



Investigation of Some Bioactive Properties and Antimicrobial Activity of *Olea Europaea* Leaves

Melek Kalkan^{1a,*}, Ashabil Aygan^{1b}, Nazan Çömlekçiöğlü^{1c}, Uğur Çömlekçiöğlü^{1d}

¹Kahramanmaraş Sütçü İmam University, Faculty of Science, Department of Biology, Kahramanmaraş, Türkiye

*Corresponding author

ARTICLE INFO	ABSTRACT
<p><i>Research Article</i></p> <p>Received : 06/12/2022 Accepted : 19/02/2023</p> <p>Keywords: Antimicrobial activity Antioxidant activity <i>Olea europaea</i> Enzyme inhibition Flavonoid</p>	<p><i>O. europaea</i> (olive) plant has a widespread use in many areas such as food, soap, cosmetics, and it is also a medicinal plant known to be used in traditional treatments. In this study, olive tree leaves grown in the central region of Kahramanmaraş were collected in June and their total phenolic, flavonoid contents, antioxidant, enzyme inhibition activities as well as fatty acid components were determined from the extracts obtained with different solvents. In addition, antimicrobial activities of all plant extracts were determined by well-diffusion method and MIC values were determined in microplates. According to the results of GC-MS analysis, 13 different fatty acids belonging to the leaf part of <i>Olea europaea</i> were determined. The main components of fixed oil are oleic acid, linoleic acid, palmitic acid, gamma-linoleic acid, lignoceric acid, stearic acid, myristic acid, palmitoleic acid, trichosanoic acid and nervonic acid. Total phenolic content of plant extracts; 31.72-59.31 mg/g, total flavonoid amounts 4.64-15.98 mg/g, FRAP values 38.93-50.44 µg/g and DPPH values 0.85-1.71 mg/g. On 12 microorganisms tested for antimicrobial effect, <i>O. europaea</i> showed inhibition at different rates.</p>

Türk Tarım – Gıda Bilim ve Teknoloji Dergisi, 11(3): 496-504, 2023

Olea europaea Yapraklarının Bazı Biyoaktif Özelliklerinin Araştırılması, Antimikrobiyal ve Enzim İnhibisyon Etkinliğinin İncelenmesi

MAKALE BİLGİSİ	ÖZ
<p><i>Araştırma Makalesi</i></p> <p>Geliş : 06/12/2022 Kabul : 19/02/2023</p> <p>Anahtar Kelimeler: Antimikrobiyal aktivite Antioksidan aktivite <i>Olea europaea</i> Enzim inhibisyonu Flavonoid</p>	<p><i>Olea europaea</i> (zeytin) bitkisi başta gıda, sabun, kozmetik gibi pek çok alanda yaygın bir kullanıma sahip olup geleneksel tedavilerde de kullanıldığı bilinen ve tıbbi yönü olan bir bitkidir. Bu çalışmada Kahramanmaraş'ın merkez bölgesinde yetişen zeytin ağacı yaprakları haziran ayında toplanmış ve farklı çözücülerle elde edilen ekstraktlarından toplam fenolik, flavonoid içerikleri ile antioksidan, enzim inhibisyon aktivitelerinin yanı sıra yağ asidi bileşenleri belirlenmiştir. Ayrıca tüm bitki ekstraktlarının antimikrobiyal aktiviteleri oyuk agar (well-diffusion) metodu ile ve MIC değerleri mikropalakalarda tespit edilmiştir. GC-MS analiz sonucuna göre <i>O. europaea</i>'nın yaprak kısmına ait 13 farklı yağ asidi belirlenmiştir. Sabit yağın başlıca bileşenlerini oleik asit, linoleik asit, palmitik asit, gama-linoleik asit, lignoserik asit, stearik asit, miristik asit, palmitoleik asit, trikosanoik asit ve nervonik asit oluşturmaktadır. Bitki ekstraktlarının toplam fenolik madde değerleri; 31,72-59,31 mg/g, toplam flavonoid miktarları 4,64-15,98 mg/g, FRAP değerleri 38,93-50,44 µg/g ve DPPH değerleri 0,85-1,71 mg/g olarak tespit edilmiştir. Antimikrobiyal etki açısından test edilen 12 mikroorganizma üzerinde ise <i>O. europaea</i> yaprakları farklı oranlarda inhibisyon göstermiştir.</p>

^a melekkalkan11164@gmail.com

^b <https://orcid.org/0000-0003-1265-9796>

^c noktem80@gmail.com

^d <https://orcid.org/0000-0001-7729-5271>

^e ashabil@ksu.edu.tr

^f <https://orcid.org/0000-0003-4936-9872>

^g cugur1978@gmail.com

^h <https://orcid.org/0000-0001-9093-4496>



Giriş

Hastalıkların tedavi sürecinde birçok medeniyette bitkilerin tedavi amaçlı kullanıldığına ilişkin bilgiler mevcuttur. Günümüzde sentetik ilaçların kullanımından kaynaklı yan etkiler, ekonomik sorunlar gibi pek çok nedenden dolayı bitkisel tedavi giderek popüler duruma gelmiş ve bu konuyla ilgili araştırmalar artmıştır (Sarışen ve Çalışkan, 2005). Şu an temel ihtiyaçların karşılanması dışında bitkisel ürünlerden (sekonder metabolitler) başta ilaç sanayi olmak üzere; kimya, besin, kozmetik ve zirai mücadele gibi çeşitli pek çok alanda faydalanılmaktadır (Arslan ve ark., 2015). Sekonder metabolitlerin, biyotik ve abiyotik faktörlerin sebep olduğu birtakım durumlarda bitkilerin bu faktörlere yanıtı sırasındaki metabolik yollarında görev aldığı bilinirken; UV radyasyon ve oksidanlardan, mikroplardan, virüslerden ve rakip bitkilere karşı sinyal yollarının oluşumundan yani bir çeşit savunma sisteminden de sorumlu olduğu bildirilmektedir (Lattanzio, 2013). Fenolik bileşikler bitkide çok yaygın olarak bulunan, fenolik asitler ve flavonoidler olarak gruplandırılan bileşiklerdir. Flavonoidler bitki dokularında yoğun miktarda bulunan fenoliklerden bir tanesidir. Bitkideki mavi, mor, sarı ve turuncu renklerin oluşumundan sorumludurlar (Khoddami ve ark., 2013). Bugüne kadar bitkilerin yapraklarında, tohumlarında, kabuğunda ve çiçeklerinde yaygın olarak bulunan 4000'den fazla flavonoid tanımlanmıştır (Heim ve ark., 2002). Antioksidanlar ise serbest radikallere karşı vücudu koruyan, oksidasyon oluşumunu baskılayan veya geciktiren bileşenlere denir. Vücudumuzda oksidatif strese maruz kalma sürecinde protein, lipit, DNA ve karbonhidrat temelli moleküllerin zarar görmesini en aza indirirler (Ekici ve Sağdıç, 2008). Antioksidan kapasitenin belirlenmesinde yaygın olarak DPPH yöntemi kullanılmaktadır (Molyneux, 2004).

Geçmişten günümüze kadar var olmuş geleneksel bir bitki olan zeytin ağacı, içeriğindeki fenolik bileşikler sayesinde pek çok hastalığın tedavi edilme sürecinde faydalanılan bir bitki olmuştur. *O. europaea* botanik adlı zeytin ağacı, Oleaceae familyasına dahil olup meyvesi yenen, Akdeniz iklimine özgü bir ağaç türüdür (Aslan ve ark. 2017). Zeytinde bulunan en önemli etken madde meyve ve yapraktaki acı tattan sorumlu bileşik oleuropeindir. Bu bileşiğin antiinflamatuvar, antiviral, antimikrobiyal, antidiyabetik gibi sağlıkta önemli etkileri vardır (Ötleş ve Özyurt, 2012). Oleuropein zeytin yapraklarında en bol bulunan bileşiktir ve bunu sırasıyla hidroksitirozol, luteolin ve apigenin glukozitleri ve verbascoside takip eder. Oleuropein işlenmemiş zeytin ve meyve yapraklarında bolca bulunurken, hidroksitirozol işlenmiş zeytin meyvesi ve zeytinyağında daha çok bulunmaktadır (El ve Karakaya, 2009). Zeytin yaprağındaki fenolik bileşiklerin tümünün antimikrobiyal etkisi ile sadece oleuropein maddesinin antimikrobiyal etkisi karşılaştırıldığında; fenolik bileşiklerin tümünün antimikrobiyal etkisinin daha fazla olduğu bildirilmiştir (Yıldız ve Uylaşer, 2011). Oleuropeince zengin ekstraktların antikanser özellik gösterdiği, toplam lenfosit sayısını artırarak insan periferik bağışıklık yanıtının oluşumunda etkili olduğu da belirtilmektedir (Kaya ve Demir, 2020). Günümüzde terapötik etkilerinden dolayı doğal antioksidan olarak bitkisel kaynaklar da tercih

edilmekte olup zeytin yaprağı da tarihte geleneksel tedavilerin başında gelen halk hekimliğinde; mide, bağırsak hastalıkları, ağız temizleyici, ishal ve idrar yolu enfeksiyonlarında kullanılan bitkisel ürünlerden biri olmuştur (Salık ve Çakmakçı, 2021). Dünyada zeytin ağacı ve zeytin üretiminin yaklaşık olarak %98'i Akdeniz ülkelerinde özellikle İtalya, İspanya, Yunanistan, Türkiye, Tunus, Portekiz ve Fas bu ülkelerin başında gelmektedir. Akdeniz bölgesi dışında ise Arap Yarımadası, Hint Yarımadası ve Asya'da da yetiştirilmektedir (El ve Karakaya, 2009). Anadolu topraklarına bakıldığında ise zeytinin anavatanı Kahramanmaraş, Hatay, Kilis, Gaziantep, Şanlıurfa ve Mardin olduğu tahmin edilmektedir (Gökşen ve Burakay, 2020). Geleneksel tedavilerde zeytin iltihaplı yaraları iyileştirmek için kullanılmakta olup, eklem ağrılarında fayda sağlayacağı düşüncesi ile, zeytinin çekirdeği ile birlikte ezilip burkulan yerin üzerine sarılması kullanılan bir yöntemdir (Sever, 2004). Zeytin yaprağının tüketimi, hipertansiyon, diyare, üriner ve solunum sistemi hastalıkları, karın ve bağırsak hastalıkları, astım, böbrek iltihabı ve safra taşı düşürme gibi pek çok hastalığın tedavi sürecinde de kullanıldığı bildirilmektedir (Akbaş, 2017). Günümüzde ise birçok marka zeytin yaprağı içerikli bitkisel ilaç piyasada hazır preparatlar veya tabletler şeklinde diyabette, hipertansiyonda, kardiyovasküler rahatsızlıklarda, grip, üriner sistem rahatsızlıklarında, kronik halsizlikte, kötü huylu kolesterolün düşürülmesinde, dejeneratif eklem rahatsızlıklarında ve vücutta doğal bağışıklık sisteminin desteklenmesinde kullanılmaktadır. Zeytin yaprağı ekstraktı içeren ürünler antioksidan etkileriyle kozmetik alanında da cilt bakımında kullanılmaktadır (Şahin ve ark., 2011).

Biyoaktif bileşiklerce zengin ve antimikrobiyal aktiviteye sahip olan zeytin bitkisinin sağlık açısından potansiyel faydaları farklı alanlarda kullanılabilirliği açısından bir örnek oluşturmaktadır. Bu çalışmanın amacı; *O. europaea* yapraklarından elde edilen ekstraktların biyoaktif bileşen ve antioksidan aktivitesinin yanı sıra antimikrobiyal aktivitesini araştırmaktır. Ayrıca ekstraktlar GC-MS yardımıyla analiz edilerek, bitki yapraklarının yağ asidi profili incelenmiştir.

Materyal ve Yöntem

Bitki Materyali

Bu çalışmada kullanılan *O. europaea* bitki yaprakları 2021 yılının haziran ayında Kahramanmaraş'ın Onikişubat ilçesinden toplanmıştır. Bitki örnekleri, KSÜ Biyoteknoloji laboratuvarında güneş almayacak şekilde oda sıcaklığında, gölge ve rutubetsiz bir ortamda kurutulmuştur. Kurutulmuş bitkinin yaprakları laboratuvarında bulunan Waring blender ile öğütülerek toz haline getirilmiştir. Ardından deneyde kullanılmak üzere ışık ve nemden korunacak şekilde cam şişelerde saklanmıştır.

Ekstraksiyon Yöntemi

Analizden önce ekstraksiyon hazırlığı Miliauskas ve ark. (2004)'nın yöntemi kısmen modifiye edilerek yapılmıştır. Bunun için 20'şer g tartılan bitki örnekleri üzerine 200 ml olacak şekilde belirlenen çözücüler

(metanol, etanol ve su) eklenip oda sıcaklığında 1 saat Ultrasonik Su Banyosu'nda ekstraksiyon işlemine tabii tutulmuştur. USB sonrası 3500 rpm'de 15 dk. santrifüj edilmiştir. Santrifüj edildikten sonra süpernatant kısım başka bir tüpte toplanmış ve bitki örnekleri iki kez daha aynı şekilde ekstrakte edilmiştir. Üç tekerrür sonunda elde edilen ekstraktlar bir araya getirilerek vakumlu rotary evaporatörde çözücüler uzaklaştırılmış ve böylece kuru ekstraktlar elde edilmiştir. Çözücüsü uçurulmuş bitki ekstraktları analize kadar -20°C'de muhafaza edilmiş ve elde edilen bu ekstraktlardaki toplam fenolik ve flavonoid içerik, enzim inhibitör etkisi, antioksidan aktivite ve antimikrobiyal aktivite tayini gerçekleştirilmiştir.

Bitki Ekstraktlarının Yağ İçeriği ve Yağ Asidi Kompozisyonunun Belirlenmesi

Soksalet yöntemiyle elde edilen sabit yağ içerisindeki yağ asitlerinin analizi GC-MS ile Comlekcioglu (2019)'na göre yapılmıştır. GC-MS analizleri Shimadzu GC 2025 sistemi ile gerçekleştirilmiştir. TRCN-100 (60m × 0,25 mm × 0,20 µm film thickness) SE-54 fused silika kapiler kolon kullanılmıştır. Elektron enerjisi 70 eV'tur. Enjeksiyon miktarı 1 µl'dir. Numunelerin analizi 80°C'de 2 dakika bekletildikten sonra dakikada 5°C artırılıp 140°C sıcaklığa ulaşıldıktan sonra, bu sıcaklıkta 2 dakika tutulmuştur. Bu işlemi takiben, dakikada 3°C'lık bir artışla 240°C'da 5 dakika daha bekletilmiştir. Toplam analiz süresi 61 dakika olarak ayarlanmıştır. Enjeksiyonlar split modda (1:50) 240°C sıcaklıkta gerçekleştirilmiştir ve dedektör sıcaklığı 250°C'dir. Helyum taşıyıcı gaz olarak kullanılıp ve akış hızı 30ml/dk'ya ayarlanmıştır. Kullanılan gaz akışları H₂=40ml/dk ve kuru hava=400 ml/dk olarak belirlenmiştir.

Toplam Fenolik İçeriğin Belirlenmesi

Örneklerin toplam fenolik içeriği Folin Ciaceltaeu Reaktif (FCR) yöntemi kullanılarak (Obanda ve Owuor, 1997)'in prosedürü modifiye edilerek yapılmıştır. Standart olarak gallik asit (Sigma) kullanılmıştır. Hazırlanan solüsyonlar spektrofotometrede (Perkin-Elmer Lambda EZ 150, USA) 750 nm'de okunmuştur. Elde edilen absorbans değerleri gallik asit çözeltileri ile oluşturulan kalibrasyon eğrisi yardımıyla mg gallik asit eşdeğeri (GAE)/g kuru örnek ağırlığı cinsinden verilmiştir.

Toplam Flavonoid İçeriğinin Belirlenmesi

Bitki ekstraktlarındaki toplam flavonoid içeriği Chang ve ark. (2002)'a göre spektrofotometrik olarak belirlenmiştir. Standart solüsyon farklı konsantrasyonlarda (25-200 µg/mL) yukarıdaki prosedüre göre hazırlanan quercetin (Sigma) ile hesaplanmıştır. Absorbans 415 nm'de spektrofotometrede okunmuştur. Elde edilen absorbans değerleri µg quercetin eşdeğeri/g kuru örnek ağırlığına dönüştürülmüştür.

Antioksidan Kapasitenin Belirlenmesi

DPPH Metodu

Antioksidan kapasite (serbest radikallerin indirgenme kapasitesi) Brand-Williams ve ark. (1995) tarafından tanımlanan DPPH metodu modifiye edilerek belirlenmiştir. Her bitki ekstraktından seyreltilerek beş farklı konsantrasyonda solüsyon hazırlanmıştır. Sonuçlar, DPPH serbest radikallerinin %50'sini indirgemek için

gereken konsantrasyon değeri olan IC₅₀ olarak gösterilmiştir. Tüm deneyler üç tekerrürlü olarak yapılmış ve askorbik asit pozitif kontrol olarak kullanılmıştır.

Antioksidan kapasite:

$$\%AA = \frac{(\text{Akontrol} - \text{Örnek})}{\text{Akontrol}} \times 100$$

FRAP Metodu

FRAP yöntemi (Benzie ve Strain, 1996)'a göre yapılmıştır. Bitki ekstraktlarından 50 µl, 2ml'lik ependorf tüplerine aktarılmış ve üzerine 600 µl FRAP ajanı eklenmiştir. Absorbans 593 nm'de ölçülmüştür. Sonuçlar askorbik asit (100-1000 µmol/L) kalibrasyon grafiği kullanılarak µmol askorbik asit eşdeğeri/g kuru bitki ağırlığı olarak hesaplanmıştır. Sonuçlar µmol/g kuru bitki ağırlığı olarak verilmiştir.

In Vitro Enzim İnhibisyon Aktivitesinin Belirlenmesi

Zeytin bitkisi (*Olea europaea*) yapraklarından elde edilen ekstraktın enzim inhibisyon aktivitesi optimum pH ve sıcaklığı 40°C ve 7,6 olan alfa amilaz enzimine karşı test edilmiştir. Metot amilaz aktivitesi sonucu açığa çıkan indirgen şeker miktarının DNS ayracı ile belirlenmesine dayanmaktadır (Miller, 1951). Öncelikle kurutulmuş bitki ekstraktı örnekleri 100 mM fosfat tamponu içerisinde çözülmüştür (16 mg/mL). Enzim üzerine ekstraktların inhibisyon aktivitesi 30 µL enzim ile 20 µL ekstrakt karıştırılarak 15 dk 40°C de ön inkübasyona bırakılarak gerçekleştirilmiştir. Daha sonra, kalan amilolitik aktivite, karışım üzerine 450 µL çözünür nişasta (%1) eklenerek 40°C de 15 dk inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonrası 500 µL 3,5-dinitrosalicilyic asit çözeltisi (Bernfeld, 1955) eklenerek enzim aktivitesi sonlandırılarak 550nm absorbansta Perkin Elmer Lambda EZ 150 spektrofotometrede köre karşı okunmuştur. Bitkisel ekstrakt içermeyen enzim ve substrat karışımı sonucu kontrol olarak (%100) değerlendirilmiştir. Üç tekrar ile elde edilen değerler sonuç olarak alınmıştır.

Antimikrobiyal Aktivitenin Belirlenmesi

Elde edilen yaprak ekstraktların antimikrobiyal aktivitelerinin tayinini Klinik Laboratuvar Standartları Ulusal Komitesi'ne (NCCLS) göre oyuk agar difüzyon metodu ile belirlenmiştir (NCCLS, 1993). Test mikroorganizmaları olarak; *Escherichia coli* ATCC 13846, *Klebsiella pneumonia*, *Bacillus subtilis* ATCC 25922, *S.marcessens** *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, MRSA (Metisilin Dirençli *Staphylococcus aureus*), *Sarcina lutea* ATCC 9341NA, *Acinetobacter sp.**, *Pseudomonas aeruginosa*, *Candida albicans*, *Candida parapsilosis*, *Saccharomyces cerevisiae** olmak üzere klinik izolatlara ve standart suşlar kullanılmıştır. Test mikroorganizmaları 24 saat önceden LB (Luria Bertani) ve Sabouraud dextrose broth besiyerlerine ekilerek 0,5 Mcfarland standart turbiditesine karşılık gelen (1×10⁸ bakteri ve 0,5- 3×10⁴ maya/mL) steril serum fizyolojik ile sulandırılmış kültürlerden 0.1mL alınarak Müeller Hinton Agar ve Sabouraud Dextrose Agara aşılama yapıldıktan sonra petrilere dökülmüştür. DMSO içerisinde çözülmüş (100mg/mL) bitki ekstraktlarından 100µL aseptik olarak açılan oyuklara eklenmiştir. Bu şekilde hazırlanan petrilere 45 dakika kadar buzdolabında bekletildikten sonra, bakteri kültürleri 37°C'de 24 saat, maya aşılama petrilere ise

25°C'de 2 gün inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonunda oluşan inhibisyon zonları mm olarak ölçülmüştür. DMSO (100 µl) çözücü kontrolü olarak kullanılmıştır. Antimikrobiyal aktivite gösteren bitki ekstraktlarının daha sonra farklı konsantrasyonlarda Mueller Hinton Broth ve Sabouraud Dextrose Broth içerisinde MİK (Minimal İnhibisyon Konsantrasyon) değerleri belirlenmiştir Collins ve ark. (1989). MİK değerleri, gözlemlenebilir gelişmeyi/bulanıklığı önleyen mikrop laka kuyucuklarındaki en düşük ekstrakt konsantrasyonu olarak kaydedilmiştir.

Bulgular ve Tartışma

Yağ İçeriği ve Yağ Asidi Kompozisyonuna Ait Sonuçlar

Kahramanmaraş Onikişubat ilçesinden toplanan *O. europaea* yapraklarından elde edilen ekstraktın yağ asidi

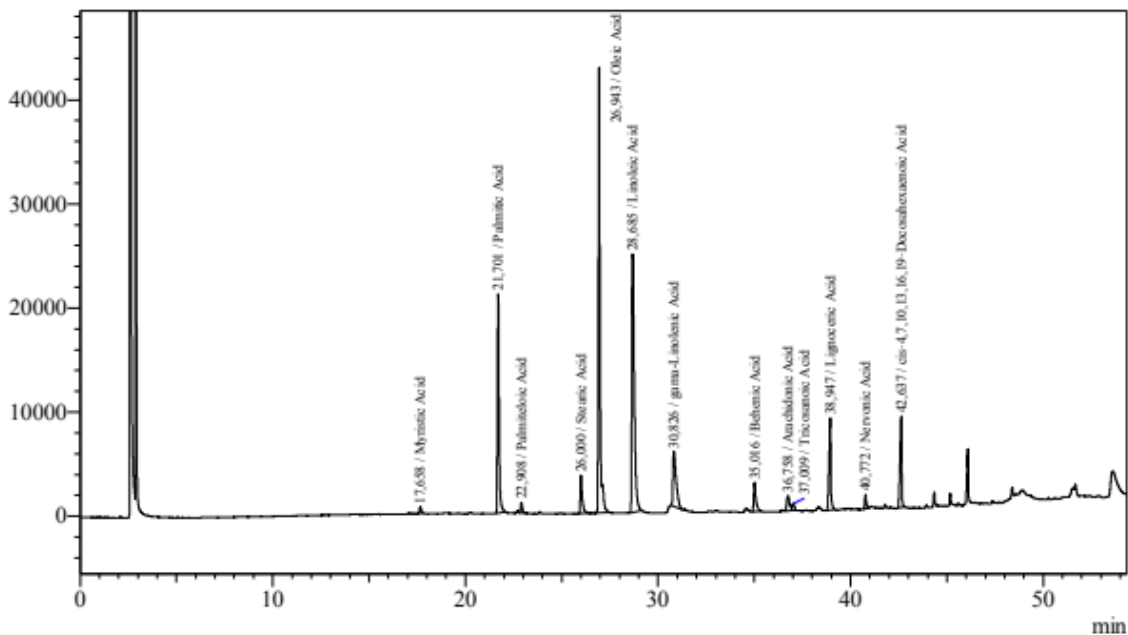
kompozisyonuna ait veriler Çizelge 1.'de, GC-MS kromatogramları ise Şekil 1.'de verilmiştir. Sokslet ekstraksiyonu sonucunda yaprak ekstraktının yağ miktarı %4,45 olarak saptanmıştır.

Ölçüm sonuçlarına göre *O. europaea*'nın yaprak ekstraktında 13 farklı yağ asidi belirlenmiştir. Bu yağ asitlerinin %28,27'sini doymuş yağ asitleri oluştururken, %71,69'luk oranını ise doymamış yağ asitleri oluşturmaktadır. *O. europaea*'nın yaprak ekstraktlarına ait sabit yağın başlıca bileşenlerinin %28,89'unu oleik asit ve %25,84'ünü linoleik asit oluşturmaktadır. Palmitik asit (%14,85), gama-linoleik asit (%7,43), lignoserik asit (%6,50), 4,7,10,13,16,19-Dokosaheksaenoik asit (%6,23) oransal bakımdan yüksek olan diğer önemli yağ asitleridir. Miristik, palmiteloik, trikosanoik asit ve nervonik asit ise %1'in altında kalan yağ asitleri olmuştur. Yağ oranının büyük çoğunluğunu çoklu doymamış yağ asitleri (%34,96) oluşturmaktadır.

Çizelge 1. *O. europaea*'nın yağ asidi kompozisyonu (%)

Table 1. Fatty acid composition of *O. europaea* (%)

Karbon Sayısı	Yağ asidi	İçerik (%)
C14:0	Miristik Asit	0,50 ±0,01
C16:0	Palmitik Asit	14,85±0,01
C18:0	Steraik Asit	3,16 ±0,05
C21:0	Behenik Asit	2,64 ±0,01
C23:0	Trikosanoik Asit	0,62 ±0,01
C24:0	Lignoserik Asit	6,50 ±0,01
Doymuş Yağ Asitleri Toplamı		28,27
C16:1	Palmiteloik Asit	0,68 ±0,01
C18:1	Oleik Asit	28,89 ±0,05
C24:1	Nervonik Asit	0,93 ±0,01
Tekli Doymamış Yağ Asitleri Toplamı		30,50
C18:2	Linoleik Asit	25,84 ±0,05
C18:3	Gama-Linolenik Asit	7,43 ±0,01
C20:4	Araşidonik Asit	1,69 ±0,01
C22:6	cis-4,7,10,13,16,19-Dokosaheksaenoik Asit	6,23 ±0,01
Çoklu Doymamış Yağ Asitleri Toplamı		41,19
Toplam		100,36



Şekil 1. *O. europaea*'ya ait GC-MS kromatogramı

Figure 1. GC-MS chromatogram of *O. europaea*

Çizelge 2. Toplam fenolik ve flavonoid içerik ile antioksidan aktivite değerleri

Table 2. Total phenolic and flavonoid content and antioxidant activity values

	Metanol	Etanol	Su
Fenol (mg GAE g ⁻¹)	59,31 ± 0,21	52,44 ± 0,48	31,72 ± 0,47
Flavonoid (mikrog QE g ⁻¹)	15,98 ± 0,33	9,81 ± 0,22	4,64 ± 0,47
FRAP (µg AAE g ⁻¹)	50,44 ± 0,18	38,93 ± 0,22	49,60 ± 0,86
IC50 Değeri (%DPPH) (mg mL ⁻¹)	0,85 ± 0,21	1,41 ± 0,15	1,71 ± 0,23

Doymamış yağ asitleri insan vücudunda sentezlenemediği için dışardan alınması zorunlu olan esansiyel yağ asitleridir. Bu yağ asitlerinden omega 3 (dokosaheksaenoik asit), omega 6 (linoleik asit, araşidonik asit, gama linolenik asit) ve omega 9'un (oleik asit, palmitoleik asit) beyin gelişiminde, bağışıklık sisteminin güçlenmesinde, koroner kalp hastalıklarının önlenmesinde önemli rolleri olduğu belirtilmekte ve doymamış yağ asitleri bakımından zengin içeriğe sahip gıdaların kullanımı teşvik edilmektedir (Eseceli ve ark. 2006). Ayrıca yalnızca insanlar için değil, yağ asidi içeriği yüksek gıdaların hayvansal gıda olarak da kullanımı teşvik edilmektedir. Örneğin zeytin yaprakları kurutularak koyun ve keçilerde kaba yem olarak kullanıldığında, sütteki yağ asidi profilinin tekli ve çoklu doymamış yağ asitleri olarak özellikle de oleik ve linoleik asit bakımından arttığı belirtilmiştir (Dalkılıç, 2018). Yağ asitlerinin insan sağlığı ve yağ kalitesi üzerinde önemli etkileri vardır, örneğin oleik asitçe zengin bitkisel ürünlerin tüketilmesiyle, kalp ve damar hastalıklarının önlenmesi, yağın kalitesinin artması ve yağın raf ömrünün uzatılması arasında önemli bir ilişki olduğu belirtilmektedir (Duru ve Konuşkan Bozdoğan, 2015).

Omega 3 yağ asidi olan dokosaheksaenoik asit beyin ve gözde sinir hücrelerinin yapısal bir maddesidir bu yağ asidi bebeklerin sinir sisteminin gelişimi için de önemlidir. Anne sütünde önemli miktarda dokosaheksaenoik asit bulunmakta olup, tüm omega 3 yağ asitlerinin kalp krizi sonrası gelişen ani ölümleri azaltarak kalbi koruduğu bildirilmiştir. Zeytin yaprağında bulunan bu yağ asidinin sağlık açısından önemi büyüktür. Zeytinde bulunan bir diğer yağ asidi olan gama linoleik asitin ise kanser hücreleri üzerinde tümörün büyümesini yavaşlatmada yardımcı olabileceği; alerji, egzama ve kronik yorgunluk, kardiyovasküler hastalıklar gibi çeşitli sağlık sorunlarında alternatif tıpta kullanım alanı bulduğu belirtilmektedir (Yeşilbuçuk ve Karaali, 2011). Gama linolenik asit ise bir omega 6 yağ asididir, vücudu dış etkilere karşı muhafaza ederek, esnek ve pürüzsüz bir cilt oluşumuna katkı sağlamaktadır (Aktaş, 2021). Omega-9 yağ asidi olarak bilinen oleik asitin en çok bulunduğu bitkisel kaynaklar %75-82 ile fındık ve %72-74 ile zeytindir (Salar ve Uz, 2021).

10 farklı zeytinyağının yağ asitleri içeriğinin araştırıldığı bir çalışmada majör yağ asidi olarak oleik asitin (%62,43-71,32) bulunduğunu ve bunu takiben linoleik asit (%7,22-11,83) ve palmitik asitlerin (%2,26-12,02) yüksek oranda gözlemlendiğini, laurik asit, miristik asit, palmitoleik asit, stearik asit ve linolenik asitin de içeriğinde bulunan diğer yağ asitleri olduğu belirtilmiştir (Türkoğlu ve Kanık, 2012). Zeytinin hasat zamanının zeytinyağındaki yağ asitleri bileşimine etkisinin araştırıldığı bir çalışmada majör yağ asidi bileşenlerinin; palmitik asit, stearik asit, oleik asit, linoleik asit, linolenik asit olduğu ve önemli minör yağ asidi bileşeni olarak ise palmitoleik asit olduğu bildirilmiştir (Topuz ve ark., 2012). Bizim çalışmamızda ise majör yağ asidi bileşenleri

benzerdir fakat minör yağ asidi bileşeni olarak miristik asit belirlenmiştir. Gündoğdu ve ark. (2016) çalışmalarında yağ asitleri bileşenlerinin olgunluk ilerledikçe değiştiğini bildirmiş ve zeytinin hasat edildiği yılın da yağ asitleri bileşenleri üzerinde önemli etkisi olduğunu belirtmişlerdir. Bu bakımdan yağ asitlerinin dönemsel olarak irdelenmesi sonucunda yağ sentezinin ilk başladığı ağustos ayından son dönem olan Kasım ayına doğru özellikle doymuş yağ asitlerinde düşüş gözlenirken, tekli doymamış yağ asitlerinde yükseliş olduğunu belirtmişlerdir. Bu açıdan bakıldığında pek çok çalışmada aynı bitki için yağ asidi bileşenlerinin çeşitli oranlarda değişmesi literatürdeki bu farklılığı açıklar niteliktedir.

Toplam Fenol, Flavonoid İçerikleri ve Antioksidan Aktivitesine Ait Sonuçlar

Farklı radikaller ve oksidanlar farklı antioksidan tepki mekanizmalarına sahip olduklarından, antioksidan kapasiteyi ölçmenin tek bir yolu yoktur (Dağlı ve ark., 2019). Bu nedenle bu çalışmada, zeytin bitkisinin toplam fenolik ve flavonoid içeriğini karşılaştırmak için metanol, etanol ve su olmak üzere üç farklı çözücü ile ekstraktlar hazırlanmış ve bu ekstraktlara Folin-Ciocalteu ve AlCl₃ deneyleri uygulanmış ve sonuçlar Çizelge 2.'de verilmiştir. Antioksidan aktiviteyi belirlemek için ise DPPH ve FRAP analizleri kullanılmıştır. Ölçüm sonuçlarına göre *O. europaea* bitkisinin fenol miktarlarının 31,72 ile 59,31 mg/g arasında değiştiği belirlenmiştir. Bitkinin flavonoid miktarlarının ise 4,64 ile 15,98 mg/g arasında olduğu görülmüştür. Bu türün bu değerleriyle ilgili olarak literatürdeki diğer çalışmalar incelendiğinde Erdoğan ve ark. (2020), zeytin yaprağının en yüksek fenol miktarını metanollü ekstreden (85,27±15,03 mg GAE) elde ederken en düşük fenolik madde miktarını ise n-hekzan ekstresinden (0,18±1,32 µg GAE/g) elde etmiştir. Bu çalışmadaki fenol değerleri ise Erdoğan ve ark.'a kıyasla daha düşük çıkmıştır. Fenolik bileşiklerin tayininde çözücünün ekstraksiyon verimi üzerine etkisi incelenen bir başka çalışmada ise etanol, metanol, su ve hekzan çözücülerini kullanılmış ve metanol özütünden elde edilen ekstraktta fenolik madde miktarının diğer çözücülere (etanol, hekzan, su) oranla daha yüksek çıktığı belirtilmiştir (Şahin, 2011). Bu çalışmada da benzer şekilde farklı çözücüler (etanol, metanol, su) kullanılmış olup en yüksek fenolik madde miktarının metanolik ekstraktan elde edilmesi, Şahin (2011)'i destekler nitelikte olmuştur. Fenolik madde değeri açısından, literatürdeki bu farklılıklar kullanılan çözücünün kimyasal yapısına, kullanılan konsantrasyona veya hasat zamanına bağlı olarak değişebilmektedir. Pereira ve ark. (2007) yaptıkları çalışmada zeytin bitkisinin su ekstrelerinin HPLC-DAD analizinde 7 fenolik bileşik tanımlamışlardır. Bu bileşiklerin kafeik asit (220,5 ± 23,3 mg/kg), verbascoside (966,1±18,1 mg/kg), oleuropein (26471,4±1760,2 mg/kg), luteolin, 7-O-glukozit (4208,9 ± 97,8 mg/kg), rutin (495,9 ± 12,2 mg/kg), apigenin 7-O-glukozit (2333,1±74,7 mg/kg) ve lutein 4-O- glukozit (1355,9±75,9 mg/kg)

olduğunu bildirmişlerdir. Zeytin yaprağı içerdiği fenolik bileşikler sayesinde pek çok alanda kullanım imkânı bulmaktadır. Kafein içermediği için zeytin yaprağından yapılan çay; hipertansiyon vakalarında kan basıncını düşürmede, koroner damarları açarak kan akışını artırıp kalp atışını düzenlemeye ve vücudun kanserojen ve zararlı kimyasallardan arındırılmasında yardımcı olmaktadır (Toparlak ve Kola, 2022). Ayrıca zeytin yaprağı ekstraktının klasik yöntemlerle toz haline getirilerek soğuk çayda kullanımı sağlanmış ve zeytin yaprağında var olan fenolik bileşiklerin soğuk çaylarda da bulunması hedeflenerek, bitkisel bir artık olan zeytin yaprağının kullanımı değerlendirilmiştir. Bu sayede soğuk çayların fenolik içeriğinin genişletildiği belirtilmektedir (Arslan ve ark., 2021).

Çizelge 2 incelendiğinde, zeytin yaprağı ekstraktlarındaki IC50 değerinin 0,85-1,71 mg/mL arasında değiştiği belirlenmiştir. Antioksidan aktivite değeri ile DPPH analizi kullanılarak hesaplanan IC50 değeri arasında ters bir orantı olduğundan, bu değer düşük olması istenmektedir (Çelik, 2009). Buna göre zeytin bitkisinin su, metanol ve etanol ekstraktları arasında en yüksek aktivite sonucu 0,85 mg/mL ile metanol özütünden elde edilmiştir. Geleneksel kurutma yöntemlerinden farklı olarak mikrodalga ile kurutulan zeytin yapraklarının antioksidan içeriğinin daha yüksek olduğunu belirten bir çalışmada 19 farklı çözücü kullanılmış olup en yüksek DPPH radikali yakalama aktivitesinin %3,24 ile %33,33 arasında değişim gösterdiğini belirtmişlerdir (Karakulak, 2009). Bizim çalışmamızda ise farklı kurutma yöntemleri kullanılmamış olup ultrasonik yöntemle elde edilen zeytin yaprağı ekstraktlarından 0,85-1,71 mg/mL arasında değişen değerlerde yüksek bir antioksidan aktivite elde edilmiştir. Bir başka çalışmada ise Hatay'ın farklı bölgelerinde yetişen zeytin ağacı yapraklarının metanollü ekstraktlarının antioksidan özelliği DPPH ve FRAP yöntemleriyle test edilmiş ve sonuçlar standart antioksidanlar ile kıyaslanmıştır. Uygulanan tüm yöntemlerde zeytin yaprağının yüksek antioksidan aktivite gösterdiğini tespit etmişlerdir (Danahaliolu ve ark., 2018). Antioksidan özelliğinden dolayı zeytin yaprağı ekstraktı ilave edilen yağların DPPH radikal süpürücü aktivitesin %86 oranında arttığı literatürde belirtilmektedir (Salta ve ark., 2007).

***In vitro* Enzim Deneyine İlişkin Bulgular ve Sonuçların Değerlendirilmesi**

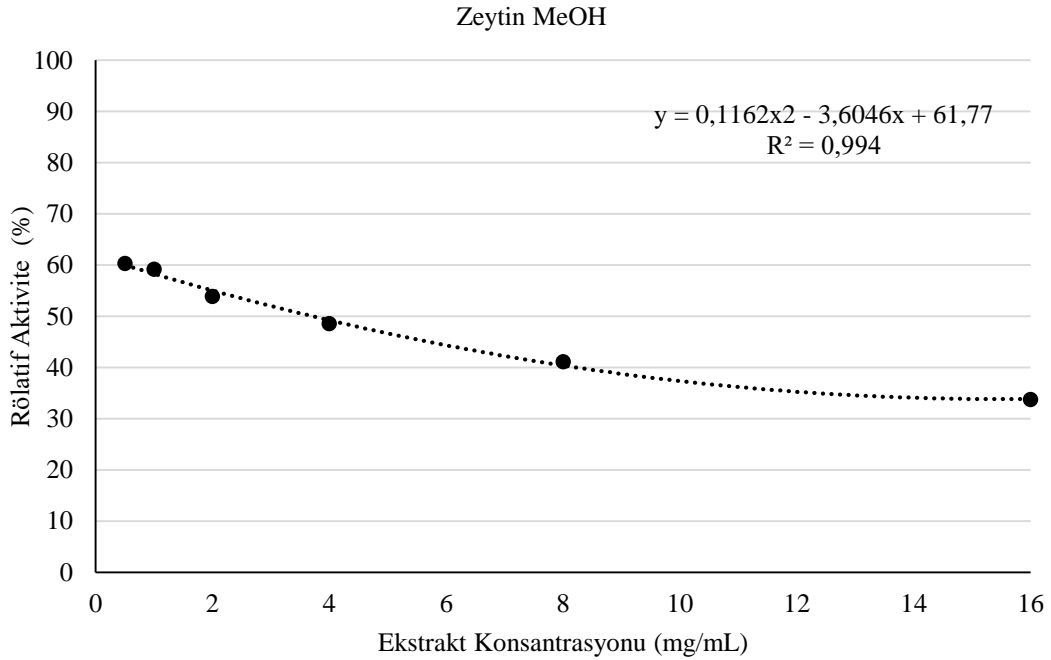
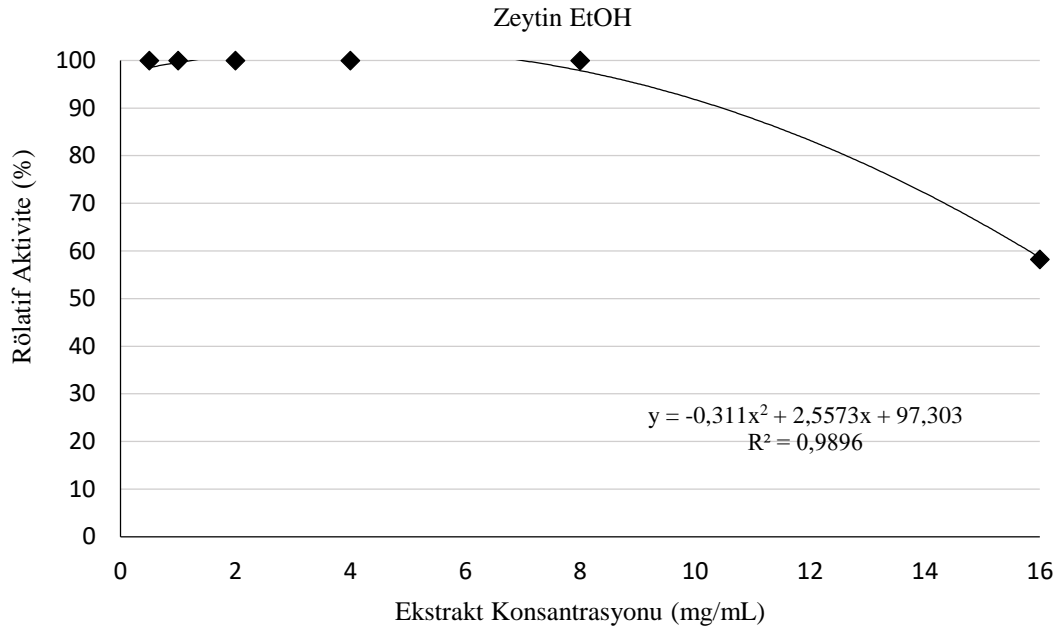
O. europaea'ya ait etanol ve metanol özütlerinin enzim inhibisyon aktivitesi optimum pH ve sıcaklığı 7,6 ve 40°C olan alfa amilaz enzimine karşı test edilmiş ve aşağıdaki sonuçlar elde edilmiştir. Buna göre *O. europaea* yapraklarının etanol ekstraktları 8 mg/mL konsantrasyona kadar bir inhibisyon etkisi göstermezken 16 mg/mL konsantrasyonda %40 oranında bir aktivite kaybı oluşturmuştur. Buna karşın metanol ekstraktları ise 0,5mg/mL konsantrasyonda %40 lık bir inhibisyon gösterirken 16 mg/mL lik konsantrasyonda aktivite kaybı %60'a varmıştır (Şekil 2). Bu inhibisyon değerleri bu ekstraktların gıda, yem teknolojisinde ile bitkisel gıda destek veya tıbbi amaçlı kullanımlarında ekstraksiyon işleminde çözücü tercihinde dikkat edilmesi gerektiğini göstermektedir.

Biyoaktif metabolitleri içeren bitkisel preparatlar dünya genelinde yaygın olarak kullanılmaktadır. Bunların çoğu kolayca ulaşılabilir doğal ürünlerdir, ancak canlı organizmalar üzerindeki etkileri tam olarak incelenip açıklığa kavuşturulamamıştır. Enzimler protein tabiatlarından dolayı çoğu ilaç veya preparatların moleküler hedefi olmaktadır (Copeland, 2013). Bu potansiyel doğal bitkisel ürünler ve biyolojik rollerinin belirlenmesi için başta enzim inhibisyonu gibi etkilerin tanımlanması önemlidir.

Antimikrobiyal Aktiviteye ait Sonuçlar

O. europaea'nın antimikrobiyal aktivite tayini için 12 mikroorganizma üzerinde incelemeler yapıldı elde edilen sonuçlar Çizelge 3'te verilmiştir. *O. europaea*'ya ait bitki özütlerinin farklı çözücülerdeki antimikrobiyal etkinliği incelendiğinde test mikroorganizmaları üzerinde farklı oranlarda bir antimikrobiyal etkinlik gösterdiği görülmüştür. Çözücü tipi olarak ele alındığında inhibisyon zonu açısından birbirine yakın antimikrobiyal etkinlik göstermektedir. Gram pozitif bakteriler üzerindeki en yüksek inhibisyon zonu *S. marcescens* üzerine etanol ve metanol özütleri ile elde edilmiştir. Gram negatif bakterilerde ise *Acinetobacter* üzerinde görülmüştür. Mayalar üzerinde ise etanol özütü ile *S. cerevisiae* üzerinde elde edilmiştir. Klinik izolatlar açısından antimikrobiyal etkinlik değerlendirildiğinde ise tüm test bakterileri üzerinde bir inhibisyon zonu görülürken tüm çözücüler ile *Acinetobacter*'de en yüksek inhibisyon elde edilmiştir. Yapılan MİK çalışması sonucunda 25 mg/mL ile en etkin mayalardan klinik izolatlar üzerinde en iyi sonuçlar elde edilmiştir.

Bu çalışmanın sonuçlarına benzer şekilde Pereira ve ark. (2007) zeytin yaprağı su ekstraktlarının *B. cereus*, *B. subtilis*, *S. aureus*, *P. aeruginosa*, *E. coli*, *K. pneumonia*, *C. albicans*, *C. parapsilosis*'e karşı çok küçük konsantrasyonlarda bile zeytin yaprağı ekstraktının antimikrobiyal etki gösterdiğini bildirmekte idiler. Aynı şekilde Markın ve ark. (2003) da su ekstraktları ile gerçekleştirdikleri çalışmada *E. coli*, *P. aeruginosa*, *S. aureus*, *B. subtilis*, *K. pneumoniae* ve *C. albicans* üzerine bir antimikrobiyal etkinlik tespit etmişlerdir. Sudjana ve ark. (2009) ise yaptıkları çalışmada ise zeytin yaprağı ekstraktının birçok mikroorganizmaya karşı antimikrobiyal etkinliğini test etmişler ve çalışmamızda kullanılan test mikroorganizmalarından çoğunu içeren mikroorganizmalar üzerine bir antimikrobiyal etkinliği gözlemlenmişlerdir. Ancak Korukluoğlu ve ark. (2010) bizim çalışmamızdan farklı olarak su ekstraktlarında *S. aureus*, *E. coli*, *P. aeruginosa*, *K. pneumoniae* ve diğer birçok mikroorganizma üzerine bir antimikrobiyal aktivite gözlemlenmezken; etanol ve diğer organik çözücüler ile elde ettikleri ekstraktlarda bizim sonuçlarımıza benzer etkinlik elde etmişlerdir. Sonuç olarak zeytin yaprağının çalşılan tüm mikroorganizmalarda antimikrobiyal etkinliği gözlemlenmiştir. Ülkemizde hastane enfeksiyon etkenleri içinde, gram-negatif bakteriler ön sırada gelmektedir. Bu bakterilerden başlıcaları ise *P. aeruginosa*, *K. pneumoniae*, *E. coli* ve *S. aureus*'tur (Karahocagil ve ark., 2011). Çalışmamızda test edilen bu mikroorganizmalarda zeytin yaprağının antimikrobiyal etkinliği gözlemlenmiştir.



Şekil 2. Zeytin (*O. europaea*) bitkisinin metanol ve etanol özütüne ilişkin sonuçlar (µg/ml)
Figure 2. Results of methanol and ethanol extract of olive (*O. europaea*) plant (µg/ml)

Çizelge 3. *O. europaea* (zeytin yaprağı) ekstraktının antimikrobiyal aktivite sonucu
Table 3. Antimicrobial activity result of *O. europaea* (olive leaf) extract

Mikroorganizma	EtOH/MİK	MeOH/MİK	Su/MİK	Gn	Nys
B.subtilis ATCC 25922	13±1,5/100	13±1,5/100	13±1,5/50	25	TE
S.lutea ATCC 9341NA	11±0,7/50	11±1,1/50	11±0,5/50	10	TE
S.aureus ATCC 25923	14±1,1/50	15±1,5/50	12±1,1/50	25	TE
MRSA*	13±0,5/50	13±1,0/100	10±1,0/50	25	TE
S.marcescens*	16±1,7/50	19±1,7/50	13±0,5/50	27	TE
E.coli ATCC 13846	11±1,1/100	11±1,1/100	15±0,5/50	10	TE
Acinetobacter sp.*	17±1,7/50	17±1,0/25	16±1,0/50	25	TE
K.pneumoniae *	9±1,1/25	9±1,0/50	15±1,5/50	20	TE
Pseudomonas aeruginosa*	11±1,5/25	12±0,5/50	15±1,5/25	25	TE
C.albicans*	11±1,7/25	11±1,7/25	11±1,7/25	TE	18
C.parapsilosis*	11±1,1/25	11±1,0/25	11±1,0/25	TE	18
S.cerevisiae	14±1,1/100	11±1,1/100	12±1,5/100	TE	30

(MİK: *: Klinik izolat, TE: Test edilmedi Gn:Gentamisin (10 µg), Nys:Nistatin (100U)

Klinik izolatlardan *K. pneumoniae* ve MRSA hastane ortamında çeşitli enfeksiyonlara sebep olurken zeytin bitkisinin bu bakterilere karşı antimikrobiyal etkinliğinin yüksek olması önemli bir sonuç teşkil etmektedir. Bitkilerde bulunan fenolik bileşiklerin bakterilerdeki hücre zarına veya peptidoglikan yapıya penetre olarak bu yapıları zarara uğratabildiği bilinmektedir. Fenolik bileşiklerin başka moleküllerle oluşturduğu kombinasyonlarla hücrede toksik bir etki yaratabildiği ve bu toksik etkinin ise antioksidan özellikten kaynaklandığı belirtilmektedir (Erdoğan ve Everest, 2013). Zeytin yaprağında bulunan fenolik bileşik oleuropein ise hücrede nitrik oksit seviyesini yükselterek patojen mikroorganizmalara karşı sitotoksik bir etki göstermekte ve bu etkinin bakteriyel enfeksiyonlara karşı koruyucu bir potansiyeli olduğu belirtilmektedir (Bisignano ve ark., 1999).

Sonuç

Kahramanmaraş'ta yetişen zeytin ağacı yapraklarının biyoaktif bileşenlerinin araştırıldığı bu çalışmada zeytin yaprağının yüksek miktarda fenolik bileşik ve antioksidan madde içerdiği tespit edilmiştir. Fitokimyasal bileşenlerin bitkilerdeki antioksidan kapasiteden sorumlu olduğu bilinmektedir. Bu bakımdan zeytin yapraklarının sağlık açısından faydası, bu çalışma ile desteklenmektedir. Ayrıca katkı maddesi olarak gıda sektöründe, kozmetikte ve doğal antioksidan kaynağı olarak kullanılabilirlik açısından önemli bir kaynaktır. Öte yandan oleik ve linoleik gibi doymamış yağ asitleri açısından zengin olması zeytin yaprağının değerini arttırmaktadır. Bu yağ asitlerinin damar sertliğini geriletme, kanser riskini azaltma veya sinir sistemindeki yararlı etkinlikleri, yaprakların tıbbi değerini ön plana çıkarmaktadır. Zeytin yapraklarının gram pozitif ve gram negatif bakterilerin yanında enfeksiyon riski taşıyan bakterilere karşı da antimikrobiyal etkinliğinin olması diyet olarak tüketiminde kullanılabilirliği açısından önemlidir. Bu bakımdan bakıldığında bitkisel kaynaklarımızdan zeytin yapraklarının kullanımı hem insan sağlığına olumlu etkileri hem de kullanım alanları bakımından ülke ekonomisine katkı sağlayacaktır. Yine de daha fazla araştırma yapılması ve farklı mikroorganizmalar üzerinde de test edilmesine ihtiyaç vardır.

Kaynaklar

Akbaş Ü. 2017. Farklı Çeşit Zeytin Yapraklarının Fenolik Bileşen, Antioksidan Aktivite ve Mineral İçeriği Üzerine Kurutmanın Etkisi. Yüksek Lisans Tezi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Selçuk Üniversitesi. Konya.

Aktaş İ. 2021. Omega Yağ Asitlerinin İnsan Sağlığı Açısından Önemi. Sayfa 56. ISBN: 978-625-7562-82-9

Arslan AKK, Öztürk E, Yerer MB, Koşar M. 2017. Zeytin Yaprakındaki Oleuropein ve Farmakolojik Etkileri. Sağlık Bilimleri Dergisi, 26(1): 89-93.

Arslan EE, Karademir G, Berktaş S, Çam M. 2021. Zeytin Yaprakı Ekstraktı İçeren Soğuk Çay Üretimi. Mühendislik Bilimleri ve Tasarım Dergisi, 9(3): 843-849.

Arslan N, Baydar H, Kızıl S, Karık Ü, Şekeroğlu, N, Gümüşçü A. 2015. Tıbbi Aromatik Bitkiler Üretiminde Değişimler ve Yeni Arayışlar. Türkiye Ziraat Mühendisliği VIII. Teknik Kongresi, 12, 16.

Benzie IF, Strain JJ. 1996. The Ferric Reducing Ability of Plasma (FRAP) As a Measure of "Antioxidant Power": The FRAP Assay. Analytical Biochemistry, 239(1): 70-76.

Bernfeld P. 1955. Amylases, α and β . Methods in Enzymology. 1: 149-158.

Bisignano G, Tomaino A, Cascio RL, Crisafi G, Uccella N, Saija A. 1999. On The In-Vitro Antimicrobial Activity of Oleuropein and Hydroxytyrosol. Journal of Pharmacy and Pharmacology, 51(8): 971-974.

Brand-Williams W, Cuvelier ME, Berset CLWT. 1995. Use of a Free Radical Method to Evaluate Antioxidant Activity. LWT-Food Science and Technology, 28(1): 25-30.

Comlekcioglu N. 2019. Bioactive Compounds and Antioxidant Activity in Leaves of Endemic and Native *Isatis* spp in Turkey. Braz Arch Biol Technol, 62: 1-13.

Collins CH, Lyne PM, Grange JM. 1989. Collins and Lyne's Microbiological Methods, Sixth Edition, Butterworths Co. Ltd. London.

Copeland RA. 2013. Evaluation of Enzyme Inhibitors In Drug Discovery: A Guide for Medicinal Chemists and Pharmacologists. John Wiley and Sons.

Chang CC, Yang MH, Wen HM, Chern JC. 2002. Estimation of Total Flavonoid Content In Propolis By Two Complementary Colorimetric Methods. J Food Drug Anal 10(3):178-182.

Çelik F. 2009. Kızılcıgın (*Cornus Mas L.*) Ekstraksiyonu ve Antioksidan Bileşenlerinin Belirlenmesi. Doktora tez çalışması. Fen Bilimleri Enstitüsü, Selçuk Üniversitesi, Konya, Türkiye

Dağlı F, Çömlekcioglu N, Aygan A. 2019. *Cornus mas L.* Yapraklarının Antioksidan Kapasitesi ve Bazı Fitokimyasal Özellikleri. III. International Mediterranean Forest and Environment Symposium. 3-5 October 2019, Kahramanmaraş, Türkiye.

Dalkılıç B. 2018. Zeytinyağı Endüstrisi Yan Ürünlerinin Hayvan Besleme Alanında Değerlendirilme Olanakları. El-Cezeri, 5(3): 917-926.

Duru S, Konuşkan Bozdoğan D. 2015. Bitkisel Yağlarda Oleik Asit Miktarının Arttırılması ve Yağ Kalitesi Üzerine Etkileri. Gıda, 39(6): 379-385.

Ekici L, Sağdıç O. 2008. Serbest Radikaller ve Antioksidan Gıdalarla İnhibisyonu. Gıda, 33(5): 251-260.

El SN, Karakaya S. 2009. Olive Tree (*Olea Europaea*) Leaves: Potential Beneficial Effects on Human Health. Nutrition Reviews, 67(11): 632-638

Erdoğan AE, Everest A. 2013. Antimikrobiyal Ajan Olarak Bitki Bileşenleri. Türk Bilimsel Derlemeler Dergisi, (2): 27-32.

Erdoğan S, Akkol EK, Avcı G. 2020. Research On the Antioxidant Efficiency of Olive (*Olea Europaea L.*) Leaf Using By In Vitro Methods. Kocatepe Veterinary Journal, 13(3): 319-326.

Eseceli H, Değirmencioglu A, Kahraman R. 2006. Omega Yağ Asitlerinin İnsan Sağlığı Yönünden Önemi. Türkiye, 9: 403-406.

Gündoğdu MA, Şeker M. 2012. Bazı Yabancı Kökenli Zeytin Çeşitlerinden Elde Edilen Zeytinyağlarının Yağ Asidi Bileşiminin Olgunlaşma Süresince Değişimi. Zeytin Bilimi, 3(1): 19-28. Retrieved from <https://dergipark.org.tr/tr/pub/zeytin/issue/28965/309889>

Gündoğdu MA, Kaleci N, Nergis O, Doğan E. 2016. Farklı Zaman Periyotlarında Hasat Edilen Bazı Yabancı Kökenli Zeytin Çeşitlerinin Pomolojik ve Bazı Biyokimyasal Karakterlerindeki Değişimlerin Saptanması. Zeytin Bilimi, 6(2): 61-67.

Gökşen C, Burkay AO. 2020. Kilis Halk Kültüründe Zeytin. Uluslararası Türkçe Edebiyat Kültür Eğitim (TEKE) Dergisi, 9(1): 205-224.

Heim KE, Tagliaferro AR, Bobilya DJ. 2002. Flavonoid Antioxidants: Chemistry, Metabolism and Structure-Activity Relationships. The Journal of Nutritional Biochemistry, 13(10):572-584.

Karahocagil MK, Yaman G, Göktaş U, Sünnetçioğlu M, Çıkman A, Bilici A, Akdeniz H. 2011. Hastane Enfeksiyon Etkenlerinin ve Direnç Profillerinin Belirlenmesi. Van Tıp Dergisi: 18 (1):27-32, 2011

- Karakulak Ş. 2009. Zeytin Yapraklarından Antioksidan Eldesinde, Etüv ve Mikrodalga ile Kurutmanın, Çözücü, Sıcaklık ve Zaman Parametreleri Üzerine Etkisinin İncelenmesi. Yüksek Lisans Tezi, Fen Bilimleri Enstitüsü, İstanbul Teknik Üniversitesi, İstanbul, Türkiye.
- Kaya S, Demir N. 2020. Zeytin (Olea Europaea) Yapağı Ekstraktlarının Model Organizma *Galleria Mellonella* Hemosit ve Hemosit Aracılı Bağışıklık Tepkileri Üzerine Etkileri. Türk Tarım ve Doğa Bilimleri Dergisi, 7(3): 646-653
- Korukluoğlu M, Şahan Y, Yiğit A, Tümay Özer E, Gücer Ş. 2010. Antibacterial Activity and Chemical Constitutions of Olea Europaea L. Leaf Extracts. Journal of Food Processing and Preservation, (34): 383-396.
- Khoddami A, Wilkes MA, Roberts TH. 2013. Techniques for Analysis of Plant Phenolic Compounds. Molecules, 18(2): 2328-2375.
- Lattanzio V. 2013. Phenolic Compounds: Introduction 50. Nat. Prod., 1543-1580.
- Markin D, Duek L, Berdicevsky I. 2003. In Vitro Antimicrobial Activity of Olive Leaves. Mycoses, 46: 132-136.
- Miller GL. 1959. Use of Dinitrosalicylic Acid Reagent for Determination of Reducing Sugar. Analytical Chemistry, 31(3): 426-428.
- Miliauskas G, Venskutonis PR, Van Beek TA. 2004. Screening of Radical Scavenging Activity of Some Medicinal and Aromatic Plants Extracts. Food Chemistry, 85(2): 231-237.
- Molyneux P. 2004. The Use of The Stable Free Radical Diphenylpicrylhydrazyl (DPPH) for Estimating Antioxidant Activity. Songklanakarin J.Sci.Technol, 26(2): 211-219
- Obanda M, Owuor PO, Taylor SJ. 1997. Flavanol Composition and Caffeine Content of Green Leaf as Quality Potential Indicators of Kenyan Black Teas. Journal of the Science of Food and Agriculture, 74(2): 209-215.
- Ötleş S, Özyurt VH. 2012. Oleuropein ve Önemi. Zeytin Bilimi, 3(1): 59-71.
- Pereira AP, Ferreira IC, Marcelino F, Valenteo P, Andrade PB, Seabra R, Pereira JA. 2007. Phenolic Compounds and Antimicrobial Activity of Olive (*Olea europaea* L. Cv. Cobrançosa) Leaves. Molecules, 12(5): 1153-1162.
- Sarışen Ö, Çalışkan D. 2005. Fitoterapi: Bitkilerle Tedaviye Dikkat! Sted, 14(8): 182-187.
- Salık MA, Çakmakçı S. 2021. Zeytin (*Olea europaea* L.) Yapağının Fonksiyonel Özellikleri ve Gıdalarda Kullanım Potansiyeli. Gıda, 46(6): 1481-1493.
- Salar B, Uz A. 2021. Omega Yağ Asitleri: Biyolojik Etkileri ve Bitkisel Kaynakları. Hacettepe University Journal of the Faculty of Pharmacy, 41(3): 194-209.
- Salta FN, Mylona A, Chiou A, Boskou G, Andrikopoulos NK. 2007. Oxidative Stability of Edible Vegetable Oils Enriched In Polyphenols with Olive Leaf Extract. Food Sci Technol Int, 13(6): 413-42.
- Sever M. 2004. Türk Halk İnançlarında ve Halk Hekimliği Uygulamalarında Meyve. Türklük Bilimi Araştırmaları, (16).
- Sudjana AN, D'Orazio C, Ryan V, Rasool N, Ng J, Islam N, Hammer KA. (2009). Antimicrobial Activity of Commercial Olea Europaea (Olive) Leaf Extract. International Journal of Antimicrobial Agents, 33(5): 461-463.
- Şahin S. 2011. Zeytin Ağacı Yapraklarından Süperkritik-CO2 ile Ekstrakt Eldesi ve Bileşimindeki Oleuropein Miktarının İncelenmesi. Doktora tezi çalışması. Fen Bilimleri Enstitüsü, İstanbul Üniversitesi, İstanbul, Türkiye
- Şahin S, Bilgin M, Dramur, MU. 2011. Investigation of Oleuropein Content In Olive Leaf Extract Obtained by Supercritical Fluid Extraction and Soxhlet Methods. Separation Science and Technology, 46(11): 1829-1837.
- Şahin Yeşilçubuk N, Karaali A. 2011. Gamma-Linolenik Asit ile Zenginleştirilmiş Anne Sütü Yağına Benzer Yapılandırılmış Yağların Üretimi. İtüdergisi/D, 7(4).
- Yıldız G, Uylaşer V. 2011. Doğal Bir Antimikrobiyel: Oleuropein. Uludağ Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi, 25(1): 131-142.
- Toparlak E, Kola O. 2022. Zeytin Yapağı, Pirina ve Karasuyu Gıda ve Yem Sektörlerinde Değerlendirme Çalışmaları. Gıda ve Yem Bilimi Teknolojisi Dergisi, (28): 1-17.
- Topuz H, Meriç Ş, Bozkurt G, Durmuşoğlu E. Ayvalık, Memecik ve Erkence Zeytin Çeşitlerinde Hasat Zamanı ve Zeytin Sineği Zararının, Zeytinyağı Yağ Asitleri Bileşimi Üzerine Etkisi. Zeytin Bilimi, 3(2): 107-113.
- Türkoğlu H, Kanık Z. 2012. Nizip ve Çevresinde Satışa Sunulan Zeytinyağı Örneklerinin Bazı Özellikleri. Harran Tarım ve Gıda Bilimleri Dergisi, 16(3): 1-8.