanılabilmektedir [67].

Uçucu yağlar, bileşenleri çeşitli olan kompleks karışımlar oldukları için, biyolojik etkileri yönünden de değişiklik gösterirler. Etken maddelere göre etkileri değişen pek çok uçucu yağ; antimikrobiyal, koloretik, diüretik, sedafik, antispazmodik gibi etkilere sahiptir. Sıtma hastalığında kullanılmakta olan ilaçlara karşı gelişen direnci yok etmede ve sıtma hastalığının tedavisinde *Cochlospermum tinctorium, Jatropha curcas, Gossypium hirsutum, Euphorbia lateriflora, Khaya grandifolia, Artemisia vulgaris, Cochlospermum planchonii, Artemisia annua, Artemisia absinthium, Cinchona* spp, gibi bitkiler önerilmiştir [68].

Mikroorganizmaların, antimikrobiyal maddelere karşı ciddi bir şekilde direnç geliştirmesi insan sağlığını tehdit eden boyutlara ulaşmıştır. Bu nedenle ilaç firmaları yeni antibiyotik üretmek için arayış içerisindedir. Antimikrobiyal maddelerin de içinde yer aldığı farmasötik maddelerin %80'i bitki kökenlidir [69]. Mikroorganizmaların neden olduğu enfeksiyonları kontrol etmek için doğal ya da sentetik maddelerin antimikrobiyal aktivitelerini belirlemek amaçlı pek çok çalışma yapılmaktadır. Gelişmekte olan ülkelerin özellikle kırsal kesimlerinde, enfeksiyon hastalıkların önlenmesi ya da tedavi edilmesi amacı ile çeşitli bitki ekstraktları halk ilacı olarak kullanılmaktadır [70].

Halk ilacı olarak bazı hastalık ve rahatsızlıkların tedavisinde kullanılan tıbbi bitkiler:

Böbrek hastalıkları: Atkuyruğu, altın otu (ölmez çiçek), ayrıkotu.

Cinsel isteksizlik: Meyankökü, demir dikeni, kakule, safran, zencefil.

Hazımsızlık: Anason, dereotu, kakule, kimyon, papatya, rezene, zencefil.

Hemoroit: Civanperçemi, kuşburnu, sultan otu, zencefil.

Kabızlık: Sinemaki, keten, rezene, sinirliot tohumu.

Kalp rahatsızlıkları: Alıç, ökseotu.

Kanserden korunma: Isırgan otu, kırmızıbiber, ökseotu.

Karaciğer rahatsızlıkları: Enginar, hindiba, Kurtpençesi, meryemana dikeni, zerdaçal.

Menopoz: Civanperçemi, adaçayı, anason, papatya, tarçın.

Mide kanaması: Civanperçemi, kuşburnu, sumak.

Mide bulantısı ve ağrıları: Eğir kökü, nane, zencefil.

Prostat büyümesi: Eğir kökü, yeşil çay, zerdeçal, ısırgan otu kökü.

Romatizma ağrıları: Anason, atkuyruğu, biberiye, karanfil, lavanta, melisa, papatya.

Safra kesesi rahatsızlıkları: Altın otu, civanperçemi, kara hindiba, pelin otu, zerdeçal.

Soğuk algınlığı, üşütme ve öksürük: Ardıç, ebegümeci, ekinezya, ıhlamur, karanfil, meyankökü, nane, okaliptus, papatya, zencefil.

Stres, depresyon, ve endişe: Anason, kantaron, lavanta, melisa, papatya, rezene, şerbetçi otu.

Unutkanlık ve hafıza zayıflığı: Adaçayı, biberiye, kakule, yeşil çay, zencefil.

Uyku bozukluğu: Anason, çuha çiçeği, kediotu, melisa, papatya, rezene, şerbetçi otu.

Yorgunluk: Adaçayı, biberiye, meyankökü, kakule, kekik, kuşburnu, zencefil.

Yüksek Kolesterol: Biberiye, kekik, kuşburnu, üzüm çekirdeği, yeşil çay, zencefil.

Yüksek şeker: Kudret narı, mahlep, tarçın, mersin.

Zayıflama Çayı: Biberiye, kiraz sapı, mısır püskülü, rezene, sinemaki, zencefil,

zerdeçal, yeşil çay [71].

Mikroorganizmaların antibiyotiklere direncinin saptanmasında 2 ana yöntem vardır [72].

a) Dilüsyon yöntemi: Antibiyotiklerin katı ve sıvı besiyerlerinde seriler halinde seyreltilmesi ve seyreltilen ortama direnci belirlenecek olan bakterinin belli bir miktarda bulunduğu süspansiyonun eşit olarak ilave edilmesidir. Bu teknik ile organizmaların antibiyotiklere olan direnci tayin edilmektedir. Deney serileri 35-37 °C'de ve 16-20 saat bekletilir. Antimikrobiyal madde konsantrasyonu eğer inhibitör konsantrasyonunun altında ise tüpteki süspansiyon bulanık görülmektedir. Eğer antimikrobiyal madde konsantrasyonu inhibitör konsantrasyonuna eşit veya inhibitör konsantrasyonundan fazla ise tüpte buyyon berraktır. Üremeyi durduran en düşük madde konsantrasyonu ise MİK (Minimum İnhibitör Konsantrasyonu) kabul edilir [73,74].

b) Disk Difüzyon yöntemi: Bu yöntemde bakterilerin katı besiyerine ekimi yapılır ve belli konsantrasyonlarda hazırlanan ekstrelerin emdirildiği kağıt diskler ile kullanılacak olan antibiyotikler besiyerine yerleştirilir. Uygun süre ve sıcaklıkta inkübasyondan sonra besiyerlerinde meydana gelen zon çapları ölçülerek kıyaslanır [75].

3. MATERYAL VE METOD

3.1. Materyal

3.1.1. Bitki Örneği

Deneylerde kullanılan ahlat (*Pyrus elaeagrifolia*) bitkisinin meyveleri, Edirne'nin Tahal Köyü'nden toplanarak temin edildi. Bitki örnekleri, Trakya Üniversitesi, Fen Fakültesi, Biyoloji Bölümü öğretim üyelerinden Yrd. Doç. Dr. Necmettin GÜLER tarafından teşhis edildi. Temin edilen örnekler -80 °C de muhafaza edildi.

3.1.2. Kullanılan Bakteriler

Bu araştırmada 7 standart bakteri suşu kullanıldı. Kullanılan standart bakteri suşları Trakya Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Mikrobiyoloji Laboratuvarı'ndan temin edildi. Kullanılan bakteriler ve kodları Tablo 3.1.2'de gösterilmiştir. Kullanılan yöntemin kontrolünü ve test edilen bakteri suşlarının duyarlılığını belirlemek için Ampicillin, Ofloxacin ve Chloramphenicol standart antibiyotik diskleri kullanıldı.

Tablo 3.1.2. Kullanılan Bakteriler ve Kodları

Bakteriler	Bakteri Kodları
Staphylococcus aureus	ATCC29213
Klebsiella pneumonia	ATCC33495
Enterococcus faecalis	ATCC29212
Pseudomonas aeruginosa	ATCC27853
Enterobacter cloacae	ATCC13047
Escherichia coli	ATCC25923
Serratia marcescens	Klinik izolat

3.1.2.1. *Enterobacter cloacae*

Enterobacter cloacae, Enterobacteriaceae ailesinden gram negatif, çubuk şeklinde bir bakteridir. Bu bakterilerin boyutları 0,3-0,6 x 0,8-2,0 μm arasında değişmektedir. *Enterobacter cloacae*, mezofil ortamda yaşayan 37 ° C'de optimum sıcaklığa sahiptir ve hareket etmek için peritrichous flagella kullanır.

Ortamda oksijen bulunduğu zaman, bu organizma aerobik solunum ile ATP yapabilmektedir; ama oksijen yokluğunda da fermantasyona geçiş yapabilir. *Enterobacter cloacae* deri ve yumuşak doku enfeksiyonları, alt solunum yolu enfeksiyonu, septik artrit, idrar yolu enfeksiyonları, osteomiyelit, intra-abdominal enfeksiyonları, endokardit ve oftalmik enfeksiyonları gibi birçok enfeksiyona sebep olabilen patojenlerdir [76]. Bu bakteriler, in vitro olarak tespit edilemez. Antibiyotiklere karşı yüksek derecede direnci olan üçüncü nesil sefalosporinler gibi beta-laktamaz ihtiva etmektedir [77].

3.1.2.2. *Enterococcus faecalis*

Enterokoklar gram pozitif, aerobik veya fakültatif anaerob, birkaç istisna dışında hareketsiz, oval kok formunda, katalaz negatif, genellikle kısa zincir veya diplokok görünümündedirler. Karakteristik özelliği ise, diğer gram negatif bakterilerle kıyaslandığında beslenme ihtiyaçları daha seçicidir. Enterokoklar genellikle her yerde bulunabilen mikroorganizmalardır. Birçok gıda türünde, özellikle de süt ürünlerinde çoğu zaman rastlanan bir bakteri grubudur.

Ayrıca, geniş bir pH aralığında ve birçok patojen bakterinin gelişme gösteremediği alkali pH'da (pH 9,6) gelişebilirler. Sodyum klorüre ve safra tuzuna karşı dayanıklıdırlar. Enterococcus cinsine ait bütün türler %3 NaCl ve %40 safra tuzu içeren besiyerlerinde gelişebilirken, *Enterococcus faecalis* tuza daha dirençli olup % 6.5 tuz konsantrasyonunda gelişebilmektedir.

Enterokoklar suda iyi üreyemezler ve insan dışkısında genellikle *Escherichia coli* 'den daha az sayıda bulunurlar. Fakat suda koliformlara kıyasla daha uzun süre canlılıklarını koruyabilirler. Bu özellikleri enterokokların su için fekal kontaminasyon indikatörü olarak değerini arttırmaktadır [78].

3.1.2.3. *Escherichia coli*

Escherichia cinsi içinde en önemli tür *Escherichia coli*'dir. *E.coli* bakterisinin boyu eninden daha uzundur. 2-6 μm boyunda ve 1-1,5 μm eninde düz bakterilerdir. Gram negatif, bazen hareketli, fakültatif anaerop, 1-2 mm çapında S tipi koloniler yapan bakterilerdir. Özellikle 44°C de üremesi diğer bakterilerden ayrılmasını sağlar.

Memelilerde ve kuşlarda barsak floralarında bulunur. Barsaktaki diğer bakterilerle dengeli olarak bulunur; barsaktaki beslenme ve kokuşma gibi işlemlerde yardımcı olur. Fakat canlının bağışıklık sistemi zayıfladığı zaman kana ve dokulara yayılarak hastalık etkeni oluşturur. Bu hastalıklar özellikle ishalli hastalıklardır. Fakat idrar yolu enfeksiyonlarına, sinüzite ve menenjit gibi hastalıklara da neden olmaktadır [79].

3.1.2.4. *Klebsiella pneumoniae*

Klebsiella cinsi bakteriler genellikle Enterobacteriaceae grubunun özelliklerini gösterir. 0,7-1,5 × 2,0-5,0 μm büyüklüğünde, hareketsiz, sporsuz, çevresi polisakkarit bir kapsülle çevrelenmiş gram negatif çomaklardır. Kapsül bu bakterinin fırsatçı patojen olmasına ve fagositozdan korunmasına neden olur. Kapsülleri en iyi glukozlu besiyerlerinde görülmektedir. Kanlı besiyerlerinde kapsüllerini saklamaktadırlar [80].

Klebsiella cinsi mikroorganizmalar birçok antibiyotiğe karşı dirençlidir. Araştırmalar, dirençli genlerin kaynağı olarak, bir plazmitin etkili olduğunu göstermektedir. Çoğunlukla direnç gösterdikleri tetrasiklinler, aminoglikozitler, sülfametoksazol, trimetoprim ve florokinonlardır [81].

3.1.2.5. *Pseudomonas aeruginosa*

Pseudomonadaceae familyasının en çok hastalık yapan türüdür. 1-3 µm boyunda, 0,5-1 µm eninde ve gram-negatif bakterilerdir. Karakteristik özelliği kültürlerde piyosiyanin adı verilen çözünür fenazin pigmentini açığa çıkarmasıdır. İlk defa 1960'lı yıllarda insan patojeni olarak kabul edilmiştir. Çünkü, kistik fibrözlü ve immün sistemi baskılanmış hastaların vücudunda enfeksiyona neden olmuştur. Günümüzde üriner sistem, akciğer, kan kaynaklı bakteriyel enfeksiyonların önemli sebeplerinden biri olarak kabul edilmektedir [82].

3.1.2.6. *Serratia marcescens*

Serratia marcescens gram negatif bir bakteridir. Gram negatif bakteriler, bir dış zar ile kapalı peptidoglikan tek kat yapılmış ince bir hücre duvarına sahiptir. Bu dış zar glukozamin fosfat dimeri bağlı olan yağlı asitlerin fosfolipitlerinden oluşan özel bir türdür [83]. *Serratia* hastane enfeksiyonlarına neden olan fırsatçı bir patojendir. Bu, genel olarak, penisilin ve ampisilin gibi bakteriyel enfeksiyonları tedavi etmek için kullanılan birçok antibiyotiklere dayanıklıdır [84].

3.1.2.7. *Staphylococcus aureus*

Gram pozitif olan *S. aureus* 1µm büyüklüğünde, kamçısız, hareketsiz ve yuvarlak koklardır. *S.aureus'*un karakteristik özelliği plazmayı pıhtılaştırdığı için koagülaz pozitif koklar olarak bilinmesidir. Dış ortamda yaygın olarak bulunmaktadır. Eşyaların üzerinde, deride, burun mukozasında, tozda ve toprak gibi yerlerde rastlanmaktadır. Ortam şartlarına iyi uyum sağladıkları için yaygın olarak görülmektedir. İnsanlarda çeşitli enfeksiyonlara neden olabilirler [85].

3.1.3. Kullanılan Kimyasal Madde ve Ekipmanlar

Çalışmamızda kullanılan kimyasal maddeler analitik saflıkta olup, Sigma, Aldrich, Merck, Oxoid ve Riedel-de Haen'den satın alındı.

Çalışmada Trakya Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü Biyokimya Araştırma Laboratuvarı, Kimya Bölümü Biyokimya Araştırma Laboratuvarı, Kırklareli Üniversitesi Sağlık Hizmetleri Meslek Yüksek Okulu Laboratuvarındaki ve Kırklareli Devlet Hastanesindeki alet ve cihazlar kullanıldı.

Isıtıcı ve manyetik karıştırıcı (Chiltern HS31),

Rondo (Tefal 400W),

Pasteur fırını (Nüvefuge CN180),

Vortex (Fisons),

Evaporatör (Buchi R- 200),

Etüv (Hybaid-Midi 14),

pH-metre (Hanna-HI 221),

Analitik terazi (Gec Avery),

Spektrofotometre (Ceceil 5000 series CE5502, Shimadzu UV-1601),

Dağıtıcı ve mikro pipetler (Eppendorf),

Çalkalamalı su banyosu (Clifton 100-400 rpm; termostatlı)

Otoklav (Nüve OT 4060) kullanılan başlıca cihazlardır.

Bunların dışında balon jojeler, pensler, cam petriler, eküvyon çubukları, cam tüpler, erlenler, şırıngalar, membran filtreler, Whatmann No:1 kağıdı, Ofloxacin, Ampicillin ve Chloramphenicol antibiyotik diskleri, BHT, BHA, C Vitamini, $AlCl_3$, aseton, metanol, Na_2CO_3, DPPH, linoleik asit, gallik asit, Folin Ciocalteu Reaktifi, NH_4SCN, $FeCl_2$, HCl, Tween 20 kullanılan başlıca ekipman ve kimyasallardır.

3.1.4. Çözeltilerin ve Besiyerinin Hazırlanması

3.1.4.1. Antioksidan Aktivite Tayininde Kullanılan Çözeltilerin Hazırlanması

Folin-Ciocalteu Reaktifi ($CuSO_4$ + fosfotungistik-fosfomolibdik asit)

Ticari olarak satın alındığı şekilde kullanıldı.

1 mM DPPH çözeltisi

0.0986 g DPPH tartılarak etanol ile balon jojede çözülerek 250 mL'ye tamamlandı.

0.1 mM DPPH çözeltisi

1 mM DPPH çözeltisinden 10 mL alınarak etanolle balon jojede 100 mL'ye tamamlanarak 1mM'lık DPPH çözeltisi elde edildi.

% 75'lik Etanol

390.6 mL etanol ile destile su balon jojede 500 mL'ye tamamlanarak hazırlandı.

% 30'luk NH_4SCN çözeltisi

30 g NH_4SCN tartılarak destile su ile balon jojede 100 mL'ye tamamlanarak hazırlandı.

20 mM $FeCl_2$ çözeltisi

0.2535 g $FeCl_2$ tartıldı ve % 3.5'luk HCl ile balon jojede 100 mL'ye tamamlanarak hazırlandı.

Linoleik asit emülsiyonu

175 mL Tween 20 ve 155 µL linoleik asit 0.04 M fosfat tamponu (pH 7.0) ile balon jojede 50 mL'ye tamamlanarak hazırlandı.

% 10'luk TCA çözeltisi

10 g TCA tartıldı ve destile su ile balon jojede 100 mL'ye tamamlanarak hazırlandı.

0.04 M fosfat tamponu (pH 7.0)

KH_2PO_4 (5.44 g/L) ve $Na_2HPO_4.\ _2H_2O$ (7.12 g/L) çözeltilerinin pH 7.0 olacak şekilde pH metre yardımı ile karıştırılması ile hazırlandı.

% 0.1'lik $FeCl_3$ çözeltisi

0.1 g $FeCl_3$ tartıldı ve destile su ile balon jojede 100 mL'ye tamamlanarak hazırlandı.

% 1'lik $K_3Fe(CN)_6$ çözeltisi

1 g $K_3Fe(CN)_6$ tartıldı ve destile su ile balon jojede 100 mL'ye tamamlanarak hazırlandı.

Gallik asit çözeltisi (GAE)

0.029 g gallik asit tartılarak distile su ile mezürde 29 mL'ye tamamlanarak hazırlandı.

0.2 M fosfat tamponu (pH 6.6)

KH_2PO_4 (27.218 g/L) ve $Na_2HPO_{4.2}H_2O$ (35.598 g/L) çözeltilerinin pH 6.6 olacak şekilde pH metrede karıştırılması ile hazırlandı.

% 2'lik Na_2CO_3 çözeltisi

2 g Na_2CO_3 tartılarak destile su ile balon jojede 100 mL'ye tamamlanarak hazırlandı.

3.1.4.2. Antibakteriyel Aktivite Tayininde Kullanılan Besiyeri ve Çözeltiler

Besiyeri için; 38 g Müller Hinton agar tartıldı ve 1000 mL distile su ilave edildi ve benmari yöntemiyle eritilerek hazırlandı. 121°C'de otoklavda 15 dk steril edildikten sonra besiyerleri steril disposable petrilere döküldü. McFarland standart çözeltisi; 0,5McFarland değerinde standart çözelti cihazla belirlenerek hazırlanmıştır.

3.2. Metod

3.2.1. Ekstrelerin Hazırlanması

-80°C'de dondurulmuş halde bulunan meyveler oda sıcaklığına çıkartılarak çözdürüldü. Aseton ve metanol çözücüleri kullanılarak ekstreler hazırlandı.

Aseton ve metanol ekstraksiyonları için 145,5' şer gram meyve 375 mL çözücü ile 25°C' de 150 rpm'de çalkalamalı su banyosunda 1 saat bekletildi. Süzgeç kağıdından süzüldü ve süzülen meyvelere tekrar 375 mL çözücü ilave edilerek aynı işlem tekrarlandı ve tekrar süzüldü. Süzüntüler birleştirilerek çözücüleri evaparatörde 40°C'de uçuruldu [86]. Meyvelerden ekstrakte edilebilen bileşiklerin miktar tayini için tartımı alındı.

3.2.2. Antioksidan Aktivitenin Belirlenmesi

3.2.2.1. Toplam Fenolik Madde Tayini

Bitkilerin aseton ve metanol ekstralarındaki çözünebilen fenolik maddeler Folin-Ciocalteu reaktifi (FCR) ile tayin edildi. Bu metodda fenolik bileşikler ile Folin-Ciocalteu reaktifi mavi yeşil renklerinde bileşik oluşturmaktadır. Oluşan bu renkli bileşik polifenolik madde miktarıyla doğru orantılıdır ve 760 nm'de maksimum absorbans gösterir [87].

Bitkilerin 1000 µg/mL konsantrasyonunda hazırlanan aseton ve metanol ekstraktlarından 0,1 mL alındı. 4,5 mL distile su ilave edildikten sonra 0,1 mL FCR eklendi. 3 dakika sonra 0,3 mL % 2'lik Na_2CO_3 çözeltisi ilave edilerek oda koşullarında 2 saat çalkantılı su banyosunda 250 rpm'de bekletildi. Süre sonunda örneklerin absorbansları okundu ve elde edilen sonuçlar oluşturulan gallik asit standart grafiğinden elde edilen denklem kullanılarak, ekstrelerin fenolik madde miktarları tayin edildi.

3.2.2.2. DPPH Radikali Giderme Aktivitesi Tayini

Bu metod bir serbest radikal olan DPPH (1,1-difenil-2-pikrilhidrazil) radikalinin antioksidan madde tarafından yakalanarak mor renginin açılmasının spektrofotometrede ölçülerek tayin edilmesine dayanır [88]. Radikalin sahip olduğu mor rengin açılması antioksidan aktivitenin varlığını belirtmektedir.

100, 250, 500, 750, 1000 µg/mL konsantrasyonlarda hazırlanan ekstrelerden ve 25, 50, 75, 100, 250 µL/mL konsantrasyonlarda hazırlanan standart çözeltilerden 1'er mL alınarak, 4 mL 0.1 mM DPPH (etanolde) çözeltisi ilave edildi. Karışım vortekslendikten sonra karanlıkta ve oda koşullarında 30 dk bekletildi. Süre sonunda spektrofotometrede 517 nm absorbansta değerleri okundu.

% DPPH radikali giderme aktivitesi bu formülle hesaplanarak belirlendi:

$$\%DPPH\ Radikali\ Giderme\ Aktivitesi = \frac{Kontrolu\ n\ Absorbansı - Örnek\ Absorbansı}{Kontrol\ Absorbansı} \times 100$$

Aktiviteler hesaplandıktan sonra %inhibisyon-konsantrasyon grafiği çizildi.

3.2.2.3. Linoleik Asit Sisteminde Ferrik Tiyosiyanat (FTC) Metodu ile Toplam Antioksidan Aktivite Tayini

Bu metodda amaç, in vitro ortamda linoleik asit oksidasyonunu oluşturup oksidasyon sırasında Fe^{+2} iyonlarını Fe^{+3} iyonlarına yükseltgemektir. Peroksitlerin oluşumu inkübasyonda bekletilen karışımdan belli aralıklarla alınan örneklerin spektrofotometrik olarak ölçülmesi ile belirlenmektedir. Yüksek absorbans yüksek peroksit değerini göstermektedir [90].

50, 100, 250, 500, 750, 1000 µg/mL konsantrasyonlardaki bitki ekstraktlarının ve 50, 100, 250, 500, 750, 1000 µg/mL konsantrasyonlarındaki standart madde çözeltilerinin 1 mL' sine 1.5 mL fosfat tamponu (0.04 M pH 7.0) ve 2.5 mL linoleik asit emülsiyonu eklendi. Linoleik asit emülsiyonu 175 mg Tween 20 ve 155 µL linoleik asidin fosfat tamponu ile (0.04 M pH 7.0) 50 mL'ye tamamlanması ile hazırlandı. Kontrol örneği 2.5 mL fosfat tamponu ve 2.5 mL linoleik asit emülsiyonu ile hazırlandı. Vortekslenen çözeltiler inkübatörde 37°C'de inkübasyona bırakıldı. 156 saat boyunca

12 saatte bir inkübasyon çözeltisinden 0.1 mL alınarak 4.7 mL % 75'lik etil alkol ve 0.1 mL % 30'luk NH_4SCN eklendi. 3 dakika sonra hazırlanan karışımlara; %3.5'lik HCl'de hazırlanmış olan 0.1 mL $FeCl_2$ (20 mM) çözeltisi eklendi ve 5 dakika sonra oluşan kırmızı rengin absorbansı 500 nm'de ölçüldü. Linoleik asit peroksidasyonunun inhibisyonu şu formülle hesaplandı:

$$\%İnhibisyon = \frac{500\ nm'de\ örnek\ absorbansı}{500\ nm'de\ kontrolün\ maksimum\ absorbansı} \times 100$$

3.2.2.4. İndirgeme Kapasitesi Tayini

Bu metodda amaç Fe^{+3} iyonlarını Fe^{+2} iyonlarına indirgemek ve $FeCl_3$ ilavesiyle oluşan mavi renkli bileşiğin absorbansını ölçmektir. Okunan absorbans değeri ne kadar yüksekse, örneğin okadar iyi indirgeme kapasitesine sahip olduğu anlamına gelmektedir [89].

50, 100, 250, 500, 1000 μg/mL konsantrasyonlarında hazırlanan bitki ekstraktları ve standart madde çözeltilerinin 1 mL'sine, 2.5 mL fosfat tamponu (0.2M, pH 6.6) ve 2.5 mL % 1'lik $K_3Fe(CN)_6$ ilave edildi. Karışımlar 20 dakika boyunca 50°C'de çalkalamalı su banyosunda bekletildikten sonra, 2.5 mL % 10'luk TCA eklendi ve vortekslendi. Vorteks sonrası karışımlardan 1 mL alınarak 1 mL distile su ve 0.5 mL % 0.1'lik $FeCl_3$ çözeltisi ile karıştırıldı. Spektrofotometrede 700 nm'de absorbans değerleri ölçüldü ve konsantrasyon-absorbans grafiği çizilerek deney sonucu değerlendirildi.

3.2.3. Antibakteriyal Aktivite Tayin Yöntemi

3.2.3.1. Bakteri Kültürlerinin Hazırlanması

Bakteri kültürleri için besiyeri olarak Nutrient agar kullanıldı. Besiyerleri steril olarak hazırlandıktan sonra 20 mL'lik miktarlarda 90 mm çaplı steril petri kaplarına döküldü. Bakteri kültürlerini hazırlamak için 37°C'ye ayarlanmış etüvde 24 saat inkübasyona bırakıldı.

3.2.3.2. Disk Difüzyon Yöntemi

Bitki ekstrelerinin antimikrobiyal aktivitelerinin bulunup bulunmadığını belirlemek amacı ile disk difüzyon yöntemi kullanıldı [91]. Hazırlanmış olan bitki ekstraktları 50, 100, 200, 500 mg/mL olacak şekilde DMSO içerisinde çözüldü. Elde edilen çözeltiler membran filtreden (0.45 μm) geçirilerek steril edildi. Mikroorganizmaların katı besiyerlerinde üreyen 18-24 saatlik kültürlerinden öze yardımı ile alınan koloniler serum fizyolojik içinde süspanse edildi ve McFarland ölçüm cihazında ölçülerek 0,5 McFarland değerinde dilüsyon hazırlandı. Müller Hinton agar içeren petrilerin yüzeyine eküvyon çubuğu kullanılarak bakteri dilüsyonundan steril pipet yardımıyla 100 μL ekildi. Çözeltilerden 35 μL alınarak 6 mm çaplı steril disklere (Whatmann No:1) emdirildi. Daha sonra diskler petrilere uygun şekilde yerleştirildi. Bakteriler 37°C'da, 24 saat süreyle etüvde inkübasyona bırakıldı. Pozitif kontrol olarak Ampicillin, Ofloxacin ve Chloramphenicol standart antibiyotik diskleri kullanıldı. Negatif kontrol olarak da sadece DMSO'nun emdirildiği diskler kullanıldı.

4. BULGULAR

Pyrus elaeagrifolia bitkisinden hazırlanan aseton (AA) ve metanol (MA) ekstrelerinin antioksidan aktivitesi; ekstrelerin indirgeme kapasitesi, DPPH serbest radikal giderme aktivitesi ve total antioksidan aktivite metodları kullanılarak değerlendirildi. Ayrıca tüm ekstrelerin toplam fenolik miktarları gallik asitle eşdeğer olarak belirlendi.

Pyrus elaeagrifolia bitkisinden hazırlanan aseton (AA) ve metanol (MA) ekstrelerinin antibakteriyel aktivitesi disk difüzyon yöntemiyle belirlendi.

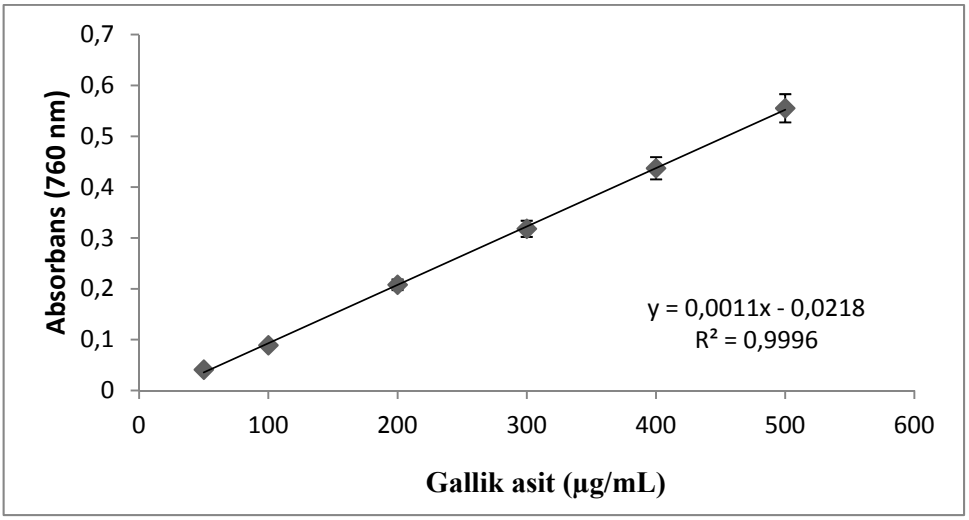
Elde edilen ekstaksiyonlar sonucunda, bitkilerden ekstrakte edilebilen bileşiklerin verimi aseton ekstresi için %22, metanol ekstresi için %11'dir.

4.1. Toplam Fenolik Madde Miktar Tayini

Pyrus elaeagrifolia bitkisinden elde edilen aseton ve metanol ekstrelerindeki toplam çözünebilen fenolik maddeler Folin-Ciocalteu reaktifi (FCR) ile tayin edildi. Eğer ortamda fenolik madde bulunuyorsa FCR ilave edilen ekstrelerde 760 nm'de maksimum absorbans değeri gözlenmektedir. Absorbansdaki yüksek değer fenolik madde miktarıyla doğru orantılıdır. Bu amaçla gallik asit kullanılarak standart gallik asit grafiği hazırlandı (Şekil 4.1.1). Bu standart grafikten elde edilen doğru denklemi ile örneklerin toplam fenolik madde miktarları mg gallik asit (mg GAE/g ekstrakt) eşdeğeri şeklinde hesaplandı.

Tablo 4.1.1. Ekstrelerin gallik asit eşdeğeri cinsinden toplam fenolik madde miktarı.

Ekstreler	**Toplam Fenolik Madde Miktarı (µg GAE/mg)**
Aseton	49,81±0,81
Metanol	28,91±3,6



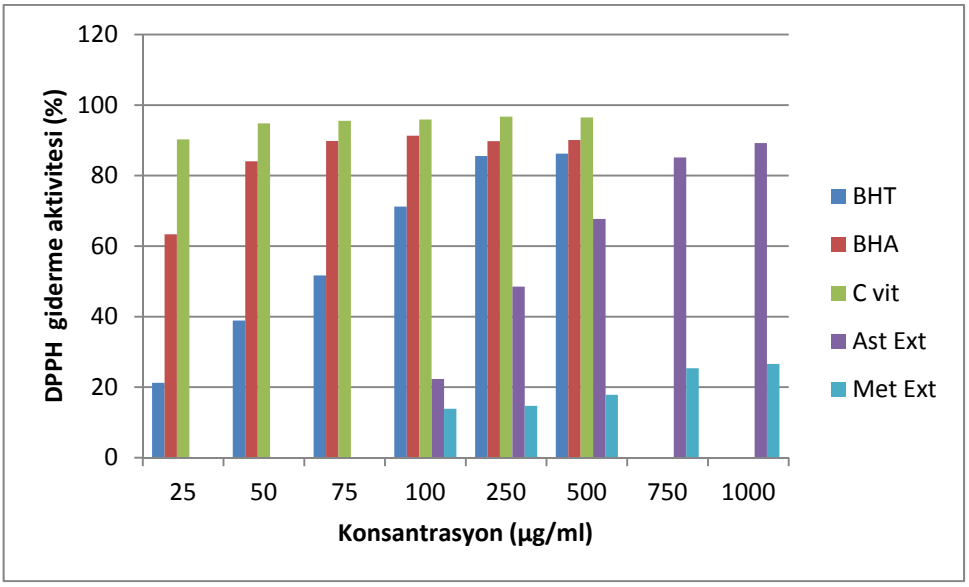
Şekil 4.1.1. Gallik asit standart grafiği

Standart grafik denkleminden hesaplanan sonuçlar gallik asit ekivalenti cinsinden metanol ekstraktı için 28,91±3,6 GAE mg/g ekstrakt, aseton ekstraktı için 49,81±0,81 GAE mg/g ekstrat olarak belirlendi. Bu sonuçlara göre aseton ekstresinin fenolik madde açısından metanol ekstresine göre daha zengin olduğu gözlenmiştir.

4.2. DPPH Radikali Giderme Aktivitesi

*P. elaeagrifolia'*dan hazırlanan ekstreler DPPH serbest radikal giderme aktivitesi tayini için beş farklı konsantrasyonda (50, 100, 250, 500, 1000 µg/mL) hazırlandı. Standart olarak BHT, BHA ve C vitamini kullanıldı. Bitki ekstrelerinin aktiviteleri standartların aktiviteleri ile karşılaştırıldı. Etanoldeki DPPH çözeltisinin rengi mordur. Çözeltiye ilave edilen maddeler eğer antioksidan özelliği taşıyorsa DPPH radikalini giderirler ve mor renkli olan çözeltinin rengi sarıya yakın bir renge dönüşür. İlave edilen madde DPPH çözeltisinin rengini ne kadar çok açarsa o kadar düşük absorbans gözlenir ve bu düşük absorbansda yüksek aktivite anlamına gelmektedir.

Bu metodda hazırlanan ekstrelerin düşük konsantrasyonlarının DPPH radikalini giderme aktivitesi düşük iken, aseton ekstresinin 500-1000 µg/mL'lik konsantrasyonları standartlarla kıyaslanabilecek yaklaşık %90 civarında aktivite göstermiştir (Şekil 4.2.1, Şekil 4.2.2).



Şekil 4.2.1. *Pyrus elaeagrifolia* ekstrelerinin DPPH radikali giderme aktivitesi değerleri

Yapılan çalışmada, aseton ve metanol ekstrelerinin DPPH radikal giderme aktivitelerinin aynı olmadığı görüldü. Aseton ekstresi metanol ekstresine göre daha fazla aktivite göstermiştir ve DPPH radikali giderme aktivitesi yüksektir. Standartlarla karşılaştırıldığında aseton ekstratının yüksek konsantrasyonlarının standartlara yakın değerler gösterdiği görülmektedir. Metanol ekstresinde ise DPPH serbest radikali giderme aktivitesi düşük değerlerdedir. Tüm ekstraktlarda, konsantrasyon artışı ile birlikte % inhibisyon oranlarında artış gözlendi (Tablo 4.2.1).

Tablo 4.2.1. *Pyrus elaeagrifolia* bitkisinin aseton ve metanol ekstrelerinin ve BHT, BHA, C Vitamini standartlarının DPPH radikali giderme oranları (%inhibisyon)

Konsantrasyon	AA	MA	BHT	BHA	C Vitamini
25 µg/mL	-	-	21,24±1,1	63,355±2,3	90,27±0,04
50 µg/mL	-	-	38,91±2,3	84,065±1,3	94,82±0,6
75 µg/mL	-	-	51,695±3,9	89,805±0,7	95,56±0,2
100 µg/mL	22,345±1,15	13,89±0,42	70,23±2,2	91,305±1,4	95,885±0,15
250 µg/mL	48,505±0,61	14,73±0,73	85,555±1,4	89,78±1	96,73±0,31
500 µg/mL	76,74±3,8	17,84±0,33	86,23±1,5	90,1±0,9	96,5±0,1
750 µg/mL	85,125±2,1	25,39±1,1	-	-	-
1000 µg/mL	89,23±0,3	26,59±1,3	-	-	-

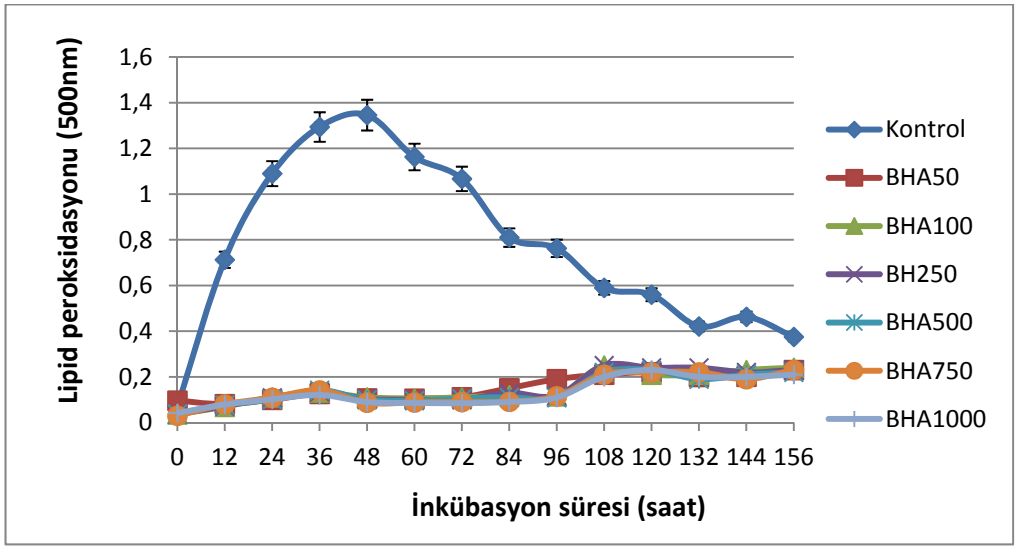
4.3. Linoleik Asit Sisteminde Ferrik Tiyosiyanat (FTC) Metodu ile Toplam Antioksidan Aktivite Tayini

Bu metotda hazırlanan linoleik asit emülsiyonu sabit sıcaklıkta, 156 saat boyunca, karanlıkta oksidasyona bırakıldı. Yağların oksidasyonu sırasında peroksitler oluştuğu için ortamdaki peroksitler spektrofotometrik olarak ölçüldü. Ölçüm için inkübasyona bırakılan linoleik asit emülsiyonundan, 12 saatte bir örnekler alınarak üzerine Fe^{+2} ve SCN^{-} ilave edildi. Oluşan peroksitler, ortama ilave edilen Fe^{+2} iyonlarını $Fe^{+3'}$e yükseltgerler ve Fe^{+3} te SCN^{-} ile reaksiyona girerek maksimum absorbans veren $Fe(SCN)^{+2}$ bileşiğini oluşturur. Absorbansın yüksek olması ortamdaki peroksit miktarının fazla olduğu anlamına gelmektedir ve bu da ortamda antioksidan maddenin yetersiz ya da az miktarda olduğu anlamına gelmektedir.

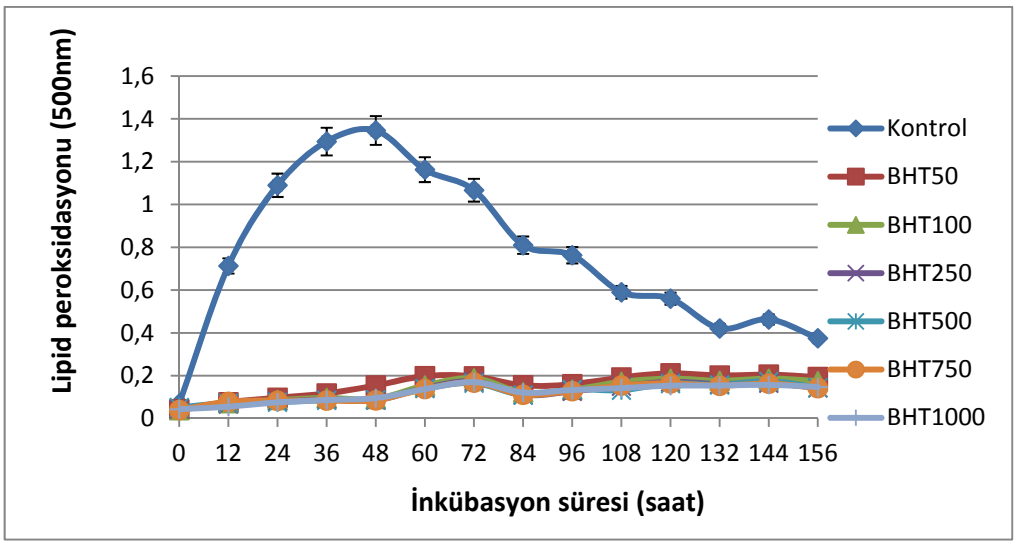
P. elaeagrifolia bitki ekstrelerinden hazırlanan 50, 100, 250, 500, 1000 µg/mL konsantrasyonlarındaki örneklerde linoleik asit peroksidasyonu ölçüldü ve sonuçlar BHT ve BHA standartları ile karşılaştırıldı. Standart maddeler ve ekstreler için zaman-absorbans grafikleri çizildi (Şekil 4.3.1, Şekil 4.3.2, Şekil 4.3.3, Şekil 4.3.4). Kontrol örneğinin absorbansının maksimum olduğu, yani lipid peroksidasyonunun en fazla

olduğu zamandaki veriler kullanılarak, bu absorbans değeri ile ekstrelerin lipid peroksidasyonunu inhibe etme oranı belirlendi (Tablo 4.3.1)(Şekil 4.3.5).

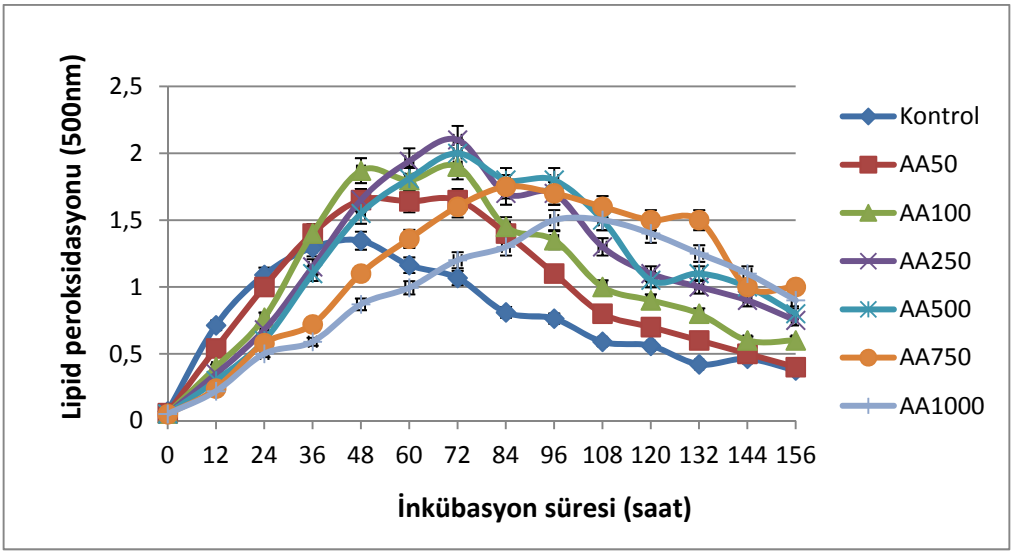
Şekil 4.3.1'de ve Şekil 4.3.2'de görüldüğü gibi BHT ve BHA standart maddeleri tipik bir antioksidan davranışı sergilemiş ve bütün konsantrasyonlarında lipid peroksidasyonunu inhibe etmiştir. Şekil 4.3.3. ve Şekil 4.3.4.'e göre bitki ekstrelerinin lipid peroksidasyonunu önlemede başarısız olduğu görülmüştür.



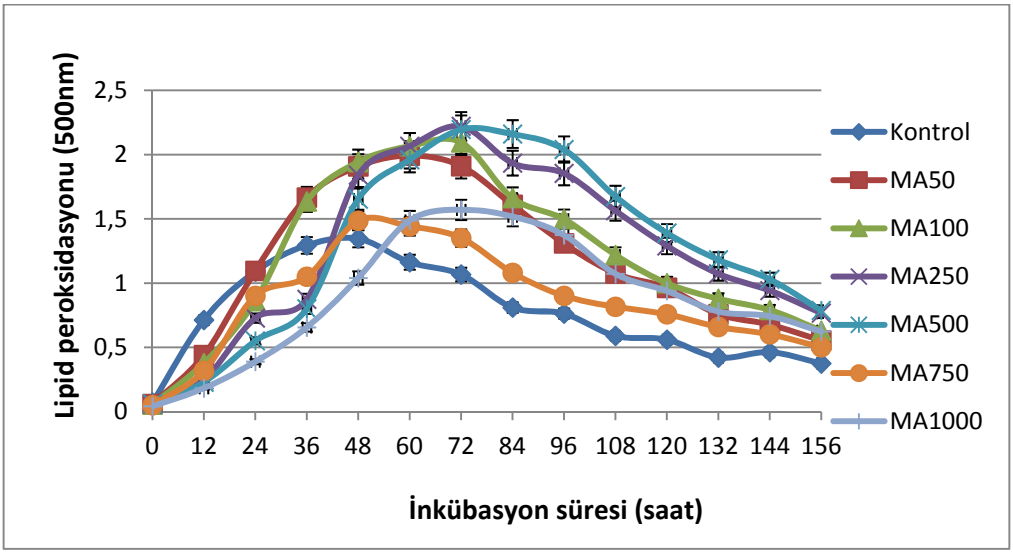
Şekil 4.3.1. BHA'nın linoleik asit peroksidasyonu üzerindeki etkisi



Şekil 4.3.2. BHT'nin linoleik asit peroksidasyonu üzerindeki etkisi



Şekil 4.3.3. Linoleik asit peroksidasyonu üzerinde aseton ekstresinin etkisi

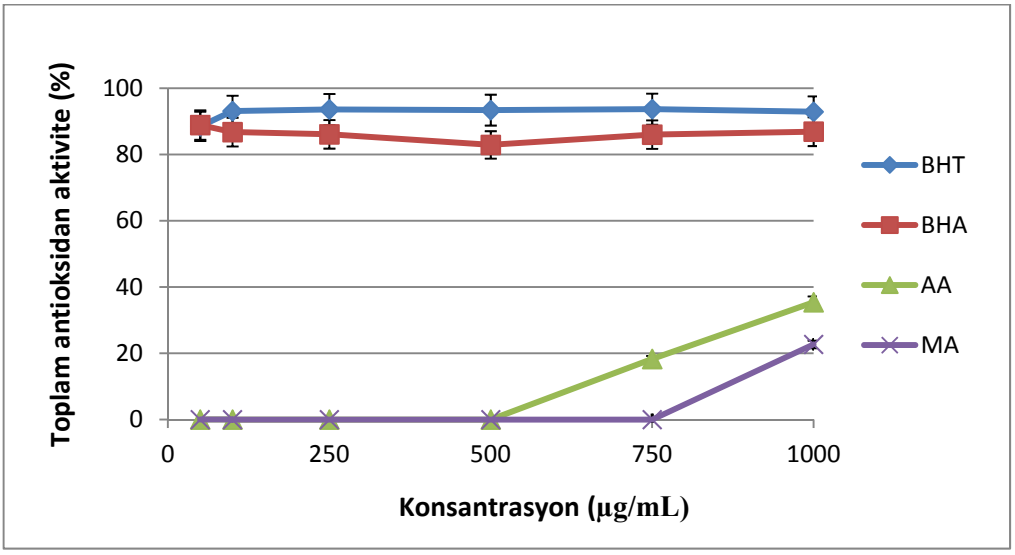


Şekil 4.3.4. Linoleik asit peroksidasyonu üzerinde metanol ekstresinin etkisi

Bitki ekstraktlarının ve standartların antioksidan aktivitelerine ait % inhibisyon değerleri Tablo 4.3.1'te verilmiştir. Aseton ekstresi 750 µg/mL ve 1000 µg/mL konsantrasyonlarında ve metanol ekstresinin de sadece 1000 µg/mL konsantrasyonunda düşük seviyede aktivite görülmüştür.

Tablo 4.3.1. Ekstrelerin ve standart maddelerin lipid peroksidasyonunu inhibe etme oranları (%inhibisyon).

BİTKİ EKSTRESİ	% İNHİBİSYON					
	50µg/mL	100µg/mL	250µg/mL	500µg/mL	750µg/mL	1000µg/Ml
ASETON	-	-	-	-	18,3±2,7	35,4±3,2
METANOL	-	-	-	-	-	22,7±4,4
STANDART MADDE	% İNHİBİSYON					
	50µg/mL	100µg/mL	250µg/mL	500µg/mL	750µg/mL	1000µg/Ml
BHT	88,5±0,5	93,1±1,1	93,6±1,3	93,4±1,5	93,7±1,6	92,9±1,3
BHA	88,9±0,7	86,77±0,6	86,1±0,1	82,9±0,7	86±1,1	86,9±0,5

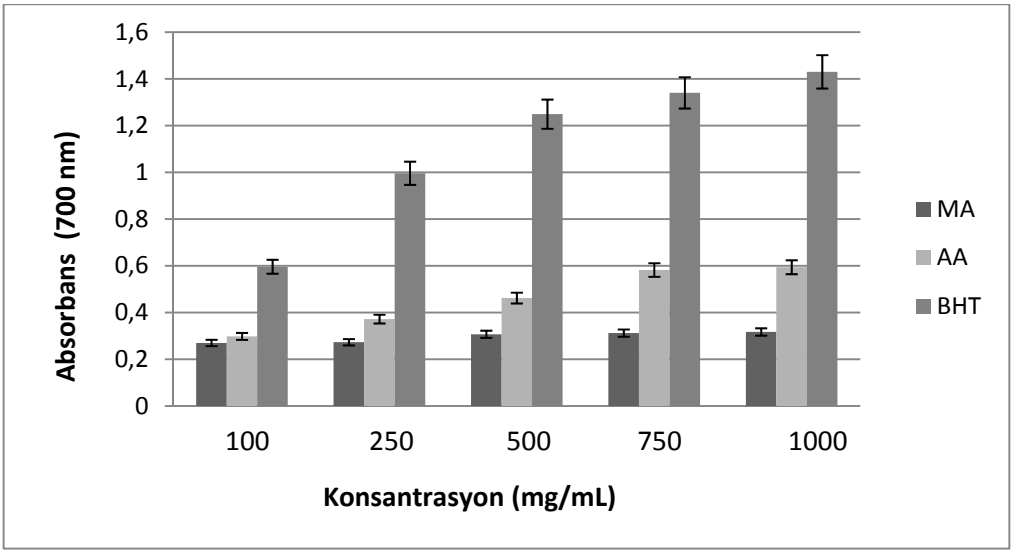


Şekil 4.3.5. Ekstrelerin ve standart maddelerin lipid peroksidasyonunu inhibe etme oranları (%)

4.4. İndirgeme Gücü Tayini

P. elaeagrifolia bitki ekstrelerinin indirgeme kapasitesi Oyaizu metoduna göre belirlenmiştir. İndirgeme gücünde amaç ortamda bulunan Fe^{+3} iyonlarının Fe^{+2} iyonlarına indirgenmesi ve sonuçlarının spektrofotometrik olarak ölçülmesidir. Yüksek absorbans değeri, yüksek antioksidan aktivite anlamına gelmektedir. Bileşiklerin Fe^{+3} iyonlarını indirgemesi, elektron verebilme yeteneklerinin bir göstergesidir. Bu yüzden bileşiklerin indirgeme güçleri antioksidan aktivitelerinin belirlenmesinde kullanılabilir.

Bu metodda bitki ekstreleri ile standart olarak BHT kullanılarak çalışılmıştır. Bitki ekstreleri ve BHT'nın absorbansları ölçülüp, absorbans-konsantrasyon grafikleri çizilmiş, ekstreler ile standart madde karşılaştırılarak ve indirgeme gücü belirlenmiştir (Şekil 4.4.1)(Tablo 4.4.1).



Şekil 4.4.1. *Pyrus elaeagrifolia* ekstrelerinin Fe^{+3}'ü Fe^{+2}'ye indirgeme kapasitesi

Grafikte de görüldüğü gibi bitki ekstrelerinin sonuçları standart madde ile karşılaştırıldığında; bitki ekstrelerinin yüksek aktiviteye sahip olmadıkları görülmektedir. Fakat aseton ekstresinin metanol ekstresine göre daha yüksek değerler gösterdiği görülmektedir.

Tablo 4.4.1. *Pyrus elaeagrifolia* ekstrelerinin Fe^{+3}'ü Fe^{+2}'ye indirgeme kapasitesi

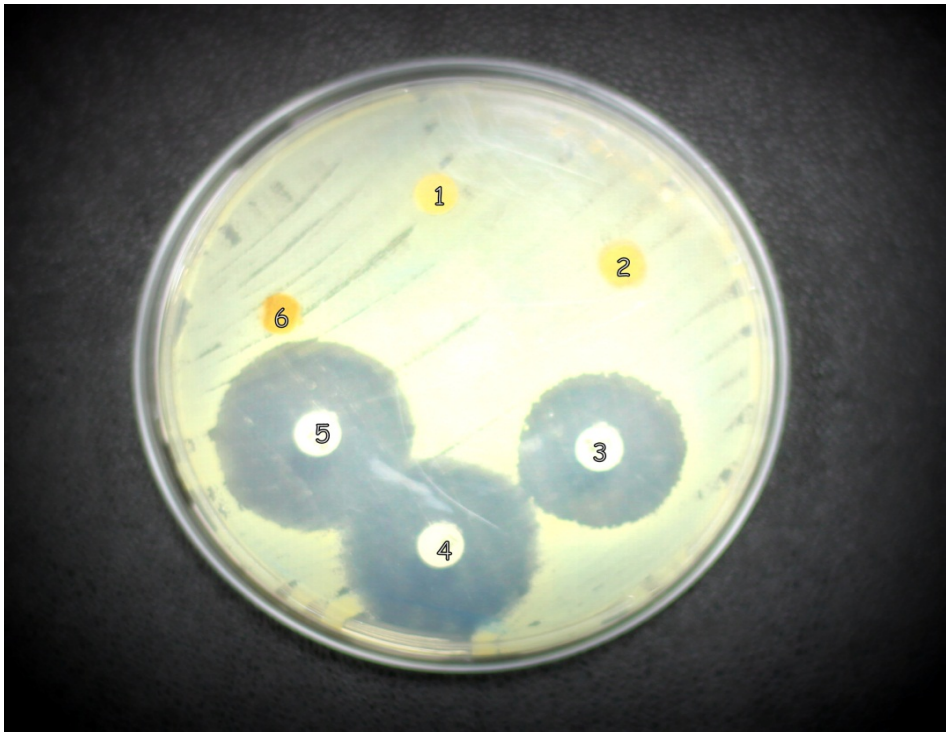
BİTKİ EKSTRESİ	**KONSANTRASYON (mg/mL)**				
	100mg/mL	**250mg/mL**	**500mg/mL**	**750mg/mL**	**1000mg/mL**
ASETON	**0,298±0,4**	**0,372±0,21**	**0,462±0,62**	**0,582±0,32**	**0,594±1,1**
METANOL	**0,27±0,92**	**0,273±1,2**	**0,307±0,62**	**0,312±0,34**	**0,317±0,12**
STANDART MADDE	**KONSANTRASYON (mg/mL)**				
	100mg/mL	**250mg/mL**	**500mg/mL**	**750mg/mL**	**1000mg/mL**
BHT	**0,596±0,14**	**0,996±0,038**	**1,249±0,058**	**1,34±0,028**	**1,43±0,021**

4.5. Antimikrobiyal Aktivite Tayini

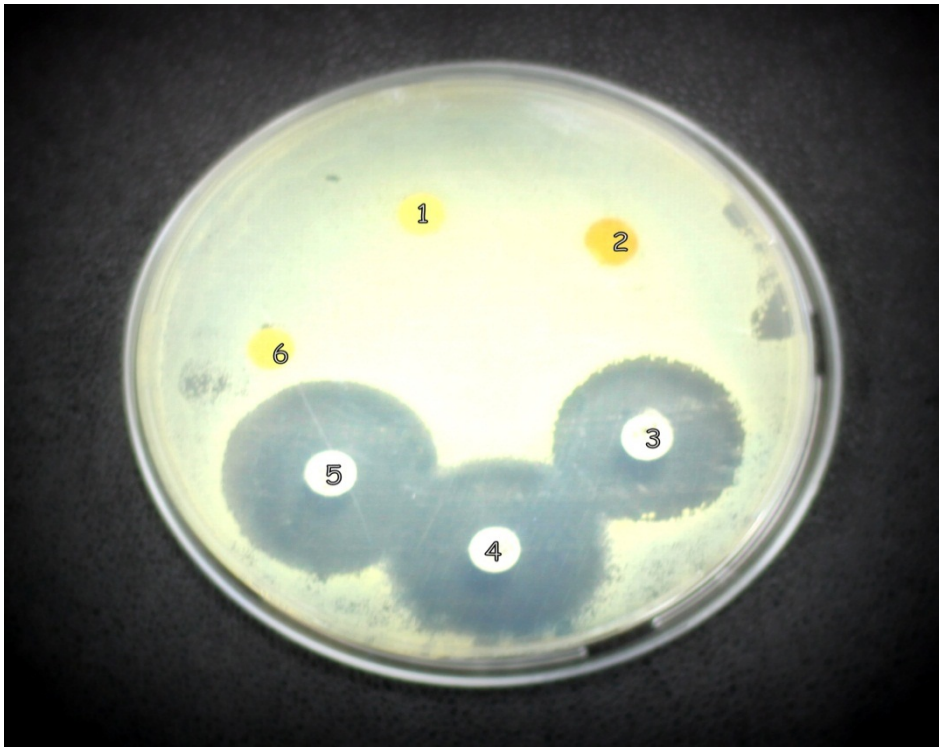
P. elaeagrifolia bitkisinden hazırlanan ekstrelerin antimikrobiyal etkisi 7 bakteri üzerinde disk difüzyon yöntemiyle araştırıldı. Antimikrobiyal etkilerin belirlenmesi için ekstrelerin 4 farklı konsatrasyonu (50 mg/mL, 100 mg/mL, 200 mg/mL, 500 mg/mL) ile çalışıldı. Negatif kontrol olarak DMSO, pozitif kontrol olarak da Ampicillin, Ofloxacin, Chloramphenicol standart antibiyotik diskleri kullanıldı. Çalışmada sonuç olarak ekstrelerin *Staphylococcus aureus* ATCC29213, *Klebsiella pneumonia* ATCC33495, *Enterococcus faecalis* ATCC29212, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC27853, *Enterobacter cloacae* ATCC13047, *Serratia marcescens* klinil izolat, *Escherichia coli* ATCC25923 bakterileri için inhibisyon zon çapı oluşturmadığı belirlenmiştir (Şekil 4.5.1 ve Şekil 4.5.2) (Tablo 4.5.1).

Tablo 4.5.1. *Pyrus elaeagrifolia'* dan hazırlanan ekstrelerin (200 mg/mL) test mikroorganizmaları üzerindeki antimikrobiyal etkileri

MİKROORGANİZMALAR	İNHİBİSYON ZON ÇAPLARI (mm)					
	AA	MA	DMSO	Ampicillin	Ofloxacin	Chloramphenicol
Enterobacter cloacae	(-)	(-)	(-)	(-)	31mm	31mm
Enterococcus facealis	(-)	(-)	(-)	29mm	20mm	29mm
Escherichia coli	(-)	(-)	(-)	23mm	32mm	32mm
Klebsiella pneumoniae	(-)	(-)	(-)	13mm	28mm	28mm
Staphylococcus aureus	(-)	(-)	(-)	21mm	26mm	30mm
Serratia marcescens	(-)	(-)	(-)	24mm	32mm	33mm
Pseudomonas aureginosa	(-)	(-)	(-)	(-)	26mm	(-)



Şekil 4.5.1. *Pyrus elaeagrifolia* bitki ekstrelerinin antimikrobiyal aktivitesi 1. AA, 2. MA, 3.Ampicillin, 4.Ofloxacin, 5.Chloramphenicol, 6.DMSO (50 mg/mL'de)



Şekil 4.5.2. *Pyrus elaeagrifolia* bitki ekstrelerinin antimikrobiyal aktivitesi 1. AA, 2. MA, 3.Ampicillin, 4.Ofloxacin, 5.Chloramphemicol,6.DMSO (100 mg/mL'de)

5. TARTIŞMA

Bu çalışma, daha önce detaylı olarak antioksidan ve antimikrobiyal aktivite çalışması yapılmadığı belirlenen Rosaceae (Gülgiller) familyasının bir üyesi olan *Pyrus elaeagrifolia* bitkisinin meyvelerinin bazı biyolojik aktivitelerinin araştırılması amacı ile yapılmıştır. *P. elaeagrifolia* bitkisinin aseton ve metanol çözücüleri ile ekstreleri elde edildi. Bitkinin antioksidan ve antimikrobiyal aktiviteleri araştırıldı ve toplam fenolik madde miktarı belirlendi. Ekstrelerin antioksidan aktivitesi; indirgeme gücü kapasitesi, ferrik tiyosiyonat (FTC) metodu ve DPPH radikali giderme metodları gibi 3 farklı metod ile, toplam fenolik madde miktarı ise gallik asit cinsinden belirlendi. Antimikrobiyal aktivite de disk difüzyon yöntemi ile belirlendi.

Birçok araştırmacı deneylerinde ekstraksiyon yaparken; su, aseton, petrol eteri, etanol, metanol, kloroform gibi çeşitli kimyasal çözücüler ve karışımlar kullanmıştır [92]. Çalışmamızda ekstrelerin hazırlanmasında toksisitesi diğer çözücülere oranla daha az, polaritesi yüksek, kolay temin edilebilen ve ekonomik açıdan uygun olan çözücüler tercih edildi.

P. elaeagrifolia meyvesinden elde edilen bitki ekstrelerinin DPPH radikal giderme metodunda, en çok DPPH radikali giderme aktivitesini aseton ekstresi göstermiştir. Metanol ekstresinin bütün konsantrasyonları %20 civarında DPPH radikali giderme aktivitesi göstermiştir. Fakat aseton ekstresinin 500 µg/mL ve üzerindeki konsantrasyonları standartlarla kıyaslanabilecek seviyede %80-90 civarında DPPH radikal giderme aktivitesi göstermiştir. Standart maddelerden BHT, BHA ve C vitamini arasında ise en fazla DPPH radikali giderme aktivitesi 500 µg/mL de yaklaşık %96 ile C vitamininde görülmüştür (Tablo 4.2.1).

Ahlat meyvelerinden elde edilen bitki ekstrelerinin indirgeme gücü tayininde bitki ekstrelerinin Fe^{+3} iyonlarını Fe^{+2} iyonlarına indirgeyebilme yeteneği incelendi. Bir bileşiğin iyi bir antioksidan olabilmesi için elektron transferi yapıp bileşiği indirgemesi gerekmektedir. Çalışmamızda da bitki ekstrelerinin indirgeme gücü için BHT standart maddesi kullanılarak kıyaslama yapıldı ve BHT tipik bir antioksidan gibi davranıp yüksek aktivite göstererek Fe^{+3} iyonlarını Fe^{+2} iyonlarına indirgerken, bitki ekstrelerinin

standart madde ile kıyaslanacak seviyede aktivite göstermediği belirlenmiştir (Şekil 4.4.1).

Bitki ekstrelerinin linoleik asit peroksidasyonunu inhibe edebilme aktivitesi FTC metoduna bağlı olarak farklı konsantrasyonlarda çalışıldı. Sonuçlar BHT ve BHA standart maddeleri ile karşılaştırıldı. Ekstrelerde konsantrasyon artışı ile lipid peroksidasyonunu inhibe etme oranında da artış görüldü. Fakat bitki ekstrelerinde görülen düşük aktivite sebebiyle konsantrasyona bağlı bir aktivite artışı gözlense bile bu aktivite tipik bir antioksidan olarak lipid peroksidasyonunu tamamen inhibe eden standart maddeler ile kıyaslanamayacak seviyededir (Şekil 4.3.5).

Ekstre eklenmemiş olan kontrol tüpünün absorbansında hızlı bir artış görüldü ve bu artış 48. saatte maksimuma ulaştı. Bu süre için; aseton ekstresinin 750 µg/mL ve 1000 µg/mL konsantrasyonlarında, metanol ekstresinin ise sadece 1000 µg/mL'lık dozunun düşük seviyede peroksidasyonu inhibe ederek, otooksidasyonun başlama süresini az da olsa uzattığı görüldü (Tablo 4.3.1).

Fenolik maddeler doğal antioksidanların önemli kısmını oluşturmakta ve bitkilerin bütün kısımlarında bulunmaktadır. Bu bileşikler bitkilerin genetik hasar almasını önlemek için bitkilere güneşten aldıkları ultraviyole ışığı absorbe edebilme özelliği kazandırırlar. Besinlerde bulunan ve kolay oksitlenen maddelerin fenolik bileşikler tarafından oksidasyonlarının engellendiği bildirilmiştir [71,93].

Toplam fenolik madde tayini metodu FCR metodu ile tayin edilerek, *P. elaeagrifolia* bitkisinden elde edilen ekstrelerin gallik asit cinsinden toplam fenolik madde miktarı aseton ekstresi için 49,81±0,81 µg GAE/mg ekstre ile metanol ekstresi için 28,91±3,6 µg GAE/mg ekstre olarak bulundu. Tablo 4.1.1'de görüldüğü gibi aseton ekstresi metanol ekstresine göre daha fazla fenolik madde içermektedir.

Bitkilerde bulunan fenolik maddelerin içeriği iklim şartları, hasat zamanı, ışık, tarım süreci ve depolama gibi birçok sebepten dolayı değişiklik gösterebilir. Kullanılan çözücü ve ekstraksiyon sırasında kullanılan yöntemler de ekstreler de bulunan fenolik madde miktarlarında değişikliğe sebep olabilir [94]. Çalışmada kullanılan aseton (5,4) ve metanol (6,6) çözücülerinin polaritelerinin farklı olması, ekstraksiyon sırasında bitkiden farklı tür ve miktarda fenolik bileşiklerin alınmasına neden olmuştur. Buna

bağlı olarak aseton ekstresinin toplam fenolik içeriğinin daha yüksek çıkması; iki ekstre kıyaslandığında aseton ekstresinin metanol ekstresine göre daha iyi DPPH radikali giderme, indirgeme gücü ve toplam antioksidan aktivite göstermesini açıklayabilir.

Çalışmamızın bir diğer kısmı ise bitkinin antimikrobiyal aktivitesinin araştırılmasıdır. *P. elaeagrifolia* meyvesinden elde edilen ekstrelerin antimikrobiyal etkisinin araştırılmasında pozitif kontrol olarak Ampicillin, Ofloxacin, Chloramphenicol antibiyotik diskleri ve negatif kontrol olarak da DMSO emdirilmiş diskler kullanıldı. Sonuçta ekstrelerin test bakterileri olan *Staphylococcus aureus* ATCC29213, *Klebsiella pneumonia* ATCC33495, *Enterococcus faecalis* ATCC29212, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC27853, *Enterobacter cloacae* ATCC13047, *Serratia marcescens* klinik izolat, *Escherichia coli* ATCC25923 üzerinde araştırılan 4 farklı konsantrasyonda da inhibisyon zon çaplarının oluşmadığı, antimikrobiyal etkisinin bulunmadığı belirlendi (Şekil 4.5.1 ve Şekil 4.5.2). Test bakterilerinin *P. elaeagrifolia* bitki ekstrelerine karşı direnç gösterdiği düşünülebilir. Antibiyotik disklerinin mikroorganizmaların birçoğuna karşı etkili oldukları meydana gelen inhibisyon çaplarından anlaşıldı.

Günümüzde endüstriyel alanda gıdaların saklanma koşullarının geliştirilmesi, depolanması ve raf ömrünün uzatılması gibi, kozmetik alanında daha az toksik madde içeren ürünlerin üretilmesi amaçlanmaktadır. İlaç sanayiinde mikroorganizmaların, antimikrobiyal maddelere karşı ciddi ölçüde direnç geliştirmesi önemli bir tehdit konusudur. Bu nedenden dolayı, her geçen gün yeni bitkisel ve doğal kaynaklı antioksidan ve antimikrobiyal maddelerin araştırılmasına olan ilgi artmaktadır.

Bu amaçla yapılan tez çalışmasında doğal bir kaynak olan ve ülkemizde kolaylıkla yetişebilen bir bitki olan *P. elaeagrifolia* bitkisinin meyveleri materyel olarak seçilmiştir. Meyvelerden elde edilen aseton ve metanol ekstrelerinin DPPH radikali giderme, indirgeme gücü, ferrik tiyosiyonat metodu ile antioksidan aktiviteleri çalışıldı ve toplam fenolik madde miktarı belirlendi. Bitki ekstrelerinin standart maddelerle kıyaslandığında düşük konsantrasyonlarının aktivite göstermediği fakat yüksek konsantrasyonlarında aktivitelere rastlandığı görüldü. Meyve ekstrelerinin antimikrobiyal aktiviteleri araştırıldığında, ekstrelerin test bakterileri üzerinde inhibisyon çapı oluşturmadığı saptandı. Sonuç olarak 3000-4000 arası türe sahip olan Rosaceae familyasının bir üyesi olan *P. elaeagrifolia* bitkisinin halk arasında yaygın

olarak kullanılmasına karşın, denenen çözücü sistemler içerisinde yüksek antioksidan aktivite sergilemediği, denenen test mikroorganizmalarına karşı antimikrobiyal aktivite göstermediği belirlendi. Ancak, yabani bir bitki türü olan ahlat bitkisinin antioksidan ve antimikrobiyal özellikleri, bitkinin farklı kısımlarında ve farklı çözücü sistemlerde araştırılabilir.

6. KAYNAKLAR

[1] M. Koçyiğit, ***Yalova Dilinde Etnobotanik Bir Araştırma***, İstanbul Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi, 2005.

[2] D. F. Farias, T. M. Souza, M. P. Viana, B. M. Soares, A. P. Cunha, I. M. Vasconcelos, N. M. P. S. Ricardo, P. M. P. Ferreira, V. M. M. Melo and A. F. U. ***Carvalho, Antibacterial, Antioxidant, and Anticholinesterase Activities of Plant Seed Extracts from Brazilian Semiarid Region,*** Brezilya, 2013.

[3] R. Lewin, ***Modern İnsanın Kökeni, TÜBİTAK Popüler Bilim Kitapları,*** Çeviri: N. Özüaydın, 7. basım, TÜBİTAK, Ankara 2000.

[4] M. Heinrich, J. Barnes, S. Gibbons, E.M. Williamson, ***Fundementals of Pharmacognosy and Phytotherapy, Churchill Livingstone,*** Edinburgh, 2004.

[5] E. Bayram, S. Kırıcı, S. Tansı, G. Yılmaz, O. ArabacI,S. Kızıl, D. Telci, ***"Tıbbi Ve Aromatik Bitkiler Üretiminin Arttırılması Olanakları",*** Türkiye Ziraat Mühendisliği VII. Teknik Kongresi Bildiriler Kitabı-I, 437–456, 11–15 Ankara, 2010.

[6] L. Salgueiro, A. P. Martins, & H. Correia***, Raw materials: the importance of quality and safety.*** Flavour Fragrance Journal, 25, 253-271, 2010.

[7] M. Viuda-Martos, M.A. Mohamady, J. Fernández-López, K.A. Abd ElRazik E.A. Omer, J.A. Pérez-Alvarez, E. Sendra, ***In vitro antioxidant and antibacterial activities of essentials oils obtained from Egyptian aromatic plants,*** Food Control, 22, 1715-1722, 2011.

[8] I. Jallali, W. Megdiche, B. M'Hamdi, S. Oueslati, A. Smaoui, C. Abdelly, ***Changes in phenolic composition and antioxidant activities of the edible halophyte Crithmum maritimum L. with physiological stage and extraction method.*** Acta Physiologiae Plantarum, 34, 1451–1459, 2012.

[9] N. Karray-Bouraoui, F. Harbaoui, M. Rabhi, I. Jallali, Ksouri, Attia, ***Different antioxidant responses to salt stress in two different provenances of Carthamus tinctorius L.*** Acta Physiologiae Plantarum, 33, 1435–1444, 2011.

[10] R. Ksouri, W. Megdiche Ksouri, I. Jallali, A. Debez, C. Magné, ***Medicinal halophytes potent source of health promoting biomolecules with medical, nutraceutical and food applications.*** Critical Reviews in Biotechnology, 32(4), 289–326, 2012.

[11] I. Jallali, Y. Zaouali, I. Missaoui, A. Smeoui, C. Abdelly, R. Ksouri, ***Variability of antioxidant and antibacterial effects of essential oils and acetonic extracts of two edible halophytes: Crithmum maritimum L. and Inula crithmoïdes L.,*** Food Chemistry 145, 1031–1038, 2014.

[12] X. Dao-Zong, Y. Xin-Fen, Z. Zhuo-Ying & Z. Zhuang-Dan, ***Antioxidant and antibacterial activity of six edible wild plants (Sonchus spp.) in China,*** Formerly Natural Product Letters, 25:20, 1893-1901, 2011.

[13] D. Deliorman Orhan, B. Özçelik, S. Hoşbaş, M. Vural, ***Assessment of antioxidant, antibacterial, antimycobacterial, and antifungal activities of some plants used as folk remedies in Turkey against dermatophytes and yeast-like fungi*** Turk J Biol. 36, 672-686, 2012.

[14] G. Nuño, I. C. Zampini, R. M. Ordoñez, M. R. Alberto, M. E. Arias and M. I. Isla, ***Antioxidant/Antibacterial Activities of a TopicalPhytopharmaceutical Formulation Containing a Standardized Extract of Baccharis incarum, an Extremophile Plant Species from Argentine Puna,*** Phytother. Res., 26: 1759–1767, 2012.

[15] M. Gordon, J. Pokorný, N. Yanishlieva, Antioxidants in food: practical application,10, 311-330, 2001.

[16] H.P. Wichi, ***Enhanced tumor development by butylated hydroxyanisole (BHA) from the prospective of effect on forestomach and oesophageal squamous epithelium,*** J. Agr Food Chem., 26, 717-723, 1988.

[17] İ. Gülçin, E. Kireçci, E. Akkemik, F. Topal, O. Hisar, ***Antioxidant, antibacterial, and anticandidal activities of an aquatic plant: duckweed (Lemna minor L. Lemnaceae)***, Turk J Biol. 34, 175-188, 2010.

[18] http://tr.wikipedia.org/wiki/G%C3%BClgiller

[19] S. Özbek, ***Özel Meyvecilik (Kışın Yaprağını Döken Meyve Türleri),*** Ankara Üniversitesi Basımevi, Ankara, 1978.

[20] R. L. Bell, H. A. Quamme, R. E. C. Layne and R. M. Skırvın, In: J. Janick and J.N. Moore (eds.). ***Fruit Breeding Vol. I Tree and tropical fruits,*** John Wiley & Sons, Pears. p. 441-514, New York, 1996.

[21] N. Ö. Kiper, ***Ankara-Eskişehir-Çankırı Vilayetlerinde Meyvecilik ve Bilhassa Armut Çeşitlerinin Morfolojik ve Biyolojik Tetkikatına ait Rapor,*** Yüksek Ziraat Enstitüsü Neşriyatı, 101, 1937.

[22] A. S. Özbek, ***Türkiye Armut Yetiştiriciliği ve Önemli Armut Çeşitlerimiz,*** Yüksek Ziraat Enstitüsü Basımevi, Ankara, 1947.

[23] P. B. Lombard, M. N. Westwood, ***Pear Rootstocks, In: Rootstocks for Fruit Crops,*** Ed: Rom, R.C. and Carlson, R.F., New York, John Wiley and Sons, 145-183, 1987.

[24] K. Hummer, J. Postman, ***Pyrus L. Pear. USDA Forest Service Research*** Notes:89, 2003.

[25] http://www.lokmanhekiminiz.com/forum/thread-7388.html

[26] http://tr.wikipedia.org/wiki/Ahlat_(bitki))

[27] A. Diplock, ***Healty lifestyles nutrition and physical activity: Antioxidant nutrients.*** ILSI Europe concise monograph series, 59, Belgium, 1998.

[28] C. Kaur, and H. C. Kapoor, ***Antioxidants in fruits and vegetables-the millennium's health.*** Int. J. Food Sci. Tech. 36, 703-725, 2011.

[29] http://www.chats.gen.tr/serbest-radikal-nedir.html

[30] J. G. Elliot, ***Application of antioxidant vitamins in foods and beverages***, Food Tech. 53, 46-48, 1999.

[31] B. Halliwell, ***Antioxidant characterization, Methodology and mechanism,*** Biochem Pharmacol, 49, 1341-1348, 1995.

[32] E.Akyüz, ***Polygonum bistorta ssp. Carneum Bitki Ekstraktlarının Kromotografik Yöntemlerle Kimyasal Bileşiminin Belirlenmesi ve Antioksidan ve Antimikrobiyal Aktiviteleri,*** Karadeniz Teknik Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi, Trabzon, 2007.

[33] M. Oktay, İ. Gülçin , Ö. İ. Küfrevioğlu, ***Determination of in vitro antioxidant activity of fennel (Foeniculum vulgare) seed extracts,*** Lebensm Wiss Technol 36, 263-271, 2003.

[34] İ. Gülçin, Ş. Beydemir, H. A. Alici et al. ***In vitro Antioxidant properties of morphine,*** Pharmacol Res. 49, 59-66, 2004.

[35] M. E. Büyükokuroğlu, İ. Gülçin, M. Oktay. ***In vitro antioxidant properties of dantrolene sodium,*** Pharmacol Res 44, 491-495, 2001.

[36] İ. Gülçin, V. Mshvildadze, A. Gepdiremen. ***Antioxidant activity of a triterpenoid glycoside isolated from the berries of Hedera colchica: 3-O-(β-D-glucopyranosyl)-hederagenin,*** Phytother Res 20, 130-134, 2006.

[37] S. Bourgou, A. Pıchette, B. Marzouk and J. Legault, ***Antioxıdant, Antı-Iflammatory, Antıcancer and Antıbacterıal Actıvıtıes of Extract from Nıgella Satıva (Black cumın) Plant Parts,*** Journal of Food Biochemistry, 36, 539-546, 2012.

[38] http://www.oksantest.oksante.com.tr/

[39] P.F. Fox, P.L.H. McSweeney***, Heat induced changes in milk. Dairy Chemistry and Biochemistry,*** London, 1998.

[40] N. Gourine, M.I. Bombarda, B. Nadjemi, P. Stocker & E.M. Gaydou, ***Antioxidant activities and chemical composition of essential oil of Pistacia atlantica from Algeria.*** Industrial Crops and Products, 31, 203–208, 2010.

[41] M. Kelen, B. Tepe, ***Chemical composition ,antioxidant and antimicrobia properties of the essential oils of three Salvia species from Turkish flora,*** Bioreource Techology, 99, 4096-4104, 2008.

[42] I. Oliveira, A. Sousa, C.F.R. Isabel, Ferreira, A. Bento, L. Estevinho and A.J. Pereira, ***Total phenols, antioxidant potential and antimicrobial activity of walnut (Juglans regia L.) green husks ,*** Food and Chemical Toxicology , 46, 2326-2331, 2008.

[43] A.M. Papas, ***Antioxidant status, diet, nutrition and health,*** CRC Press, Amerika, 1999.

[44] W.W. Nawar, Lipids. ***In Food Chemistry,*** O.R. Fennema (Ed), 225-319, New York, 1996.

[45] N.A.Porter, Mechanism of fatty acid and phospholipid autoxidation. ***In Chemical Changes in Food During Processing,*** T. Richardson and J.W. Finley (Eds), 73-105. Van Nostrand Rainhold Company, New York, 1985.

[46] C.S. Foote, ***Chemistry of reactive oxygen species. In Chemical Changes in Food During Processing,*** T. Richardson and J.W. Finley (Eds), 17-32. Van Nostrand Rainhold Company, New York, 1985.

[47] B. Halliwell, J.M.C. Gutteridge, ***Role of free radicals and catalytic metal ions in human disease.*** Methods Enzymol. 186, 1-85, 1990.

[48] D.D. Miller, ***Minerals In Food Chemistry***, O.R. Fennema (Ed), Marcel Dekker, New York, 1996.

[49] V. Lavelli, C. Peri and A. Rizzola, ***Antioxidant activity of tomato products as studied by model reactions using Xanthine oxidase, Myeloperoxidase,*** American Chemical Society, Milano, 2000.

[50] G.G. Duthie, K.W.J. Wahle and W.P.T. James, ***Oxidants, antioxidants and cardiovascular disease,*** Nutr. Res. Rev. 2, 51-62, 1989.

[51] H. Chen and A.L. Tappel, ***Protection of multiple antioxidants against heme protein oxidation and lipid peroxidation induced by $CBrCl_3$ in liver, lung, kidney, heart, and spleen,*** J. Agric. Food Chem. 44, 854-858, 1996.

[52] R.A. Larson, ***The antioxidants of higher plants.*** Phytochemistry, 27, 969-978, 1988.

[53] P. Di Mascio, M.E. Murphy, H. Sies, ***Antioxidan defense system: the role of carotenoids, tocopherols, and thiol,*** Am. J. Clin. Nutr., 53, 194-200, 1991.

[54] P.D. Reaven, A. Khouw, W.F. Beltz, S. Parthasarathy and J.L. Witztum, ***Effect of dietary antioxidant combinations in humans. Protection of LDL by vitamin E but not by ß-carotene.*** Arterioscler Thromb., 13, 590-600, 1993.

[55] L.K. MacDonald-Wicks, LG. Wood, ML. Garg, ***Methodology for the determination of biological antioxidant capacıty in vitro,*** J Sci Food Agr; 86, 2046-2056, 2006.

[56] DJ. Huang, BX. Ou, RL. Prior, ***The chemistry behind antioxidant capacity assay,*** J Agr Food Chem., 53, 1841-1856, 2005.

[57] RL. Prior, X. Wu, K. Schaich, ***Standardized methods for the determination of antioxidant capacity and phenolics in foods and dietary supplements,*** J Agr Food Chem; 53, 4290-4302, 2005.

[58] B. Ou, M. Hampsch-Woodill, RL. Prior, ***Development and validation of an improved oxygen radical absorbance capacity assay using fluorescein as the fluorescent probe,*** Jagr. Food Chem., 49, 4619-4626, 2001.

[59] H. Schlegel, ***Produktion Sekundarer Metabolite, Allgemeine Mikrobiologie,*** Georg-Thieme Verlag, Almanya, 1992.

[60] A.L. Demain, ***Pharmaceutically active secondary metabolites of microorganisms, Appl. Microbiol,*** Biotechnol., 52, 455-463, 1999.

[61] J.R.Borchardt, D.L. Wyse, C.C. Sheaffer, K.L. Kauppi, R.G. Fulcher, N.J. Ehlike, D.D. Beisboer, R.F. Bey, ***Antimicrobial activity of native and naturalized plants of Minnesota and Wisconsin***, Journal of Med. Plants Res., 2, 98-110, 2008.

[62] B. Tepe, D. Daferera, A. Sokmen, M. Sokmen, M. Polissiou, ***Antimicrobial and antioxidant activities of the essential oil and various extracts of Salvia tomentosa Miller (Lamiaceae),*** Food Chemistry, 90, 333–340, 2005.

[63] PS. Mead, L. Slutsker,V. Dietz, LF. McCaig, JS. Breese, C. Shapro, PM. Griffin, RV. Tauxe, ***Food related illness and death in the Unıted State,*** Emerg. Infect. 5, 607-625, 1999.

[64] NS. Alzoker, K. Nakahara, ***Antibacterial activity of extracts from some edible plants commonly consumed in Asia***, Int. J. Food microbiol., 80, 223-230, 2003.

[65] M. Mariano, C. Bersani, G. Comi, ***Antimicrobial activity of the essential oils of Thymus vulgaris L. Measured using a bioimpedometric method,*** J.Food Prot., 62, 1017-1023, 1999.

[66] H. Baydar, ***Tıbbi, Aromatik ve Kef Bitkileri Bilimi ve Teknolojisi,*** Süleyman Demirel Üniversitesi Yayınları No: 51, Isparta, 2005.

[67] T. Ersöz, ***Bitkisel ilaçlar ve gıda takviyeleri ile ilgili genel yaklaşım ve sorunlar,*** Türk Eczacılar Birliği Yayını/ Meslek İçi Sürekli Eğitim Dergisi, 27-28, 11-22, 2012.

[68] ZA. Maksimovic, M. Dordevic, ***Antimicrobial activitiy of Chenopodium botrys essentiaoil,*** Fitoterapia, 76, 112-114, 2005.

[69] RP. Samy, P. Gopalakrishnakone, ***Therapeutic potential of plants as anti-microbials for drug discovery,*** Evid Based Complement Alternat Medicine 7, 283-294, 2010.

[70] A. Kan, B. Özçelik, M. Kartal, ***In vitro antiviral activities under cytotoxic doses against herpes simples type-1 and parainfluensa-3 viruses of Cicer arietinum L.***, Afr J Pharm Pharmaco, 3, 627-631, 2009.

[71] H. Baydar, ***Tıbbi ve Aromatik Bitkiler Bilimi ve Teknolojisi,*** Süleyman Demirel Üniversitesi Ziraat Fakültesi Yayın No: 51,122-123, 2009.

[72] Z. Günay, ***Antibiyotik Duyarlılık Testi Yorumları***, Türk Toraks Dergisi, 3, 75-88, 2002.

[73] E.Akyüz, ***Polygonum bistorta ssp. Carneum Bitki Ekstraktlarının Kromotografik Yöntemlerle Kimyasal Bileşiminin Belirlenmesi ve Antioksidan ve Antimikrobiyal Aktiviteleri,*** Karadeniz Teknik Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi, Trabzon, 2007.

[74] Ö. Hacıoğlu, ***Achillea (Anthemideae) cinsi Filipendulinae ve Santolinoidea seksiyonunlarına ait yedi türün uçucu yağ kompozisyonları ve antimikrobiyal aktivite özellikleri,*** Balıkesir Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi, Balıkesir, 2005.

[75] J. Parekh, S. Chanda, ***In vitro antimicrobial activity and phytochemical analysis of some Indian medicinal plants,*** Turkish Journal of Biology, 31, 53-58, 2007.

[76] http://www.extento.hawaii.edu/kbase/crop/type/e_cloac.htm.

[77] http://www.anaesthetist.com/icu/infect/bacteria/gramneg/Findex.htm#enterobacter.

[78] http://www.diatek.com.tr/Makale-Yontem/Mikrobiyolojik-Analizler/Gidalarda

[79] http://www.mikrobiyoloji.org/TR/Genel Bilgi

[80] S. Özgen, ***Klinik örneklerden izole edilen Klebsiella pneumoniae türlerinde genişlemiş spektrumlu beta laktamaz varlığının moleküler tekniklerle araştırılması,*** Gazi Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi, Ankara, 2007.

[81] B. Vastag, ***Superbug' stalked NIH hospital last year, killing six,*** The Washington Post. Ağustos, 22, 2012.

[82] A. Çakar, ***Hacettepe Üniversitesi Hastanesi'nde ayrıştırılan Pseudomonas aureginosa izolatlarında metallo-beta-laktamaz enziminin fenotipik ve genotipik yöntemlerle ayrıştırılması,*** Hacettepe Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Doktora Tezi, Ankara, 2005.

[83] J. Slonczewski, ve J. Foster, ***Mikrobiyoloji Bir Gelişen Bilim*** WW Norton & Company; Second Edition, 91, 488, 2009.

[84] JAMA ve Arşiv Dergiler, ***Lenslerde Bulunan Organizmalar Kornea Göz Enfeksiyonlarında ipuçları sağlayabilir,*** Science Daily, 2007.

[85] C. Tansel, A. Kapucu, F. Öztay, S. Üstünova, H. Balci, M. Caner, B. Engin, ***Effects of coenzyme Q10 on the heart ultrastructure and nitric oxide synthase during hyperthroidism.*** Chinese journal of physiology, 50, 217-224, 2007.

[86] L.H. Bailey, ***The Standard Cyclopedia of Horticulture, TheMacmillan Company,*** New York, 1950.

[87] V.L. Singleton, J.A. Rossi, ***Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents.*** American Journal of Enology and Viticulture, 16, 144-158, 1965.

[88] M.S. Bloıs, ***Antioxidant determinations by the use of stable free radical.*** Nature, 1199-1200, 1958.

[89] M. Oyaızu, ***Studies on product of browning reaction prepared from glucose amine.*** Japan Journal of Nutrition, 44, 307-315, 1986.

[90] Y. Pan, X. Zhang, H. Wang, Y. Liang, J. Zhu, H. Lı., Z. Zhang., Q. Wu, ***Antioxidant potential of ethanolic extract of Polygonum cuspidatum andapplication in peanut oil,*** Food Chemistry, 105, 1518-1524, 2007.

[91] L.E. Ünal, ***Türkiye Florasında Doğal Olarak Yetişen Bazı bitki Türlerinin Antimikrobiyal ve Antioksidan Aktivitelerinin İncelenmesi*** Atatürk Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi, Erzurum, 2006.

[92] K. Tawaha, Q. Alalı, M. Gharaıbeh, M. Mohammad, T. El-elımat, ***Antioxidant activity and total phenolic of selected Jordanian plant species,*** Food Chemistry, 104, 1372-1378, 2007.

[93] L.E. Graham, J.M. Graham, L.W. Wilcox, ***Bitki Biyolojisi,*** Palme Yayıncılık, Ankara, 22-29, 2008.

[94] D. Heimler, P. Vignolini, M.G. Dini, F.F. Vincieri, A. Pomani, ***Antiradical activity and polyphenol composition of local Brassicaiceae adible varieties,*** Food Chemistry, 99, 464-469, 2006.

ÖZGEÇMİŞ

4 Ocak 1989 tarihinde İstanbul Cihangir' de doğdum. İlk ve Orta öğrenimimi Ataköy Muhittin Üstündağ İlköğretim Okulu'nda 2003 yılında tamamladım. 2003-2006 yılları arasında lise öğrenimimi Ataköy Cumhuriyet Lisesi'nde tamamladım. 2007 yılında Trakya Üniversitesi, Fen Fakültesi, Biyoloji Bölümü'nde okumaya hak kazandım.

2011 yılında lisans eğitimimi tamamladım ve 2011'den bu yana Trakya Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyoloji Anabilim Dalı yüksek lisans öğrencisiyim.