



**ZEYTİN (*OLEA EUROPEA* L.) YAPRAĞININ ANTİOKSİDAN
ETKİNLİĞİNİN *İN VİTRO* YÖNTEMLERLE
ARAŞTIRILMASI**

Süleyman Muammer ERDOĞAN

BİYOKİMYA ANABİLİM DALI

YÜKSEK LİSANS TEZİ

DANIŞMAN

Prof. Dr. Gülcan AVCI

2.DANIŞMAN

Prof. Dr. Esra AKKOL

Tez No: 2019-042

2019-AFYONKARAHİSAR

TÜRKİYE CUMHURİYETİ
AFYON KOCATEPE ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**ZEYTİN (*OLEA EUROPEA* L.) YAPRAĞININ
ANTİOKSİDAN ETKİLERİNİN *İN VİTRO*
YÖNTEMLERLE ARAŞTIRILMASI**

Süleyman Muammer ERDOĞAN

**BİYOKİMYA ANABİLİM DALI
YÜKSEK LİSANS TEZİ**

Danışmanlar

**Prof. Dr. Gülcan AVCI
Prof. Dr. Esra AKKOL (2. Danışman)**

**Bu tez Afyon Kocatepe Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon
Birimi tarafından 18. SAĞ. BİL. 30 proje numarası ile desteklenmiştir.
Tez No: 2019-042**

KABUL VE ONAY

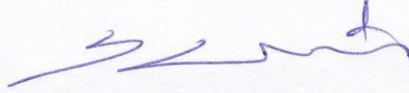
Afyon Kocatepe Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü

Veteriner Biyokimya Programı

Çerçevesinde yürütölmüş bu çalışma, aşğıdaki jüri tarafından

Yüksek Lisans Tezi olarak kabul edilmiştir.

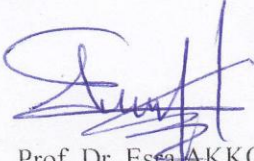
Tez Savunma Tarihi: 20.06.2019



Prof. Dr. Sefa ÇELİK

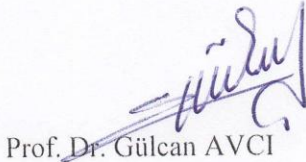
Afyonkarahisar Sağlık Bilimleri Üniversitesi

Jüri Başkanı



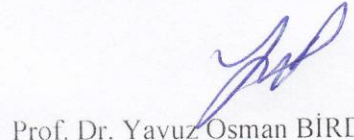
Prof. Dr. Esra AKKOL

Gazi Üniversitesi



Prof. Dr. Gülcan AVCI

Afyon Kocatepe Üniversitesi



Prof. Dr. Yavuz Osman BİRDANE

Afyon Kocatepe Üniversitesi



Doç. Dr. İsmail KÜÇÜKKURT

Afyon Kocatepe Üniversitesi

Biyokimya Anabilim Dalı Yüksek Lisans Öğrencisi Süleyman Muammer ERDOĞAN'ın "Zeytin (*Olea europea L.*) Yaprağının Antioksidan Etkinliğinin *In Vitro* Yöntemlerle Araştırılması" başlıklı tezi günü saat Lisansüstü Eğitim Öğretim ve Sınav Yönetmeliğinin ilgili maddeleri uyarınca değerlendirilerek kabul edilmiştir.

Prof. Dr. Esmâ KOZAN

Enstitü Müdürü

ÖNSÖZ

Yüksek Lisans tez çalışmamın tamamlanmasında, bilimsel deneyimlerinden ve görüşlerinden yararlandığım başta saygıdeğer danışmanım Prof. Dr. Gülcan AVCI ve ikinci danışmanım Prof. Dr. Esra AKKOL olmak üzere, Anabilim Dalımızın değerli öğretim üyeleri; Prof. Dr. Nalan BAYŞU SÖZBİLİR'e, Doç. Dr. A. Fatih FİDAN'a, Doç. Dr. İsmail KÜÇÜKKURT'a, Dr. Öğr. Üyesi Damla ACARÖZ'e ve desteklerini esirgemeyen Araş. Gör. Dr. Barış DENK'e teşekkürlerimi sunarım.

Tez çalışmamda laboratuvar analizlerindeki katkıları nedeniyle Fizyoloji Anabilim Dalı öğretim üyesi Prof. Dr. Aziz BÜLBÜL'e, bitki ekstrelerinin hazırlanmasındaki yardımları için Gazi Üniversitesi Eczacılık Fakültesi öğretim üyesi Doç. Dr. Mert İLHAN'a ve zeytin yapraklarının toplanmasındaki desteklerinden dolayı Selçuk Ticaret Odası Başkanı Veteriner Hekim Sayın Koray YOLCU'ya ve emeği geçen herkese teşekkürlerimi sunarım.

Proje desteği sağlayan Afyon Kocatepe Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi'ne ve özverili destekleri nedeniyle Sağlık Bilimleri Enstitüsü personeline teşekkürlerimi sunarım.

Ayrıca hayatım boyunca maddi manevi tüm desteklerini bana sunan değerli aileme teşekkürlerimi sunarım.

İÇİNDEKİLER DİZİNİ

KABUL VE ONAY	ii
ÖNSÖZ.....	iii
İÇİNDEKİLER DİZİNİ	iv
SİMGELER VE KISALTMALAR	vi
ŞEKİLLER	viii
TABLolar	ix
1. GİRİŞ	1
1.1. Serbest Radikaller	1
1.1.1. Oksijen ve Reaktif Oksijen Türleri (ROT).....	3
1.2. Zeytin ve Zeytin Yaprığı	9
1.2.1. Oleuropein.....	11
2. MATERYAL VE METOT.....	15
2.1. Kullanılan Ekipmanlar	15
2.2. Kimyasal Çözeltiler	15
2.3. Bitki Materyali	18
2.3.1. Ekstrelerin Hazırlanışı.....	18
2.4. <i>İn vitro</i> analizler	19
2.4.1. Toplam Fenolik Madde (TPC) Tayini.....	20
2.4.2. DPPH Radikali Giderme Aktivitesi Tayini.....	21
2.4.3. Linoleik Asit Sisteminde Ferrik Tiyosiyanat (FTC) Metodu ile Antioksidan Aktivitesinin Tayini	21
2.4.4. Demir (II) İyonlarının Şelatlanma Aktivitesinin Tayini	22
2.4.5. Süperoksit Radikali Giderme Aktivitesinin Tayini.....	23
2.4.6. İndirgenme Kapasitesi Tayini	24
2.5. İstatistik Analiz	24
3. BULGULAR.....	25
3.1. Toplam Fenolik Madde (TPC) Düzeyi	25
3.2. DPPH Radikali Giderme Aktivitesi Düzeyi.....	27
3.3. Linoleik Asit Sisteminde Ferrik Tiyosiyanat (FTC) Metodu ile Antioksidan Aktivitesi Düzeyi	28

3.4. Demir(II) İyonlarının Şelatlanması Aktivitesi Düzeyi.....	29
3.5. Süperoksit Radikali Giderme Aktivitesi Düzeyi.....	30
3.6. İndirgenme Kapasitesi	31
4. TARTIŞMA.....	32
5. SONUÇ	38
ÖZET.....	40
SUMMARY	42
KAYNAKLAR	44
ÖZGEÇMİŞ.....	51



SİMGELER VE KISALTMALAR

C: Karbon

Cu: Bakır

DPPH: 1,1-difenil-2-pikrilhidrazil

EDTA: Etilendiamin tetraasetik asit

EtOAc: Etil Asetat

FCR: Folin-Ciocalteu Reaktifi

Fe: Demir

Fe²⁺: Ferri Demir

Fe³⁺: Ferro Demir

FeCl₂: Demir(II)klorür

FeCl₃: Demir(III)klorür

H₂O₂: Hidrojenperoksit

HCl: Hidroklorik asit

HO₂•: Perhidroksil

HOCl: Hipoklorik asit

K₃Fe(CN)₆: Potasyum Ferrosiyanür

KH₂PO₄: Potasyum Fosfat

kj: Kilo Joule

MeOH: Metanol

Mn: Mangan

Mo: Molibden

N: Azot

Na₂CO₃: Sodyumbikarbonat

Na₂HPO₄: Disodyum Fosfat

NADH: Nikotinamid adenin dinükleotit

NBT: Nitrotetrazolium Blue chloride

NO•: Nitrik Oksit

NO₂: Azotdioksit

O: Oksijen

O₂^{•-}: Süperoksit Radikali

•OH: Hidroksil Radikali

ONOO⁻: Peroksinitritin

PMS: Fenazin metasülfat

ROT: Reaktif Oksijen Türleri

S: Kükürt

SOD: Süperoksit Dismutaz

SOR: Serbest Oksijen Radikali

TCA: Trikloroasetik Asit

Tween 20: Polisorbat 20

ŞEKİLLER

Şekil 1.1. Oksijenin suya indirgenmesi ve diğer oksijen türlerinin oluşumu	4
Şekil 1.2. Oleuropein molekül yapısı	11
Şekil 1.3.Oleuropeinin biyosentezi	12
Şekil 3.1.Gallik asit standart grafiği.....	26
Şekil 3.2.Tüm ekstrelerin gallik asit eşdeğeri olan toplam fenolik madde düzeyleri	26
Şekil 3.3.Tüm ekstrelerin DPPH radikali giderme aktivitesi (%) düzeyleri	27
Şekil 3.4.Tüm ekstrelerin Linoleik asit sisteminde ferrik tiyosiyanat (FTC) metodu ile antioksidan aktivitesi (%) düzeyleri.....	28
Şekil 3.5.Tüm ekstrelerin Demir (II) iyonlarını şelatlama aktivitesi (%) düzeyleri	29
Şekil 3.6.Süperoksit radikali giderme aktivitesi (%) düzeyleri	30
Şekil 3.7.İndirgenme kapasitesi absorbands değeri sütun grafiği	31
Şekil 3.8.İndirgenme kapasitesi absorbands değerleri	31

TABLÖLAR

Tablo 1.1.Serbest radikaller	5
Tablo 3.1.Tüm ekstrelerin çeşitli antioksidan aktivite düzeyleri ^{a,b,c,d,e,f} Aynı sütündaki farklı harfler ortalama değer arasındaki istatistiki farkı göstermektedir. (***) P<0,001.....	25



1. GİRİŞ

Zeytin ağacı *Oleaceae* familyasından olup etimolojik olarak Latince *olea*, Yunanca *elaia*'dan gelmektedir (Kaplan ve Karagöz Arıhan, 2011). Zeytin bitkisi yaprak dökmez, ilkbahar aylarında çiçek açmaktadır. Zeytin Akdeniz havzasında hem kültürel hem de ekonomik öneme sahiptir (Harp, 2011).

Zeytin hasatından sonra genellikle atık madde olarak görülen zeytin yapraklarının pek çok fenolik bileşik içerdiği ve bu fenolik madde içeren yaprakların antibakteriyel, antifungal ve antioksidan özelliklere sahip olduğu belirtilmektedir (Ferreira ve ark, 2007). Zeytin yapraklarının antioksidan özellikleri ve doğal bir besin olmasından dolayı direk olarak kullanılabilirdiği için ticari bir öneme de sahiptir (Papoti ve Tsimidou, 2009; Suarez ve ark., 2010).

Zeytin yaprağı içerisinde antibakteriyel, antifungal ve antioksidan özellik gösteren fenolik bileşikler (tirozol, hidroksitirozol, gallik asit, kumarik asit, kafeik asit, ferulik asit) olarak flavonoidler (kersetin, kateşin, apigenin, luteolin) ve sekoiridoidler (oleuropein, ligstrosit) bulunmaktadır (Dekanski ve ark. 2009, Talhaoui ve ark., 2015). Bunlar arasında zeytin yaprağında en çok bulunan bileşik oleuropeindir (Ötleş ve Özyurt, 2012).

1.1. Serbest Radikaller

Elektronlar çekirdeğin etrafında orbitallerde hareket halindedir. Elektronlar birbirine zıt yönde hareket edecek şekilde her yörüngede en fazla iki tane bulunurlar. Dış

orbitalerde ortaklanmamış elektron bulunması durumunda serbest radikal olarak tanımlanır. Ortaklanmamış elektron bulunduran moleküller oldukça kolay reaksiyona girerler (Halliwell ve Gutteridge, 1990).

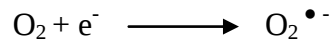
Kimyasal reaksiyonlar ile fiziksel faktörler, ortamda ve hücre içerisinde sürekli olarak radikal yapımına neden olmaktadır. Üç mekanizma üzerinden serbest radikal yapılmaktadır (Akkuş, 1995; Onat ve ark. 2002).

1) Kovalent bağların homolitik kırılması: Kovalent bağın kırılması ile ortaklanmış elektronlar bileşiği oluşturan atomlar tarafından paylaşılır.



2) Molekülün elektron kaybetmesi: Ortaklanmamış elektron çifti bulunan bir molekülün dış orbitalinden bir elektron vererek elektron kaybına uğraması sonucu, ortaklanmamış elektronu bulunursa radikal forma geçer.

3) Normal bir moleküle tek bir elektron transferi: Ortaklanmamış elektron çifti bulunmayan bir molekülün dış orbitaline bir elektron alarak, elektron kazanması sonucu molekül indirgenir ve dış orbitalinde ortaklanmamış elektron bulunur. Bu indirgenme sonucu molekül radikal forma geçer.



Serbest radikaller pozitif yüklü, negatif yüklü ve nötral olmaktadır. En önemli radikaller, serbest oksijen radikalleri (SOR) olmakla birlikte; C, N, S türevi olan radikaller ve inorganik moleküller de serbest radikallerdir. Cu^{2+} , Fe^{3+} , Mn^{2+} , Mo^{5+}

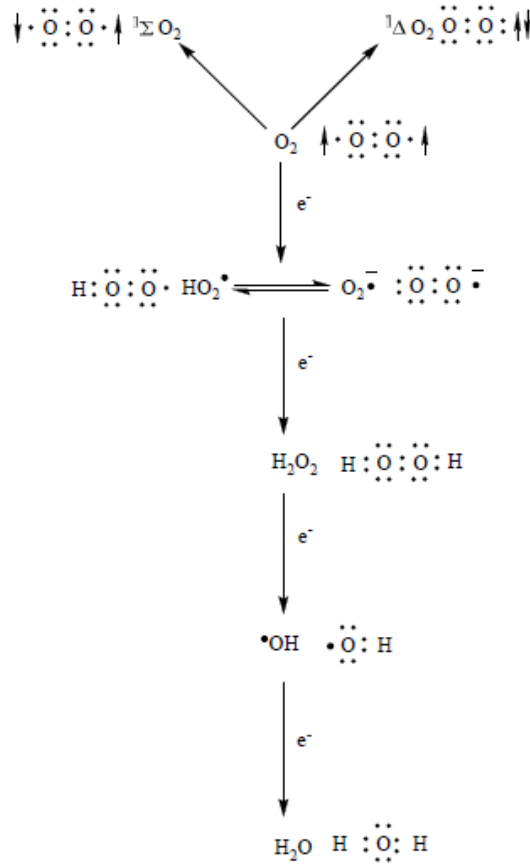
gibi geçiş metalleri radikal olarak kabul edilmezler. Bu geçiş metali iyonları, reaksiyonları katalizlediklerinden dolayı serbest radikal oluşumunda önemli rol oynarlar (Akkuş, 1995).

1.1.1. Oksijen ve Reaktif Oksijen Türleri (ROT)

Oksijen molekülü (O_2), molekülün paramanyetik özellikte olmasından dolayı kovalent bağ içerse bile ortaklanmamış elektron çifti içermektedir. Molekülün en düşük enerji seviyesi en dış orbital grubunda bulunan elektronların aynı yönde farklı orbitallerde olduğu durumdadır (Lee, 1991). Oksijen diradikal olarak sınıflandırılmıştır. Diradikal oksijen, spin sınırlandırılmasından dolayı radikal olmayan moleküllerle yavaş tepkime verirken, serbest radikallerle çok daha hızlı tepkime verir (Akkuş, 1995).

Organizma içerisinde bulunan geçiş metalleri içeren enzimler oksijen molekülüne elektron vererek oksidasyon tepkimesi meydana getirirler. Moleküler oksijenin aktivitesinin arttırmanın bir diğer yolu ise enerji absorpsiyonu ile oksijeni uyarmaktır (Halliwell ve Gutteridge, 1990).

Oksijen ile metabolik reaksiyonlar sonucu oksijen radikalleri oluşur. Oksijen radikalleri metabolizmasındaki en önemli serbest radikallerdir. Süperoksit radikali ($O_2^{\bullet-}$), hidroksil radikali ($^{\bullet}OH$) ve radikal olmadığı halde hidrojen peroksit (H_2O_2) en önemlileridir ve reaktif oksijen türleri (ROT) olarak adlandırılırlar (Şekil 1.1).



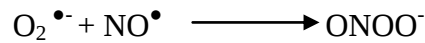
Şekil 1.1. Oksijenin suya indirgenmesi ve diğer oksijen türlerinin oluşumu

Serbest radikal tepkimelerini reaktif oksijen türleri başlatabilir. Metabolizmadaki merkez atomu karbon (C) olan radikaller, peroksit radikalleri, alkoksi radikalleri, tiyil radikalleri, sülfenil radikalleri serbest radikallerin oluşmasına neden olurlar (Akkuş, 1995).

Tablo 1.1. Serbest radikaller (Halliwell, 1994)

Adı	Formülü	Tanımı
Hidrojen atomu	H•	En basit serbest radikal
Süperoksit	O ₂ • ⁻	Oksijen merkezli radikal, seçimli reaktif
Hidroksil	•OH	En fazla reaktif oksijen radikali. İnsan vücudundaki tüm moleküllere saldırır.
Triklorometil	CCl ₃ •	C merkezli radikal, CCl ₄ metabolizması sonucu üretilir ve genellikle O ₂ ile hızla reaksiyona girer.
Tiyil	RS•	Kükürt üzerinde eşleşmemiş elektron bulunduran türlerin genel adı
Peroksil, Alkoksil	RO ₂ •, RO•	Organik peroksitlerin yıkımı sırasında oluşan oksijen merkezli radikaller.
Nitrik oksit	NO•	L-arginin amino asidinden in vivo koşullarda üretilir.
Azotdioksit	NO ₂ •	NO•'nın O ₂ ile reaksiyonunda oluşur. Kirli hava, sigara dumanında vb. bulunur.
Hidrojen peroksit	H ₂ O ₂	Reaktivitesi en düşük, moleküler hasar yeteneği düşük.
Singlet oksijen	¹ O ₂	Oksijenin güçlü oksidatif formu

Reaksiyona girme hızı, reaksiyona giren reaktiflere bağlıdır. İki radikal reaksiyona girdiğinde ortaklanmamış elektronları çiftlenerek kovalent bağ oluştururlar. Oluşan yeni bileşikte reaksiyona girmek için aktif olabilir. NO• ile O₂•⁻ reaksiyonu sonucu aktif ürün olarak nonradikal olan peroksinitrit örnek gösterilebilir;



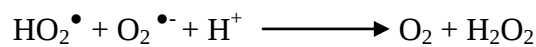
Radikaller, radikal olmayan reaktiflerle reaksiyona girerek bunun sonucunda farklı bir radikal ürün meydana gelebilir. Biyolojik moleküllerin çoğunluğu radikal olmadıklarından dolayı, *in vivo* şartlarda radikalın oluşumu çoğunlukla zincirleme tepkimelere neden olmaktadır (Nehir El ve ark., 1999).

1) Süperoksit radikali ($O_2^{\bullet-}$): Aerobik hücrelerde indirgenme reaksiyonuyla beraber oksijen bir elektron alır ve süperoksit radikali meydana gelir. Genel olarak süperoksit radikalının meydana geldiği yollar;

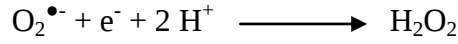
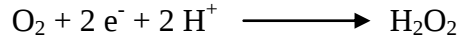
- Aerobik olarak redükte flavinler, katekolaminler, tiyoller, hidrokinonlar, tetrahidrofolatların otooksidasyonu ile süper oksitler meydana gelir.
- Etkin hale gelmiş fagositik hücreler, bakteri ve virüslerin etkinliğini azalmak için süperoksit sentezlerler.
- Mitokondride kullanılan oksijenin yaklaşık %3'ü elektron sızıntısından dolayı süperoksit radikale dönüşür.
- İndirgenmiş B grubu metallerin otooksidasyonu sonucu süperoksit radikali oluşur (Halliwell ve Gutteridge, 1990; Halliwell, 1994).



B grubu metallerini indirgemesi ve hidrojen peroksit (H_2O_2) kaynağı olmasından ötürü süperoksit radikali oldukça önemlidir. Bununla beraber hücre içerisinde sentezlenen süperoksit radikali hem indirgen hem de yükseltgen özellik gösterebilir. Buna göre ferrisitokrom c ile tepkimesinde süperoksit radikali indirgen olarak görev alır ve oksijene dönüşür. Epinefrin ile tepkimesinde ise durum tam tersi olarak işler ve yükseltgen olarak bir elektron alıp hidrojen peroksiti (H_2O_2) oluşturur (Akkuş, 1995). Asidik ortamlarda süperoksit radikali daha aktiftir, bu durumlarda proton alarak perhidroksil radikali ($HO_2^{\bullet}$) oluşur. Süperoksit radikali ile perhidroksil radikali tepkimeye girdiğinde ise biri yükseltgenirken diğeri indirgenir. Dismutasyon tepkimesinden dolayı hidrojen peroksit (H_2O_2) meydana gelir.

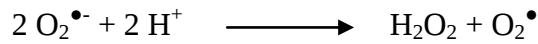


2) Hidrojen peroksit (H₂O₂): Oksijen molekülünün bir elektron çifti alması ya da süperoksit radikalının indirgenmesi ile H₂O₂ meydana gelir.

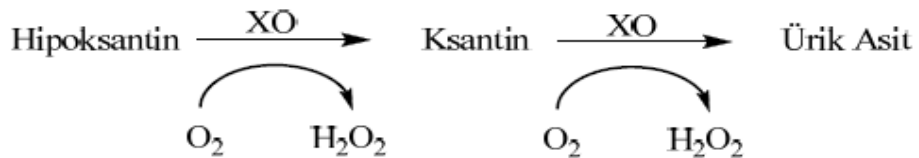


Ortaklanmamış elektron çifti bulunmadığı için radikal değildir fakat hücre membranından geçebildiği için oksidandır (Helliwell ve Gutteridge, 1990; Halliwell, 1994).

Metabolizma içerisinde H₂O₂'in sentezi süperoksit radikalının enzimatik olmayan yollarla ya da süperoksit dismutaz (SOD) enzimini tepkimeyi katalizlemesi sonucu oluşur.

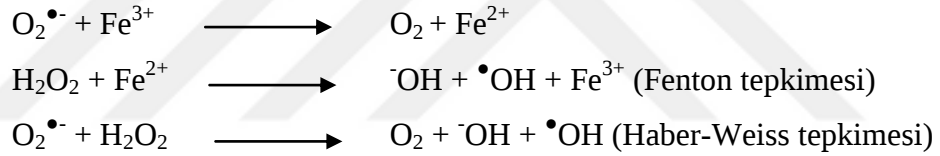


Süperoksit dismutaz haricinde aminoasit oksidaz, ksantin oksidaz (XO) gibi oksidaz özellikli enzimlerin tepkimeleri sonucu hücre içerisinde H₂O₂ sentezlenir (Murray ve ark., 1996).



H₂O₂ serbest radikal olmadığı halde ROT içerisinde sınıflandırılmıştır ve serbest radikaller arasında önemli bir yere sahiptir. H₂O₂ B grubu metallerin bulunduğu ortamda Fenton tepkimesi ve süperoksit radikalinin bulunduğu ortamda Haber-Weiss tepkimesi ile oldukça aktif ve yıkıcı olan hidroksil radikaline dönüşür (Halliwell ve ark., 2000).

Haber-Weiss tepkimesi süperoksit ile H₂O₂ arasında gerçekleşen bir tepkimedir ve tepkime hızı katalizörsüz ortamda çok yavaştır. Tepkime demir katalizörlüğünde ilerlediğinde ise yüksek hızda gerçekleşir. Bu tepkimede ferri (Fe³⁺) iyonu, ferro (Fe²⁺) iyonuna süperoksit vasıtasıyla indirgenir. Tepkimenin devamında Fenton tepkimesi ile H₂O₂ hidroksit (⁻OH) ve hidroksil ([•]OH) radikaline ayrılır. Tepkimenin mekanizması;



3) Hidroksil radikali ([•]OH): B grubu metallerin bulunduğu ortamda H₂O₂'in Fenton tepkimesi sonucu indirgenmesiyle meydana gelir. Radikal oksijen türleri arasında en aktif ve zararlı radikaldir. Yarılanma süresi kısa olduğu halde biyolojik her madde ile reaksiyona girer ve oldukça fazla zarara neden olur (Akkuş, 1995; Halliwell ve Gutteridge, 1990).

4) Singlet oksijen: Oksijen molekülünün enerji alarak elektronlarının dönüş yönünün tersi yönde farklı orbitale geçmesiyle singlet oksijen meydana gelir. Singlet oksijenin eşleşmiş elektron çiftine sahip olduğu için radikal olarak sınıflandırılmaz ama oldukça aktif bir moleküldür (Akkuş, 1996). Sigma ve delta olarak adlandırılan iki formu vardır. Sigma formunun enerji düzeyi 155 kj, delta formunun enerji düzeyi

92 kJ olduğu için delta formunun yarılanma süresi daha fazladır (Cotton ve Wilkinson, 1988).

5) Hipoklorik asit (HOCl): Serbest radikal olmamasına rağmen oksitleme ve klorlama ajanıdır. Ölümlere, hücre deformasyonlarına ve hücre zarında deformasyona neden olduğu bildirilmektedir (Carr ve ark., 1996).

6) Nitrik oksit (NO[•]): Fizyolojide mühim bir yere sahip çözünebilen, hücrel deformasyonlara sebep olan serbest radikaldir. Oksijen ile yüksek hızda tepkimeye girerek, zehirli olan NO₂ oluşabilir (Ignarro ve ark., 1987; Palmer ve ark., 1988; Sneddon ve Vane., 1988; Halliwell, 1994; Murray ve ark., 1996).

Nitrik oksit serbest radikali metabolizma içerisinde önemli bir yere sahiptir. NO[•] hücre içerisindeki reseptöre stimülatör bağlanması ya da nöronlardaki uyarılar nedeniyle sentezlenir. NO[•] histamin gibi reseptörlerin aktif hale gelmesi ile oksijen ve L-arjininden, ortamda nitrik oksit sentaz (NOS) varlığında sentezlenir. NO[•] süperoksit radikali ile tepkimesinden peroksinitrit meydana gelir ve NO[•]'in etkisi azaltılmış olur (Halliwell, 1994; Murray ve ark., 1996).

1.2. Zeytin ve Zeytin Yaprağı

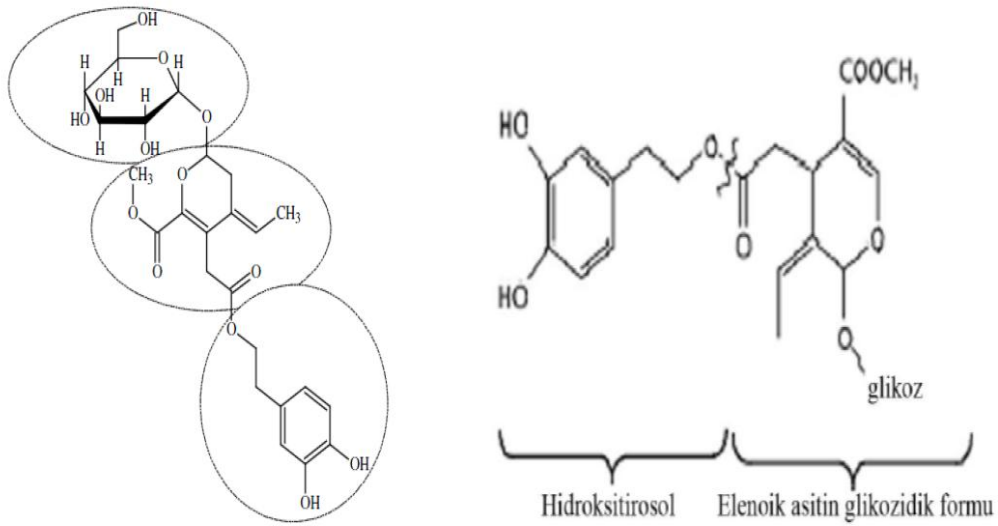
Zeytin (*Olea europaea* L.), Oleaceae familyasından meyvesi yenen Akdeniz iklimine özgü bir ağaç türü olup adının kökeni Yunanca *elaia*, Latince *olea*'dan gelmektedir. Genellikle 300-400 yıl yaşayan ve boyu genellikle 10 m civarında olan ağacın meyveleri önceleri yeşil olgunlaştıkça mor bir renge dönüşmektedir (Kaplan ve Karagöz Arıhan, 2011). Dikimi çok eski zamanlardan beri yapılan zeytin ağacı,

günümüzde zeytin ve zeytinyağı halinde yemeklerde, dini törenlerde, yağ lambalarında, kozmetik malzemesi olarak ve masaj yağı olarak kullanılmaktadır (Nontokozo ve Simelane, 2017). Dünyada en fazla zeytin üretimi yapan 4. ülke konumundaki Türkiye ekonomisi için de zeytin önemli bir bitkidir (Keser ve Bilal, 2010). Zeytinin meyvesi dışında yapraklarının kurutulduktan sonra ruminantlar için düşük kaliteli kaba yem olarak kullanılabileceği bildirilmiştir (Amici ve ark., 1991). Yağı çıkarıldıktan sonra geriye kalan çekirdek, kabuk ve posadan oluşan pirinasının içerdiği yüksek orandaki ham selüloz, tanen ve fenolik bileşiklerin, rumen mikroorganizmalarının selüloolitik aktivitesi üzerine olumsuz etkileri olduğu ancak düşük besleyici değeri olan yemlerden yüksek düzeyde yararlanabilme yeteneğine sahip koyun gibi ruminantların bundan yararlanabileceği de belirtilmektedir (Lanzani ve ark., 1993). Buna göre zeytin yaprakları ve pirinanın belirli oranlarda kullanıldığında ruminantlar için alternatif bir yem maddesi olabilir (Keser ve Bilal, 2010).

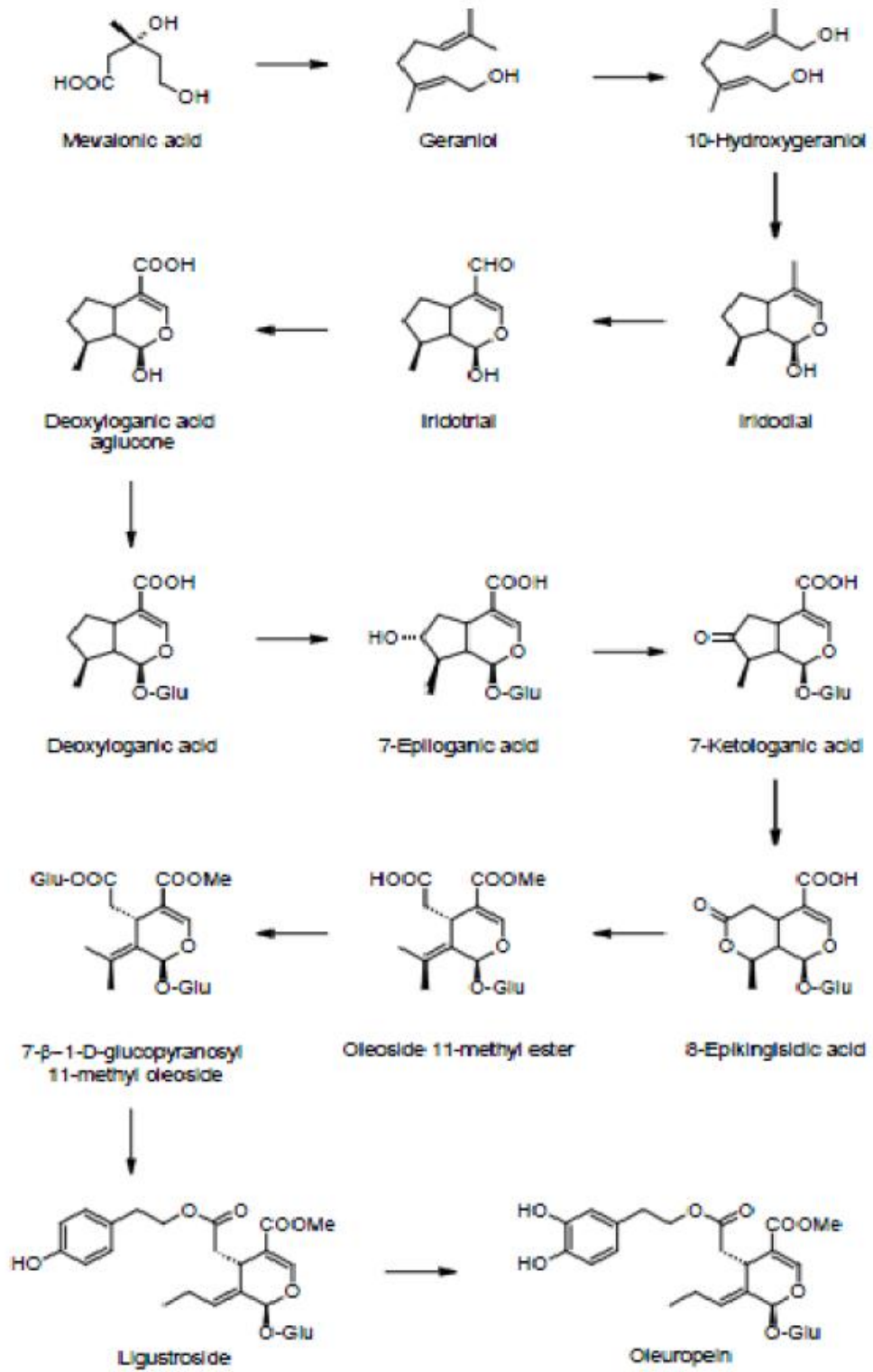
Besin içeriği açısından değerli bir bitki olan zeytinin kimyasal bileşiminde su (%50), yağ (%22), protein (%1,6), şeker (%19,1), selüloz (%5,8) ve mineral maddeler (%1.5), hidrokarbonlar, tokoferoller ve polifenoller bulunmaktadır (Kiritsakis, 1998). Zeytinin toplanması esnasında ağacın bir yan ürünü olarak ortaya çıkan ve genellikle yakılan zeytin yaprağı ise oldukça fonksiyonel değere sahip olan biyoaktif maddelerden fenolik bileşikler (tirozol, hidroksitirozol, gallik asit, kumarik asit, kafeik asit, ferulik asit), flavonoidler (kersetin, kateşin, apigenin, luteolin) ve sekoiridoidler (oleuropein, ligstrosit) içermektedir (Dekanski ve ark. 2009, Talhaoui ve ark., 2015). Zeytin meyvelerinin acı ve buruk aromasına neden olan oleuropein zeytin ağacının ana bileşenidir (Silva ve ark., 2006). İridoid monoterpen olan oleuropein, elenoik asit ve hidroksitirozolün glukosidik esteridir. Oleuropein zeytin meyvesinin bütün kısımlarında bulunmasına karşın zeytin ağacı yapraklarında oranı daha fazladır. Oleuropeinin miktarı olgunlaşmamış zeytinde fazla iken olgunlaştıkça miktarı giderek azalmaktadır (Yıldız ve Uylaşer, 2011).

1.2.1. Oleuropein

Oleuropein gentianales, oleaceas ve cornales gibi bitkilerde bulunan sekoiridoidlerdir (Soler-Rivas ve ark., 2000; Cashas- Sanchez, ve ark., 2007). Zeytin ağacının (*Olea europea*) ana biyoaktif bileşenidir. Oleuropein üç yapıdan oluşur; polifenol olan hidroksitirozol (4-(2-hidroksiethyl) benzen-1,2-diol), sekoiridoid olan glukoz ve elenolik asitdir (Şekil 1.2.) (Boudhrioua ve ark., 2009; Briante ve ark. 2000; El ve Karakaya, 2009; Ferreira ve ark., 2007 ; Gikas ve ark., 2007; Jemai ve ark., 2009). Oleuropeinin zeytindeki biyosentezi Şekil 1.3'de gösterilmiştir (Damtoft ve ark., 1995).



Şekil 1.2. Oleuropeinin molekül yapısı (Gikas ve ark., 2007)



Şekil 1.3. Oleuropeinin biyosentezi (Domtoft ve ark., 1995)

Zeytin meyvesi olgunlaştıkça oleuropein miktarı azalmaktadır ancak serbest komponenti hidroksitirozol miktarı artmaktadır (Basmacıoğlu-Malayoğlu ve Aktaş, 2011). Meyve tamamen olgunlaşıp siyaha döndüğünde oleuropein miktarı azalırken bunun yerine dimetiloleuropein, elenolik asit ve oleuropein glukosilat türevleri artar. Siyahlaşma bittiğinde ise oleuropein yerine dimetiloleuropein ana bileşen olmaktadır (Omar, 2010). Oleuropein miktarı ayrıca hasat zamanına, yıllara, zeytin ağacının yetiştiği bölgeye, ağacın cinsine ve yaprağın özelliklerine göre farklılık göstermektedir. Ayrıca ekstre işleminde kullanılan metot, parçalama, kurutma, sıcaklık ve organik çözücü gibi değişkenlerde oleuropein miktarını değiştirmektedir (Bayrak ve ark, 2010; Tsimidou ve Papoti, 2010).

Oleuropeinin antioksidan etkisine bakıldığında; serbest radikalleri inhibe etmesi, bakır (Cu) ve demir (Fe) gibi iyonlarla bağ kurmasıyla lipoksigenaz enzimi gibi inflamatuvar enzimlerin etkinliğini azaltmasına dayanmaktadır (Omar, 2010).

Oleuropeinin antioksidan, antimikrobiyal, antiviral, antiinflamatuvar, antiaterojenik, parkinson ve alzheimer hastalığında, kansere karşı koruyucu, yaşlanma karşıtı, deri koruyucu etkileri yanında kalp koruyucu ve hipolipidemik etkileri de bulunmaktadır (Ferreira ve ark., 2007; Omar, 2010; Barbora ve ark., 2014). Oleuropeinin antioksidan etkisi, serbest radikal oluşumunu engelleyerek +2 değerlilikte metal iyonlarıyla bağ oluşturmada bu bağın lipoksijenaz gibi inflamatuvar enzimlerin aktivitesini baskılamasından kaynaklanmaktadır (Omar, 2010). Spesifik olarak zeytin yaprağı Türkiye'de sıklıkla tüketilmese de Avrupa'da sindirim, böbrek-idrar, kalp-damar, yüksek tansiyon ve idrar güçlüğü rahatsızlıklarında kullanılmaktadır (Kaplan ve Karagöz Arıhan, 2011). Özellikle zeytin yaprağının uzun yıllar sıtma ve ateşli hastalıkların tedavisinde kullanıldığı, yapraktaki oleuropeinin antioksidan olması yanında virüs, bakteri, küf, mantar ve parazitlere karşı antimikrobiyal etkiye sahip olduğu bildirilmektedir (Benavente-Garcia ve ark., 2000). Bunun yanı sıra zeytin yaprağı ekstresinin toksik etkilerinin belirlenmesi amacıyla yapılan çalışmalarda farelerde akut veya kronik etkileri, farelerin üreme ve hamilelik dönemleri üzerine

veya genetik yapılarına etkileri ayrı ayrı incelenmiş ve belirgin hiçbir toksik etki tespit edilmemiştir (Christian ve ark., 2004). Aynı zamanda biyolojik değeri olan zeytin yapraklarının doğal, güvenli ve ucuz bir alternatif antioksidan kaynağı olduğu hatta antimikrobiyel etkileri ve lipid oksidasyonunu engellemesi nedeniyle besinlerde raf ömrünü uzatma özelliğinin olduğu bildirilmektedir (Jemai ve ark., 2009; Boudhrioua ve ark., 2009; Bouaziz ve ark., 2010).

Bu çalışmada, ülkemizde doğal olarak yetişen ve biyoaktif maddeler açısından değerli bir bitki olan zeytin yaprağının belirlenecek olan antioksidan özellikleri ile besin olarak tüketimindeki yeri, önemi ve farklı alanlardaki kullanım alanları genişletilmiş olacaktır.

Antienflamatuvar, antiallerjik, antibakteriyel, antimikotik, immunoregulator, antidiyabetik ve hipolipemik (Omar, 2010) etkileri olduğu bildirilen zeytinin değişik biyolojik etkilerinin ortaya konmasına yönelik çalışmalar sınırlı sayıda olsa da, zeytin hasatından sonra geri kalan ve yakılarak yok edilen zeytin yaprağının *in vitro* ya da *in vivo* etkilerine yönelik çalışmalar oldukça yetersizdir. Bu tez kapsamında geniş bir fenolik madde içeriği olan ve biyolojik açıdan oldukça değerli olmasına rağmen kullanım alanı ülkemizde pek yaygın olmayan zeytin yaprağından elde edilen metanol, etil asetat ve n-hekzanlı ekstraktların antioksidan aktivitelerinin çeşitli *in vitro* yöntemlerle belirlenmesi amaçlanmıştır.

2. MATERYAL VE METOT

2.1. Kullanılan Ekipmanlar

Deneylerde su banyosu (Termal J11540K), vortex (Velp Scientifica RX3), inkübatör (Nüve EN400), pH-metre (WTW - pH 330), analitik terazi (Ohaus-Adventurer Pro AV264C 0,0001 g'a duyarlı, Kern-PCB 200-2 0,01 g'a duyarlı), santrifüj (Orto Alresa Digicen 21R), rondo (sinbo ev tipi rondo), mikropipetler (VWR – Starter Kit tek kanallı pipet; 0,5-10µl/10-100µl/100-1000µl hacimlerinde), ELISA mikrolekt okuyucu (Fisher Scientific – accuSkan – FC Filter-Based), mikro lekt (Greiner Bio-One, 96 kuyucuklu), manyetik ve ısıtıcı karıştırıcı (Velp Scientifica) başlıca kullanılmıştır.

2.2. Kimyasal Çözeltiler

Deneylerde kullanılan kimyasal maddeler analitik saflıkta olup Sigma-Aldrich ve Merck'den satın alınmıştır.

1mM DPPH çözeltisi

0,0493 gr DPPH (1,1-difenil 2-pikrilhidrazil) etanolde çözülmüş ve 250 mL'ye balon jojede tamamlanmıştır.

0,1 nM DPPH çözeltisi

1 mM DPPH çözeltisinden 5 mL alınarak balon jojede etanolle 50 mL'ye tamamlanmıştır.

Folin-Ciocalteu Reaktifi

Ticari satılan Folin-Ciocalteu reaktifi kullanılmıştır.

%3,5'luk HCl çözeltisi

4,73 mL derişik HCl çözeltisi distile su ile balon jodede 50 mL'ye tamamlanmıştır.

20 mM FeCl₂ çözeltisi

0,1267 gr FeCl₂ %3,5'luk HCl çözeltisiyle balon jodede 50 mL'ye tamamlanmıştır.

%30'luk NH₄SCN çözeltisi

15 gr NH₄SCN distile suda çözüldükten sonra 50 mL'ye tamamlanmıştır.

0,04 M fosfat tamponu çözeltisi (pH=7)

Na₂HPO₄ (7,12 g/L) ve KH₂PO₄ (5,44 g/L) çözeltilerinin karışımları pH=7 oluncaya kadar karıştırılmıştır.

Linoleik asit emülsiyonu

87,5 mg Tween 20 ve 77,5 µL linoleik asit 0,04 M pH=7 olan fosfat tamponu ile 25 mL'ye tamamlanmıştır.

0,1 M fosfat tamponu çözeltisi (pH=7,4)

Na₂HPO₄ (17,799 g/L) ve KH₂PO₄ (13,609 g/L) çözeltilerinin karışımları pH= 7,4 oluncaya kadar karıştırılmıştır.

40 mM H₂O₂ çözeltisi

0,2045 mL H₂O₂ 0,1 M pH=7,4 olan fosfat tamponu ile 50 mL'ye tamamlanmıştır.

468 µM NADH çözeltisi

0,0347 gr NADH 0,1 M pH=7,4 olan fosfat tamponunda 100 mL'ye tamamlanmıştır.

156 µM NBT çözeltisi

0,0127 gr NBT 0,1 M pH=7,4 olan fosfat tamponunda 100 mL'ye tamamlanmıştır.

60 µM PMS çözeltisi

0,0009 gr PMS 0,1 M pH=7,4 olan fosfat tamponunda 50 mL'ye tamamlanmıştır.

%1'lik K₃Fe(CN)₆ çözeltisi

0,5 gr K₃Fe(CN)₆ distile suda çözüldükten sonra 50 mL'ye tamamlanmıştır.

2 mM FeCl₂ çözeltisi

0,0127 gr FeCl₂ distile suda çözüldükten sonra 50 mL'ye tamamlanmıştır.

5 mM Ferrozin çözeltisi

0,0308 gr ferrozin distile suda çözüldükten sonra 12,5 mL'ye tamamlanmıştır.

% 0,1'lik FeCl₃ çözeltisi

0,05 gr FeCl₃ distile suda çözüldükten sonra 50 mL'ye tamamlanmıştır.

% 2'lik Na₂CO₃ çözeltisi

1 gr Na₂CO₃ distile suda çözüldükten sonra 50 mL'ye tamamlanmıştır.

% 10'luk TCA çözeltisi

5 gr TCA Distile suda çözüldükten sonra 50 mL'ye tamamlanmıştır.

0,2 M fosfat tamponu (pH=6,6)

Na₂HPO₄ (35,598 g/L) ve KH₂PO₄ (27,218 g/L) çözeltilerinin karışımları pH= 6,6 oluncaya kadar karıştırılmıştır.

% 75'lik Etanol

195,3 mL etanol distile suda 250 mL'ye tamamlanmıştır.

2.3. Bitki Materyali

Memecik türüne ait *Olea europaea* L. yaprakları İzmir ili Selçuk ilçesinden 2017 yılında Aralık ayının ilk haftasında toplanmış ve gölgede kurutulduktan sonra toz haline getirilerek kullanılmıştır. Herbaryum örneği, Gazi Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü'nden Prof. Dr. Mecit VURAL tarafından tayin edilmiştir.

2.3.1. Ekstrelerin Hazırlanışı

n-Hekzan ekstresinin Hazırlanışı:

Toz haline getirilen bitki materyalinden 400 g tartılarak günde 2 litre n-hekzan'da bekletilerek ve her gün süzülme suretiyle 5 gün boyunca ekstre edildi. Elde edilen ekstreler birleştirilerek rotavaporda 40 °C'de alçak basınç altında yoğunlaştırıldıktan sonra vakumlu desikatöre konularak ekstrenin tamamen kuruması sağlandı. Elde edilen n-hekzan ekstresi için verim % 13,21 olarak belirlendi.

Etil asetat ekstresinin hazırlanışı:

n-hekzan ekstresi elde edildikten sonra kalan bakiye günde 2 litre etil asetat içerisinde bekletilerek ve her gün süzülme suretiyle 5 gün boyunca ekstre edildi. Elde edilen ekstreler birleştirilerek rotavaporda 40 °C'de alçak basınç altında yoğunlaştırıldıktan sonra vakumlu desikatöre konularak ekstrenin tamamen kuruması sağlandı. Elde edilen etil asetat için verim % 26,15 olarak belirlendi.

Metanol ekstresinin hazırlanışı:

Metanol ekstresi elde edildikten sonra kalan bakiye günde 2 litre metanol içerisinde bekletilerek ve her gün süzölmek suretiyle 5 gün boyunca ekstre edildi. Elde edilen ekstreler birleştirilerek rotavaporda 40 °C’de alçak basınç altında yoğunlaştırıldıktan sonra vakumlu desikatöre konularak ekstrenin tamamen kuruması sağlandı. Elde edilen metanol için verim % 34.59 olarak belirlendi.

Elde edilen ekstrelerden 1000 µg/ml konsantrasyonlarında stok çözeltiler hazırlanarak diğer konsantrasyonlar bu stok çözeltilerden seyreltilerek hazırlandı. *In vitro* deneyler yapılmaya kadar ekstreler +4°C’de buzdolabında saklandı.

2.4. *In vitro* analizler

In vitro analizleri yapılacak olan metanol, etil asetat ve n-hekzanlı ekstrelerin her biri kendi çözücüsünde 1000 µg/ml olacak şekilde çözüldü. Bu stok çözeltiler kendi çözücülerini ile seyreltilerek aşağıda belirtilen konsantrasyonlar hazırlandı. Buna göre antioksidan etkinliği test edilecek olan gruplar;

- Grup metanol: 100,250,500,1000 µg ekstre/ml metanol
- Grup etil asetat: 100,250,500,1000 µg ekstre/ml etil asetat
- Grup n-hekzan: 100,250,500,1000 µg ekstre/ml n-hekzan olarak hazırlandı.

Belirtilen zeytin yaprağı ekstrelerinin her bir konsantrasyonunda toplam fenolik madde tayini (Singleton ve Rossi, 1965), DPPH radikali giderme aktivitesinin tayini (Blois, 1958), demir (II) iyonlarını şelatlama aktivitesinin tayini (Dinis ark., 1994), süperoksit radikali giderme aktivitesi tayini (Nishikimi ark., 1972), Linoleik asit

sisteminde ferrik tiyosiyanat (FTC) metodu ile antioksidan aktivitesinin tayini (Pan, 2007) ve indirgeme kapasitesi tayini (Oyaizu, 1986) bildirilen yöntemlere uygun olarak Afyon Kocatepe Üniversitesi Veteriner Fakültesi Biyokimya ve Fizyoloji Anabilim Dalı Laboratuvarlarında yapıldı.

2.4.1. Toplam Fenolik Madde (TPC) Tayini

Zeytin yaprağının metanol, etil asetat ve n-hekzan ekstralarında çözünen toplam fenolik maddeler Folin-Ciocalteu reaktifi (FCR) ile tayin edilmiştir (Singleton ve Rossi, 1965). FCR fosfotungustik asit ($H_3PW_{12}O_{40}$) ile fosfomolibtik asitin ($H_3PMo_{12}O_{40}$) karışımlarıdır. FCR, vitamin C, aromatik aminler ve Cu(I) gibi bileşikler tarafından da indirgenebildiği için fenolik madde tayinine özel bir yöntem değildir (Büyüktuncel, 2013). FCR ile fenolik madde reaksiyonu sırasında indirgenme sonucunda mavi renkli bir bileşik oluşur. Oluşan mavi renkli bileşik spektrofotometrede 760 nm'de ölçülür ve standart çözeltisi gallik asittir.

Zeytin yaprağından hazırlanan 100-250-500-1000 $\mu\text{g/mL}$ metanol, etil asetat ve n-hekzan ekstralarından 0,5 mL alınmıştır. Distile su ile 23 ml'ye tamamlanmıştır ve 0,5 mL FCR eklenmiştir. 3 dakika sonra %2'lik Na_2CO_3 çözeltisi katılmış ve oda şartlarında 2 saat 250 rpm'de çalkantılı su banyosunda tutulmuştur. Blank olarak distile su kullanılmıştır. Her bir konsantrasyondaki numune 3'erli tekrar edilerek 760 nm'de absorbansları ölçülmüştür.

Standart çözelti olarak 1000-500-250-125-62,5 $\mu\text{g/mL}$ konsantrasyonda hazırlanan gallik asit çözeltileri 760 nm'de absorbansları ölçülmüştür. Ölçülen absorbanlar ile zeytin yaprağı örnekleri arasındaki grafik denklemlerinden, toplam fenolik madde miktarı μg gallik asit ($\mu\text{g GAE/g}$ örnek) eşdeğer şeklinde hesaplanmıştır.

2.4.2. DPPH Radikali Giderme Aktivitesi Tayini

Zeytin yaprağının 1,1-difenil-2-pikrilhidrazil (DPPH) radikal giderme aktivitesi Blois yöntemi aracılığı ile belirlenmiştir (Blois, 1958). Buna göre DPPH serbest elektron içeren bir radikal olup koyu mor renkli bu çözelti 515 nm’de absorbands vermektedir. Antioksidanların varlığında DPPH’tan serbest elektron alındığında DPPH çözeltisinin rengi açılmaktadır. Buna göre yüksek serbest radikal giderme aktivitesinin göstergesi, reaksiyon karışımının absorbandsının düşmesi olarak kabul edilmektedir.

Zeytin yaprağından hazırlanan 100-250-500-1000 µg/mL metanol, etil asetat ve n-hekzan ekstraherinden 0,5 mL alınmıştır, 2 mL 0,1 mM DPPH çözeltisi eklenmiştir. Vortekslenen çözeltiler ışık geçirmeyen bir ortamda 30 dk normal şartlar altında bekletilmiştir. 30 dk bekletilen çözeltilerin absorbandsları 517 nm’de okunmuştur. Kontrol olarak 0,5 mL etanol çalışılmıştır. Aşağıda belirtilen formül şeklinde hesaplanmıştır.

$$\% \text{ DPPH Radikali Giderme Aktivitesi} = \frac{\text{Kontrol Absorbansı} - \text{Numune Absorbansı}}{\text{Kontrol Absorbansı}} \times 100$$

2.4.3. Linoleik Asit Sisteminde Ferrik Tiyosiyanat (FTC) Metodu ile Antioksidan Aktivitesinin Tayini

Antioksidan aktivitesi ferrik tiyosiyanat metodu kullanılarak belirlenmiştir (Pan ve ark., 2007). Bu yöntemde linoleik asit oksidasyonu oluşturulmuştur. Oksidasyon sırasında Fe^{+2} , Fe^{+3} iyonlarına yükseltgenmiştir. İnkübasyondaki örnekten belirli aralıklarla ölçümler yapılarak peroksit oluşumu takip edilmiştir. Peroksit konsantrasyonundaki yükselme absorbands değerini de yükseltmektedir.

Zeytin yaprağından hazırlanan 100-250-500-1000 µg/mL metanol, etil asetat ve n-hekzan ekstrelerinden ve standart madde çözeltisinden 0,5 mL alınmıştır. Ekstrelerle ve standart madde çözeltisine 1,25 mL linoleik asit emülsiyonu ile 0,75 mL 0,04 M pH=7 olan fosfat tamponu eklenmiştir. Kontrol örneği hazırlamak için 1,25 mL 0,04 M pH=7 fosfat tamponu ile 1,25 mL linoleik asit emülsiyonu alınmıştır. Çözeltiler vortekslendikten sonra 37 °C'de inkübasyon için inkübatöre konulmuştur. 24 saat aralıklarla 500 nm'de 2 farklı ölçüm yapılmıştır. Ölçüm için inkübasyon çözeltisinden 0,05 mL alınmıştır, üzerine 2,35 mL %75'lik etil alkol çözeltisi ile 0,05 mL %30'luk NH₄SCN eklenmiştir. 3 dakika beklendikten sonra, 0,05 mL 20 mM FeCl₂ çözeltisi eklenmiştir. Reaksiyon oluşumu için 5 dakika beklendikten sonra oluşan kırmızı renkli çözeltinin absorbanansı 500 nm'de ölçülmüştür.

Linoleik asit peroksidasyonunun % inhibisyonunu hesaplamak için aşağıdaki formül kullanılmıştır;

$$\% \text{ inhibisyon} = 1 - \frac{\text{Örnek Absorbanansı}}{\text{Kontrol Maksimum Absorbanansı}} \times 100$$

2.4.4. Demir (II) İyonlarının Şelatlanma Aktivitesinin Tayini

Zeytin yaprağından hazırlanan 100-250-500-1000 µg/mL metanol, etil asetat ve n-hekzan ekstreleri Dinis ve arkadaşlarının yöntemine göre Fe⁺² iyonlarını şelatlama aktivitesine bakılmıştır (Dinis ve ark. 1994). Yöntem demir şelatlayıcısı olan ferrozin ve ortamdaki demiri bağlayan bileşiklerin Fe⁺² iyonlarını bağlama hızına dayanmaktadır. Kırmızı renkli Fe⁺² kompleksinin oluşumunun obstrüksiyonu şelatlama gücünün fazla olmasındandır.

0,5 ml ekstreye 1,85 mL distile su ile 50 µL 2 mM FeCl₂ çözeltisi eklenmiştir. Normal şartlar altında inkübasyon için 30 dakika beklendikten sonra 100 µL 5 mM

ferrozin çözeltisi eklendikten sonra vortekslenmiştir. Karışımların absorbens değerleri 562 nm'de 10 dakika beklendikten sonra ölçülmüştür. Kontrol için ekstraler yerine 0,5 mL distile su kullanılmıştır. 50-100-150-200-250 µg/mL konsantrasyonlarındaki EDTA çözeltileri standart madde olarak kullanılmıştır.

Ferrozin-Fe⁺² kompleksinin inhibisyon yüzdesi;

$$\% \text{ Şelatlama Aktivitesi} = 1 - \frac{\text{Örnek Absorbansı}}{\text{Kontrol Absorbansı}} \times 100 \text{ formülü ile hesaplanmıştır.}$$

2.4.5. Süperoksit Radikali Giderme Aktivitesinin Tayini

Süperoksit anyonu giderme aktivitesi tayini için kullanılan metot, Nishikimi ve arkadaşlarının metodudur (Nishikimi ve ark. 1972). NADH/PMS/O₂ kompleksi ile oluşturulan süperoksit radikali NBT'yi sarı renkten mavi-mor renkli formazon türevine indirger. Düşük absorbens değerleri, bileşiklerin süperoksit radikali giderme aktivitesinin olduğunu gösterir.

0,5 mL 156 µM NBT ve 0,5 mL 468 µM NADH çözeltilerine 0,5 mL zeytin yaprağından hazırlanan 100-250-500-1000 µg/mL metanol, etil asetat ve n-hekzan ekstraleri eklenmiştir. Eksrat eklenen karışımlara 50 µL 60 µM PMS çözeltisi katıldıktan sonra oda şartlarında 5 dakika bekletilmiştir. Kontrol çözeltisi olarak 0,5 mL su kullanılmıştır. Örneklerin 560 nm'de absorbensleri okunmuştur. Süperoksit anyonu giderme aktivitesi % olarak aşağıda verilen eşitlik ile hesaplanmıştır.

$$\% \text{ Süperoksit anyonu giderme aktivitesi} = \frac{\text{Kontrol Absorbansı} - \text{Örnek Absorbansı}}{\text{Kontrol Absorbansı}} \times 100$$

2.4.6. İndirgenme Kapasitesi Tayini

Zeytin yaprağından hazırlanan 100-250-500-1000 µg/mL metanol, etil asetat ve n-hekzan ekstraktlarının indirgenme kapasiteleri Oyaizu yöntemine göre belirlenmiştir (Oyaizu, 1986). Fe^{+3} iyonları Fe^{+2} iyonlarına indirgenir ve ortama $FeCl_3$ eklenmesiyle Prusya mavisi renginde oluşan kompleks bileşiğin absorptansı 700 nm'de ölçülür. Yüksek indirgenme kapasitesi, yüksek absorptans değerlerinde görülür.

Zeytin yaprağından hazırlanan 100-250-500-100 µg/mL metanol, etil asetat ve n-hekzan ekstraktları ve standart madde çözeltilerinden 0,5 mL alınarak 1,25 mL fosfat tamponu (0,2 M, pH=6,6) ve 1,25 mL %1'lik $K_3Fe(CN)_6$ katılmıştır. Karışımlar 50°C'de 20 dakika inkübasyonda bekletildikten sonra 1,25 mL %10'luk TCA eklenmiştir. 10 dakika boyunca 2500 rpm hızında santrifüjleme yapılmıştır. Daha sonra çözeltinin üst kısmından 1,25 mL örnek alınarak 1,25 mL distile su ile beraber 0,25 mL %0,1'lik $FeCl_3$ eklenmiştir. Çözeltilerin son olarak 700 nm'de absorptansları ölçülmüştür.

2.5. İstatistikî Analiz

Yapılan çalışma sonucunda elde edilen verilerin istatistik değerlendirilmesinde SPSS 13.0 istatistik programı kullanılarak verilerin ortalamaları $\pm$ standart hataları ile ifade edildi. Verilerin normallik testleri yapılarak gruplar arasındaki istatistikî farkları belirlemek için ANOVA testi ve posthoc student t test olarak ise Duncan testi uygulandı. Sonuçlar % 95'lik güven aralığında değerlendirildi ve istatistikî anlamlılık için uygun P değeri seçilerek belirlendi.

3. BULGULAR

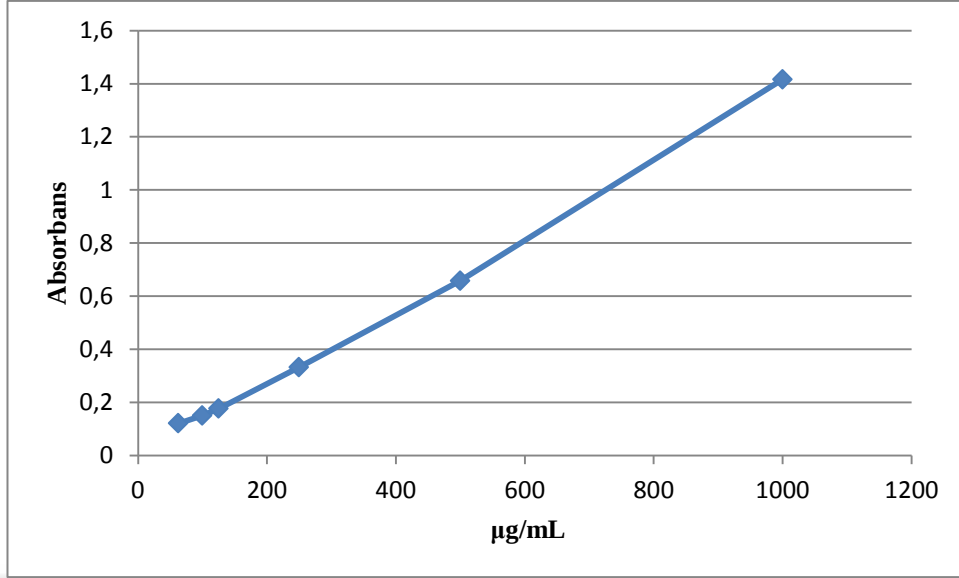
Zeytin yaprağının metanol, etil asetat ve n-hekzan ekstralarının *in vitro* koşullarda bazı antioksidan aktiviteleri belirlenerek Tablo 3.1’de gösterildi.

Tablo 3.1. Tüm ekstraların çeşitli antioksidan aktivite düzeyleri ^{a,b,c,d,e,f} Aynı sütündeki farklı harfler ortalama değer arasındaki istatistiksel farkı göstermektedir. (***) P<0,001

Ekstre	mg/L	TESTLER					
		Toplam Fenolik Madde (mg GAE/g ekstre)	DPPH (% İnhibisyon)	Linoleik Asit (% İnhibisyon)	Demir II Şelatlama (% Şelatlama)	Süperoksit Radikal (% İnhibisyon)	İndirgeme Kapasitesi (Absorbans)
Metanol	1000	85,27±15,03 ^a	60,53±4,33 ^{b,c,d}	67,67±2,34 ^c	23,26±0,31 ^{b,c}	68,82±0,65 ^a	1,49±0,03 ^a
	500	48,39±1,42 ^b	54,43±5,17 ^d	74,79±3,93 ^{a,b,c}	17,70±0,33 ^{b,c,d}	67,02±1,47 ^a	0,90±0,04 ^a
	250	26,78±3,14 ^c	55,67±2,83 ^{c,d}	89,52±9,77 ^a	15,33±0,20 ^{c,d,e}	56,90±0,85 ^b	0,54±0,01 ^b
	100	11,58±0,63 ^{c,d}	55,77±1,58 ^{c,d}	83,57±2,70 ^{a,b}	11,61±0,24 ^{d,e}	59,02±2,51 ^{a,b}	0,33±0,00 ^d
Etil Asetat	1000	33,67±4,12 ^{b,c}	72,93±0,42 ^a	86,67±7,63 ^{a,b}	50,53±5,53 ^a	67,29±2,23 ^a	0,44±0,01 ^c
	500	19,89±2,29 ^{c,d}	68,40±0,67 ^{a,b}	65,24±6,67 ^c	25,62±5,90 ^b	63,88±1,65 ^a	0,21±0,00 ^d
	250	14,91±3,59 ^{c,d}	61,50±0,79 ^{b,c,d}	63,09±0,48 ^c	16,91±5,22 ^{b,c,d,e}	72,00±1,35 ^a	0,25±0,01 ^{e,f}
	100	13,49±8,22 ^{c,d}	42,37±3,34 ^e	61,19±4,05 ^c	14,87±1,22 ^{c,d,e}	70,78±2,99 ^a	0,19±0,01 ^f
n-hekzan	1000	12,53±3,82 ^{c,d}	71,17±2,93 ^a	71,67±1,26 ^{b,c}	8,85±0,18 ^{d,e}	51,02±0,46 ^c	0,28±0,00 ^{d,e}
	500	0,18±1,32 ^d	64,10±4,95 ^{a,b,c}	75,24±1,26 ^{a,b,c}	9,05±0,20 ^{d,e}	39,96±3,52 ^d	0,24±0,01 ^{e,f}
	250	2,79±0,71 ^d	43,67±1,04 ^e	76,19±5,61 ^{a,b,c}	8,95±0,14 ^{d,e}	31,53±1,97 ^e	0,23±0,02 ^{e,f}
	100	0,4177±2,34 ^d	13,77±1,23 ^f	76,19±2,03 ^{a,b,c}	8,16±0,43 ^e	13,76±2,24 ^f	0,25±0,01 ^{e,f}
P		0,000	0,000	0,003	0,000	0,000	0,000

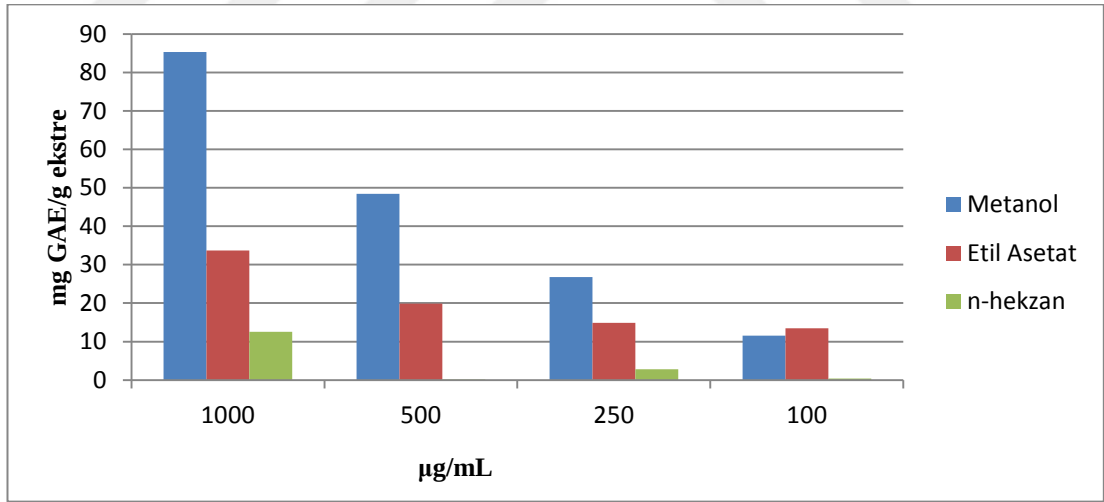
3.1. Toplam Fenolik Madde (TPC) Düzeyi

Zeytin yaprağının metanol, etil asetat ve n-hekzan ekstraları ile gallik asit kullanılarak hazırlanan standardın fenolik madde düzeyleri Folin-Ciocalteu reaktifi (FCR) ile belirlendi. Standarda ait grafik Şekil 3.1’de verildi.



Şekil 3.1. Gallik asit standart grafiği

Bitkinin farklı organik çözücülerdeki konsantrasyonlarına ait toplam fenolik madde düzeyleri Şekil 3.2’de gösterildi.



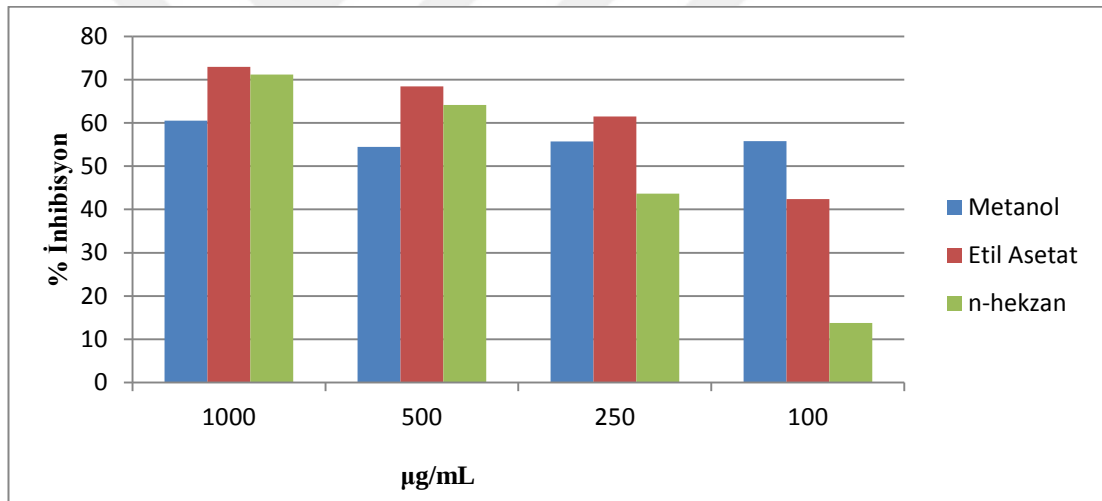
Şekil 3.2. Tüm ekstrelerin gallik asit eşdeğeri olan toplam fenolik madde düzeyleri

Tüm ekstrelerdeki toplam fenolik madde düzeyi istatistiki olarak önemli ($P < 0,001$) olmakla birlikte, metanolün 1000 µg’lık konsantrasyonunun ortalama $85,27 \pm 15,03$ mg gallik asit (mg GAE/g ekstre) düzeyinin en yüksek ($P < 0,001$) değere sahip olduğu belirlendi. Buna göre en düşük fenolik madde düzeyi n-hekzan 500 µg’lık konsantrasyonda bulundu.

Her bir grup kendi içerisinde karşılaştırıldığında metanol, etil asetat ve n-hekzanda çözünen zeytin yaprağı ekstre konsantrasyonu arttıkça toplam fenolik madde düzeyinde artmış olduğu görüldü.

3.2. DPPH Radikali Giderme Aktivitesi Düzeyi

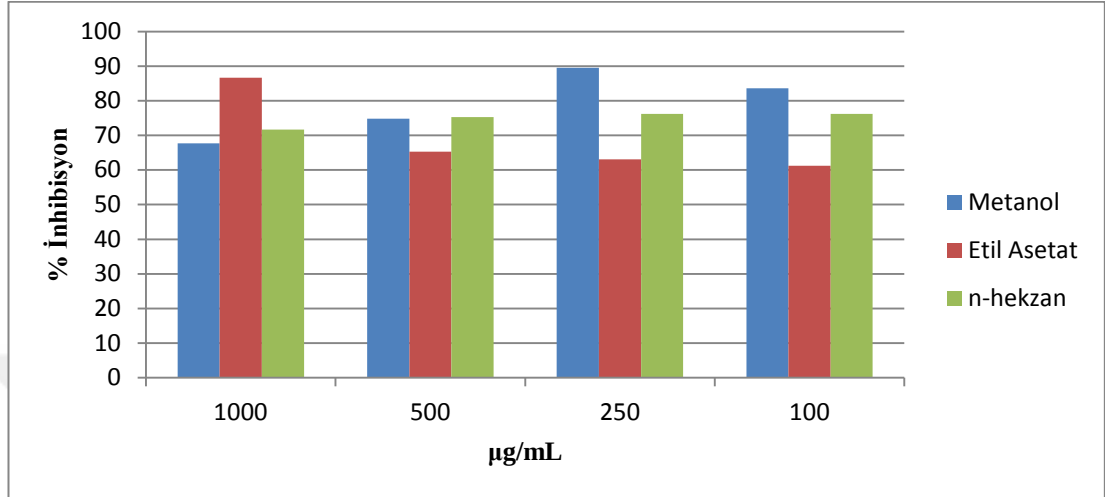
Zeytin yaprağının farklı organik çözücülerde konsantrasyonlarına ait DPPH radikali giderme aktivitesi Şekil 3.3.'de gösterilmiştir.



Şekil 3.3. Tüm ekstrelerin DPPH radikali giderme aktivitesi (%) düzeyleri

Tüm ekstrelerin DPPH radikali giderme aktivitesi karşılaştırıldığında etil asetat ve n-hekzan 1000 µg'lık konsantrasyonlarındaki aktivitenin sırasıyla %72,93±0,42 ve %71,17±2,93 inhibisyonu ile en yüksek düzeyde olduğu görüldü. Tüm ekstrelerdeki DPPH radikali giderme aktivitesi önemli olmakla birlikte n-hekzanın 100 µg'lık konsantrasyonunun % inhibisyon aktivitesi %13,77±1,23 düzeyi ile en düşük değeri bulundu.

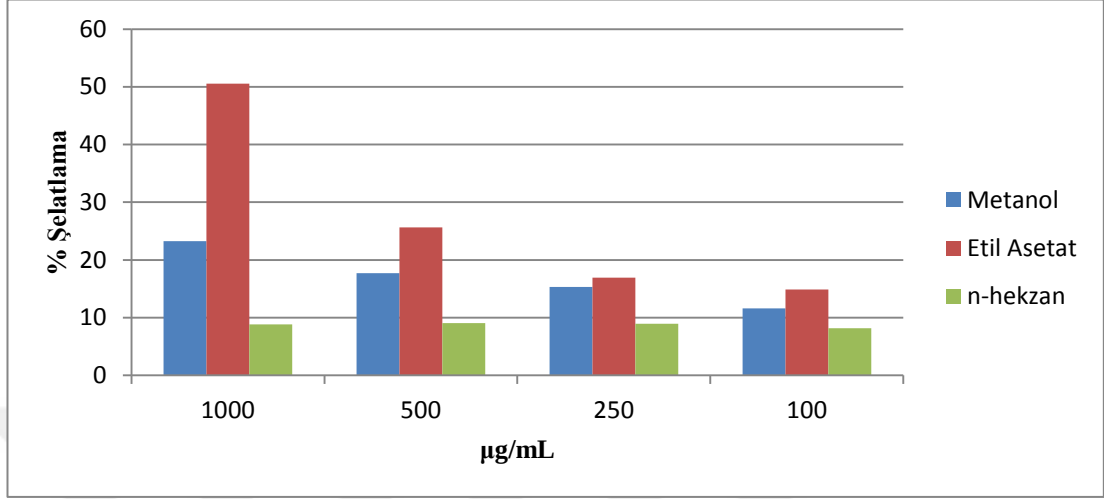
3.3. Linoleik Asit Sisteminde Ferrik Tiyosiyanat (FTC) Metodu ile Antioksidan Aktivitesi Düzeyi



Şekil 3.4. Tüm ekstrelerin Linoleik asit sisteminde ferrik tiyosiyanat (FTC) metodu ile antioksidan aktivitesi (%) düzeyleri

Tüm ekstrelerin linoleik asit sisteminde 48 saatlik antioksidan aktiviteleri karşılaştırıldığında metanol 250 µg'lık konsantrasyonunun % inhibisyon değeri $89,52 \pm 9,77$ ile en yüksek düzeyde olduğu görüldü.

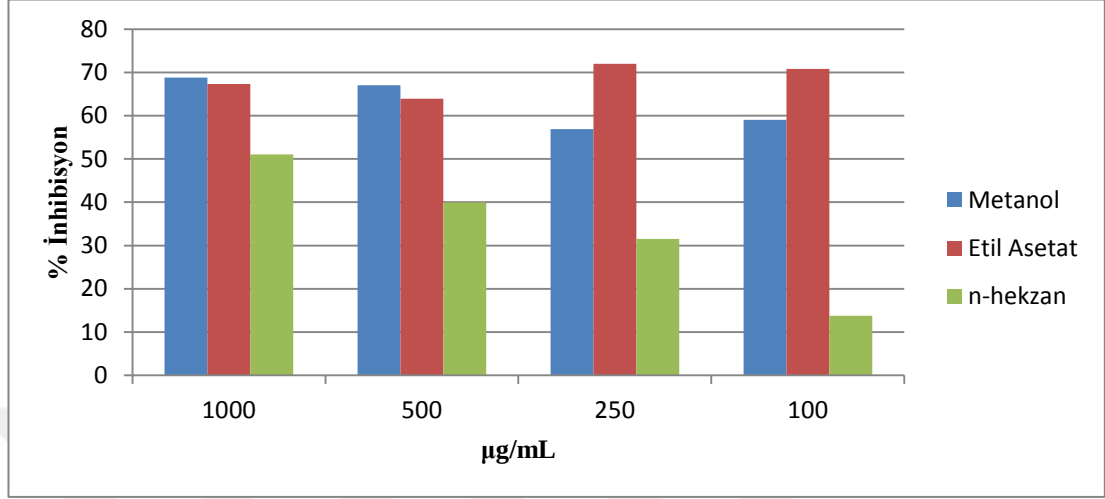
3.4. Demir(II) İyonlarının Şelatlanması Aktivitesi Düzeyi



Şekil 3.5. Tüm ekstrelerin Demir (II) iyonlarını şelatlama aktivitesi (%) düzeyleri

Tüm ekstrelerin demir (II) iyonlarını % şelatlama aktivitesine bakıldığında en yüksek değer etil asetat 1000 µg'lık konsantrasyondaki % 50,53±5,53 olarak bulunmuştur. Tüm konsantrasyonlara bakıldığında 8,16±0,43 değeri ile n-hekzan 100 µg'lık konsantrasyonu en düşük % şelatlama aktivitesine sahip olduğu bulundu.

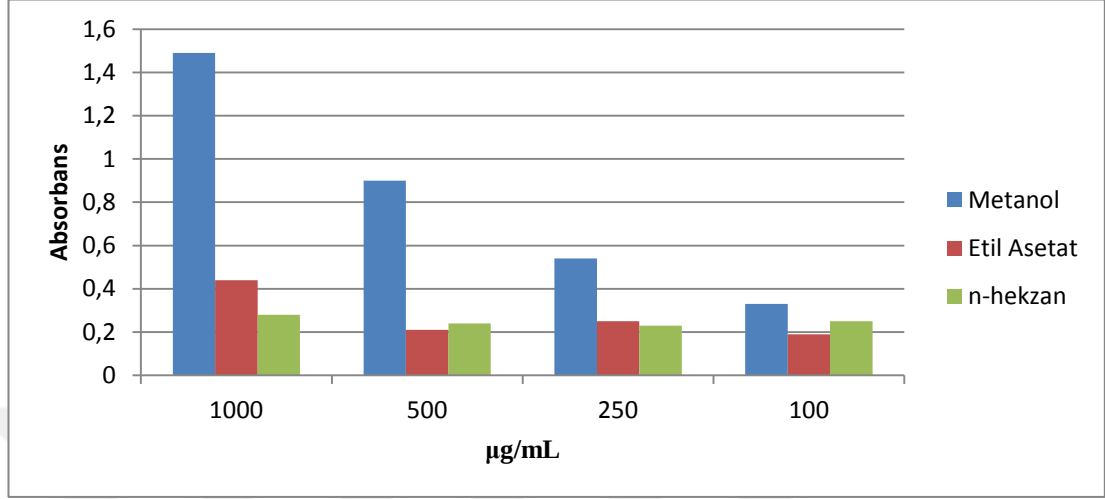
3.5. Süperoksit Radikali Giderme Aktivitesi Düzeyi



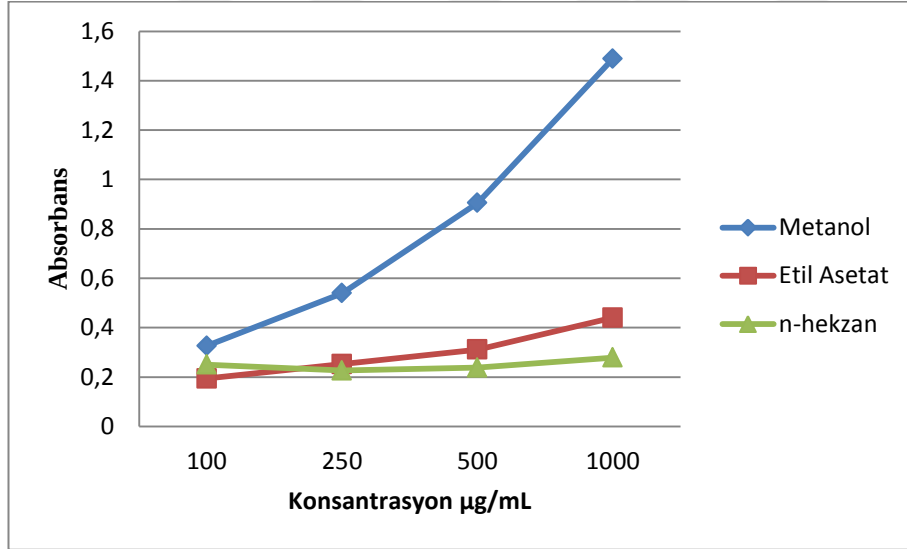
Şekil 3.6. Süperoksit radikali giderme aktivitesi (%) düzeyleri

Tüm ekstatların süperoksit radikali giderme aktivitesine bakıldığında etil asetat eksrelerin aktivitesinin yüksek olduğu, en yüksek % inhibisyon değeri ise etil asetat 250 µg'lık konsantrasyondaki % 72,00±1,35 olarak bulunmuştur. En düşük % inhibisyon değeri ise % 13,76±2,24 değeri ile n-hekzan 100 µg'lık konsantrasyonu olarak bulundu.

3.6. İndirgenme Kapasitesi



Şekil 3.7. İndirgenme kapasitesi absorbans değeri sütun grafiği



Şekil 3.8. İndirgenme kapasitesi absorbans değerleri

İndirgenme kapasitesi tayininde tüm eksretlere bakıldığında indirgenme kapasitesinin en yüksek olduğu ekstretler metanollü ekstretler olduğu görünmektedir. En yüksek absorbans değeri metanol 1000 µg'lık konsantrasyondaki $1,49 \pm 0,03$ olarak bulunmuştur. Tüm eksretlerde en düşük absorbans değeri ise etil asetat 100 µg'lık konsantrasyonda $0,19 \pm 0,01$ olarak bulunmuştur.

4. TARTIŞMA

Bitki florası bakımından oldukça zengin olan ülkemizde, endüstriyel tarım ürünleri arasında zeytin önemli bir yer tutmaktadır. Dünya zeytin üreticileri arasında 4. sırada yer alan Türkiye’de (Keser ve Bilal, 2010) başlıca memecik, kilis yağlık, gemlik, tavşan yüreği, domat ve ayvalık gibi çeşitli zeytin türleri yetiştirilmektedir (Orak ve ark., 2019). Zeytin hasatından sonra genellikle yakılarak bertaraf edilen zeytin yapraklarının günümüzde pek çok fenolik bileşik içerdiği ve bunların antibakteriyel, antifungal ve antioksidan özelliklere (Ferreira ve ark, 2007) sahip olduğu bilinmesine rağmen yapılan *in vitro* ve *in vivo* çalışmaların yetersiz olduğu görülmektedir. Doğal ve aynı zamanda ucuz bir tarımsal yan ürün olan zeytin yaprakları veya bunlardan elde edilen çeşitli ekstratlar, başlıca hayvan besleme ve biyokütle enerjisinde kullanılmaktayken son zamanlarda gıda, kozmetik ve ilaç endüstrisinde de kullanımı giderek yaygınlaşmaktadır (Spinelli ve ark., 2010; Rodrigues ve ark., 2015; Souilem ve ark., 2017). Bu çalışmada diğer ülkelerde çay olarak tüketilen ancak ülkemizde kullanımı pek de yaygın olmayan zeytin yapraklarından elde edilen farklı polaritedeki ekstratların *in vitro* antioksidan aktiviteleri çeşitli parametreler ile belirlendi.

Bitkilerde yaygın olarak bulunan ve kimyasal yapılarına göre farklılık gösteren fenolik bileşiklerin antioksidan aktivitelerinin belirlenmesi bunların gıda katkı maddesi olarak ya da farmasötik ve kozmetik gibi alanlarda endüstriyel kullanımını giderek artırmaktadır. Nitekim bitkilerde yaygın olarak bulunan pek çok polifenolik bileşiğin antioksidan aktivite gösterdiği bildirilmektedir (Nehir El ark., 1999; Al-İsmail ve Aburjai, 2004). Zeytin ağacı biyokimyasal olarak sekoiridoidler, karbonhidratlar, şeker alkolü ve terpenoidler ile karakterizedir. Bunlardan özellikle yaprağında bolca bulunan oleuropein biyolojik açıdan en önemlisidir. Kuru yaprak ağırlığının yaklaşık %3’ünü oluşturan polialkollerden mannitol ise tatlandırıcı ve düşük kalorisi nedeniyle gıda ve ilaç endüstrisinde kullanılmaktadır. Aynı zamanda

yaprağında bulunan oleanolik asidin önemli farmakolojik özellikleri bulunmaktadır (Guinda ve ark., 2015). Yapılan bir başka çalışmada memecik türüne ait zeytin yapraklarında sırasıyla en önemli fenolik maddeler 38,2 mg oleuropein, 4,96 mg luteolin 7-O-glukozid, 3,47 mg verbaskozit, 2,10 mg hidroksitirozol ve 1,86 mg kuersetin olarak bildirilmektedir (Orak ve ark., 2019).

Çalışmamızdaki memecik türü zeytin yaprakları ekstre verimleri açısından değerlendirildiğinde bu oran, metanolde %34,59, etil asetat % 26,15 ve n-hekzanda % 13,21 olarak belirlenirken, Orak ve ark. (2019) aynı türün metanol ekstresi için verimliliği %27,11 düzeyinde bildirmektedir. Çalışmadaki tüm gruplar değerlendirildiğinde toplam fenolik madde düzeyinin ortalama 0,18-85,27 mg GAE/g ekstre civarında olduğu görülmektedir. Ayrıca tüm gruplardaki ekstre konsantrasyonunun artışına bağlı olarak toplam fenolik madde düzeyinin de artmış olduğu ve buna ait en yüksek değerin (%85,27±15,03) 1000 µg'lık metanolde ve en düşük değerin ise 500 µg'lık n-hekzan grubunda olduğu dikkati çekmektedir. Bu sonuca göre toplam fenolik madde miktarı bakımından ekstreler metanol>etil asetat>n-hekzan olarak sıralanmaktadır. Metanoldeki bu değer Orak ve ark. (2019)'nın memecik türü zeytin yaprakları için bildirdiği 209±3,4 mg GAE/g değerinden düşük bulunurken, Türkiye'de yetişen diğer zeytin türlerine ait yapraklarda metanol ekstresi için ise bu değer 110-268 mg GAE/g olarak bildirilmektedir (Orak ve ark., 2019). Yapılan diğer çalışmalarda zeytin yaprağı total fenolik madde düzeylerinin 45,2±1,1g GAE/kg (Botsoglou ve ark 2014) ve 26 g GAE/kg (Botsoglou ve ark 2012) olarak bulunduğunu bu farklılıklarda ise zeytin yaprağı türü ve yaşının, hasat zamanının ve ekstraksiyon çözücülerinin etkili olduğu bildirilmektedir.

Antioksidanların serbest radikal giderme aktivitelerinin tayininde yaygın olarak kullanılan DPPH kararlı bir serbest radikal (DPPH•) olup (Chen ve ark., 2007; Wojdylo ve ark., 2007) mor renkli bu madde antioksidanlarla etkileştiğinde sarı renkli indirgenmiş DPPH formuna (DPPH-H) dönüşmektedir. Bu nedenle ölçülen

absorbans ne kadar düşük ise antioksidanın serbest radikal giderme aktivitesi de o derece yüksek kabul edilmektedir. Çalışmada grupların radikal giderme kapasitelerine ait veriler Tablo 3.1 ve Şekil 3.3 'de görülmektedir. Bu sonuçlara göre tüm ekstrelerin DPPH radikali giderme aktivitesi incelendiğinde 1000 µg'lık etil asetat ve n-hekzanın yüksek düzeyde ve 100 µg'lık n-hekzanında düşük düzeyde % inhibisyon gösterdiği tespit edildi. Ayrıca çalışmada metanol, etil asetat ve n-hekzan gruplarındaki ekstre konsantrasyonlarının azaldıkça DPPH radikali giderme aktivitesinin de buna paralel olarak azaldığı görülmektedir. Hayes ve ark., (2009) yaptıkları çalışmada, zeytin yaprağı metanol ekstresinin DPPH radikalini tutucu aktivitesinin 100 ppm'den 400 ppm'e geçişte arttığını, bu artışın 1000 ppm'de %94'e ulaştığını bildirmekte ve bunu ekstredeki hidroksitirozol ve oleuropein gibi güçlü serbest radikal inhibitörlerinin radikal toplayıcısı (Stupans ve ark., 2002) olarak davranmasına bağlamaktadır. Harp (2011) yaptıkları başka bir çalışmada ise toplam fenol içeriği ile DPPH radikalini tutma kapasiteleri arasında pozitif bir korelasyon olmadığını, ancak zeytin yaprağı ekstrelerinin DPPH radikalini tutma aktivitesinin sentetik BHT ve BHA'dan daha etkili olduğunu bildirmektedir. Benzer şekilde oleuropein (%20) içeren zeytin yaprağı ekstresinin resveratrol ve *Polypodium leucotomos* ekstresi (PLE) ile karşılaştırıldığı çalışmalarda oleuropeinin DPPH radikali tutma kapasitesinin resveratrolle benzer olduğu (da Silva ark, 2019) ayrıca vitamin C ve E'den de daha yüksek olduğu (Benavente-Garcia ve ark., 2000) bildirilmektedir. Zeytin yaprağı ekstresinin radikal tutucu özellikleri değerlendirildiğinde tek başına kullanılan oleuropeine göre antioksidan aktivitesinin daha yüksek olduğu, bu aktivitenin de ekstredeki oleuropein miktarı ile pozitif korelasyon gösterdiği belirtilmektedir. Buna göre zeytin ağacının farklı bölümleri arasında polifenol bileşik miktarı en yüksek olan ve antioksidan aktivitesi en fazla olan kısmının yaprakları olduğu bildirimi de bunu destekler niteliktedir (Blasi ve ark., 2016). Yapılan benzer çalışmalarda zeytin yaprağı ekstrelerinin DPPH radikaline hidrojen verebilme yeteneği tokoferol, tirozol, C ve E vitamini ile karşılaştırıldığında bu özelliğinin onlara eşit yada daha yüksek olduğu bildirilmektedir (Benavente-Garcia ve ark., 2000, Aktaş ve ark., 2005, Farag ve ark., 2007). Ayrıca yaprakta bulunan flavonoidlerden özellikle luteolin-7-o-glikozitin DPPH bağlamada, hidroksitirozol, oleuropein ve verbaskosin gibi fenolikler kadar

antioksidan kapasiteyi artırdığı belirtilmektedir (Goulas ve ark., 2010). Oleuropeinin yanısıra ekstredeki flavonoidler ve substitue fenoller gibi polifenolik bileşikler bir arada iken sinerjistik etki göstererek antioksidan aktiviteyi artırmaktadır (Benavente-Garcia ve ark., 2000). Çalışmada kullanılan çözücüler polarite açısından değerlendirildiğinde sırasıyla nonpolar n-hekzan > etil asetat > metanol şeklindedir. Buna göre ekstraksiyonda kullanılan çözücülerin radikal giderme aktivitesini etkilediği ve polar ekstrelerde bu aktivitenin daha fazla olduğu bildirilmektedir (Hayouni ve ark., 2007; Özcan ve ark., 2007). Nitekim aromatik bitki ekstreleriyle yapılan bir çalışmada DPPH radikali giderme açısından aseton, metanol ve etil asetat ekstreleri arasında en etkili olanın metanol ekstresi olduğu bildirilirken (Miliauskas ve ark., 2004) bir başka çalışmada ise bütanol, etil asetat ve kloroforma göre sıcak su ve metanol ekstrelerinin DPPH radikali gidermede daha etkili olduğu belirtilmektedir (Shon ark., 2003).

Serbest radikallerin yol açtığı non enzimatik lipid peroksidasyonu, yağ asitlerindeki konjuge çift bağlardan bir elektron bulunduran H atomlarının lipid peroksidasyonu ile başlamakta ve membrandaki yağ asitleri lipid serbest radikale ($L^{\bullet}$) dönüşmektedir. Bu radikaller kararsız olup, oksijenle lipid peroksit radikale ($LOO^{\bullet}$) ve daha sonra da diğer yağ asitlerinden elektron alarak lipid peroksitlerine ($LOOH$) çevrilirler. Bu süreç zincirleme devam ederken yağ asitlerinin peroksidasyonu sonucu malondialdehitler oluşmaktadır (Halliwell ve Gutteridge, 1990). Tablo 3.1.'de belirtildiği üzere grupların linoleik asit temel alınarak antioksidan aktiviteleri değerlendirildiğinde tüm gruplarda aktivite önemli olup, metanol 250 μ g konsantrasyonunda % inhibisyon değerinin en yüksek olduğu görülmektedir. Bu sonuçlara göre her bir ekstrenin linoleik asit peroksidasyonunu engelleyerek peroksitlerin oluşumunu azaltmada önemli ölçüde antioksidan etki gösterdiği sonucuna varılmaktadır. Çalışmamızda kullanılan memecik türünün metanollü gruplarında % inhibisyon değerleri 89,52-67,67 olarak belirlenmiştir. Danahaliloğlu ve ark. (2018) Halhalı türü zeytin yapraklarıyla yaptıkları çalışmada metanol ekstrelerinin % inhibisyon değerlerinin bölgelere göre 72,89-41,32 arasında değiştiğini bildirmektedir. Günümüzde özellikle gıda endüstrisinde besinlerin

oksidasyonunu engellemek amacıyla kullanılan sentetik antioksidanların yerini alternatif doğal antioksidanlar almaya başlamıştır. Özellikle biyoaktif bileşiklerden zengin ve bol miktarda bulunan zeytin yaprağı da bu alternatiflerden biridir. Nitekim Botsoglou ve ark., (2014) zeytin yaprağı etanolik ekstresiyle yaptıkları çalışmada depolanma süresine bağlı olarak ekstrenin etlerde, kontrole göre lipid oksidasyonuna bağlı olarak gelişen konjuge dienleri, peroksitleri ve malondialdehit oluşumunu azalttığını bildirmişlerdir. Aynı zamanda protein oksidasyonu sonucu oluşan protein karbonil ve sülfidril miktarını da düşürdüğü belirtilmektedir. Bu bağlamda zeytin yaprağı ekstreleri yağdan zengin gıdaların veya rafine edilmiş yağların oksidasyonunu stabilize etmek için gıda katkı maddesi olarak kullanılabilir. Lipid oksidasyonunda yüksek reaktivitesi nedeniyle prooksidan olarak bilinen Fe^{2+} Fenton reaksiyonu ($Fe^{2+} + H_2O_2 \rightarrow Fe^{3+} + OH^- + \bullet OH$) ile reaktif oksijen türlerini oluşturmakta ve hidrojen bağlarını kırarak lipid oksidasyonunu hızlandırmaktadır (Halliwell ve Gutteridge, 1990).

Çalışmada tüm ekstrelerin demir (II) iyonlarını % şelatlama aktivitesi değerlendirildiğinde, etil asetatın 1000 µg'lık konsantrasyonunun en fazla ve n-hekzan gruplarının ise en düşük değerlere sahip olduğu görülmektedir. Hayes ve ark., (2009)'ın lutein, sesamol, ellagik asit ve zeytin yaprağında yaptıkları araştırmada tüm maddelerin metanolik ekstrelerinin 200-1000 ppm aralığında demir şelatlama aktivitesi gösterdiği bildirilmiştir.

Hücrenin farklı bölümlerinde açığa çıkan süperoksit radikallerinin zararlı etkilerine karşı ilk savunma hattını oluşturan SOD süperoksit radikalini H_2O_2 ve O_2 'e dönüştüren metalloenzimlerden (Halliwell ve ark., 2000). Genel olarak SOD'un Mn, Fe ve CuZn prostetik grubuna sahip üç farklı tipi bulunmaktadır (Fridowich, 1986). Zeytin yaprağının kloroplast, sitozol, nükleus ve peroksizomlarında CuZn-SOD tipi bulunmakta ve total SOD aktivitesinin %52'sini bu izoenzim sağlamaktadır. Diğer bitki hücrelerinde nadir olmasına rağmen zeytin yapraklarının nükleer inklüzyon kristallerinde CuZn-SOD'un bulunması süperoksit türlerinin

oksidatif hasarına karşı DNA'yı koruması ile ilişkili olabilir. Ayrıca yaprağın vasküler dokusunda bulunan ve antioksidan savunmaya katılan Mn-SOD tipi ise lignin biyosentezinde gereklidir (Ogawa ve ark., 1996; Corpas ve ark., 2006). Yaptığımız çalışmada süperoksit radikali giderme aktivitesi değerlendirildiğinde, en yüksek % inhibisyon değerleri etil asetat gruplarda iken aktivitenin en düşük olduğu grupların ise n-hekzanda bulunduğu görülmektedir. Lee ve Lee (2010) yaptıkları çalışmada SOD aktivitesinin zeytin yaprağında bulunan oleuropeinde %18, rutinde %67, kafeik asitte %83 ve bunların karışımlarında ise %19 olduğunu bildirmişlerdir.

Bir bileşik veya ekstrenin indirgeme kapasitesi onun elektron transfer edebilmesiyle ilişkilidir ve o bileşik veya ekstrenin antioksidan aktivitesinin önemli bir göstergesi olarak kabul edilmektedir. Çalışmada tüm ekstrelerin indirgenme kapasitesi değerlendirildiğinde en yüksek absorbansın metanollü ekstre gruplarında olduğunun görülmesi, bu gruplardaki toplam fenolik madde ve linoleik asit % inhibisyon düzeylerinin de yüksek olması ile açıklanabilir. Yapılan bir çalışmada doğal fenoliklerden rutin, kateşin, kafeik asit ve zeytin yaprağında da bulunan kuarsetinin demir şelatlayıcı olduğu bildirilmektedir (Chen ve Ahn, 1998). Nitekim Juntachote ve Berghofer, (2005) yaptığı çalışmada Holy basil (fesleğen) ve Galangal (havlıcan) ekstrelerinin lipid oksidasyonunu katalizleyen Fe^{+2} 'yi şelatlayıcı ajan olarak kullanılabileceğini de belirtmektedir. Danahaliloğlu ve ark. (2018) Hatay'da farklı bölgelerde yetiştirilen Halhalı türü zeytin yapraklarıyla yaptıkları çalışmada metanol ekstraktlarının FRAP değerlerinin 0,96-0,11 arasında bulunduğunu bildirmekte iken bu değerler çalışmamızın metanol gruplarında 1,49-0,33 aralığında olup daha yüksek bulunmuştur.

Zeytin sanayi yan ürünlerinden olan zeytin yapraklarının *in vitro* koşullarda çeşitli antioksidan etkinliklerinin belirlendiği bu çalışmanın konu ile ilgili yapılacak *in vivo* araştırmalara yön verebileceği, yapraklarının insan ve hayvan sağlığı açısından farklı alanlarda alternatif kullanımlarının olabileceği düşünülmektedir.

5. SONUÇ

Sunulan çalışma kapsamında antioksidan aktivite açısından tüm veriler değerlendirildiğinde; metanollü ekstrelerin toplam fenolik madde, linoleik asit indirgeme ve indirgeme kapasitesi düzeyleri bakımından ilk sırada yer aldığı görülmektedir. Etil asetat ekstrelerin ise DPPH radikali tutma, demir II şelatlama, linoleik asit indirgeme ve süperoksit radikali yakalama değerleri bakımından önemli olduğu tespit edilmiştir. Toplam fenolik madde miktarı en düşük olan n-hekzan ekstrelerinin ise linoleik asit indirgeme ve DPPH değerleri önemli olup diğer antioksidan aktiviteleri düşük bulunmuştur.

Bu bağlamda polaritesine göre ekstreler gözönüne alındığında metanol ve etil asetat ekstrelerinde çözünen fenolik maddelerin elektron verebilme özelliği ile tek başına ya da birlikte sinerjistik etki oluşturarak test ortamındaki serbest radikalleri reaktif olmayan türlere indirgediği, metal iyonları ile kompleks oluşturabildiği, lipid peroksidasyonunu engellediği veya metalleri indirgeyici kapasiteleri bulunması ile antioksidan aktivite gösterdikleri sonucuna varılmıştır. Ekstrelerde gözlenen çeşitli antioksidan aktivite farklılıklarının kullanılan çözücüye geçen polifenolik bileşiklerin düzeyi ile bunların kimyasal yapılarındaki farklılıktan kaynaklandığı düşünülmektedir. Bu nedenle sentetik antioksidanlar yerine tercih edilen bitkisel kaynaklı doğal antioksidanlara yönelik *in vitro* çalışmalardan elde edilecek veriler yapılacak olan *in vivo* çalışmalara temel oluşturacaktır.

Sonuç olarak zeytin yapraklarının *in vitro* koşullarda çeşitli antioksidan etkinliklerinin tespit edildiği bu çalışma verileri gözönüne alındığında, yaprakların antioksidan özellikleri nedeniyle;

- Hayvan beslemede kullanımına ilişkin yapılacak araştırmalara,
- Gıdalarda katkı maddesi olarak kullanımına ilişkin yapılacak araştırmalara,

- Gıdalarda raf ömrünün uzatılmasına ilişkin yapılacak çalışmalara,
- Çeşitli hastalıkların tedavisinde kullanılan ilaçlarla birlikte kombinasyonuna ilişkin yapılacak *in vivo* çalışmalara,
- Kozmetik, gıda ve ilaç sanayisinde kullanılan sentetik antioksidanlara alternatif doğal antioksidan madde olarak kullanımına ilişkin yapılacak araştırmalara dayanak olması bakımından önemli olduğu düşünülmektedir.



ÖZET

Bu çalışmada içerisinde oleuropein gibi birçok biyoktif madde içeren zeytin (*Olea europaea* L.) yaprağının antioksidan özelliği çeşitli yöntemlerle *in vitro* olarak incelenmiştir. Kurutulan zeytin yapraklarından elde edilen metanol, etil asetat ve n-hekzanlı ekstrelerin 100-250-500-1000 µg/mL konsantrasyonlarında toplam fenolik madde tayini, DPPH radikali giderme aktivitesi, linoleik asit sisteminde ferrik tiyosiyanat (FTC) metodu ile antioksidan aktivitesi, demir (II) iyonlarını şelatlama aktivitesi, süperoksit radikali giderme aktivitesi ve indirgenme kapasitesi belirlenmiştir.

Zeytin yaprağının metanol, etil asetat ve n-hekzanlı ekstrelerinin yüzde verimleri sırasıyla %34.59, 26.15 ve %13.21 olarak bulunmuştur. Toplam fenolik madde tayininde en yüksek değer metanol 1000 µg/mL konsantrasyonda $85,27 \pm 15,03$, en düşük değer n-hekzan 500 µg/mL konsantrasyonda $0,18 \pm 1,32$ olarak bulunmuştur. DPPH radikali giderme aktivitesinde ise en yüksek değer etil asetat 500 µg/mL konsantrasyonda $72,93, \pm 0,42$, en düşük değer n-hekzan 100 µg/mL konsantrasyonda $13,77 \pm 1,23$ olarak bulunmuştur. Linoleik asit indirgemedede en yüksek değer metanol 250 µg/mL konsantrasyonda $89,52 \pm 9,77$, en düşük değer etil asetat 100 µg/mL konsantrasyonda $61,19 \pm 4,05$ olarak bulunmuştur. Demir (II) iyonlarını indirgemedede etil asetat 1000 µg/mL konsantrasyonda $50,53 \pm 5,533$, en düşük değer n-hekzan 100 µg/mL konsantrasyonda $8,16 \pm 0,43$ olarak bulunmuştur. Süperoksit radikali giderme aktivitesinde etil asetat 250 µg/mL konsantrasyonda $72,00 \pm 1,35$, en düşük değer n-hekzan 500 µg/mL konsantrasyonda $13,76 \pm 2,24$ olarak bulunmuştur. Son olarak indirgenme kapasitesinde metanol 1000 µg/mL konsantrasyonda $1,49 \pm 0,03$, en düşük değer etil asetat 100 µg/mL konsantrasyonda $0,19 \pm 0,01$ olarak bulunmuştur.

Sonuç olarak zeytin yaprağının metanollü ekstresinde toplam fenolik madde, linoleik asit indirgeme ve indirgenme kapasitesi diğer ekstrelerle göre daha aktif bulunmuştur. DPPH radikali tutma, demir (II) şelatlama, linoleik asit indirgeme ve

süperoksit radikali giderme aktivitesinde etil asetat ekstrelerin daha etkili olduğu görölmüştür. n-hekzanlı ekstrelerde ise sadece DPPH radikali tutma aktivitesi ve linoleik asit indirgeme düzeyi önemli bulunmuştur. Bu aktiviteleri nedeniyle zeytin yaprağının gıda, kozmetik, farmasötik ve hayvan besleme alanında doğal alternatif bir antioksidan olarak değerlendirilebileceğı düşünülmektedir.

Anahtar kelimeler: *Olea europaea* L., zeytin yaprağı, antioksidan aktivite, toplam fenolik madde, DPPH.



SUMMARY

In this study, antioxidant property of olive leaf (*Olea europaea* L.) containing many bioactive substances in it like oleuropein was investigated *in vitro* with various methods. Determination of total phenolic substances, DPPH radical removal activity, antioxidant activity with ferric thiocyanate (FTC) method in linoleic acid system, chelation activity of iron (II) ions, superoxide radical removal activity and reduction capacity were performed for the samples at the concentration of 100-250-500-1000 µg/mL with methanol, ethyl acetate and n-hexane extracts obtained from dried olive leaves.

Percentage yields of the *Olea europaea* L. were found 34,59%, 26,15% and 13,21% respectively, as a result of the extractions made with methanol, ethyl acetate and n-hexane solvents. In total phenolic substance determination the highest value was found $85,27 \pm 15,03$ in methanol at 1000 µg/mL concentration and the lowest value as $0,18 \pm 1,32$ in n-hexane at 500 µg/mL concentration. The highest value in the DPPH radical removal activity was found $72,93 \pm 0,42$ in ethyl acetate at 500 µg/mL concentration, the lowest value as $13,77 \pm 1,23$ in n-hexane at 100 µg/mL concentration. The highest value linoleic acid reduction was found as $89,52 \pm 9,77$ in methanol at 250 µg/mL concentration, the lowest value as $61,19 \pm 4,05$ in ethyl acetate at 100 µg/mL concentration. The highest value in reduction of iron (II) ions was found as $50,53 \pm 5,53$ in ethyl acetate at 1000 µg/mL concentration, the lowest value as $8,16 \pm 0,43$ in n-hexane 100 µg/mL concentration. In the superoxide radical removal activity, the highest value as $72,00 \pm 1,35$ in ethyl acetate at 250 µg/mL concentration, the lowest value as $13,76 \pm 2,24$ in n-hexane at 500 µg/mL concentration. Finally, the highest value was found as $1,49 \pm 0,03$ in methanol at 1000 µg/mL concentration and the lowest value as $0,19 \pm 0,01$ in ethyl acetate at 100 µg/mL concentration for the reduction capacity.

In conclusion, it was seen that total phenolic substances, linoleic acid reduction and reduction capacity of methanol extract of the antioxidant activity of the *Olea europaea* L. are more active when compared with other extracts. It was found out that extracts with ethyl acetate are more effective in DPPH radical retention, iron (II) chelating, linoleic acid reduction and superoxide radical removal activity. Important values were obtained only in DPPH radical retention activity and linoleic acid reduction in the extracts with n-hexane. Due to these activities, it is thought that olive leaf may be considered as a natural alternative antioxidant in nourishment, cosmetic, pharmaceutical and animal nutrition fields.

Key words: *Olea europaea* L., olive leaf, antioxidant activity, total phenolic substance, DPPH

KAYNAKLAR

- AMICI, A., VERNA, M., MARTILLOTTI, F. (1991). Olive byproducts in animal feeding: Improvement and utilization. *Options Mediterraneennes- Serie Seminaires*, 16: 149-152.
- AKKUŞ, İ. (1995). Serbest Radikaller ve Fiziksel Etkileri. Mimoza Yayınları. Konya.
- AKTAŞ, D., KARAGÖZLER, A., UYGUN, M., KAVAS, C., KIRGİL, A. (2005). Zeytin (*Olea europaea* L.) yaprağının antioksidan özelliklerinin incelenmesi. XIX Ulusal Kimya Kongresi, Kuşadası, 133.
- AL-ISMAIL, K. M., ABURJAI, T. (2004). Antioxidant activity of water and alcohol extracts of chamomile flowers anise seed and dill seeds. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 84(2): 173-178.
- BARBORA, B., TOIETTA, G., MAGGIO, R., ARCIELLO, M., TAROCCHI, M., GALLI, A., BALSANO, C. (2014). Effects of the Olive-Derived Polyphenol Oleuropein on Human Health. *International Journal of Molecular Sciences*, 15: 18508-18524.
- BASMACIOĞLU-MALAYOĞLU, H., AKTAŞ, B. (2011). Zeytin yağı işleme yan ürünlerinden zeytin yaprağı ile zeytin karasuyunun antimikrobiyal ve antioksidan etkileri. *Hayvansal Üretim*, 52: 49-58.
- BAYRAK, A., KİRALAN, M. ÇALIKOĞLU, E., KARA, H. (2010). Ege bölgesi zeytinyağlarının aroma profilleri ve bazı kalite özelliklerinin araştırılması. Ankara Üniversitesi Araştırma Projesi.
- BENAVENTE-GARCIA, O., CASTILLO, J., LORENTE, J., ORTUÑO, A., DEL RIO, J. A., (2000). Antioxidant activity of phenolics extracted from *Olea europaea* L. leaves. *Food Chemistry*, 68(4): 457-462.
- BLASI, F., URBANI, E., SIMONETTI, M. S. CHIESI, C., COSSIGNANI, L., (2016). Seasonal variations in antioxidant compounds of *olea europaea* leaves collected from different Italian cultivars. *J. Appl. Bot. Food Qual*, 89: 202-207.
- BLOIS, M. S. (1958). Antioxidant determinations by the use of stable free radical. *Nature*, 181: 1199 - 1200.
- BOTSOGLOU, E., GOVARIS, A., AMBROSIADIS, I., FLETOURIS, D. (2012). Lipid and protein oxidation of α -linolenic acid-enriched pork during refrigerated storage as influenced by diet supplementation with olive leaves (*Olea europaea* L.) or α -tocopheryl acetate. *Meat Sci.*, 92: 525-532.

- BOTSOGLOU, E., GOVARIS, A., AMBROSIADIS, I., FLETOURIS, D. PAPAGEORGIOU, G. (2014). Effect of olive leaf (*Olea europea L.*) extracts on protein and lipid oxidation in cooked pork meat patties enriched with n-3 fatty acids. *J. Sci. Food Agric.*, 94(2): 227–234532.
- BOUAZIZ, M., FEKI, I., AYADI, M., JEMAI, H., SAYADI, S. (2010). Stability of Refined Olive Oil and Olive-Pomace Oil Added by Phenolic Compunds From Olive Leaves. *Eur.J.Lipid Sci. Technol*, 112: 894-905.
- BOUDHRIOUA, N., BAHLOUL, N., SLIMEN, B. I., KECHAOU, N. (2009). Comparison on the total phenol contents and the color of fresh and infrared dried olive leaves. *Industrial Crops and Products*, 29: 412-419.
- BRIANTE, R., LA CARA, F., FEBBRAIO, F., BARONE, R., PICCIALLI, G., CAROLLA, R., MAINOLFI, P., DE NAPOLI, L., PATUMI, M., FONTANAZZA, G., NUCCI, R., (2000). Hydrolysis of oleuropein by recombinant beta-glycosidase from hyperthermophilic archaeon *sulfolobus solfataricus* immobilised on chitosan matrix. *Journal of Biotechnology*, 77: 275–286.
- BÜYÜKTUNCEL, E. (2013). Toplam FEnolik içerik ve Antioksidan Kapasitesi Tayininde Kullanılan Başlıca Spektrofotometrik Yöntemler. *Marmara Pharmaceutical Journal*.17: 93-103.
- CARR, A. C., VAN DER BERG, J. J. M., WINTERBOURN, C. C. (1996). Chlorination of cholesterol in cell membranes by hypochlorous acid. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 332(1): 63-69.
- CASHAS-SANCHEZ, J., ALSINA, M., A., HERRLEIN, M., K., MESTRES, C. (2007). Interaction between the antibacterial compound, oleuropein and model membranes. *Colloid Polym Sci.*, 285: 1351–1360.
- CHEN, H. Y., LIN, Y. C., HSIEH, C. L. (2007). Evaluation of antioxidant activity of aqueous extract of some selected nutraceutical herbs. *Food Chemistry*, 104: 1418–1424.
- CHEN, X., AHN, D.U. (1998). Antioxidant activities of six natural phenolics against lipid oxidation induced by Fe²⁺ or ultraviolet light. *Journal of the American Oil Chemist's Society*, 75: 1717-1721.
- CHRISTIAN, M., SHARPER, V., HOBERMAN, A., SENG, J., FU, L., COVELL, D., DIENER, R., BITLER, C., CREA, R. (2004). The Toxicity Profile of Hydrolyzed Aqueous Olive Pulp Extract. *Drug and Chemical Toxicology*, 27: 309-330.
- CORPAS, F. J., FERNANDEZ-OCANA, A., CARRERAS, A., VALDERRAMA, R., LUQUE, F., ESTEBAN, F. J., RODRÍGUEZ-SERANO, M., CHAKI, M., PEDRAJAS, J. R., SANDALIO, L. M., DEL RIO, L. A., BARROSO, J. B. (2006). The expression of different superoxide dismutase forms is cell-type dependent in olive (*Olea europaea L.*) leaves. *Plant Cell Physiol*, 47(7): 984-994.

- COTTON, F. A., WILKINSON, G. (1988). Advanced Inorganic Chemistry. John Wiley&Sons Inc., USA. 5th Ed.
- DAMTOFT, S., FRANZYK, H., JENSEN, S. R., (1995). Biosynthesis of ecoridoids in fontanesia. *Phytochemistry*, 38: 615-621.
- DANAHALİLOĞLU, H., TEKELİ, Y., GÖYGİNCİK, S., YILDIRIM, F. (2018). Hatay'da farklı bölgelerde yetiştirilen zeytin yapraklarının antioksidan özelliklerinin belirlenmesi. *Karadeniz Fen Bilimleri Dergisi*, 8(1): 77-86.
- da SILVA, A. C. P., PAIVA, J. P., DINIZ, R. R., DOS ANJOS, V. M., SILVA, A. B. S. M., PINTO, A. V., DOS SANTOS, E. P., LETÍAO, A. C., CABRAL, L. M., RODRÍGUES, C. R., de PADULA, M., SANTOS, B. A. M. C. (2019). Photoprotection assessment of olive (*Olea europaea* L.) leaves extract standardized to oleuropein: *In vitro* and *in silico* approach for improved sunscreens. *Journal of Photochemistry & Photobiology, B: Biology*, 193: 162-171.
- DINIS, T. C. P., MADEIRA, V. M. C., ALMEIDA, L. M. (1994). Action of phenolic derivatives (acetaminophen, salicylate, and 5-aminosalicylate) assay inhibitors of membrane lipid peroxidation and assay peroxyl radical scavengers. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 315(1): 161-169.
- DEKANSKI, D., JANIĆIJEVIĆ-HUDOMAL, S., TADIĆ, V., MARKOVIĆ, G., ARSIĆ, I., MITROVIĆ, D. M., (2009). Phytochemical analysis and gastroprotective activity of an olive leaf extract. *Journal of the Serbian Chemical Society*, vol. 74(4): 367-377.
- EL, S. N., KARAKAYA, S. (2009). Olive tree (*Olea europaea*) leaves: Potential beneficial effects on human health. *Nutrition Reviews*, 67: 632-638.
- FARAG, R. S., MAHMOUD, E. A., BASUNY, A. M. (2007). Use crude olive leaf juice as natural antioxidant for the stability of sunflower oil during heating. *International Journal of Food Science and Technology*, 42: 107-115.
- FERREIRE, I. C. F. R., BARROS, L., SOARES, M. E., BASTOS, M. L., PEREIRA, J. A. (2007). Antioxidant Activity and Phenolic Contents of *Olea europaea* L. Leaves Sprayed with Different Copper Formulations. *Food Chemistry*, 103: 188-195.
- FRIDOVICH, I. (1986). Superoxide dismutase. *Adv. Enzymol. Relat. Areas Mol. Biol*, 58: 61-97.
- GIKAS, E., BAZOTI, F. N., TSARBOPOULOS, A. (2007). Conformation of oleuropein, the major bioactive compound of *Olea europaea*. *J. Mol. Struct.: Theochem*, 821: 125-132.

- GOULAS, V., PAPOTI, V., EXARCHOU, V., TSIMIDOU, M. Z., GEROTHANAASIS, I. P. (2010). Contribution of flavonoids to the overall radical scavenging activity of Olive (*Olea europaea* L.) leaf polar extracts. *Journal Agricultural and Food Chemistry*, 58: 3303-3308.
- GUINDA, A., CASTELLANO, M. J., SANTOS-LOZANO, J. M., DELGADO-HERVAS, T., GUT  RREZ-ADANEZ, P., RADA, M. (2015). Determination of major bioactive compounds from olive leaf. *Food Science and Technology*, 64: 431-438.
- 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.
- HALLIWELL, B. (1994). Free radicals and antioxidants: A personal view. *Nutrition Reviews*, 52(8): 253-265.
- HALLIWELL, B., CLEMENT, M. V., LONG, L. H. (2000). Hydrogen peroxide in the human body. *FEBS Letter*, 486: 10-13.
- HARP, F. (2011). Gemlik, domat, adana topağı ve adana yerli zeytin yapraklarının antioksidan etkilerinin belirlenmesi. Y  ksek Lisans tezi,   ukurova   niv. Fen Bilimleri Enstit  s  .
- HAYES, J. E., STEPANYAN, V., ALLEN, P., O'GRADY, M. N., O'BRIEN, N. M. KERRY, J. P. (2009). The effect of lutein, sesamol, ellagic acid and olive leaf extract on lipid oxidation and oxymyoglobin oxidation in bovine and porcine muscle model systems. *Mea Science*, 83: 201-208.
- HAYOUNI, E. A., ABEDRABBA, M., BOUIX, M., HAMDI, M. (2007). The effect of solvent and extraction method on the phenolic contents and biological activities *in vitro* of tunisian *Quercus coccifera* and *Juniperus phoenicea* L. fruit extracts. *Food Chemistry*, 105(3): 1126-1134.
- IGNARRO, L. J., BUGA, G. M., WOOD, K. S., BYRNS, R. E., CHANDHURI, G. (1987). Endothelium-derived relaxing factor produced and released from artery and vein is nitric oxide. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 84: 9265-9269.
- JEMAI, H., BOUAZ  Z, M., FK  I, I., EL FEK  I, A., SAYAD  I, S. (2008). Hypolipidimic and antioxidant activities of oleuropein and its hydrolysis derivative-rich extracts from Chemlali olive leaves. *Chemico-Biological Interactions*, 176: 88-98.
- JEMAI, H., EL FEK  I, A., SAYAD  I, S. (2009). Antidiabetic and antioxidant effect hydroxytyrosol and oleuropein from olive leaves in alloxan-diabetic rats. *Journal Agricultural and Food Chemistry*, 57: 8798-8804.
- JUNTACHOTE, T., BERGHOFER, E. (2005). Antioxidative properties and stability of ethanolic extracats of holy basil and galangal. *Food Chemistry*, 92: 193-202.

- KAPLAN, M., KARAÖZ ARIHAN, S. Antik Çağdan Günümüze Bir Şifa Kaynağı: Zeytin ve Zeytinyağının Halk Tıbbında Kullanımı. VIII. Milletlerarası Türk Halk Kültürü Kongresi (21-24 Kasım 2011). İzmir/Özdere. <http://dergiler.ankara.edu.tr/dergiler/26/1748/18573.pdf>
- KESER, O., BİLAL, T. (2010). Zeytin Sanayi Yan Ürünlerinin Hayvan Beslemede Kullanım Olanakları. Hayvansal Üretim 51(1): 64-72.
- KRISTAKIS, A.K. (1998). Olive oil. From Tree to the Table. edition, food & Nutrition Pres. Inc. 2nd. sy. 3-47.
- LANZANI, A., BONDIOLI, P., FOLEGATTI, L., FEDELI, E., BONTEMPO, V., CHIOFALO, V., PANICHI, G., DELL'ORTO, V. (1993). Integrated olive husks applied to the sheep feeding: Influences on the quali-quantitative production of milk. *Riv. Ital. Sost. Grasse*, 70: 375- 383.
- LEE, J. D. (1991). Concise Inorganic Chemistry. Chapman&Hall, New York. 4th.
- LEE, O. H., LEE, B. Y. (2010). Antioxidant and antimicrobial activities of individual and combined phenolics in *Olea europaea* leaf extract. *Bioresource Technology*, 101: 3751-3754.
- MILIAUSKAS, G., VENSKUTONIS, P. R., VAN BEEK, T. A., (2004). Screening of radical scavenging activity of some medical and aromatic plant extracts. *Food Chemisrty*, 82: 231-237.
- MURRAY, R. K., STEINBERGER, D., PFANNHAUSER, M., BOSKA, M. D. (1996). Harper'ın Biyokimyası. Barış Kitapevi, İstanbul. 24. Baskı.
- NEHIR EL, S., KARAKAYA, S., TAŞ, A. A. (1999). Bazı gıdalardaki fenolik bileşiklerin antioksidan etkilerinin *in vitro* koşullarda saptanması. TÜBİTAK Projesi No: TOGTAG-1698, İzmir.
- NISHIKIMI, M., RAO, N. A., YAGI, K. (1972). The occurance of superoxide anion in the reaction of reduced phenazine methosulfate and molecular oxygen. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 46(2): 849-854.
- NONTOKOZO, Z. M., SIMELANE B. C., (2017). *Olea europaea* subs. *africana* (Oleaceae), Active Ingredients From Aromatic and Medicinal Plants. Ed.: El-Shemy, H., Croatia: National and University Library in Zagreb, Chapter 10: sy.1594.
- OGAWA, K., KANEMATSU, S., ASADA, K. (1996). Intra- and extra-cellular localization of 'cytosolic' CuZn-superoxide dismutase in spinach leaf and hypocotyls. *Plant Cell Physiol*, 37: 790-799.

- OMAR, S. H., (2010). Oleuropein in Olive and its Pharmacological Effects, *Sci Pham*, 78: 133-154.
- ONAT, T., EMERK, K., SÖZMEN, E. Y. (2002). İnsan BİYOKİMYASI. Palma Yayıncılık. Ankara.
- ORAK, H. H., KARAMAC, M., AMAROWICZ, R., ORAK, A., PENKACIK, K. (2019). Genotype-related differences in the phenolic compound profile and antioxidant activity of extracts from olive (*Olea europaea* L.) leaves. *Molecules*, 24: 1130.
- OYAIZU, M. (1986). Studies on product of browning reaction prepared from glucose amine. *Japan Journal of Nutrition*, 44: 307-315.
- ÖTLEŞ, S., ÖZYURT, V. (2012). Oleuropein ve Önemi. *Zeytin Bilimi*, 3 (1): 59-71.
- ÖZCAN, M. M., BAYDAR, H., SAĞDIÇ, O., ÖZKAN, G. (2007). Türkiye'de ticari açıdan önemli *Lamiaceae* familyasına ait baharat veya çeşni olarak kullanılan bitkilerin fenolik bileşenleri ile antioksidan ve antimikrobiyal etkilerinin belirlenmesi. *TÜBİTAK Projesi*, NO: TOGTAĞ-3319, Konya.
- PALMER, R. M. J., ASHTON, D. S., MONCADA, S. (1988). Vascular endothelium cell synthesise nitric oxide from L-Arginine. *Nature*, 333: 664-666.
- PAN, S., 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. *PFood Chemistry*, 105: 1518-1524.
- PAPOTI, V., TSIMIDOU, M. Z., (2009). Impact of sampling parameters on the radical scavenging potential of olive (*Olea europaea* L.) Leaves. *J.Agric. Food Chem*, 57: 3470-3477.
- RODRUGUES, F., PIMENTEL, F. B., OLIVEIRA, M. B. P. P. (2015) Olive by-products: Challenge application in cosmetic industry, *Industrial Crops and Products*, 70: 116-124.
- SHON, M. Y., KIM, T. H., SUNG, N. J. (2003). Antioxidants and free radical scavenging activity of *Phellinus baumii* (*Phellinus* of *Hymenochaetacea*) extracts. *Food Chemistry*, 82: 593-597.
- SNEDDON, J. W., VANE, J. R. (1988). Endothelium-derived relaxing factor reduces platelet adhesion to bovine endothelium cells. *Ibid*, 85: 1341-1344.
- SOLER-RIVAS, C., ESPIN, J. C., WICHES, H., J., (2000), Review Oleuropein and related compounds, *J. Sci. Food Agric.*, 80: 1013-1023.

- SOUILEM, S. FKI, I., KOBAYASHI, N., KHALİD. N., NEVES, M., ISODI, S., NAKAJIMA, M. (2017). Emerging technologies for recovery of value-added components from olive leaves and their applications in food/feed industries. *Food and Bioprocess Technology*, 10(2): 229-248.
- SILVA, S., GOMES, L., LEITAO, F., COELHO, A.V., VILAS BOAS, L. (2006). Phenolic Compounds and Antioxidant Activity of *Olea europaea* L. Fruits and Leaves. *International Food Science and Techonology*, 12: 385-396.
- SINGLETON, V. L., ROSSI, J. R. (1965). Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. *American Journal of Enology and Viticulture*, 16(3): 144-158.
- SPINELLI, R., PICCHI, G. (2010). Industrial harvesting of olive tree pruning residue of energy biomass. *Bioresource Technology*. 101: 730-735.
- STUPANS, I., KIRLICH, A., TUCK, K. L., HAYALL, P. J. (2002). Comparison of radical scavenging effect, inhibition of microsomal oxygen free radical generation, and serum lipoprotein oxidation of several natural antioxidants. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 50: 2464-2469.
- SUAREZ, M., ROMERO, M. P., MOTILVA, M. J. (2010). Development of a phenol-enriched olive oil with phenolic compounds from olive cake. *J. Agric. Food Chem.* 58: 10396-10403.
- TALHAOUİ N, TAAMALLİ A, GÓMEZ-CARAVACA AM, FERNÁNDEZ-GUTIÉRREZ A, SEGURA-CARRETERO A (2015). Phenolic compounds in olive leaves: Analytical determination, biotic and abiotic influence, and health benefits. *Food Research International*, 77: 92-108.
- TSIMIDOU, M. Z., PAPOTİ, V. T., (2010). Bioactive ingredients in olive leaves, *Olives and Olive Oil in Healty and Disease Prevention*. Ed.: Preddy, V., Watson, R., Chapter 39: sy. 349-356.
- WOJDYLO, A., OSZMIANSKI, J., CZEMERYYS, R. (2007). Antioxidant activity and phenolic compounds in 32 selected herbs. *Food Chemisrty*, 105(3): 940-949.
- YILDIZ, G., UYLAŞER, V. (2011). Doğal Bir Antimikrobiyel: Oleuropein. *U. Ü. Ziraat Fakültesi Dergisi*, 25(1): 131-142.

ÖZGEÇMİŞ

DOĞUM TARİHİ : 08.08.1989

DOĞUM YERİ : KARATAY/KONYA

MAİL ADRESİ : suleymanmuammer.erdogan@gmail.com

EĞİTİM : AFYON KOCATEPE ÜNİVERSİTESİ - FEN EDEBİYAT
FAKÜLTESİ - KİMYA BÖLÜMÜ LİSANS PROGRAMI
(2009 - 2016)

AFYON KOCATEPE ÜNİVERSİTESİ - FEN BİLİMLERİ
PROGRAMI (2016 - 2017)

AFYON KOCATEPE ÜNİVERSİTESİ - SAĞLI BİLİMLERİ
ENSTİTÜSÜ - BİYOKİMYA (VETERİNERLİK) YÜKSEK
LİSANS PROGRAMI (2016 - 2019)

YAYINLAR : AVCI, G , ERDOĞAN, S . (2017). Efficacy of Functional
Foods in Thyroid Dysfunction. *Kocatepe Veterinary Journal*,
10: 331-336.