

**T.C.**  
**TRAKYA ÜNİVERSİTESİ**  
**FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**BAZI ROSACEAE BİTKİLERİNİN YAPRAKLARININ ANTİDİYABETİK VE  
ANTİOKSİDAN KAPASİTELERİNİN İN VİTRO İNCELENMESİ**

**GAMZE FINDIÇAK**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**KİMYA ANABİLİM DALI**

**Tez Danışmanı: PROF. DR. ŞEBNEM SELEN İŞBİLİR**

**EDİRNE-2019**

GAMZE FINDICAK'ın hazırladığı "BAZI ROSACEAE BİTKİLERİNİN YAPRAKLARININ ANTİDİYABETİK VE ANTİOKSİDAN KAPASİTELERİNİN IN VİTRO İNCELENMESİ" başlıklı bu tez, tarafımızca okunmuş, kapsam ve niteliği açısından Kimya Anabilim Dalında bir Yüksek Lisans tezi olarak kabul edilmiştir.

Prof. Dr. Özlem SAÇAN

İmza



Prof. Dr. Hülya YAĞAR



Prof. Dr. Şebnem SELEN İŞBİLİR



Tez Savunma Tarihi: 11/07/2019

Bu tezin Yüksek Lisans tezi olarak gerekli şartları sağladığımı onaylarım.

Prof. Dr. Şebnem SELEN İŞBİLİR

İmza



Tez Danışmanı

Trakya Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü onayı



Prof. Dr. Murat YURTCAN  
Fen Bilimleri Enstitü Müdürü

**T.Ü.FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**  
**KİMYA YÜKSEK LİSANS PROGRAMI**  
**DOĞRULUK BEYANI**

Trakya Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, tez yazım kurallarına uygun olarak hazırladığım bu tez çalışmada, tüm verilerin bilimsel ve akademik kurallar çerçevesinde elde edildiğini, kullanılan verilerde tahrifat yapılmadığını, tezin akademik ve etik kurallara uygun olarak yazıldığını, kullanılan tüm literatür bilgilerinin bilimsel normlara uygun bir şekilde kaynak gösterilerek ilgili tezde yer aldığını ve bu tezin tamamı ya da herhangi bir bölümünün daha önceden Trakya Üniversitesi ya da farklı bir üniversitede tez çalışması olarak sunulmadığını beyan ederim.

11 / 07 / 2019

*Gamze FINDIÇAK*



Yüksek Lisans Tezi

Bazı Rosaceae Bitkilerinin Yapraklarının Antidiyabetik ve Antioksidan Kapasitelerinin  
in vitro İncelenmesi

T.Ü. Fen Bilimleri Enstitüsü

Kimya Anabilim Dalı

## ÖZET

Bu tez çalışmasının amacı; Rosaceae (Gülgiller) ailesine ait güvem, kuşburnu, armut, elma, ayva ve ahlat (yabani armut) ağaç yapraklarının antioksidan ve antidiyabetik kapasitelerinin araştırılmasıdır. Öncelikle; bitki yapraklarının su ve etanol ekstraktlarının toplam fenolik madde, flavonoid ve tanen miktar tayinleri yapıldı. Toplam fenolik madde miktarı Folin-Ciocalteu reaktifi, flavonoid miktarı  $AlCl_3$  çözeltisi ve tanen miktarı Folin-Denis reaktifi kullanılarak spektrofotometrik olarak belirlendi. Bitki ekstraktlarının antioksidan aktiviteleri; DPPH<sup>•</sup> ve ABTS<sup>•+</sup> giderme yöntemleri, CUPRAC yöntemi,  $\beta$ -karoten ağartma yöntemi, metal şelatlama kapasitesi olmak üzere beş yöntem kullanılarak incelendi. Antidiyabetik kapasitelerinin belirlenmesi için in vitro koşullarda  $\alpha$ -amilaz ve  $\alpha$ -glukozidaz enzim inhibisyonu yöntemleri substrat olarak nişasta ve p-nitrofenil- $\alpha$ -D-glukopiranosid (pNPG), pozitif kontrol olarak akarboz kullanılarak çalışıldı.

Ekstraktların toplam fenolik ve tanen miktarları sırasıyla, 57,70-133,93  $\mu$ g gallik asit eşdeğer/mg ve 4,07-25,7  $\mu$ g tannik asit eşdeğer/mg aralıklarında bulundu. Flavonoid miktarı, rutin eşdeğeri olarak 18,45-95,51  $\mu$ g/mg ve kersetin eşdeğeri olarak 16,92-121,06  $\mu$ g/mg aralıklarında belirlendi. DPPH ve ABTS radikal giderme yöntemleri yönünden, etanol ekstraktlarının su ekstraktlarına göre daha yüksek radikal

süpürme özelliği gösterdiği ve ayrıca tüm ekstraktların da konsantrasyon artışıyla artan aktiviteler gösterdiği gözlemlendi. Toplam antioksidan kapasiteyi değerlendiren CUPRAC metodunda TEAC değerleri tüm ekstraktlar için 7,5-21 µg/mL aralığında olup, sentetik antioksidanlar BHT ve BHA için sırasıyla 37,0 ve 41,5 µg/mL idi. β-karoten/linoleik asit sisteminde oluşturulan lipid peroksidasyonunu engelleme yönteminde, etanol ekstraktlarının standart antioksidanlar BHT, BHA, α-tokoferol ile karşılaştırılabilir düzeyde yüksek aktivite gösterdiği gözlemlendi. Etanol ekstraktlarının metal şelatlama özelliği göstermediği, su ekstraktlarının EDTA'ya göre düşük oranlarda metal şelatlama kapasitesi gösterdiği belirlendi. Antioksidan kapasite yönünden genel değerlendirildiğinde, alkol ekstraktlarının su ekstraktlarına göre daha iyi olduğu ve özellikle kuşburnu ve ayva yapraklarının yüksek antioksidan aktivite gösterdiği görüldü.

Bitki yapraklarının antidiyabetik kapasitelerinin belirlenmesi için; ekstraktların 1.0, 2.5, 5.0, 10 mg/mL konsantrasyonlarında çalışıldı. Kuşburnu ve ayva ekstraktları α-amilaz ve α-glukozidaz enzimleri üzerinde yüksek oranlarda inhibisyon etkisi gösterdi. Bu sonuç, halk arasında diyabet tedavisinde kullanılan kuşburnu ve ayva yapraklarının geleneksel kullanımını destekler niteliktedir.

Yıl : 2019

Sayfa Sayısı : 85

Anahtar Kelimeler : Flavonoid, Rosaceae, ABTS, DPPH, CUPRAC, α-amilaz inhibisyonu

Master Thesis

In vitro Investigation of Antidiabetic And Antioxidant Capacities of Some Rosaceae Plants Leaves

Trakya University Institute of Natural Sciences

Department of Chemistry

## **ABSTRACT**

The aim of this thesis is to investigate the antioxidant and antidiabetic capacity of leaves of blackthorn, rosehip, pear, apple, quince and wild pear trees, which belongs Rosaceae family. Firstly, total phenolic, flavonoid and tannin amounts of aqueous and ethanol extracts of these leaves were determined spectrophotometrically using Folin-Ciocalteu reagent,  $\text{AlCl}_3$  solution and Folin-Denis reagent, respectively. The antioxidant activities of plant extracts were examined by DPPH $\cdot$  and ABTS $^{+\cdot}$  scavenging methods, CUPRAC method,  $\beta$ -carotene bleaching method and metal chelating capacity. In order to determine their antidiabetic capacity, in vitro  $\alpha$ -amylase and  $\alpha$ -glucosidase enzyme inhibition methods were studied by using starch and p-nitrophenyl glucopyranoside (pNPG) as substrate, and acarbose as positive control.

The total phenolic and tannin amounts of the extracts were determined to be in the range of 57.70-133.93  $\mu\text{g}$  gallic acid equivalent/mg and 4.07-25.7  $\mu\text{g}$  tannic acid equivalent/mg, respectively. The amount of flavonoid was found to be in the range of 18.45-95.51  $\mu\text{g}/\text{mg}$  as routine equivalent and 16.92-121.06  $\mu\text{g}/\text{mg}$  as quercetin equivalent. In terms of DPPH and ABTS radical scavenging methods, ethanol extracts showed higher radical scavenging activity than aqueous extracts and also all extracts showed increased activity with increasing concentration. In the CUPRAC method, which evaluates the total antioxidant capacity, TEAC values were in the range of 7.5-21

$\mu\text{g/mL}$  for all extracts; for synthetic antioxidants BHT and BHA were 37.0 and 41.5  $\mu\text{g/mL}$ , respectively. In the method of inhibiting of lipid peroxidation in the  $\beta$ -carotene/linoleic acid system, ethanol extracts showed high activity comparable to standard antioxidants BHT, BHA,  $\alpha$ -tocopherol. Ethanol extracts did not show metal chelating properties, and aqueous extracts showed lower chelating capacity than EDTA. Consequently, it was seen that alcohol extracts were better than aqueous extracts and especially rosehip and quince leaves showed high antioxidant activity.

The assay of antidiabetic capacity of plant leaves were studied at extracts concentrations of 1.0, 2.5, 5.0, and 10.0 mg/mL. Rosehip and quince extracts showed high inhibition effects on  $\alpha$ -amylase and  $\alpha$ -glucosidase enzymes. This result supports the traditionally use of rosehip and quince leaves for the diabetes treatment in folk medicine.

Year : 2019

Number of Pages : 85

Keywords : Flavonoid, Rosaceae, ABTS, DPPH, CUPRAC,  $\alpha$ -amylase inhibition

## TEŞEKKÜR

Yüksek lisans eğitimim sürecinde tecrübesi, bilgisi, önerisi, yardımı, ilgi ve hoşgörüsünden yararlandığım sevgili danışman hocam Sayın Prof. Dr. Şebnem SELEN İŞBİLİR'e,

Tez çalışmam kapsamında her zaman yardımcı olan; su ekstralarının liyofilizasyonunu ve istatistik işlemlerini gerçekleştiren Sayın Doç. Dr. H. Hülya ORAK'a (Namık Kemal Üniversitesi Teknik Bilimler MYO, Gıda Teknolojisi Bölümü),

Bitki örneklerimin tür tanımlamalarını yapan T.Ü. Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü'nden Sayın Dr. Öğr. Üyesi Necmettin GÜLER'e,

Çalışmam süresince ultra saf su ihtiyaçlarımı karşılayan Trakya Üniversitesi Teknoloji Araştırma Geliştirme ve Uygulama Merkezi'ne,

Çalışmamın her aşamasında yardımlarını esirgemeyen FABAL Alüminyum San. Tic. A.Ş.'ye,

Eğitimim süresince yanımda olan arkadaşlarıma,

Her zaman desteğini hissettiğim ve yanımda olan aileme, anneciğim Gülsüm FINDICAK'a, babacığım İsmail FINDICAK'a, bitanecik ablam Selda FINDICAK İŞLEYEN'e, Can Doruk İŞLEYEN'e ve eniştem A.Caner İŞLEYEN'e,

Çok teşekkür ederim.

Bu çalışma TÜBAP-2017/199 no'lu proje kapsamında gerçekleştirilmiştir.



## İÇİNDEKİLER

	Sayfa No
<b>ÖZET</b> .....	<b>iv</b>
<b>ABSTRACT</b> .....	<b>vi</b>
<b>TEŞEKKÜR</b> .....	<b>viii</b>
<b>İÇİNDEKİLER</b> .....	<b>ix</b>
<b>SİMGELER VE KISALTMALAR</b> .....	<b>xii</b>
<b>ÇİZELGELER DİZİNİ</b> .....	<b>xiii</b>
<b>ŞEKİLLER DİZİNİ</b> .....	<b>xiv</b>
<b>BÖLÜM 1</b> .....	<b>1</b>
<b>GİRİŞ</b> .....	<b>1</b>
<b>BÖLÜM 2</b> .....	<b>4</b>
<b>KURAMSAL BİLGİLER</b> .....	<b>4</b>
1.1. Serbest Radikaller.....	4
1.2. Serbest Radikallerin Hücresel Moleküllere Etkileri.....	6
1.3. Oksidatif Stres.....	8
1.4. Diabetes Mellitus (DM) ve Türleri.....	9
1.4.1. $\alpha$ -Amilaz ve $\alpha$ -Glukozidaz Enzimleri.....	10
1.4.2. Diyabet Hastalığında Bitkisel Yaklaşım.....	11
1.5. Antioksidanlar / Antioksidan Savunma Elemanları.....	13
1.5.1. Antioksidanların Sınıflandırılması.....	14
1.5.2. Antioksidan Kaynağı Olarak Bitkiler.....	17
1.5.2.1 Polifenolik Bileşikler.....	17
1.5.2.1.1. Flavonoidler.....	18
1.5.2.1.2. Tanenler.....	19
1.5.3. Antioksidan Aktivite Tayin Yöntemleri.....	20
1.5.3.1. Tez Çalışmasında Kullanılan Antioksidan Aktivite Tayin Yöntemleri....	22
1.5.3.1.1. FCR ile toplam fenolik bileşik tayini.....	22
1.5.3.1.2. DPPH radikali giderme metodu.....	22
1.5.3.1.3. ABTS katyonik radikali giderme metodu.....	23
1.5.3.1.4. CUPRAC yöntemi (Bakır (II) iyonu indirgeme antioksidan kapasitesi)	24
1.5.3.1.5. İndirgeme gücü tayini.....	24
1.5.3.1.6. $\beta$ -karoten renk açılım yöntemi.....	24
1.6. Çalışmada Kullanılan Bitkiler.....	25

1.6.1. Elma ( <i>Malus sylvestris</i> Miller).....	25
1.6.2. Ayva ( <i>Cydonia oblonga</i> Miller).....	25
1.6.3. Armut ( <i>Pyrus communis</i> L.).....	25
1.6.4. Ahlat ( <i>Pyrus elaeagnifolia</i> L.).....	26
1.6.5. Kuşburnu ( <i>Rosa canina</i> L.).....	26
1.6.6. Güvem ( <i>Prunus spinosa</i> L.).....	27
1.7. Tezde Kullanılan Bitkilerin Antioksidan ve Antidiyabetik Aktiviteleriyle İlgili Literatür Araştırması.....	27
1.7.1. Tezde Kullanılan Bitkilerle İlgili Yapılmış Olan Antioksidan Aktivite Çalışmaları.....	27
1.7.2. Tezde Kullanılan Bitkilerle İlgili Yapılmış Olan Antidiyabetik Aktivite Çalışmaları.....	30
<b>BÖLÜM 3.....</b>	<b>32</b>
<b>MATERYAL ve METODLAR.....</b>	<b>32</b>
2.1. Materyaller.....	32
2.1.1. Kullanılan Kimyasal Maddeler.....	32
2.1.2. Kullanılan Cihazlar.....	32
2.1.3. Çalışmada Kullanılan Çözeltiler.....	33
2.1.3.1. Toplam Fenolik Madde Tayininde Kullanılan Çözeltiler.....	33
2.1.3.2. Toplam Flavonoid Tayininde Kullanılan Çözeltiler.....	33
2.1.3.3. Tanen Tayininde Kullanılan Çözeltiler.....	34
2.1.3.4. DPPH* Giderme Metodunda Kullanılan Çözeltiler.....	34
2.1.3.5. ABTS <sup>+</sup> Giderme Metodunda Kullanılan Çözeltiler.....	34
2.1.3.6. CUPRAC Metodunda Kullanılan Çözeltiler.....	35
2.1.3.7. $\beta$ -Karoten Ağartma Yönteminde Kullanılan Çözeltiler.....	35
2.1.3.8. Metal Şelatlama Yönteminde Kullanılan Çözeltiler.....	35
2.1.3.9. $\alpha$ -Amilaz Enzim Aktivitesi ve İnhibisyonu İçin Kullanılan Çözeltiler....	36
2.1.3.10. $\alpha$ -Glukozidaz Enzim İnhibisyonu İçin Kullanılan Çözeltiler.....	36
2.2. Metodlar.....	37
2.2.1. Bitki Ekstraktlarının Hazırlanması.....	37
2.2.2. Fitobileşenlerin Tayini.....	39
2.2.2.1. Toplam Fenolik Madde (TPC) Tayini.....	39
2.2.2.2. Toplam Flavonoid Tayini.....	39
2.2.2.3. Tanen Tayini.....	40
2.2.3. Antioksidan Aktivite Tayin Metodları.....	40
2.2.3.1. DPPH* Giderme Metodu.....	40
2.2.3.2. ABTS <sup>+</sup> Giderme Metodları.....	41
2.2.3.3. CUPRAC Metodu.....	42
2.2.3.4. $\beta$ -Karoten Ağartma Metodu.....	42
2.2.3.5. Metal Şelatlama Kapasitesi.....	43
2.2.4. Antidiyabetik Aktivite Tayin Metodları.....	44
2.2.4.1. $\alpha$ -Amilaz Enzim İnhibisyonu.....	44

2.2.4.2. $\alpha$ -Glukozidaz Enzim İnhibisyonu.....	44
2.2.5. İstatistiksel Analiz.....	45
<b>BÖLÜM 4.....</b>	<b>46</b>
<b>BULGULAR.....</b>	<b>46</b>
3.1. Fitobileşenlerin Tayini.....	46
3.1.1. Toplam Fenolik Madde Tayini.....	48
3.1.2. Toplam Flavonoid Tayini.....	49
3.1.3. Tanen Tayini.....	50
3.2. Antioksidan Aktivite Tayin Metodları.....	50
3.2.1. DPPH* Giderme Metodu.....	50
3.2.2. ABTS <sup>•+</sup> Giderme Metodu.....	53
3.2.3. CUPRAC Metodu.....	55
3.2.4. $\beta$ - Karoten Ağartma Metodu.....	56
3.2.5. Metal Şelatlama Kapasitesi.....	59
3.3. Antidiyabetik Aktivite Tayini.....	60
<b>BÖLÜM 5.....</b>	<b>66</b>
<b>TARTIŞMA.....</b>	<b>66</b>
<b>KAYNAKLAR.....</b>	<b>73</b>
<b>ÖZGEÇMİŞ.....</b>	<b>83</b>
<b>TEZ ÖĞRENCİSİNE AİT TEZ İLE İLGİLİ BİLİMSEL FAALİYETLER.</b>	<b>84</b>

## SİMGELER VE KISALTMALAR

<b>•NO</b>	: Nitrik Oksit
<b>•OH</b>	: Hidroksil Radikali
<b><sup>1</sup>O<sub>2</sub></b>	: Singlet Oksijen
<b>ABTS</b>	: 2,2'-Azinobis (3-etilbenzotiazolin-6-sülfonik Asit)
<b>ABTS<sup>•+</sup></b>	: ABTS Radikali
<b>BHA</b>	: Bütillenmiş Hidroksi Anisol
<b>BHT</b>	: Bütillenmiş Hidroksi Toluen
<b>CAT</b>	: Katalaz
<b>CUPRAC</b>	: Bakır (II) İyonu İndirgeme Antioksidan Kapasitesi
<b>DM</b>	: Diabetes mellitus
<b>DNS</b>	: 3,5-Dinitro Salisilik Asit
<b>DPPH</b>	: 1,1-Difenil-2-Pikrilhidrazil
<b>EC<sub>50</sub></b>	: Etkin Konsantrasyon
<b>EDTA</b>	: Etilendiamin Tetraasetik Asit
<b>EtOH</b>	: Etanol
<b>FCR</b>	: Folin-Ciocalteu Ayırıcı
<b>GAE</b>	: Gallik Asit Eşdeğeri
<b>GPx</b>	: Glutasyon Peroksidaz
<b>H<sub>2</sub>O<sub>2</sub></b>	: Hidrojen Peroksit
<b>HAT</b>	: Hidrojen Atomu Transferi
<b>IDF</b>	: Uluslararası Diyabet Federasyonu
<b>KE</b>	: Kateşin Eşdeğeri
<b>O<sub>2</sub><sup>•-</sup></b>	: Süperoksit Anyonu
<b>PG</b>	: Propil Gallat
<b>R•</b>	: Karbon Merkezli Organik Radikal
<b>RE</b>	: Rutin Eşdeğeri
<b>RO•</b>	: Alkoksil Radikali
<b>ROO•</b>	: Peroksil Radikali
<b>ROT</b>	: Reaktif Oksijen Türleri
<b>RSO•</b>	: Sülfenil Radikali
<b>RSO<sub>2</sub>•</b>	: Tiyil Peroksil Radikali
<b>SD</b>	: Standart Sapma
<b>SET</b>	: Bir Tek Elektron Transferi
<b>SOD</b>	: Süperoksit Dismutaz
<b>SR</b>	: Serbest Radikal
<b>TAE</b>	: Tannik Asit Eşdeğeri
<b>TEAC</b>	: Trolox Eşdeğeri

## ÇİZELGELER DİZİNİ

	Sayfa No
<b>Çizelge 1.1.</b> : Farklı antioksidanların lipid peroksidasyonu üzerindeki etkisine göre sınıflandırması.....	15
<b>Çizelge 1.2.</b> : Antioksidanların alfabetik sınıflandırması ve bu kategorilere örnekler.....	15
<b>Çizelge 3.1.</b> : Bitkilerden elde edilen su ve etanol ekstraktlarının toplam fenolik, flavonoid ve tanen miktarları .....	49
<b>Çizelge 3.2.</b> : Bitkilerden elde edilen su ve etanol ekstraktlarının DPPH radikali giderme oranları (% inhibisyon) .....	51
<b>Çizelge 3.3.</b> : Bitkilerden elde edilen su ve etanol ekstraktlarının ABTS radikali giderme oranları (% inhibisyon) .....	53
<b>Çizelge 3.4.</b> : Ekstraktların CUPRAC metodundan elde edilen TEAC (Troloks ekivalenti antioksidan kapasite) değerleri .....	55
<b>Çizelge 3.5.</b> : Bitkilerden elde edilen su ekstraktlarının beta karoten ağartma aktiviteleri (Lipid peroksidasyonunun % inhibisyonu).....	57
<b>Çizelge 3.6.</b> : Bitkilerden elde edilen etanol ekstraktlarının beta karoten ağartma aktiviteleri (Lipid peroksidasyonunun % inhibisyonu)..	58
<b>Çizelge 3.7.</b> : Bitkilerin su ekstraktlarının ve EDTA'nın değişen konsantrasyonlarında, metal iyonu şelatlama oranları (%)......	60
<b>Çizelge 3.8.</b> : Akarboz, örneklerin su ve alkol ekstraktlarının alfa-amilaz enzimini inhibe etme oranları (%)......	60
<b>Çizelge 3.9.</b> : Akarboz ve örneklerin su ekstraktlarının alfa-glukozidaz enzimini inhibe etme oranları (%)......	63
<b>Çizelge 3.10.</b> Çalışmada kullanılan bitkilerin antioksidan ve antidiyabetik karakteristikleri ile içerdikleri fitobileşenlerinin korelasyon analizi tablosu.....	65

## ŞEKİLLER DİZİNİ

	Sayfa No
Şekil 1.1. : Reaktif oksijen türlerini oluşturan sebepler.....	5
Şekil 1.2. : Serbest radikallerin hücresel hedefleri.....	7
Şekil 1.3. : Amiloz ve amilopektinin $\alpha$ -amilaz ile hidrolizi.....	11
Şekil 1.4. : Antioksidanların sınıflandırılması.....	16
Şekil 1.5. : Temel flavonoid iskeleti.....	18
Şekil 1.6. : Flavonoid yapısı.....	19
Şekil 1.7. : DPPH radikalinin antioksidan molekül ile reaksiyonu.....	22
Şekil 1.8. : ABTS'nin kimyasal reaksiyonu.....	23
Şekil 1.9. : CUPRAC yöntemine ait kimyasal reaksiyon.....	24
Şekil 2.1. : Tezde kullanılan bitki yapraklarından alkol ekstraktı hazırlama aşamaları.....	38
Şekil 3.1. : Toplam fenolik madde tayini için hazırlanan Gallik asit standart grafiği.....	47
Şekil 3.2. : Flavonoid tayini için hazırlanan Rutin standart grafiği.....	47
Şekil 3.3. : Flavonoid tayini için hazırlanan Kateşin standart grafiği.....	48
Şekil 3.4. : Tanen tayini için hazırlanan Tannik asit standart grafiği.....	48
Şekil 3.5. : Bitkilerin su ve etanol ekstraktlarının içerdiği polifenolik bileşen miktarları.....	50
Şekil 3.6. : Örneklerin su ekstraktlarının DPPH' giderme oranları.....	52
Şekil 3.7. : Örneklerin etanol ekstraktlarının DPPH' giderme oranları....	52
Şekil 3.8. : Örneklerin su ekstraktlarının ABTS <sup>+</sup> giderme oranları.....	54
Şekil 3.9. : Örneklerin etanol ekstraktlarının ABTS <sup>+</sup> giderme oranları..	54
Şekil 3.10. : Su ve alkol ekstraktlarının ABTS <sup>+</sup> giderme etkilerinin karşılaştırılması.....	55
Şekil 3.11. : Bitkilerin su ve etanol ekstraktlarının TEAC <sub>CUPRAC</sub> değerleri.....	56

<b>Şekil 3.12.</b>	: Örneklerin su ekstraktlarının beta karoten/linoleik asit sisteminde lipid peroksidasyonunu önleme aktiviteleri.....	57
<b>Şekil 3.13.</b>	: Örneklerin etanol ekstraktlarının beta karoten/linoleik asit sisteminde lipid peroksidasyonunu önleme aktiviteleri.....	58
<b>Şekil 3.14.</b>	: Bitkilerin su ekstraktlarının metal iyonu şelatlama aktiviteleri.....	59
<b>Şekil 3.15.</b>	: Su ekstraktlarının $\alpha$ -amilaz enzimi üzerindeki % inhibisyon değerleri.....	61
<b>Şekil 3.16.</b>	: Etanol ekstraktlarının $\alpha$ -amilaz enzimi üzerindeki % inhibisyon değerleri.....	62
<b>Şekil 3.17.</b>	: Su ekstraktlarının $\alpha$ -glukozidaz enzimi üzerindeki % inhibisyon değerleri.....	63

# BÖLÜM 1

## GİRİŞ

Serbest radikaller kanser, diyabet, yaşlanma, ateroskleroz, katarakt, kalp hastalıkları gibi pekçok patofizyolojik süreçte rol oynamaktadır. Ayrıca reaktif oksijen türleri yağlarda ve yağ içeren gıdalarda lipid peroksidasyonuna ve bunun sonucunda gıdalarda istenmeyen renk, tat, tekstür değişimi gibi bozulmalara neden olmaktadır. Antioksidanlar serbest radikallerin etkilerini azaltabilen veya ortadan kaldıracı küçük moleköl ağırlıklı, endojen veya eksojen bileşiklerdir. Bu nedenle ortaya çıkabilecek hastalıklardan korunmak için antioksidan etkiye sahip çeşitli meyve ve sebzelerin tüketilmesi tavsiye edilmektedir. Bitkisel kaynaklardan elde edilen antioksidanlar, sentetik olanlara göre daha avantajlı ve tercih edilir oldukları için, hem gıda takviyesi olarak hem de gıda, ilaç veya kozmetik sektöründe kullanılmak üzere aranan önemli bileşikler haline gelmiştir.

Bitkiler insanlar için her zaman hem besin, hem de ilaç kaynağı olmuşturlar. Bitkiler ve bitkilerdeki etken maddeler ilaç sanayi yanında özellikle gıda ve kozmetik endüstrilerinde de önemli bir yere sahiptir. Bu sebeple bitkilerdeki etken maddelerin ve onların etkilerinin araştırılması ilgi çekici bilimsel çalışma alanlarından birisidir. Bitkilerin etkileri içerdikleri fenolik asitler, flavonoidler, antosiyaninler, terpenoidler, alkaloidler ve fitosteroller gibi sekonder metabolitlerden kaynaklanmaktadır. Bu metabolitler sayesinde bitkiler antiviral, antimikrobiyal, antioksidan, antitümör, antiinflamatuar, antidiyabetik aktiviteler başta olmak üzere farklı biyolojik etkiler gösterirler. Modern tıbbın önerdiği ilaç tedavisine paralel olarak halk arasında çeşitli hastalıklarda doğal ürünlerin kullanımı halen bir seçenek olarak devam etmektedir. Birçok ülkede geleneksel olarak çeşitli baharat, tohum, bitkilerin kök, yaprak, dal ve kabuklarından bitki ekstraktları hazırlanmakta ve başlıca diyabet, romatizma, öksürük,



soğuk algınlığı, astım, bronşit, hemoroid, egzema ve ağrıların iyileştirilmesinde kullanılmaktadır.

Özellikle doğu ülkelerinin birçoğunda olduğu gibi ülkemizde de halk arasında şeker hastalığının tedavisi için çeşitli bitkiler kullanılmaktadır. Tarçın, çörekotu, karadut, zeytin yaprağı, yaban mersini, kimyon tohumu, rezene, kırkkilit otu, fesleğen, yer elması, ayva yaprağı, ısırgan, nar kısımları, bamya, kudret narı, çemen, Ginseng türleri, tetra, maydanoz, pelinotu, devediken, kenger, yeralması, solmaz çiçek, karahindibağ, çobançantası, mürver, kızılıçık, ardiç, ceviz, kekik, adaçayı, ebegümece, dut, hünnap, acıbadem, ısırgan, mahlep, vişne, alıç, ayva, taflan, yabani elma, muşmula, güvem, ahlata, kuşburnu, böğürtlen ve üzüm bunlardan bazılarıdır. Şeker hastalığının tedavisinde geleneksel olarak kullanılan bu bitkilerin bazıları Rosaceae ailesindedir.

Rosaceae (Gülgiller) ailesi çiçekli bitkiler gruplarından biri olup, 90'ın üzerinde cinsi 2500 türü ile dünyada geniş bir dağılım alanı gösterir. Özellikle ılıman bölgelerde ekonomik değeri olan bitki gruplarından biridir. Bu ailenin meyveleri, insan diyetinin önemli bir parçasını oluşturmaktadır. Elma, kayısı, armut, ayva, şeftali, muşmula, kiraz, kuşburnu, güvem bu ailenin bazı üyeleridir. Meyveleri askorbik asit, tanenler, flavonidler de kapsayan fenolik bileşikler ve çeşitli biyolojik aktiviteler gösteren diğer fitokimyasallar bakımından zengindir. Ülkemizin farklı yörelerinde bu aileye ait bazı üyelerinin çeşitli kısımları diyabete karşı kullanılmaktadır.

Tip 2 diyabet tedavisindeki stratejilerden biri  $\alpha$ -amilaz ve  $\alpha$ -glukozidaz gibi glikozidaz enzimlerinin inhibisyonudur. Karbonhidratları hidroliz eden bu enzimlerin inhibisyonu yoluyla glukoz emilimi önlenerek, yemek sonrası oluşan postprandiyal hiperglisemi azaltılabilmektedir. Özellikle Tip 2 diyabette postprandiyal hiperglisemi kontrol etmek üzere; baharatlar, meyveler ve sebzeler gibi bitkisel kaynaklardan doğal  $\alpha$ -amilaz ve  $\alpha$ -glukozidaz inhibitörü olabilecek kaynaklar araştırılmaktadır.

Fenolik bileşikler bitkiler aleminde yaygın olarak bulunan maddelerdir. Polifenoller ve flavonoidler gibi fenolik bileşiklerin bu enzimleri inhibe ettiğine dair çalışmalar vardır. Ayrıca fenolik bileşikler antioksidan etkileriyle gerek vücutta, gerekse gıdalardaki istenmeyen radikalik prosesleri önlemede önemli rol oynarlar. Tez kapsamında meyveleri tüketilen ancak yaprakları gıda olarak tüketilmeyen Gülgiller (Rosaceae) ailesine ait bazı bitkilerin yapraklarıyla çalışılması planlanmıştır. Çalışmada Rosaceae ailesine ait ve yaygın olarak bulunan armut, elma, ayva, kuşburnu, güvem ve

yabani armut olarak da bilinen ahlat ağaçlarının yapraklarının diyabet tedavisindeki olası potansiyelleri kısmen araştırılmıştır.

Diğer yandan bitkiler, baharatlar, sebzeler ve meyveler etkili birer antioksidan kaynağıdır. Bunların antioksidan özellikleri flavonoid, fenolik asit, tanen gibi polifenolik bileşikler ve alkaloid, karotenoid, askorbik asit,  $\alpha$ -tokoferol gibi diğer fitokimyasal içeriklerinden kaynaklanmaktadır. Antioksidanlar beslenme, farmasötik ve gıda endüstrisi için önemli unsurlar oldukları için, bu endüstrilerde kullanılmak üzere doğal kaynaklardan antioksidan arayışları da hala devam etmektedir. Bu yüzden çalışmada bu Rosaceae bitkilerinin yapraklarının antidiyabetik etkilerinin yanında antioksidan kapasiteleri de araştırılmıştır.

Yapılan tez çalışmasında kuşburnu, güvem, elma, armut, ayva ve ahlat (yabani armut) ağaçlarından toplanan yaprakların su ve etanol ekstraktları elde edilerek, beş farklı metodla antioksidan kapasitesi ve  $\alpha$ -amilaz ve  $\alpha$ -glukozidaz enzimleri üzerindeki inhibisyon etkisi çalışıldı. Gözlenen aktivitelerden sorumlu olan maddelerden fenolik bileşen, flavonoid ve tanen miktar tayinleri de yapıldı.

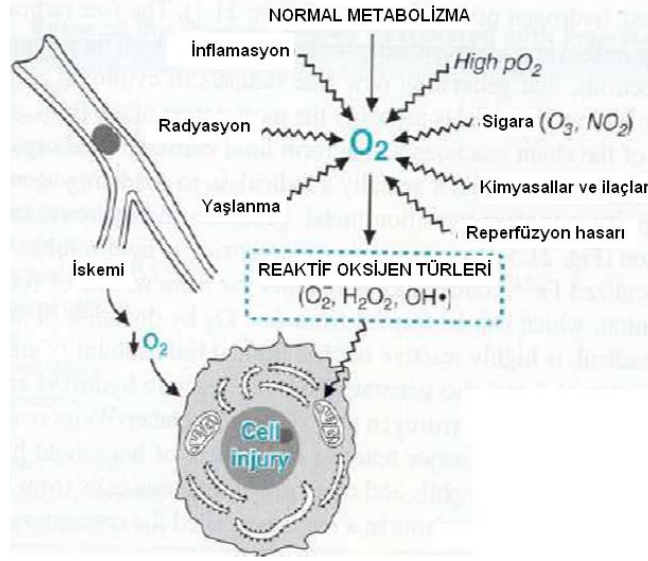
## BÖLÜM 2

### KURAMSAL BİLGİLER

#### 2.1. Serbest Radikaller

Atom veya moleküllerdeki elektronlar çekirdeğin etrafında orbital olarak tanımlanan bölgelerde hareket ederler. Her yörüngede birbirine zıt yönde hareket eden en fazla iki elektron bulunur. Bir atom veya molekül dış orbitallerinde bir veya daha fazla ortaklanmamış (eşleşmemiş) elektron bulunduruyorsa serbest radikal (SR) olarak tanımlanır. Bir moleküldeki kovalent bağların homolitik kırılması, bir molekülün elektron kaybetmesi veya bir moleküle bir tek elektron transferi olmak üzere başlıca üç yolla oluşurlar. Serbest radikaller ortaklanmamış elektron içerdikleri için oldukça kararsızdırlar ve kısa ömürlüdürler. Çeşitli fiziksel etkenler ve kimyasal olaylar nedeniyle çevrede ve hücrel koşullarda devamlı bir radikal yapımı vardır. Biyolojik sistemlerdeki en önemli radikaller reaktif oksijen türleri (ROT) olarak adlandırılan süperoksit anyonu ( $O_2^{\bullet-}$ ), hidroksil radikali ( $\bullet OH$ ), singlet oksijen ( $^1O_2$ ) ve hidrojen peroksit ( $H_2O_2$ )'tir. Bununla beraber karbon, azot, kükürt türevi olan radikaller de (karbon merkezli organik radikaller ( $R^{\bullet}$ ), alkoksil radikalleri ( $RO^{\bullet}$ ), peroksil radikali ( $ROO^{\bullet}$ ), nitrik oksit ( $\bullet NO$ ), sülfenil ( $RSO^{\bullet}$ ) tiyil peroksil ( $RSO_2^{\bullet}$ ) radikali gibi) mevcuttur (Akkuş, 1995).

Serbest radikaller ve diğer reaktif oksijen türleri organizmada endojen ve eksojen sebeplerden dolayı sürekli üretilirler (Şekil 2.1).



**Şekil 2.1.** Reaktif oksijen türlerini oluşturan sebepler

a) Endojen olarak; NO, HOCl gibi fizyolojik rolü olanlar özel metabolik olaylar için üretilirler veya metabolik olaylar sırasında kazara üretilirler. Heriki durumda da reaktif oksijen türlerinin miktarının artmadan etkisizleştirilmesi gerekir, aksi halde tüm biyolojik moleküllere zarar vererek hücre hasarına yolaçarlar. İntrasellüler ROT kaynaklarının bazıları şunlardır (Akkuş, 1995; Karabulut & Gülay, 2016):

- Mitokondride aerobik solunum sırasında elektron taşıma zincirinde meydana gelen kaçaklar sonucu, elektronlar  $O_2^{\bullet-}$ ,  $OH^{\bullet}$  veya  $H_2O_2$  üretmek üzere oksijen ile etkileşime girerler.
- Birçok enzimin (ksantin oksidaz, amino asit oksidaz, triptofan dioksijenaz, lipoksijenazlar gibi) katalitik döngüleri sırasında SR oluşabilir.
- Araşidonik asit metabolizması, nitrik oksit sentaz (NOS) enzimi ve peroksizomlar gibi çeşitli kaynaklardan çeşitli SR türleri oluşabilir.
- Nötrofiller ve makrofajlar fagosite edilmiş mikroorganizmayı öldürmek amaçlı çeşitli serbest oksijen radikallerini (süperoksit anyonu,  $H_2O_2$ , hidroksil radikali ve HOCl) üretirler.
- Tiyoller, tetrahidrofolatlar, flavinler gibi bazı küçük moleküllerin otooksidasyonu da süperoksit radikali kaynağıdır.
- Zihinsel veya yorgunluk kaynaklı stres katekolamin sentezinde artış yapar. Katekolaminlerin oksidasyonu da serbest radikal oluşumuna yol açar.

- Hücrede SR üretimi bazı yabancı toksik maddeler tarafından da arttırılabilir. Mesela toksinin kendisi bir SR'e metabolize olarak bozunabilir veya toksinin metabolize edilmesi sonucu serbest oksijen radikali meydana gelebilir.

**b)** Serbest radikal oluşumuna neden olan başlıca ekzojen kaynaklar radyasyon ve çevresel ajanlardır (hava kirliliği, pestisitler, sigara dumanı, çözücüler, anestezikler).

- Canlı organizmaların iyonize ve iyonize olmayan ışımaya maruz kalması ROS'un başlıca ekzojen kaynağını oluşturmaktadır.

- Ozon fotokimyasal hava kirliliğinin önemli bir bileşenidir ve biyolojik molekülleri direkt olarak oksitleyebilir.

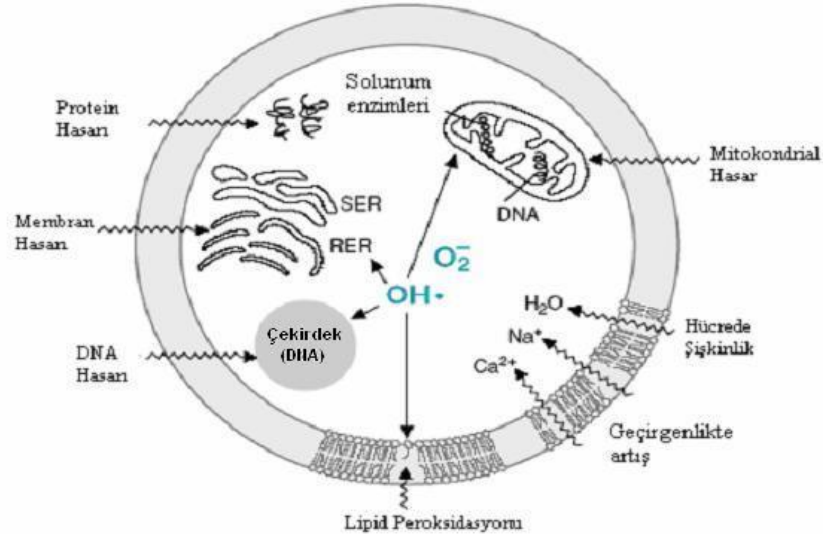
- Egzoz dumanı, sigara dumanı ve endüstriyel kontaminantlar, aromatik hidrokarbonlar gibi hava kirleticileri ROT kaynaklarını oluşturmaktadır.

- Ksenobiyotikler (örneğin toksinler, pestisitler ve parakuat gibi herbisitler) ve kimyasallar (örneğin hardal gazı, benzen, toluen, formaldehit)'in in vivo metabolizması sırasında yan ürünü olarak ROT üretilir.

- Tüketilen gıdaların bazıları yüksek derecede oksitlenmiş olabilir ve peroksitler, aldehitler, oksitlenmiş yağ asitleri gibi çeşitli oksidanları içerebilirler.

## **2.2. Serbest Radikallerin Hücresel Moleküllere Etkileri**

Serbest radikallerin aşırı ve kontrolsüz üretimi hücreler için zararlıdır. Güçlü reaktif özelliklerinden dolayı hem direk hücre bileşenlerine zarar verirler, hem de toksik yan ürünlerin oluşumuna neden olurlar (Şekil 2.2). SR'ler hücrenin savunma mekanizmaları ile ortadan kaldırılamazlarsa, hücredeki tüm makromoleküller (lipidler, proteinler, nükleik asitler, karbonhidratlar) ile kolayca reaksiyona girerek, onların normal fonksiyonlarını kaybetmesine ve geri dönüşümsüz hasarlara yol açarlar.



**Şekil 2.2.** Serbest radikallerin hücredeki hedefleri (Onat, Emerk & Sözmen, 2002)

SR'lere karşı en hassas biyomoleküller lipidlerdir. Hücre membranları iki katlı lipid tabakadan oluşmuştur ve özellikle fosfolipidlerce zengindir. Hücre membranlarındaki ve hücre organellerinin membranlarında, lipid peroksidasyonu serbest radikallerin hepsiyle başlatılabilir ve katalizör olarak görev yapan geçiş metallerinin varlığında oksidasyon daha da artar. Lipid peroksidasyonu sonucu membran yapısı direkt zarar görebilir veya peroksidasyon sonucu oluşan reaktif aldehytler de diğer hücresel bileşenlere indirek olarak zarar verebilir; bu geri dönüşümsüz bir olaydır. Diğer yandan gıdaların ve yağların korunması/depolanması sırasında karşılaşılan en büyük problemlerden biri gıdalarda meydana gelen lipid peroksidasyonudur. Bu olay yağ içeren gıdalarda renk, tat, aroma, tekstür ve kıvamda bozulmalara; yağlarda acılaşmaya (ransidleşme) ve besinsel kalitenin azalmasına neden olmaktadır. Bu sebeple yağ ve gıda sanayi oksidasyon prosesini yavaşlatmak veya durdurmak ihtiyacındadır (Ahmed vd., 2016).

SR'ler özellikle hidroksil radikali DNA üzerinde de çeşitli hasarlar oluşabilir. Bunlar arasında DNA baz modifikasyonları, DNA tek ve çift zincirinin kırılmaları, purinlerin kaybı, deoksiriboz şekerin hasarlanması ve DNA-protein çapraz bağı oluşumu sayılabilir. DNA'da oksidatif yolla hasarlanmış baz ürünlerinden bazıları

nükleozid olan 8-hidroksi deoksiguanozin (8-OHdG), 8-hidroksi adenin ve 5-hidroksi sitozin'dir (Dizdaroğlu, Coşkun & Jaruga, 2015). Oluşan DNA hasarları onarılmazsa hücre disfonksiyonuna ve kansere yol açabilir.

Proteinler ve protein yapılı olan enzimler canlı hücrelerin ana elemanları olduklarından, yapılarındaki küçük bir değişiklik, onların fonksiyonlarında büyük bir değişime yol açar. Proteinlerin SR hasarından ne derece etkileneceği proteinin amino asit içeriğine bağlıdır. Triptofan, tirozin, fenilalanin, histidin gibi doymamış bağlı ve metiyonin, sistein gibi kükürtlü amino asitleri içeren proteinler SR saldırısından kolaylıkla etkilenir. Oksidatif hasar sonucunda oluşan birincil, ikincil ve üçüncül yapıdaki bozukluklar protein moleküllerinin çapraz bağlanmasına veya yıkımına yol açar (Aldred, 2009).

Serbest radikallerin karbonhidratlar üzerinde de olumsuz etkileri vardır; polisakkaritlerin depolimerizasyonuna ve özellikle monosakkarit otooksidasyonuna yol açarlar. Monosakkaritlerin otooksidasyonu sonucu süperoksitler ve okzalaldehitler meydana gelir, bunların DNA, RNA ve proteinlere bağlanabilme özellikleri vardır. Böylece kanser ve yaşlanma olaylarında da rol oynarlar (Akkuş, 1995).

Özetle SR'ler başta yağlar, proteinler ve nükleik asitler olmak üzere tüm moleküllerin zarar görmesine ve fonksiyonlarını kaybetmesine neden olurlar. Ancak sağlıklı bir organizmada serbest radikaller hücrelerin özel savunma mekanizmaları ile ortadan kaldırılmakta ve ROT üretimi antioksidan savunma sistemleri tarafından dengelenmektedir.

### **2.3. Oksidatif Stres**

Oksidatif stres, serbest radikal üretimi ve antioksidan savunma sistemleri arasındaki dengesizliğin bir sonucu olarak ortaya çıkan bir durumdur. Serbest radikaller, birçok biyokimyasal reaksiyonda bir yan ürünü olarak ve bazı durumlarda (aktive edilmiş nötrofillerde olduğu gibi) gerekli oldukları için üretilirler. Ayrıca çevreden gelen elektromanyetik radyasyon, doğrudan ozon ve azot dioksit gibi oksitleyici kirleticiler de serbest radikalleri üretilmesine yolaçabilir ve vücuttaki antioksidan savunma elemanları eksikse, çeşitli dokularda hasarlar oluşur. Bu yüzden "Oksidatif stres" reaktif oksijen türlerinin üretimi ile antioksidan savunma arasındaki kritik

dengeinin doku hasarına yol açabilecek bir şekilde, oksidanlar lehine bozulması olarak tanımlanmıştır (Betteridge, 2000).

Oksidatif stresin birçok hastalık durumunda önemli bir rol oynadığı bilinmektedir. Astım, kronik obstruktif akciğer hastalığı (KOAH), kistik fibrozis, hepatit ve karaciğer hastalıkları, göz hastalıkları (katarakt oluşumu, maküler dejenerasyon), Crohn's hastalığı, inflamasyon, romatoid artrit, nörodejeneratif hastalıklar, obezite ve metabolik sendrom, pankreatit, deri hastalıkları, felç, infertilite, iskemi/reperfüzyon hasarı ve ateroskleroz oksidatif stresin rolünün kesin olarak tespit edildiği hastalıklardır (Dasgupta & Klein, 2014). Ayrıca oksidatif stres ile dolaylı ilişkisinin olduğu önerilen birçok hastalık da vardır, ancak bu hastalıklar ile oksidatif stresin patofizyolojisindeki rolü arasında sağlam bir ilişki kurmak için daha fazla araştırma yapılması gerekmektedir (Dasgupta & Klein, 2014).

Reaktif oksijen türlerinin üretimi ve antioksidan savunma arasındaki dengeinin oksidanlar yönüne kayması olarak açıklanan oksidatif stresin, şeker hastalığında (Diabetes mellitus) doku hasarı oluşumundaki olası rolüyle ilgili olarak tartışılmaktadır (Betteridge, 2000; Asmat, Abad & İsmail, 2016).

#### **2.4. Diabetes Mellitus (DM) ve Türleri**

Diabetes mellitus (DM) insülin sentezindeki, insülinin çalışmasındaki veya herikisindeki eksiklikten kaynaklanan metabolik bir hastalıktır. Kanda yüksek şeker miktarıyla karakterize edilmesine rağmen, sadece karbonhidrat metabolizmasıyla ilişkili olmayıp, yağ ve protein metabolizmalarıyla da ilişkili kronik bir hastalıktır (Beslenme ve Diyet, 2019). Diyabet iyi takip ve tedavi edilmediğinde çeşitli organlarda da hasar oluşumuna yol açar. İlerlemiş diyabet hastalarında retinopati (retina ve göz damarlarında bozukluğa bağlı görme kaybı), nefropati (böbrek yetmezliğine yol açan), nöropati (sinir harabiyeti) dahil olmak üzere kalbi besleyen ve beyin damarlarında bozukluklar gelişebilir (Govindappa, 2015).

Şeker hastalığının genellikle Tip 1 ve Tip 2 çeşitleri bilinir. Tip 1 diyabette pankreas insülin üretmez, genellikle çocukluk döneminde ortaya çıkar. İnsülin üretiminin yetersiz olması veya hiç olmamasından dolayı, tedavisi dışarıdan insülin alınmasıdır. Tip 2 diyabet daha sık görülen diyabet çeşididir. İnsülin sekresyonu veya faaliyetinde azalma, hücrelerin insüline karşı duyarsızlaşması sonucu görülür.



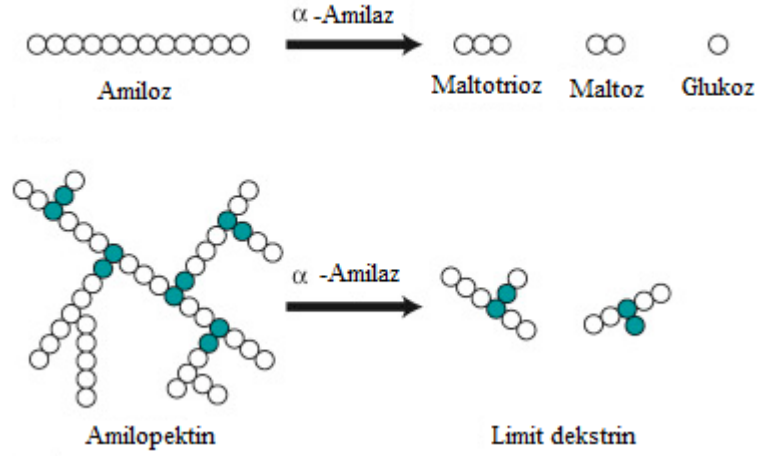
Genellikle yetişkinlerde (40 yaş sonrası) ortaya çıkar ve tüm diyabetlilerin % 90'ını kapsar. Tedavide ağız yoluyla alınan ilaçlar veya insülin salgılanmasını uyaran ilaçlar kullanılır. Ayrıca gebelik sırasında hormonal değişimlerden kaynaklanan “Gestasyonel Diyabet”, erken yaşta görülen Tip 2 diyabet benzeri “Gençlerin erişkin tipi diyabeti (Maturity Onset Diyabet)” ve Tip 1,5 da denilen ileri yaşta görülen latent otoimmün diyabet “LADA” az bilinen diğer şeker hastalığı çeşitleridir (Beslenme ve Diyet, 2019).

Tip 2 diyabette temel sorunlar insülin sekresyonunda azalma, insülin direnci ve fazla kan glukoz düzeyidir. Bu yüzden Tip 2 diyabet tedavisi için terapötik stratejiler insülin sekresyonunun uyarımını, hedef dokularda insülinin etkisinin artırılmasını ve oligo- ve disakkarit yıkımının inhibisyonunu kapsar. Kan şekeri seviyesini düşürmek için ve diyabeti kontrol etmek için yaygın olarak kullanılan ilaçlar sülfonilüreler, biguanid, glukozidaz inhibitörleri, aldoz redüktaz inhibitörü, tiyazolidindionlar, karbamoilmetil benzoik asit, insülin-benzeri büyüme faktörüdür (Sales, Souza, Simeoni, Magalhaes & Silveira, 2012). Klinikte kullanılan bu ilaçlar etki mekanizmalarına göre 3 grupta incelenebilir: Sülfonilüreler (ör; gliklazid, tolbutamid) pankreastan insülin salınımını artırır; Biguanidler (ör; metformin) insülin varlığında hücrelere glukoz girişini arttırmaları;  $\alpha$ -glukozidaz inhibitörleri (ör; akarboz, miglitol) bağırsakta karbonhidrat hidrolizini yavaşlatarak yemek sonrası kan şekeri yükselmesini (postprandiyal hiperglisemi) engellerler (Erdoğan, 2002).

#### **2.4.1. $\alpha$ -Amilaz ve $\alpha$ -Glukozidaz Enzimleri**

$\alpha$ -Amilaz insanlarda tükürük bezi ve pankreastan salgılanır ve beslenmeyle alınan ekmek, makarna, patates gibi yiyeceklerde bulunan nişastayı hidrolizler. Nişasta molekülü ( $\alpha 1 \rightarrow 4$ ) glukozidik bağlardan oluşan amiloz ve ( $\alpha 1 \rightarrow 4$ ) glukozidik bağlanmalarına ek olarak ( $\alpha 1 \rightarrow 6$ ) glukozidik dallanma gösteren amilopektin olmak üzere iki adet glukoz polimeri içerir.

$\alpha$ -Amilazlar, amilozdaki ( $\alpha 1 \rightarrow 4$ ) glukozidik bağlarını maltoz ve zincir uçlarından glukoz verecek şekilde hidrolizler, ancak bir disakkarit olan maltoz üzerinde etkili olmazlar.  $\alpha$ -Amilazlar amilopektin ve glikojen üzerinde de ( $\alpha 1 \rightarrow 4$ ) bağlarına etki eder ve oligosakkaritler ile dallanmış oligosakkaritler ( $\alpha$ -limit dekstrinler) oluşur. Böylece nişastanın hidrolizi sonucu bir ürün karışımı oluşur (Şekil 2.3).



**Şekil 2.3.** Amiloz ve amilopektinin  $\alpha$ -amilaz ile hidrolizi (Smith ve Morton, 2010)

Nişastanın sindirimi ağızda tükürük amilazı ile başlar. Mideye geldikten sonra tükürük amilazı düşük pH'da inaktif hale gelir. Yiyeceklerde bulunan nişastanın % 50'si kadarı sindirilmiş olur. Sindirim kanalında yemek olduğunda pankreastan duodenuma salınan ve tükürük amilazından daha fazla miktarlarda üretilen ikinci bir  $\alpha$ -amilaz vardır. İnce bağırsakta nişasta ve glikojenin sindirimi pankreatik  $\alpha$ -amilaz ile devam eder. Pankreatik  $\alpha$ -amilaz maltoz, dekstrin oligosakkaritleri ve ( $\alpha 1 \rightarrow 6$ ) dallanma noktası içeren amilopektin parçacıklarını açığa çıkarır (Boyle, 2005). İki kaynaktan gelen  $\alpha$ -amilazlar, farklı aminoasit dizilerine sahip olmasına rağmen, benzer katalitik özelliklere sahiptir ve her ikisi de nötr veya hafif alkali pH'da çalışır.

İnce bağırsakta pankreatik  $\alpha$ -amilazın maltoz ve dekstrinlere parçaladığı karbonhidratların emilebilmesi için glukoz birimlerine ve diğer monosakkaritlere hidrolizlenmesi gerekir. İnce bağırsak lümenindeki fırça kenarlı epitel hücrelerin membranına bağlı intestinal  $\alpha$ -glukozidazları oligosakkaritleri, trisakkaritleri ve disakkaritleri glukozu hidrolizler ve sonrasında monosakkaritlerin emilimi gerçekleşir. Diyabetik hastalarda bu enzimin inhibisyonu, gecikmiş bir glukoz emilimine ve postprandiyal hipergliseminin azalmasına neden olur.

#### 2.4.2. Diyabet Hastalığında Bitkisel Yaklaşım

Uluslararası Diyabet Federasyonu (IDF) 8. Diyabet Atlasına göre 2017 yılında dünyada 425 milyon diyabet hastası (20-79 yaş arası) olduğu ve bu rakamın 2045 yılında 629 milyon olacağı öngörülmüyor. Yine IDF verilerine göre ülkemizde 6,694

milyon kişi şeker hastası olup, 2045 yılında diyabet görölme sıklığı öngörölen ilk 10 ölke arasında Türkiye 11,2 milyon kişiyle 10. sırada yer alacaktır (*Diabetesatlas*, 2018).

Diyabetle ilgili yapılan harcamalar tüm ölkeler için sağlık hizmetleri sistemlerin üzerinde büyük bir yük oluşturmaktadır. Ayrıca oral hipoglisemik ajanların etkinliği ve güvenilirliği, insülinin maliyeti ve bulunabilirliği antidiyabetik ajanlarla ilgili olarak alternatif alanlarda araştırmalara yol açmıştır. Bu alanlardan biri de yeryüzünde yaygın olarak bulunan bitkilerden yararlanma fikridir. Bitkiler, özellikle tıbbi bitkiler, çeşitli aktif bileşenleri içermeleri, kolay bulunabilmeleri, ucuzluğu ve kullanılabilme kolaylığı gibi sebeplerle diyabet hastalığının tedavisinde büyük bir imkan sunabilirler (Yatoo, Saxena, Gopalakrishnan, Alagawany & Dhama 2017).

Bitkiler antidiyabetik etkiye sahip olan fitobileşenleri içerebilirler. Bu fitobileşenler arasında fenolikler, flavonoidler, terpenoidler, alkaloidler, kumarinler, antrakınonlar, tanenler, saponinler, kardiyak glikozitler bulunur. Bitki bileşenleri antioksidan aktivite göstermelerinin yanısıra farklı mekanizmalar vasıtasıyla antidiyabetik aktivite de sergilerler; insülin benzeri etki, Langerhans adacık beta hücrelerinin rejenerasyonu, hipoglisemik etki, hepato-pankreatik koruyucu etki, aldoz redüktaz aktivitesinin inhibisyonu veya karbonhidrat emiliminin azaltılması gibi (Yatoo vd., 2017).

Sindirim kanalında karbonhidratların hidrolizlenmesinde görev alan  $\alpha$ -glukozidaz veya  $\alpha$ -amilaz enzimlerinin inhibisyonu yoluyla karbonhidrat emilimini yavaşlatılabilir. Zaten günümüzde diyabet tedavisindeki ilaç gruplarından biri olan enzim inhibitörleri, oral antidiyabetik ajan olarak kullanılmaktadır. Diyabet tedavisinde en önemli yaklaşımlarından biri yemek sonrası hiperglisemiye düşürmeye yöneliktir. Bunun için sindirim kanalında karbonhidratları hidrolizleyen  $\alpha$ -glukozidaz ve  $\alpha$ -amilaz enzimlerinin inhibisyonu yoluyla karbonhidrat emilimi yavaşlatılır ve yemek sonrası kan şekeri yükselmesi azaltılır. Diğer antidiyabetik ilaçlardan farklı olarak  $\alpha$ -glukozidaz inhibitörleri sadece ince bağırsakta etkisini gösterirler (Arituluk & Ezer, 2012; Erdoğan, 2002).

Geleneksel olarak halk arasında diyabete karşı çeşitli bitkiler kullanılmaktadır. Ölkemizde Rosaceae (Gülgiller), Asteraceae (Papatyagiller), Lamiaceae (Ballıbabagiller) familyaları başta olmak üzere çeşitli bitki ailelerinin birçok türünün halk arasında diyabete karşı kullanıldığı bildirilmiştir (Arituluk & Ezer, 2012).

Bunlardan bazıları kudret narı, çemen, gurmar, tarçın, Ginseng türleri, konyak bitkisi (Aslan & Orhan, 2010), tetra, maydanoz, pelinotu, devedikeni, kenger, yeralması, solmaz çiçek, karahindibağ, çobançantası, mürver, kızılıçık, ardıç, ceviz, kekik, adaçayı, bamya, ebegümeçi, dut, hünnap, acıbadem, ısırğan ve Rosaceae ailesinden mahlep, vişne, alıç, ayva, taflan, yabani elma, muşmula, güvem, ahlat, kuşburnu, böğürtlen, üvez (Arituluk & Ezer, 2012)'dir. Bu bitkilerin yaprak, yumru, çiçek, dal, kök, rizom, tohum, genç sürgünleri veya bitkinin tamamı su ile kaynatılarak, birkaç gün soğuk suda bekletilerek, üzerine kaynatılmış su eklenerek, çığ veya pişirilmiş olarak diyabete karşı kullanılmaktadır (Arituluk & Ezer, 2012). Görüldüğü üzere Rosaceae ailesine ait bitkiler de diyabete karşı halk ilacı olarak kullanılmaktadır. Bu yüzden yapılan çalışmada bu bitki ailesine ait elma, ayva, armut, kuşburnu, güvem ve ahlat (yabani armut) ağacı yapraklarının antioksidan aktivite çalışmasına ilaveten  $\alpha$ -amilaz ve  $\alpha$ -glukozidaz enzimleri üzerindeki inhibisyon etkisi incelenmiştir.

## **2.5. Antioksidanlar / Antioksidan Savunma Elemanları**

Canlı hücrelerde sürekli kimyasal reaksiyonlar meydana gelmekte ve özellikle aerobik canlılarda bu reaksiyonlar sonucu) eşleşmemiş bir veya daha fazla tek elektron taşıyan serbest radikaller oluşmaktadır. Bu reaktif türler hücrede bulunan lipid, protein, DNA ve karbonhidrat gibi tüm biyomoleküllere saldırarak, oksidasyonlarına yol açar. Organizmanın sağlıklı bir yaşam sürdürebilmesi için oksidan/antioksidan dengesi çok önemlidir. Bu yüzden organizmada serbest radikallerin oluşumunu ve bunların meydana getirdiği hasarları önlemeye yönelik savunma mekanizmaları mevcuttur. Bunlar “antioksidan savunma sistemleri” veya kısaca “antioksidanlar” olarak bilinirler.

Genel olarak antioksidanlar oksidasyona açık olan bileşiklerin oksidasyonunu azaltan veya engelleyen maddelerdir. Gerek canlı organizmalardaki gerekse gıdalardaki lipidler kolaylıkla okside olabilen moleküllerdir. Lipidlerin yanı sıra protein, DNA ve karbonhidrat gibi okside olabilen diğer tüm molekülleri de içerecek şekilde antioksidanlar “okside olabilen substratlara kıyasla düşük konsantrasyonlarda bulunan ve substratların oksidasyonunu önleyen veya geciktiren maddeler” şeklinde tanımlanabilir (Becker, Nissen & Skibsted, 2004).

Canlılarda ve gıdalarda reaktif oksijen türlerinin oluşumu ve meydana getirdikleri hasarları önlemeye çalışan antioksidanlar farklı şekillerde etki

gösterebilirler. Bu mekanizmalar şu şekilde özetlenebilir (Rice-Evans, 1999; Seven & Candan, 1996):

- a) ROT oluşmasını engelleyebilirler; örneğin özellikle hidroksil radikalının oluşumunda katalizör olan demir ve bakır iyonlarını bağlayan metal şelatörleri gibi.
- b) ROT'ları yakalayıp nötralize edebilirler; örneğin flavonoidler,  $\alpha$ -tokoferol, askorbik asit, metiyonin, ürik asit,  $\beta$ -karoten, indirgenmiş glutatyon molekülleri.
- c) Oluşan radikalleri detoksifiye edebilirler; örneğin ROT'ları daha az toksik ürünlere dönüştüren süperoksit dismutaz, katalaz enzim sistemleri gibi.

### **2.5.1. Antioksidanların Sınıflandırılması**

Antioksidan etki gösteren bileşikler çok geniş bir çeşitlilikte olduğu için sınıflandırılmaları da çeşitlilik göstermektedir. Yapılarına, oluşumlarına, etkilerine, çözünürlüklerine ve kinetik davranışlarına göre çeşitli şekillerde sınıflandırılabilirler:

1) Reaksiyon mekanizmalarına göre birincil ve ikincil antioksidanlar olarak ikiye ayrılırlar. Birincil antioksidanlar otooksidasyonun başlangıcında veya ileri aşamasında lipid türevli radikallere hidrojen atomu verirler ve zincir kırıcı antioksidan olarak rol oynarlar. Doğal kaynaklı karotenoitler, tokoferoller ve çeşitli halka süstitüsyonları olan polifenolik bileşikler birincil antioksidanlardır. İkincil antioksidanlar metallerle şelat yapma, UV ışığı absorblama veya singlet oksijeni giderme gibi çeşitli mekanizmalarla etki gösteren koruyucu antioksidanlardır. Örnek olarak EDTA, sitrik asit, askorbik asit ve karotenler verilebilir (Akoh & Min, 2008).

2) Lipit peroksidasyonu yiyeceklerde meydana gelen, yiyeceğin tat, koku ve aromasını olumsuz etkileyerek gıda kalitesinin bozulmasına yol açan radikalik bir reaksiyondur. Lipit peroksidasyonunu önlemek veya yavaşlatmak için ortamdaki oksijenin ve metal katalizörlerinin uzaklaştırılması gerekir. Antioksidanlar lipit peroksidasyonunu önlemede nasıl işlev gösterdiklerine göre sınıflandırılabilir (Çizelge 2.1) (Embuscado, 2015).

**Çizelge 2.1.** Farklı antioksidanların lipid peroksidasyonu üzerindeki etkisine göre sınıflandırması

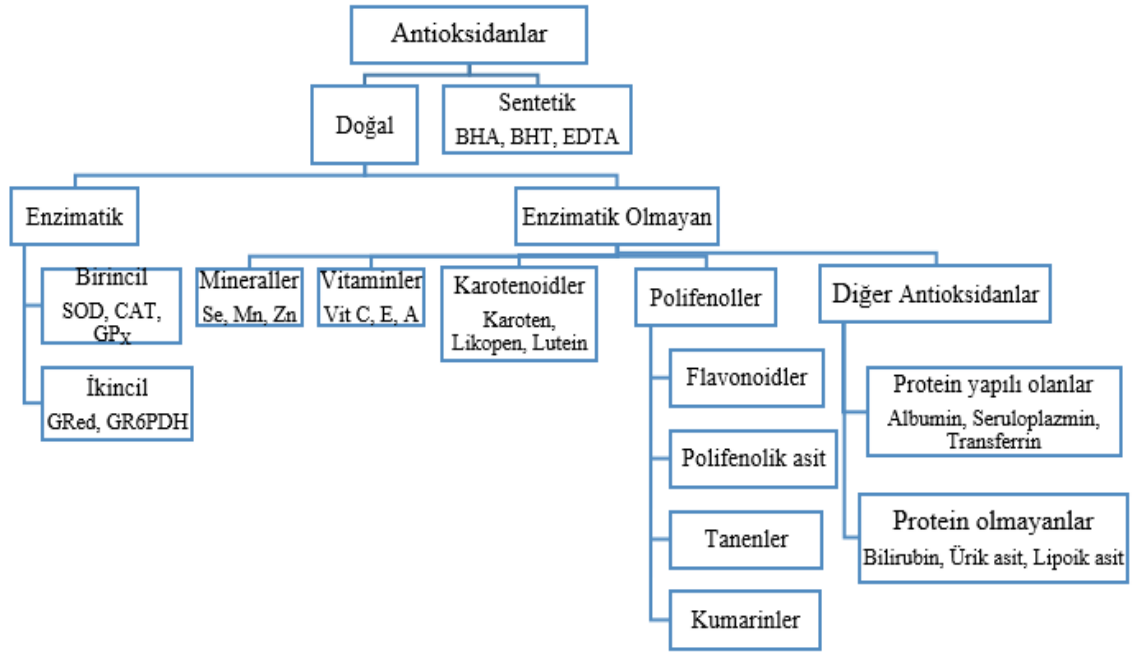
Antioksidan sınıfı	Örnek	Fonksiyonu
Serbest radikal süpürücüler	BHA BHT TBHQ Propil gallatlar Tokoferoller Baharat ve bitki ekstraları (biberiye, karanfil, adaçayı, kekik)	Bir hidrojen atomu vererek serbest radikalleri nötralize ederler.
Oksijen tutucular	Askorbik asit Erithorbik asit Askorbatlar Sülfidler ve bisülfidler Askorbik palmitat	Oksijenle reaksiyona girerler.
Şelatlama yapanlar	Sitrik asit EDTA Fosfatlar	Oksidasyonu katalize edebilen metal iyonları ile şelat yaparlar.

3) Antioksidanların alfabetik olarak yapılan sınıflandırılması ve örnekleri Çizelge 2.2’de görülmektedir (Flora, 2009).

**Çizelge 2.2.** Antioksidanların alfabetik sınıflandırması ve bu kategorilere örnekler

Alfabetik adı	Antioksidanın kategorisi	Örnek
Antioksidan C	Karotenoidler	$\beta$ -karoten, Likopen, Lutein
Antioksidan E	Enzimler	SOD, Katalaz, GPx
Antioksidan G	Glutasyon	Glutasyon
Antioksidan H	Hormonlar	Melatonin, Östrojen
Antioksidan L	Lipitlerle ilişkili moleküller	Ubikinol-10, N-asetil sistein, L-lipoik asit
Antioksidan M	Mineraller	Çinko, Selenyum, Bakır
Antioksidan P	Fenolikler	Kersetin, Kateşin
Antioksidan S	Saponinler, Steroidler	Kortizon, Östradiol, Östriol
Antioksidan V	Vitaminler	$\alpha$ -tokoferol, Askorbik asit

4) Antioksidanlar doğal ve sentetik olarak iki ana sınıfa ayrılabilir (Şekil 2.4). Doğal antioksidanlar, insan metabolizmasında sentezlenir veya diğer doğal kaynaklardan desteklenir. Bunlar kendi içinde de enzimatik antioksidanlar (Süperoksit dismutaz, katalaz, glutatyon peroksidaz, glutatyon redüktaz) ve enzimatik olmayan antioksidanlar (glutatyon, lipoik asit, üre, bilirubin, koenzim Q, vitaminler, karotenler, polifenoller, mineraller) olarak ayrılabilir. Sentetik antioksidanlar gıdalara koruyucu olarak eklenen BHT, BHA, EDTA, PG'tır (Mamta vd., 2019).



Şekil 2.4. Antioksidanların sınıflandırılması (Mamta vd., 2019)

Doğal antioksidanlar endojen kaynaklıdır ve vücudumuzdaki antioksidan savunma sisteminde yer alan başlıca elemanlar ise enzimler, metal iyonlarını bağlayan proteinler, suda ve yağda çözünen radikal giderici özellikteki bileşiklerdir. Vücuttaki bu enzimatik ve endojen savunma sistemlerine ilaveten gıdalarla alınan antioksidan özelliği olan moleküller de vardır. Bunların en bilinenleri Şekil 2.4'de de görüldüğü gibi vitaminler, karotenoidler ve geniş bir yer tutan polifenolik bileşiklerdir. Bu bileşikler bitkiler tarafından enfeksiyon, yaralanma, UV ve radyasyon gibi stres koşullarında sentezlenen ikincil metabolitlerdir. Meyve ve sebzelerde bol miktarda bulunan polifenolik bileşikler serbest radikalleri giderici etki gösteren güçlü antioksidanlar

olarak bilinmektedir. Bu nedenle vücudun endojen antioksidan sisteminin diyetle alınacak antioksidan bileşikler ile desteklenmesi yararlı olacaktır.

### **2.5.2. Antioksidan Kaynağı Olarak Bitkiler**

Beslenme ile tüketilen taze meyve ve sebzelerin birçok hastalığa karşı koruyucu etki gösterdiği bilinmektedir. Birçok çalışmada diyetle alınan taze meyve ve sebzelerin katarakt, kardiovasküler hastalıklar, obezite, diyabet ve özellikle bazı kanser türleri üzerinde etkili olduğu ve hastalıkların oluşma riskini azalttığı bildirilmiştir (Schröder, 2007; Tavani, Negri & Vecchia, 1996; Giugliano, Ceriello & Esposito, 2006; Steinmetz & Potter, 1996; Vecchi, Altieri & Tavani, 2001; Oude, Geleijnse, Kromhout, Ocke, Verschuren, 2010; Liu, 2013). Bu koruyucu etkiler besinlerde bulunan polifenolik bileşikler (flavonoidler ve fenolik asitler), askorbik asit,  $\alpha$ -tokoferol,  $\beta$ -karotenoidler, glutatyon, fitosteroller, azotlu bileşikler (alkaloitler, klorofil türevleri) ve izotiyosiyanatlar gibi antioksidan özellikli bileşiklerden kaynaklanmaktadır (Wilson vd, 2017; Zou, Xi, Hu, Nie & Zhou, 2016; Kolektif, 2018).

#### **2.5.2.1. Polifenolik Bileşikler**

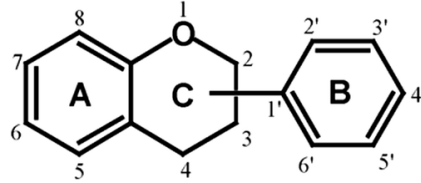
“Polifenolik” terimi birden fazla hidroksil grubunu ifade etmesine rağmen, “fenolik bileşik” ve “polifenoller” terimleri genellikle aynı anlamda kullanılmaktadır (Dorman, Peltoketo, Hiltunen & Tikkanen, 2003). Fenolik bileşik meyve ve sebzelerde doğal olarak oluşan, başlıca fenolik asitler, basit fenoller ve flavonoidleri kapsayan organik bileşiklerdir. Bitkilerin sekonder metabolitleri olup, yapılarında en az bir aromatik halka ve buna bağlı olan bir veya birden fazla hidroksil grubu bulundurlar. Fenolik bileşikler bitkilerde çoğunlukla hidroksil gruplarından şekerlerle (en sık olarak glukoz) konjuge olmuş formda bulunurlar. Polifenollerin bitkilerde büyümenin düzenlenmesi, bitkileri UV radyasyonuna, zararlı böcek ve enfeksiyonlara karşı koruma, böcekleri çekerek tozlaşmayı sağlama gibi birçok önemli fizyolojik görevi vardır (Dorman, Peltoketo, Hiltunen & Tikkanen, 2003). Ayrıca bitkilerde tat, koku ve renk oluşumu üzerinde de etkileri olan fenolik bileşikler, gıda bileşeni olarak insan sağlığı açısından enzim inhibisyonuna sebep olmaları, antioksidan, antiviral ve antimikrobiyal göstermeleri yönüyle önem taşırlar. Fenolik bileşikler geniş bir aile olup fenolik asitler



(hidroksi sinnamik asitler, hidroksi benzoik asitler), flavonoidler, kumarinler, stilbenler, lignanlar ve tanenler olarak sınıflandırılır (Sonia & Sharma, 2015).

### 2.5.2.1.1. Flavonoidler

Flavonoidler fenoliklerin en yaygın dağılım gösteren grubudur. Genel yapıları C<sub>6</sub>-C<sub>3</sub>-C<sub>6</sub> (difenilpropan) formunda olup, iki fenolik özellikli halkanın (A ve B halkaları), oksijenli heterohalka oluşturmak üzere üç karbonla (C halkası) birleşmesiyle oluşur (Şekil 2.5). Hidroksilasyon yeri ve C halkasındaki (kroman halkası) değişikliklerden dolayı flavonoidler çeşitlenir. Başlıca antosiyaninler, flavonlar, flavanonlar, flavonoller, flavanoller (kateşinler) ve isoflavonlar alt gruplarına ayrılır (Dorman, Peltoketo, Hiltunen & Tikkanen, 2003; Tsao, 2010).



Şekil 2.5. Temel flavonoid iskeleti (Tsao, 2010)

Antioksidan olarak davranan fenolik bileşikler, serbest radikalik zincir reaksiyonlarının sonlandırıcısı ve lipid peroksidasyonunu katalizleyen metal iyonlarının şelatörleri olarak işlev görebilir (Şekil 2.5). Fenolik bileşiklerin güçlü antioksidan kapasiteleri, aromatik halkadaki hidroksil grubundan bir hidrojeni kolaylıkla serbest radikale verebilmelerinden ve eşleşmemiş elektronların aromatik halkada delokalizasyon sistemi ile, oluşan fenoksil radikalinin stabilize edilmesinden kaynaklanır (Rice-Evans, Miller & Paganga, 1996; Frankel & Meyer, 2000).

Flavonoidler primer antioksidan ve reaktif oksijen türlerini giderici olarak rol oynar. Ayrıca flavonoidlerin bazıları metal şelatlayarak antioksidan aktivite gösterirler, çünkü flavonoidlerin polivalent fenol yapıları metal iyonlarıyla kompleks yapabilmelerine olanak sağlar. Fenolik asitler de metal kompleksi oluşturabilen fenolik bileşiklerdir (Akoh & Min, 2008).

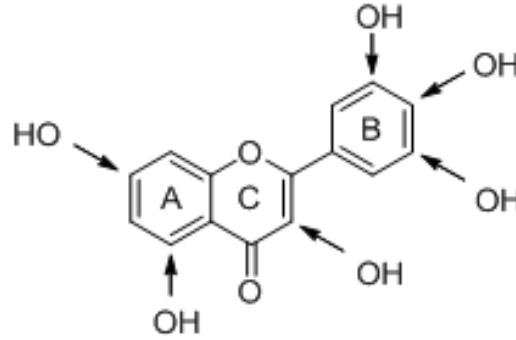
Antioksidan özellik bileşiğin moleküler yapısıyla yakından ilişkilidir. Flavonoidlerde B halkasının 2'-OH, 3'-OH ve 4'-OH grupları olması antioksidan

aktiviteye kritik rol oynadığı bildirilmiştir (Cotelle vd., 1996). Genel olarak flavonoidlerin antioksidan kapasiteleriyle ilgili üç yapısal özellikleri vardır (Şekil 2.6):

1) Antioksidan kapasitesi için flavonoid molekülünün hidrojen (elektron) verebilmesi özellikle önemlidir ve bu durum B halkasında kateşol grubunun (yani dihidroksillenmiş B halkası) bulunmasıyla yakından ilişkilidir.

2) Bir önemli yapısal özellikleri de C halkasındaki 4-okso grubuna konjuge durumda 2. ve 3. karbonlar arasında doymamış bağıın olmasıdır.

3) B halkasında iki hidroksil grubunun ve A halkasında 5-hidroksil grubunun bulunması, flavonoidlerin redoks-aktif metalleri şelatlama kabiliyetine katkıda bulunması yönünden çok önemlidir.



Şekil 2.6. Flavonoid yapısı (Cotelle vd., 1996)

Günlük beslenmede tüketilen üzüm, nar, elma, yaban mersini, adaçayı, biberiye, kekik, brokoli, domates, soğan, sarımsak, havuç, ıspanak, karnabahar, lahana, kereviz, kuşüzümü, kocayemiş, çay, yeşilçay, şarap, siyah üzüm suyu gibi çeşitli meyve, sebze ve içeceklerle yapılan araştırmalarda, fenolik bileşikler ve özellikle flavonoidleri içeren fitonutrientlerin yüksek antioksidan aktiviteler gösterdiği bildirilmiştir (Nehir, Karakaya & Taş, 1999; Frankel, 1999; Halvorsen vd., 2002; Opara & Rockway, 2006; Wolfe & Liu, 2007; İşbilir, Orak, Yağar & Ekinci, 2012; Puganen, Kallio, Schaich, Jukka-Pekka & Yang, 2018).

#### 2.5.2.1.2. Tanenler

Tanenler bitkiler aleminde yaygın olarak bulunan bitki polifenollerindendir. Patojenlere, otçul hayvanlara ve çevresel düşmanlara karşı bitkilerin savunma mekanizması olarak rol oynarlar. Tanenler kimyasal yapılarına göre hidrolizlenebilen

tanenler ve kondanse tanenler (proantosiyanidinler) olarak iki sınıfa ayrılır. Hidrolizlenebilen tanenler glikozillenmiş gallik asitler, kondanse tanenler ise flavonoid oligomer ve polimerleridir. En önemli özellikleri proteinleri bağlayarak çöktürmeleridir, tanenlerin fenolik grupları peptid ve proteinlerin –NH<sub>2</sub> gruplarına bağlanır (Singh, Bhat & Singh, 2003; Kolektif, 2018). Şarap, çay ve olgunlaşmamış meyveler tüketildiğinde hissedilen büzücü tat tanenlerden kaynaklanır. İnsanlar tarafından yenilen pekçok yiyeceğin besin değeri üzerinde büyük etkileri vardır (Cobzac vd., 2005), özellikle amilaz ve diğer sindirim enzimlerini inhibe etmelerinden dolayı anti-besinsel faktör olarak bilinirler.

Polifenollerce zengin meyve ekstraktlarının  $\alpha$ -amilaz ve  $\alpha$ -glukozidaz gibi nişastayı sindiren enzimlerin aktivitelerini azalttığı bildirilmiştir (McDougall vd., 2005). İnhibisyon fenolik içeriğine göre değişebilir, örneğin tanenler amilazı inhibe ederken, glukozidazın inhibisyonu için bir dizi polifenol gerekebilir (Boath, Stewart & McDougall, 2012 ).

### **2.5.3. Antioksidan Aktivite Tayin Yöntemleri**

Hastalıkların önlenmesinde antioksidan etki gösteren bileşiklerin pozitif etkilerinden dolayı bu alandaki çalışmalar ilgi alanı haline gelmiştir. Ayrıca yağ ve yağ içeren gıdaların raf ömrünü uzatmak üzere sentetik antioksidanlar yerine doğal kaynaklı antioksidan katkı maddesi arayışı da sürmektedir. Dolayısıyla doğal kaynaklarda bulunan antioksidan bileşenlerin ekstraksiyonu sonrası veya izolasyonu sonrası bunların antioksidan özellikte olup olmadığı araştırılmaktadır. Bu çalışmada da bazı Rosaceae ailesi bitkileri antioksidan potansiyeli açısından incelenecektir. Diğer yandan oksidatif stres çalışmalarında da, organizmanın antioksidan savunma sistemlerinin durumunu araştırmak için biyolojik materyallerde antioksidan enzimlerin aktiviteleri veya endojen antioksidanların konsantrasyonları ölçülmektedir. Bu gerekliliklerden dolayı günümüzde antioksidan aktivitenin belirlenmesi amacıyla çok sayıda yöntem geliştirilmiştir.

Moleküler veya hücresel düzeyde radikal giderme kapasitesi, indirgeme gücü ve diğer spesifik antioksidan özellikleri ölçmek için bir dizi kimyasal metodlar, gıda ve biyolojik model sistemler geliştirilmiştir. Bu yöntemler, antioksidan mekanizma, substrat ve oksidasyon başlatıcısı, sonucun hesaplanması ve işlemin uygulanması gibi

açılardan birbirinden farklılık gösterir (Shadi, 2015). Antioksidan aktivite çalışmalarında farklı metodlardan alınan sonuçları kıyaslamak zor olduğundan, bir örneğin veya bitki ekstraktının antioksidan etkisinin olup olmadığının değerlendirilmesinde birden fazla antioksidan aktivite tayin metodu kullanılır.

Toplam antioksidan kapasiteyi ölçmek için kullanılan metodlar dayandıkları kimyasal reaksiyonun esasına göre genellikle iki gruba ayrılırlar: Hidrojen atomu transferine (HAT) ve bir tek elektron transferine (SET) dayanan metodlar. Bu metodlarda antioksidandan serbest radikal molekülüne elektron transferi veya H<sup>+</sup> verilmesinin direk ölçümü yapılır ve çalışılan örneğin koruyucu antioksidan kapasitesi yerine radikal veya oksidan giderici kapasitesi ölçülmüş olur.

HAT temelli metodlar, örneğin bir hidrojen vererek serbest radikalleri giderme yeteneğini ölçer, çözücü ve pH'dan bağımsızdır, genellikle hızlı metodlardır (Prior'dan aktaran Gülçin, 2012). Bu esasa dayanarak antioksidan etkiyi değerlendiren metodların bazıları şunlardır:

- Oksijen Radikal Absorplama Kapasitesi (ORAC)
- Toplam Radikal Tutucu Antioksidan Parametre (TRAP)
- İndüklenmiş LDL Oksidasyonunun İnhibisyonu
- Toplam Oksiradikal Süpürme Kapasitesi Yöntemi (TOSCA)
- $\beta$ -Karoten Ağartma Metodu
- Crocin Ağartma Metodu

SET temelli metodlarda, antioksidan molekülden metal iyonu veya radikal gibi oksidan bileşiğe bir elektron transfer edilir. Bu da oksidanın renk değişimine neden olur ve UV/VIS ile absorbans değişimi ölçülür. Genellikle pH'ya bağımlı, yavaş ve zaman gerektiren metodlardır. SET temelli metodların bazıları şunlardır (Gülçin, 2012):

- Folin-Ciocalteu Ayırıcı ile Toplam Fenolik Metodu
- ABTS Katyonik Radikali Giderme Metodu
- Fe (III) İyonu İndirgeme Gücü
- DPPH Radikali Giderme Metodu
- Bakır (II) İyonu İndirgeme Antioksidan Kapasitesi (CUPRAC) Yöntemi

Antioksidan bileşikten serbest radikal molekülüne elektron transferi veya H<sup>+</sup> verilmesinin ölçümünü yapan bu metodlardan başka; gıdalarda veya biyolojik sistemlerdeki makromoleküllere zarar veren oksidanları ve radikalleri (O<sub>2</sub><sup>•-</sup>, OH<sup>•</sup>,

H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, •NO yakalama metodları gibi) ölçen metodlar, antioksidan enzimlerin aktivitesini ölçen metodlar ve lipid peroksidasyon ürünlerinin ölçümünü yapan (Malonildialdehit tayini-TBARS metodu, Peroksit değeri-POV, Ransimat metodu) diğer metodlar da vardır.

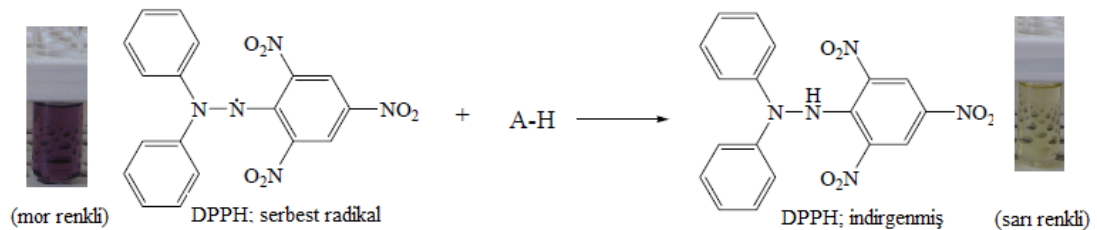
### 2.5.3.1. Tez Çalışmasında Kullanılan Antioksidan Aktivite Tayin Yöntemleri

#### 2.5.3.1.1. FCR ile toplam fenolik bileşik tayini

Metod başlangıçta protein tayini için düşünülmüştür, çünkü tirozin amino asidinin yapısındaki fenol grubu Folin-Ciocalteu ayırıcı (FCR) ile etkileşir. Daha sonraları metodun toplam fenolik bileşen tayini için de kullanımı artmıştır. Ancak reaktif Cu<sup>+</sup>, C vitamini gibi fenolik olmayan bileşikler tarafından da indirgenebildiği için fenolik bileşiklere spesifik değildir. Bu metotta örnekteki (bitki ekstraktı veya saf madde) fenolik bileşiklerden, ayıraçtaki Mo(VI)'a bir elektron transfer edilir ve molibdenyumun indirgenmesiyle renk sarıdan maviye döner. 760 nm'de absorbans ölçülür (Singleton, Orthofer & Lamuela-Raventos, 1999).

#### 2.5.3.1.2. DPPH radikali giderme metodu

Bu metod ilk kez Stanford Üniversitesi'nden Marsden Blois tarafından geliştirilip (Blois, 1958), kısa bir makale olarak sunulmasına rağmen oldukça etkili olmuştur ve günümüzde de sıklıkla kullanılmaktadır. Antioksidan bileşiklerin serbest radikal giderme gücünü belirleyen hızlı, pratik ve genel kabul görmüş bir yöntemdir. 1,1-difenil-2-pikrilhidrazil (DPPH) radikali ticari olarak mevcut olan stabil bir radikaldir. Alkoldeki çözeltisi mor renkli olup 515-520 nm'de maksimum absorbans verir. Ortama antioksidan bileşik ilave edildiğinde rengi sarıya döner ve absorbansın düşüşü spektrofotometrik olarak izlenir (Şekil 2.7) (Molyneux, 2004).

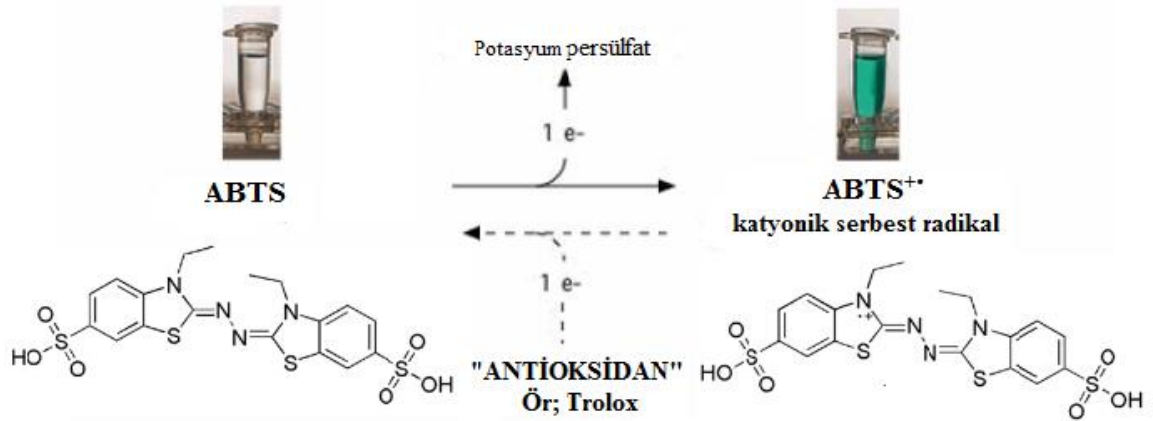


Şekil 2.7. DPPH radikalinin antioksidan molekül ile reaksiyonu (Molyneux, 2004)

Antioksidan aktiviteyi yorumlamak için son zamanlarda geliştirilen bir parametre “etkin konsantrasyon (EC)”dur. Başlangıçtaki DPPH radikali konsantrasyonunun % 50’sini azaltmak için gerekli antioksidan miktarını ifade eder ve EC<sub>50</sub> (mg/mL) olarak isimlendirilir. EC<sub>50</sub> değeri antioksidan aktiviteyi değerlendirmek için yaygın olarak kullanılan bir parametredir (Molyneux, 2004). Standart maddelere göre düşük olan EC<sub>50</sub> değeri yüksek radikal giderme aktivitesinin göstergesidir.

### 2.5.3.1.3. ABTS katyonik radikali giderme metodu

Bu yöntemde 2,2'-azinobis (3-etilbenzotiazolin-6-sülfonik asit) (ABTS) hidrojen peroksit, potasyum persülfat gibi yükseltgenler ile tepkimeye sokulup ABTS<sup>•+</sup> radikali oluşturulur. Radikalik çözelti koyu yeşil-mavi renkli olup 734 nm dalga boyunda maksimum absorbans verir. Antioksidan bileşik ile tepkimeye sokulduğunda, indirgenerek ABTS<sup>•+</sup>'nin rengi açılır ve absorbansı azalır (Şekil 2.8) (Rice-Evans, 1999).

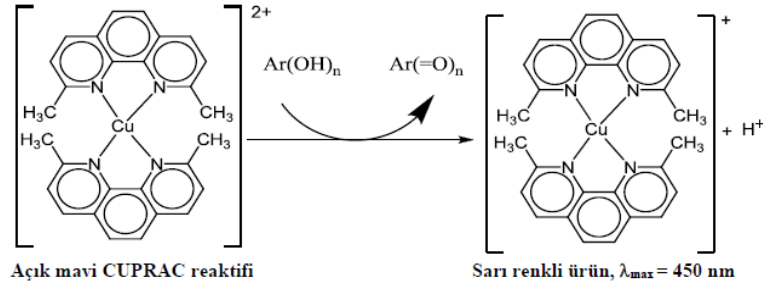


Şekil 2.8. ABTS'nin kimyasal reaksiyonu (Boligon, Machado & Athayde, 2014)

Bu metotta antioksidan kapasite suda çözünen E vitamini analogu olan troloks eşdeğeri olarak tayin edilir. Bu yüzden TEAC metodu olarak da bilinir. TEAC, 1 mM troloksun gösterdiği aktiviteyi göstermek için gerekli olan antioksidan konsantrasyonunu ifade eder.

#### 2.5.3.1.4. CUPRAC yöntemi (Bakır (II) iyonu indirgeme antioksidan kapasitesi)

Metod CUPric Reducing Antioxidant Capacity-CUPRAC adıyla 2004 yılında literatüre girmiştir. Bu yöntemde aynı ortamdaki 2,9-dimetil-4,7-difenil-1,10-fenantrolin (Neokuproin-Nc) ve Cu (II) bulunur. Cu(II)-Nc reaktifi biyolojik bakımdan önemli antioksidanları ve çoğu polifenolik bileşiğin yükseltgemesini sağlayabilir. Antioksidanlar veya örnekte bulunan antioksidan özellikli bileşikler tarafından Cu(II) Cu(I)'e indirgenir. Oluşan Cu(I)-Neokuproin şelatı (Şekil 2.9) 450 nm'de maksimum absorbands verir, yüksek absorbandsı yüksek antioksidan aktivitenin göstergesidir (Şekil 1.9) (Apak, Güçlü, Özyürek & Karademir, 2004).



Şekil 2.9. CUPRAC yöntemine ait kimyasal reaksiyon (Apak vd., 2004)

#### 2.5.3.1.5. İndirgeme gücü tayini

Bir tek elektron transferine (SET) dayanan mekanizma ile çalışan antioksidanlar, serbest radikale bir elektron vererek SR'yi nötralize ederler. Dolayısıyla bir bileşik ne kadar güçlü bir indirgen madde ise, o derece güçlü bir antioksidandır. İndirgeme gücü metodunda ortamdaki indirgen madde yani antioksidan etki gösteren madde Fe<sup>3+</sup> iyonlarını Fe<sup>2+</sup> iyonlarına indirger. Değerlik değiştiren demirin oluşturduğu Prusya mavisi rengindeki kompleksin absorbandsı 700 nm'de okunur. Bu yöntemde absorbandsı yüksek çıkan maddelerin antioksidan aktivitesi de yüksektir.

#### 2.5.3.1.6. β-karoten renk açılım yöntemi

Karotenoidler ışık, sıcaklık veya peroksil radikalleri tarafından parçalanma sonucu renklerini kaybederler. Bu yöntemde, emülsiyon içindeki β-karoten ve linoleik asit karışımında ısı etkisiyle linoleik asit peroksidasyonu oluşturulur. Oksidasyon sonucu oluşan lipid radikalleri (LO•, LOO• gibi) 490 nm'de maksimum absorbands veren

$\beta$ -karoteni parçalayarak renginin açılmasına neden olurlar. Çalışılan örnek antioksidan etkiye sahip ise oluşan radikalleri gidererek  $\beta$ -karotenin renginin açılmasını önler veya geciktirir. Bu değişim spektrofotometrik olarak izlenir (Miller, 1971).

## **2.6. Çalışmada Kullanılan Bitkiler**

### **2.6.1. Elma (*Malus sylvestris* Miller)**

Diğer adı Alma'dır. Genellikle yaprak döken kısa boylu ağaçlardır, ılıman iklim bitkisidir. Ormanlar, çalılıklar, kayalık yamaçlar, dere kenarı ve tarla kenarlarında yetişir. Türkiye'de yaygındır. Dünyada Kafkasya, Kuzey İran ve Kırım'da yetişir. Yaprakları yumurtamsı, elips, üstü parlak yeşil ve zamanla tüysüzleşen, altı solgun yeşil ve ince tüylüdür. Nisan-Mayıs aylarında çiçek açar; sarı, yeşilimsi sarı, yeşil, kırmızı meyveler verir. Meyveleri yaş, kuru, likör, sirke şeklinde kullanılabilir (Dalgıç & Güler, 2015).

### **2.6.2. Ayva (*Cydonia oblonga* Miller)**

Ilıman iklim bitkisidir, küçük ağaçlardır. Ormanlar, çalılar ve dere kenarlarında yetişir. Vatanı Kuzey İran, Kuzey Irak ve Kafkasya'dır. Yaprakları yumurtamsı, basit, grimsi-koyu yeşil renkli ve olgunlaşınca tüsüzdür. Meyveleri yenir, taze ve kuru olarak kullanılabilir. Tanen, pektin ve müsilaj maddeleri içerir. Meyve, yaprak ve kabuklarının tıbbi değeri vardır (Dalgıç & Güler, 2015).

Ayva ağacı yapraklarının Türkiye'de halk ilacı olarak karın ağrısı, soğuk algınlığı, bronşitte öksürük kesici ve balgam söktürücü olarak ve şeker hastalığında kullanıldığı bildirilmiştir (Fujita vd., 1995; Bulut, 2011; Tuzlacı, Alparslan İşbilen & Bulut, 2010.; Tuzlacı & Şenkardeş, 2011). Ayva yaprakları başka ülkelerde de hastalıkların önlenmesinde veya tedavisinde kullanılmaktadır. İtalya'da deri ve kardiyovasküler hastalıkların tedavisinde; Portekiz'de sedatif, antipiretik, ishal ve öksürük kesici özelliklerinden dolayı geleneksel tıpta kullanılmaktadır (Oliveria vd., 2012).



### 2.6.3. Armut (*Pyrus communis* L.)

Yaprak döken geniş taçlı ağaçlardır, boyları 20 metreye ulaşabilir. Ilıman iklim bitkisidir. Ormanlık ve çalılıklarda yetişir. Türkiye’de Kuzey ve Güneybatı Anadolu’da, dünyada Anadolu ve Kafkasya’da yetişir. Yaprakları daire, eliptik, yumurtamsı, parlak yeşil renkli ve zamanla tüysüzleşen, 3-5 cm civarındadır. Mart-Nisan aylarında çiçek açar; meyveleri sulu ve tatlıdır (Dalgıç & Güler, 2015).

Çin ve Kore’de geleneksel halk tıbbında armut meyveleri antiinflamatuvar, diüretik olarak, öksürük ve kabızlık önleyici olarak kullanılmaktadır (Lee vd., 2011).

### 2.6.4. Ahlat (*Pyrus elaeagnifolia* L.)

Boyu 15 metreye kadar uzayabilen, yuvarlak taçlı, dikenli ve dikensiz, gövde kabuğu çatlaklı ve kalındır. Yaprakları basit, dar eliptik, gri, tüylü, alttaki damarları tüylüdür. Çiçekleri beyaz ve kümeler halindedir. Meyveleri elmamsı, armutsu, küremsi, tek veya kümeler halinde, olgunlaşmamış hali sarımsı yeşil, olgunlaşmış hali kalın çeperli ve kahverengidir. Taşlı, kumlu, kuru, nemli ve her türlü toprakta yetişebilir. Erozyona karşı etkilidir. Ilıman iklim bitkisidir, Türkiye’de kuzey, orta ve güneyde yetişir (Dalgıç & Güler, 2015). Ahlat, yabani armut veya yaban armudu olarak da bilinir.

Meyvelerinin halkarasında diyabet için kullanılmaktadır (Güneş, 2017). Yaprakları demlenerek çay olarak da içilmektedir (Yılmaz vd., 2015). Anadolu’nun bazı yerlerine ahlat yaprakları şişliklerde kullanılır (Honda vd., 1996) ve kurt, çakal, yılan gibi yabani hayvan ısırıklarında dövülmüş sarımsak ve yoğurtla karıştırılarak zehirin dışarı atılması için kullanılır (İlhan, Akkol, Taştan, Dereli & Tümen, 2019).

### 2.6.5. Kuşburnu (*Rosa canina* L.)

Diğer adı yabani gül ya da yaban gülüdür. Dik yapılı, tırmanıcı, gövdesi dikenli bir çalıdır, dalları yay şeklinde yana eğilebilir. Ormanlar, çalılar, yol kenarı, tarla kenarı ve kireç kayalarda yetişir. Ilıman iklim bitkisidir. Türkiye dışında Asya, Avrupa ve Afrika’da görülür. Çiçekleri pembe beyaz renkte, tek tek veya kümeler halinde olur. Meyveleri yuvarlak, yumurtamsı, koyu kırmızı, tüsüzdür. İçlerinde tüylü çekirdekler bulunur. Meyveler sonbaharda olgunlaşır ve “kuşburnu” olarak adlandırılan bu

meyveler çay ve marmelat yapımında kullanılır, A, D ve C vitaminince zengindir (Dalgıç & Güler, 2015).

Kuşburnu bitkisi Türkiye’de sık kullanılan bir halk bitkisidir. Halk arasında kuşburnunun meyveleri soğuk algınlığı, karın ağrısı ve ishale karşı (Bulut, 2011), meyve, dal ve kökleri soğuk algınlığı, öksürük, bademcik iltihabı, hepatit, astım, kalp ve damar tıkanıklığı hastalıklarında (Tuzlacı & Şenkardeş, 2011; Tuzlacı, Alparslan İşbilen & Bulut, 2010) kullanılmaktadır. Ayrıca meyveleri diyabet ve hemoroit tedavisinde, yaprak ve dalları bronşit tedavisinde kullanılmaktadır (Orhan, Hartevioğlu, Küpeli, Yeşilada, 2007). Avrupa halk hekimliğinde de kuşburnu ekstraktları diüretik ve laksatif olarak; böbrek ve üriner hastalıklarda; artirit, gut, soğuk algınlığı, ateş ve C vitamini eksikliğinde kullanılmaktadır (Lattanzio vd., 2011).

#### **2.6.6. Güvem (*Prunus spinosa* L.)**

Çakal eriği de denir. Küçük ağaç veya dikenli, sık dallı, dağınık görümlü, yayılıcı bir çalıdır. Ilıman iklim bitkisidir. Boyu 3 metreye kadar uzayabilir. Orman kenarı, çalılar, çayırlar ve dere kenarlarında yetişir. Gövdesi siyah, sıkı ve serttir. Sürgünleri dikenli ve tüylüdür. Yaprakları ters yumurtamsı, donuk yeşil, üstü tüysüz, altı tüylüdür. Mart-Nisan aylarında çiçek açar. Çiçekleri beyaz renklidir, çoktur. Meyveleri küre şeklinde ve mavimtırak siyah renklidir. Meyvelerindeki kabuğun üzerinde beyazımsı mumsu tabaka bulunur. Kökleri iyi bir toprak tutucudur. Yamaçlarda yetişir (Dalgıç & Güler, 2015).

Meyveleri eriksi, ekşi, asitli, C vitamini bakımından zengindir (Dalgıç & Güler, 2015). Güvem meyveleri halk arasında şeker hastalığının tedavisinde kullanılmaktadır (Bulut, 2011). Çiçekleri ve yaprakları diüretik, spazm çözücü ve antiinflamatuvar olarak da kullanılır (Olszewska, Glowackı, Wolbis & Bald, 2001; Ghazghazi vd., 2010).

## 2.7. Tezde Kullanılan Bitkilerin Antioksidan ve Antidiyabetik Aktiviteleriyle İlgili Literatür Araştırması

### 2.7.1. Tezde Kullanılan Bitkilerle İlgili Yapılmış Olan Antioksidan Aktivite Çalışmaları

Polonya’da yapılan bir çalışmada elma yaprak ve meyvesinden su ile ekstrakte edilen polifenoller ön saflaştırma uygulanarak deriştirilmiştir. Lipid peroksidasyonu oluşturulan hayalet eritrosit membranında hem lipid peroksidasyon ürünü malondialdehit ölçülerek, hem de floresans prop ile ekstrakt varlığında ve yokluğunda lipid oksidasyonunun inhibisyonu araştırılmıştır. Ayrıca ekstraktların fenolik bileşenleri HPLC ile belirlenmiştir (Kujawa, Cyboran, Oszmiański & Kleszczyńska, 2011).

*Malus domestica* türüne ait Golden ve Royal çeşidi elma yaprakları etanolle ekstrakte edildikten sonra diğer çözücüler ile fraksiyonlanmış; örneklerin antioksidan aktiviteleri DPPH, ABTS ve FRAP metodları ile ölçülmüş ve toplam fenolik ve flavonoid tayinlerinin yanısıra UPLC ile fenolik bileşenleri tanımlanmıştır (Walia, Kumar & Agnihotri, 2015). Benzer bir çalışmada elma yaprağı etanol ekstraktında aynı metodlar kullanılmış ve HPLC analizi ile floridzin ana bileşen olarak tayin edilmiştir (Liaudanskas vd.,2014).

Lu ve arkadaşları tarafından elma (*Malus pumila* Mill.) yaprakları petrol eteri, etilasetat ve % 75’lik etanol ile fraksiyonlanarak ekstrakte edildikten sonra, ekstraktlarda toplam fenolik ve flavonoid tayini ve DPPH testleri yapılmıştır. HPLC ile fenolik içerikleri belirlenmiş, sitotoksisite testi yapılmış ve ayrıca nöron hücre kültüründeki oksidatif hasara karşı ekstraktların nöroprotektif etkisi de çalışılmıştır (Lu vd., 2019).

Diğer bir çalışmada elma (*Malus domestica* Borkh.) yapraklarının sulu metanol ve etanol ekstraktlarında toplam fenolik ve flavonoid tayinleri yapılarak, fenolik profili RP-HPLC ile elde edilmiştir ve antioksidan tayin metodu olarak ABTS metodu uygulanmıştır. Bu çalışmada elma yapraklarının in vitro sitotoksisite testi, antimikrobiyal ve antiinflamatuvar aktivitesi de araştırılmıştır (Rana vd., 2016).

Litvanya’daki dört elma (*Malus domestica* Borkh.) kültürünün yapraklarından alınan etanol ekstraktlarında toplam fenolik ve flavonoid tayinleri, ABTS, DPPH ve

FRAP metodlarıyla antioksidan aktivite tayini ve HPLC ile fenolik bileşen analizi yapılmıştır (Liaudanskas vd., 2014).

Elma ve ayva yapraklarını da kapsayan 7 bitki ile yapılan diğer bir çalışmada ise bitkilerin polifenolik analizi yapılmış ve ABTS ve FRAP metodlarıyla antioksidan aktivite değerlendirilmiştir (Teleszko & Wojdylo, 2015).

Ayva (*Cydonia oblonga* Miller) yapraklarının metanolik ekstraktının DPPH süpürücü aktivitesi, eritrositlerin oksidatif hemolizini önleyici ve kanser hücreleri üzerinde antiproliferatif etkisi olduğu bildirilmiştir (Oliveira vd., 2012). Benzer bir çalışmada da yeşilçay ile karşılaştırmak üzere ayva (*Cydonia oblonga*) yapraklarının metanolik ekstraktının FCR ve DPPH metodlarıyla antioksidan ve oksidatif hasar oluşturulmuş eritrositler üzerinde antihemolitik özellikleri incelenmiş; HPLC/UV ile fenolik içeriği analizlenmiştir (Costa vd., 2009).

Ayva (*Cydonia oblonga* Miller) yapraklarının metanolik, etanolik ve sulu ekstraktlarında FCR ile toplam fenolik bileşen tayini; FRAP ve DPPH metodları ile de antioksidan aktivitesi çalışılmıştır (Yılmaz & Seyhan, 2017).

Çin’de ekilen *Pyrus ussuriensis* Maxim. türü armudun kabuk ve yapraklarından metanolla başlayarak çeşitli çözücülerle fraksiyonlamayla elde edilen ekstraktlarda 13 tane fenolik izole edilmiş ve örneklerin yüksek oranda DPPH radikalini süpürdüğü bildirilmiştir (Qiu vd., 2017).

İki armut türünün (*Pyrus communis* ve *Pyrus pyrifolia*) yapraklarından alınan metanol ekstraktlarında toplam fenol tayini, ABTS radikali süpürme etkisi ve antimikrobiyal aktivitesi çalışılmış; RP-HPLC ile fenolik bileşenleri belirlenmiştir (Sroka vd., 2018).

Türkiye’de yetişen ahlut (*P. elaeagnifolia* subsp. *elaagnifolia*) meyvesinin etil asetat, hekzan ve metanol ekstraktlarında toplam fenolik, flavonoid ve tanen tayini yapılarak, sıçanlarda deneysel kolit oluşturulmuş ve ekstraktların antiinflamatuvar etkisi araştırılmıştır (İlhan, Akkol, Taştan, Dereli & Tümen, 2019).

Tunus’ta yetişmiş kuşburnu (*Rosa canina*) yapraklarının metanol ekstraktlarında ABTS ve DPPH metodlarıyla antioksidan aktivite tayini, toplam flavonoid tayini, Folin metoduyla toplam fenolik madde tayini ve uçucu yağ profili analizleri yapılmıştır (Ghazghazi vd., 2010). Yine Tunus’a ait üç Rosa türünün (*Rosa canina*, *Rosa sempervirens* ve *Rosa moschata*) yapraklarından elde edilen metanol ve etilasetat

ekstraktlarında TPC, DPPH, TEAC, FRAP, ORAC testleri yapılarak antioksidan aktiviteleri değerlendirilmiş ve ayrıca içerdikleri fenolikler HPLC ile analizlenmiştir (Ouerghemmi vd., 2016).

Sicilya’da yetişen dört Rosa (*Rosa canina* L., *R. corymbifera*, *R. micrantha* ve *R. sempervirens*) türünün Haziran ve Ekim aylarında yaprakları toplanmış, yaprakların metanol ekstraktlarında klorofil, karotenoid, toplam antosiyanin, toplam flavonoid, toplam polifenol (FCR) ve DPPH radikali giderme tayinleri yapılmıştır (D’angiollillo, Mammano & Fascella, 2018).

Bulgaristan’da yetişen ve aralarında kuşburnu (*Rosa canina* L.) meyvesi ve güvem (*Prunus spinosa* L.) meyvesinin de bulunduğu altı yabancı türden elde edilen sulu ve metanolik ekstraktlarda TPC ve ABTS radikali giderme metoduyla, meyvelerin antioksidan potansiyelleri değerlendirilmiştir (Kiselova vd., 2005).

İspanya’da yetişen Rosacea ailesinden güvem (*Prunus spinosa*) ve alıç (*Crataegus monogyna*) meyvelerinde HPLC ile C vitamini, fenolik asit, flavonol ve antosiyanin analizleri; TPC, ABTS, DPPH ve FRAP metodlarıyla antioksidan aktiviteleri çalışılmıştır (Ruiz-Rodriguez vd., 2013).

Gümüşhane’de yetişen güvem (*Prunus spinosa* L.) meyveleriyle yapılan kapsamlı bir çalışmada metanolik ekstrakt fenolik bileşenleri için RP-HPLC ile analizlenmiş; antioksidan aktivitesi TPC, FRAP ve DPPH metodlarıyla çalışılmış ve, altı tür bakteri ve iki tür maya kullanılarak antimikrobiyal aktivitesi araştırılmıştır (Aliyazıcıoğlu vd., 2015).

Güvem (*Prunus spinosa* L.)’in meyve, yaprak ve dallarından sırasıyla diklorometan, etilasetat, etanol ve su kullanılarak fraksiyonlu ekstraksiyon sonrası DPPH testi, toplam fenolik ve flavonoid tayinleri yapılmış, ayrıca HPLC teknikleriyle özel fenolik bileşenleri de analizlenmiştir (Pinacho, Caverro, Astiasarán, Ansorena & Calvo, 2015) Ayrıca güvem (*Prunus spinosa* L.) yapraklarından ve çiçeklerinden çeşitli flavonoidler de saflaştırılarak tanımlanmıştır (Olszewska & Wolbis, 2002; Olszewska, Glowacki, Wolbis, Bald, 2001).

## 2.7.2. Tezde Kullanılan Bitkilerle İlgili Yapılmış Olan Antidiyabetik Aktivite Çalışmaları

Birçok ülkede olduğu gibi Türkiye’de de halk arasında şeker hastalığının tedavisinde yaygın olarak kullanılan bitkiler vardır. Bunlardan bazıları çemen tohumu, tarçın, çörekotu, karadut, zeytin yaprağı, yaban mersini, kimyon tohumu, rezene, kırkkilit otu, fesleğen, yer elması, ayva yaprağı, ısırgan, nar kısımları, bamya çiçeği, kudret narı, banaba, çemen, gurmar, tarçın, Ginseng türleri, konyak bitkisi, tetra, maydanoz, pelinotu, devedikeni, kenger, yeralması, solmaz çiçek, karahindibağ, çobançantası, mürver, kızılıcık, ardıç, ceviz, kekik, adaçayı, bamya, ebegümece, dut, hünnap, acıbadem, ısırgan, mahlep, vişne, alıç, ayva, taflan, yabani elma, muşmula, güvem, ahlat, kuşburnu, böğürtlen, üvezdir (Arituluk & Ezer, 2012; Aslan & Orhan, 2010; Çıkladilmez, 2013).

Şeker hastalığının tedavisinde geleneksel olarak kullanılan bu bitkilerin bazıları Rosaceae ailesindedir. Yapılan taramada tez kapsamında çalışılan bitkilerin bazılarının meyvelerinin antidiyabetik özelliğiyle ilgili in vitro veya in vivo çalışmalar mevcut olup; yapraklarının in vitro antidiyabetik özelliğiyle ilgili çalışmalara çok fazla rastlanmamıştır. Ulaşılan çalışmalardan bazıları aşağıda verilmiştir.

Aslan ve arkadaşları deneysel olarak diyabet oluşturdukları sıçanlara 5 gün boyunca günde iki kez yer elması, pırasa ve ayva (*Cydonia oblonga*) yaprağı etanol ekstraktı vererek yaptıkları çalışmalarında, üç örnek arasında en etkili antidiyabetik özelliği ayva yaprağının gösterdiğini rapor etmişlerdir (Aslan, Orhan, Orhan & Ergün, 2010). Aynı grup bu üç bitkinin (yer elması, pırasa ve ayva yaprağı) in vitro olarak da antidiyabetik ve antioksidan aktivitesini de metal şelatlama, indirgeme gücü, DPPH ve ABTS radikallerini giderme metodlarıyla çalışmış ve bitkilerin etki mekanizmalarının  $\alpha$ -amilaz ve  $\alpha$ -glukozidaz enzimlerinin inhibisyonu yoluyla olmadığını bildirmişlerdir (Orhan & Orhan, 2016). Bu grubun üyeleri yine deneysel olarak diyabetik yaptıkları sıçanlar üzerinde kuşburnu (*Rosa canina*) meyvesinden elde ettikleri ekstraktların antidiyabetik etkisini incelemişler ve ayrıca ekstraktların antioksidan aktivitelerini TPC, DPPH radikali giderme, metal şelatlama ve indirgeme gücü metodları ile in vitro olarak da çalışmışlardır (Orhan, Aslan, Hoşbaş & Deliorman, 2009).

Rosaceae ailesi meyveleri özellikle gıda olarak yaygın şekilde tüketilmektedir. Dolayısıyla halk arasında şeker hastalığında bu meyvelerin kullanımı ulaşılabilirlik ve

tüketim şekli açısından kolaydır. Bu tez çalışmasında meyveleri yenilen ve bol bulunan bu aileye dahil elma, armut, güvem, ayva, ahlat ve kuşburnu meyvelerinin normalde tüketilmeyen ancak bol ve kolay bulunabilecek olan yaprakların antioksidan kapasitesinin yanında antidiyabetik özellikleri açısından da incelenmesi hedeflenmiştir.

## BÖLÜM 3

### MATERYAL VE METODLAR

#### 3.1. Materyaller

##### 3.1.1. Kullanılan Kimyasal Maddeler

BHA (Bütillenmiş hidroksi anisol), BHT (Bütillenmiş hidroksi toluen), EDTA (Etilendiamin tetraasetik asit), Tween-40 (Polioksi etilen sorbitan monopalmitat), Tannik asit, Folin-Denis ayırıcı, Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (Sodyum karbonat), DNS (3,5-dinitro salisilik asit), Al(NO<sub>3</sub>)<sub>3</sub> (Alüminyum nitrat), FeCl<sub>2</sub> (Demir (II) klorür), Sodyum persülfat (Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>8</sub>), Sodyum nitrit (NaNO<sub>2</sub>), Folin&Ciocalteu ayırıcı, α-amilaz (domuz pankreatik kaynaklı, 30 units/mg solid), α-glukozidaz (*Saccharomyces cerevisia*, 100 UN), Linoleik asit (C<sub>18</sub>H<sub>32</sub>O<sub>2</sub>), p-nitrophenil-α-D-glukopiranosid (C<sub>12</sub>H<sub>15</sub>NO<sub>8</sub>), β-karoten (C<sub>40</sub>H<sub>56</sub>), α-tokoferol (C<sub>29</sub>H<sub>50</sub>O<sub>2</sub>), Kateşin, Akarboz (C<sub>25</sub> H<sub>43</sub>NO<sub>18</sub>), Ferrozin (3-(2-Piridil)-5,6-difenil-1,2,4-triazin-*p,p'*-disülfonik asit monosodyum tuzu), Neokuproin (2,9-Dimethyl-1,10-phenanthroline, C<sub>14</sub>H<sub>12</sub>N<sub>2</sub>), ABTS (2,2'-azinobis (3-etilbenzotiazolin-6-sülfonat)), DPPH (1,1-difenil-2-pikrilhidrazil), Gallik asit (C<sub>7</sub>H<sub>6</sub>O<sub>5</sub>), Amonyum asetat (C<sub>2</sub>H<sub>7</sub>NO<sub>2</sub>), Rutin (C<sub>27</sub>H<sub>30</sub>O<sub>16</sub>), Sodyum-potasyum tartarat (KNaC<sub>4</sub>H<sub>4</sub>O<sub>6</sub>·4H<sub>2</sub>O) kimyasal maddeleri Sigma firması; Fenol (C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>OH), Nişasta, Sodyum sülfat (Na<sub>2</sub>SO<sub>3</sub>), AlCl<sub>3</sub>·6H<sub>2</sub>O (Alüminyum klorid heksahidrat), NaOH (Sodyum hidroksit), CuCl<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O (Bakır (II) klorid dihidrat), Kloroform (CHCl<sub>3</sub>) kimyasalları Merck firması; NaCl (Sodyum klorür), Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (Disodyum hidrojen fosfat), KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (Mono potasyum dihidrojen fosfat) Riedel-de-Häen firması, Troloks metil eteri Fluka ve etanol (% 96) Alkomed tarafından temin edilmiştir.



### 3.1.2. Kullanılan Cihazlar

Çalışma süresince kullanılan cihazlar aşağıda listelenmiştir:

- Spektrofotometre ve Mikroplaka Okuyucu (Therma Scientific)
- Hassas Terazı (Citizon)
- Hassas Terazı (Precisa Xb 220a)
- pH Metre (Wtw 82362 Weilheim)
- Waring Blender
- Çalkalamalı Su Banyosu (Wisebath Daihan)
- Manyetik Karıştırıcı ve Isıtıcı (Ciltern Hotplate Magnetic Stirrer H351)
- Vorteks (Whırlı Mixer Finons)
- Saf Su Cihazı (Elga-Reservoir 40l Model Lab612)
- Mikro Pipetler (Eppendorf)
- Santrifüj (Hettich Zentrifugen Rotina 38r)
- Etüv (Daihan)
- Evaporatör (Buchi R-200)
- Ultrasonik Su Banyo (Daihan Wiseclean)
- Buzdolabı (Arçelik, Vestel)
- Derin Dondurucu (-80°C ) (Wise Cyro Daihan)
- Cam Malzemeler ( Iso Lab)
- Mikroplaka (Spl Life Sciences Cell Culture Plate)
- Kuvarz Küvetler (Iso Lab)
- Liyofilizatör (Wirtis Sp Scientific Sentry 2.0)

### 3.1.3. Çalışmada Kullanılan Çözeltiler

#### 3.1.3.1. Toplam Fenolik Madde Tayininde Kullanılan Çözeltiler

- % 2'lik Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> çözeltisi: 0,5 g Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> tartıldı ve saf suda çözülerek balon jøjede 25 mL'ye tamamlandı.
- Gallik asit çözeltisi: 0,05 g gallik asit tartıldı ve saf su ile 50 mL'ye tamamlandı. 20, 100, 200, 300, 400, 500 µg/mL konsantrasyonlara seyreltildi.
- Folin Ciocalteu Reaktifı (FCR): Satın alındığı şekilde direk kullanıldı.

### 3.1.3.2. Toplam Flavonoid Tayininde Kullanılan Çözeltiler

- % 5'lik NaNO<sub>2</sub>: 0,5 g NaNO<sub>2</sub> tartıldı ve 10 mL'ye saf su ile tamamlandı.
- % 10'luk AlCl<sub>3</sub>.6H<sub>2</sub>O: 1 g AlCl<sub>3</sub>.6H<sub>2</sub>O tartıldı ve 10 mL'ye saf su ile tamamlandı.
- 1 M NaOH: 2 g NaOH saf suda çözülerek 50 mL'ye saf su ile tamamlandı.
- 1 mg/mL Rutin çözeltisi: 0,025 g rutin tartıldı ve 25 mL etanolde çözüldü. 25, 50, 100, 150 µg/mL konsantrasyonlara seyreltildi.
- 1 mg/mL Kateşin çözeltisi: 0,025 g kateşin tartıldı ve 25 mL etanolde çözüldü. 20, 40, 60, 80, 100 µg/mL konsantrasyonlara seyreltildi.

### 3.1.3.3. Tanen Tayininde Kullanılan Çözeltiler

- 1 mg/mL Tannik asit çözeltisi: 100 mg tartılarak 100 mL saf suda çözüldü. 10, 20, 30, 40, 50, 60 ve 70 µg/mL konsantrasyonlara seyreltildi.
- Doygun Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>: 175 g tartıldı ve 500 mL saf su eklenerek ısıtılarak çözüldü. 1 gece bekletildi ve cam pamuğundan süzülerek kullanıldı.
- Folin- Denis Reaktifi: Ticari olarak satın alındığı şekilde kullanıldı.

### 3.1.3.4. DPPH' Giderme Metodunda Kullanılan Çözeltiler

- 1 mM DPPH: 0,0394 g DPPH tartılarak balon jøjeye konuldu ve etanolde çözülerek 100 mL'ye tamamlandı. Işık almaması için etrafı alüminyum folyo ile kaplandı.
- 0,1 mM DPPH: 1 mM DPPH çözeltisinden 25 mL alınıp etanol ile 250 mL'ye tamamlandı.
- 1 mg/mL'lik BHA çözeltisi: 25 mg BHA tartıldı ve 25 mL etanol ile tamamlanarak hazırlandı. 10, 25, 50, 100, 250, 500, 750, 1000 µg/mL konsantrasyonlara seyreltildi.
- 1 mg/mL'lik BHT çözeltisi: 25 mg BHT tartıldı ve 25 mL etanol ile tamamlanarak hazırlandı. 10, 25, 50, 100, 250, 500, 750, 1000 µg/mL konsantrasyonlara seyreltildi.

### 3.1.3.5. ABTS<sup>•+</sup> Giderme Metodunda Kullanılan Çözeltiler

- 7 mM ABTS: 0,770 g ABTS tartılarak 200 mL saf su ile tamamlanarak hazırlandı.
- 2,45 mM Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>8</sub>: 0,145 g tartılarak 250 mL saf su ile tamamlanarak hazırlandı.
- ABTS<sup>•+</sup> çözeltisi: 100 mL 7 mM ABTS çözeltisi ve 50 mL 2,45 mM Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>8</sub> çözeltisi 1:0,5 oranında karıştırılarak 16 saat karanlıkta bekletildi ve ABTS katyonik radikalinin oluşumu sağlandı. ABTS<sup>•+</sup> çözeltisi 734 nm'de 0,7 absorbans vermek üzere % 80 etil alkol ile seyreltildikten sonra deneyde kullanıldı.

### 3.1.3.6. CUPRAC Metodunda Kullanılan Çözeltiler

- 0,01 M CuCl<sub>2</sub>.2H<sub>2</sub>O: 0,462 g tartıldı ve üzerine 250 mL saf su eklenerek tamamlandı.
- 7,5 mM Neokuproin: 0,156 g tartıldı ve 100 mL etil alkolde çözülerek hazırlandı.
- 1 M Amonyum asetat tamponu (pH:7): 19,27 g tartıldı ve 250 mL saf su ile tamamlanarak hazırlandı.
- % 10 TCA çözeltisi: 10 g TCA tartılarak saf su ile çözüldü ve 100 mL'ye tamamlanarak hazırlandı.
- α-Troloks çözeltisi: 10 mg troloks 10 mL etil alkolde çözülerek stok çözelti hazırlandı. 100, 150, 200, 250, 300 ve 400 µg/mL konsantrasyonlara seyreltildi.

### 3.1.3.7. β-Karoten Ağartma Yönteminde Kullanılan Çözeltiler

- Substrat emülsiyonu: Balona 0,0005 g β-karoten, 2 mL kloroform, 400 µL Tween 40 ve 40 µL linoleik asit ekleyerek karıştırıldı. Evaporatörde kloroformu uçurulduktan sonra üzerine 100 mL ultra saf su eklenerek 10 dk kuvvetlice çalkalandı. Elde edilen substrat emülsiyonu deneyde kullanıldı.
- α-Tokoferol çözeltisi: 0,026 g α-tokoferol tartılarak 26 mL etil alkolde çözüldü. Etil alkol ile 50, 100, 250, 500, 750, 1000 µg/mL konsantrasyonlara seyreltilerek kullanıldı.

### 3.1.3.8. Metal Şelatlama Yönteminde Kullanılan Çözeltiler

- 2 mM FeCl<sub>2</sub>: 0,0126 g FeCl<sub>2</sub> tartılarak ultra saf suda çözüldü ve 50 mL'ye tamamlandı.
- 5 mM Ferrozin: 0,0616 g ferrozin tartılarak ultra saf suda çözüldü ve 25 mL ultra saf su ile tamamlandı.
- Standart EDTA çözeltisi (1 mg/mL): 0,025 g EDTA tartılarak 25 mL ultra saf su ile hazırlandı. 25, 50, 75 ve 100 µg/mL konsantrasyonlara seyreltilerek kullanıldı.

### 3.1.3.9. α-Amilaz Enzim Aktivitesi ve İnhibisyonu İçin Kullanılan Çözeltiler

- 20 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>: 2,72 g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> tartılarak çözüldü ve 1000 mL'lik balon jodede saf su ile tamamlandı.
- 20 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>: 2,8 g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> tartılarak çözüldü ve 1000 mL'lik balon jodede saf su ile tamamlandı.
- 20 mM Fosfat tamponu (pH=6.8): Tampon hazırlama tablosuna göre, hazırlanan 20 mM'lık KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> çözeltisinden 53 mL, 20 mM'lık Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> çözeltisinden 47 mL ve 0,14 g NaCl eklenerek fosfat tamponu hazırlandı. pH metre ile pH'ı kontrol edildikten sonra kullanıldı.
- %1'lik nişasta çözeltisi: 0,5 g nişasta tartılarak, 50 mL 20 mM fosfat tamponu (pH:6.8) eklenerek ve ısıtılarak çözüldü.
- α-amilaz enzimi çözeltisi (1,5 U): 0,015 g tartılarak 15 mL 20 mM fosfat tamponunda (pH:6.8) hazırlandı.
- DNS (3,5-dinitro salisilik asit) çözeltisi: 0,4 DNS tartıldı, içine 0,02 g sodyum sülfid, 0,4 g NaOH ve 8 g Na-K tartarat eklendi, 40 mL saf suda çözülerek hazırlandı.
- Standart Akarboz çözeltisi (5 mg/mL): 0,1 g akarboz tartılarak 20 mL saf suda çözülerek hazırlandı. 5, 10, 50, 100, 250, 500 ve 1000 µg/mL konsantrasyonlara seyreltilerek kullanıldı.

### 3.1.3.10. $\alpha$ -Glukozidaz Enzim Aktivitesi ve İnhibisyonu İçin Kullanılan Çözeltiler

- 0,1 M  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ : 13,609 g  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  saf suda çözülerek, balon jodede 1000 mL hacmine tamamlandı.
- 0,1 M  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ : 14,196 g  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  saf suda çözülerek, balon jodede 1000 mL hacmine tamamlandı.
- 0,1 M Fosfat tamponu (pH=6.8): Tampon hazırlama tablosuna göre, 0,1 M  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  çözeltisinden 41 mL ve 0,1 M  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  çözeltisinden 59 mL alınarak hazırlandı. Fosfat tamponunun pH'ı pH metre ile kontrol edildikten sonra kullanıldı.
- 5 mM p-NPG (4-nitro fenil  $\alpha$ -D-glukopiranosid): 0,0075 g pNPG tartılarak 5 mL 0,1 M fosfat tamponunda (pH=6.8) çözüldü.
- $\alpha$ -glukozidaz enzimi (0,2 U): 1 mg tartılarak 1080  $\mu\text{L}$  0,1 M fosfat tamponunda (pH=6.8) hazırlandı. Deneyde bu stok çözeltilerden 100  $\mu\text{L}$  alınarak 4900  $\mu\text{L}$  tampon ile seyreltikten sonra kullanıldı (0,004 U).
- 0,1 M  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ : 0,265 g  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  tartılarak 25 mL saf suda çözüldü.

## 3.2. Metodlar

### 3.2.1. Bitki Ekstraktlarının Hazırlanması

*Rosaceae* ailesinden olan elma (*Malus sylvestris* (L.) Mill var. *domestica* (Borkh.) Mansf. 'Fuji'), armut (*Pyrus communis* L. 'Deveci'), ahlat/yabani armut (*Pyrus communis* subsp. *communis*), ayva (*Cydonia oblonga* Mill.), kuşburnu (*Rosa canina* L.) ve güvem (*Prunus spinosa* L.) bitkilerinin yaprakları Musabeyli (Edirne) Köyü yakınındaki araziden toplandı. Bitki örneklerinden elma ve armut kültürü yapılan, diğerleri arazi civarında bulunan bitkiler olup; toplanan yaprakları direk güneş ışığı görmeyen, havadar bir ortamda kurutuldu, blenderda öğütüldü ve uygun koşullarda saklandı.

Bitkilerin etanol ekstraktlarını hazırlamak için; her bir bitki örneğinden 30 gr tartılarak erlene konuldu. Bitki/alkol oranı 1:20 (w/v) olacak şekilde etanol eklenerek çalkalamalı su banyosunda 180 rpm'de 24 °C'de 3 saat ekstraksiyonları gerçekleştirildi. Süzgeç kağıdı ile süzüldü. Kalan bitki yapraklarının üzerine tekrar

etanol eklenerek, aynı şartlarda 3 saat daha ekstraksiyon işlemi gerçekleştirildi. Süzgeç kağıdından süzüldü ve ekstraktlar birleştirildi. Evaporatörde çözücüsü uzaklaştırıldı. Elde edilen ekstraktlar kullanılıncaya kadar buzdolabında muhafaza edildi (Şekil 3.1).



**Şekil 3.1.** Tezde kullanılan bitki yapraklarından alkol ekstraktı hazırlama aşamaları

Bitkilerin su ekstraktlarını hazırlamak için; 30 g bitki örneği üzerine 300 mL kaynatılmış sıcak saf su, bitki/saf su oranı 1:10 (w/v) olacak şekilde konularak, beherin ağzı alüminyum folyo ile sıkıca kapatıldı, 15 dk 80 °C’de bekletildi. Süzgeç kağıdından süzildikten sonra süzüntüler donduruldu ve liyofilizatörde suyu uzaklaştırıldı. Liyofilize bitki ekstraktları kullanılıncaya kadar buzdolabında saklandı.

Bitki yapraklarından elde edilen su ve alkol ekstraktlarının hepsi 1 mg/mL konsantrasyonda stok çözelti olarak hazırlandı ve çalışılan metoda göre 10-1000 µg/mL aralığındaki çeşitli konsantrasyonlara seyreltilerek deneylerde kullanıldı.

### **3.2.2. Fitobileşenlerin Tayini**

#### **3.2.2.1. Toplam Fenolik Madde (TPC) Tayini**

Elma, ayva, armut, ahlat, kuşburnu ve güvem bitkilerinin kurutulmuş yapraklarından elde edilen ekstraktlarda toplam fenolik madde tayini Singleton ve Rossi (1965) metoduna göre yapıldı.

1 mg/mL konsantrasyondaki su ve alkol ekstraktlarından deney tüplerine 0,1'er mL alındı. Üzerlerine 4,5 mL destile su ve 0,1 mL Folin-Ciocalteu Reaktifi eklenerek vortekslendi. 3 dk bekletildikten sonra tüplere 0,3 mL % 2'lik Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> eklendi ve oda koşullarında 125 rpm'de 2 saat çalkalamalı su banyosunda bekletildi. λ=760 nm'de absorbansları ölçüldü. Kontrol olarak su ekstraktları için ekstrakt yerine 0,1 mL saf su; alkol ekstraktları için ekstrakt yerine 0,1 mL alkol konularak aynı deney prosedürü çalışıldı.

Örneklerdeki fenolik madde miktarını tayin etmek için, standart madde olarak gallik asit kullanıldı. 50, 100, 200, 300, 400, 500 µg/mL konsantrasyonlarında hazırlanan gallik asit çözeltilerine aynı deney prosedürü uygulandı. Microsoft Excel programında, elde edilen absorbanslara karşı konsantrasyon grafiği çizilerek, gallik asit standart grafiği ( $y=0,001x-0,0355$ ,  $R^2=0,996$ ) elde edildi. Grafiğin doğru denklemi kullanılarak, her bir ekstraktın toplam fenolik madde miktarı gallik asit eşdeğeri cinsinden hesaplandı.

#### **3.2.2.2. Toplam Flavonoid Tayini**

Elma, ayva, armut, ahlat, kuşburnu ve güvem bitkilerinin kurutulmuş yapraklarından elde edilen ekstraktlarda toplam flavonoid madde tayini yapıldı (Zhishen, Mengchneq & Jianming, 1999).

1 mg/mL konsantrasyonlarda hazırlanan ekstraktlardan deney tüplerine ayrı ayrı 0,5 mL konuldu ve 2 mL saf su eklendi. Üzerlerine 75 µL % 5'lik NaNO<sub>2</sub> çözeltisi eklenerek 5 dk oda koşullarında bekletildi. 150 µL % 10'luk AlCl<sub>3</sub>.6H<sub>2</sub>O eklendi ve 6

dk oda koşullarında bekletildikten sonra 0,5 mL 1M NaOH eklenerek vorteks yapıldı.  $\lambda=510$  nm'de absorbansları okundu. Kontrol olarak su ekstraktları için ekstrakt yerine 0,5 mL saf su; alkol ekstraktları için ekstrakt yerine 0,5 mL alkol konularak aynı deney prosedürü çalışıldı.

Flavonoidler geniş bir çeşitlilik gösterdiği için standart olarak rutin (flavonol glikozidi) ve kateşin (flavanol) olarak iki farklı flavonoid türü ile çalışıldı. 25, 50, 100, 150  $\mu\text{g/mL}$  konsantrasyonlarda rutin çözeltileri ve 20, 40, 60, 80, 100  $\mu\text{g/mL}$  konsantrasyonlarda kateşin çözeltileri hazırlanarak aynı deney prosedürü uygulandı. Herbiri için ayrı ayrı standart grafikleri çizilerek doğru denklemleri bulundu. Buna göre her bir ekstrakt için rutin ( $y=0,0089x-0,0684$ ,  $R^2=0,9952$ ) ve kateşin ( $y=0,0063x-0,0021$ ,  $R^2=0,9986$ ) eşdeğeri cinsinden flavonoid madde miktarları hesaplandı.

### **3.2.2.3. Tanen Tayini**

Elma, ayva, armut, ahlat, kuşburnu ve güvem bitkilerinin kurutulmuş yapraklarından elde edilen ekstraktlarda tanen tayini yapıldı (Katoch, 2011).

1 mg/mL konsantrasyonlardaki su ve alkol ekstraktlarının herbirinden 100  $\mu\text{L}$  alındı ve üzerlerine 500'er  $\mu\text{L}$  Folin-Denis reaktifi eklendi. 1 mL doygun  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  çözeltisi eklenerek toplam hacim saf su ile 10 mL'ye tamamlandı. Tüpler vorteksledikten sonra 30 dk bekletildi ve  $\lambda=700$  nm'de absorbansları ölçüldü. Ekstrakt yerine saf su veya alkol konularak kontrol tüpüne de aynı deney prosedürü uygulandı.

Ekstraktların içerdiği tanen miktarını belirlemek üzere standart olarak tannik asit kullanıldı. 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70  $\mu\text{g/mL}$  konsantrasyonlarda hazırlanan tannik asit çözeltilerine deney prosedürü uygulandı. Absorbans-konsantrasyon grafiği çizilerek doğru denklemi ( $y=0,0084x-0,0288$ ,  $R^2=0,9968$ ) yardımı ile bitki ekstraktlarındaki tanen miktarları tannik asit cinsinden bulundu.

### **3.2.3. Antioksidan Aktivite Tayin Metodları**

#### **3.2.3.1. DPPH' Giderme Metodu**

Elma, ayva, armut, ahlat, kuşburnu ve güvem bitkilerinin kurutulmuş yapraklarından elde edilen ekstraktlarda DPPH kullanılarak serbest radikal giderme aktivitesi çalışıldı (Blois, 1958).

1 mg/mL konsantrasyonlarında hazırlanan stok su ve alkol ekstraktları 25, 50, 100, 250, 500 ve 750  $\mu\text{g/mL}$  konsantrasyonlara seyreltildi. 1'er mL örnek üzerine



etanolda hazırlanmış 0,1 mM DPPH çözeltisinden 4 mL eklenerek vortekslendi. Oda koşullarında ve karanlıkta 30 dk bekletildikten sonra  $\lambda=517$  nm'de absorbansları ölçüldü. Kontrol tüpleri için ekstrakt yerine alkol veya saf su kullanılarak aynı deney prosedürü çalışıldı.

BHA ve BHT standart maddelerinden de 25, 50, 100, 250, 500, 750, 1000  $\mu\text{g/mL}$  konsantrasyonlarda hazırlanarak aynı deney prosedürü çalışıldı.

Tüm bitki ekstraktları ve standart maddeler için ölçülen absorbans değerleri kullanılarak aşağıdaki formül ile serbest radikal giderme etkinlikleri % inhibisyon olarak hesaplandı.

$$\% \text{ İnhibisyon} = [(\text{Absorbans}_{\text{kontrol}} - \text{Absorbans}_{\text{örnek}}) / \text{Absorbans}_{\text{kontrol}}] \times 100$$

### 3.2.3.2. ABTS<sup>•+</sup> Giderme Metodları

Elma, ayva, armut, ahlat, kuşburnu ve güvem bitkilerinin kurutulmuş yapraklarından elde edilen ekstraktlarda ABTS kullanılarak serbest radikal giderme aktivitesi çalışıldı (Rice-Evans, 1999).

ABTS<sup>•+</sup> giderme metodu için öncelikle 7 mM'lık ABTS çözeltisi ve 2,45 mM'lık Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>8</sub> çözeltisi hazırlandı. 7 mM ABTS ve 2,45 mM Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>8</sub> çözeltileri 1:0,5 oranında karıştırıldı ve 16 saat karanlıkta bekletilerek ABTS<sup>•+</sup> çözeltisinin (ABTS radikalik çözeltisi) oluşumu sağlandı. ABTS<sup>•+</sup> çözeltisi  $\lambda=734$  nm'de yaklaşık 0,7 absorbans vermek üzere % 80 etanolla seyreltildi ve deneyde bu şekilde kullanıldı. 25, 50, 100, 250, 500, 750, 1000  $\mu\text{g/mL}$  konsantrasyonlarında saf su ve alkol ekstraktları hazırlandı ve deney tüplerine ayrı ayrı 50  $\mu\text{L}$  konuldu. Üzerlerine 2 mL ABTS<sup>•+</sup> çözeltisi eklenerek 30 dk karanlıkta bekletildi ve  $\lambda=734$  nm'de absorbans ölçüldü. Kontrol tüpüne ekstrakt yerine 50  $\mu\text{L}$  saf su veya alkol konularak deney prosedürü aynen uygulandı.

ABTS<sup>•+</sup> giderme metodunda standart madde olarak kullanılmak üzere 25, 50, 100, 250 ve 500  $\mu\text{g/mL}$  BHA ve BHT çözeltileri hazırlandı. Aynı deney prosedürü standartlar için de tekrarlandı. Absorbans ölçümleri yapılan tüm bitki ekstraktları ve standart maddeler için aşağıdaki formül ile hesaplama yapılarak % inhibisyon değerleri hesaplandı.

$$\% \text{ İnhibisyon} = [(\text{Absorbans}_{\text{kontrol}} - \text{Absorbans}_{\text{örnek}}) / \text{Absorbans}_{\text{kontrol}}] \times 100$$

### 3.2.3.3. CUPRAC Metodu

Elma, ayva, armut, ahlat, kuşburnu ve güvem bitkilerinin kurutulmuş yapraklarından elde edilen ekstraktlarda toplam antioksidan aktivite tayini CUPRAC metoduna göre çalışıldı (Apak, Güçlü, Özyürek & Karademir, 2004).

CUPRAC deneyi için mikropalakanın kuyucuklarına sırasıyla 50 µL  $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  çözeltisi, 50 µL neokuproin ve 50 µL amonyum asetat tamponu (pH=7.0) konuldu. Üzerlerine artan konsantrasyonlarda (50, 100, 250, 500, 750 µg/mL) hazırlanan ekstraktlardan 25'er µL eklenerek karıştırıldı. Saf su ile belirlenen toplam hacme seyreltikten sonra, 30 dk karanlıkta bekletildi.  $\lambda=450$  nm'de absorbans ölçümleri yapıldı. Ekstraktlar yerine alkol veya saf su konularak kontrol çalışıldı. 50, 100, 250, 500 ve 750 µg/mL konsantrasyonlarda hazırlanan standart antioksidan (BHA ve BHT) çözeltilerine de aynı deney prosedür uygulandı.

Antioksidan özellik gösteren çeşitli bileşiklerin troloks eşdeğeri antioksidan kapasitesi (TEAC) olarak verilmektedir. TEAC katsayısı test edilen 1.0 mM'lık bileşiğin antioksidan gücünün mM Troloks olarak eşdeğeri olarak bilinir. TEAC katsayısını bulmak için test edilen bileşiğin ve Troloksun absorbans-konsantrasyondan oluşan kalibrasyon grafikleri çizilir ve eğimleri birbirine oranlanır (Apak, Güçlü, Özyürek & Karademir, 2004).

$$\text{TEAC}_{\text{CUPRAC}} = \text{Eğim}_{\text{örnek}} / \text{Eğim}_{\text{Troloks}}$$

Çalışmada CUPRAC metoduna ait TEAC katsayılarını hesaplamak üzere, yukarıda anlatıldığı şekilde çalışılan ekstraktlar ve antioksidan bileşenlere ilaveten 100-400 µg/mL konsantrasyonlarda Troloks çözeltilerine CUPRAC metodu uygulandı. Hepsinin absorbans-konsantrasyon grafikleri çizildi. Ekstrakt ve antioksidan bileşenlerin grafiklerinden elde edilen doğru denklemlerinin eğimleri, Troloks grafiğinin eğimine oranlanarak  $\text{TEAC}_{\text{CUPRAC}}$  değerleri elde edildi.

### 3.2.3.4. $\beta$ -Karoten Ağartma Metodu

Elma, ayva, armut, ahlat, kuşburnu ve güvem bitkilerinin kurutulmuş yapraklarından elde edilen ekstraktlara  $\beta$ -karoten ağartma yöntemi uygulanarak ekstraktların lipid peroksidasyonunu önleme yetenekleri incelendi (Miller v& Luiz-Larrea, 2002).

$\beta$ -karoten ve linoleik asit içeren substrat emülsiyonu Bölüm 3.1.3.7’de anlatıldığı şekilde hazırlandı. 40  $\mu$ L 50-1000  $\mu$ g/mL konsantrasyonlarında hazırlanan ekstraktların üzerine 160  $\mu$ L substrat emülsiyonu eklendi ve  $\lambda=490$  nm’de ilk absorbansları ( $t_0$ ) ölçüldü. Mikroplakalar etüvde 50 °C’de 2 saat inkübe edildikten sonra absorbansları ( $t_{120}$ ) tekrar ölçüldü. Herbir numune için kontrol kuyucuğu çalışıldı. 50-1000  $\mu$ g/mL konsantrasyon aralığında doğal antioksidan  $\alpha$ -tokoferol ve sentetik antioksidanlar BHT ve BHA ile deney tekrarlandı.

Absorbans ölçümleri yapılan tüm örnekler için aşağıdaki formüller ile hesaplamalar yapılarak ortamda oluşturulan lipid peroksidasyonunu engelleme oranları % inhibisyon olarak hesaplandı.

$$\% \text{ İnhibisyon} = [ (R_{\text{Kontrol}} - R_{\text{Örnek}}) / R_{\text{Kontrol}} ] \times 100$$

$$R = [ \ln(\text{Absorbans}_{t_0} / \text{Absorbans}_{t_{120}}) ] / t$$

Burada  $\text{Absorbans}_{t_0}$  örneklerin inkübasyondan önceki ilk absorbans ölçümünü;  $\text{Absorbans}_{t_{120}}$  örneklerin inkübasyondan sonraki absorbans ölçümünü; t inkübasyon süresini; R  $\beta$ -karoten bozunma oranını ifade etmektedir.

### 3.2.3.5. Metal Şelatlama Kapasitesi

Elma, ayva, armut, ahlat, kuşburnu ve güvem bitkilerinin kurutulmuş yapraklarının metal şelatlama kapasitesi incelendi (Dinis, Madeira, & Almeida, 1994). 25, 50, 100, 250, 500, 750, 1000  $\mu$ g/mL konsantrasyonlardaki ekstraktlardan 500  $\mu$ L alınarak, herbirinin üzerine 1850  $\mu$ L ultra saf su ve 50  $\mu$ L  $\text{FeCl}_2$  eklenerek 5dk bekletildi. Daha sonra 100  $\mu$ L ferrozin eklenerek 10 dk daha bekletildi ve  $\lambda=562$  nm’de absorbansları ölçüldü. Kontrol tüpüne 500  $\mu$ L ekstrakt yerine ultra saf su konularak deney prosedürü tekrarlandı. İyi bir metal şelatlayıcı olan EDTA standart madde olarak kullanıldı. 25, 50, 75 ve 100  $\mu$ g/mL konsantrasyonlarda ultra saf su ile hazırlanan EDTA çözeltililerine de deney prosedürü aynı şekilde uygulandı.

Absorbans ölçümleri yapılan tüm örnekler için aşağıdaki formül ile metal şelatlama kapasiteleri hesaplandı.

$$\text{Metal şelatlama oranı (\%)} = [(\text{Absorbans}_{\text{kontrol}} - \text{Absorbans}_{\text{ekstre}}) / \text{Absorbans}_{\text{kontrol}}] \times 100$$

### 3.2.4. Antidiyabetik Aktivite Tayin Metodları

#### 3.2.4.1. $\alpha$ -Amilaz Enzim İnhibisyonu

Elma, ayva, armut, ahlat, kuşburnu ve güvem yapraklarından elde edilen ekstraktların varlığında ve yokluğunda, karbonhidrat sindirim enzimi olan  $\alpha$ -amilazın aktivite tayini yapıldı (Apostolidis, Kwon & Shetty, 2007).

Öncelikle % 1'lik nişasta çözeltisinin farklı miktarları (0,1, 0,2, 0,3, 0,4 ve 0,5 mL) kullanılarak enzim aktivitesi tayini yapıldı. Maksimum doygunluk olarak ortama eklenecek olan substrat konsantrasyonu 0,5 mL olarak belirlendi.

Enzim aktivite tayini için 0,5 mL nişasta ve 0,5 mL enzim çözeltisi 25 °C'de 15 dk inkübe edildi. 1 mL DNS eklendikten sonra 5 dk kaynatıldı. Çeşme suyunda soğutularak üzerine 7,5 mL saf su eklendi.  $\lambda=540$  nm'de absorbans ölçüldü. Enzim yerine 0,5 mL tampon alınarak kontrol tüpü çalışıldı.

Ekstraktların  $\alpha$ -amilaz enzimi üzerinde inhibe edici etkisinin olup olmadığını incelemek için; ilk önce 0,5 mL değişen konsantrasyonlarda (1,0, 2,5, 5,0 ve 10 mg/mL) ekstrakt ve 0,5 mL enzim 37 °C'de 15 dk inkübe edildi. Sonra ortama 0,5 mL nişasta eklenerek DNS ilavesi ve kaynatma işlemi ile yukarıda belirtildiği şekilde deneye devam edildi. Herbir örnek için numune körü çalışıldı. Numune körleri hazırlanırken, enzim yerine tampon konularak aynı deney prosedürü uygulandı.

Enzim inhibitörü olan Akarboz pozitif kontrol olarak kullanıldı ve 5-1000  $\mu$ g/mL konsantrasyon aralığındaki Akarboz çözeltileri ile deney yapıldı.

Örnek veya Akarboz eklenmeden enzim aktivitesi yapılan tüp % 100 aktif kabul edildi. Aşağıdaki formüle göre örneklerin veya Akarbozun  $\alpha$ -amilaz enzimini inhibe etme değerleri hesaplandı.

$$\% \text{ İnhibisyon} = [( \text{Absorbans}_{\text{Amilaz}} - \text{Absorbans}_{\text{Ekstrakt/Akarboz}} ) / \text{Absorbans}_{\text{Amilaz}}] \times 100$$

$\text{Absorbans}_{\text{Amilaz}}$  % 100 aktif kabul edilen tüpün absorbansı;  $\text{Absorbans}_{\text{Ekstrakt}}$  örneklerin absorbanlarından numune körü absorbansı çıkarıldıktan sonra elde edilen absorbans değerini ifade etmektedir.

### 3.2.4.2. $\alpha$ -Glukozidaz Enzim İnhibisyonu

Elma, ayva, armut, ahlat, kuşburnu ve güvem bitkilerinin kurutulmuş yapraklarından elde edilen ekstraktların varlığında ve yokluğunda, karbonhidrat sindirim enzimi olan  $\alpha$ -glukozidazın aktivite tayini yapıldı (Kwon, Apostolidis & Shetty, 2008).

Ortama eklenecek substrat miktarını belirlemek için 5 mM p-NPG çözeltisinin farklı miktarlarında (20, 40, 60, 80, 100, 120  $\mu$ L) enzim aktivitesi çalışılarak, doyumluk substrat konsantrasyonu 100  $\mu$ L olarak belirlendi ve reaksiyon ortamına eklendi.

Enzim aktivite tayini için 100  $\mu$ L p-NPG ve 20  $\mu$ L enzim çözeltileri karıştırılarak 37 °C'de 15 dk inkübe edildi. 80  $\mu$ L 0,1 M Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> çözeltisi eklendikten sonra  $\lambda=405$  nm'de absorbansları okundu.

Ekstraktların  $\alpha$ -glukozidaz enzimi üzerinde inhibe edici etkisinin olup olmadığını incelemek için; 1, 2,5, 5, 10 mg/mL'lik konsantrasyonlardaki ekstraktlardan 50  $\mu$ L alınarak, 20  $\mu$ L enzim ile 37 °C'de 10 dk inkübe edildi. Daha sonra 100  $\mu$ L substrat eklenerek 20 dk 37 °C'de tekrar inkübe edildi. 80  $\mu$ L Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> eklenerek  $\lambda=405$  nm'de absorbans ölçümleri yapıldı. Enzim yerine tampon konularak ekstraktların numune körleri çalışıldı. Pozitif kontrol olarak enzim inhibitörü olan akarboz kullanıldı ve 5-1000  $\mu$ g/mL konsantrasyon aralığındaki akarboz çözeltileri hazırlanarak deney tekrarlandı.

Tüm bitki ekstraktları ve Akarbozlar için aşağıdaki formül ile hesaplama yapılarak,  $\alpha$ -glukozidaz için inhibisyon değerleri yüzde olarak hesaplandı.

$$\% \text{ İnhibisyon} = \left[ \frac{\text{Absorbans}_{\text{Glukozidaz}} - \text{Absorbans}_{\text{Ekstrakt/Akarboz}}}{\text{Absorbans}_{\text{Glukozidaz}}} \right] \times 100$$

Absorbans<sub>Glukozidaz</sub> % 100 aktif kabul edilen tüpün absorbansı; Absorbans<sub>Ekstrakt</sub> örneklerin absorbanslarından numune körü absorbansı çıkarıldıktan sonra elde edilen absorbans değerini ifade etmektedir.

### 3.2.5. İstatistiksel Analiz

Tüm denemeler üç kez tekrarlanarak yapıldı. Tüm sonuçların aritmetik ortalamaları ve standart sapma değerleri Microsoft Office-Excel programı kullanılarak hesaplandı. Değişkenler arasındaki ilişki Pearson korelasyon testi ile MSTAT-C paket programı kullanılarak yapıldı.

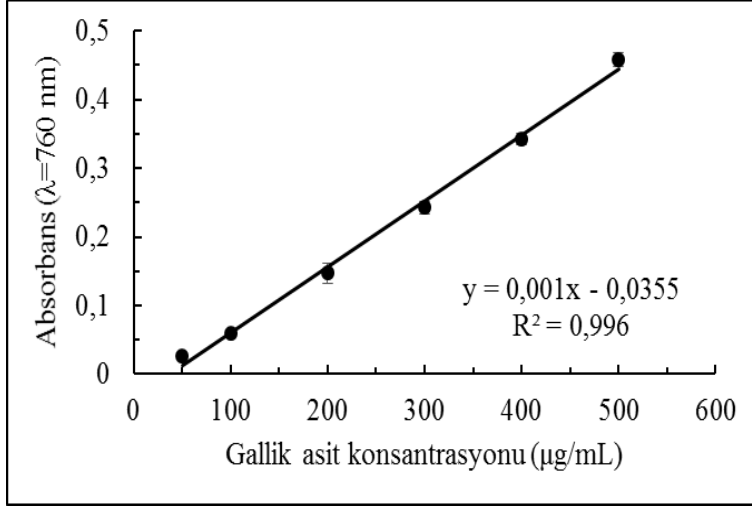
## BÖLÜM 4

### BULGULAR

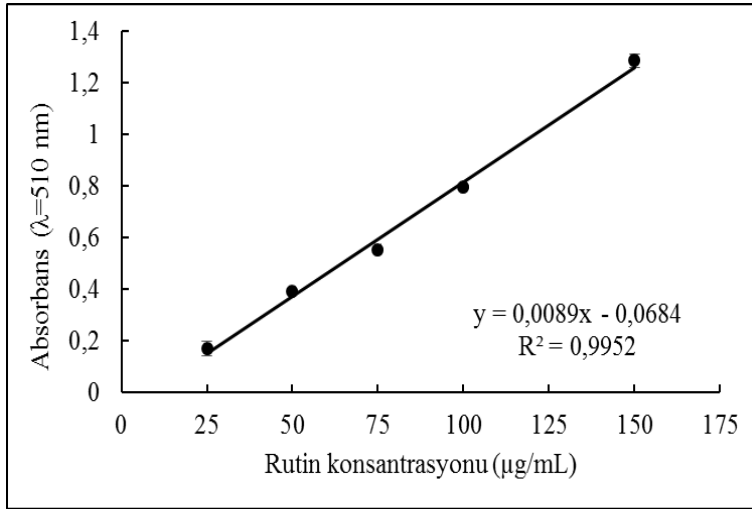
#### 4.1. Fitobileşenlerin Tayini

Fenolik bileşikler veya polifenoller bitkiler aleminde bulunan ve tüketilen meyve, sebze, tahıllar ve içeceklerle alınan doğal bileşiklerdir. Pekçok bitkinin biyolojik etkileri ve sağlık üzerinde gösterdikleri olumlu etkileri içerdikleri biyoaktif bileşenlere atfedilir. Bundan dolayı sunulan çalışmada öncelikle elde edilen ham ekstraktların içerdiği genel fenolik bileşikler, flavonoid ve tanen miktarları spektrofotometrik metodlar ile belirlendi. Toplam fenolik madde miktarı bitkisel kaynaklarda en sık bulunan gallik asit eşdeğeri olarak ve tanen miktarı ise hidrolizlenebilen tanenlerden en genel bulunan tannik asit eşdeğeri olarak hesaplandı. Flavonoidler geniş bir çeşitlilik gösterdiğinden flavonoid içeriği; flavonollerden bir flavonol glikozidi olan rutin ve flavanollerden kateşin standart olarak kullanılarak rutin ve kateşin eşdeğeri olarak belirlendi (Çizelge 4.1).

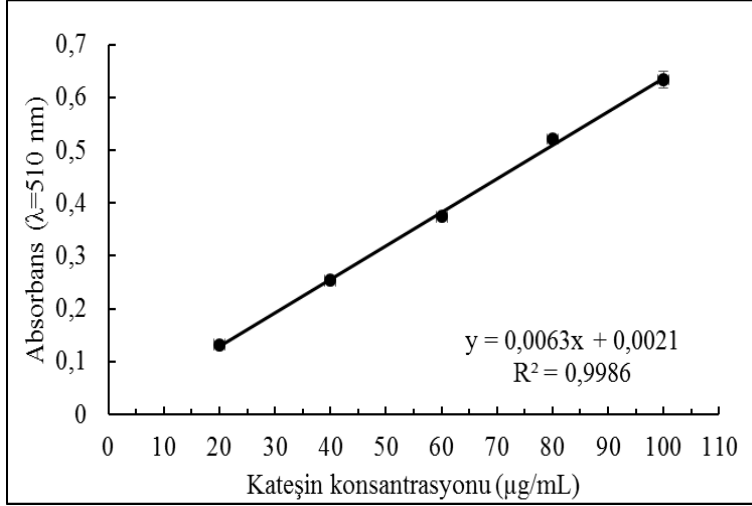
Bitki ekstraktlarının içerdiği fitobileşenlerden fenolik madde miktarını belirlemek üzere hazırlanan gallik asit standart grafiği Şekil 4.1’de, flavonoid miktarını belirlemek üzere hazırlanan rutin ve kateşin standart grafikleri Şekil 4.2 ve Şekil 4.3’de, tanen miktarını belirlemek üzere hazırlanan tannik asit standart grafiği Şekil 4.4’de verilmiştir.



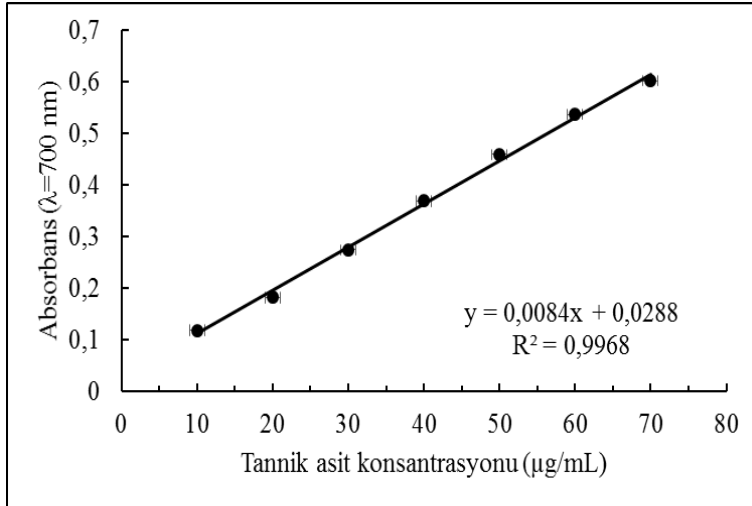
**Şekil 4.1.** Toplam fenolik madde tayini için hazırlanan Gallik asit standart grafiği



**Şekil 4.2.** Flavonoid tayini için hazırlanan Rutin standart grafiği



**Şekil 4.3.** Flavonoid tayini için hazırlanan Kateşin standart grafiği



**Şekil 4.4.** Tanen tayini için hazırlanan Tannik asit standart grafiği

#### 4.1.1. Toplam Fenolik Madde Tayini

Rosaceae ailesine ait altı bitkinin fenolik madde tayini Folin-Ciocalteu reaktifi kullanılarak yapıldı. Toplam fenolik madde miktarı bitkilerden elde edilen su ekstraktlarında 57,70-133,93 µg GAE/mg aralığında ve etanol ekstraktlarında 61,06-124,76 µg GAE/mg aralığında olarak belirlendi. Bununla birlikte Çizelge 4.1 ve Şekil 4.5'te görüldüğü gibi, her iki ekstrakt türünde kuşburnu ekstraktı en yüksek, güvem ekstraktı en düşük fenolik madde miktarına sahipken; sıralama kuşburnu, ayva, armut, ahlat, elma ve güvem şeklinde idi.



**Çizelge 4.1.** Bitkilerden elde edilen su ve etanol ekstraktlarının toplam fenolik, flavonoid ve tanen miktarları

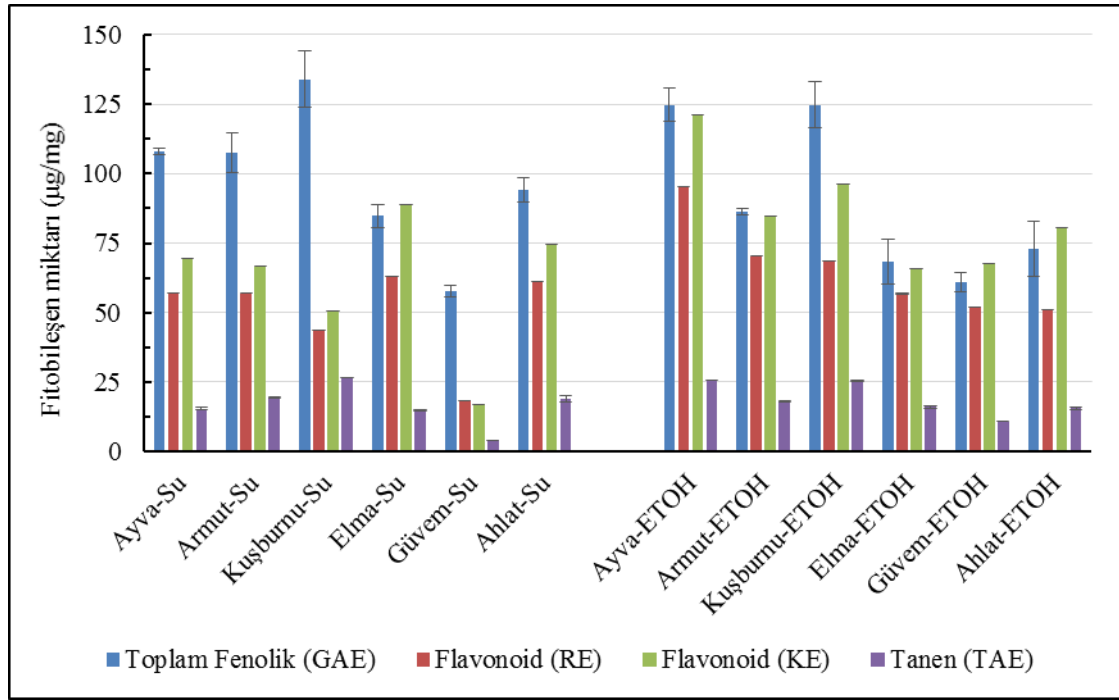
Ekstrakt	Örnek	Toplam Fenolik Madde ( $\mu\text{g GAE/mg}$ )	Toplam Flavonoid Tayini		Tanen Tayini ( $\mu\text{g TAE/mg}$ )
			Rutin ( $\mu\text{g RE/mg}$ )	Kateşin ( $\mu\text{g KE/mg}$ )	
Su	Elma	84,70 $\pm$ 3,96	62,92 $\pm$ 0,01	80,85 $\pm$ 0,01	14,85 $\pm$ 0,16
	Ayva	108,16 $\pm$ 1,12	56,98 $\pm$ 0,01	69,50 $\pm$ 0,01	15,33 $\pm$ 0,43
	Armut	107,60 $\pm$ 7,02	56,95 $\pm$ 0,01	66,52 $\pm$ 0,01	19,39 $\pm$ 0,37
	Ahlat	94,23 $\pm$ 4,31	61,32 $\pm$ 0,01	74,69 $\pm$ 0,01	18,82 $\pm$ 1,15
	Kuşburnu	133,93 $\pm$ 10,05	43,67 $\pm$ 0,01	50,38 $\pm$ 0,01	26,42 $\pm$ 0,02
	Güvem	57,70 $\pm$ 1,88	18,45 $\pm$ 0,01	16,92 $\pm$ 0,01	4,07 $\pm$ 0,15
Etanol	Elma	68,42 $\pm$ 7,99	56,80 $\pm$ 0,01	65,66 $\pm$ 0,01	16,06 $\pm$ 0,40
	Ayva	124,76 $\pm$ 5,86	95,51 $\pm$ 0,01	121,06 $\pm$ 0,1	25,71 $\pm$ 0,17
	Armut	86,25 $\pm$ 0,99	70,37 $\pm$ 0,01	84,91 $\pm$ 0,01	18,15 $\pm$ 0,33
	Ahlat	73,07 $\pm$ 9,95	51,18 $\pm$ 0,02	70,60 $\pm$ 0,01	15,65 $\pm$ 0,49
	Kuşburnu	124,73 $\pm$ 8,33	68,62 $\pm$ 0,01	96,28 $\pm$ 0,01	25,32 $\pm$ 0,28
	Güvem	61,06 $\pm$ 3,43	52,15 $\pm$ 0,01	67,69 $\pm$ 0,01	10,86 $\pm$ 0,05

#### 4.1.2. Toplam Flavonoid Tayini

Bitkilerin toplam flavonoid içerikleri  $\text{AlCl}_3$  ile kompleks yapmaları temeline dayanan spektrofotometrik metod ile tayin edildi. Flavonoid miktarları su ve etanol ekstraktlarında rutin ekivalenti olarak sırasıyla 18,45- 62,92  $\mu\text{g/mg}$  ve 51,18-95,51  $\mu\text{g/mg}$  aralıklarında; kateşin ekivalenti olarak ise 16,92-80,85  $\mu\text{g/mg}$  ve 65,66-121,06  $\mu\text{g/mg}$  aralıklarında belirlendi. Genel olarak etanol ekstraktlarının flavonoid miktarlarının su ekstraktlarına göre biraz daha yüksek olduğu gözlemlendi. Ayrıca kateşin ekivalenti olarak hesaplanan flavonoid değerleri rutin ekivalenti olarak elde edilen değerlerden daha yüksekti. Bunun nedeni, uygulanan metod flavonoid-aluminyum kompleksleşmesi esaslı olduğu için, standart olarak kullanılan flavanol glikozidi ve flavanol'un yapılarına bağlı olarak farklı şekil ve pozisyonlardan kompleks yapmış olmaları olabilir.

### 4.1.3. Tanen Tayini

Ekstraktlarda bulunan tanen miktarı Folin-Denis reaktifi kullanılarak ve tannik asit çözeltilerinden elde edilen standart grafik denklemi ile belirlendi. Su ekstraktlarında 4,07-26,42 µg TAE/mg ve etanol ekstraktlarında 10,86-25,71 µg TAE/mg aralığında tanen tayin edildi. Örnekler toplam fenolik madde tayini ile benzer sıralama gösterirken, burada da kuşburnu ekstraktında en yüksek, güvem ekstraktında en düşük tanen içeriği belirlendi (Çizelge 4.1.).



Şekil 4.5. Bitkilerin su ve etanol ekstraktlarının içerdiği polifenolik bileşen miktarları

## 4.2. Antioksidan Aktivite Tayin Metodları

DPPH ve ABTS metodları özellikle doğal ürünlerin antioksidan kapasitelerinin tayininde yaygın olarak kullanılan yöntemlerdir. Yöntemler, bitki veya gıda ekstraktlarındaki antioksidan etkili bileşiklerin DPPH<sup>•</sup> ve ABTS<sup>•+</sup> radikallerini nötralize etmesi sonucu stabil renkli radikallerin renklerinin açılması ve bunun spektrofotometrik olarak takip edilmesi esasına dayanır.

### 4.2.1. DPPH<sup>•</sup> Giderme Metodu

DPPH radikali giderme metodu çeşitli bileşikler, biyolojik kaynaklar ve özellikle bitki ekstraktlarının antioksidan potansiyelinin değerlendirilmesinde kullanılan, basit,

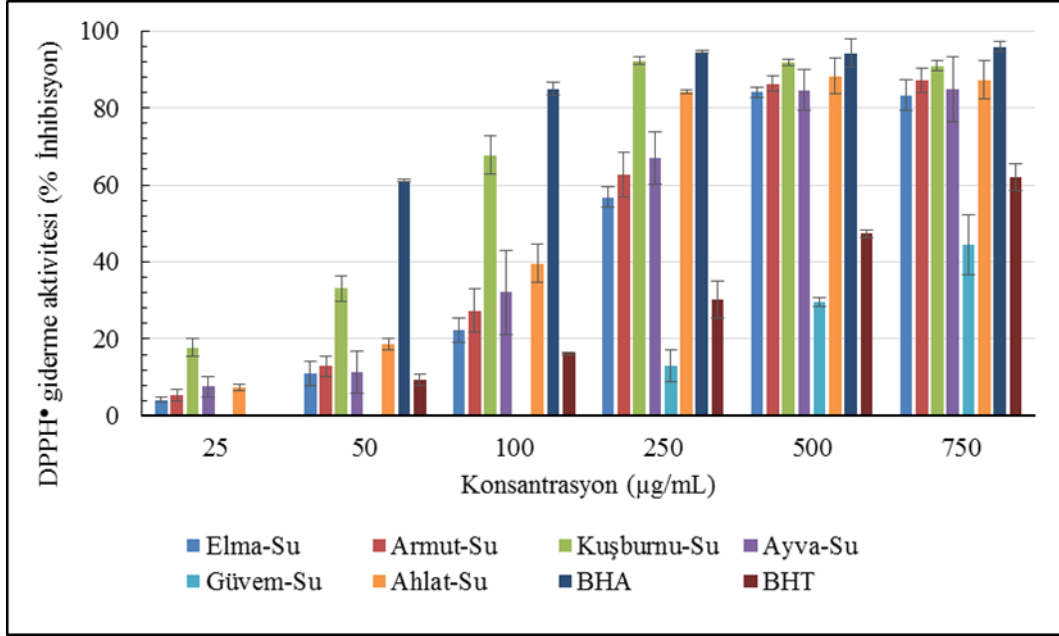
kolay bir yöntemdir. Çalışmada 25-1000 µg/mL konsantrasyon aralığında hazırlanan ekstraktların DPPH radikalini söndürebilme potansiyelleri incelenerek, sentetik antioksidanlar olan BHT ve BHA ile karşılaştırıldı. Çizelge 4.2, Şekil 4.6 ve Şekil 4.7'de görüldüğü gibi ekstraktların konsantrasyonuna bağımlı olarak artan oranlarda radikal giderme aktiviteleri gözlemlendi. Örneklerin etanol ekstraktları su ekstraktlarına göre daha yüksek radikal giderme kapasitesi gösterirken, en düşük radikal giderme aktivitesi güvem yaprağının su ekstraktında belirlendi (Çizelge 4.2).

**Çizelge 4.2.** Bitkilerden elde edilen su ve etanol ekstraktlarının DPPH radikali giderme oranları (% inhibisyon)

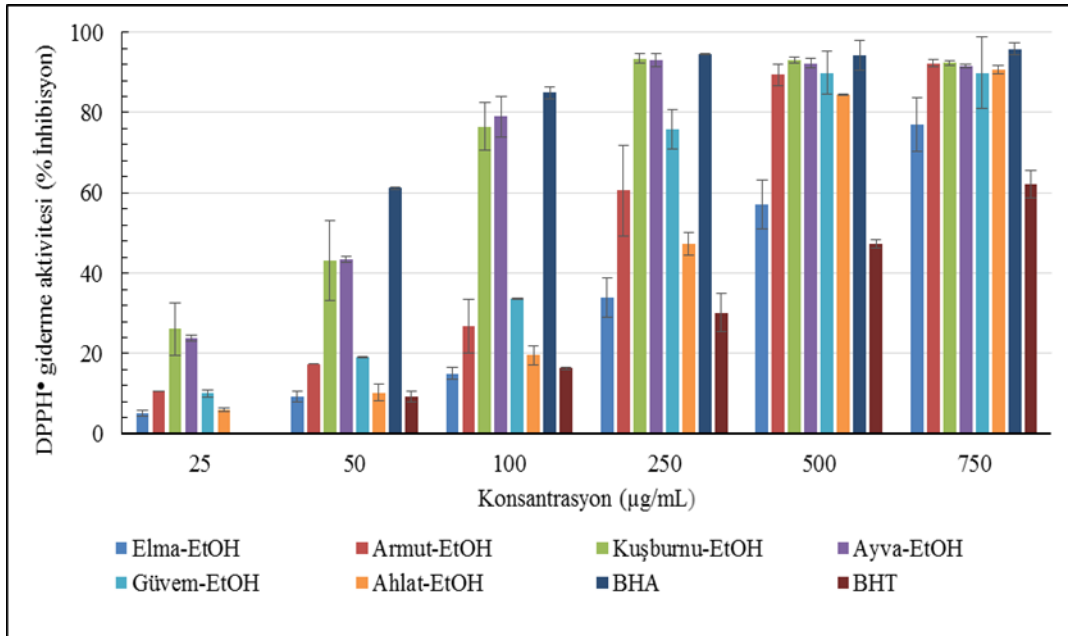
Ekstrakt	Bitki	Konsantrasyon (µg/mL)						
		25	50	100	250	500	750	1000
Su	Elma	4,20±0,75	11,01±3,18	22,25±3,06	56,85±2,58	84,04±1,33	83,24±3,97	81,91±5,57
	Armut	5,34±1,54	12,95±2,64	27,38±5,60	62,70±5,73	86,22±2,02	87,16±3,27	95±0,20
	Kuşburnu	17,76±2,38	33,07±3,18	67,77±4,83	92,24±0,99	91,81±0,71	90,94±1,22	90,58±1,91
	Ayva	7,61±2,65	11,33±5,57	32,19±9,91	67,00±6,71	84,63±5,21	84,77±8,39	83,38±10,79
	Güvem	-	-	-	13,09±4,08	29,54±1,21	44,47±7,65	65,55±4,63
	Ahlat	7,35±0,81	18,65±1,41	39,61±4,88	84,31±0,48	88,28±4,63	87,30±5,06	86,95±5,53
Etanol	Elma	5,16±0,79	9,19±1,30	15,02±1,40	33,83±4,88	57,14±6,13	77,08±6,70	81,81±0,07
	Armut	10,74±1,02	17,44±2,41	26,81±6,61	60,55±11,26	89,40±2,69	92,29±0,88	93,13±0,36
	Kuşburnu	26,17±6,53	43,06±10,0	76,54±6,03	93,48±1,18	93,09±0,80	92,37±0,60	92,14±0,06
	Ayva	23,77±0,68	43,41±0,69	78,99±5,04	93,06±1,72	92,27±1,18	91,49±0,41	90,59±1,18
	Güvem	10,14±0,86	19,05±0,24	33,72±0,21	75,91±4,91	89,94±5,32	89,91±8,87	92,65±1,65
	Ahlat	6,01±0,30	10,28±1,99	19,56±2,42	47,21±2,85	84,34±0,11	90,68±1,02	98±1,18
Std madde	BHA	-	61,17±0,37	84,94±1,55	94,55±0,24	94,22±3,68	95,86±1,37	95,58±2,96
	BHT	-	9,27±1,45	16,28±0,37	30,20±4,83	47,30±0,96	62,07±3,46	68,99±5,03

Kuşburnu ve ayva yapraklarının ekstraktları 100 µg/mL konsantrasyondan başlayarak güçlü radikal giderme etkisi gösterdiler. Çalışılan yüksek konsantrasyonlarda, güvem yaprağının su ekstraktı hariç, tüm örnekler standart olarak

seçilen antioksidan maddelerden BHT'den yüksek ve BHA ile yarışabilecek düzeyde radikal giderici aktivite sergiledi (Şekil 4.6 ve Şekil 4.7).



Şekil 4.6. Örneklerin su ekstraktlarının DPPH radikali giderme oranları



Şekil 4.7. Örneklerin etanol ekstraktlarının DPPH radikali giderme oranları

#### 4.2.2. ABTS<sup>•+</sup> Giderme Metodu

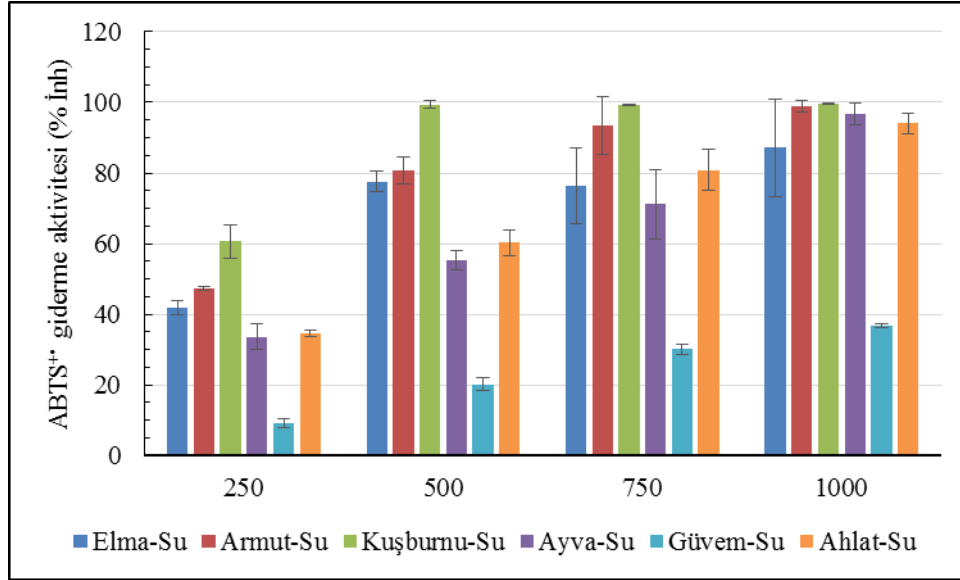
ABTS<sup>•+</sup> giderme metodu bitki ekstraktlarının antioksidan potansiyelinin değerlendirilmesinde sıklıkla kullanılan bir metottür. Çalışmada 25-1000 µg/mL konsantrasyon aralığında hazırlanan ekstraktların ABTS radikalini giderebilme potansiyelleri incelenerek, sentetik antioksidanlar olan BHT ve BHA ile karşılaştırıldı. Çizelge 4.3, Şekil 4.8 ve Şekil 4.9’de görüldüğü gibi ekstraktların konsantrasyonunun artmasıyla radikal giderme oranlarının da arttığı gözlemlendi. Örneklerin etanol ekstraktları su ekstraktlarına göre daha yüksek radikal giderme kapasitesi göstermektedir (Çizelge 4.3).

**Çizelge 4.3.** Bitkilerden elde edilen su ve etanol ekstraktlarının ABTS radikali giderme oranları (% inhibisyon)

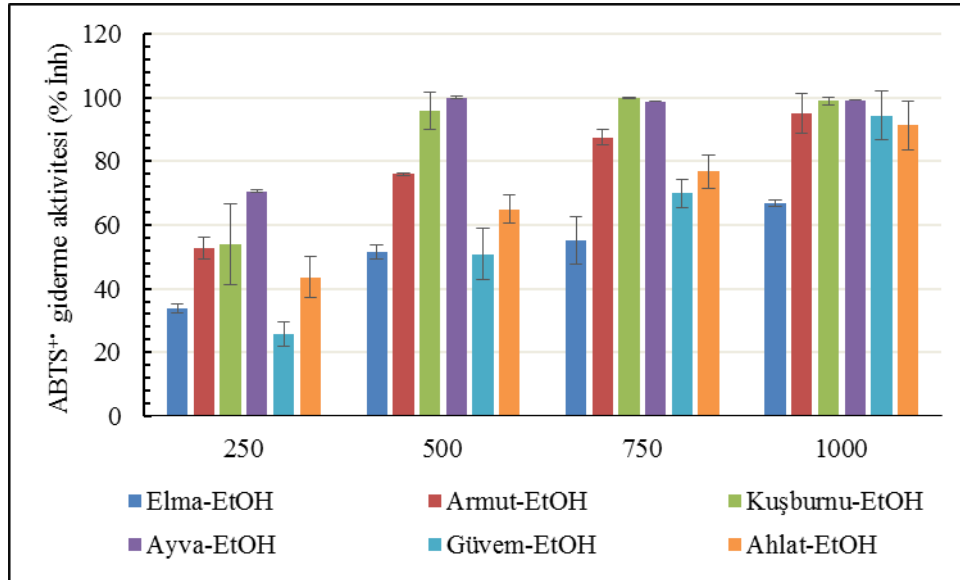
Ekstrakt	Konsantrasyon (µg/mL)						
	25	50	100	250	500	750	1000
Elma-Su	6,26±4,74	12,06±0,10	22,53±4,92	41,82±1,92	77,58±2,92	76,37±9,79	87,12±13,80
Armut-Su	-	-	18,15±3,01	47,34±0,65	80,60±3,79	93,44±8,00	98,83±1,64
Kuşburnu-Su	5,40±1,78	13,21±1,61	27,10±1,24	60,56±4,71	99,33±1,12	99,2±0,2	99,6±01
Ayva-Su	-	-	14,45±2,53	33,59±3,62	55,44±2,74	71,11±9,77	96,86±3,13
Güvem-Su	-	-	-	9,15±1,21	20,12±1,87	30,05±1,61	36,67±0,48
Ahlat-Su	-	9,21±0,83	16,50±1,43	34,52±0,92	60,21±3,67	80,86±5,80	94,11±2,85
Elma-EtOH	13,28±1,11	12,56±0,63	25,78±3,44	33,81±1,24	51,67±2,24	55,03±7,51	66,64±0,99
Armut-EtOH	6,20±2,57	13,07±3,10	23,29±2,61	52,59±3,47	75,93±0,36	87,55±2,43	95,01±6,13
K.burnu-EtOH	6,58±0,40	12,35±1,36	28,10±1,44	53,98±12,62	95,82±5,78	99,85±0,11	98,88±1,24
Ayva-EtOH	10,05±0,27	17,65±0,65	32,13±2,88	70,51±0,36	99,91±0,36	98,7±0,05	99,2±0,02
Güvem-EtOH	-	-	15,06±4,72	25,61±3,83	50,89±7,97	70,00±4,47	94,34±7,52
Ahlat-EtOH	-	-	18,02±0,44	43,60±4,40	64,96±4,33	76,70±5,33	91,35±7,65
BHA	14,47±1,98	37,00±2,17	77,77±2,06	99,94±0,08	99,94±0,08	-	-
BHT	12,23±1,72	26,00±1,55	54,43±1,78	98,15±1,50	99,97±0,03	-	-

250-1000 µg/mL konsantrasyonlarında çizilen sütun grafiklerden (Şekil 4.8 ve Şekil 4.9) görüldüğü gibi; 250 µg/mL konsantrasyonda kuşburnunun su ekstraktı, armut, kuşburnu ve ayvanın etanol ekstraktlarında, 500 µg/mL konsantrasyonda güvem su

ekstraktı hariç diğer tüm su ve etanol ekstraktlarının % 50'in üzerinde radikal giderme aktiviteleri belirlendi. Ayrıca 500 µg/mL konsantrasyondaki elma, armut, kuşburnunun su ekstraktlarında ve ayva, armut, kuşburnunun etanol ekstraktlarında, 100 µg/mL konsantrasyondaki BHA standartınıninkine eşit veya yüksek aktiviteler gözlemlendi.



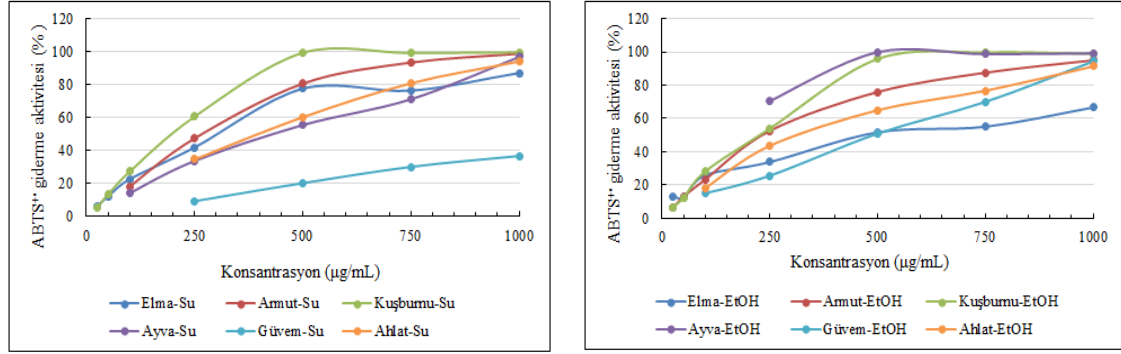
**Şekil 4.8.** Örneklerin su ekstraktlarının ABTS<sup>•+</sup> giderme oranları



**Şekil 4.9.** Örneklerin etanol ekstraktlarının ABTS<sup>•+</sup> giderme oranları

25-1000 µg/mL konsantrasyon aralığında çizilen çizgi grafikler (Şekil 4.10) yardımıyla ekstraktların ABTS<sup>•+</sup> giderme etkileri birbiriyle de kıyaslanabilir. En düşük

radikal giderme aktivitesi güvem yaprağının su ekstraktında, en iyi aktivite kuşburnu ve armutun su ve etanol ekstraktlarında gözlemlendi. Ayrıca ayvanın etanol ekstraktı da çalışılan yüksek konsantrasyonlarında yüksek radikal giderme aktivitesi gösterdi.



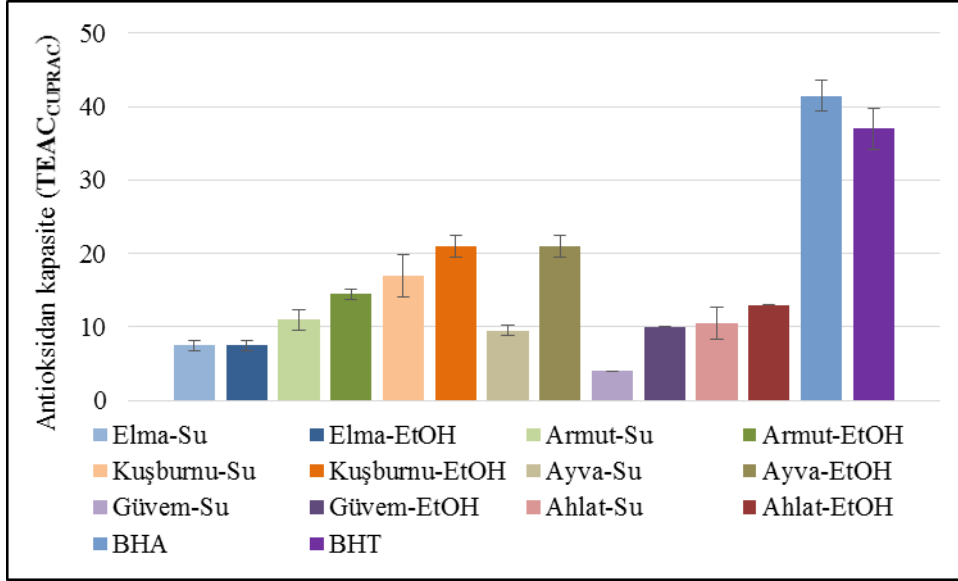
**Şekil 4.10.** Su ve alkol ekstraktlarının ABTS<sup>+</sup> giderme etkilerinin karşılaştırılması

#### 4.2.3. CUPRAC Metodu

CUPRAC yöntemi kullanılarak ekstraktların toplam antioksidan kapasiteleri değerlendirildi. 50-750 µg/mL konsantrasyon aralığında yapılan çalışma sonucunda elde edilen verilerden herbir örnek için absorbans-konsantrasyon grafikleri çizildi. Elde edilen doğru denkleminin eğimi, E vitamini analogu olan troloksa ait doğru denkleminin eğimine oranlandı. Antioksidan özellik gösteren bileşiklerin CUPRAC metodu sonuçları troloks eşdeğeri antioksidan kapasite (TEAC) olarak Çizelge 4.4 ve Şekil 4.11’de verilmiştir.

**Çizelge 4.4.** Ekstraktların CUPRAC metodundan elde edilen TEAC (Troloks ekivalenti antioksidan kapasite) değerleri

Ekstrakt	TEAC <sub>CUPRAC</sub>	Ekstrakt	TEAC <sub>CUPRAC</sub>
Elma-Su	7,5±0,71	Elma-EtOH	7,5±0,71
Armut-Su	11±1,41	Armut-EtOH	14,5±0,71
Kuşburnu-Su	17±2,83	Kuşburnu-EtOH	21±1,41
Ayva-Su	9,5±0,71	Ayva-EtOH	21±1,14
Güvem-Su	4±0,01	Güvem-EtOH	10±0,01
Ahlat-Su	10,5±2,12	Ahlat-EtOH	13±0,01
BHA	41,5±2,12	BHT	37±2,83



**Şekil 4.11.** Bitkilerin su ve etanol ekstraktlarının TEAC<sub>CUPRAC</sub> değerleri

Elma hariç örneklerin etanol ekstraktlarının gösterdiği toplam antioksidan kapasiteleri su ekstraktlarından daha yüksek bulundu. En yüksek TEAC değerlerine kuşburnu ve ayvanın etanol, kuşburnunun su ekstraktları sahipti. Ancak örneklerin toplam antioksidan kapasitelerinin BHA ve BHT sentetik antioksidanlarına oranla düşük olduğu gözlemlendi.

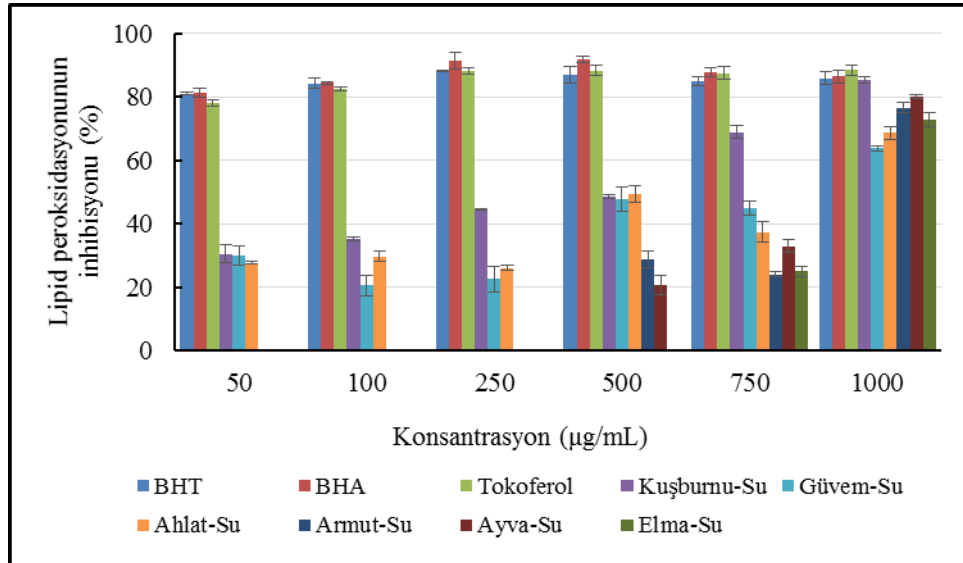
#### 4.2.4. $\beta$ -Karoten Ağartma Metodu

Tez kapsamında çalışılan bitkilerin toplam antioksidan aktivitelerini belirlemek üzere; ekstraktların beta-karoten/linoleik asit model sisteminde oluşturulan lipid peroksidasyonunu önleme yetenekleri test edildi. 50-1000  $\mu\text{g/mL}$  konsantrasyon aralığında çalışıldı. Ekstraktların beta-karoten ağartma aktiviteleri, lipid peroksidasyonunun inhibisyonu (%) olarak ifade edildi. Elde edilen verilere göre su ekstraktları sadece 1000  $\mu\text{g/mL}$  konsantrasyonda beta-karotenin bozunmasını etkili şekilde önledi ve bunlardan standart maddelerinkine yakın olacak şekilde en iyi aktiviteyi kuşburnu ve ayva ekstraktları gösterdi (Çizelge 4.5, Şekil 4.12).



**Çizelge 4.5.** Bitkilerden elde edilen su ekstraktlarının  $\beta$ -karoten ağartma aktiviteleri (Lipid peroksidasyonunun % inhibisyonu)

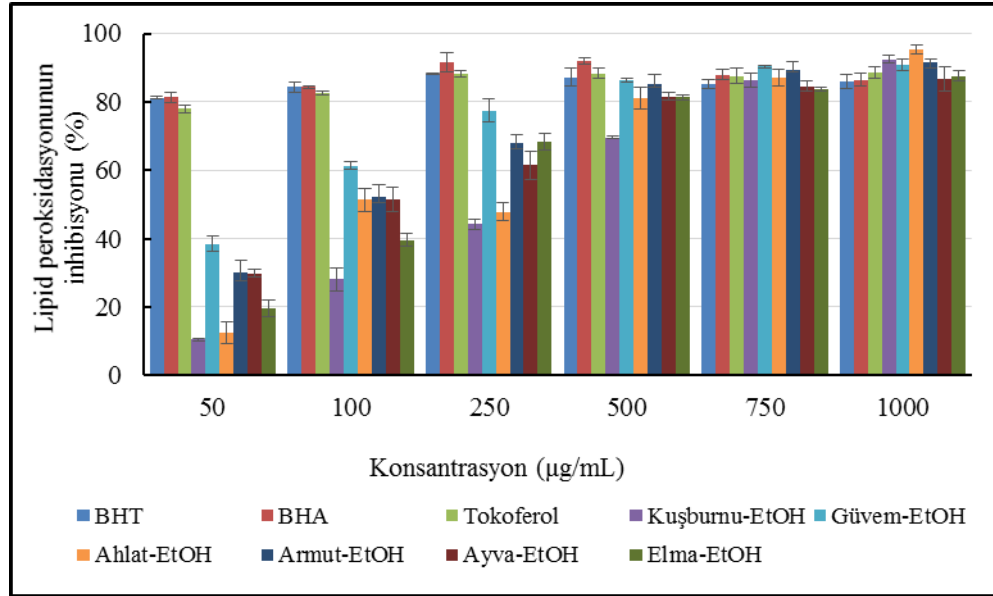
Su Ekstraktı	% İnhibisyon					
	Konsantrasyon ( $\mu\text{g/mL}$ )					
	50	100	250	500	750	1000
Kuşburnu	30,63 $\pm$ 2,97	35,43 $\pm$ 0,61	44,58 $\pm$ 0,25	48,65 $\pm$ 0,56	8,99 $\pm$ 2,04	85,32 $\pm$ 1,12
Güvem	30,12 $\pm$ 3,14	20,57 $\pm$ 3,21	22,60 $\pm$ 4,06	47,70 $\pm$ 3,78	45,01 $\pm$ 2,14	63,87 $\pm$ 0,87
Ahlat	27,72 $\pm$ 0,43	29,78 $\pm$ 1,67	26,15 $\pm$ 0,85	49,45 $\pm$ 2,74	37,45 $\pm$ 3,12	68,67 $\pm$ 2,17
Armut	-	-	-	28,78 $\pm$ 2,71	24,07 $\pm$ 0,79	76,69 $\pm$ 1,65
Ayva	-	-	-	20,78 $\pm$ 3,14	32,99 $\pm$ 1,97	80,14 $\pm$ 0,48
Elma	-	-	-	-	25,17 $\pm$ 1,64	72,81 $\pm$ 2,16
BHT	81,17 $\pm$ 0,36	84,29 $\pm$ 1,54	88,31 $\pm$ 0,23	87,16 $\pm$ 2,68	85,15 $\pm$ 1,37	86,02 $\pm$ 2,12
BHA	81,38 $\pm$ 1,44	84,43 $\pm$ 0,37	91,47 $\pm$ 2,82	92,01 $\pm$ 0,96	87,90 $\pm$ 1,46	86,49 $\pm$ 1,89
Tokoferol	78,06 $\pm$ 1,12	82,75 $\pm$ 0,58	88,28 $\pm$ 0,97	88,32 $\pm$ 1,57	87,62 $\pm$ 2,14	88,51 $\pm$ 1,63



**Şekil 4.12.** Örneklerin su ekstraktlarının  $\beta$ -karoten/linoleik asit sisteminde lipid peroksidasyonunu önleme aktiviteleri

**Çizelge 4.6.** Bitkilerden elde edilen etanol ekstraktlarının  $\beta$ -karoten ağartma aktiviteleri (Lipid peroksidasyonunun % inhibisyonu)

Etanol Ekstraktı	% İnhibisyon					
	Konsantrasyon ( $\mu\text{g/mL}$ )					
	50	100	250	500	750	1000
Kuşburnu	10,54 $\pm$ 0,43	28,05 $\pm$ 3,25	44,22 $\pm$ 1,54	69,53 $\pm$ 0,34	86,33 $\pm$ 2,15	92,50 $\pm$ 1,24
Güvem	38,51 $\pm$ 2,11	61,39 $\pm$ 1,05	77,44 $\pm$ 3,42	86,18 $\pm$ 0,55	90,32 $\pm$ 0,47	90,95 $\pm$ 1,65
Ahlat	12,47 $\pm$ 3,35	51,32 $\pm$ 3,42	47,76 $\pm$ 2,61	81,02 $\pm$ 3,15	86,98 $\pm$ 2,40	95,26 $\pm$ 1,23
Armut	30,25 $\pm$ 2,48	52,37 $\pm$ 1,91	67,86 $\pm$ 1,40	85,05 $\pm$ 0,85	89,19 $\pm$ 0,57	91,43 $\pm$ 1,65
Ayva	29,90 $\pm$ 1,21	51,61 $\pm$ 3,51	61,44 $\pm$ 4,14	81,64 $\pm$ 0,98	84,62 $\pm$ 1,56	86,74 $\pm$ 3,47
Elma	19,75 $\pm$ 2,48	39,59 $\pm$ 1,91	68,24 $\pm$ 2,45	81,30 $\pm$ 0,86	83,86 $\pm$ 0,57	87,58 $\pm$ 1,62
BHT	81,17 $\pm$ 0,36	84,29 $\pm$ 1,54	88,31 $\pm$ 0,23	87,16 $\pm$ 2,68	85,15 $\pm$ 1,37	86,02 $\pm$ 2,12
BHA	81,38 $\pm$ 1,44	84,43 $\pm$ 0,37	91,47 $\pm$ 2,82	92,01 $\pm$ 0,96	87,90 $\pm$ 1,46	86,49 $\pm$ 1,89
Tokoferol	78,06 $\pm$ 1,12	82,75 $\pm$ 0,58	88,28 $\pm$ 0,97	88,32 $\pm$ 1,57	87,62 $\pm$ 2,14	88,51 $\pm$ 1,63



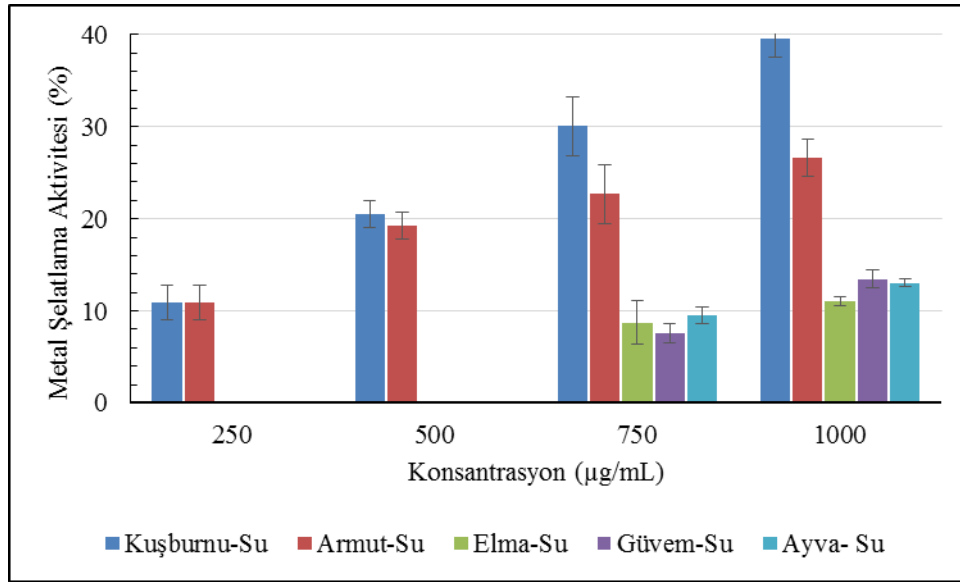
**Şekil 4.13.** Örneklerin etanol ekstraktlarının  $\beta$ -karoten/linoleik asit sisteminde lipid peroksidasyonunu önleme aktiviteleri

Beta-karoten/linoleik asit model sistemde oluşturulan lipid peroksidasyonunu önlemede bitkilerin alkol ekstraktlarının su ekstraktlarından daha etkili olduğu görüldü. Güvem, armut ve ayva etanol ekstraktları çalışılan düşük konsantrasyonlardan itibaren lipid peroksidasyonunu önleme etkisi gösterirken, yüksek konsantrasyonlarda tüm

ekstraktların beta-karotenin bozunmasını etkili şekilde önlediği görüldü (Çizelge 4.6, Şekil 4.13).

#### 4.2.5. Metal Şelatlama Kapasitesi

Serbest metal iyonları biyolojik sistemlerde serbest radikallerin oluşumuna yola açtığı için bitki ekstraktlarının metal şelatlama özelliği önem taşımaktadır. Bitki ekstraktlarının metal şelatlama etkinliği  $Fe^{2+}$  iyonu kullanılarak ve iyi bir şelatör olan EDTA ile karşılaştırılarak değerlendirildi. Çalışmada bitkilerin etanol ekstraktlarında metal şelatlama aktivitesi gözlenmemiştir. Su ekstraktlarında tayin edilen metal şelatlama kapasitesini sonuçları Şekil 4.14’de verilmiştir.



**Şekil 4.14.** Bitkilerin su ekstraktlarının metal iyonu şelatlama aktiviteleri

Su ekstraktlarında en yüksek metal şelatlama aktivitesi %  $39,59 \pm 1,98$  oranı ile kuşburnu ve %  $26,65 \pm 3,35$  oranı ile armut ekstraktlarının 1 mg/mL konsantrasyonunda tayin edilmiştir (Çizelge 4.7). Ekstraktların hiç birinin güçlü bir metal şelatlayıcısı olan EDTA ile kıyaslanabilecek kadar iyi şelatlayıcı bileşenler içermediği görülmüştür.

**Çizelge 4.7.** Bitkilerin su ekstraktlarının ve EDTA'nın değişen konsantrasyonlarında, metal iyonu şelatlama oranları (%)

Konst.	100µg/mL	250 µg/mL	500 µg/mL	750 µg/mL	1000 µg/mL
Ayva-Su	-	-	-	9,58±0,90	13,04±0,42
Elma-Su	-	-	-	8,75±2,39	11,04±0,54
Kuşburnu-Su	-	10,90±1,92	20,54±1,43	30,05±3,19	39,59±1,98
Armut-Su	-	10,94±2,25	19,23±4,03	22,72±1,31	26,65±3,35
Güvem-Su	-	-	-	7,58±1,18	13,47±0,39
EDTA	25 µg/mL 32.68±2.83	50 µg/mL 70.81±7.37	75 µg/mL 95.29±0.01	100 µg/mL 99.29±0.41	

### 4.3. Antidiyabetik Aktivite Tayini

Halk arasında diyabet tedavisi için çeşitli bitkisel kökenli uygulamalar yapılmaktadır. Bitkilerin gösterdikleri bu hipoglisemik etkiler içerdikleri bazı fitobileşenlerle ilişkilendirilmektedir. Fenoller, flavonoidler, saponinler gibi bileşenlerin potansiyel glikozidaz inhibitörü olduğu bilinmektedir. Dolayısıyla bu çalışmada bitki ekstraktlarının  $\alpha$ -amilaz ve  $\alpha$ -glukozidaz gibi glikozidazlar üzerinde inhibitör etkisinin olup olmadığı araştırıldı. Bir glikozidaz inhibitörü olan ve klinik diyabet tedavisinde kullanılan akarboz inhibisyon denemelerinde pozitif kontrol olarak kullanıldı.

Ekstraktların 1.0, 2.5, 5.0 ve 10 mg/mL konsantrasyonlarında, inhibitör olan akarbozun 0,05, 0,1, 0,25, 0,5 ve 1 mg/mL konsantrasyonlarında çalışılmıştır. Çizelge 4.8'de tüm bitki ekstraktlarının ve akarbozun  $\alpha$ -amilaz enzimi üzerindeki inhibisyon yüzdeleri görülmektedir.

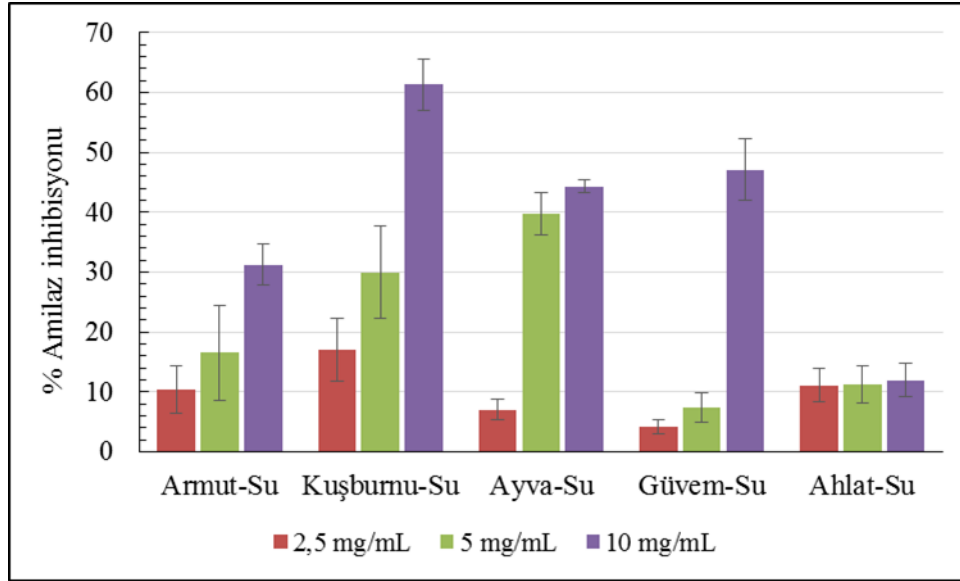
**Çizelge 4.8.** Akarboz, örneklerin su ve alkol ekstraktlarının  $\alpha$ -amilaz enzimini inhibe etme oranları (%)

Konsantrasyon	1 mg/mL	2,5 mg/mL	5 mg/mL	10 mg/mL
<b>Su Ekstraktı</b>	<b>% İnhibisyon*</b>			
Armut	-	10,40±3,99	16,51±7,91	31,28±3,45
Kuşburnu	-	17,04±5,18	29,92±7,70	61,34±4,23
Ayva	-	-	39,79±1,07	44,27±1,07
Güvem	-	-	-	47,11±5,11
Ahlat	-	11,11±3,11	11,16±3,11	11,94±2,84

<b>Etanol Ekstraktı</b>				
Armut	-	-	29,01±3,99	62,09±7,27
Kuşburnu	-	38,63±2,13	47,04±4,61	67,76±1,07
Ayva	50,47±2,54	74,30±5,20	69,70±6,45	71,24±8,18
Güvem	32,99±7,62	47,89±5,54	59,44±7,15	58,70±7,15
Ahlat	-	-	23,10±2,31	43,06±3,51
Akarboz	<b>50 µg/mL</b> 25,88±0,15	<b>100 µg/mL</b> 61,64±6,52	<b>250 µg/mL</b> 76,37±3,60	<b>500 µg/mL</b> 75,95±3,97
			<b>1 mg/mL</b> 76,77±5,22	

\*% 10'dan düşük olan inhibisyon oranları tabloda gösterilmemiştir.

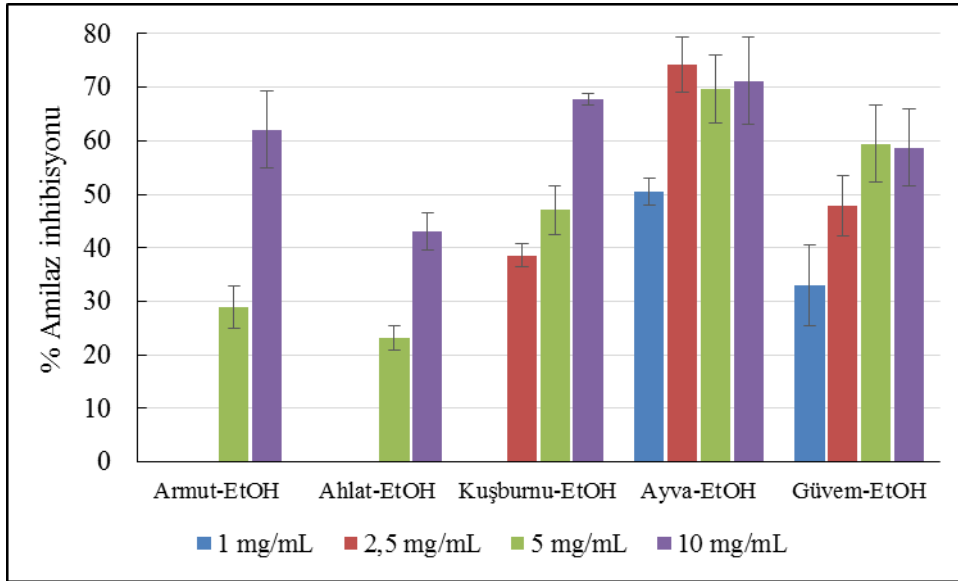
Bitkilerin su ekstraktlarında 1 mg/mL konsantrasyonda inhibisyon gözlenmeyip, 10 mg/mL konsantrasyonda en yüksek inhibisyon oranı % 61,34±4,23 olarak kuşburnu, % 47,11±5,11 olarak güvem ve % 44,27±1,07 olarak ayva yapraklarında tayin edilmiştir (Şekil 4.15). Kuşburnunun 10 mg/mL konsantrasyondaki su ekstraktı, akarbozun 1 mg/mL konsantrasyondaki etkisine en yakın inhibisyon oranını göstermiştir.



**Şekil 4.15.** Su ekstraktlarının  $\alpha$ -amilaz enzimi üzerindeki % inhibisyon değerleri

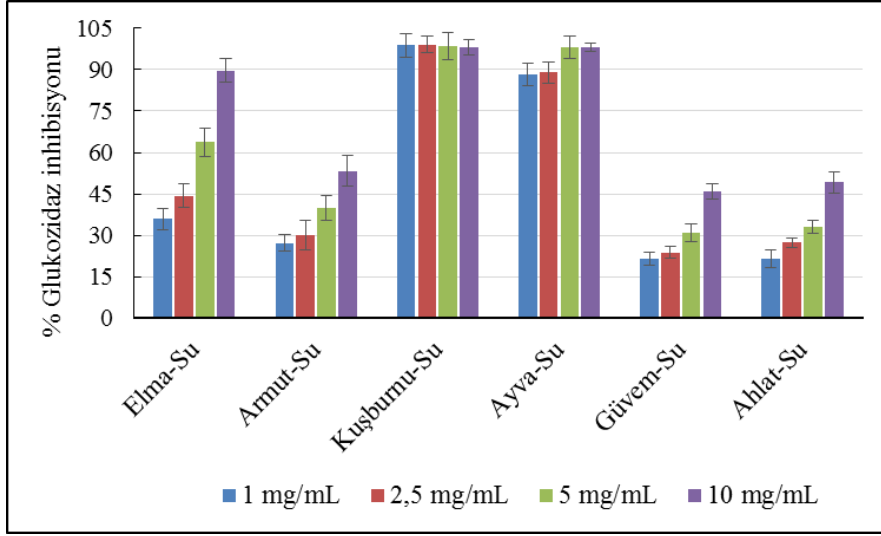
Bitkilerin etanol ekstraktları, su ekstraktlarına göre daha iyi sonuçlar vermiş olup, özellikle kuşburnu, ayva ve güvem yaprakları çalışılan tüm konsantrasyonlarda ekstraktın artan miktarıyla artan enzim inhibisyon etkisi oluşturmuştur (Şekil 4.16). Etanol ekstraktlarında su ekstraktlarında olduğu gibi özellikle ayva, güvem ve kuşburnu yaprakları  $\alpha$ -amilaz üzerinde etki göstermiş ve 2,5, 5.0 ve 10 mg/mL

konsantrasyonlarda (kuşburnu etanol ekstraktının 2,5 mg/mL konsantrasyonu hariç) % 45'in üzerinde inhibisyon etkisi göstermişlerdir.



**Şekil 4.16.** Etanol ekstraktlarının  $\alpha$ -amilaz enzimi üzerindeki % inhibisyon değerleri

Bitkilerden elde edilen etanol ekstraktlarının  $\alpha$ -glukozidaz enzimini inhibe etme denemesinde, çalışılan konsantrasyonlarla (1.0, 2.5, 5.0 ve 10 mg/mL) ilişkili olarak anlamlı sonuçlar alınmadığından bu sonuçlar tez kapsamına dahil edilmemiştir. Şekil 4.17'de görüldüğü gibi su ekstraktlarının  $\alpha$ -glukozidaz enzimini inhibe etme dereceleri konsantrasyonla orantılı olarak artmaktadır. Ayrıca kuşburnu ve ayva yapraklarının su ekstraktları çalışılan tüm konsantrasyonlarda, elma yaprakları da 5 mg/mL ve 10 mg/mL konsantrasyonlarda akarbozun 1 mg/mL'si ile kıyaslandığında yüksek inhibisyon etkileri göstermişlerdir (Çizelge 4.9).



Şekil 4.17. Su ekstraktlarının  $\alpha$ -glukozidaz enzimi üzerindeki % inhibisyon değerleri

Çizelge 4.9. Akarboz ve su ekstraktlarının  $\alpha$ -glukozidaz enzimini inhibe etme oranları

Konsantrasyon	1 mg/mL	2,5 mg/mL	5 mg/mL	10 mg/mL
<b>Su Ekstraktı</b>	<b>% İnhibisyon</b>			
Elma	35,94±3,75	44,29±4,18	63,66±5,14	89,68±4,21
Armut	27,18±2,89	30,01±5,26	39,90±4,57	53,34±5,53
Kuşburnu	98,84±4,24	99,12±2,88	98,58±5,03	98,20±2,73
Ayva	88,33±3,95	89,05±3,88	98,10±3,98	97,98±1,49
Güvem	21,55±2,45	23,69±2,17	30,71±3,21	45,83±2,76
Ahlat	21,60±1,75	27,42±1,75	33,09±2,43	49,15±3,72
Akarboz 50 $\mu$ g/mL	100 $\mu$ g/mL	250 $\mu$ g/mL	500 $\mu$ g/mL	1 mg/mL
26,67±1,98	24,43±2,85	27,46±3,73	36,09±4,51	52,83±2,15

Rosaceae ailesi meyveleri günlük beslenmemizde önemli bir yer tutmaktadır. Bu ailenin bazı üyelerinin yaprakları da halk arasında uygulanan geleneksel tıpta çeşitli amaçlarla kullanılmaktadır. Tez çalışması kapsamında çevremizde kolaylıkla ulaşabileceğimiz Gülgiller ailesinden elma, armut, kuşburnu, ayva, güvem ve ahlat ağaçlarının yapraklarının antioksidan ve antidiyabetik potansiyelinin incelenmesi amaçlanmıştır. Bitkilerin gösterdikleri biyolojik aktiviteler içerdikleri fitobileşenlerden kaynaklandığı için, bu bitkilerin yapraklarından elde edilen ekstraktların toplam fenolik, flavonoid ve tanen içerikleri de tayin edilmiştir. Bitki ekstraktlarının içerdiği bu

polifenolik bileşenlerin, yaprakların gösterdiği antioksidan özellikler ve antidiyabetik kapasite üzerindeki etkisini gösteren korelasyon analizi sonuçları Çizelge 4.10'da verilmiştir.

Çalışılan beş antioksidan aktivite metodunun ve iki enzim inhibisyon metodunun sonuçları, ekstraktların fitobileşen içerikleriyle karşılaştırıldı. Korelasyon analizi sonuçlarına göre; özellikle bir tek elektron transferine dayanan (SET temelli) metodlar ile polifenolik bileşenler arasında pozitif ilişki gözlemlendi. DPPH• giderme aktivitesi toplam fenolik madde ( $r=0,499^{**}$ ), flavonoid ( $r=0,630^{**}$  ve  $r=0,672^{**}$ ) ve tanen ( $r=0,669^{**}$ ) içerikleri ile anlamlı şekilde ilişkili bulundu. ABTS<sup>•+</sup> giderme aktivitesinin toplam fenolik madde ( $r=0,701^{**}$ ), flavonoid ( $r=0,579^{**}$  ve  $r=0,676^{**}$ ) ve tanen ( $r=0,720^{**}$ ) içerikleri ile oldukça yakın ilişkili olduğu gözlemlendi. CUPRAC metodunda da toplam fenolik madde ( $r=0,705^{**}$ ), flavonoid ( $r=0,677^{**}$  ve  $r=0,692^{**}$ ) ve tanen ( $r=0,863^{**}$ ) içerikleri ile bu metod arasında pozitif korelasyon tayin edildi. Bu durum fenolik bileşenlerin antioksidan aktivite üzerinde önemli rol oynadığını göstermektedir. Korelasyon çalışması sonuçlarına göre β-karoten ağartma metodunda ekstraktların içerdiği fenolik madde ( $r=0,080_{ns}$ ) ile antioksidan aktivite arasında güçlü korelasyon gözlenmezken; flavonoid içeriği ( $r=0,675^{**}$  ve  $r=0,617^{**}$ ) ile antioksidan aktivite arasında anlamlı bir pozitif ilişki gözlemlendi. Dolayısıyla lipid peroksidasyonunu önlemede flavonoidlerin önemli bir rol oynadığı belirlendi. Metal şelatlama deneyinde ise, korelasyon çalışması sonuçlarına göre gözlenen aktiviteye ekstraktların içerdiği fenolik maddelerin ( $r=0,461^{**}$ ) katıldığı belirlendi.

Ekstraktların gösterdiği antidiyabetik aktivite ile fitobileşenler arasındaki korelasyon sonuçlarına göre; α-glukozidaz inhibisyonu ile fenolik bileşen ( $r=0,378^*$ ) arasında ve α-amilaz inhibisyonu ile tanen içeriği ( $r=0,339^*$ ) arasında pozitif ilişki tayin edildi.



**Çizelge 4.10.** Çalışmada kullanılan bitkilerin antioksidan ve antidiyabetik karakteristikleri ile içerdikleri fitobileşenlerinin korelasyon analizi tablosu

	DPPH• giderme	ABTS• <sup>+</sup> giderme	CUPRAC	β- karoten ağartma	Metal şelatlama	α- amilaz inh.	α- glukozidaz inh.	Fenolik (GA)	Flavonoid (RE)	Flavonoid (KE)	Tanen (TAE)
DPPH• giderme	1.000	0.908**	0.700**	0.649**	-0.118ns	0.418**	-0.265ns	0.499**	0.630**	0.672**	0.669**
ABTS• <sup>+</sup> giderme		1.000	0.657**	0.455**	0.040ns	0.255ns	0.037ns	0.701**	0.579**	0.676**	0.720**
CUPRAC			1.000	0.588**	-0.082ns	0.696**	-0.301ns	0.705**	0.677**	0.692**	0.863**
β-karoten ağartma				1.000	-0.539**	0.473**	-0.634**	0.080ns	0.675**	0.617**	0.393*
Metal şelatlama					1.000	0.070ns	0.817**	0.461**	-0.542**	-0.514**	0.165ns
α-amilaz inhibisyonu						1.000	-0.369*	0.146ns	0.320ns	0.258ns	0.339*
αglukozidaz inhibisyonu							1.000	0.378*	-0.494**	-0.407*	0.021ns
Fenolik (GA)								1.000	0.355*	0.416*	0.862**
Flavonoid (RE)									1.000	0.931**	0.605**
Flavonoid (KE)										1.000	0.635**
Tanen (TAE)											1.000

“\*\*\*” İstatistiksel olarak p<0.01 düzeyinde önemli (anlamlı), “\*” istatistiksel olarak p<0.05 düzeyinde önemli ve “ns” istatistiksel olarak önemsiz olduğunu ifade etmektedir.

## BÖLÜM 5

### TARTIŞMA

Rosaceae (Gülgiller) geniş yayılım gösteren, çiçekli bitkiler gruplarından birisidir. Elma, kayısı, armut, ayva, şeftali, muşmula, kiraz, kuşburnu, güvem bu ailenin bazı üyeleridir. Özellikle meyveleri tüketildiği için hem diyetin bir parçasını oluşturur, hem de ekonomik değeri olan bitki ailelerindedir. Bazı bölgelerde bu aileye ait üyelerin çeşitli kısımları halk ilacı olarak diyabet tedavisinde kullanılmaktadır (Çıkladilmez, 2013; Arıtuluk & Ezer, 2012). Günümüzde diyabet en sık görülen endokrin bozukluğu hastalığıdır ve insidansı her yıl artmaktadır.

Antioksidan özellikli taze meyve, sebze, içecek ve baharatların alımıyla bazı hastalıkların önlenmesi arasında pozitif ilişki olduğuna dair yapılan çalışmalardan sonra, insanların tükettikleri gıdalara özen gösterme eğilimleri ve sağlıklı bir yaşam tarzına sahip olma istekleri de artmıştır. Özellikle bitkilerde bol bulunan polifenolik bileşikler antioksidan etkileriyle vücutta etkili iken; aynı zamanda gıdalardaki istenmeyen radikalik reaksiyonları geciktirme ve/veya önlemede önemli rol oynarlar. Bu yüzden gıdalara katılan sentetik antioksidanların yerine doğal kaynaklardan antioksidan arayışı da hızla devam etmektedir.

Ayrıca bitkiler tüm dünyaya yayılmış olup, büyük bir çeşitliliğe sahiptirler. Beslenmede çeşitli kısımlarının kullanılmasına rağmen bazılarının yaprakları kullanılmamaktadır. Tezde çalışılan Rosaceae ailesi bitkilerinin de yaprakları özel bir alanda kullanılmadan doğada kalmaktadır.

Ayrıca antioksidan ve antidiyabetik özellikle ilgili olarak; bu ailenin meyveleriyle yapılan çok sayıda çalışma mevcuttur, ancak yapraklarıyla ilgili çalışmalar daha sınırlıdır. Sözü edilen bu sebeplerden dolayı sunulan çalışmada Rosaceae (Gülgiller) ailesine ait güvem, kuşburnu, armut, elma, ayva ve ahlat ağaçlarının

yaprakları ile çalışılması ve antidiyabetik, antioksidan potansiyellerinin araştırılması planlanmıştır. Çalışmada, yaprakların su ve etanol ekstraktları hazırlanarak elde edilen ekstraktlarda spektrofotometrik metodlar ile toplam fenolik madde, flavonoid ve tanen miktarları tayin edildi. Antidiyabetik kapasitelerinin belirlenmesi için in vitro koşullarda  $\alpha$ -amilaz ve  $\alpha$ -glukozidaz enzim inhibisyonu metodları çalışıldı. Bitki ekstraktları DPPH<sup>•</sup> ve ABTS<sup>•+</sup> radikallerini giderme aktiviteleri, CUPRAC ve  $\beta$ -karoten ağartma metodları ile toplam antioksidan aktivite tayini ve metal şelatlama aktivitesi yönünden incelendi. Sonuçlar, tezde çalışılan Rosaceae bitkilerinin yapraklarıyla ilgili literatürdeki çalışmalarla karşılaştırılarak değerlendirildi.

Elma yaprağının fenolik madde miktarı etanol ekstraktı için 68,42 mg GAE/g ve flavonoid miktarı 56,80 mg RE/g olarak; su ekstraktı için fenolik ve flavonoid miktarları ise sırasıyla 84,70 mg GAE/g ve 62,92 mg RE/g olarak tayin edilmiştir.

Liaudanskas vd. (2014) çalışmalarında dört farklı kültüre ait elma yapraklarının antioksidan aktivitesini üç antioksidan metod kullanarak belirlemişler, toplam fenolik ve flavonoid miktar tayinlerini yapmışlardır. Antioksidan aktiviteyi Troloks eşdeğeri olarak ifade ettiklerinde tüm kültürlerde DPPH < ABTS < FRAP sıralaması olduğunu rapor etmişlerdir. Toplam fenolik miktarları 98,81-163,35 mg GAE/g ve flavonoid miktarları 21,59-45,02 mg RE/g olarak tayin edilmiştir.

Lu ve arkadaşları (2019) tarafından elma (*Malus pumila* Mill.) yaprakları petrol eteri, etilasetat ve %75'lik etanol ile fraksiyonlayarak ekstrakte edildikten sonra, ekstraktlarda toplam fenolik ve flavonoid tayini ve DPPH testleri yapılmış. Üç ekstrakt arasında en yüksek fenolik madde (56,74 mg GAE/g), flavonoid miktarı (37,56 mg KE/g) ve antioksidan aktivite (DPPH için EC<sub>50</sub>=50,96 mg/L) olarak %75'lik etanol ekstraktında tayin edilmiştir.

Bir diğer çalışmada elma (*Malus domestica* Borkh.) yaprağının alkol (metanol, % 50 metanol, % 70 metanol, etanol, % 50 etanol, % 70 etanol) ekstraktlarında toplam fenolik ve flavonoid tayinleri yapılarak, ABTS metodu uygulanmış ve ayrıca fenolik profili RP-HPLC analizlenmiştir (Rana vd., 2016). Bu ekstraktlar arasında en yüksek fenolik madde (30,38 mg/g), toplam flavonoid bileşen (20,92 mg/g) ve en yüksek antioksidan aktivitenin (ABTS için IC<sub>50</sub>=49,16  $\mu$ g/mL) %70'lik etanol ekstraktında olduğu bildirilmiştir.

Tez çalışmasında literatürle benzer şekilde, DPPH ve ABTS metodlarında elma ekstraktlarının çalışılan yüksek konsantrasyonlarda iyi aktiviteler göstermesine rağmen tez kapsamındaki diğer bitki ekstraktlarla kıyaslandığında genel sıralamada geride kaldığı söylenebilir.

Sunulan çalışmada ayva yapraklarının etanol ve su ekstraktlarına ait fenolik madde miktarları 124,76 ve 108,16 GAE µg/mg olup, uygulanan antioksidan aktivite yöntemlerinin hepsinde ayva yaprağı ekstraktları güçlü antioksidan aktivite göstermiştir.

Costa vd. (2009) yeşilçay ile karşılaştırmalı olarak iki farklı zamanda ve iki farklı yerden topladıkları ayva (*Cydonia oblonga*) yapraklarının metanolik ekstraktının FCR ve DPPH metodlarıyla antioksidan özellikleri incelenmiş ve fenolik içeriğini HPLC/UV ile analizlemişlerdir. Fenolik içeriğini 5-O-kafeoilkuinik asit eşdeğeri olarak ortalama 227,8 g/kg ve DPPH için EC<sub>50</sub> değerini 21,6 µg/mL belirlenmiştir.

Diğer bir çalışmada ayva (*Cydonia oblonga* Miller) yapraklarının FCR ile toplam fenolik bileşen tayini ve FRAP ve DPPH metodları ile de antioksidan aktivite tayini yapılmıştır (Yılmaz & Seyhan, 2017). Metanol, su ve etanol ekstraktlarındaki toplam fenolik bileşenler sırasıyla 744, 544 ve 247 GAE µg/mL olarak belirlenmiştir. Ekstraktların DPPH giderme ve FRAP aktiviteleri metanol > etanol > su sıralamasında tayin edilmiştir.

Çalışmada armut yaprağının etanol ekstraktı için toplam fenolik miktarı 86,25 mg GAE/g olarak belirlendi; armut yaprağı ekstraktları başta ABTS radikali giderme metodu olmak üzere çalışılan tüm antioksidan kapasite tayin metodlarında yüksek aktivite gösterdi. Sroka vd. (2018) farklı aylarda toplanan iki armut türünün (*Pyrus communis* ve *Pyrus pyrifolia*) yapraklarından alınan metanol ekstraktlarında toplam fenolik miktarlarını 43,4-58,4 mg/g aralığında, ABTS radikali süpürme etkisini değişen oranlarda tayin etmişleridir. Fenolik bileşenleri ayrıca RP-HPLC ile çalışmışlardır.

Armut ile aynı cinsten olan ahlat bitkisinin yaprağı halk arasında kullanılmasına rağmen, antioksidan etkinliğiyle ilgili çalışmaya rastlanmamıştır. Bu çalışmada ahlat yaprağının etanol ekstraktı için polifenolik bileşikler toplam fenolik 73,07 mg GAE/g, flavonoid 51,18 mg RE/g ve tanen miktarları 15,65 mg TA/g olarak tayin edilmiştir. Ahlat ile ilgili olarak, Türkiye’de yetişen ahlat (*P. elaeagnifolia* subsp. *elaegnifolia*) meyvesinin etil asetat, hekzan ve metanol ekstraktlarında toplam fenolik, flavonoid ve tanen tayini yapılarak, ekstraktların antiinflamatuvar etkisi araştırılmıştır (İlhan vd.,

2019). Ahlatın etanol ekstraktında toplam fenolik madde 31,92 mg GAE/g, flavonoid 47,31 mg RE/g ve tanen 11,78 mg TA/g olarak belirlenmiştir.

Literatürde güvemın meyveleriyle ilgili çeşitli antioksidan aktivite çalışmaları bulunmaktadır (Aliyazıcıoğlu vd., 2015; Kiselova vd., 2005; Ruiz-Rodriguez vd., 2013). Ayrıca güvem (*Prunus spinosa* L.) yapraklarından ve çiçeklerinden çeşitli flavonoidler de saflaştırılarak tanımlanmıştır (Olszewska & Wolbis, 2002; Olszewska, Glowackı, Wolbis, Bald, 2001). Güvem yaprağıyla ilgili olarak ulaşılan çalışma Pinacho ve arkadaşlarının yaptığı çalışmadır (Pinacho vd., 2015). Bu çalışmada güvem meyve, yaprak ve dallarından fraksiyonlu ekstraksiyon ile elde edilen diklorometan, etilasetat, etanol ve su ekstraktlarında DPPH testi, toplam fenolik ve flavonoid tayinleri yapılmış, ayrıca HPLC teknikleriyle özel fenolik bileşenleri de analizlenmiştir. Bu çalışmada güvem yaprağının etanol ve su ekstraktlarının toplam fenolik miktarları sırasıyla 228,56 ve 101,28 mg/g ve toplam flavonoid miktarları sırasıyla 196,88 ve 81,01 mg/g olarak belirlenmiştir. Çalışmamızda ise bu değerlerden farklı olarak etanol ve su ekstraktlarının fenolik bileşen miktarları sırasıyla 61,06 ve 57,70 mg GAE/g olarak ve flavonoid miktarları 52,15 ve 18,45 mg RE/g olarak tayin edilmiştir.

Çalışmamızda güvem yaprağının fitobileşen miktarları aynı ailedeki diğer bitki yapraklarından düşük olarak belirlendi. Ayrıca güvem tez kapsamında çalışılan antioksidan aktivite metodlarında da düşük aktiviteler gösterdi.

Sicilya'da yetişen dört kuşburnu türünün yaprakları farklı iki ayda (Haziran ve Ekim) toplanarak fitobileşen (klorofil, karotenoid, antosiyanin, flavonoid, polifenol) ve antioksidan özelliğindeki değişimlerin zamana göre incelenmesi amaçlanmıştır (Dangiollılo, Mammano & Fascella, 2018). Metanol ekstraktlarının polifenolik içeriğı 31,3-67,5 mg CAE/g aralığında ve flavonoid içeriğı 13,1-24,1 mg QE/g aralığında tayin edilmiştir. Tunus'un farklı bölgelerinden toplanmış olan üç Rosa türünün metanol ekstraktlarında, toplam fenolik bileşen 243-464 mg GAE/g aralığında tayin edilmiştir (Ouerghemmi vd., 2016). Tez çalışmasında ise kuşburnu yaprağının etanol ekstraktında fenolik madde miktarı 124,73 mg GAE/g ve flavonoid miktarı 68,62 mg RE/g olarak belirlendi. Ouerghemmi ve arkadaşları yaptıkları çalışmada; ekstraktların, çözücü türü ve bitki türüne göre DPPH, TEAC, FRAP ve ORAC antioksidan aktivite testlerinde farklı oranlarda aktivite gösterdiklerini rapor etmişlerdir.

Gougoulis (2015) kiraz, kayısı, şeftali, erik, elma, zeytin, kestane ve fıstık ağaçlarının yapraklarının fenolik içeriğini (toplam fenolik, non-flavonoid fenoller, flavonoid fenoller, flavan-3-ol miktar tayini) ve antioksidan aktivitesini (DPPH, ABTS ve FRAP metodları) incelemiştir. Bu sekiz bitkiden kiraz, kayısı, şeftali, erik ve elma Gülgiller ailesinden olup, çalışma sonucuna en yüksek fenolik içeriği ve antioksidan aktiviteyi erik yaprağı ekstraktı gösterirken, en düşük fenolik miktarları ve aktivite şeftali yaprağı ekstraktında tayin edilmiştir.

Bitkilerin sekonder metabolit içeriği bitkinin türü, yetiştirilme şartları, iklim, hasat zamanı ve depolama şartları gibi çeşitli faktörlerden etkilenir. Ekstraksiyon işleminde uygulanan yöntem ve çözücü cinsi de örneklerin göstereceği biyolojik aktiviteler üzerinde etkili olabilir. Bu sebeplerden dolayı incelenen örneklerin antioksidan aktivitelerini kıyaslamakta zorluk yaşanmaktadır.

Ekstraktlar farklı miktarlarda fenolik bileşenler içermektedir, ayrıca herbirinin baskın fenolik bileşeni farklı olabilir; elma yaprağında floridzin (Liaudanskas vd.,2014), phloretin, kersitrin (Rana vd., 2016), güvem yaprağında kamferol, kersetin ve glikozidleri (Olszewska & Wolbis, 2002), ayva yaprağında 5-O-kafeoilkuinik asit (Costa vd., 2009), armut yaprağında hidroksikinon ve hidroksisinnamik asit (Sroka vd., 2018), kuşburnu yapraklarında kamferol ve türevleri (Ouerghemmi vd., 2016) ana bileşen olarak tayin edilmiştir. Bitkiler aynı türe ait olmasına rağmen, ekstraktlarda gözlenen farklı aktiviteler farklı polifenol karışımlarını içermelerinden kaynaklanabilir.

Diyabet dünyanın en büyük sağlık problemlerinden biridir ve giderek hasta sayısı artmaktadır. Karbonhidratları sindiren enzimler ve onların inhibisyonu insülinin bağımsız olan hiperglisemiye kontrol etmede önemli rol oynar. Bu yüzden  $\alpha$ -amilaz ve  $\alpha$ -glukozidaz inhibitörleri etkili teröpatik ajanlar haline gelmiştir.

Çalışılan bitki yapraklarının in vitro antidiyabetik etkisiyle ilgili makale çok fazla bulunamamıştır. Aslan ve arkadaşları streptozotosin ile diyabet oluşturdukları sıçanlara 5 gün boyunca oral yoldan 500 mg/kg dozda ayva yaprağı etanol ekstraktı vermişler ve kan glukoz düzeyinin % 33,8 azaldığını bildirmişlerdir (Aslan vd., 2010). Daha sonrasında yaptıkları çalışmalarında in vitro deneylerde ayva yaprağının karbonhidrat sindirim enzimleri üzerinde inhibitör etkisinin olmadığını ve bu sebeple hipoglisemik etki mekanizmasının  $\alpha$ -amilaz ve  $\alpha$ -glukozidaz enzimlerinin inhibisyonu yoluyla olmadığını bildirmişlerdir (Orhan & Orhan, 2016).

Liudanskas vd., (2014) elma yapraklarının gösterdiği antidiyabetik aktivitenin, yaprakta bulunan yüksek miktardaki phloridzinden kaynaklandığını ifade etmişlerdir. Phloridzin elmada ve yaprağında bulunan bir fenolik bileşiktir. Tez çalışmasında elma yaprağı su ekstraktının gösterdiği  $\alpha$ -glukozidaz inhibisyonu polifenolik içeriğinde (84,7 GAE mg/g) bulunabilecek bu bileşik ile ilişkilendirilebilir. Üzümsü meyvelerdeki polifenolik bileşiklerle ilgili olarak yapılan çalışmada, antosiyanince zengin ekstreler özellikle  $\alpha$ -glukozidaz enzimini, tanence zengin ekstreler  $\alpha$ -amilaz enzimini güçlü şekilde inhibe etmiştir (McDougall, 2005). Tez çalışmasında da en yüksek tanen içeriğine sahip ayva yaprağının etanol ekstraktında (25,71 TAE mg/g), kuşburnu yaprağının etanol (25,32 TAE mg/g) ve su (26,42 TAE mg/g) ekstraktlarında diğer yaprak ekstraktlarına göre daha yüksek  $\alpha$ -amilaz inhibisyonu görülmüştür.

Mauritius'ta geleneksel tıpta diyabet için kullanılan yedi egzotik bitki yaprağıyla yapılan çalışmada, Gülgiller ailesinden olan ancak tez kapsamında çalışılmayan malta eriği (*Eriobotrya japonica*) yaprağında amilaz inhibisyon aktivitesi bulunmamıştır (Kotowaroo vd., 2006).

Potansiyel amilaz veya glikozidaz inhibitörleri olarak bitki polifenolleri ile ilgili çok sayıda çalışma yapılmaktadır. Ancak bu çalışmalarda uygulanan optimum şartlar ve değişen metod koşulları farklı inhibisyon değerlerinin elde edilmesine yol açmaktadır. Farklı deney koşulları  $IC_{50}$  değerini oldukça etkilemektedir; örneğin optimum koşullarda çalışılmamasının Akarbozun  $IC_{50}$  değeri üzerinde 5 kat fazla etkisi vardır (Nyambe-Slavwe vd., 2015). Bu sebeple bitkilerden elde edilen ekstraktlar antidiyabetik açıdan değerlendirilirken literatürdeki verilerle kıyaslamakta zorluk çekilebilir. Sunulan çalışmada Gülgiller ailesinin altı üyesine ait ekstraktlar potansiyel antidiyabetik açıdan değerlendirilmiş olup; kuşburnu ve ayva yaprağı ekstraktlarında yüksek inhibisyon oranları tayin edilmiştir. Gelecekte planlanan çalışmalarda;

- a)  $\alpha$ -amilaz ve  $\alpha$ -glukozidaz üzerinde inhibisyon yapan ekstraktlarda, daha ileri analizler yapılarak gözlenen inhibitör etkiden sorumlu özel fenolik bileşikler belirlenebilir,
- b) Çalışmadan elde edilen antidiyabetik aktivite sonuçları hayvan modelleri kullanılarak in vivo ortamda yapılarak geliştirilebilir,
- c) Ayrıca in vitro ortamda çalışılan glukozidaz enzimleri inhibisyon metodları genel kullanım için daha iyi optimize edilerek, farklı araştırmacıların sonuçlarının birbiriyle kıyaslanması sağlanabilir.

Günümüzde insanlar sağlıklı yaşam tarzını benimsediklerinden, özellikle çevresel faktörlerden kaynaklı oksidatif stresle mücadelede taze ve bol meyve-sebze tüketme eğilimindedirler. Antioksidan bileşikler sağlık üzerinde iyileştirici etki gösterdikleri gibi; özellikle gıda ve kozmetik alanında da kullanılmaktadır. Dolayısıyla sentetik antioksidanların yerine doğal kaynaklardan belirlenecek ve izole edilecek antioksidan özellikli yeni ekstre veya bileşikler de önem arz etmektedir. Bu tez kapsamında çalışılan bitkilerden kuşburnu ve ayva yaprakları da fenolik içerikçe zengin olup güçlü antioksidan özellik göstermiştir. Elde edilen sonuçlara göre;

- a) Kuşburnu, ayva veya ahlat yaprakları gıda, kozmetik gibi alanlarda alternatif doğal antioksidanlar olarak değerlendirilebilir,
- b) Daha sonraki çalışmalarla kuşburnu, ayva ve ahlat yapraklarından elde edilen ham ekstraktlarda saflaştırma yapılarak, aktivitede rol oynayan fitokimyasallar tanımlanabilir,
- c) Toplam flavonoid tayininde kullanılan alüminyum klorür metodu özellikle flavonollerini içeren örneklerde daha kullanışlı olduğu için (Olszewska vd., 2001), flavonoidlerin kantitatif analizinde spektrofotometrik yöntemin yanında HPLC ile de analiz yapılması önerilebilir.

Sunulan tez çalışmasında Gülgiller ailesine ait güvem, kuşburnu, elma, armut, ahlat (yabani armut) ve ayva yapraklarının antioksidan kapasiteleri yönünden beş farklı antioksidan aktivite metodu kullanılarak kapsamlı olarak incelenmesi ve bitkilerin antidiyabetik potansiyellerinin araştırılması amaçlanmıştır. Bitkilerin gösterdikleri biyolojik aktivitelerinden sorumlu fitobileşenlerden olan fenolik madde, flavonoid ve tanen miktarları da belirlenmiştir. Çalışılan bitkilerden kuşburnu ve ayva yaprakları fenolik içerikçe zengin olup güçlü antioksidan özellik gösterirken, güvem yapraklarının antioksidan yönden zayıf olduğu gözlenmiştir. Kuşburnu, ayva ve güvem yaprağı ekstraktları ise karbonhidrat sindirim enzimleri olan  $\alpha$ -amilaz ve  $\alpha$ -glukozidaz üzerinde inhibisyon etkisi göstermiştir.



## KAYNAKLAR

Ahmed, M., Pickova, J., Ahmad, T., Liaquat, M., Farid, A., Jahangir, M. (2016). Oxidation of lipids in foods. *Sarhad Journal of Agriculture*, 32(3), 230-238.

Aliyazıcıoğlu, R., Yıldız, O., Şahin, H., Eyüpoğlu, O.E., Özkan, M.T., Karaoğlu, S.A., Kolaylı, S. (2015). Phenolic components and antioxidant activity of *Prunus spinosa* from Gumushane, Turkey. *Chemistry of Natural Compounds*, 51(2), 346-349.

Akkuş, İ. (1995). *Serbest Radikaller ve Fizyopatolojik Etkileri* (1.Baskı). Konya:Mimoza.

Akoh, C.C., Min, D.B. (2008). Food Lipids: Chemistry, Nutrition and Biotechnology (3.baskı). Reische, D.W., Lillard, D.A., Eitenmiller, R.R. (ed.), *Oxidation and Antioxidants içinde* (Bölüm 3(15), s. 409-433). New York: CRC Press.

Aldred, E.M. (2009). Pharmacology A Handbook For Complementary Healthcare Professionals. Halliwell, B., Gutteridge, J.M.C. (ed.), *Basic Pharmacological Principles içinde* (Bölüm7, s.41-52). York UK: Churchill Livingstone Elsevier.

Apak, R., Güçlü, K., Özyürek, M., Karademir, S.E. (2004). Novel total antioxidant capacity index for dietary polyphenols and vitamins C and E, using their cupric ion reducing capability in the presence of neocuproine: CUPRAC method. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52(26), 7970-7981.

Apostolidis, E., Kwon, YI., Shetty, K. (2007). Inhibitory potential of herbal, fruit, and fungal-enriched cheese against key enzymes linked to type 2 diabetes and hypertension *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 8, 46-54.

Arıtuluk, Z.C., Ezer, N. (2012). Halk arasında diyabete karşı kullanılan bitkiler (Türkiye) 2. *Hacettepe Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Dergisi*, 32(2), 179-208.

Aslan, M., Orhan, N. (2010). Diyabet tedavisinde kullanılan bitkisel ürünler ve gıda destekleri. *Türk Eczacılar Birliği Yayını- Meslek İçi Sürekli Eğitim Dergisi*, 23-24, 27-38.

Aslan, M., Orhan, N., Orhan, D.D., Ergün, F. (2010). Hypoglycemic activity and antioxidant potential of some medicinal plants traditionally used in Turkey for diabetes. *Journal of Ethnopharmacology*, 128, 384-389.

Asmat, U., Abad, K., İsmail, K. (2016). Diabetes mellitus and oxidative stress-A concise review. *Saudi Pharmaceutical Journal*, 24(5), 547-553.

Becker, E.M., Nissen, L.S., Skibsted, L.H., (2004). Antioxidant evaluation protocols: Food quality or health effects. *European Food Research and Technology*, 219(6), 561-571.

Betteridge, D.J. (2000). What is oxidative stress?. *Metabolism*, 49(2), 3-8.

Blois, M.S. (1958). Antioxidant determinations by the use of a stable free radical. *Nature*, 181, 1199-1200.

Boath, A.S., Stewart, D., McDougall, G.J. (2012). Berry components inhibit  $\alpha$ -glucosidase in vitro: Synergies between acarbose and polyphenols from black currant and rowanberry. *Food Chemistry*, 135, 929-936.

Boligon, A.A., Machado, M.M., Athayde, M.L. (2014). Technical evaluation of antioxidant activity. *Medicinal Chemistry*, 4, 517-522.

Boyle, J. (2005). *Lehninger: Principles of Biochemistry (4th Edition)*. Nelson, D., Cox, M. (ed.), ( Bölüm 33(1), s. 74-75). New York: W.H. Freeman And Company.

Bulut, G. (2011). Folk medicinal plants of Silivri (İstanbul, Turkey). *Marmara Pharmaceutical Journal*, 15, 25-29.

Cobzac S., Moldovan, M., Olah, N.K., Boboş, L., Surducan, E. (2005). Tannin extraction efficiency, from *Rubus idaeus*, *Cydonia oblonga* and *Rumex Acetosa*, using different extraction techniques and spectrophotometric quantification. *Acta Universitatis Cibiniensis Seria F Chemia*, 8(2005-2), 55-59.

Costa, R.M., Magalhães, A.S., Pereira, J.A., Andrade, P.B., Valentão, P., Carvalho, M., Silva, B.M. (2009). Evaluation of free radical-scavenging and antihemolytic activities of quince (*Cydonia oblonga*) leaf: A comparative study with green tea (*Camellia sinensis*). *Food and Chemical Toxicology*, 47, 860-865.

Cotelle, N., Bernier, J.L., Catteau, J.P., Pommery, J., Wallet, J.C., Gaydou, E.M. (1996). Antioxidant properties of hydroxy-flavones. *Free Radical Biology and Medicine*, 20(1), 35-43.

Çıkladilmez, Ş. (2013). *Diyabet Tedavisinde Kullanılan Bitkiler ve Bitkisel Ürünler* (Bitirme tezi). Erciyes Üniversitesi/ Eczacılık Fakültesi/ Farmasötik Botanik Anabilim Dalı, KAYSERİ.

Dalgıç, G., Güler, N. (2015). *Trakya'nın Odunsu Bitkileri (Ağaç ve Çalılar)*. Ankara: Pelikan.

Dangioliello, F., Mammano, M.M., Fascella, G. (2018). Pigments, polyphenols and antioxidant activity of leaf extracts from four wild rose species grown in Sicily. *Notulae Botanicae Horti Agrobotanici Cluj-Napoca*, 46(2), 402-409.

Dasgupta, A., Klein, K. (2014). *Antioxidants in Food, Vitamins and Supplements (Prevention and Treatment of Disease)* içinde Oxidative Stress Related to Other Diseases, (Bölüm 11, s. 185-207). Burlington: Elsevier Science.

Dinis, T.C.P., Madeira, V.M.C., Almeida, L.M. (1994). Action of phenolic derivatives (Acetaminophen, salicylate, and 5-aminosalicylate) as inhibitors of membrane lipid peroxidation and as peroxy radical scavengers. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 315, 161-169.

Dizdaroğlu, M., Coşkun, E., Jaruga, P. (2015). Measurement of oxidatively induced DNA damage and its repair, by mass spectrometric techniques. *Journal Free Radical Research*, 49(5), 525-48.

Dorman, H.J.D., Peltoketo, A., Hiltunen, R., Tikkanen M.J. (2003). Characterisation of the antioxidant properties of deodourised aqueous extracts from selected Lamiacea herbs. *Food Chemistry*, 83(2), 255-262.

Embuscado, M.E. (2015). Spices and herbs: Natural sources of antioxidants. *Journal of Functional Foods*, 18, 811-819.

Erdoğan, S. (2002). Diyabet Hemşireliği: Temel Bilgiler. Özcan, Ş.(ed.), *Oral Antidiyabetik Tedavisinin Yönetimi içinde* (Bölüm 6, s. 55-56). İstanbul: Tavaslı.

Flora, S.J.S. (2009). Structural, chemical and biological aspects of antioxidants for strategies against metal and metalloid exposure. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2(4), 191-206.

Frankel, E. N., Meyer, A.S. (2000). The problems of using one-dimensional methods to evaluate multifunctional food and biological antioxidants. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 80(13), 1925-1941.

Frankel, E. N. (1999). Naturel phenolic antioxidants and their impact on health. Packer L., Hiramatsu M., Yoshikawa T. (Ed.). *Antioxidant Food Supplements in Human Health* içinde (Bölüm 25, s. 393-410). San Diego: Academic Press.

Fujita, T., Sezik, E., Tabata, M., Yesilada, E., Honda, G., Takeda, Y., Tanaka, T., Takaishi, Y. (1995). Traditional medicine in Turkey VII. Folk medicine in Middle and West Black Sea regions. *The New York Botanical Garden*, 49(4), 406-422.

Ghazghazi, H., Miguel, M.G., Hasnaoui, B., Sebei, H., Ksontini, M., Figueiredo, A.C., Pedro, L.G., Barroso, J.G. (2010). Phenols, essential oils and carotenoids of *Rosa canina* from Tunisia and their antioxidant activities. *African Journal of Biotechnology*, 9(18), 2709-2727.

Giugliano D., Ceriello A., Esposito K., (2006): The effect of diet on inflammation: Emphasis on the metabolic syndrome. *Journal of American College of Cardiology*, 48(4), 677-685.

Govindappa, M. (2015). A Review on role of plant(s) extracts and its phytochemicals for the management of diabetes. *Journal of Diabetes & Metabolism*, 6(7), DOI: 10.4172/2155-6156.1000565.

Gougoulas, N. (2015). Evaluation of antioxidant activity and polyphenol content of leaves from some fruit species. *Oxidation Communications*, 38(1), 35-45.

Gülçin, I. (2012). Antioxidant activity of food constituents: An overview. *Archives of Toxicology*, 86, 345-391.

Güneş, F. (2017). Medicinal plants used in the Uzunköprü district of Edirne, Turkey. *Acta Societatis Botanicorum Poloniae*, 86(4), DOI: 10.5586/asbp.3565.

Halvorsen, B.L., Holte, K., Myhrstad, M.C.W., Barigmo, I., Hvattum, E., Remberg, S.F., Wold, A.B., Haffner, K., Baugerod, H., Andersen, L.F., Moskaug, J.O., Blomhoff, R. (2002). A systematic screening of total antioxidants in dietary plants. *The Journal of Nutrition*, 132(3), 461-471.

Honda, G., Yesilada, E., Tabata, M., Sezik, E., Fujita, T., Takeda, Y., Takaishi, Y., Tanaka, T. (1996). Traditional medicine in Turkey. VI. Folk medicine in West Anatolia: Afyon, Kütahya, Denizli, Muğla, Aydın provinces. *Journal of Ethnopharmacology*, 53(2), 75-87.

İlhan, M., Akkol, E.K., Taştan, H., Dereli, F.T.G., Tümen, İ. (2019). Efficacy of *Pyrus elaeagnifolia* subsp. *Elaeagnifolia* in acetic acid-induced colitis model. *Journal of Chemistry/Open Chemistry*, 17(1).

İşbilir, Ş.S., Orak, H.H., Yağar, H., Ekinci, N. (2012). Determination of antioxidant activities of strawberry tree (*Arbutus unedo* L.) flowers and fruits at different ripening stages. *Acta Scientiarum Polonorum: Hortorum Cultus*, 11(3), 223-237.

Karabulut, H., Gülay, M.Ş. (2016). Free Radicals. *Mehmet Akif Ersoy Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Dergisi*, 4(1), 50-59.

Katoch, R. (2011). Methods for nutritional quality evaluation of food materials. *Analytical Techniques in Biochemistry and Molecular Biology içinde*. New York: Springer.

Kiselova, Y., Marinova, S., Ivanova, D., Gerova, D., Galunska, B., Chervenkov, T., Yankova, T. (2005). Antioxidative potential of edible wild Bulgarian fruits. *Proceedings of The Balkan Scientific Conference of Biology In Plovdiv (Bulgaria) From 19th Till 21st of May 2005 (Eds B. Gruev, M. Nikolova and A. Donev)*, p. 233–239.

Know, Y. I., Apostolidis, K., Shetty, K. (2006). Inhibitory potential of wine and tea against  $\alpha$ -amylase and  $\alpha$ -glucosidase for management of hyperglycemia linked to type 2 diabetes. *Journal Food Biochemical*, 32, 15-31.

Kolektif (2018). The most recent studies in science and art. Arapgırlıoğlu, H., Atık, A., Hızıroğlu, S., Elliott, R.L., Atık, D. (Ed.), *Plant Secondary Metabolites with Antioxidant Properties and Human Health* (Bölüm 1, s.11). Ankara: Gece.

Kotowaroo, M.I., Mahomoodally, M.F., Grib-Fakim, A., Subratty, A.H. (2006). Screening of traditional antidiabetic medicinal plants of Mauritius for possible  $\alpha$ -amylase inhibitory effects *in vitro*. *Phytotherapy Research*, 20, 228-231.

Kujawa, D.B., Cyboran, S., Oszmiański, J., Kleszczyńska, H. (2011). Extracts from apple leaves and fruits as effective antioxidants. *Journal of Medicinal Plants*, 5, 2339-2347.

Lattanzio, F., Greco, E., Carretta, D., Cervellati, R., Govoni, P., Speroni, E. (2011). In vivo anti-inflammatory effect of *Rosa canina* L. extract. *Journal of Ethnopharmacology*, 137, 880-885.

Lee, K.H., Cho, J.Y., Lee, H.J., Ma, Y.K., Kwon, J., Park, S.H., Lee, S.H., Cho, J.A., Kim, W.S., Park, K.H., Moon, J.H. (2011). Hydroxycinnamoylmalic acids and their

methyl esters from pear (*Pyrus pyrifolia* Nakai.) fruit peel. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 59(18), 10124–10128.

Liaudanskas, M., Viškelis, P., Raudonis, R., Kviklys, D., Uselis, N., Janulis, V. (2014). Phenolic composition and antioxidant activity of *Malus domestica* leaves. *The Scientific World Journal*, <http://dx.doi.org/10.1155/2014/306217>.

Liu, R.H. (2013). Dietary bioactive compounds and their health implications. *Journal of Food Science*, 78(1), 18-25.

Lu, Y., Du, Y., Qin, X., Wu, H., Huang, Y., Cheng, Y., Wei, Y. (2019). Comprehensive evaluation of effective polyphenols in apple leaves and their combinatory antioxidant and neuroprotective activities. *Industrial Crops & Products*, 129, 242-252.

McDougall, G.J., Shpiro, F., Dobson, P., Smith, P., Blake, A., Stewart, D. (2005). Different polyphenolic components of soft fruits inhibit  $\alpha$ -amylase and  $\alpha$ -glucosidase. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53(7), 2760–2766.

Miller, H.E. (1971). A simplified method for the evaluation of antioxidants. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 48(2), 91-97.

Miller, N.J., Luiz-Larrea, M.B., (2002). Flavonoids and other plant phenols in the diet: Their significance as antioxidants. *Journal of Nutritional & Environmental Medicine* 12, 39–51.

Molyneux, P. (2004). The use of the stable free radical diphenylpicrylhydrazyl (DPPH) for estimating antioxidant activity. *Songklanakarin Journal of Science and Technology*, 26(2), 211-219.

Nehir, E.S., Karakaya, S., Taş, A.A., (1999). Bazı gıdalardaki fenolik bileşiklerin antioksidan etkilerinin in vitro koşullarda saptanması. *TÜBİTAK Projesi* (No:TOGTAG-1698), İzmir.

Nyambe-Slavwe, H., Villa-Rodriguez, J.A., Ife, I., Holmes, M., Aydin, E., Jensen, J.M., Williamson, G. (2015). Inhibition of human alpha-amylase by dietary polyphenols. *Journal of Functional Foods*, 19, 723-732.

Oliveria, A.P., Costa, R.M., Magalhaes, A.S., Jose, A.P., Carvalho, M., Valentao, P., Andrade, P.B., Silva, B.M. (2012). Targeted metabolites and biological activities of *Cydonia oblonga* Miller leaves. *Journal of Food Research International*, 46, 496-504.

Olszewska, M., Wolbis, M. (2002). Flavonoids from the leaves of *Prunus spinosa* L. *Polish Journal of Chemistry*, 76(7), 967-974.

Olszewska, M., Glowacki, R., Wolbis, M., Bald, E. (2001). Quantitative determination of flavonoids in the flowers and leaves of *Prunus spinosa* L.. *Acta Poloniae Pharmaceutica-Natural Drugs*, 58(3), 199-203.

Onat, T., Emerk, K., Sözmen, E.Y.(Ed.) (2002). *İnsan Biyokimyası* (2.Baskı). Ankara: Palme.

Opara, E.C., Rockway, S.W. (2006). Antioxidants and micronutrients. *Disease a Month*, 52, 151-163.

Orhan, N., Aslan, M., Hoşbaş, S., Deliorman, O.D. (2009). Antidiabetic effect and antioxidant potential of *Rosa canina* fruits. *Pharmacognosy Magazine*, 5(20), 309-315.

Orhan, D.D., Hartevioğlu, A., Küpeli, E., Yeşilada, E. (2007). In vivo anti-inflammatory and antinociceptive activity of the crude extract and fractions from *Rosa canina* L. Fruits. *Journal of Ethnopharmacology*, 112, 394-400.

Orhan, D.D., Orhan, N. (2016). Assessment of in vitro antidiabetic and antioxidant effects of *Helianthus tuberosus*, *Cydonia oblonga* and *Allium porrum*. *Turkish Journal of Pharmaceutical Sciences*, 13(2), 181-186.

Oude, G.L.M., Geleijnse, J.M., Kromhout, D., Ocké, M.C., Verschuren, W.M. (2010). Raw and processed fruit and vegetable consumption and 10-year coronary heart disease incidence in a population-based cohort study in the Netherlands. *Journal of Plos One*, 5(10), e13609.

Ouerghemmi, S., Sebei, H., Siracusa, L., Ruberto, G., Saija, A., Cimino, F., Cristani, M. (2016). Comparative study of phenolic composition and antioxidant activity of leaf extracts from three wild *Rosa* species grown in different Tunisia regions: *Rosa canina* L., *Rosa moschata* Herrm. and *Rosa sempervirens* L.. *Industrial Crops And Product*, 94, 157-177.

Pinacho, R., Caverro, R.Y., Astiasarán, I., Ansorena, D., Calvo, M.I. (2015). Phenolic compounds of blackthorn (*Prunus spinosa* L.) and influence of in vitro digestion on their antioxidant capacity. *Journal of Functional Foods*, 19, 49-62.

Predescu, N.C., Papuc, C., Nicorescu, V., Gajaila, I., Goran, G.V., Petcu, C.D., Stefan, G. (2016). The influence of solid-to-solid and extraction method on total phenolic

content, flavonoid content and antioxidant properties of some ethanolic plant extracts. *Revista De Chimie (Bucharest)*, 67(10), 1922-1927.

Puganen, A., Kallio, H.P., Schaich, K.M., Jukka-Pekka, S., Yang, K.M. (2018). Red/green currant and sea buckthorn berry press residues as potential sources of antioxidants for food use. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 66(13), 3426-3434.

Qiu, D., Guo, J., Yu, H., Yang, S., Li, X., Zhang, Y., Sun, J., Cong, J., He, S., Wei, D., Qin, J.C. (2017). Antioxidant phenolic compounds isolated from wild *Pyrus ussuriensis* Maxim. fruit peels and leaves. *Journal of Food Chemistry*, 241, 182-187.

Rana, S., Kumar, S., Rana, A., Sharma, V., Katoch, P., Padwad, Y., Bhushan, S. (2016). Phenolic constituents from apple tree leaves and their in vitro biological activity. *Industrial Crops and Products*, 90, 118-125.

Rice-Evans, C.A. (1999). Antioxidant Food Supplements in Human Health. Packer L., Hiramatsu M., Yoshikawa T. (ed.), *Screening of phenolics and flavonoids for antioxidant activity içinde* (Bölüm 16, s.239-253). Elsevier: Academic.

Rice-Evans, C.A., Miller, N.J., Paganga, G. (1996). Structure–antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. *Free Radical Biology Medicine.*, 20 (7), 933-956.

Ruiz-Rodriguez, B.M., Ancos, B.D., Sánchez-Moreno, C., Fernández-Ruiz, V., Sánchez-Mata, M.D.C., Cámara, M., Tardío, J. (2013). Wild blackthorn (*Prunus spinosa* L.) and hawthorn (*Crataegus monogyna* Jacq.) fruits as valuable sources of antioxidants. *The International Journal of Tropical and Subtropical Horticulture*, 69(1), 61-71.

Sales, P., Souza, P.M.D., Simeoni, L.A., Magalhaes, P.D., Silveira, D. (2012).  $\alpha$ -amylase inhibitors: A review of raw material and isolated compounds from plant source. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 15(1), 141-183.

Schröder, H. (2007). Protective mechanism of the Mediterranean diet in obesity and type 2 diabetes. *Journal of Nutritional Biochemistry*, 18, 149-160.

Seven, A., Candan, G. (1996). Antioksidan savunma sistemleri. *Cerrahpaşa Tıp Dergisi*, 27(1), 41-50.

Shadi, F. (ed.) (2015). Handbook of Antioxidants for Food Preservation. *Antioxidants: Principles and Applications içinde* (Bölüm 1, s.1-14). Canada: Woodhead.



Smith, M.E., Morton, D.G. (2010) 8-Digestion and Absorption. *The Digestive System (Second Edition) içinde* (Bölüm 8, s.129-152)

Sing, B., Bhat, T.K., Sing, B., (2003). Potential therapeutic applications of some antinutritional plant secondary metabolites. *Journal of Agricultural and Food Chemistry, 51*, 5579-5597.

Singleton, V.L., Orthofer, R., Lamuela-Raventos RM. (1999). Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin-Ciocalteu reagent. *Methods in Enzymology, 299*, 152-178.

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

Sonia, A.T., Sharma, C.P. (2015). Oral Delivery of Insulin, Woodhead Publishing Series in Biomedicine. *Diabetes mellitus – an overview içinde* (Bölüm 1, s.1-57). İngiltere: Woodhead.

Sroka, Z., Zgorka, G., Zbikowska, B., Sowa, A., Franiczek, R., Wychowaniec, K., Krzyzanowska, B. (2019). High antimicrobial efficacy, antioxidant activity, and a novel approach to phytochemical analysis of bioactive polyphenols in extracts from leaves of *Pyrus communis* and *Pyrus pyrifolia* collected during one vegetative season. *Microbial Drug Resistance, 25(4)*, 582-593.

Steinmetz KA., Potter JD., (1996). Vegetables, fruit, and cancer prevention: A review. *Journal of the American Dietetic Association, 96*, 1027-1039.

Tavanı A., Negri E., La Vecchia C., (1996). Food and nutrient intake and risk of cataract. *Annals of Epidemiology, 6(1)*, 41-46.

Teleszko, M., Wojdylo, A., (2015). Comparison of phenolic compounds and antioxidant potential between selected edible fruits and their leaves. *Journal of Functional Foods, 14*, 736-746.

Tsao, R., (2010). Chemistry and biochemistry of dietary polyphenols. *Journal of Nutrients, 2 (12)*.

Tuzlacı, E., Alparslan İşbilen, D.F., Bulut, G., (2010). Turkish folk medicinal plants, VIII: Lalapaşa (Edirne). *Marmara Pharmaceutical Journal, 14*, 47-52.

Tuzlacı, E., Şenkardeş, İ., (2011). Turkish folk medicinal plants, X: Ürgüp (Nevşehir). *Marmara Pharmaceutical Journal* 2(15), 58-68.

Vecchia CL., Altieri A., Tavani A., (2001). Vegetables, fruit, antioxidants and cancer: A review of Italian studies. *European Journal of Nutrition*, 40, 261-267.

Walia, M., Kumar, S., Agnihotri, V.K., (2015). UPLC-PDA quantification of chemical constituents of two different varieties (Golden and Royal) of apple leaves and their antioxidant activity. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 96, 1440-1450.

Wilson, D.W., Nash, P., Buttar, H.S., Griffiths, K., Sing, R., Meester, F.D., Horiuchi, R., Takahashi, T. (2017). The role of food antioxidants, benefits of functional foods, and influence of feeding habits on the health of the older person: An overview. *Antioxidants (Basel)*, 6(4), doi: 10.3390/antiox6040081.

Wolfe, K.L., Liu, R.H. (2007). Cellular Antioxidant activity (CAA) Assay for assessing antioxidants, foods, and dietary supplements. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55(22), 8896-8907.

Yatoo, M.I., Saxena, A., Gopalakrishnan, A., Alagawany, M., Dhama, K. (2017). Promising Antidiabetic Drugs, Medicinal Plants and Herbs: An Update. *International Journal of Pharmacology*, 13(7), 732-745.

Yılmaz, D. Ç., Seyhan, S.A. (2017). Antioxidant potential of *Cydonia oblonga* Miller leave. *Istanbul Journal of Pharmacy*, 47(1), 9-12.

Yılmaz, K.U., Ercişli, S., Cam, M., Uzun, A., Yılmaztekin, M., Kafkas, E., Pınar, H., (2015). Fruit weight, total phenolics, acidity and sugar content of edible wild pear (*Pyrus elaeagnifolia* Pall.) fruits. *Erwerbs-Obstbau*, 57(4), 179-184.

Zhishen, J., Mengcheng, T., Jianming, W. (1999). The determination of flavonoid contents in mulberry and their scavenging effects on superoxide radicals. *Food Chemistry*, 64(4), 555-559.

Zou, Z., Xi, W., Hu, Y., Nie, C., Zhou, Z. (2016). Antioxidant activity of citrus fruits. *Food Chemistry*, 196, 885-896.

*Diabetesatlas*. (2018). 10 Haziran 2019 tarihinde <https://diabetesatlas.org> adresinden erişildi.

Mamta, K.M., Gurpreet, S.D., Satinder, K.B., Mausam, V. (2019). *Antioxidants*. 21 Mayıs 2019 tarihinde <https://ebrary.net/17945/environment/antioxidants> adresinden erişildi.

*Beslenme ve Diyet*. (2019). 12 Haziran 2019 tarihinde <https://www.medicalpark.com.tr/seker-hastaligi-diyabet-nedir/hg-1703> adresinden erişildi.

## ÖZGEÇMİŞ

04.10.1990 yılında Tekirdağ'ın Çorlu ilçesinde doğdum. İlköğretim, Ortaöğretim ve Lise eğitimimi bulunduğu ilçede tamamladım. 2010 yılında Trakya Üniversitesi Eğitim Fakültesi Fen Bilgisi Öğretmenliği bölümünü kazandım ve 2014 yılında mezun oldum. 2014 yılında Trakya Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Kimya Anabilim Dalında yüksek lisans eğitimime başladım. 2014-2015 eğitim öğretim yılında Trakya Üniversitesi Sağlık Kültür Spor Dairesi Başkanlığı bağlı olarak kısmi zamanlı olarak çalıştım. 2015-2016 eğitim öğretim yılında Tekirdağ'ın Çorlu ilçesinde MEB'de sınıf öğretmeni olarak çalıştım. Aynı zamanda aynı okulun anaokulunda da görev yaptım. Şu anda yüksek lisans eğitimime devam etmekteyim.

## **TEZ ÖĞRENCİSİNE AİT TEZ İLE İLGİLİ BİLİMSEL FAALİYETLER**

Fındıcak G., Selen İşbilir Ş., “In vitro Radical Scavenging Capacity and Total Phenolic Content of Blackthorn Leaves.” 1st Eurasia Biochemical Approaches & Technologies (EBAT) Congress, Side-Antalya, 27-29 Ekim 2018. (Poster Presentations S-148)