Hibiscus sabdariffa L. BİTKİSİNİN ANTİMİKROBİYAL VE ANTİOKSİDAN AKTİVİTESİNİN ARAŞTIRILMASI

Cansel ŞEN

YÜKSEK LİSANS TEZİ
BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

Danışman
Doç. Dr. Figen İNCEOĞLU (ERTAN)

EDİRNE-2011

TRAKYA ÜNİVERSİTESİ

FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

Hibiscus sabdariffa L. BİTKİSİNİN ANTİMİKROBİYAL VE ANTİOKSİDAN AKTİVİTESİNİN ARAŞTIRILMASI

Cansel ŞEN

YÜKSEK LİSANS TEZİ

BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

Bu tez 14/10/2011 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından kabul edilmiştir.

Prof. Dr. Tülin AKTAÇ

Doç. Dr. Hülya YAĞAR

Doç. Dr. Figen İNCEOĞLU (ERTAN)

(Danışman)

ÖZET

Bu çalışmanın amacı, Malvaceae familyasına ait *Hibiscus sabdariffa* L. bitkisinin antimikrobiyal ve antioksidan aktivitesinin çeşitli metotlarla incelenmesidir. Bu amaçla kurutulup öğütülen bitkilerin su, etanol ve aseton çözücüleri kullanılarak ekstraksiyonları yapıldı. En yüksek ekstraksiyon verimi su ekstraktında gözlendi. Bütün ekstraktların toplam fenolik madde içeriği Folin-Ciocalteu ayıracı ile belirlendi. Onların toplam antioksidan aktiviteleri DPPH serbest radikali giderme metodu, indirgeme kapasitesi metodu ve ferrik tiyosiyanat (FTC) metodu kullanılarak tayin edildi. Elde edilen sonuçlar α-tokoferol, BHT ve BHA standart maddeleriyle kıyaslanarak değerlendirildi.

Ekstraktların antimikrobiyal aktiviteleri disk difüzyon yöntemi kullanılarak belirlendi. Bitki ekstraktlarının antimikrobiyal aktivitesinin belirlenmesi için 5 bakteri (*Staphylococcus aureus* ATCC 29213, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Pseudomonas aureginosa* ATCC 27853, *Klebsiella pneumoniae* ATCC 700603, *Enterococcus faccialis* klinik izolat) ve 2 maya (*Candida albicans* ATCC 60193, *Candida crusei* 6258) türü kullanıldı.

Toplam fenolik madde tayini sonucunda, ekstraktların toplam fenolik madde miktarlarının gallik asit eşdeğeri olarak 53.84±0,008 – 45.38±0.002 mg/g aralığında değiştiği belirlendi. Etanol ekstraktı en yüksek fenolik madde miktarına sahipti.

Serbest radikal giderme aktivitesinden elde edilen verilere göre su ve etanol ekstraktlarının 500 ve 1000 µg/mL'lik konsantrasyonları standart maddelerle karşılaştırılabilir düzeyde DPPH giderme aktivitesi gösterdi. Aseton ekstraktının DPPH giderme aktivitesi bakımından zayıf olduğu gözlendi.

Bitki ekstraktlarının toplam antioksidan aktivitesi linoleik asit emülsiyonunda değerlendirildi. Elde edilen sonuçlara göre su, etanol ve aseton ekstraktlarının 50 ve 100 µg/mL konsantrasyonları haricindeki tüm ekstraktların etkili ve özellikle 500 ve 1000 µg/mL konsantrasyonlarda yüksek oranlarda antioksidan aktivite gösterdiği belirlendi.

İndirgeme kapasitesi tayini sonuçlarına göre bütün bitki ekstraktlarının standartlarla kıyaslandığında yüksek aktiviteye sahip olmadığı gözlendi.

H.sabdariffa'dan hazırlanan ekstraktlar arasında aseton ekstraktının en yüksek antimikrobiyal aktiviteyi gösterdiği ve en duyarlı olduğu bakterinin *S. aureus* olduğu tespit edildi.

Anahtar kelimeler: *Hibiscus sabdariffa* L. (Kerkedah), Malvaceae ailesi, antimikrobiyal aktivite, antioksidan aktivite

ABSTRACT

The aim of this study was to investigate antimicrobial and antioxidant activities of *Hibiscus sabdariffa* belonging to Malvecea Family. For this purpose, the extractions of dried and milled plants were carried out by using water, ethanol and acetone as solvent. It was observed the highest extraction yield in the water extract. The total phenolic compound contents of all extracts were determined by Folin- Ciocalteu reagent. Their total antioxidant activities were assayed by using DPPH free radical scavenging method, recoding power method and ferric thiocyanate method. The obtained results were evaluated by comparing to α- tocopherol, BHT and BHA as standard.

Antimicrobial activities of extracts were determined by disc diffusion method. For that purpose 5 species of bacteria (*Staphylococcus aureus* ATCC 29213, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Pseudomonas aureginosa* ATCC 27853, *Klebsiella pneumoniae* ATCC 700603, *Enterococcus faccialis* clinical isolate) and 2 species of yeast(*Candida albicans* ATCC 60193, *Candida crusei* 6258) were used.

At the end of total phenolic compound assay the phenolic contents were determined to be in the range 53.84±0.008 – 45.38±0.002 mg/g as gallic acid equivalent. Ethanol extract had the highest phenolic content.

According to the free radical scavenging activity, water and ethanol extract showed DPPH scavenging activity which is comparable with standard compound at the 500 and 1000 mg/ mL concentration. Acetone extract showed weakly DPPH activity.

Total antioxidant activities of the plant extracts were assayed by using linoleic acid emulsion. According to obtained data all extracts showed effective antioxidant activity except for 50 and 100 mg/ml concentrations. Especially their antioxidant activities were very high at 500 and 1000 mg/ml concentrations. All extracts hadn't high reducing capacity as compared to standards.

Among the prepared extracts from *H. sabdariffa* acetone extract showed the highest antibacterial activity and S.aureus were determined to be most sensitive bacterium.

Key words: *Hibiscus sabdariffa* L ., Malvaceae, antibicrobial activity, antioxidant activity

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans öğrencisi olarak beni kabul eden ve yüksek lisans eğitimim boyunca desteğini, bilgisini ve tecrübelerini benden esirgemeyen, değerli hocam Doç. Dr. Figen İNCEOĞLU (ERTAN)' na teşekkürlerimi sunarım.

Beni laboratuvarına kabul eden, tez çalışmamda laboratuvarın bütün imkanlarını kullanmamı sağlayan, tez çalışmam boyunca bilgi ve deneyimiyle beni yönlendiren zamanını ve katkısını esirgemeyen Trakya Üniversitesi Fen Fakültesi Kimya Bölümü öğretim elemanları Sayın hocalarım Arş. Gör. Dr. Şebnem SELEN İŞBİLİR ve Doç. Dr. Hülya YAĞAR'a sonsuz teşekkürler.

Tez çalışmamda kullandığım bitkinin teşhis edilmesinde botanik bilgilerinden yararlandığım Trakya Üniversitesi Biyoloji Bölümü öğretim üyesi Sayın hocam Yrd.Doç.Dr. Necmettin GÜLER'e, bitkimin su ekstraktlarının liyofilizasyon işlemini gerçekleştiren Namık Kemal Üniversitesi, Tekirdağ Meslek Yüksekokulu, Gıda teknolojisi Programı öğretim üyesi Yrd. Doç. Dr. Hülya ORAK'a ve mikroorganizmaların temin edilmesinde yardımcı olan Kırklareli Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü öğretim üyesi Sayın Prof. Dr. Aysun Ergene'ye,

Laboratuvar çalışmalarım ve analizler sırasında yardımlarını esirgemeyen 6 yıl boyunca her zaman yanımda olan yüksek lisans öğrencisi çok sevgili ev arkadaşım Ezgi BEKTAŞ 'a ve grafiklerin çiziminde yardımıma koşan arkadaşım Emre ORUÇOĞLU' na teşekkür ederim.

Beni bugünlere getiren, emek veren, maddi ve manevi desteklerini benden esirgemeyen aileme en içten sevgi, saygı ve teşekkürlerimi sunarım.

Cansel Şen

ÖZGEÇMİŞ

23 Ocak 1987 tarihinde İstanbul'da doğdum. İlköğrenimimi Dede Korkut İlköğretim Okulu'nda 1998 yılında tamamladım. Orta öğrenimi Topçular İlköğretim Okulu'nda 2001 yılında tamamladıktan sonra lise öğrenimimi 2001-2005 yılları arasında Rıfat Canayakın Lisesi'nde tamamladım. 2005 yılında Trakya Üniversitesi, Fen Fakültesi, Biyoloji Bölümü'nde okumaya hak kazandım.

2009 yılında lisans eğitimimi tamamladım. 2009'dan bu yana Trakya Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyoloji Anabilim Dalı yüksek lisans öğrencisiyim.

İÇİNDEKİLER

ÖZET ..... **i**
ABSTRACT ..... **iii**
TEŞEKKÜR ..... **iv**
ÖZGEÇMİŞ ..... **v**
İÇİNDEKİLER ..... **vi**
ŞEKİLLER DİZİNİ ..... **viii**
TABLOLAR DİZİNİ ..... **ix**
KISALTMALAR ..... **x**
1. GİRİŞ **1**
2. GENEL BİLGİLER **4**
2.1. Malvacea (Ebegümeciler) familyası 4
2.2. *Hibiscus* cinsiyle ilgili genel bilgiler 4
2.2.1. *Hibiscus sabdariffa* L. 5
2.3. Antioksidanlar 7
2.3.1. Serbest radikallerin etkileri 9
2.3.1.1. Serbest radikallerin lipidlere etkileri 9
2.3.1.2. Serbest radikallerin proteinlere etkileri 10
2.3.1.3. Serbest radikallerin karbonhidratlara etkileri 10
2.3.2. Antioksidan aktivite tayin yöntemleri 13
2.3.2.1. HAT-temelli metodlar 14
2.3.2.2. ET-temelli metodlar 15
2.4. Antimikrobiyal maddeler ve özellikleri 16
2.4.1. Antimikrobiyal Aktivite Tayin Yöntemleri 18
2.4.1.1. Dilüsyon Yöntemi: 18
2.4.1.2 Difüzyon Yöntemi: 19
3. MATERYAL VE METOD **20**
3.1. Materyal 20
3.1.1. Bitki örneği 20

3.1.2. Test Bakterileri 20
3.1.2.1. *Escherichia coli* 21
3.1.2.2. *Klebsiella pneumoniae* 22
3.1.2.3. *Staphylococcus aureus* 22
3.1.2.4. *Pseudomonas aureginosa* 23
3.1.2.5. *Enterococcus faecalis* 23
3.1.2.6. *Candida sp.* 24
3.1.3. Kimyasal Maddeler 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. Ekstraktların Hazırlanışı 28
3.2.2. Antioksidan Aktivitenin Belirlenmesi 29
3.2.2.1. Toplam Fenolik Madde Tayini 29
3.2.2.2. DPPH Radikali Giderme Aktivitesi Tayini 30
3.2.2.3. Linoleik Asit Sisteminde Ferrik Tiyosiyanat (FTC) Metodu ile Antioksidan Aktivite Tayini 31
3.2.2.4. İndirgeme Kapasitesi Tayini 32
3.2.3. Antibakteriyal Aktivite Tayin Yöntemi 33
3.2.3.1. Bakteri Kültürlerinin Hazırlanması 33
3.2.3.2. Disk Difüzyon Yöntemi 33
3.2.3.3. Minimum İnhibitör Konsatrasyonunun (MİK) Tayini 34
4. BULGULAR 35
4.1. Toplam Fenolik Madde Miktar Tayini 35
4.3. Linoleik Asit Sisteminde Ferrik Tiyosiyanat (FTC) Metodu ile Total Antioksidan Aktivite Tayini 39
4.4. İndirgeme Kapasitesi Tayini 44
4.5. Antimikrobiyal Aktivite 46
4.5.1. Disk difüzyon yöntemi 46
4.5.2. MİK değerleri 50
5. TARTIŞMA 51
6. KAYNAKLAR 57

ŞEKİLLER DİZİNİ

Sayfa No

Şekil 2.1 *Hibiscus sabdariffa* L. bitkisi 7

Şekil 2.2 Serbest radikallerin kaynakları 11

Şekil 2.3 Serbest radikallerin hücresel hedefleri 12

Şekil 4.1 Gallik asit standart grafiği 35

Şekil 4.2 *Hibiscus sabdariffa* L. ekstraktlarının DPPH radikali giderme aktivitesi 37

Şekil 4.3 Linoleik asit peroksidasyonunda *H.sabdariffa* L. su (A), aseton (B) ve etanol ekstraktlarının etkisi 41

Şekil 4.4 Linoleik asit peroksidasyonunda sentetik antioksidan BHA ve BHT'nin etkisi 42

Şekil 4.5 *H. sabdariffa* L. ekstraktlarının total antioksidan aktivitesi 43

Şekil 4.6 *H. sabdariffa* L. ekstratlarının Fe^{+3} ü Fe^{+2} ye indirgeme kapasitesi 45

Şekil 4.7 HA, HE, HS'nin *E.coli* üzerinde oluşturduğu inhibisyon zonu içeren diskler 47

Şekil 4.8 HA, HE, HS'nin *S.aureus* üzerinde oluşturduğu inhibisyon zonu içeren diskler 48

Şekil 4.9 HA, HE, HS'nin *P.aureginosa* üzerinde oluşturduğu inhibisyon zonu içeren diskler 49

Şekil 4.10 HA, HE, HS'nin *C.albicans* üzerinde oluşturduğu inhibisyon zonu içeren diskler 50

TABLOLAR DİZİNİ

Sayfa No

Tablo 3.1 Kullanılan bakteriler ve kodları 21

Tablo 3.2 Kurutulmuş bitkilerden ekstrakte edilen bileşiklerin verimleri 29

Tablo 4.1 *H.sabdariffa* L. ekstraktının gallik asit eşdeğeri olan fenolik madde miktarları 36

Tablo 4.2 *H.sabdariffa* bitkisinin su, etanol, aseton ekstraktlarının EC50 değerleri 38

Tablo 4.3 Ekstraktların ve standartların lipid peroksidasyonunu inhibe etme oranları 43

Tablo 4.4 *H.sabdariffa* L.'dan hazırlanan ekstraktların test mikroorganizmaları üzerindeki antimikrobiyal aktiviteleri 46

Tablo 4.5 *H.sabdariffa* L. HS ekstraktının MIC ve MBC değerleri 50

KISALTMALAR

BHA	Bütillendirilmiş hidroksianisol
BHT	Bütillendirilmiş hidroksitoluen
HA	*Hibiscus* aseton ekstraktı
HE	*Hibiscus* etanol ekstraktı
HS	*Hibiscus* su ekstraktı
DPPH	1,1-Difenil-2-pikrilhidrazil
FCR	Folin-Ciocalteu reaktifi
FTC	Ferrik tiyosiyanat
LDL	Düşük yoğunluklu lipoprotein
MDA	Malondialdehit
NADH	Nikotinamidadenindinükleotid
NBT	Nitroblue tetrazolyum
ORAC	Oksijen radikalini absorblama kapasitesi
TBHQ	t-Bütil hidroksikinon
DMSO	Dimetilsülfoksit
IC50	%50 İnhibisyon Değeri
ROT	Reaktif Oksijen Türleri
GAE	Gallik asit esdeğeri
Gr(+)	Gram pozitif
Gr(-)	Gram negatif
MIK	Minumum inhibisyon konsantrasyonu
µg	Mikrogram
ml	Mililitre
mg	Miligram
µl	Mikrolitre

1. GİRİŞ

İnsanlardan önce hastalık etmenlerinin yeryüzünde bulunduğu bilinmektedir. Bu düşünce çok eski devirlere ait bazı kemik ve fosil gibi kanıtlarla da desteklenmektedir. İlk insandan itibaren hastalık etmenlerine karşı korunma çareleri aranmaya başlanmıştır. Bu korunma başlangıçta içgüdüler yardımı ile olsa da aradan geçen uzun süre içinde bilinçli bir çabaya dönüşmüş ve insanlar çevrelerinde bulunan hem abiyotik (hava, su v.b.) hem de biyotik (mikroorganizmalar, bitkiler, hayvanlar v.b.gibi) faktörleri kendi tedavilerinde yararlandıkları obje ve aracılar olarak kullanmaya başlamışlardır (Hacıoğlu, 2005). İnsanoğlu tarihi boyunca bitkileri barınak, giyecek, yiyecek, baharat, parfüm ve ilaç olarak kullanmıştır. Bitkiler aynı zamanda sahip oldukları kompleks kimyasal yapılarından dolayı geleneksel tedavinin temelini de oluşturmuşlardır (Mari, 2008).

Tıbbın günümüzdeki kadar gelişmediği çağlarda insanlar yine hasta oluyor ve ehil bildikleri, hekimlik yapan kişilere giderek tedavi oluyorlardı. Eski dünyanın Mısır ve Mezopotamya medeniyetlerinden Hint ve Çin medeniyetlerine, yeni dünyanın İnka ve Aztek medeniyetlerine kadar tarihte kalmış bütün medeniyetlerini inceleyenlerin bilgi birikimine bakılırsa tıp her zaman popüler ve insanlığın hizmetinde olmuş bir bilim dalıdır (Dağcı ve Dığrak, 2005).

Eski Yunan Döneminde tedavi ve bitkisel droglar hakkında çok önemli eserler yazılmış ve bu eserler yüzlerce yıl İslam Ülkeleri ve Avrupa'yı etkilemiştir. Bu dönemde yaşayan ve hekimlerin babası olarak kabul edilen Hippocrate (İ.Ö. 460-377)'in eserlerinde bulunan drogların miktarı 400 kadar olup, bunların çoğunu bitkisel kökenliler oluşturmaktadır (Ünal, 2006).

Tüm dünyada olduğu gibi ülkemizde de çeşitli bitkiler yıllardan beri halk arasında çeşitli amaçlarda kullanılmaktadır (Kırbağ ve Zengin, 2006). Anadolu tıbbi

bitkileri ile ilgili bilgilerimizin kökenleri Hititler dönemine kadar dayanmaktadır. Bu dönemde Anadolu'da bazı tıbbi bitkilerin yetiştiğini ve bazı drogların (Haşhaş başı, Kitre, Mazı ve Safran gibi) dış satımının yapıldığı belirtilmektedir (Dağcı ve Dığrak, 2006). Ülkemizde bitkisel zenginlik; üç fitocoğrafik bölgenin kesiştiği bölgede bulunması, Güney Avrupa ile Güneybatı Asya floraları arasında köprü olması, pek çok cins ve seksiyonun orjin ve farklılaşma merkezlerinin Anadolu oluşu, muhtemelen ekolojik ve fitocoğrafik farklılaşma ile ilgili olarak tür endemizminin yüksek oluşu faktörlere dayanmaktadır (Toroğlu ve Çenet, 2006).

Tıbbi bitkilerin kimyasal yapı zenginliğinden, sitotoksik ve mutajenik potansiyellerinden yeni etkin ilaç molekülleri geliştirilebilmesi amacıyla yararlanılması ilaç araştırmacılarının başlıca çalışma alanını oluşturmaktadır. Bu zengin içerikten tedavi amacıyla yararlanılmasında bir diğer yaklaşım ise fitoterapidir. "Fitoterapi" terim olarak ilk kez Fransız hekim Henri Leclerc (1870–1955) tarafından kullanılmıştır. Leclerc'e göre fitoterapi; hastalıkların, tedavi edici özellikleri olan bitkisel droglarla ya da ekstraksiyon ürünleri kullanılarak elde edilen çay, damla, kapsül, şurup, draje, tablet gibi ürünlerle iyileştirilmesidir (Hacıoğlu, 2005). Geçmişteki fitoterapi uygulamaları ile günümüz arasında en büyük fark artık bitkilerin bütünüyle değil özellikle faydalı olan parçasının tedavi amacıyla kullanılmasıdır. Örneğin eskiden bir bitkinin uçucu yağından faydalanmak için onun çayı yapılıp içilirken şimdi o bitkideki uçucu yağ ekstre edilerek tek başına kullanılmaktadır. Bu da bitkinin diğer faydasız ancak yan etkileri olan bölümlerinden hastayı uzak tutmaktadır. Günümüzde fitoterapinin en çok geliştiği ülke Almanya'dır (URL 6).

Son yıllarda bütün dünyada antibiyotiklerin gelişigüzel kullanımı nedeniyle, insan patojeni bakterilerin ilaçlara karşı direnç kazandığı tespit edilmiştir (Çelik, vd., 2010). Yine ilaçlara dirençli patojen fungus ve bakteriler nedeniyle özellikle immun sistemi zayıflatan AIDS, kanser gibi hastalıkların ve enfeksiyon hastalıklarının tedavisinin zorlaştığı görülmüstür (Ünal, 2006). Bu durum bilim adamlarını değişik kaynaklardan yeni antimikrobiyal bileşiklerin araştırılması için teşvik etmiştir. Bitkiler, yeni antimikrobiyal kemoterapotik maddelerin elde edilebileceği, zengin kaynak olduğundan araştırmalar özellikle tıbbi bitkiler üzerinde yoğunlaşmıştır (Ünal, 2006).

Organizmada normal metabolik yolların işleyişi sırasında veya çevresel ajanlar (pestisidler, aromatik hidrokarbonlar, toksinler, çözücüler vb.), stres, radyasyon gibi çeşitli dış faktörlerin etkisiyle serbest radikaller meydana gelmektedir (Akkuş, 1995). Vücutta sürekli üretilen oksijen merkezli serbest radikaller ve reaktif oksijen türleri hücre ölümleri ve doku tahribatlarına neden olmaktadır. Serbest radikallerden kaynaklanan oksidatif tahribat yaşlanma süreci ve hastalıklarla yakından ilişkilidir (Türkoğlu, vd., 2007).

İnsan vücudunu serbest oksijen radikallerine karşı korumada doğal ve fenolik bileşiklerce zengin meyve ve sebzelerin yararlı olduğu bilinmektedir. Yapılan epidemiyolojik çalışmalarla reaktif oksijen türlerine karşı bitkisel kaynaklardaki fitonutrientlerin yararlı olduğu; meyve ve sebzelerin koruyucu etkilerinin içerdikleri askorbik asit (C vitamini), α-tokoferol (E vitamini), karotenoidler, glutatyon, flavonoidler ve fenolik asitler gibi doğal bileşiklerden dolayı olduğu bildirilmiştir (Halvorsen vd., 2002). Gıdalarda ya da biyolojik sistemlerde serbest radikaller ve reaktif oksijen türevleri oksidasyona neden olduğunda, antioksidanlar bu süreci söz konusu mekanizmaların kombinasyonu ya da tek çalışmasıyla önleyebilir ya da erteleyebilir (Ulusoy vd., 2009). Gıdalardaki antioksidan kapasitesinin hesaplanmasıyla insanların sağlık amacıyla farmosötik ve kozmetik ürünlerde doğal olan ürünlerin kullanımına olan ilgisi artmaktadır (Lopez vd., 2006).

Bu tez kapsamında ülkemizde son yıllarda tanınan ve çoğunlukla içecek olarak kullanılan *Hibiscus sabdariffa* L. bitkisinin çeşitli metodlarla antimikrobiyal ve antioksidan aktivitelerinin belirlenmesi ve bu bitki ekstraktlarının sentetik antioksidanlara alternatif doğal antioksidan kaynağı olup olamayacağının incelenmesi amaçlanmıştır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Malvacea (Ebegümeciler) familyası

Ebegümecigiller (Malvaceae), yaklaşık 1500 türüyle, kutuplar hariç dünyanın her yerinde yayılış gösteren çiçekli bitkiler familyasıdır. Tek ya da çok yıllık otsular, çalılar ya da ağaçlardır. Büyük, parlak, huni şeklinde çiçekleri vardır.

Yapraklar alternat dizilişli, tam veya elsi loplu ve stipullüdür. Çiçekler yaprak koltuklarında tek veya kimoz çiçek durumludur. Çiçekler erdişi, nadiren tek eşeyli ve ışınsal simetrilidir. Genellikle epikaliks bulunur. Sepaller ve petaller 5, serbest veya kaidede birleşiktir. Stamenler çok sayıda ve filamentleri stilusu saran bir tüp şeklinde (kolumna) birleşmiştir. Pistil tek, ovaryum üst durumludur. Meyve pek çok merikarpa ayrılan bir şizokarp şeklinde, bakka, samara veya kapsuladır (URL 7).

Malvacea ailesine ait bitkilerden doğal olarak elde edilen ekstraktlar dünya çapında birçok hastalığın tedavisinde kullanılmaktadır. Bu ailenin bir önemli cinside tropikal ve subtropikal bölgelere dağılmış ve yaklaşık 300 kadar türe sahip olan *Hibiscus'tur* (Tseng ve Lee, 2006).

2.2. *Hibiscus* cinsiyle ilgili genel bilgiler

Hibiscus cinsinin türleri çeşitli uygulamalarda kullanılmaktadır. Örneğin kimyasal zehirlenmelerde ve mantar zehirlenmelerinde antidot olarak, kağıt ve selüloz endüstrisinde lifin kaynağı olarak kullanılmaktadır. *Hibiscus* cinsinin üyeleri çeşitli iklimlerde gelişebilmektedir ve ilginç biyoaktif özellikte ürünler ortaya koymaktadır

(Holser vd., 2004). *Hibiscus* cinsine ait farmakolojik araştırmalar, bazı türlerinin faydalı biyolojik aktivitesini ortaya çıkarmıştır. Basınç düşürücü etki, antidiyaretik, antispermatojenik, antitümör, antidiyabetik, antikonvülzan, antihelmintik, antioksidant ve antimutajenik özellikler bunların arasındadır (Maganha vd., 2010).

2.2.1. *Hibiscus sabdariffa* L.

Sudan, Tayvan'ın doğusu ve Tayland gibi tropikal bölgelerde ekilen, kökeninin Afrika olduğuna inanılan oldukça göz alıcı bir bitkidir (Chang vd., 2006). İngiltere'de Roselle, Fransa'da I'Oiselle, Arap ülkelerinde Kerkedah, Taylant'ta Krachiap doeng, Batı Sudan'da Bissap, Jamaica'da Spanish olarak bilinmektedir. Çiçekleri salkım şeklinde, petaller kırmızımsı beyazdır. Bitkinin olgunlaşmasıyla kaliks büyür ve meyvesi etli, parlak kırmızı bir hal alır (Maganha vd., 2010). Roselle, genellikle içeceklerde, reçel ve jöle yapımında kullanılan tek yıllık bir bitkidir (Tsaia vd., 2002).

Dünyadaki tropikal ve subtropikal bölgelerin çoğunda kaliksi sıcak ve soğuk içecek şeklinde kullanılır. Bu içeceklerin günlük ortalama tüketimi Nijerya'da 150-180 mg/kg'dır. *H.sabdariffa* L.'nın kaliksi Batı Hindistan'da tüketilen 'rum' adlı içeceğe tat ve renk vermesi amacıyla, tohumu da kahvede afrodizyak olarak kullanılmaktadır. Ayrıca meyveleri de yenilebilmektedir (Alil vd., 2005). Genç yaprakları ve yumuşak gövdeleri salata ve acı soslarda ham madde olarak kullanılmaktadır. Malezyalılar 'curries' olarak bilinen baharat karışımında kullanmaktadır. Tohumları bir parça acı olmasına rağmen yüksek protein içeriğinden dolayı Afrikalılar Roselle'yi yemeklerde kullanmaktadır (Mohd-Esa vd., 2010). Roselle'nin petalinde bulunan yüksek miktarda antosiyanin varlığı, hem renklenmenin hem de antioksidan aktivitenin potansiyel kaynağıdır (Tsaia vd., 2002).

Roselle'nin kaliksi ve çiçeğinin alkaloid, askorbik asit, beta karoten, anisaldehit, arachidic asit, sitrik asit, malik asit, tartarik asit, glisinbetain, trigonelline, siyanidin3-rutinozit, delfinidin, delfinidin-3-glukozit (*H. sabdariffa* L.'daki antosiyaninin ana bileşeni hibiscündür), delphinidin-3-monoglukozit, siyanidin-3-monoglukozit, siyanidin-3-sambubiosit, siyanidin-3,5-diglukozit; flavanol glikozit, hibiscetin-3-

monoglukozit, gossipetin-3-glukozit, gossypetin-7-glukozit, gossipetin-8-glukozit and sabdaritrin gibi antosiyaninlerin ve kersetin, protokateşik asit (PCA) (Chang vd., 2006), pektin, polisakkarit, mukopolisakkarit, stearik asit ve mum gibi etkin kimyasal bileşenleri içerdiği bilinmektedir (Hirunpanich vd., 2005).

Tohum yağında komposterol, stigmasterol, ergosterol, ß-sitosterol, alfa spinosterolün varlığı kanıtlanmıştır. Hidroliziyle galaktoz, galaktouronik asit ve ramnozu veren musilaj, petallerin kuru ağırlığının %65'ini oluşturmaktadır. Bu moleküller, bu türün ekstraktının farmakolojik etkisinden sorumludur ve farklı biyolojik maddelerde biyoetkendir. Ayrıca HSE kuru ağırlığının %1.7'sinde polifenolik asit, %1.43'ünde flavanoit ve %2.5'unda antosiyanin içermektedir (Maganha vd., 2010).

Dünyada birçok tedavi edici uygulamada bu bitkinin kullanımı artmaktadır. Örneğin Çin'de yüksek PCA içeriğinden dolayı hipertansiyonun, yüksek ateşin, karaciğer tahribatının ve löseminin tedavisinde bu bitkiden faydalanılmaktadır (Tseng vd., 2000).

1995'te bir grup araştırmacı tarafından yapılan çalışmada Roselle'nin insanlarda kanseri ve yüksek kan basıncını engellediği gözlenmiştir. Böbrek sorunu yaşayan kişilerde, ürikozurik etkisinden dolayı kaliks ekstraktının yararlı olduğu bilinmektedir (Prosongvata vd., 2008).



Şekil 2.1. *Hibiscus sabdariffa* L. bitkisi (URL 5)

2.3. Antioksidanlar

Oksidasyon birçok canlı organizmadaki biyolojik sürecin gerçekleşmesi için gereken enerjinin üretiminde temel bir gereksinimdir (Hallıwell vd., 1984). Vücudumuzdaki ve besinlerdeki lipitler, proteinler, karbonhidratlar, nükleik asitler oksidasyona uğrayabilmekte ve böylece canlı organizma için zararlı olabilecek oksidasyon ürünleri oluşabilmektedir. Bu durum "oksidatif stres" şeklinde ifade edilmektedir (Öztürk, 2007).

Oksidatif stres; oksidanlar ve antioksidanlar arasındaki dengenin değişimi olarak da tanımlanabilmektedir. En önemli oksidanlar direk ya da indirek olarak O_2 den elde edilir (Bancirova, 2010). Serbest radikaller ve oksidatif stresin oluşumundan sorumlu olan reaktif oksijen (ROS) ve reaktif azot türleri (RNS) normal hücre metabolizması yan ürünleridir ve düşük konsantrasyonlarda patojenlere karşı savunmada hücresel sinyal iletiminde çeşitli fizyolojik rollere sahiptir (Öztürk, 2007). Bir atom veya molekül dış orbitallerinde bir veya daha fazla ortaklanmamış (eşleşmemiş) elektron bulunduruyorsa "serbest radikal (SR)"olarak tanımlanır. Bu tip moleküller, ortaklanmamış elektronlarından dolayı oldukça reaktiftirler (Akkuş, 1995). Reaktif oksijen ve azot türleri radikalik ve radikalik olmayan türleri içermektedir. Radikalik oksijen türlerine, süperoksit anyon ($O^{\cdot -2}$), hidroksil ($OH^{\cdot}$), peroksit ($HOO^{\cdot}$) ve alkoksi ($RO^{\cdot}$) radikalleri; azot türlerine, azot monoksit ($NO^{\cdot}$) radikalleri örnek verilebilir. Radikalik olmayan oksijen türlerine ise, hidrojen peroksit (H_2O_2), ozon (O_3) ve singlet oksijen ($1O_2$); azot türlerine ise, nitröz asit (HNO_2), nitrozil katyonu (NO^+) ve nitroksi anyonu (NO^-) örnek olarak verilebilir. Ayrıca bu radikallerin yanı sıra tiyol radikalleri ($RS^{\cdot}$) ve karbon merkezli radikaller de mevcuttur (Boğa, 2007).

Bu radikallerin kaynaklarını endojen (iç faktörler) ve eksojen (dış,çevre faktörleri) kaynaklar olarak iki gurupta toplayabiliriz

1. Endojen kaynaklar:

- Mitokondrial elektron transport zinciri
- Otooksidasyon reaksiyonları
- Enzim reaksiyonları
- Fagositik hücreler (monosit ve makrofajlar, nötrofil, eozinofil) ve endotelyal hücreler gibi hücrelerdeki oksidatif reaksiyonlar

2. Eksojen Kaynaklar:

- Diyet faktörleri
- İlaçlar
- Sigara dumanı
- İyonize radyasyon ve UV ışık
- Kimyasal karsinojenler (Temur, 2006)

2.3.1. Serbest radikallerin etkileri

2.3.1.1. Serbest radikallerin lipidlere etkileri

Serbest radikaller tüm biyomoleküllerde tahribat yaratır, fakat serbest radikallerden en çok etkilenen biyomoleküller lipidlerdir. Hücre membranlarındaki ve gıdalardaki kolesterol ve yağ asitleri serbest radikallerle kolayca reaksiyona girerek peroksidasyon ürünleri oluştururlar. Çoklu doymamış yağ asitlerinin serbest radikaller etkisi ile oksidatif yıkımı **nonenzimatik lipid peroksidasyonu** olarak bilinir ve zincir reaksiyonu şeklinde ilerler. Bu reaksiyonunun gerçekleştirdiği hasarın geri dönüşümü yoktur.

Bir hidrojenini kaybeden yağ asidi, lipid radikali ($L^{\bullet}$) niteliği kazanır. Lipid radikali kararsızdır ve bir dizi değişikliğe uğrar. Molekül kendi içinde bir düzenleme gerçekleştirir ve konjuge dienler oluşur. Konjuge dienlerde oksijenle reaksiyona girerek lipit peroksit radikalini oluştururlar. Bu radikaller membran yapısındaki çoklu doymamış yağ asitleriyle etkileşime girerek, yeni lipit radikallerinin oluşumuna yol açar, bu sırada kendisi de açığa çıkan hidrojen atomlarını alarak lipit peroksitlerine dönüşür. Reaksiyon bu şekilde kendini katalizleyerek devam eder (Halliwell ve Gutteridge, 1990).

Lipid peroksidasyonu lipid peroksidlerinin aldehit ve diğer karbonil bileşiklerine yıkılması ile sona erer (sonlanma basamağı). Yıkıldıklarında, çoğu biyolojik olarak aktif olan aldehitler oluşur. Bu bileşikler ya hücre düzeyinde metabolize edilir veya ilk atak bölgesinden hücreye difüze olup hücrenin diğer bölümlerine hasarı yayarlar (İşbilir, 2008).

Lipid peroksidasyonu çok zararlı reaksiyondur. Direkt olarak membran yapısına, reaktif aldehitler üreterek de diğer hücrelere zarar verebilir. Birçok hastalığa ve doku hasarına neden olur. Hücre membranının geçirgenliği ve mikrovizitesi ciddi bir şekilde etkilenir (Onat vd., 2002).

2.3.1.2. Serbest radikallerin proteinlere etkileri

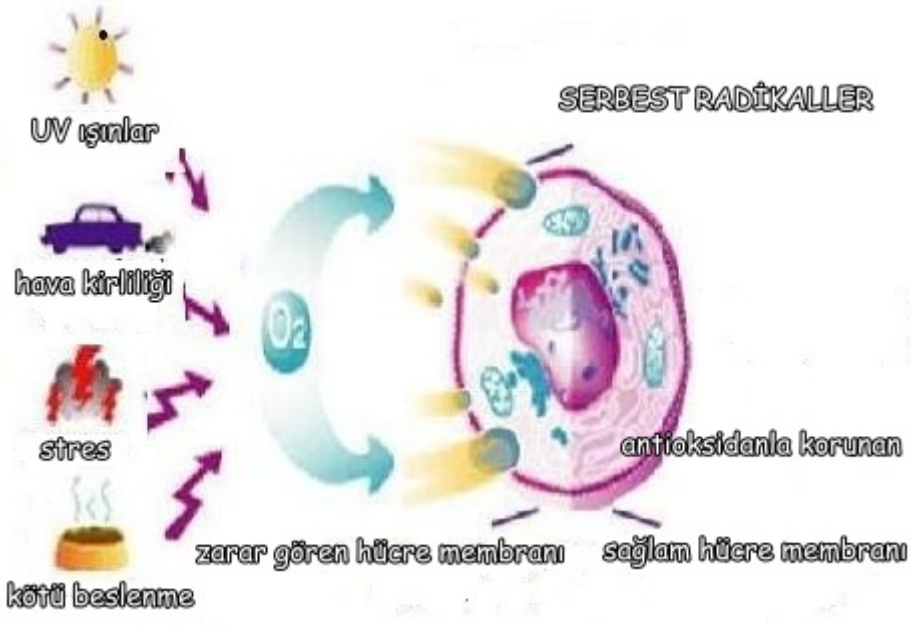
Proteinler serbest radikallere karşı poliansatüre yağ asitlerinden daha az hassastırlar. Proteinlerin serbest radikal harabiyetinden etkilenme derecesi amino asit kompozisyonlarına bağlıdır. Doymamış bağ ve kükürt içeren triptofan, tirozin, fenilalanin, histidin, metiyonin, sistein gibi amino asitlere sahip proteinler serbest radikallerden kolaylıkla etkilenirler. Bu etki sonucunda özellikle sülfür radikalleri ve karbon merkezli organik radikaller oluşur.

Serbest radikallerin etkileri sonunda, yapılarında fazla sayıda disülfit bağı bulunan immünoglobülin G (IgG) ve albümin gibi proteinlerin tersiyer yapıları bozulur, normal fonksiyonlarını yerine getiremezler. Prolin ve lizin reaktif oksijen türleri (ROS) üreten reaksiyonlara maruz kaldıklarında nonenzimatik hidroksilasyona uğrayabilirler.

Hemoglobin gibi hem proteinleri de serbest radikallerden önemli oranda zarar görürler. Özellikle oksihemoglobinin süperoksit radikali ($O_2^{\cdot -}$) veya hidrojen peroksitle (H_2O_2) reaksiyonu methemoglobin oluşumuna neden olur (URL 4).

2.3.1.3. Serbest radikallerin karbonhidratlara etkileri

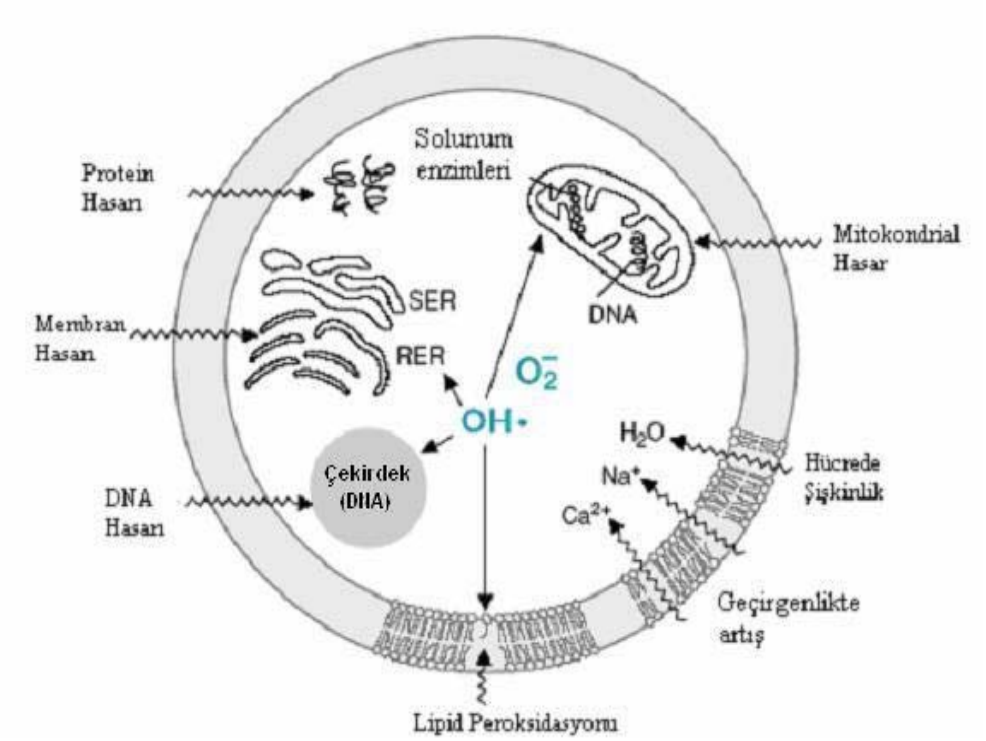
Serbest radikallerin karbonhidratlara etkisiyle çeşitli ürünler meydana gelir ve bunlar, çeşitli patolojik süreçlerde önemli rol oynarlar. Diyabet ve diyabet komplikasyonlarının gelişimi, koroner kalp hastalığı, hipertansiyon, psöriyazis, romatoit artrit, Behçet hastalığı, çeşitli deri ve göz hastalıkları, kanser gibi birçok hastalıkta ve yaşlılıkta serbest radikal üretiminin arttığı, antioksidan savunma mekanizmalarının yetersiz olduğu gösterilmiştir. Ancak bu hallerde serbest radikal artışının sebep mi yoksa sonuç mu olduğu tam olarak bilinmemektedir.



Şekil 2.2. Serbest radikallerin kaynakları (URL 7)

Özetle serbest radikallerin hücre ve dokularda neden olduğu zararlar;

- DNA tahribatı,
- Nükleotid yapılı koenzimlerin yıkımı,
- Protein tahribatı,
- Enzim aktiviteleri ve lipid metabolizmasındaki değişiklikler (Kil vd., 2009) ,
- Hücre ortamının tiyol/disülfit oranının değişmesi,
- Mukopolisakkaritlerin yıkımı,
- Zar proteinlerinin tahribatı ve taşıma sisteminin bozulması, steroid ve yaş pigment denilen bazı maddelerin birikimi,
- Kollajen ve elastin gibi uzun ömürlü bileşiklerde oksidasyon-redüksiyon olaylarının bozulmasıdır (Onat vd, 2002).



Şekil 2.3. Serbest radikallerin hücresel hedefleri (Onat vd, 2002)

Organizmaların çoğu süperoksit dismutaz, katalaz gibi enzimler ya da askorbik asit, tokoferoller, glutatyon gibi bileşenler tarafından serbest radikallerin zararlarına karşı iyi bir şekilde korunmaktadır ve kendilerini oksidatif tahribata karşı koruyacak gelişmiş bir antioksidan dirence ve tamir sistemine sahiptir. Ancak bu sistemler tahribatı tamamı ile önlemede yetersizdir (Turkoğlu vd., 2007). Bununla birlikte antioksidan ilaveler ya da antioksidan içerikli gıdalar oksidatif tahribatı azaltmada insan vücuduna yardımcı olmaktadır (Yang vd., 2002).

Tahıl, meyve ve sebzelerin tüketiminin artmasıyla kronik hastalıkların oluşum riski azalmaktadır (Hu, 2002). Meyve ve sebzeler, baharatlar, bitkisel çaylar ve yağlı tohumların içermiş oldukları antioksidan bileşikleri pek çok çalışmaya konu olmuş ve antioksidan etkilerinin fenolik bileşiklerden ve özellikle de flavanoit yapısından kaynaklandığı gösterilmiştir. Fenolik maddelerin insan sağlığı üzerindeki etkilerine

baktığımızda, meyve ve sebzelerde zengince bulunan polifenolik bileşiklerin günlük bir gramın üzerinde alındığında mutajenez ve karsinojenez üzerine inhibitör etki gösterdiği rapor edilmiştir (Diri, 2006).

Günümüzde antioksidan maddelerin gıda ve ilaç sanayinde kullanımı oldukça yaygın olup hemen hemen tükettiğimiz ürünlerin çoğuna sentetik antioksidan maddeler katılmaktadır. Bunlar gıdaları bozulmaya karşı korumakta ve onların daha uzun süreli saklanmasını sağlamaktadır. En yaygın kullanılan BHT, BHA VE TBHQ gibi sentetik antioksidanlar lipide dayalı oksidasyonları stabil kılmaktadır (Kil, vd., 2009). Ancak deney hayvanlarıyla yapılan çalışmalarda BHA ve BHT'nin antikarsinojenik özelliğinin yanında karsinojenik etkisinin varlığı da gözlenmiştir. BHA tümör başlatıcı etkiye sahiptir ve araştırmalar sonucunda BHA ve BHT' nin tümör oluşumuna yol açtığı kanıtlanmıştır (Botterweck vd., 2000).

Geçen son on yılda sentetik maddeler yerine doğal özlere doğru eğilimin arttığı gözlenmiştir. Sentetik materyaller ve ürünleri doğal özlerle karşılaştırıldığında daha komplekstir ve onların doğal döngüsünü tamamlaması, doğaya dönmesi uzun zaman almaktadır. Bu yüzden bunlar çok fazla çevresel kirliliğe neden olur. Hammadde fiyatındaki artışla kimyasal üretim maliyetlerindeki dezavantaj daha fazla ortaya çıkar (Silva vd., 2004).

2.3.2. Antioksidan aktivite tayin yöntemleri

Antioksidanlarla ilgili bilimsel makaleler incelendiğinde farklı araştırıcılar tarafından antioksidan kapasiteyi tanımlamak için farklı terimlerin kullanıldığı görülür. Karşılaşılabilecek terimler total antioksidan "kapasite" veya "etkinlik", "güç", "parametre", "potansiyel", "potens" ve "aktivite" dir. Bir kimyasalın "aktivitesi" basınç, sıcaklık, reaksiyon ortamı, diğer reaktifler gibi spesifik reaksiyon koşulları belirtilmedikçe anlamsızdır. Tek bir analiz yöntemi ile ölçülen "antioksidan aktivite" o

yöntemde uygulanan spesifik koşullardaki kimyasal reaktiviteyi yansıttığından verileri "total antioksidan aktivitenin" göstergesi olarak genellemek uygun olmayabilir ve yanıltıcıdır. Bu nedenle "aktivite" terimi yerine farklı deneylerde elde edilen sonuçları "kapasite" olarak sunmak önerilmektedir. Ya da "peroksil radikal süpürücü kapasite", "süperoksit süpürücü kapasite", "demir iyonu indirgeme kapasitesi" gibi ölçüm yöntemini daha spesifik olarak belirten terimlerin kullanılması da önerilmektedir (Ardağ, 2008).

Antioksidan kapasite tayin yöntemleri, kullanılan kimyasal reaksiyon açısından temel olarak iki sınıfta toplanabilir:

2.3.2.1. HAT-temelli metodlar

Temel olarak hidrojen atomu transferine dayanan bu metodlarla, azo bileşiklerinin bozunması sonucu oluşan peroksil radikallerinin antioksidan ve substrat tarafından yarışmalı bir şekilde giderilmesi prensibine dayanır (Ardağ, 2008). İlk olarak bir radikal başlatıcı kullanılarak, peroksil radikali ($ROO^{\cdot}$) üretilir. Reaksiyon ortamındaki antioksidan ve substrat, radikaller için yarışır. $ROO^{\cdot}$ tercihen, antioksidandan bir hidrojen atomu alır. Sonuç olarak peroksil radikali ve hedef molekülün arasındaki reaksiyon geciktirilir veya inhibe edilir (Ou vd. 2002, Huang v.d. 2005).

HAT analiz yöntemleri:

a) İndüklenmiş düşük yoğunluklu lipoprotein otooksidasyonu,
b) Oksijen radikal absorbans kapasitesi (ORAC)
c) Total radikal yakalama antioksidan kapasitesi (TRAP)
d) Crocin ağartma deneyleri olarak sıralanabilir (Ardağ, 2008).

2.3.2.2. ET-temelli metodlar

Antioksidanın, Fe^{+3}, $ABTS^{\cdot+}$ gibi bir oksidan tarafından yükseltgenmesi sonucunda bir elektron antioksidandan oksidana transfer edilir, bu da oksidanın renk değişimine neden olur. UV/VIS ile absorbans değişimi ölçülür. Bu absorbans değişiminin derecesi antioksidan konsantrasyonuyla orantılı olduğundan, antioksidanın indirgeyici kapasitesi tayininde kullanılır (Huang vd., 2005).

ET esaslı analiz yöntemleri:
a) Folin-Ciocalteu reaktifi (FCR) ile toplam fenolik madde analizi
b) Troloks eşdeğeri antioksidan kapasite (TEAC) ölçümü
c) Ferrik iyonu indirgeme antioksidan gücü (FRAP)ölçümü
d) Cu (II) kompleksini oksidan olarak kullanılan "toplam antioksidan potansiyel" ölçüm yöntemi
e) DPPH kullanarak "toplam antioksidan potansiyel" ölçüm yöntemi
f) CUPRAC (Bakır(II) İndirgeyici Antioksidan Kapasite) Yöntemi olarak sıralanabilir (Lopez-Alarcon ve Lissi, 2006).

Antioksidan kapasitenin ölçümü için literatürde verilen yirmiden fazla yöntem vardır. Bitkilerin antioksidan kapasitelerinin tayini söz konusu olduğunda literatürdeki sonuçlar açıkça göstermektedir ki antioksidan aktivite seçilen tayin yöntemine son derece bağımlıdır ve gözlenen antioksidan aktivite (veya kapasite) ile bitki ekstrelerinin total fenolik içeriği arasında tam bir korelasyon gözlenmeyebilir (Miliauskas, vd., 2004).

Gıdaların bileşiminin kompleks oluşu, gıda antioksidanlarının çoklu fonksiyon göstermesi ve sinerjistik etkileşimleri sebebiyle, gıda bileşenlerinin özel olarak ayrılması ve çalışılması pahalı ve zordur. Bu nedenle antioksidan aktivite bir bütün olarak incelenir. Aktivite ölçümü için çok çeşitli metotlar vardır, ancak fazla çeşit görüş ayrılıklarını da beraberinde getirmiştir. Ölçüm yapılırken farklı oksidasyon şartlarında farklı oksidasyon ürünlerini ölçmek için birden fazla metot kullanılır.

2.4. Antimikrobiyal maddeler ve özellikleri

20. yüzyılın başlarına kadar insan organizmasına zarar vermeden mikroorganizmaları etkilemenin imkansız olduğu düşünülüyordu. M.Ö 2500 yıllarında bilinçsiz olarak antimikrobik tedavi yöntemleri uygulanmış ve bu devirde enfeksiyon hastalıkları tedavisinde bitki kökleri, şarap ve küf gibi maddeler kullanılmıştır.1600'lü yıllarda Güney Amerika'da, insanlar cinchora bitkisinin kabuğunu yiyerek sıtmadan korunmuşlar, ipeka bitkisinin kök ekstresini kullanarak amipli dizanteri hastalığını tedavi etmişlerdir. Cinchora bitkisinin kabuğunda kinin, ipeka bitkisinin köklerinde ise emetin bulunduğu belirlenmiştir. 20. yüzyıldan itibaren patojen mikroorganizmalar hakkında bilgiler arttıkça enfeksiyon hastalıkları ile savaş da bilinçli olarak sürdürülmüştür (Akyüz, 2007).

Antimikrobiyal ajanlar (bileşikler), mikroorganizmaları inhibe eden doğal, yarısentetik veya sentetik olarak bulunan maddedir (URL 3). Bitki orjinli antimikrobiyal bileşenler bitkinin kök, gövde, yaprak, tohum, çiçek ve meyvesinden elde edilebilir (Borchardt vd., 2008) ve bitkilerin antimikrobiyal aktivitesi üzerine yapılan eski çalışmalar çoğunlukla yaprak, kök, gövde ve rizom ekstraktlarıyla gerçekleştirilmiştir (Barbour vd, 2004). Ham maddelerin depolanması, işlenmesi ve hatta son ürünlerin depolanması sırasında oluşan lipid oksidasyonu, gıdalarda bayatlama ve ekşimeye neden olan temel sebeptir. İnsan vücudunda lipid oksidasyonunun istenmeyen etkilerinden dolayı gıdaların bozulmasında etken oksidasyon ürünlerini azaltmanın önemi her geçen gün artmaktadır (Tepe vd., 2005).

Katkı maddeleri; ürün kalitesini arttırmak, gıdayı korumak ve raf ömrünü uzatmak amacıyla ürün içeriğine eklenen kimyasal bileşiklerdir. Katkı maddesi içermeyen, daha az tuz içeren, daha az işlem görmüş gıdalarda koruyucu faktörlerin azalması ile ürün mikrobiyal gelişim ve bozunma reaksiyonları açısından riskli hale

gelmekte, ayrıca ürünün raf ömrü sınırlanmaktadır. Tüketicilerde eğilim sentetik katkı maddelerinden farklı olarak hayvansal, bitkisel ve mikrobiyal kaynaklardan elde edilen doğal antimikrobiyallerin kullanımı yönünde olmaktadır (Lemay vd., 2002, Oliveira vd., 2008). Doğal antimikrobiyallerin bir kısmı gıda muhafazasında kullanılmakta olup, bir kısmı da hala araştırma aşamasındadır. Bitkilerde bulunan antimikrobiyal maddeler kimyasal yapılarına göre; fenolikler, terpenoidler ve esansiyel yağlar, alkaloidler, lektinler ve polipeptitler, poliasetilenler seklinde gruplandırılabilir. Fenolikler de kendi içinde; basit fenoller, fenolik asitler, kinonlar, flavonoidler, flavonlar, flavonoller, taninler ve kumarinler olarak ayrılır (Cowan, 1999). Yumurtadaki lizozim, ovotransferrin ve avidin, sütteki laktoperoksidaz ve laktoferrin, kan serumundaki transferrinler hayvansal kaynaklı doğal antimikrobiyallere örnek oluştururken, fitoaleksinler, baharat ve şifalı bitkilerden elde edilen düşük molekül ağırlığına sahip "carvacrol", "eugenol", "thymol", "cinnamic aldehyde", "allicin" gibi fenolik bileşenler, esansiyel yağlar, ekstraktlar başlıca doğal bitkisel antimikrobiyaller arasındadır. Mikroorganizmalardan elde edilen doğal antimikrobiyaller arasında ise nisin ve pediosin gibi bakteriyosinler yer almaktadır (Lemay vd., 2002). Bu bileşenler mikroorganizmaların maximum büyüme aralığı olan log fazında bakteriyosidal ve bakteriyostatik etki gösterir (Borchardt vd., 2008).

Son yıllarda enfekte hastalıkların tedavisinde kullanılan ticari antimikrobiyal ilaçların gelişigüzel kullanımından dolayı insandaki patojenik mikroorganizmalar birçok ilaca karşı direnç geliştirmiştir. Bu durum bilim adamlarının çeşitli kaynaklardan yeni antimikrobiyal öz bulmalarını zorunlu kılmıştır (Karaman vd., 2003). Bugün enfekte hastalıklarla savaşta önemli bir kaynak olmaya devam eden antimikrobiyal aktiviteye sahip bitkiler hastalıkların tedavisinde modern ilaçlara bile meydan okuyabilecek özelliktedir (Yı vd., 2007).

2.4.1. Antimikrobiyal Aktivite Tayin Yöntemleri

Antimikrobiyal duyarlılık testleri içinde en sık kullanılanları:

- Disk difüzyon testleri
- Dilüsyon testleri :

  a) Agar dilüsyon testleri (katı by.de sulandırım testi)

  b) Broth dilüsyon testleri

  - ✓ Makrodilüsyon (tüp dilüsyon) yöntemi
  - ✓ Mikrodilüsyon testleri
- Gradient strip testleri (E-test, MICE)
- Otomatize yöntemler
- Moleküler yöntemlerdir.(URL 8)

2.4.1.1. Dilüsyon Yöntemi:

Antibiyotiklerin sıvı veya katı (agarda dilüsyon) besiyerlerinde bir seri halinde seyreltilmesi ve her bir seyreltme ortamına, duyarlılığı belirlenecek bakterinin belirli sayıda hücre içeren süspansiyonundan eşit miktarda ilave edilmesidir. Deney serileri uygun sıcaklıkta (35-37 °C' de) ve bakterinin üremesi için uygun süre (16-20 saat) bekletilir (Akyüz, 2007). Antimikrobiyal madde konsantrasyonun, inhibitör konsantrasyonunun altında olduğu tüplerde süspansiyon bulanıktır. Antimikrobiyal madde konsantrasyonun inhibitör düzeye eşit veya daha yüksek olduğu tüplerde ise buyyon berraktır. Üremeyi baskılayan en düşük madde konsantrasyonu MİK (Minimum İnhibitör Konsantrasyonu) olarak kabul edilir. Sıvı besiyerinde sulandırma yöntemleri tüpte uygulanıyorsa makrodilüsyon, mikrotitrasyon plaklarında uygulanıyorsa mikrodilüsyon olarak adlandırılır (Hacıoğlu, 2005).

2.4.1.2 Difüzyon Yöntemi:

Bu yöntemin prensibi test materyalinin agarda difuze olmasına ve difuze olduğu mesafe kadar test mikroorganizmalarını inhibe etme esasına dayanır. Bu yöntemin birbirinin yerine geçebilir tarzda kullanılan, disk difüzyon (Kirby-Bauer) ve çukur agar difüzyon yöntemleri olarak adlandırılan iki alt grubu vardır.

Çalışma prensipleri arasında belirgin fark olmayan bu iki yöntemde sadece test edilecek olan materyallerin agar üzerine yerleştirilmeleri farklıdır. Çukur agar testinde değerlendirilecek olan madde agar üzerinde açılan standart çukurlara yerleştirilirken, disk difüzyon testinde emdirildikleri kağıt diskle birlikte agar yüzeyine yerleştirilir (Çakır ve Yıldırım, 2008). Disk difüzyon yönteminde, belirli bir miktar antimikrobiyal ajan içeren kağıt diskler, test mikroorganizmasından hazırlanan standart süspansiyonun yayıldığı agar plakların yüzeyine yerleştirilir. Böylece, diskteki antimikrobiyal madde besiyeri içerisine yayılır ve bakteriye etkili olduğu düzeylerde üremeyi engeller. Bunun sonucunda, disk çevresinde bakterilerin üremediği dairesel bir inhibisyon alanı (zonu) oluşur. İnhibisyon zonunun çapı, bakterinin duyarlılığı ile direkt olarak ilişkilidir. Bu alanın çapı ölçülerek her antimikrobiyal madde için farklı olabilen duyarlılık sınırı değerleriyle karşılaştırılır. İnhibisyon alanının büyüklüğüne göre duyarlı, orta veya dirençli şeklinde duyarlılık kategorisi belirlenir (Öztürk, 2009). Dilüsyon yönteminden farkı antimikrobiyal maddelerin bir tek konsantrasyonunun etkinliği denenir.

Disk-difüzyon yöntemine benzeyen, minimum inhibitör konsantrasyonu (MİK) belirlenmesini sağlayan E-testi (Dereceli antibiyotik şeridi yöntem) , kantitatif yöntem olarak kullanılır (Akyüz, 2007).

3. MATERYAL VE METOD

3.1. Materyal

3.1.1. Bitki örneği

Araştırmada kullanılan bitkisel materyal *Hibiscus sabdariffa* L.'nın çiçeği Edirne'deki bir marketten ticari olarak temin edildi. Tür teşhisi Trakya Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji bölümü öğretim üyelerinden Yrd. Doç. Dr. Necmettin GÜLER tarafından yapıldı. Temin edilen örnekler oda koşullarında ve gölgede kurutulduktan sonra analizde kullanılmak üzere renkli kavanozlarda muhafaza edildi.

3.1.2. Test Bakterileri

Bu araştırmada 6 standart mikroorganizma suşu 1 tane de klinik bakteri kullanıldı. Kullanılan test mikroorganizmalarından 5 tanesi Trakya Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Mikrobiyoloji Laboratuvarından, 1 tanesi Kırklareli Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü kültür koleksiyonundan, klinik bakteri ise Trakya Üniversitesi Tıp Fakültesi'ndeki bir hastadan alınan örnek üzerinden temin edildi. Kullanılan bakteriler ve kodları Tablo 3.1'de verildi. Test edilen her bir bakteri türünün hassasiyetini belirlemek ve kullanılan yöntemin kontrolü için Ampificilin ve Ofloksasin standart antibiyotik diskleri kullanıldı.

Tablo 3.1. Kullanılan bakteriler ve kodları

Bakteri	Bakteri kodu
Escherichia coli	ATCC 25922
Klebsiella pneumoniae	ATCC 700603
Staphylococcus aureus	ATCC 29213
Pseudomonas aureginosa	ATCC 27853
Enterococcus faccalis	Klinik
Candida albicans	ATCC 60193
Candida crusei	6258

3.1.2.1. *Escherichia coli*

E.coli basil şeklinde 2-6 µm boy ve 1-1.5 µm ende düz bakterilerdir. Gram negatif, bazen hareketli, 1-2 mm çapında S tipi koloniler yapan bakterilerdir. Spor oluşturmazlar (URL 3). Fakültatif anaerob olup optimal pH 7 -7.2, optimal üreme ısısı 37°C' dir. Isıya fazla dayanıklı değillerdir. 55°C'ye 1 saat, 60°C'ye 20 dakika dayanıklıdırlar (Erecevit, 2007). Dezenfektanlara, bazı boya (Malaşit yeşili, Füksin vb.) maddelerine, safra ve safra tuzlarına ve % 7 NaCl'e karşı duyarlı, fakat ısı ve soğuğa dirençlidir.

Normal bağırsak bakterisi olarak memeliler ve kuşlarda bulunur. Bağırsak içinde kokuşma, mayalaşma ve beslenme ile ilgili işlemlerde yardımcı olan ve diğer bağırsak bakterileri ile dengeli olarak bulunan flora bakterisidir. Fakat canlının savunma gücünün azaldığı durumlarda doku ve kana yayılarak enfeksiyon etkeni özelliği taşır. Bunlar; üriner sistem, safra ve safra yolları enfeksiyonları, menenjit, peritonit, hemolitik üremik sendrom, trombotik trombositopenik purpura, apse, sinüzit, otit ve yara enfeksiyonlarıdır (URL 3).

3.1.2.2. *Klebsiella pneumoniae*

Bu bakteriler hareketsiz, sporsuz, kısa ve uçları yuvarlak 1,2 µm boyunda ve 0.5-0.8 µm eninde basillerdir. Gram (-), polisakkarit yapısında kapsüllü, aerob ve fakültatif anaerob özellik gösterebilen, 37°C ve pH 7'de iyi üreyen bakterilerdir. Doğada yaygın olarak bulunan bu bakteri; kuruluğa dirençli, sıcaklığa dayanıksızdır. *K. pneumoniae* bakterileri, oda sıcaklığında haftalarca ve 4ºC de aylarca canlı kalabilirler.

Memelilerde üst solunum yolu ve dışkı florasında bulunan bir bakteri olduğu için patojenliği, uygunsuz koşullarda fırsatçı patojen olarak açığa çıkar. *Klebsiella* özellikle 2 yaş altı ve 40 yaş üstü kişilerde vücut direncinin kırılması, virutik üst solunum yolu enfeksiyonları sırasında pnömonilere neden olur (Erecevit, 2007).

3.1.2.3. *Staphylococcus aureus*

Yuvarlak şekilde olup gram (+) ve hareketsizdirler. Spor oluşturmazlar. Yaklaşık 1 µm çapında fakültatif anaerob bakterilerdir. Fakat aerob şartlarda daha bol ürerler. *S. aureus* için optimum üreme ısısı 30 -37 °C dir. Optimal pH 7 -7.5'tur. Bazı suşları kapsül oluşturur. Katı besiyerinde üredikleri zaman birbirine dik iki yüzeyde bölünmeleri sonucu üzüm salkımına benzer kümeler yaparlar. Sıvı besiyerinde üredikleri ise kısa zincirler ve diplokoklar oluştururlar. Birçok bakteri 60ºC'de 30 dakikada aktivitesini kaybederken, *S. aureus* bakterileri ısıya dirençli nükleazları oluşturdukları için dayanıklıdırlar. Kültürleri 4ºC'de ve oda ısısında tutulduklarında aylarca canlılıklarını korurlar. Bu yüzden; tozda, toprakta, eşya üzerinde insan ve hayvanın deri, ağız ve nazofarinks floralarında yaygın şekilde bulunurlar. *Staphylococcus*'lara bağlı deri enfeksiyonları insanlarda karşılaşılan *Staphylococcus* hastalıklarının en sık görülenleridir (Erecevit, 2007).

3.1.2.4. *Pseudomonas aureginosa*

0,6–2 μm uzunluğunda, Gram (-) basillerdir. Polar konumlu flagelları ile hareketlidirler. Tek tek, çift veya kısa zincirler halinde bulunabilirler. Bakterinin çevresinde ekstrasellüler polisakkarit yapıda bir tabaka bulunur. Fermantasyon yapamaz, glukozu okside edebilir. Çok az miktarda besin maddesi içeren nemli ortamlarda aerob üreyebilen bir bakteridir. Üreme sıcaklığı optimum 37 ºC'dir. Doğada oldukça yaygındır. İnsan ve hayvan bağırsağında bulunmaktadır. *P. aeruginosa* karakteristik olarak mavi-yeşil bir pigment oluşturur ve mavi cerahat yaparlar. Fırsatçı patojen bir bakteri olduğundan uygun şartlar altında özellikle direnci kırılmış konakçılarda yanık ve yara enfeksiyonları, idrar yolu enfeksiyonları, menenjit, göz enfeksiyonları, septisemi, bronşit ve bronkopnömoni gibi çeşitli hastalıklara yol açar. Ayrıca *P. aeruginosa*, önemli bir denitrifiye edici bakteri olarak doğadaki azot devrinde önemli bir rol oynamaktadır. Bu mikroorganizma yaygın olarak kullanılan birçok antibiyotiğe karşı doğal olarak dirençlidir. Bu direnç bakterilerin hücrelerinde bulunan R plazmitleri üzerindeki genlerle sağlamaktadır. Hastane çevrelerinde yaygın olarak bulunan bu organizma tedavi gören hastaları da enfekte etmektedir (Hacıoğlu, 2005).

3.1.2.5. *Enterococcus faecalis*

Bu bakteriler Gr(+), hareketsiz koklardır. Tek tek, çift ya da kısa zincirler halinde mikroskopta gözlenebilirler. Fakültatif anaerobtur. İnsan kalın bağırsağında bu bakteriye çok sık rastlanmaktadır. Sık sık *S. pneumonia* ile karıştırılmaktadır ancak *E. faecalis* testlerle tanımlanabilecek birçok karakteristik özelliğe sahiptir. Hastaneyle ilgili enfeksiyonlara neden olan bakteriler içinde ön sıralarda yer almaktadır. Karın ameliyatlarından sonra bu bakterilerin neden olduğu enfeksiyonlara sık rastlanmaktadır. *E .faecalis* antibiyotiklerin çoğuna direnç gösteren bakteri olarak bilinmektedir (URL 1).

3.1.2.6. *Candida sp.*

Candida'lar maya formunda mantarlardır. 5 -7 µm büyüklüğünde oval veya 4-6 x 6-10 µm büyüklüğünde uzun maya hücreleri şeklinde görülürler. Mısır unu agarında; micelyum, pseudomicelyum, blastospor ve chlamydospor olmak üzere dört farklı form oluştururlar. 8-12 mm büyüklüğünde, yuvarlak ve kalın duvarlı chlamydosporu oluşturmaları *C. albicans'*ın en önemli özelliğidir. Hacminin büyük oluşu besin maddelerini depolamasına, kalın duvarlı oluşu ise uygun olmayan çevre şartlarından korunmasına yardım eder. Bu kalın duvar iki tabakadan oluşur. Dışta polisakkarit içte protein tabaka yer alır. *C. albicans* normal bireylerin deri ve mukoz zarlarının normal florasında yer almasına rağmen organizmanın doğal direnci zayıfladığında enfeksiyonlar oluşturmaktadırlar. *Candida*'ların patojen duruma geçmesine yaş, genel enfeksiyonlar, aşırı zayıflama ve şişmanlık, şeker hastalığı, fazla terleme, vitamin eksikliği gibi endojen faktörler ve travma, nem artışı, mantarların virulansı ve patojenitesi gibi ekzojen faktörler sebep olmaktadır. Ayrıca yüksek dozda geniş spektrumlu antibiyotik kullanımı vücut florasında maya mantarları üzerindeki baskının ortadan kalkmasına neden olur ve bunlar üremeye başlar. *Candida*' ların sebep olduğu lezyonların tedavisindeki en iyi yöntem nedenin ortadan kaldırılmasıdır. Bu mayalar ağız, deri, tırnak, vajina, bronş ve akciğerlerde lezyonlar oluştururlar (Erecevit, 2007).

3.1.3. Kimyasal Maddeler ve Ekipmanlar

Çalışmada 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 ile Kimya Bölümü Biyokimya Araştırma Laboratuvarındaki alet ve cihazlar kullanıldı. Çalışmada ısıtıcı 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), liyofilizatör (Armfield FT 33), spektrofotometre (Ceceil 5000 series CE5502, Shimadzu UV-1601), dağıtıcı ve mikro pipetler (Eppendorf), hesap makinesi (CASIO fx-3950P), çalkalamalı su banyosu (Clifton 100-400 rpm; termostatlı) otoklav (Nüve OT 4060), balon jojeler, pensler, cam petriler, eküvyon çubukları, cam tüpler, erlenler, şırıngalar, membran filtreler, Whatmann No:1 kağıdı, Oflaxacin, Ampificilin antibiyotik diskleri kullanılan başlıca ekipmanlardır.

3.1.4. Çözeltilerin ve Besiyerinin Hazırlanması

3.1.4.1. Antioksidan Aktivite Tayininde Kullanılan Çözeltilerin Hazırlanması

Folin-Ciocalteu Reaktifi

Ticari olarak satın alındığı şekilde kullanıldı.

1 mM DPPH çözeltisi

0.0986 g DPPH tartılarak etanolde çözüldü ve balon jojede 250 mL'ye tamamlandı.

0.1 mM DPPH çözeltisi

1 mM DPPH çözeltisinden 10 mL alınarak etanolle balon jojede 100 mL'ye tamamlandı.

% 30'luk NH_4SCN çözeltisi

30 g NH_4SCN tartılarak destile suda çözüldü ve balon jojede 100 mL'ye tamamlandı.

20 mM $FeCl_2$ çözeltisi

0.2535 g $FeCl_2$ tartılarak % 3.5'luk HCl ile balon jojede 100 mL'ye tamamlandı.

Linoleik asit emülsiyonu

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

% 10'luk TCA çözeltisi

10 g TCA tartılarak destile suda çözüldü ve balon jojede 100 mL'ye tamamlandı.

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 karıştırılması ile hazırlandı.

% 1'lik $K_3Fe(CN)_6$ çözeltisi

1 g $K_3Fe(CN)_6$ tartılarak destile suda çözüldü ve balon jojede 100 mL'ye tamamlandı.

% 0.1'lik $FeCl_3$ çözeltisi

0.1 g $FeCl_3$ tartılarak destile suda çözüldü ve balon jojede 100 mL'ye tamamlandı.

0.2 M fosfat tamponu (pH 6.6)

KH_2PO_4 (27.218 g/L) ve $Na_2HPO_4.2H_2O$ (35.598 g/L) çözeltilerinin pH 6.6 olacak şekilde karıştırılması ile hazırlandı.

% 2'lik Na_2CO_3 çözeltisi

2 g Na_2CO_3 tartılarak destile suda çözüldü ve balon jojede 100 mL'ye tamamlandı.

% 75'lik Etanol

390.6 mL etanol alınarak destile su ile balon jojede 500 mL'ye tamamlandı.

Gallik asit çözeltisi (GAE)

0.029 g gallik asit tartılarak distile suda çözüldü ve mezürde 29 mL'ye tamamlandı.

3.1.4.2. Antibakteriyel Aktivite Tayininde Kullanılan Besiyeri ve Çözeltiler

Besiyerinin hazırlanması: Bakteriler için 38 g Müller Hinton agar tartıldı ve 1000 mL distile su ilave edildi ve benmari yöntemiyle eritilerek hazırlandı. 1g Nütrient agar tartıldı ve 50 mL distile su ilave edildi, benmari yöntemiyle eritip steril edildikten sonra yatık olarak donduruldu.

Mayalar için 5 g Sabouraud Dekstroz agar tartıldı ve 250 mL distile su ilave edildi ve benmari yöntemiyle eritilerek hazırlandı. Bu besiyerlerinin bulunduğu erlenler

121 ºC'da 15 dk steril edildikten sonra besiyerleri daha önceden pastör fırınında steril edilen cam petrilere döküldü.

0,5 McFarland standart çözeltisinin hazırlanması: %1'lik 99.5 mL H_2SO_4 ile %1,18'lik 0.5 mL $BaCl_2$ karıştırılarak hazırlandı.

Serum fizyolojik hazırlanması: 9 g NaCl tartıldı ve 1000 mL distile su ile karıştırılarak hazırlandı. Otoklavda 121 ºC'da 15 dk steril edildi.

3.2. Metod

3.2.1. Ekstraktların Hazırlanışı

Kurutulan bitki örnekleri ev tipi rondoda öğütüldükten sonra su, etanol ve aseton çözücüleri kullanılarak ekstraktlar hazırlandı.

Su infüzyonları için 20 g bitki örneği 400 mL kaynayan suda (katı:sıvı oranı 1:20) 15 dakika boyunca karıştırılarak ekstrakte edildi. Eksraktlar süzgeç kağıdından süzüldü ve Namık Kemal Üniversitesi Teknik Bilimler Meslek Yüksekokulu Gıda Teknolojileri Bölümü'nde liyofilize edildi.

Etanol ve aseton ekstraksiyonu için 20'şer gram bitki örneği 300 mL çözücü ile oda koşullarında manyetik karıştırıcıda 3 saat inkübe edildi. Süzgeç kağıdından süzüldü, süzüntülerin çözücüleri evaparatörde 40 ºC' de uçuruldu (Mothana ve Lindequist, 2004). Bitkilerden ekstrakte edilebilen bileşiklerin miktar tayini için liyofilize ve evapore örneklerin tartımı alındı. Analiz edilinceye kadar renkli şişelerde +4 ºC'de muhafaza edildi.

Antioksidan aktivite denemelerinde çalışılacak konsantrasyonlar için liyofilize örnekler destile suda, aseton ve etanol ekstraktları ise etanolde 1000 µg/mL olacak şekilde çözüldü. Diğer konsantrasyonlar bu stok çözeltilerden seyreltilerek hazırlandı. Antimikrobiyal aktivite denemelerinde ise çalışılan ekstraktlar DMSO'da çözüldü.

Tablo 3.2. Kurutulmuş bitkilerden ekstrakte edilen bileşiklerin verimleri

Bitki Materyali	Kullanılan Çözücüler	Ekstrelerin Adları	Ekstrelerin Kısaltmaları	Verimleri (%)
Hibiscus sabdariffa	Etanol	Etanol ekstraktı	HE	12.1
	Aseton	Aseton ekstraktı	HA	7.1
	Su	Su ekstraktı	HS	65.75

3.2.2. Antioksidan Aktivitenin Belirlenmesi

3.2.2.1. Toplam Fenolik Madde Tayini

Tüm bitkilerin su, etanol ve aseton ekstraktlarındaki toplam çözünebilen fenolik maddeler Folin-Ciocalteu reaktifi (FCR) ile tayin edildi (Singleton ve Rossi, 1965). FC reaktifi fosfotungustik ($H_3PW_{12}O_{40}$) ve fosfomolibdik ($H_3PMo_{12}O_{40}$) asitlerin karışımı olup fenol oksidasyonu sırasında bu oksitler mavi renkli bileşiklere indirgenir. Bu renk değişimi polifenolik bileşik miktarı ile orantılı olup 760 nm'de spektofotometrede takip edilir. Polifenol miktarı genellikle gallik asit veya kateşol ekivalenti olarak ifade edilir.

Tüm bitkilerin 1000 µg/mL konsantrasyonlarında hazırlanan su, aseton ve etanol ekstraktlarından 0.1 mL alındı. Destile su ile hacimler 4.6 mL'ye tamamlandıktan sonra 0.1 mL FCR eklendi. 3 dakika sonra % 2'lik Na_2CO_3 çözeltisi katılarak oda

koşullarında 2 saat çalkantılı su banyosunda 250 rpm'de tutuldu. Örnek yerine destile su içeren kör denemeye karşı, 760 nm'de absorbanslar ölçüldü.

Farklı konsantrasyonlarda (50-500 µg/mL) hazırlanan gallik asit çözeltilerine FCR ile toplam fenolik madde tayini uygulandı. Okunan konsantrasyonlar ile absorbanslar arasında çizilen gallik asitten hazırlanan standart grafiğin denkleminden, örneklerin toplam fenolik madde miktarları µg gallik asit (µg GAE/mg ekstrakt) eşdeğeri şeklinde hesaplandı.

3.2.2.2. DPPH Radikali Giderme Aktivitesi Tayini

Serbest radikal yakalama etkinliği deneyi 1,1-difenil-2-pikrilhidrazil (DPPH) radikali kullanılarak Blois'in metoduna göre çalışıldı (Blois, 1958). Metod ekstraktların bir proton veya elektron verebilme yeteneğinin, mor renkli DPPH çözeltisinin rengini açması esasına dayanır. Reaksiyon karışımındaki absorbansın düşmesi yüksek serbest radikal giderme aktivitesinin göstergesidir.

Farklı konsantrasyonlarda hazırlanan ekstraktlardan (100-1000 µg/mL) ve standart çözeltilerden (50-1000 µg/mL) 1'er mL alınarak, 4 mL 0.1 mM DPPH (etanolde) çözeltisi ilave edildi. Vortekslendikten sonra oda koşullarında karanlıkta 30 dakika bekletildi ve 517 nm'de absorbansları okundu. Örnek ve standart madde yerine 1 mL etanol kullanılarak aynı şartlarda kontrol de çalışıldı. Kontrolün absorbansı günlük ölçüldü.

EC50 değeri hesaplanmadan önce % DPPH radikali giderme aktivitesi aşağıda verilen formül ile hesaplandı:

$$\%\ \text{DPPH Radikali Giderme Aktivitesi} = \frac{\text{Kontrolün Absorbansı} - \text{Örnek Absorbansı}}{\text{Kontrol Absorbansı}} \text{x } 100$$

Çözeltideki DPPH radikallerinin % 50'sini gidermek için gerekli olan ekstrakt ve standart madde konsantrasyonu EC_{50} olarak tanımlanır. Düşük EC_{50} değeri yüksek radikal giderme aktivitesinin göstergesidir. Bu değer çalışılan konsantrasyonlara karşı % serbest radikal giderme aktivite değerlerinin yerleştirilmesi ile elde edilen grafik kullanılarak hesaplandı ve sonuçlar EC50 = µg/mL olarak verildi.

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

Antioksidan aktivite ferrik tiyosiyanat metodu kullanılarak (Pan vd., 2007) belirlendi. Bu metotta in vitro koşullarda linoleik asit oksidasyonu oluşturulur ve oksidasyon sırasında Fe^{+2} iyonları Fe^{+3} iyonlarına yükseltgenir. Belirli aralıklarla inkübasyondaki karışımdan örnek alınarak spektrofotometrik ölçüm ile peroksitlerin oluşumu takip edilir. Yüksek absorbans değeri yüksek peroksit konsantrasyonunu ifade eder.

100-1000 µg/mL arası konsantrasyonlarda hazırlanan bitki ekstraktları ve standart madde çözeltilerinin (2.5-1000 µg/mL) 1 mL'sine 2.5 mL linoleik asit emülsiyonu ve 1.5 mL fosfat tamponu (0.04 M pH 7.0) eklendi. Linoleik asit emülsiyonu 175 mg Tween 20 ve 155 µL linoleik asidin fosfat tamponunun (0.04 M pH=7.0) 50 mL'ye tamamlanması ile hazırlandı. Kontrol örneği ise 2.5 mL fosfat tamponu ve 2.5 mL linoleik asit emülsiyonu içerecek şekilde hazırlandı. Çözeltiler vortekslendikten sonra 37 ºC'de inkübasyona bırakıldı. 120 saat boyunca 8 saatte bir inkübasyon çözeltisinden 0.1 mL alınarak temiz deney tüpüne konuldu. 4.7 mL % 75'lik etil alkol ve 0.1 mL % 30'luk NH_4SCN'de deney tüpüne ilave edildi. Bu reaksiyon karışımları 3 dakika oda koşullarında bekletildikten sonra; % 3.5'luk HCl'de hazırlanmış olan 20 mM $FeCl_2$ (0.1 mL) çözeltisi ilave edildi ve 5 dakika sonra oluşan kırmızı rengin absorbansı 500 nm'de ölçüldü.

Linoleik asit peroksidasyonunun % inhibisyonu aşağıdaki formül ile hesaplandı :

$$\% \text{ İnhibisyon} = 1 - \frac{500 \text{ nmde Örnek Absorbansı}}{500 \text{ nmde Kontrol Maksimum Absorbansı}} \times 100$$

3.2.2.4. İndirgeme Kapasitesi Tayini

Bitki örneklerinden elde edilen ektraktların indirgeme kapasitesi Oyaizu metoduna göre tayin edildi. Ortamdaki indirgen madde Fe^{+3} iyonlarını Fe^{+2} iyonlarına indirger ve $FeCl_3$ ilavesiyle oluşan Prusya mavisi rengindeki kompleksin absorbansı ölçülür. Yüksek absorbans değeri yüksek indirgeme kapasitesinin göstergesidir (Oyaizu, 1986).

Çeşitli konsantrasyonlarda hazırlanan bitki ekstraktları (50-1000 µg/mL) ve standart madde çözeltilerinin (20-1000 µg/mL) 1 mL' sine, 2.5 mL fosfat tamponu (0.2 M, pH 6.6) ve 2.5 mL % 1'lik $K_3Fe(CN)_6$ eklendi. Karışımlar 50 ºC'de 20 dakika inkübe edildikten sonra 2.5 mL % 10'luk TCA eklendi ve 2500 rpm'de 10 dakika santrifüj yapıldı. Santrifüj sonrası süpernatantlardan 2.5 mL alınarak eşit hacimde destile su ve 0.5 mL % 0.1' lik $FeCl_3$ çözeltisi ile karıştırıldı. 700 nm'de absorbanslar okundu. Kör deneme için bitki örneği yerine tampon konularak yapıldı. Deney sonucu absorbans-konsantrasyon grafiği çizilerek değerlendirildi.

3.2.3. Antibakteriyal Aktivite Tayin Yöntemi

3.2.3.1. Bakteri Kültürlerinin Hazırlanması

Bakteri kültürleri için besiyeri olarak Nutrient agar ve maya için Sabourad Dextrose agar kullanıldı. Steril edilen besiyerleri 90 mm çaplı steril petri kaplarına 20 mL olacak şekilde döküldü. Bakteri kültürleri üremesi için 37 ºC'de, maya kültürleri için ise 30 ºC etüvde 20-24 saat inkübasyona bırakıldı.

MİK değerlerini belirlemek için kullanılan bakteri kültürlerini hazırlamada, Nütrient agar içeren yatık besiyerleri kullanıldı. Üretim 37 ºC'de 24 saat süreyle gerçekleştirildi.

3.2.3.2. Disk Difüzyon Yöntemi

H.sabdariffa ekstraktlarının antimikrobiyal aktivitelerini belirlemek için disk difüzyon yöntemi kullanıldı (Ünal, 2006). Hazırlanmış olan bitki ekstraktları son konsantrasyonu 30 mg/ml olacak şekilde DMSO içerisinde çözüldü. Elde edilen çözeltiler membran filtreden (0.45 μm) geçirilerek steril edildi. Mikroorganizmaların katı besiyerlerinde üretilmiş 18-24 saatlik taze kültürlerinden öze ile alınan koloniler serum fizyolojik içinde süspanse edildi ve 0.5 McFarland bulanıklık tüpüyle kıyaslanarak 10^8 CFU/mL dilüsyon hazırlandı. İnokulum olarak da bu sulandırma kullanıldı. Müller Hinton agar içeren petrilerin yüzeyine eküvyon çubuğu kullanılarak bakteri dilüsyonundan steril pipet yardımıyla 100 μl ekildi. Çözeltilerin 35 μl' lik miktarları 6 mm çaplı boş steril disklere (Whatmann No:1) emdirildi. Daha sonra diskler petrilere uygun şekilde yerleştirildi. Bakteriler 37 ºC'da, mayalar 30 ºC'da 18-24 saat süreyle etüvde inkübasyona bırakıldı. Pozitif kontrol olarak Ampificilin ve Oflaxacin standart antibiyotik diskleri kullanıldı. Negatif kontrol olarak da sadece DMSO'nun emdirildiği diskler kullanıldı.

İnkübasyon sonunda oluşan inhibisyon zonlarının çapları milimetrik cetvelle ölçüldü (Ebrahimabadi vd., 2010).

3.2.3.3. Minimum İnhibitör Konsatrasyonunun (MİK) Tayini

Bitki örneğinin su ile elde edilen ham özütünün Minimum İnhibisyon Konsantrasyon (MİK)' u makrobroth yöntemiyle belirlendi. Her bir bakteri kültürü (18 saatlik)' nden 25 µL ($1X10^8$ cfu/mL) alınarak 3 mL Müller Hinton Broth ve bir seri bitki ekstraktı (30 mg/mL' den başlayarak 0.46 mg/mL konsantrasyona kadar) dilusyonları bulunan deney tüplerine aktarıldı ve 37°C' de 24 saat inkübe edildi.

İnkübasyondan sonra büyümenin görülmediği tüplerdeki en düşük ekstrakt konsantrasyonu MİK olarak belirlendi.

Ayrıca bulanıklık oluşmayan tüplerden 50 µL alınarak Müller Hinton agara ekim yapıldı, büyüme olup olmadığı kontrol edildi ve minimum bakterisit konsantrasyonu (MBC) da belirlendi. Tüm deneyler birbirine paralel üç ölçüm olacak şekilde gerçekleştirildi. Tanımlayıcı istatistikler olarak aritmetik ortalama±SS değerleri ile verildi. Grafikler GraphPad Prism 5 Demo programı kullanılarak çizildi. Hata çubukları grafiklerin üzerinde belirtildi (Oskay vd., 2007).

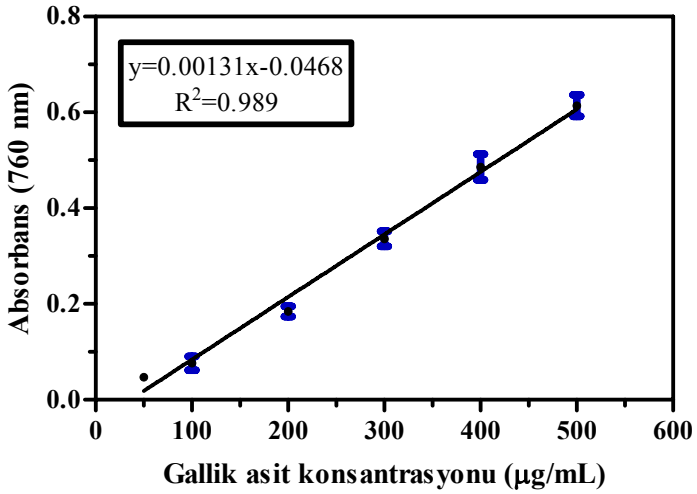
4. BULGULAR

*Hibiscus sabdariffa'*dan hazırlanan (HA, HE, HS) ekstrelerinin antioksidan aktiviteleri DPPH radikal giderme, indirgeme kapasitesi ve linoleik asit sisteminde ferrik tiyosiyanat (FTC) metodları kullanılarak yapıldı. Ayrıca tüm ekstrelerin toplam fenolik madde miktarları gallik asit eşdeğeri olarak tayin edildi.

*H. sabdariffa'*dan hazırlanan (HA, HE, HS) ekstraktların antimikrobiyal aktiviteleri disk difüzyon yöntemiyle belirlendi.

4.1. Toplam Fenolik Madde Miktar Tayini

Bitki ekstraktlarındaki toplam çözünebilen fenolik maddeler Folin-Ciocalteu reaktifi (FCR) ile tayin edildi. Gallik asit kullanılarak hazırlanan standart grafik (Şekil 4.1) yardımıyla, bitki ekstraktlarının toplam fenolik madde miktarları mg gallik asit (mg GAE/g ekstrakt) eşdeğeri şeklinde hesaplandı.



Şekil 4.1. Gallik asit standart grafiği

Tablo 4.1. *H. sabdariffa* L. ekstraktlarının gallik asit eşdeğeri olan fenolik madde miktarları

***Hibiscus sabdariffa* L.**	**Fenolik İçerik (mg.GA/gr ekstrakt)**		
	ETANOL	**ASETON**	**SU**
	53.28±0.008 mg/gr	44.88±0.002 mg/gr	47.93±0.003 mg/gr

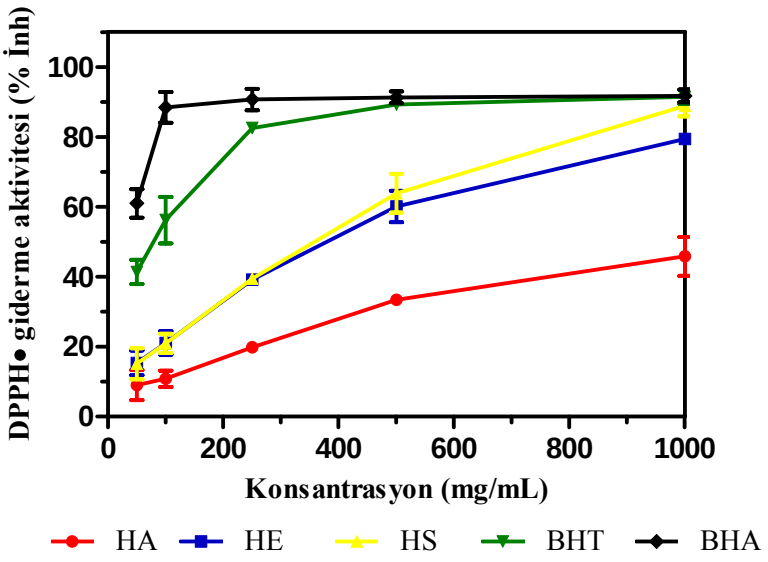
Ekstraktların toplam fenolik madde miktarları standart gallik asit grafiğinden elde edilen eşitlik kullanılarak belirlendi ve Tablo 4.1'de verildi. Görüldüğü üzere *H. sabdariffa*'nın etanol ekstraktının toplam fenolik madde miktarı açısından, diğer ekstraktlara göre daha zengin olduğu tespit edildi

4.2. DPPH Radikali Giderme Aktivitesi

Doğal antioksidanların serbest radikal giderme aktivitesini ölçmek için kullanılan radikallerden biri DPPH radikalidir. DPPH$^{\bullet}$ (1,1–difenil–2–pikrilhidrazil) kararlı yapıda bir azot radikalidir. DPPH'ın etanoldeki çözeltisi mor renklidir ve 517 nm'de absorbansı ölçülür. DPPH çözeltisine antioksidanların ilave edilmesiyle söz konusu dalga boyundaki absorbansta düşüş meydana gelir ve çözeltinin rengi sarıya doğru kayar. Absorbansın düşmesinin sebebi radikal ile antioksidan moleküllerin reaksiyonu sonucu, radikale hidrojen bağlanması ile radikalin giderilmesidir. Antioksidan ile DPPH'in oluşturduğu reaksiyon karışımının gösterdiği absorbans ne kadar düşük ise antioksidanın serbest radikal giderme aktivitesi o kadar yüksek demektir.

$$\underset{\text{(mor renkli)}}{\text{DPPH}^{\bullet}} + \text{Antioksidan-H} \rightarrow \underset{\text{(sarı renkli)}}{\text{DPPH-H}} + \text{Antioksidan}$$

*H. sabdariffa'*dan hazırlanan üç ekstraktın serbest radikal giderim aktivitesi beş farklı konsantrasyonda (50, 100, 250, 500, 1000 µg/mL) tayin edildi. Standart olarak kullanılan BHT ve BHA'ya göre aktivite karşılaştırmaları yapıldı. Ekstraktların DPPH radikali giderme aktivitelerine ait konsantrasyon-% inhibisyon grafiği Şekil 4.2'de görülmektedir. Bu metodta tüm ekstraktlar düşük konsantrasyonlarda çok etkili değilken, su ve etanol ekstraktları 500-1000 µg/mL'lik konsantrasyonlarda radikal giderme aktivitesi yönünden standartlarla karşılaştırılabilir başarılı aktiviteler gösterdi. Tüm ekstraktlarda konsantrasyon artışı ile birlikte % inhibisyon oranlarında artış gözlendi.



Şekil 4.2. *H. sabdariffa* L. ekstraktlarının DPPH radikali giderme aktivitesi

Bitkinin aseton, etanol ve su ekstraktlarının, 500 µg/mL' lik konsantrasyonlarında sırasıyla %33.43±0.7 , %60.06±4.47, %63.87±5.54 radikal giderme aktiviteleri gözlenirken 1000 µg/mL'lik konsantrasyonlarda ise sırasıyla %47.95±2.25, %79.45±1.19 ve %88.87±3.01 aktivite gözlenmiştir.

H.sabdariffa L. ekstraktlarının farklı konsantrasyonlardaki radikal giderme aktiviteleri ile (% inhibisyon) konsantrasyon arasında çizilen grafikler yardımıyla EC_{50} değerleri belirlendi ve Tablo 4.2'de verildi.

Tablo 4.2. *H. sabdariffa* L. bitkisinin su, etanol, aseton ekstraktlarının **EC50** değerleri

EC50 Değerleri (mg/ml)				
Hibiscüs sabdariffa L.			BHT	BHA
Etanol	Aseton	Su	Etanol	
0.376	0.986	0.355	0.079	0.025

Tablo 4.2'de de görüldüğü gibi tüm ekstraktlar içinde en düşük **EC50** değerini *H. sabdariffa* L. çiçeğinin su ekstraktı, en yüksek değerini ise aseton ekstraktı vermiştir.

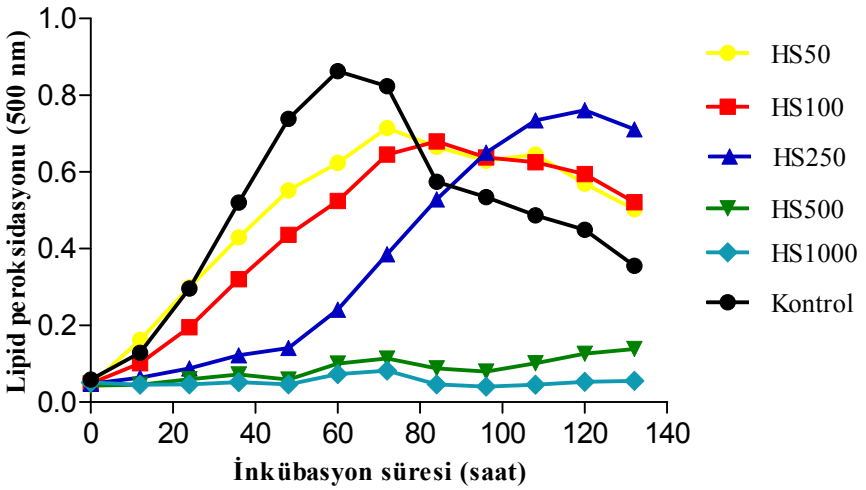
4.3. Linoleik Asit Sisteminde Ferrik Tiyosiyanat (FTC) Metodu ile Total Antioksidan Aktivite Tayini

Antioksidan aktivite tayini tiyosiyanat metoduna göre yapıldı. Bu metotta linoleik asit emülsiyonu sabit sıcaklıkta (40^oC) ve karanlıkta otooksidasyona bırakıldı. Yağların oksidasyonu sırasında peroksitler oluşmaktadır. Tiyosiyanat metodu ortamdaki peroksitlerin miktarının UV görünür bölge spektrofotometresinde belirli bir dalga boyunda miktarının ölçümü esasına dayanır. Zamanla linoleik asit oksidasyonu sonucu peroksitlerin miktarı artar. Fakat belirli bir süre sonra peroksitlerin miktarında azalma gözlenir. Çünkü peroksitler de başka ürünlere dönüşmektedir. Linoleik asit emülsiyonu inkübasyona bırakıldıktan sonra, değisik zaman aralıklarında emülsiyondan örnek alınarak, örneğe Fe^{+2} ve SCN^- ilave edilir. Peroksitler Fe^{+2}'yi Fe^{+3}'e yükseltger. $Fe^{+3'}$ de SCN^- ile reaksiyona girerek, 500 nm' de maksimum absorbans veren $Fe(SCN)^{+2}$ kompleksini oluşturur. Absorbanstaki artış peroksit miktarıyla doğru orantılıdır. Bu sebeple, antioksidan kapasiteye sahip ekstraktların linoleik asit emülsiyonundaki absorbans miktarı azalırken, antioksidan kapasitesine sahip olmayan ekstraktların linoleik asit emülsiyonundaki absorbans miktarı daha fazladır.

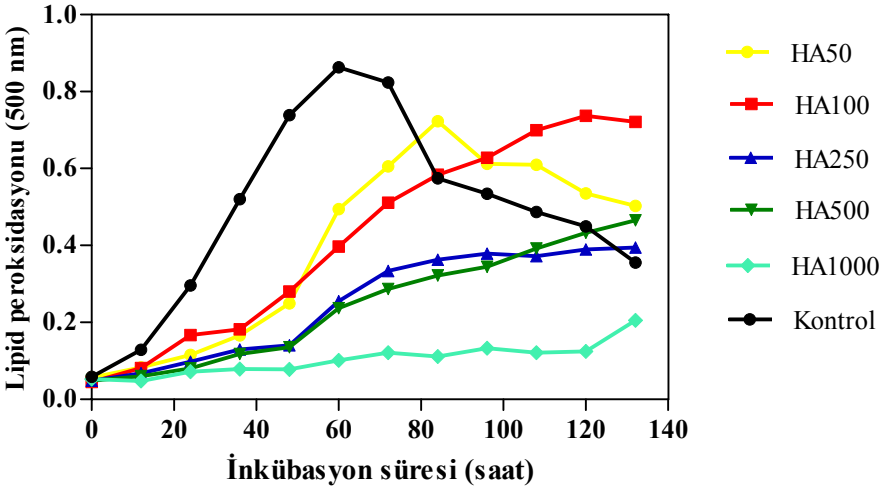
Bitki ekstraktlarının linoleik asit peroksidasyonu üzerindeki inhibisyon etkileri, örneklerin 50, 100, 250, 500, 1000 µg/mL konsantrasyonlarında ölçüldü. Sonuçlar BHA, BHT, E vitamininin inhibisyon oranları ile karşılaştırıldı. İnkübasyon sırasında emülsiyonda oluşan peroksitlerin miktarı, oksidasyonun ilerleyişi sırasında on iki saatte bir ölçüm alınarak 132 saat boyunca takip edildi. Kontrolün absorbansının maksimum olduğu yani lipid peroksidasyonunun en fazla olduğu zaman kadar olan veriler kullanılarak, herbir ekstraktın ve standart maddelerin farklı konsantrasyonları için

absorbans-zaman grafikleri çizildi (Şekil 4.3). Grafikler yardımıyla kontrolün maksimum absorbansı yani lipid peroksidasyonunun en fazla olduğu an ve her bir örneğin bu maksimum peroksit oksidasyonu anına karşılık gelen absorbansları belirlendi. Bölüm 3.2.2.3'te verilen formül yardımıyla lipid peroksidasyonunu inhibe etme oranları tayin edildi.

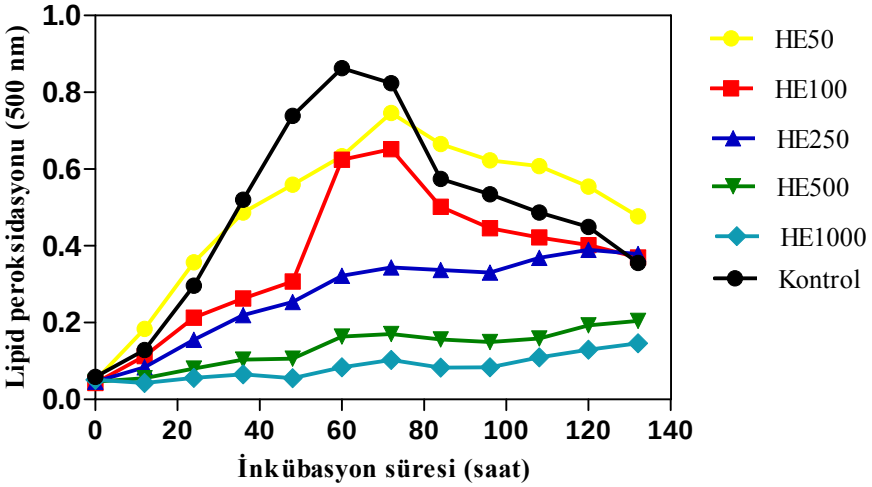
A



B



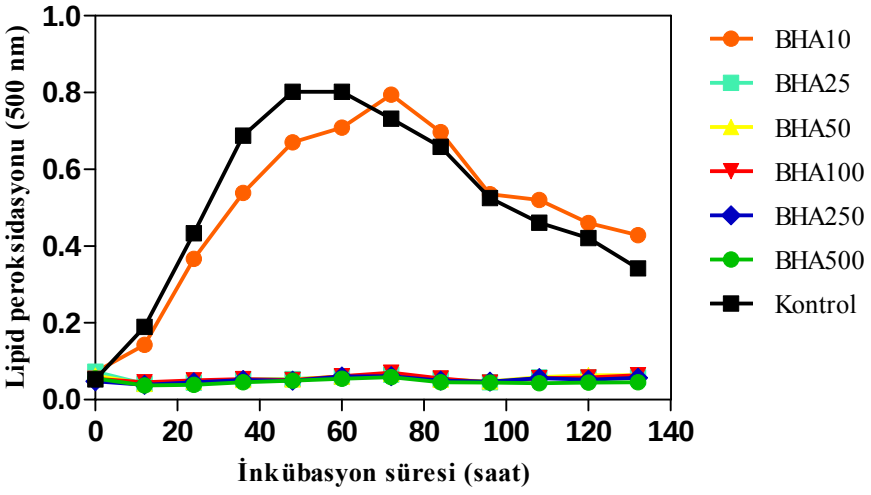
C



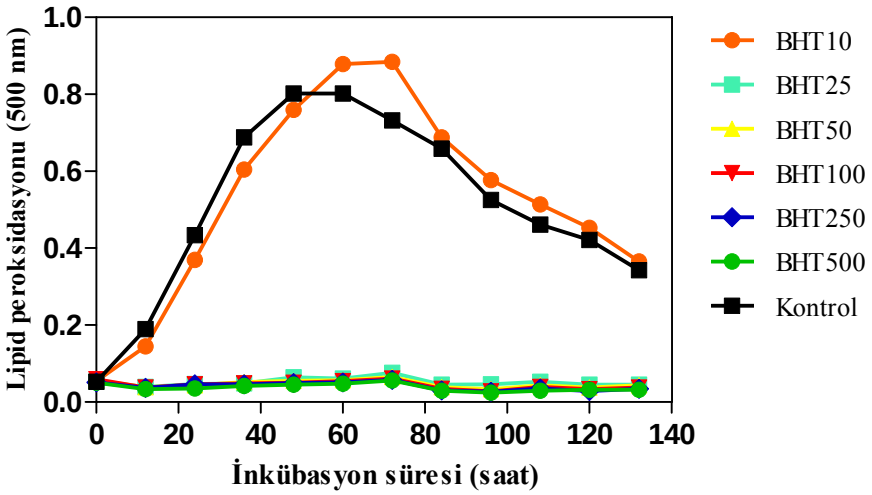
Şekil 4.3. Linoleik asit peroksidasyonunda *H. sabdariffa* L. su (A), aseton (B) ve etanol (C) ekstraktlarının etkisi

Şekil 4.3'te görüldüğü gibi genel olarak su ve etanol ekstraktlarının yüksek konsantrasyonlarda iyi aktivite gösterdiği, diğer tüm ekstraktların lipid peroksidasyonunu önlemede zayıf olduğu gözlendi.

A



B



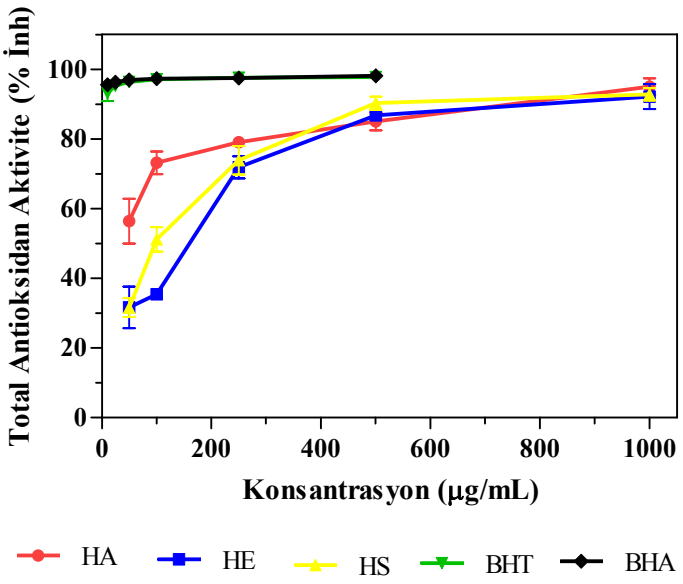
Şekil 4.4. Linoleik asit peroksidasyonunda sentetik antioksidan olan BHA (A) ve BHT (B)'nin etkisi

Çalışmamızda; linoleik asit emülsiyonu ile yapılan lipid peroksidasyonu denemesinde BHA ve BHT standartlarının 10 µg/mL hariç çalışılan tüm konsantrasyonlarda peroksit oluşumunu tamamen inhibe ederek tipik bir antioksidan profili sergilediler (Şekil 4.4). Ancak E vitamini sentetik antioksidanlara göre farklı davranış gösterdi. Literatürde yüksek dozdaki E vitamininin prooksidan etki gösterebileceği (Tafazoli vd, 2005) bildirilmiştir. Bu yüzden daha düşük konsantrasyonlar ile (2.5, 5, 10, 25 ve 50 µg/mL) çalışıldığında, lipid peroksidasyonunun maksimum olduğu sürede yüksek inhibisyon oranları tayin edildi.

Bitki ekstraktlarının ve standartların antioksidan aktivitelerini daha açık şekilde görebilmek için, elde edilen % inhibisyon değerleri Tablo 4.3'te verilmiştir

Tablo 4.3. Ekstraktların ve standartların lipid peroksidasyonunu inhibe etme oranları

Bitki ekstraktı	**% İnhibisyon**						
	10 µg/mL	**25 µg/mL**	**50 µg/mL**	**100 µg/mL**	**250 µg/mL**	**500 µg/mL**	**1000 µg/mL**
HA			56.42 ±1.38	73.17 ±3.26	79.05 ±1.19	85.02 ±2.55	95.05 ±2.3
HE			28.94 ±1.64	36.8 ±1.41	71.87 ±3.18	86.76 ±1.14	92.17 ±3.6
HS			31.62 ±2.68	51.2 ±3.5	73.9 ±4	90.3 ±1.87	92.82 ±1.79
Standart madde							
BHA	95.55 ±0.26	96.28 ±0.4	96.97 ±0.55	97.33 ±0.17	97.48 ±0.27	98.12 ±0.31	
BHT	93.14 ±2.29	95.27 ±1.44	96.42 ±0.97	97.14 ±0.83	97.62 ±0.24	97.8 ±0.17	
E VİT	**2,5 µg/mL** 95.88 ±0.86	**5 µg/mL** 96.19 ±0.42	**10µg/mL** 97.21 ±0.31	**25 µg/mL** 96.2 ±0.75	**50 µg/mL** 95.06 ±0.31		



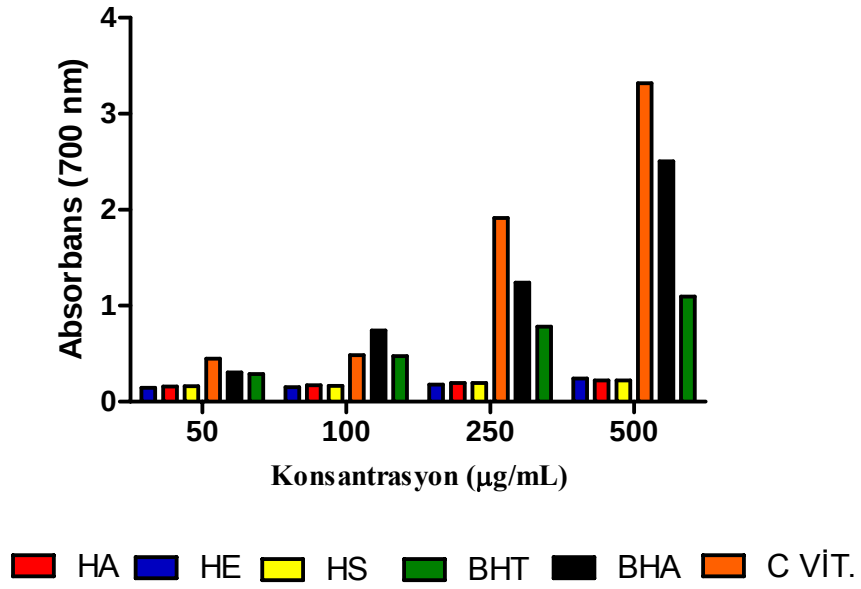
Şekil 4.5. *H. sabdariffa* L. ekstraktlarının total antioksidan aktivitesi

Şekil 4.5'e göre ekstraktların total antioksidan aktiviteleri artan konsantrasyonla artmaktadır. Ancak etanol ve su ekstraktının 50 ve 100 µg/mL konsantrasyonları hariç diğerlerinin ancak yüksek konsantrasyonlarda standart maddelerinki ile karşılaştırılabilecek düzeyde antioksidan aktivite gösterdiği bu nedenle, linoleik asit otooksidasyonunun başlamasını önemli ölçüde geciktirdikleri söylenebilir.

4.4. İndirgeme Kapasitesi Tayini

Çalışılan bitkinin indirgeme gücü Oyaizu (Oyaizu, 1986) metoduna göre belirlendi. Bu yöntemde belirleyici faktör absorbans olduğundan, absorbansı yüksek çıkan maddelerin antioksidan aktivitesi de yüksektir.

Bir bileşiğin indirgeme gücü onun potansiyel antioksidan aktivitesinin bir ölçüsüdür. İndirgeme gücünde asıl belirlenen ortamda bulunan Fe^{+3} iyonlarının ne derece Fe^{+2} iyonlarına indirgendiğidir. Bu da ekstrelerin 700 nm'deki absorbanslarının ölçülmesi ile saptanır. Çalışmadan elde edilen veriler Şekil 4.6'da gösterilmiştir.



Şekil 4.6. *H. sabdariffa* L. ekstraklarının Fe^{+3}'ü Fe^{+2}'ye indirgeme kapasitesi

Grafiklerden görüldüğü üzere, çalışılan bitki ekstraktlarının Fe^{+3}'ü indirgeme yetenekleri yönünden standartlarla karşılaştırıldığında çok yüksek aktiviteye sahip olmadıkları gözlendi.

Bitki ekstraktlarının ve standarların indirgeme güçleri şu şekilde sıralanmıştır; C vit.>BHA>BHT> etanol ekstraktı=aseton ekstraktı=su ekstraktı şeklindedir.

4.5. Antimikrobiyal Aktivite

4.5.1. Disk difüzyon yöntemi

*Hibiscus sabdariffa'*dan hazırlanan (HE, HA, HS) ekstraktların 5 bakteri 2 maya üzerindeki antimikrobiyal aktiviteleri disk difüzyon yöntemiyle belirlendi.

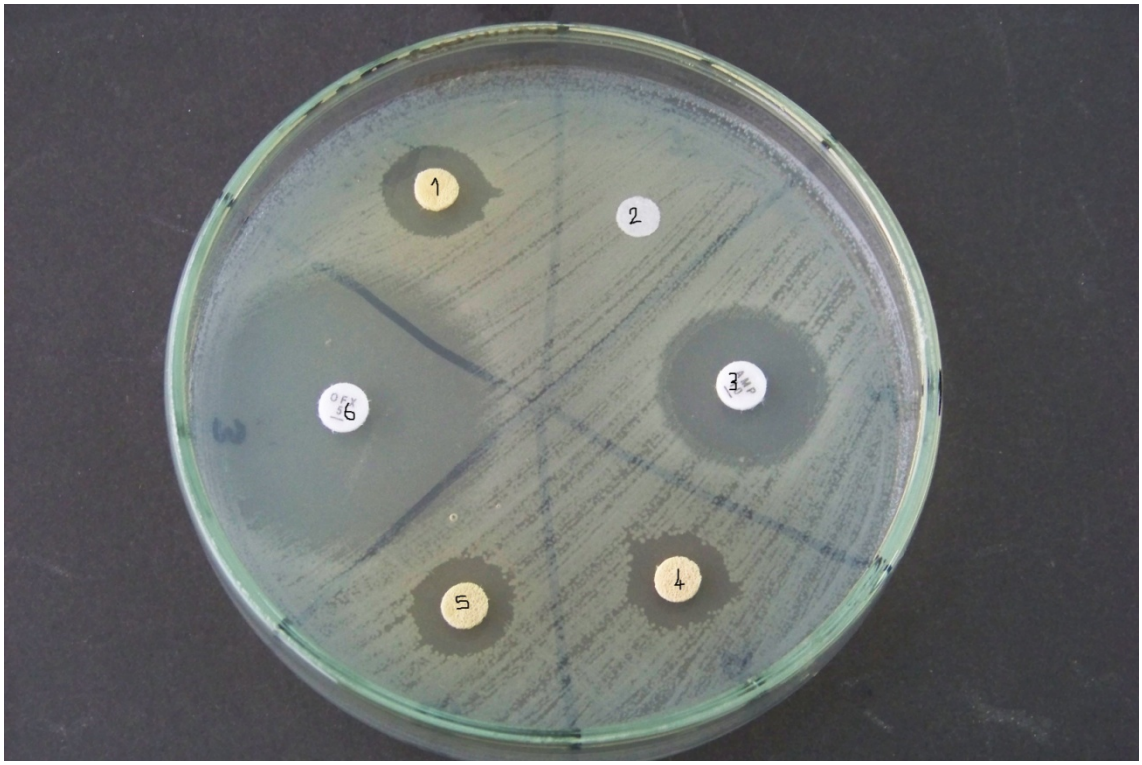
Tablo 4.4. *H.sabdariffa* L.*'* dan hazırlanan ekstraktların test mikroorganizmaları üzerindeki antimikrobiyal aktiviteleri

MİKROORGANİZMALAR	İNHİBİSYON ZON ÇAPLARI (mm)					
	HA	HE	HS	DMSO	Ampificilin	Oflaxacin
Escherichia coli	11	10	10	(-)	20	30
Klebsiella pneumoniae	11	8	6	(-)	(-)	(-)
Staphylococcus aureus	15	13	13	(-)	20	27
Pseudomonas aureginosa	7	7	5	(-)	(-)	20
Enterococcus faccalis	10	10	8	(-)	30	20
Candida albicans	15	12,5	15	(-)	(-)	(-)
Candida crusei	9	10	10	(-)	20	25

Tablo 4.4 'te de görüldüğü üzere sadece DMSO emdirilmesiyle hazırlanan negatif kontrol disklerinin test mikroorganizmalarının hiçbiri üzerinde inhibisyon zonu oluşturmadığı görüldü. Pozitif kontrol olarak Ampificilin ile Oflaxacin kullanıldı.

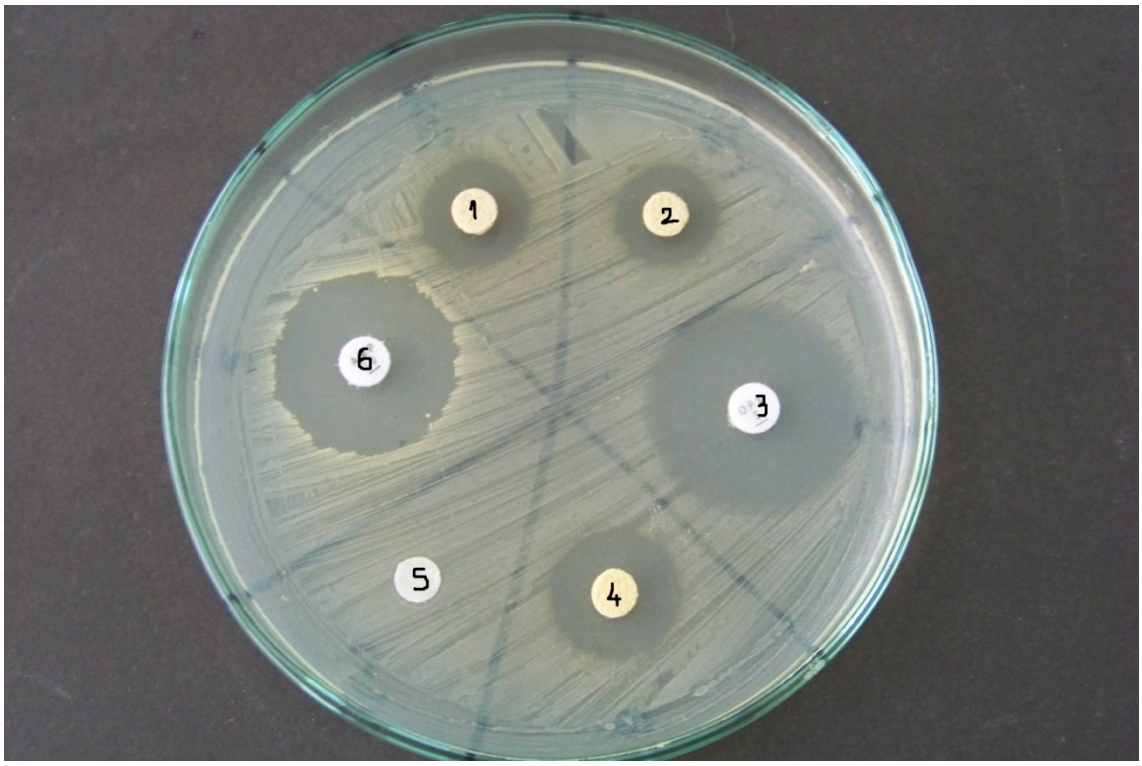
Tüm ekstraktların test mikroorganizmaları üzerinde değişen oranlarda antimikrobiyal aktivite gösterdiği belirlendi. HA, HE ve HS ekstraktlarına karşı en duyarlı bakterinin *S. aureus* olduğu belirlendi. Mayalardan *C.albicans'ın C.crusei'ye* göre daha duyarlı olduğu belirlendi.

Aşağıda HA, HE ve HS ekstraktlarının etkili oldukları mikroorganizmalar üzerinde oluşturdukları inhibisyon zonlarını gösteren şekiller verilmiştir. (Şekil 4.7., Şekil 4.8., Şekil 4.9., Şekil 4.10.)



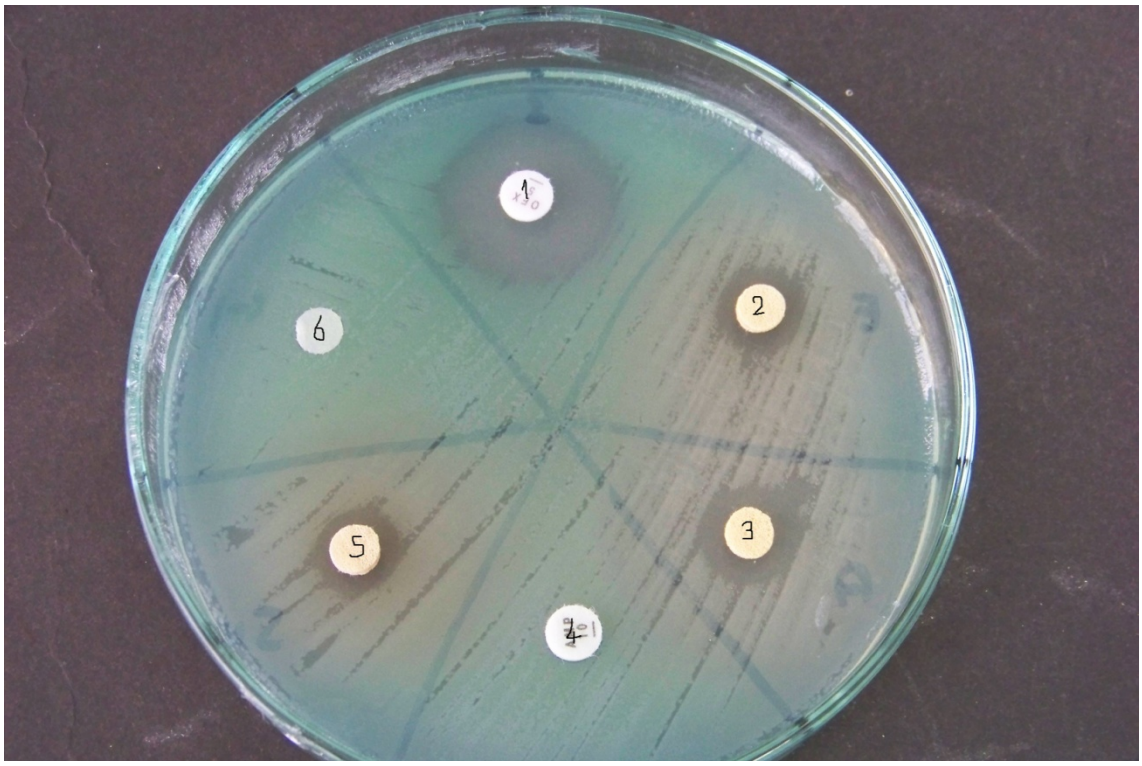
Şekil 4.7. HA, HE, HS'nin *E.coli* üzerinde oluşturduğu inhibisyon zonu içeren diskler

1.HA, 2.DMSO (Negatif kontrol içeren disk), 3.AMPİFİCİLİN, 4.HE, 5.HS, 6.OFLAXACİN



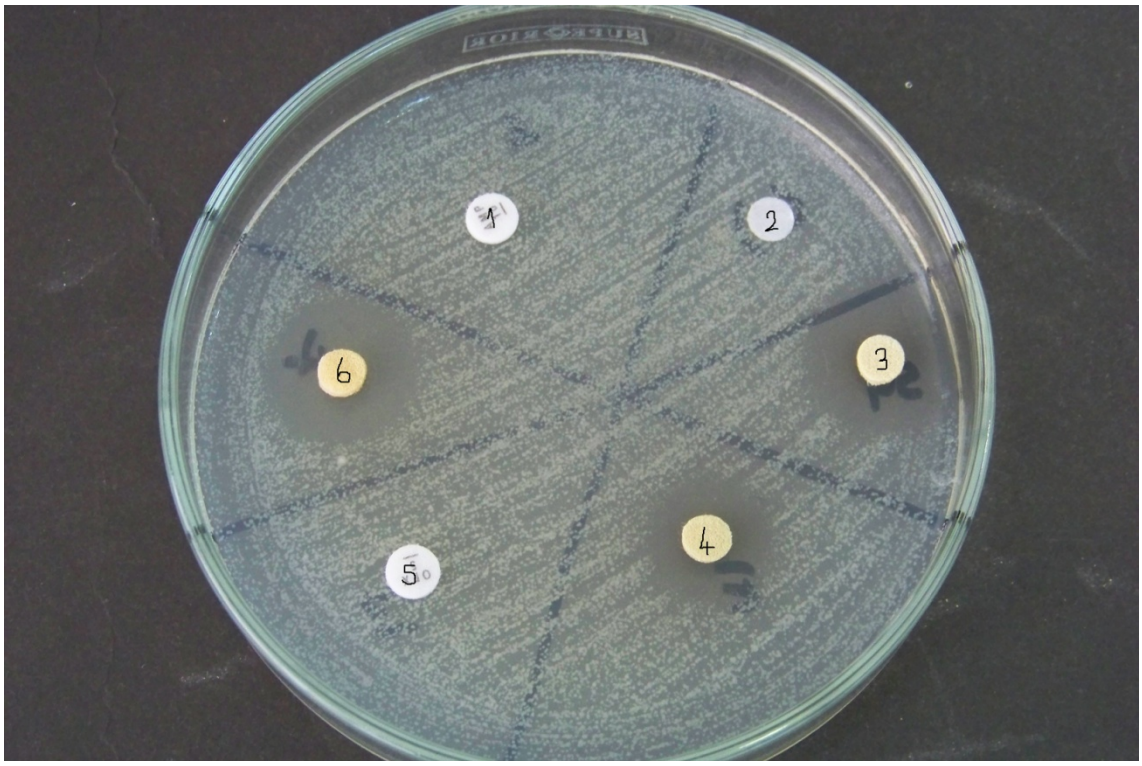
Şekil 4.8. HA, HE, HS'nin *S.aureus* üzerinde oluşturduğu inhibisyon zonu içeren diskler

1.HE, 2.HS, 3.OFLAXACİN,4. HA,5.DMSO, 6.AMPİFİCİLİN



Şekil 4.9. HA, HE, HS'nin *P.aureginosa* üzerinde oluşturduğu inhibisyon zonu içeren diskler

1.OFLAXACİN, 2.HA, 3.HE, 4.AMPİFİCİLİN, 5.HS, 6.DMSO



Şekil 4.10. HA, HE, HS'nin *C.albicans* üzerinde oluşturduğu inhibisyon zonu içeren diskler

1.AMPİFİCİLİN, 2.DMSO,3.HS, 4.HE, 5.OFLAXACİN, 6.HA

4.5.2. MİK değerleri

Tablo 4.5. *H.sabdariffa* HS ekstraktının MİK ve MBC değerleri (mg/ml)

MİKROORGANİZMALAR	MİK DEĞERLERİ (mg/ml) HS	MBC DEĞERLERİ (mg/ml) HS
Escherichia coli	7.5	15
Klebsiella pneumoniae	7.5	15
Staphylococcus aureus	15	15
Pseudomonas aureginosa	7.5	15
Enterococcus faccalis	7.5	15
Candida albicans	7.5	15
Candida crusei	7.5	15

5. TARTIŞMA

Bu yüksek lisans tez çalışmasında, Malvaceae familyası üyesi olan *Hibiscus sabdariffa* L.*'nın* kaliksi sırasıyla aseton, etanol ve su ile ekstrakte edildi. Farklı konsantrasyonlarda her bir ekstraktın DPPH radikalini giderme aktivitesi, indirgeme kapasitesi ve ferrik tiyosiyanat (FTC) metodu ile lipid peroksidasyonunu önleme kapasitesi gibi üç farklı metotla antioksidan özellikleri detaylı olarak incelendi. Yapılan önceki çalışmalardan antioksidan aktivite ile fenolik madde içerikleri arasında bir korelasyon olduğu ve fenolik maddelerin büyük çoğunluğunun antioksidan özellik gösterdiği (Turkoğlu vd., 2007, Mohd-Esa vd., 2010) bilindiği için, tüm ekstraktlarının fenolik madde miktarı da gallik asit eşdeğeri cinsinden tayin edildi.

Bitkilerden ekstrakt eldesi distile su ile katı:sıvı oranı 1:20 olacak şekilde 15 dk kaynatılarak; etanol ve aseton ile katı:sıvı oranı 1:15 olacak şekilde 3 saat boyunca oda koşullarında çalkalamalı su banyosunda ekstrakte edilerek yapılmıştır (Mata vd. 2007). Birçok araştırmacı su, metanol, etanol, aseton, petrol eteri, etil asetat, kloroform, diklorometan gibi çeşitli çözücü veya çözücü karışımları ile homojenizer kullanarak, oda koşullarında bekleterek (maserasyon), çözücü ile kaynatarak ve Soxhlet ekstraksiyonu ile ekstrakt elde etmişlerdir (Tsai vd. 2001, Mothana vd. 2003, YI vd. 2007, Yaltirak vd. 2009). Çalışmamızda ekstraksiyon için polaritesi yüksek, toksititesi diğer çözücülere oranla düşük olan, ekonomik açıdan uygun ve kolay temin edilebilecek çözücüler tercih edildi.

Farklı yöntemler ve farklı polariteye sahip çözücüler kullanarak yapılan araştırmalarda % ekstrakt miktarları üzerine polar çözücülerin apolar çözücülerden daha etkili olduğu görülmüştür (Hayouni vd. 2007). Bizim çalışmamızdaki ekstraksiyon verimliliği ekstraksiyonda kullanılan çözücü cinsine göre su>etanol>aseton (Tablo 3.2) sırasındadır.

Fenolik bileşikler meyve ve sebzelerde en çok bulunan fitokimyasallardır. Güçlü antioksidan aktiviteye sahip olduğu bilinen fenoller bitki patojenlerine karşı doğal silahtır. Sebzelerdeki fenollerin alt bileşenlerinde gözlenen antioksidan aktivitenin, vitamin C ve Vitamin E'yi dahi aşabildiği bilinmektedir. (Prenesti, 2007)

Çalışmamızda bitki ekstraktındaki toplam fenoliklerin miktarı FCR ile tayin edilerek, ekstraktlardaki miktarlar genel standart olarak kabul edilen gallik asit cinsinden hesaplandı. Toplam fenolik bileşik miktarı su ekstraktı için 47.93±0.003 GAE mg/g eksrakt, etanol ekstraktı için 53.28 ±0.008 GAE mg/g eksrakt ve aseton ekstraktı için 44.88±0.002 GAE mg/g eksrakt olarak değişmektedir (Tablo 4.1).

Tez kapsamında çalışılan bitkiye dair yapılan literatür taramasında; *H.sabdariffa* L.*'nın* tohumundaki (4.87±0.14- 2.97±0.17) fenolik madde içeriği hem metanol hem de su ekstraktında bitkinin yaprak (2.20±0.02-1.71±0.04 GAE mg/g), gövde (1.31±0.27-0.9±0.03 GAE mg/g) ve kaliksine(2.91±0.07-1.85±0.11 GAE mg/g) göre daha yüksek olduğu tayin edilmiştir. Yine aynı çalışmada yapraktaki fenolik bileşik konsantrasyonunun gövdeye göre daha yüksek olduğu belirlenmiştir (Mohd-Esa., 2010).

H. sabdariffa L. kaliksinin fenolik bileşiklerinin incelendiği bir diğer çalışmada (Anokwuru vd, 2011) metanol, etanol, aseton ve su ekstrelerinin sırasıyla 29.2±0.08 GAE mg/g, 27.6±0.08 GAE mg/g, 19.3±0.02 GAE mg/g, 20.2±0.06 GAE mg/g ekstrakte verilerini bildirmişlerdir. Çalışmamızda da etanol ekstraktında fenolik madde içeriği diğer ekstraktlara göre yüksektir.

Bitkilerin polifenol içeriği bitki türü, tarımsal proses, ışık, iklim, hasat zamanı gibi pek çok dış etkenden etkilenir. Ayrıca kullanılan çözücü ve ekstraksiyon proseslerinindeki çeşitlilik de fenolik bileşiklerde gözlenen miktar değişikliklerinin sorumluları arasındadır. *H. sabdariffa* L. ile ilgili yapılan çalışmalarda; çiçeğin depolanma süresinin, farklı sıcaklıkta kurutulması ve depolanmasının fenolik madde içeriğini etkilediği (Tsai vd., 2002), çiçeğin 3 dk suda kaynatılmasıyla elde edilen ekstraktın 3 veya 6 saat oda koşullarında karıştırılması sonucu elde edilen ekstrakttan daha yüksek fenolik içeriğine sahip olduğu, sıcak suyun fenollerin antioksidan

aktivitesini bozmadığı, aksine daha etkili bir ekstrakt ortaya çıkardığı bildirilmiştir (Prenesti vd., 2007).

Çalışmamızda; bitki ekstraktlarının serbest radikal giderici etkileri stabil bir radikal olan DPPH üzerinden test edilmiştir. DPPH çözeltisi mordur ve antioksidan bir bileşikle etkileştiğinde yapısı değişerek sarı renkli yeni bir bileşik haline dönüşür. Bu renk değişikliğinin derecesi, antioksidanın konsantrasyonu ile doğru orantılıdır.

Çalışılan bitki için radikal giderme aktiviteleri su ekstraktı>etanol ekstraktı>aseton ekstraktı şeklindedir ve 1000 µg/mL konsantrasyonda sırasıyla % 88.87±3.01, % 79.45±1.19, % 47.95±2.25 aktivite gözlendi (Şekil 4.2). Anokwuru P.C. vd. (2011) tarafından *H. sabdariffa* L. kaliksinin DPPH radikalini giderme etkisi 1000 µg/mL'lik konsantrasyonunda etanol ekstraktı> su ekstraktı>aseton ekstraktı sırasıyla % 69±0.46, % 63±9.97, % 37±0.01 şeklinde bildirilmiştir.

Bitki ekstraktlarının total antioksidan aktivitelerini belirlemek üzere linoleik asit peroksidasyonu üzerindeki inhibisyon etkileri ferik tiyosiyanat metoduna göre çalışıldı. Sonuçlar BHT, BHA, α-tokoferol standartlarıyla karşılaştırıldı. Ekstraktların konsantrasyon artışına bağlı olarak (50-1000 µg/mL) lipid peroksidasyon inhibisyonunda da artış gözlendi (Tablo 4.3). Ekstrakt eklenmemiş olan linoleik asit otooksidasyonunun (kontrol) peroksit değerinde hızlı bir artış gözlendi ve artışın 2.5-3. gününde maksimuma ulaştığı görüldü. Genel olarak ekstraktların her birinin linoleik asit peroksidasyonunun inhibisyonunda 250, 500 ve 1000 µg/mL konsantrasyonlarında önemli derecede antioksidan aktiviteler gösterdiği ve linoleik asit otooksidasyonunun başlama periyodunu geciktirdiği gözlendi.

Çalışmamızda bitkimizin lipid peroksidasyonu inhibisyonunun düşük konsantrasyonlarda (50, 100 ve 250 µg/mL) aseton ekstraktında su ve etanol ekstraktlarınınkine göre daha iyi olduğu gözlendi. Yüksek konsantrasyonlarda ise (500 ve 1000 µg/mL) bitkinin tüm ekstraktlarının aktiviteleri birbirine yakın ve yüksek aktivitelere sahip idi. Ancak bu aktiviteler BHT ve BHA standartlarının düşük

konsantrasyonlarında (10-100 μg/mL) gösterdiği aktivite ile kıyaslanabilecek değerde idi (Tablo 4.3).

H. sabdariffa L. ile yapılan araştırmada (Anokwuru vd., 2011) etanol ekstraktının; su, aseton ve metanol ekstraktlarına göre lipid peroksidasyonunu inhibe etmede daha başarılı olduğu bildirilmiştir. Bitkinin çeşitli kısımlarının (tohum, kaliks, yaprak, kök) β-karoten ağartma metoduyla yapılan total antioksidan aktivite tayininde kaliksin su ekstraktında, tohumun % 80'lik metanol ekstraktında en yüksek aktivite gösterdiği bildirilmiştir (Mohd-Esa vd., 2010).

E vitamini çalışılan tüm konsantrasyonlarda (2.5-50 μg/mL) kontrolün lipid peroksidasyonunun maksimum olduğu ana kadar yüksek inhibisyon etkisi gösterdi. Bu süreden sonra (72. saat) lipid peroksidasyonunun arttığı gözlendi. Bu artışın sebebi oksidasyonu önlemek veya geciktirmek için ortamda bulunan E vitamininin harcanması ve bunun sonucunda daha az reaktif olan E vitamini radikallerine dönüşmesi olabilir. Deney tüpündekinin ortamdakinin aksine in vivo koşullarda, oluşan E vitamini radikalleri askorbat veya flavonoidler tarafından rejenere edilerek, tekrar E vitamini formuna dönüştürülmektedir.

İndirgeme kapasitesi tayininde bitki ekstraktlarının Fe^{+3}'ü Fe^{+2}'ye dönüştürebilme etkinliği incelendi. Bir bileşiğin indirgeme kapasitesi onun elektron transfer edebilmesiyle ilişkilidir. Bu potansiyel antioksidan aktivitesinin önemli bir göstergesi olarak kabul edilir.

Ekstraktların hepsinin Fe^{+3}'ü indirgeme kapasitesinin güçlü bir indirgen madde olan askorbik aside (C vit.) göre çok zayıf olduğu gözlendi. Bitki ekstraktları kendi aralarında karşılaştırıldığında ise Fe^{+3}'ü indirgemesi açısından birbirine yakın değerler gözlendi.

Bitki ekstraktlarının antimikrobiyal aktivitelerini araştıran çeşitli çalışmalarda, farklı bitkiler için farklı çözücüler kullanılmıştır. Bu çözücülerin arasında dietileter, metanol, n- bütanol , hekzan, etil asetat yer almaktadır (Tepe vd. 2003, , Oskay vd.

2007, Yı vd. 2007, Kil vd. 2009). *H. sabdariffa* L. bitkisinin antimikrobiyal aktivitesini belirlemek amacı ile yapılan çalışmada bitki özütlerinin bazı gram pozitif ve gram negatif bakterilerle, *Candida* türleri üzerine antimikrobiyal aktivite gösterdiği saptanmıştır. Özütlerin hem bakteriler hem de fungus üzerinde aktivite göstermiş olması bitkinin içeriğinde bulunan antimikrobiyal maddelerin çok çeşitli olabileceğini düşündürmektedir. Araştırmamızda mikroorganizmalar üzerine en etkili çözücünün aseton olduğu tespit edilmiştir. Yine Ünal (2006) bitkilerin antimikrobiyal özellikleri üzerine yaptığı çalışmada, bitkilerin aseton ekstrelerinin en iyi sonuç verdiğini belirlemiştir. Aseton, polar ve polar olmayan çözücülerle ve suyla karıştırılabilir olması, ayrıca kolay buharlaşabilme özelliğine sahip olmasından dolayı sıkça tercih edilen bir maddedir.

Malvaceae familyasına ait *H. rosa sinensis*, *Malva neglegta* ve *Alcea rosea* bitkilerinin etanol ekstraktı ile yapılan bir çalışmada (Seyyednejad vd. 2010) gr (-) bakterilerden *E. coli* ve *K. pneumoniae'*nın *H. rosa sinensis* ve *M. neglegta*'ya dirençli; *Alcea rosea*'ya karşı *E. coli*'nin dirençli ancak *K. pneumoniae*'nın az miktarda duyarlı olduğu gözlenmiştir. Gr(+) bakterilerden *S. aureus*'un *H. rosa sinensis*, *M. neglegta* ve *A. rosea*'ya karşı duyarlı olduğu gözlenmiştir. Öztürk ve Ercişli'nin (2007) Malvaceae familyasına ait *Althaea officinalis* ve *Althaea hirsute* bitkileriyle yaptıkları çalışmada her iki bitkininde su ekstraktının antibakteriyal etkisi olmadığını gözlemlemişlerdir.

Bu değerlendirmelere göre bizim çalışma bitkimiz *H. sabdariffa* L.*'nın* Malvaceae familyası içinde diğer bitkilere göre daha iyi antimikrobiyal etkiye sahip olduğunu söyleyebiliriz.

H. sabdariffa L.'nın kaliksiyle yapılan diğer bir çalışmada (Adebisi vd., 2011) 40 mg/ml konsantrasyonda *E. coli (10.5 mm) , S. aureus (12 mm)* ve *P. aureginosa (11 mm)* bakterileri üzerinde üremeyi inhibe edici etkisi olduğu gözlenmiş. Bitki ekstraktının *K. pneumoniae* üzerinde 20 ve 40 mg/ml konsantrasyonda etkisi gözlenmez iken 60 mg/ml konsantrasyonda (11.5 mm) inhibe edici etki göstermiştir. *C.albicans* üzerinde ise hiçbir konsantrasyonda inhibe edici etki gözlenmemiş. Bizim çalışmamızda 30 mg/ml konsantrasyonda aseton, etanol ve su ekstraktlarının her birinin çalışılan

bakteriler üzerine inhibe edici etkisi olduğu gözlendi. İnhibisyon zonlarının 7-12.5 mm arasında değiştiği gözlendi (Tablo 4.4). Ayrıca *C. albicans* ve *C. crusei* üzerinde de etkili olduğu gözlendi.

H. sabdariffa L.*'nın* minimum inhibitör konsantrasyonu (MİK) makrobroth dilüsyon yöntemine göre yapıldı. Çalışma bitkimizin su ekstraktı *S. aureus* hariç diğer tüm mikroorganizmalarda 7.5 mg/ml konsantrasyonda üremeyi durdurucu etki gösterirken, *S. aureus'un* üremesini engellemede 15 mg/ml'lik konsantrasyon başarılı oldu.

Ekşimsi tadı ve güçlü kırmızı rengiyle bitki çaylarına hareket katan, halk arasında marketlerden alınıp çay olarak tüketimi yaygın olan *H. sabdariffa* L. bitkisinin, insan sağlığına bir yararı olup olmadığı bu çalışma ile araştırılmıştır. En doğru sonucu elde edebilmek amacıyla, bu bitki tüketilen şartlardaki formuyla temin edilip çalışılmıştır. *H. sabdariffa* karşılaştırılan standartlara yakın antioksidan aktiviteler göstermiştir. Özellikle su ekstraktında da güçlü antioksidan ve antimikrobiyal aktiviteler göstermesi bu bitkinin çay olarak tüketiminin faydalı olabileceğini göstermektedir. *Klebsiella pneumoniae* ve *Pseudomonas aureginosa* pozitif kontrol olarak kullanılan Ampificiline karşı direnç gösterir iken, bitki özütleri bu bakterilere ve Candida türlerine karşı antimikrobiyal aktivite göstermiştir. Bu çalışma ile *H. sabdariffa* L.*'*nın antibiyotiklere direnç gösteren bakterilere karşı, tıbbi bitkilerin antimikrobiyal amaçla kullanımlarının gerekli olduğu durumlarda bitki seçimine yardımcı olabilecek nitelikte olduğu belirlenmiştir.

Sonuç olarak *H. sabdariffa* L. bitkisinin çay formunda tüketiminin gerek antioksidan gerekse antimikrobiyal olarak etkili olduğu yapılan bu çalışma ile ortaya konmuştur. Hem antibakteriyal hem de antifungal aktiviteye sahip olması nedeniyle enfeksiyonların tedavisinde yardımcı olarak kullanılabilir. Ayrıca sahip olduğu güçlü antioksidan özellikten dolayı, içecek olarak ya da yiyeceklerde sos olarak kullanımı ile antioksidan savunma sistemimizin serbest radikallerle mücadelesinde katkı sağlayacağı açıktır.

6. KAYNAKLAR

ADEBİSİ, OJOKOH, (2011): "Antimicrobial activities of green and red calyx extracts of *Hibiscus sabdariffa* on some microorganisms" *Journal of Agriculture and Biological Sciences,* 2(2), 038-042

AKKUŞ İ., (1995): "Serbest radikaller ve fizyopatolojik etkileri" Mimoza Yayınları, Konya

AKYÜZ E., (2007): "*Polygonum bistorta* ssp. *carneum* bitki ekstraktının kromotografik yöntemlerle kimyasal bileşiminin belirlenmesi ve antioksidan ve antimikrobiyal aktiviteleri" Yüksek Lisans Tezi, Karadeniz Teknik Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Trabzon

ALİL B. H., WABELL N.A., BLUNDEN G., (2005): "Phytochemical, Pharmacological and Toxicological Aspects of *Hibiscus sabdariffa* L.: A Review." *Phytotheraphy research*, 19, 369–375

ANOKWURU P.C., ESİABA I., AJİBAYE O., ADESUYİ A.O., (2011): "Polyphenolic content and antioxidant activity of *H.sabdariffa* kaliks" *Res. Journal of Medi. Plant,* 5, 557-566

ARDAĞ A., (2008): "Antioksidan kapasite tayin yöntemlerinin analitik açıdan karşılaştırılması" Yüksek Lisans Tezi, Adnan Menderes Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Aydın

ASAGBA S.A., ADAIKPOH M.A., KADIRI H., OBI F.O., (2007): "Influence of Aqueous Extract of *Hibiscus sabdariffa* L. Petal on Cadmium Toxicity in Rats"

BANCİROVA M., (2010): "Comparison of the antioxidant capacity and the antimicrobial activity of black and green tea" *Food Research İnternational*, 43, 1379-1382

BARBOUR E. K., SHARİF M. A., SAGHERİAN V. K., HABRE A.N., TALHOUK R.S., TALHOUK S.N.,(2004): "Screening of selected indigenous plants of Lebanon for antimicrobial activity." *Journal of Ethnopharmacology*, 93, 1–7

BLOIS M.S., (1958): "Antioxidant determinations by the use of stable free radical." *Nature*, 1199-1200

BOĞA M., (2007): "Türkiye'de yetişen Vinca türlerinin antioksidan aktivitelerinin tayini" Yüksek Lisans Tezi, İstanbul Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, İstanbul

BORCHARDT J.R., WYSE D.L., SHEAFFER C.C., KAUPPİ K.L., FULCHER R.G., EHLİKE N.J., BİESBOER D.D., BEY R.F., (2008): "Antimicrobial activity of native and naturalized plants of Minnesota and Wisconsin" *Journal of Med. Plants Res.,* 2, 98-110

BOTTERWECK A. A. M., VERHAGEN H., GOLDBOHM R. A., KLEİNJANS J., BRANDT P. A., (2000): "Intake of butylated hydroxyanisole and butylated hydroxytoluene and stomach cancer risk: results from analyses in the Netherlands cohort study." *Food and Chemical Toxicology*, 38, 599–605

CHANG Y.C., HUANG H.P., HSU J.D., YANG S.F., WANG C.J., (2005): "Hibiscus anthocyanins rich extract-induced apoptotic cell death in human promyelocytic leukemia cells." *Toxicology and Applied Pharmacology*, 205, 201–212

CHANG Y.C., HUANG K.X., HUANG A.C., HO Y.C., WANG C.J., (2006): "Hibiscus anthocyanins-rich extract inhibited LDL oxidation and oxLDL-mediated macrophages apoptosis." *Food and Chemical Toxicology*, 44, 1015–1023

COWAN M.M., (1999): "Plant Products as Antimicrobial Agents"

ÇAKIR A., YILDIRIM S., (2008): "Dentin bağlayıcı sistemlerin antibakteriyel özelliklerinin değerlendirilmesi için kullanılan in vitro yöntemler" *SÜ Dişhek Fak Der*, 17:141-145

ÇELİK A., HERKEN E.N., ARSLAN İ., ÖZEL M.Z., MERCAN N., (2010): "Screening of the constituents, antimicrobial and antioxidant activity of endemic *Origanum hypericifolium* O. Schwatz & P.H. Daviz" *Natural Product Research*, 24, 1568-1577

DAĞCI E. K., DIĞRAK M., (2005): "Bazı Meyve Ekstraktlarının Antibakteriyal ve Antifungal Aktiviteleri." *KSU, Journal of Science and Engineering,* 8(2)

DİRİ M., (2006): "*Coridothymus capitatus* (L.) Reichb. uçucu yağının analizi, su ve etanol ekstraktlarının antioksidant aktivitelerinin belirlenmesi" Yüksek Lisans Tezi, Muğla Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Muğla

EBRAHİMABADİ A.H., BİDGOLİ Z., MAZOOCHİ A., KASHİ F.J., BATOOLİ H., (2010): "Essential oil composition, antioxidant and antimicrobial activity of the leaves and flowers of *Chaerophyllum macropodum* Boiss" Food Control, 21, 1173-1178

ERECEVİT P., (2007): "Tıbbi amaçlar için kullanılan bazı bitki türlerinin antimikrobiyal aktivitelerinin araştırılması" Yüksek Lisans Tezi, Fırat Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Elazığ

ESEN M., (2008): "*Verbascum pinetorum* (Boiss.) O. Kuntze bitki ekstraktının

Antimikrobiyal ve antioksidan aktivitesinin belirlenmesi" Yüksek Lisans Tezi, Mustafa Kemal Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Antakya/Hatay

HACIOĞLU Ö., (2005): "Achillea (Anthemideae) cinsi Filipendulinae ve Santolinoidea seksiyonunlarına ait yedi türün uçucu yağ kompozisyonları ve antimikrobiyal aktivite özellikleri" Yüksek Lisans Tezi, Balıkesir Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Balıkesir

HAYOUNİ E.A., ABEDRABBA M., BOUİX M., HAMDİ M., (2007): "The effects of solvents and extraction method on the phenolic contents and biological activities in vitro of Tunisian Quercus coccifera L. and Juniperus phoenicea L. fruit extracts" *Food Chemistry*, 105, 1126–1134

HALLIWELL B., GUTTERIDGE J.M.C., (1984): "Oxygen toxicity, oxygen radicals, transition metals and disease." *Biochem. J*., 219, 1-14

HALLIWELL B., GUTTERIDGE J.M.C., (1990) "Role of free radicals and catalytic metal ions in human disease: An overview." *In: Methods in Enzymology*, 186, 1-85

HALVORSEN B. L., HOLTE K., MYHRSTAD M.C.W., BARİGMO I., HVATTUM E., REMBERG S.F. vd., (2002): "A systematic screening of total antioxidants in dietary plants" *The Journal of Nutrition*, 132(3), 461-471

HIRUNPANICH V., UTAIPAT A., MORALES N.P., BUNYAPRAPHATSARA N., SATO H., HERUNSALEE A., SUTHISISANG C., (2005): "Antioxidant Effects of Aqueous Extracts from Dried Calyx of *Hibiscus sabdariffa* LINN. (Roselle) *in Vitro* Using Rat Low-Density Lipoprotein (LDL)." *Biol. Pharm. Bull.,* 28(3), 481-484

HOLSER R.A., BOST G., BOVEN M.V., (2004): "Phytosterol Composition of Hybrid *Hibiscus* Seed Oils." *Journal of Agricultural Food Chemistry*, 52, 2546-2548

HU F. B. (2002): "Dietary pattern analysis: A new direction in nutritional epidemiology" *Current Opinion in Lipidology*, 13, 3–9

HUANG D.,OU B., PRIOR R.L., (2005): "The Chemistry behind Antioxidant Capacity Assays" *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53, 1841-1856

İŞBİLİR Ş.S., (2008): "Yaprakları salata baharat olarak tüketilen bazı bitkilerin antioksidan aktivitelerinin incelenmesi." Doktora Tezi, Trakya Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Edirne

KARAMAN İ., ŞAHİN F., GÜLLÜCE M., ÖĞÜTÇÜ H., ŞENGÜL M., ADIGÜZEL A.,(2003): "Antimicrobial activity of aqueous and methanol extracts of *Juniperus oxycedrus* L." *Journal of Ethnopharmacology*, 85 , 231–235

KIRBAĞ S., ZENGİN F., (2006): "Elazığ Yöresindeki Bazı Tıbbi Bitkilerin Antimikrobiyal Aktiviteleri." *Yüzüncü Yıl Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Tarım Bilimleri Dergisi (J. Agric. Sci.),* 16(2): 77-80

KİL H. Y., SEONG E. S., GHİMİRE B. K.,CHUNG I.M., KWON S. S., GOH E. J., HEO K., KİM M. J., LİM J. D., LEE D., YU C. Y., (2009): "Antioxidant and antimicrobial activities of crude sorghum extract." *Food Chemistry*, 115, 1234–1239

LEMAY M.J., CHOQUETTE J., DELAQUİS P.J., GARİEPY C., RODRİGUE N., SAUCİER L., (2002): " Antimicrobial effect of natural preservatives in a cooked and acidified chicken meat model." *International Journal of Food Microbiology*, **78**, 217-226.

LOPEZ-ALARCON C., LISSI E., (2006): "A novel and simple ORAC methodology based on the interaction of Pyrogallol Red with peroxyl radicals" *Free Radical Research*, 40(9), 979-985

MAGANHA E. G., HALMENSCHLAGER R. C., ROSA R. M., HENRİQUES J. A. P., RAMOS P., SAFFİ J., (2010): " Pharmacological evidences for the extracts and secondary metabolites from plants of the genus Hibiscus." *Food Chemistry*, 118, 1–10

MARİ E., (2008): "*Verbascum pinetorum* (Boiss.) O. Kuntze bitki ekstraktının antimikrobiyal ve antioksidan aktivitesinin belirlenmesi" Yüksek Lisans Tezi, Mustafa Kemal Üni. Fen Bilimleri Enstitüsü, Antakya/Hatay

MARTİNEZ L. F., VALLE C.D., FERRİT M. , LUQUE R., (2003): "Study of phenolic compounds as natural antioxidants by a fluorescence method." *Talanta,* 60, 609-616

MATA A.D., PROENC C., FERREİRA A.R., SERRALHEİRO M.L.M., NOGUEİRA J.M.F., ARAUJO M.E.M., (2007): "Antioxidant and antiacetylcholinesterase activities of five plants used as Portuguese food spices" *Food Chemistry*, 103, 778–786

MİLİAUSKAS G., VENSKUTONİS P. R., VAN BEEK T. A., (2004): " Screening of radical scavenging activity of some medicinal and aromatic plant extracts." *Food Chemistry*, 85 (2), 231-237.

MOHD-ESA N., HERN F.S., ISMAİL A., YEE C.L., (2010): "Antioxidant activity different part of Roselle (*Hibiscus sabdariffa* L.) extracts and potential exploitation of the seeds" *Food Chemistry,* 122, 1055-1060

MOTHANAA R. A.A., LİNDEQUİSTB U., (2005): "Antimicrobial activity of some medicinal plants of the island Soqotra." *Journal of Ethnopharmacology* , 96, 177–181

ONAT T., EMERK K., SÖZMEN EY. (Ed.), (2002), İnsan Biyokimyası, Palme Yayıncılık, Ankara

OLİVEİRA I., SOUSA A., FERREİRA I.C.F.R., BENTO A., ESTEVİNHO L., PEREİRA J.A., (2008): " Total phenols, antioxidant potential and antimicrobial activity of walnut (Juglans regia L.) green husks." *Food and Chemical Toxicology,* 46, 2326–2331

OSKAY M., AKTAŞ K., SARI D., AZERİ C., (2007): "*Asphodelus aestivus* (Liliaceae)'un Antimikrobiyal Etkisinin Çukur ve Disk Diffüzyon Yöntemiyle Karşılaştırmalı Olarak Belirlenmesi" Ekoloji Çev. Kor. 16, 62-65

OU B., HUANG D., HAMPSCH-WOODILL M., FLANAGAN J.A., DEEMER E.K., (2002): "Analysis of Antioxidant Activities of Common Vegetables Employing Oxygen Radical Absorbance Capacity (ORAC) and Ferric Reducing Antioxidant Power (FRAP) Assays: A Comparative Study" *Journal of Agricultural and Food Chemistry,* 50*,* 3122-3128

OYAIZU M., (1986): "Studies on product of browning reaction prepared from glucose amine." *Japan Journal of Nutrition*, 44, 307-315

ÖZTÜRK H., (2009): "Jurinea Consanguınea'nın antioksidan ve antibakteriyel aktivitesinin belirlenmesi" Yüksek Lisans Tezi, Trakya Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Edirne

ÖZTÜRK S., ERCİŞLİ S., (2007): "Antibacterial Activity of Aqueous and Methanol Extracts of *Althaea officinalis*. and *Althaea cannabina*. from Turkey" *Pharma. Biology,* 45, 3, 235-240

PAN Y., ZHANG X., WANG H., LIANG Y., ZHU J., LI H., ZHANG Z., WU Q., (2007): "Antioxidant potential of ethanolic extract of Polygonum cuspidatum and application in peanut oil." *Food Chemistry*, 105(4), 1518-1524.

PRASONGWATANA V., WOOTTİSİN S., SRİBOONLUE P.,KUKONGVİRİYAPAN V., (2008): "Uricosuric effect of Roselle (*Hibiscus sabdariffa*) in normal and renal-stone former subjects" *Journal of Ethnopharmacology,* 117, 491–495

PRENESTİ E., BERTO S., DANİELE P.G., TOSO S., (2007): "Antioxidant power quantification of decoction and cold infusions of Hibiscus sabdariffa flowers" Food Chemistry 100, 433-438

SEYYEDNEJAD S.M., KOOCHAK H., DARABPOUR E., MOTAMEDİ H., (2010): "A survey on Hibiscus Rosa-sinensis, Alcea rosea L. and Malva neglegta Wallr as antibacterial agents" *Asian Pacific Journal of Tropical Medicine*, 351-355

SHEWEİTA S.A., ABD EL-GABAR M., BASTAWY M.,(2001): "Carbon tetrachloride changes the activity of cytochrome P450 system in the liver of male rats: role of antioxidants" Toxicology, 169 , 83–92

SILVA B.M., ANDRADE P.B., VALENTA P., FERRERES F., SEABRA R.M., FERREIRA M.A., (2004): "Quince (*Cydonia oblonga* Miller) Fruit (Pulp, Peel, and Seed) and Jam: Antioxidant Activity" *Journal of Agricultural and Food Chemistry.* 52, 4705-4712

SINGLETON VL., ROSSI JA., (1965): "Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents." *American Journal of Enology and Viticulture*, 16, 144-158

TAFAZOLİ S., WRİGHT J.S., O'BRİEN P.J., (2005): "Prooxidant and Antioxidant Activity of Vitamin E Analogues and Troglitazone." *Chemical Research Toxicology*, 18 (10), 1567 -1574

TEMUR N. (2006): "Çam , kavak , söğüt ve armut ağaçları üzerinde yetişen ökse otu (Viscum album l.) bitkilerinin antioksidan aktivitelerinin incelenmesi" Gaziosmanpaşa Üni., Fen Bilimleri Ens., Kimya A.B.D., 52

TEPE B., DAFERERA D., SOKMEN A., SOKMEN M., POLİSSİOU M., (2005): "Antimicrobial and antioxidant activities of the essential oil and various extracts of Salvia tomentosa Miller (Lamiaceae)." *Food Chemistry,* 90, 333–340

TSAİA P. J., MCINTOSHB J., PEARCEB P., CAMDENB B., JORDANC B. R., (2002): "Anthocyanin and antioxidant capacity in Roselle (Hibiscus Sabdariffa L.) extract." *Food Research International*, 35, 351–356

TSENG T. H., KAO E. S., CHU C. Y., CHOU F. P., LİN WU W., WANG C. J., (1997): "Protective effects of dried flower extract of Hibiscus sabdariffa L. against oxidative stress in rat primary hepatocytes." *Food and Chemical Toxicology*, 35, 1159–1164

TSENG T. H., KAO T.W., CHU C.Y., CHOU F.P., LİN W.L., WANG C.J., (2000): "Induction of Apoptosis by *Hibiscus* Protocatechuic Acid in Human Leukemia Cells via Reduction of Retinoblastoma (RB) Phosphorylation and Bcl-2 Expression." *Biochemical Pharmacology*, 60, 307–315

TSENG T. H., LEE Y. J. (2006): "Evaluation of natural and synthetic compounds from East Asiatic folk medicinal plants on the mediation of cancer." *Anti-cancer Agents in Medicinal Chemistry,* 6, 65–347

TOROĞLU S., ÇENET M., (2006): "Tedavi Amaçlı Kullanılan Bazı Bitkilerin Kullanım Alanları ve Antimikrobiyal Aktivitelerinin Belirlenmesi İçin Kullanılan Metodlar." *KSU, Journal of Science and Engineering,* 9(2)

TURKOGLU A., DURU M. E., MERCAN N., KIVRAK İ., GEZER K., (2007): "Antioxidant and antimicrobial activities of Laetiporus sulphureus (Bull.) Murrill" *Food Chemistry*, 101, 267–273

ULUSOY E., KOLAYLI S., SARIKAYA A. O., (2009): "Antioxidant antimicrobial activity of dıfferent floral orıgın honeys from Turkey" *Department of Chemistry Faculty of Arts & Sciences, Karadeniz Technical University 61080 Trabzon, Turkiye*

ÜNAL L., (2006): "Türkiye florasında doğal olarak yetişen bazı bitki türlerinin antimikrobiyal ve antioksidan aktivitelerinin belirlenmesi" Yüksek Lisans Tezi, Atatürk Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Erzurum

VİTAGLİONE P., FOGLİANO V., (2004): "Use of antioxidants to minimize the human health risk associated to mutagenic/carcinogenic heterocyclic amines in food" *Journal of Chromatography B*, 802 , 189–199

YALTIRAK T., ASLIM B., OZTURK S., ALLİ H., (2009): "Antimicrobial and antioxidant activities of Russula delica Fr." *Food and Chemical Toxicology*, 47, 2052–2056

YANG J.H., LİN H.C., MAU J.L., (2002): "Antioxidant properties of several commercial mushrooms" *Food Chemistry*, 77 , 229–235

YI O., JOVEL E. M., TOWERS G.H., WAHBE T.R., CHO D., (2007): "Antioxidant and antimicrobial activities of native *Rosa sp.*from British Columbia, Canada" Int. Jour. of Food Sciences and Nut., 58, 178-189

URL

1. web.mst.edu/microbio/BIO221-205

2. www.allnaturalhealthylife.com

3. www.mikrobiyoloji.org

4. www.mustafaaltınışık.org

5. http://toptropicals.com

6. www.wıkıpedia.org

7. www.epatienthealthcare.com

8. klinikmikro. ppt