

## ***Morus alba'* nın Meyve ve Yaprak Ekstrelerinin Antioksidan Kapasitelerinin Belirlenmesi**

\*Semra TÜRKÖĞLU<sup>1</sup>, Sait ÇELİK<sup>2</sup>, Serhat KESER<sup>3</sup>, İsmail TÜRKÖĞLU<sup>4</sup>, Ökkeş YILMAZ<sup>5</sup>

**1:**Tunceli Üniversitesi, Mühendislik Fakültesi, Gıda Mühendisliği Bölümü 62000-Tunceli/Türkiye. **2:** Uşak Üniversitesi, Fen Edebiyat Fakültesi 64000-Uşak/Türkiye. **3:** Fırat Üniversitesi, Fen Fakültesi, Kimya Bölümü 23119-Elazığ/Türkiye. **4:** Fırat Üniversitesi, Eğitim Fakültesi, Biyoloji Eğitimi Bölümü 23119-Elazığ/Türkiye. **5:** Fırat Üniversitesi, Fen Fakültesi, Biyoloji Bölümü 23119-Elazığ/Türkiye.

\*smrturkoglu@hotmail.com

(Geliş/Received: 17.01.2014; Kabul/Accepted: 05.03.2014)

### **Özet**

Bu çalışmada Elazığ'dan toplanan *Morus alba'* nın antioksidan ve antiradikal kapasitesi incelendi. Bitkinin yaprakları ve meyveleri gölgede kurutularak ayrı ayrı su ve etanol ekstraktları hazırlandı. Ekstreler soksilet cihazı ile yapıldı. Bu ekstraktların antioksidan ve antiradikal testleri, toplam antioksidan kapasite, indirgeme gücü kapasitesi, metal şelatlama aktivitesi, DPPH' serbest radikali giderme aktivitesi, ABTS<sup>+</sup> radikali giderme aktivitesi, süperoksit anyon radikalleri giderme aktivitesi, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> giderme aktivitesi ve FRAP testi gibi farklı antioksidan metotlar ve ek olarak toplam fenolik bileşik miktarı tayini kullanılarak farklı konsantrasyonlarda ayrı ayrı belirlendi. Elde edilen sonuçlara bakıldığında dutun yapraklarının ve meyvelerinin iyi bir serbest radikal gidericisi olduğu ve doğal bir antioksidan olarak kullanılabilceği bulundu.

**Anahtar Kelimeler:** *Morus alba*, antioksidan kapasite, antiradikal.

## **Determination of the Antioxidant Capacities of Extracts Fruit and Leave of *Morus alba***

### **Abstract**

In this study *Morus alba* investigated the antioxidant and antiradical capacity that it was collected from Elazığ. Leaves and fruits of plants dried in shade, water and ethanol extracts were prepared separately. The extracts were made with Soxhlet apparatus. These extracts, antioxidant and antiradical tests, different antioxidant methods such as total antioxidant capacity, reducing power capacity, metal chelating activity, DPPH• free radical scavenging activity, ABTS•+ radical scavenging activity, superoxide anion radicals scavenging activity, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> scavenging activity and FRAP test and in addition to by using the amount of the total phenolic compounds determined separately at different concentrations. Looking at the results obtained, leaves and the fruits of mulberry found as a good free radical scavenging and was used as a natural antioxidant.

**Keyword:** *Morus alba*, antioxidant capacity, antiradical.

### **1. Giriş**

Antioksidan madde bakımından zengin olan sebze ve meyvelerin tüketilmesi reaktif oksijen türlerinin neden olduğu doku hasarına bağlı hastalıklardan insanları korumaktadır [1]. Diğer taraftan işlenmiş gıdaların bozunmasını önlediği ve raf ömrünü uzattığı için sentetik antioksidanlar gıdalarda katkı maddesi olarak kullanılmaktadır.

Türkiye'de dut ağaçları sayısı bakımından Erzincan ilk sırada yer alırken bu ili sırasıyla Elazığ, Ankara, Malatya ve Tunceli izlemektedir [2]. Ak Dut yaprakları antibakteriyel, kan

düşürücü, ateş düşürücü, terletici özelliğe sahiptir. Taze yapraklar kanamaları durdurmak için kullanılabilir. Meyveleri baş dönmesi, kulak çınlaması, uykusuzluk, böbrek iltihabı, hipertansiyon, sinir zayıflığı, saçların erken beyazlaması tedavilerinde, gövdesi romatizma ağrıları, spazm tedavisinde, kök kabukları astım, akciğer iltihabı, öksürük, bronşit, ödem, hipertansiyon tedavisinde kullanılabilir [3,4,5]. Bunun yanında kök kabukları tansiyon düşürücü olarak kullanılır. Ayrıca dut ağacının kök kabukları, yaprakları ve meyveleri şeker hastalığı tedavisinde kullanılır [6].

Yine dut meyvesi romatoid artrit (romatizmal eklem iltihabı) de dahil olmak üzere çeşitli iltihabi durumların tedavisinde geleneksel olarak kullanılmaktadır. Kim ve arkadaşlarının [7] yaptıkları çalışmada, carrageenanla oluşturulan deneysel artritde, dut meyvesi özütü uygulaması iltihap parametreleri ile romatoid faktörlerde önemli bir azalma belirlenmiştir. Dutun antidiyabetik etkileri ise çok daha iyi çalışılmıştır [8]. Dut yaprakları, alfa glikozidaz denilen barsak enzimlerini inhibe ettikleri için hipoglisemik etki gösterirler. Bu enzimlerin görevi sukroz, maltoz ve laktoz gibi disakaritleri (çifte şekerleri) glikoz, fruktoz ve galaktoz gibi monosakaritlere parçalayarak onların barsaktan kana geçişini sağlamaktır. Baskılanan enzim aktivitesi ile enzimlerin kana geçişi engellenmiş olur. Japon araştırmacıların ratlarda yaptıkları bu çalışmalarda, hayvanları karbonhidratça zengin yemekle beslemeden evvel dut yaprağı özütü yedirilmenin normal postprandial (yemek sonrası) kan şekeri düzeyinde önemli bir düşüşe yol açtığı gösterilmiştir [9].

Bu çalışmada *M. alba*'nın toplam antioksidan kapasite, indirgeme gücü kapasitesi, metal şelatlama aktivitesi, FRAP testi, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> giderme aktivitesi gibi farklı yöntemlerle antioksidan kapasitesinin incelenmesi ve DPPH<sup>•</sup> serbest radikali giderme aktivitesi, ABTS<sup>•+</sup> radikali giderme aktivitesi, süperoksit anyon radikalleri giderme aktivitesi gibi antiradikal aktivite belirleme testleriyle serbest radikallere karşı nasıl bir temizleyici etki gösterdiğinin belirlenmesi amaçlanmıştır.

## 2. Materyal ve Metot

Bu çalışmada ilk olarak *M. alba* (MA) bitkileri, Elazığ'dan arazi çalışmalarıyla toplandı ve yaprak, ham meyve ve meyvelerinin su ve etanol ekstraları elde edilerek, bu ekstraların toplam antioksidan aktiviteleri 9 farklı metotla belirlendi. Toplam antioksidan aktivite belirleme testleri UV-Vis Spektrofotometresi kullanılarak yapıldı.

### 2.1. Toplam Antioksidan Aktivite Tayini

Ekstrelerin antioksidan aktiviteleri tiyosiyanat metoduna göre belirlendi [10]. Numunelerin 500 nm deki absorbansları köre

karşı okundu. İnkübasyona kontrolün maksimum absorbansa ulaştığı noktadan sonra son verildi.

Kontrol absorbansının maksimuma ulaştığı zamanda ekstraların peroksidasyonu inhibe etme yüzdeleri aşağıdaki eşitlik yardımıyla hesaplandı.

$$\% I = [(A_o - A_c) / A_o] \times 100$$

I = İnhibisyon, A<sub>o</sub> = Kontrolün Absorbans Değeri, A<sub>c</sub> = Numunenin Absorbans Değeri

Bu yöntemde peroksit oluşumunu SCN<sup>-</sup> sağlamaktadır. Kontrol absorbansının maksimuma ulaştığı anda spektrofotometrik ölçüme son verildi ve hesaplama işlemine geçilerek ekstraların total antioksidan aktiviteleri belirlenmiştir [10].

### 2.2. İndirgeme Kuvveti Tayini

İndirgeme gücü tayini, Oyaizu metoduna göre yapıldı [11]. Stok çözeltiler için etanol ekstraları 10 mL etanolde; 10 mg su ekstraları ise 10 mL saf suda çözülerek hazırlandı. 0, 50, 100, 250 µg/µL stok çözeltiler alınarak cam tüplere aktarıldı ve hacimler saf su ile 1 mL'ye tamamlandı. Bu yöntemde Fe<sup>+3</sup>'ün ne kadarının Fe<sup>+2</sup>'ye dönüştüğü 700 nm'de spektrofotometrik olarak ölçülebilir. Bu metotta Fe<sup>+3</sup> kaynağı olarak FeCl<sub>3</sub> kullanılır. 700 nm dalga boyundaki yüksek absorbans ortamdaki Fe<sup>+2</sup>'nin fazlalığını göstermektedir [10].

### 2.3. Serbest Radikal (DPPH<sup>•</sup>) Giderme Aktivitesi

Serbest radikal giderme, Blois metoduna (1958) göre küçük bir modifikasyonla yapıldı. Serbest radikal olarak DPPH<sup>•</sup> kullanıldı ve 1 mM'lık çözeltisi kullanıldı. Numune olarak total antioksidan aktivite ve indirgeme kuvvetlerinde kullanılan 1mg/mL yoğunluğundaki stok çözelti kullanıldı. Numuneler etanolden oluşan köre karşı 517 nm de absorbansları ölçüldü. Azalan absorbans, geriye kalan DPPH<sup>•</sup> çözeltisi miktarını serbest radikal giderme aktivitesini verir [12].

### 2.4. Süperoksit Radikalleri Giderme Aktivitesi

Ekstrelerin süperoksit radikallerinin oluşmasındaki etkisi nitroblue tetrazolium

(NBT)'nin indirgeme ürünlerinin spektrofotometrik olarak ölçümü Nishimiki metoduna (1972) göre belirlendi. Reaksiyon karışımında ekstre numunesinin eksik olduğu köre karşı 560 nm de absorbansı okundu. Azalan absorbans, artan süperoksit radikalleri giderme aktivitesini gösterir.

## 2.5. Hidrojen Peroksit Giderme Aktivitesi

Ekstrelerin hidrojen peroksit giderme aktiviteleri Ruch ve arkadaşlarının belirledikleri metoda göre yapıldı [13]. Bunun için pH'ı 7.4 olan fosfat tamponunda 40 mM'lık hidrojen peroksit çözeltisi hazırlandı. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> konsantrasyonu spektrofotometrik olarak, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>'nin 230 nm de absorbans göstermesiyle belirlendi.

Giderilen % H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> giderme aktivitesi aşağıdaki denklemden hesaplanır:

$$\% I = [(A_o - A_c) / A_o] \times 100$$

I = İnhibisyon, A<sub>o</sub> = Kontrolün Absorbans Değeri, A<sub>c</sub> = Numunenin Absorbans Değeri

## 2.6. Metal Şelatlama Aktivitesi

Ekstrelerin metal şelatlama aktiviteleri, Dinis ve arkadaşlarının belirledikleri metoda göre yapıldı [14]. Sonuçlar 562 nm de absorbansı ferrozin hariç geriye kalan çözeltilerden oluşan köre karşı kaydedildi. Kontrol olarak ekstre numunesi hariç geriye kalan çözelti kullanıldı.

Tutuklanan metalin yüzdesi şu formülle hesaplanabilir:

$$\% \text{Şelatlama Aktivitesi} = [(A_o - A_c) / A_o] \times 100$$

I = İnhibisyon, A<sub>o</sub> = Kontrolün Absorbans Değeri, A<sub>c</sub> = Numunenin Absorbans Değeri

## 2.7. Toplam Fenolik Bileşik Miktarı Tayini

Ekstrelerdeki toplam fenolik bileşik miktarı, Folin-Ciocalteu reaktifi ile Singleton ve arkadaşlarının metoduna göre belirlendi [15]. Standart fenolik bileşik olarak pirokatekol ve quercetin kullanıldı. Önce standart grafik çizmek amacıyla 25 mg pirokatekol ve 25 mg quercetin ayrı ayrı 25 mL saf suda çözülerek stok çözelti hazırlandı. Numunelerin absorbansı 760 nm de

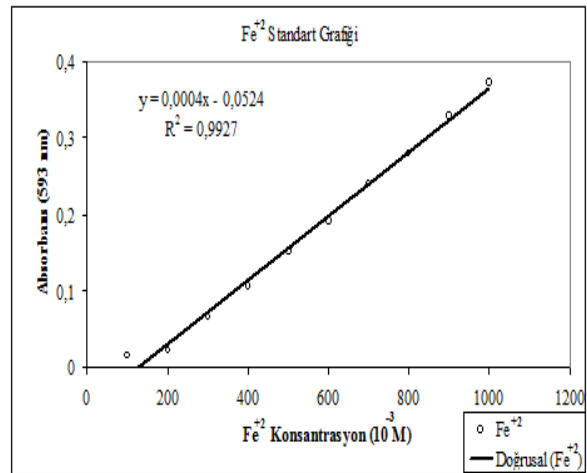
saf suya karşı okundu. Bu işlemler 3'er defa yapıldı. Kontrol için numune yerine saf su kullanılarak hazırlandı. Numunelerin absorbans değerlerine karşılık gelen pirokatekol miktarları: Absorbans=0,00209xMikrogram

Pirokatekol+0.00466standart grafik denklemi kullanılarak tespit edildi ve sonuçlar pirokatekol ekivalent şeklinde ifade edildi. Quercetin için de: Absorbans=0.0005xMikrogram

Quercetinstandart grafik denklemi yardımıyla belirlendi ve sonuçlar quercetin ekivalent şeklinde ifade edildi.

## 2.8. FRAP Testi

Bu test Benzie ve Strain' in metoduna göre yapıldı. Örneklerin absorbansı 593 nm'de alındı. Kör olarak FRAP reaktifi, kontrol olarak da içinde bitki ekstresinin eksik olduğu çözelti karışımı kullanıldı. Elde edilen sonuçlar aşağıdaki grafikte gösterilmiştir [16]. Ortamda ne kadar Fe<sup>+3</sup> ün Fe<sup>+2</sup>,ye dönüştüğü yani ortamdaki Fe<sup>+2</sup> konsantrasyonu aşağıdaki standart grafikten hesaplanmıştır. Bunun için 100-1000 10<sup>-3</sup> M arasında hazırlanmış Fe<sup>+2</sup> çözeltilerinin absorbansları alınarak kaydedilmiş ve bu standart grafik çizilmiştir (Şekil 1.1).



Şekil 1.1. FRAP testi için hazırlanan standart grafik

## 2.9. ABTS<sup>+</sup> Yok Edici Testi

ABTS<sup>+</sup> (2,2'-azino-bis(3-etilbenziazolin-6-sülfonik asit)diamonyum tuzu) yok edici testi Yu

ve ark., (2002) metodunun modifiye edilmesiyle gerçekleştirildi. ABTS<sup>+</sup> metodu, 2,2'-azino-bis(etilbenziazolin-6-sülfonik asit) diamonyum tuzu gibi bir azino-bileşiğin ortamdan yok edilmesi, yani bir başka deyişle inhibisyonuna dayanan bir antioksidan kapasite belirleme yöntemidir [17].

2.45 mM K<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>8</sub> ve 7 mM ABTS çözeltileri 1:1 oranında karıştırılarak oda sıcaklığında ve karanlıkta 16 saat inkübasyona bırakıldı. Hazırlanan bu ABTS<sup>+</sup> radikal çözeltisinin 734 nm'de absorbansı alınarak 1.660±0.02 absorbansına ulaşılan kadar etil alkolle seyreltildi. Bu absorbans kontrol absorbansı olarak kullanıldı. Daha sonra bu radikal çözeltisinden deney tüplerine 4 mL bırakıldı. Bu tüplerin üzerine 100 µL bitki ekstraterinden eklenerek oda sıcaklığında ve karanlıkta 2 saat inkübasyona bırakıldı. Bu sürenin sonunda örneklerin absorbansı 734 nm'de PBS (Fosfat Tamponu, pH=7.4)'den oluşan köre karşı kaydedildi. Azalan absorbans ortamdan yok edilen ABTS<sup>+</sup> radikallerinin miktarını verir.

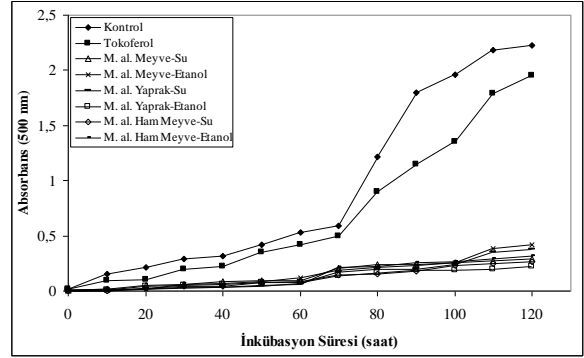
### 2.10. İstatistiksel Analiz

İstatistiksel analiz için SPSS 15.0 yazılım programı kullanıldı. Kontrol grubu ile deneysel gruplar arasındaki karşılaştırma varyans analizi (ANOVA) ve LSD testleri kullanılarak yapıldı. Sonuçlar mean ± SE olarak verildi. Kontrol ve diğer gruplar arasındaki farklılıklarda p<0.05, p<0.01 ve p<0.001 değerleri kullanıldı.

## 3. Sonuçlar

### 3.1. Toplam Antioksidan Aktivite Tayini İle İlgili Sonuçlar

Deneylerde kullanılan materyallerin total antioksidan aktiviteleri "tiyosiyanat metoduna" göre belirlendi. Bu metot, linoleik asit emülsiyonunda oksidasyon sonucu oluşan peroksidin spektrofotometrik olarak 500 nm'de ölçülmesi esasına dayanır. Yüksek absorbans, peroksidasyon sonucu oluşan peroksit miktarının fazlalığını göstermektedir. Antioksidan aktiviteler her bir ekstrenin 100 µg miktarlarının içinde bulunduğu çözeltilerin absorbansları ölçülerek belirlendi (Şekil 1.2).



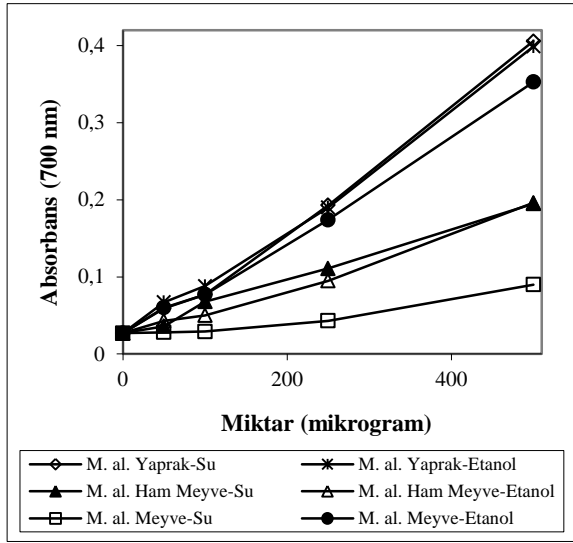
Şekil 1.2. *M. alba*'nın su ve etanol ekstraterinin antioksidan aktivitelerinin aynı şekil üzerinde gösterilmesi ve doğal bir antioksidan olan α-tokoferol ile karşılaştırılması

Yukarıdaki şekilde görüldüğü (Şekil 1.2) gibi bütün ekstraterden, 110. saat itibarıyla en iyi antioksidan aktiviteyi gösteren ekstre *M. alba* Yaprak Etanol ekstresi olduğu bulunmuştur. En düşük peroksidasyonu inhibe etme yüzdesi ise *M. alba* meyve etanol ekstresinde görülmüştür.

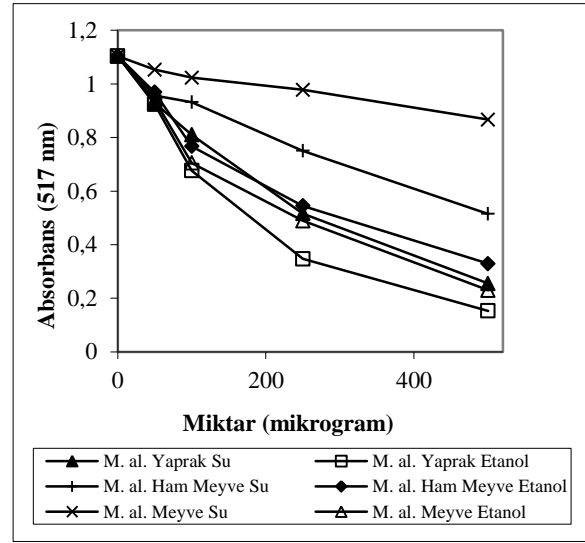
### 3.2. İndirgeme Kuvveti Tayini İle İlgili Sonuçlar

Çalışmada kullanılan bütün ekstraterin indirgeme kuvveti Oyaizu metoduna (1986) göre, Fe<sup>+3</sup>'ün Fe<sup>+2</sup>'ye dönüşümüne göre yapıldı. Bir bileşik veya ekstrenin indirgeme kapasitesi, o bileşik veya ekstrenin antioksidan aktivitesinin önemli bir indikatörü olarak bilinir [18]. Antioksidan bileşiklerin aktiviteleri, radikal zincir reaksiyonlarını önleme, metal iyonlarını şelatlama, peroksit oluşumunu engelleme, radikal giderme veya indirgeme kuvveti gibi temel antioksidatif özelliklerden kaynaklanmaktadır [19,20].

Ekstrelerin indirgeme kapasiteleri, total antioksidan aktivitede olduğu gibi ekstrenin miktarına bağlı olarak artmaktadır. İndirgeme kuvveti her bir ekstreden 50, 100, 250, 500 µg'larının içinde bulunduğu test çözeltilerinin 700 nm'de absorbansları ölçülerek belirlenmiştir (Şekil 1.3). *M. alba*'nın su ve etanol ekstraterinde en yüksek indirgeme kuvveti yapraklarda gözlenmiştir. İndirgeme kuvvetlerinin karşılaştırması için bütün ekstraterin indirgeme kuvvetleri aynı şekilde ölçülmüştür.



Şekil 1.3. *M. alba*'nın ekstrelerinin indirgeme kuvvetleri



Şekil 1.4. *M. alba*'nın ekstrelerinin DPPH radikali giderme aktivitesi

### 3.3. Serbest Radikal (DPPH') Giderme Aktivitesi Tayini İle İlgili Sonuçlar

DPPH' (2,2-difenil-1-pikrilhidrazil) bir serbest radikaldir ve bir elektron veya bir hidrojen radikali ile etkileşerek stabil bir diamanyetik bir molekül olma eğilimindedir [12,20]. DPPH' radikalleri miktarındaki meydana gelen azalma, 517 nm'de spektrofotometrik olarak tayin edilebilmektedir. Bu yüzden DPPH' radikali, antioksidan aktivite tayininde sıklıkla kullanılır. Ortamda bulunan radikal giderici veya söndürücü antiradikal türlerin (AH)<sub>n</sub> varlığında koyu menekşe renginde olan DPPH' radikalleri şekilde de görüldüğü gibi açık sarı renkli olan indirgenmiş DPPH formuna (DPPH-H) dönüşmektedir. Bu indirgenmiş formdaki DPPH ise 517 nm'de maksimum absorbanı göstermektedir.

DPPH' radikallerinin giderilmesi aktivitesi de konsantrasyon ile ekstre miktarı ile doğru orantılı olarak artmaktadır (Şekil 1.4). En yüksek DPPH' radikallerinin giderilme aktivitesi *M. alba* yaprak etanol ekstresinde gözlenmiştir.

### 3.4. Süperoksit Radikali Giderme Aktivitesi Tayini İle İlgili Sonuçlar

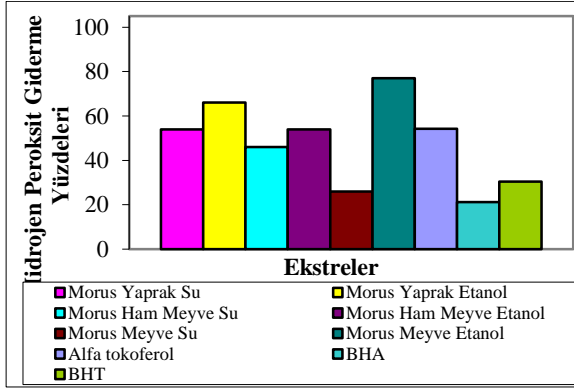
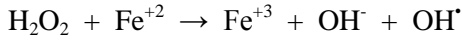
PMS/NADH-NBT sisteminde, PMS/NADH çifti tarafından meydana getirilen süperoksit anyonlarının NBT'yi indirgeme reaksiyonlarına dayanmaktadır. İndirgenmiş NBT ürünü ise 560 nm'de maksimum aktivite göstermektedir. Reaksiyon karışımında 560 nm'deki absorbanı azalması, süperoksit anyonlarının giderildiğini ve dolayısıyla antioksidan aktiviteyi göstermektedir. Tablo 1.1'de görüldüğü gibi en yüksek süperoksit anyonu radikali giderme aktivitesi *M. alba* Ham Meyvelerinin su ekstresinde gözlenirken, en düşük süperoksit anyonu radikali giderme aktivitesi *M. alba* Meyve Etanol ekstresinde gözlenmiştir.

Tablo 1.1. Bitki ekstraktlarının 100 µg'nm % süperoksit radikali giderme aktiviteyi

| Numunenin Adı                   | % İnhibisyon |
|---------------------------------|--------------|
| BHA                             | 94.8         |
| <i>M. alba</i> Ham Meyve Su     | 90.6         |
| <i>M. alba</i> Meyve Su         | 89.3         |
| <i>M. alba</i> Yaprak Su        | 89.3         |
| BHT                             | 82.6         |
| <i>M. alba</i> Ham Meyve Etanol | 74.8         |
| <i>M. alba</i> Yaprak Etanol    | 69           |
| α-Tokoferol                     | 59.6         |
| <i>M. alba</i> Meyve Etanol     | 40.5         |

### 3.5. Hidrojen Peroksit Giderme Aktivitesi Tayini İle İlgili Sonuçlar

Ekstrelerin  $H_2O_2$  giderme aktiviteleri Ruch ve ark. [13] metoduna göre yapıldı.  $H_2O_2$ , kendisi çok reaktif bir ürün olmamasına rağmen zaman zaman hücrelerin toksisitesine sebep olabilmekte ve hücrelerde hidroksil radikallerinin artmasını sağlamaktadır [21]. Özellikle  $Fe^{+2}$  ve  $Cu^+$  gibi metal iyonlarının varlığında kolayca  $OH^{\cdot}$ 'e dönüşebilmektedir. Bu yüzden hücre ve gıda sistemlerinde  $H_2O_2$ 'nin giderilmesi  $O_2^{\cdot-}$  kadar önemlidir. Çünkü gıda sistemlerinde  $H_2O_2$ 'nin en önemli diğer kaynağı  $O_2^{\cdot-}$ 'dir. SOD enzimi tarafından  $O_2^{\cdot-}$  kolayca  $H_2O_2$ 'ye dönüştürülebilir.



Şekil 1.5. Bitki ekstraktlarının ve standart antioksidan maddelerin 100 µg/ml konsantrasyonunda  $H_2O_2$  giderme aktivitesi yüzdeleri

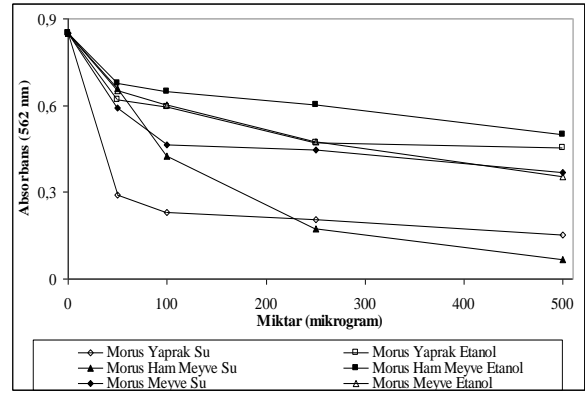
Ekstrelerin  $H_2O_2$  giderme aktiviteleri, total antioksidan aktivite, indirgeme kuvveti, serbest radikal giderme aktiviteleri ve diğer antioksidan aktivitelerde olduğu gibi ekstrenin dozuna bağlı olarak artmaktadır.

Ekstrelerinin  $H_2O_2$  giderme aktivitesi, her bir ekstrede 100 µg'larının içinde bulunduğu test çözeltilerinin 230 nm'deki absorbansları ölçülerek belirlenmiştir (Şekil 1.5). Bütün ekstratlarda en yüksek  $H_2O_2$  giderme aktiviteleri *M. alba*'nın meyve etanol ekstraktlarında gözlemlenmiştir.

### 3.6. Metal Şelatlama Aktivitesi Tayini İle İlgili Sonuçlar

Metal şelatlama aktivitesi lipit peroksidasyonuna sebep olan metalleri

tutukladığından dolayı önemlidir [22]. Fenton kimyasında da görüldüğü gibi antioksidan kapasite açısından  $OH^{\cdot}$  radikallerinin oluşmasına sebep olan  $Fe^{+2}$  ve  $Cu^+$  gibi metallerin tutuklanmasında son derece önemlidir. Şekil 1.6' da görüldüğü gibi en yüksek metal şelatlama aktivitesi *M. alba* yaprak su ekstresinde bulunurken, en düşük metal şelatlama aktivitesini *M. alba*'nın ham meyve su ekstresi göstermektedir.



Şekil 1.6. *M. alba* ekstraktlarının metal şelatlama aktiviteleri

### 3.7. Toplam Fenolik Bileşik Miktarı Tayini İle İlgili Sonuçlar

Bulunan absorbans değerleri standart grafikten elde edilen  $y=mx+n$  denkleminde yerine koyularak ekstraktların 1000 µg larındaki toplam fenolik bileşik miktarları belirlenmiştir. Ekstrelerde bulunan toplam fenolik bileşik miktarları için ölçülen absorbansları, standart grafiklerde elde edilen eşitliklerde yerlerine konularak pirokatekol ekvivalent ve kuercetin ekvivalenti olarak hesaplanmıştır ve sonuçlar Tablo 1.2'de verilmiştir.

Tablo 1.2. 1000 µg ekstraktların fenolik bileşik miktarlarının pirokatekol ekvivalent ve kuercetin ekvivalent olarak değerlendirilmesi

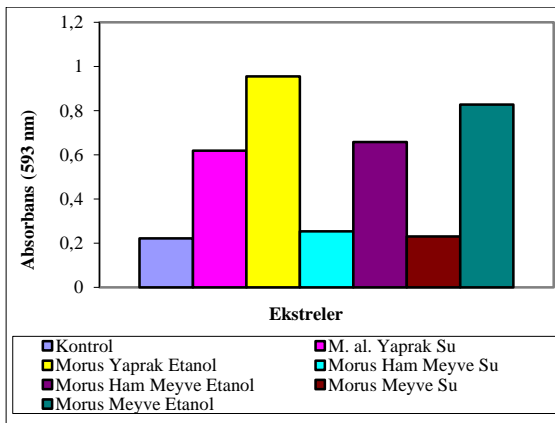
| Bitki Ekstreleri (1000 µg)      | Kuercetin | Pirokatekol |
|---------------------------------|-----------|-------------|
| Kontrol                         | 68.6      | 184         |
| <i>M. alba</i> Yaprak Su        | 80        | 205         |
| <i>M. alba</i> Yaprak Etanol    | 73        | 193         |
| <i>M. alba</i> Ham Meyve Su     | 70.6      | 202         |
| <i>M. alba</i> Ham Meyve Etanol | 69.6      | 186         |
| <i>M. alba</i> Meyve Su         | 70.2      | 209         |
| <i>M. alba</i> Meyve Etanol     | 70        | 190         |

Elde ettiğimiz sonuçlara göre en yüksek fenolik bileşik miktarları Tablo 1.2' de görüldüğü üzere kuercetin bakımından *M. alba* yapraklarının su ekstresinde, pirokatekol bakımından ise *M. alba*'nın meyvelerinin su ekstresinde gözlenmiştir.

### 3.8. FRAP (Ferric Reducing Antioxidant Power) Testi İle İlgili Sonuçlar

Bir örneğin veya ekstrenin  $Fe^{+3}$  indirgeme yeteneğinin ölçülmesi basit ve çok yaygın bir yöntem olup FRAP testi adı verilmiştir ve antioksidan kapasitenin ölçülmesi için kullanılan yöntemlerden biridir.  $Fe^{+3}$  iyonlarının düşük pH değerlerinde  $Fe^{+2}$ 'ye indirgenmesi, renkli  $Fe^{+3}$ -tripridil triazin kompleksinin oluşmasına neden olmaktadır. FRAP değerleri, bilinen konsantrasyonlarda  $Fe^{+2}$  içeren karışımların ekstralele 593 nm'de absorbanslarının karşılaştırılmasıyla gözlenebilir. Ekstrelerin absorbansları alınarak standart grafik yardımıyla ekstrelerin ne kadar  $Fe^{+3}$ 'ü indirgediği ve ortamda ne kadar  $Fe^{+2}$  oluştuğu hesaplanmıştır [16].

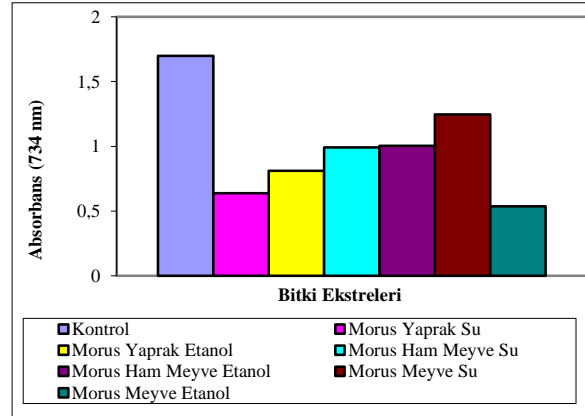
Şekil 1.7'da görüldüğü gibi  $Fe^{+3}$ 'ü en fazla dönüştürme aktivitesi *M. alba*'nın yaprak etanol ekstresinde, en düşük sonuçlar ise *M. alba* ham meyve su ve meyve etanol ekstresinde gözlenmiştir.



Şekil 1.7. 100 µg'lık bitki ekstralarının FRAP testi sonuçları

### 3.9. ABTS<sup>+</sup> Yok Edici Testi İle İlgili Sonuçlar

ABTS<sup>+</sup> metodu, 2,2'-azino-bis(etilbenzotiazolin-6-sülfonik asit) diamonyum tuzu gibi bir bileşimin ortamdaki yok edilmesi, yani bir başka deyişle inhibisyonuna dayanan bir antioksidan kapasite belirleme yöntemidir. Ortamdaki ABTS<sup>+</sup> radikalleri bitki ekstresi ilavesinin ardından belli bir yüzdede yok edilmektedir. Elde ettiğimiz sonuçlara göre en yüksek ABTS<sup>+</sup> radikali yok etme kapasitesi Şekil 1.8' de görüldüğü gibi *M. alba* meyve etanol ekstresinde; en düşük sonuçlar ise *M. alba* meyve su ekstresinde gözlenmiştir.



Şekil 1.8. Bitki ekstralarının ABTS<sup>+</sup> yok edici testi sonuçları

## 4. Tartışma

Antioksidan bileşiklerin aktiviteleri, radikalik zincir reaksiyonlarını önleme, metal iyonlarını şelatlama, peroksit oluşumunu engelleme, radikal giderme veya indirgeme kuvveti gibi temel antioksidatif özelliklerden kaynaklanmaktadır.

Antioksidan aktivite ile ilgili çalışma çerçevesinde *M. alba* (dut) meyve, ham meyve ve yapraklarının su ve etanol ekstralarının antioksidan ve antiradikal özellikleri ile ilgili yaptığımız bu çalışmada toplam antioksidan kapasite, indirgeme gücü kapasitesi, metal şelatlama aktivitesi, DPPH' serbest radikali giderme aktivitesi, ABTS<sup>+</sup> radikali giderme aktivitesi, süperoksit anyon radikalleri giderme aktivitesi, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> giderme aktivitesi ile FRAP testi

gibi farklı antioksidan metotlar ve ek olarak toplam fenolik bileşik miktarı tayini kullanılarak farklı konsantrasyonlarda ayrı ayrı belirlenmiştir.

Ekstrelerin değişik metotlarla yapılan antioksidan tayinleri arasında ilişki bulunabilir. Örneğin bir bileşiğin sahip olduğu indirgeme kuvveti o bileşiğin antioksidan aktivite sergilemesinde önemli bir etken olabilir [18]. Ancak antioksidan karakter değişik yollar ve mekanizmalar ile yürüyebilir. Örneğin, oksidasyon geçiş metalleri tarafından hızlandırıldığı bir sistemde, antioksidan bileşiğin indirgeme kuvveti, antioksidan özellik bakımından çok önemli olmayabilir. Bir ekstrenin veya bileşiğin sadece metal bağlayabilme özelliğinin olması bile böyle bir sistemde oksidasyon hızını yavaşlatacaktır. Metal şelatlayıcı ajanlara sahip bir ekstre veya bileşiğin antioksidan karakteri, onun indirgeme kuvveti veya sahip olduğu hidroksil gruplarından ziyade ortamda bulunan metalleri uzaklaştırma özelliğinden kaynaklanmaktadır. Oksidasyonun singlet oksijen tarafından indüklendiği sistemlerde ise etkili antioksidanlar singlet oksijeni bertaraf edebilen bileşiklerdir. Buna örnek olarak karotenoidler verilebilir [23]. Bütün bu özelliklerden dolayı antioksidan bileşikler sahip oldukları antioksidatif etkinliklerini geçiş metallerini bağlama, peroksitleri parçalama, hidrojen koparılmasını engelleme, radikal giderme gibi değişik mekanizmalarla ortaya koyabilirler [24].

Bu çalışmada antioksidan aktivite tayinlerinin yapılabilmesi için hazırlanan her bir ekstrenin 50, 100, 250 ve 500 µg'lık veya 100 µg'lık miktarları kullanılmıştır. Çalışma sonunda elde edilen bulgularda her bir ekstrenin artan miktarı ile orantılı olarak antioksidan kapasitede ekstre miktarına bağlı olan bir korelasyon olduğu gözlenmiştir. Bu durum, ekstre miktarı arttıkça ekstrelerde bulunan etken madde miktarının da artmasından kaynaklanmaktadır. Meydana gelen bu korelasyonunun sebebi bitkilerin içerdiği antioksidan etkiye sahip fenolik bileşikler (fenolik asit, flavonoidler, kumarinler vs.), azotlu bileşikler (alkaloidler, aminler vs.), vitaminler, terpenoidler gibi birçok serbest radikal temizleyici gruplar olabilir.

Cai ve ark. [25], Çin'deki antioksidan ve fenolik bileşikleri bulunan 112 çeşit şifalı bitkinin antikanser ilişkisini araştırmak için total

antioksidan kapasitesine ve total fenolik içeriğine bakmışlardır. Şifalı bitkilerdeki antioksidan kapasite ile total fenolik içerik arasında belirgin pozitif ilişki bulunmuş ve fenolik içeriğin antioksidan etkiyi oluşturan temel yapı olduğu düşünülmüştür. Diğer sebze ve meyvelere göre bu şifalı bitkilerin çok güçlü antioksidan aktiviteye ve yüksek fenolik bileşik içeriğine sahip olduğu tespit edilmiştir. Çin'deki şifalı bitkilerin doğal bileşimlerinin kemopreventif ajan kaynağı olarak kullanılabileceği ileri sürülmüştür.

Yaptığımız çalışmalarda bütün ekstrelerin toplam antioksidan aktivitesi sonuçları doğal ve standart bir antioksidan olan  $\alpha$ -tokoferole nazaran çok yüksek aktiviteye sahip olduğu gözlenmiştir. Ayrıca yine ekstrelerin peroksidasyonu inhibe etme yüzdelерinin çok kuvvetli ve sentetik birer standart antioksidan olan BHA ve BHT'ye yakın olduğu belirlenmiştir. Ekstrelerin içinde en yüksek total antioksidan aktiviteye sahip olan ekstrenin *M. alba* Yaprak Etanol ekstresi olduğu gözlenmiştir. Ekstreler arasında linoleik asit emülsiyonun oksidasyonunu inhibe etme sıralamasında ise; BHT> BHA> MA Yaprak Etanol Ekstresi> MA Ham Meyve Su Ekstresi> MA Meyve Su Ekstresi> MA Ham Meyve Etanol Ekstresi> MA Yaprak Su Ekstresi> MA Meyve Etanol Ekstresi> $\alpha$ -tokoferol şeklinde olduğu tespit edildi.

Ekstrelerin çoğu kontrol grubuna göre kuvvetli indirgeyici özelliğe sahiptir. Ekstrelerin sahip olduğu indirgeme kuvvetlerinin; MA Yaprak Etanol Ekstresi > MA Yaprak Su Ekstresi> MA Meyve Etanol Ekstresi> MA Ham Meyve Su Ekstresi> MA Ham Meyve Etanol Ekstresi>MA Meyve Su Ekstresi sıralamasına sahip olduğu gözlenmiştir. Bütün ekstrelerin total indirgeme kapasitelerine bakıldığında *M. alba*'nın yaprak etanol eksteresinin aktivitesinin daha yüksek olduğu, *M. alba* meyve su ekstresi aktivitelerinin ise çok düşük aktiviteye sahip oldukları gözlenmiştir. Bu durum ise *M. alba* türünün meyvelerinde bulunan indirgeyici bileşiklerinin çok fazla çözünememiş olmasından kaynaklanmış olabilir.

Fe<sup>+3</sup>'ü indirgeyici antioksidan güç (FRAP) testi sonuçlarına göre yine en yüksek aktiviteyi *M. alba* türü yapraklarının etanol ekstresi göstermiştir. Ekstrelerin sahip olduğu indirgeme



kuvvetlerinin MA Yaprak Etanol Ekstresi> MA Meyve Etanol Ekstresi> MA Ham Meyve Etanol Ekstresi> MA Yaprak Su Ekstresi> MA Ham Meyve Su Ekstresi> MA Meyve Su Ekstresi sıralamasına sahip olduğu gözlenmiştir.

Serbest radikallerin ortamdaki uzaklaştırılmaları birçok biyomolekül için hayati öneme sahiptir. Çünkü radikal zincir reaksiyonları radikaller ile başlamakta ve gelişmektedir. Böyle bir durumda yağ asitleri, proteinleri, monosakkaritleri ve hatta DNA gibi çok önemli biyomoleküllerin stabilitesi bozulmakta [23] kanser, damar tıkanıklığı gibi yüzden fazla hastalıklara, sebep olmakta ve yaşlanma gibi bir çok olguya neden olduğu bilinmektedir. Çalışmamızda serbest radikal olarak DPPH<sup>•</sup> ve ABTS<sup>•+</sup> kullanılmıştır. En yüksek DPPH<sup>•</sup> radikallerini giderme aktivitesi ise MA yaprak etanol ekstresinde bulunduğu gözlenmiştir. Ekstrelerin içerisinde en yüksek DPPH<sup>•</sup> giderme aktivitesine sahip olma sıralaması ise  $\alpha$ - tokoferol> MA Yaprak Etanol Ekstresi> MA Yaprak Su Ekstresi> MA Ham Meyve Etanol Ekstresi> SM Tohum Etanol Ekstresi> MA Ham Meyve Su Ekstresi> MA Meyve Su Ekstresi şeklindedir.

Çalışmamızda araştırdığımız bir diğer antiradikal test olan ABTS<sup>•+</sup> giderme aktivitesi testi sonuçlarımıza göre bitki ekstrelerinin 100  $\mu$ l'lik miktarlarının radikal giderme aktivitelerine bakıldığında MA meyve etanol ekstresinin aktivitelerinin yüksek olduğu, ekstrelerin kuvvetli bir şekilde ABTS<sup>•+</sup> radikalini giderdiği tespit edilmiştir. ABTS<sup>•+</sup> radikali, antioksidan maddeler ile kimyasal tepkimeye girerek bir elektron transfer eder ve radikal olmayan ABTS<sup>•+</sup> maddesine dönüşmektedir. ABTS<sup>•+</sup> radikali 734 nm'de absorbans veren renkli bir maddedir ve dolayısıyla bu dalga boyundaki absorbans azalması antioksidan aktivitenin hesaplanmasında kullanılmaktadır. Ekstrelerin içerisinde en yüksek ABTS giderme aktivitesine sahip olma sıralaması ise MA Meyve Etanol Ekstresi> MA Yaprak Su Ekstresi> MA Yaprak Etanol Ekstresi> MA Ham Meyve Su Ekstresi> MA Ham Meyve Etanol Ekstresi>MA Meyve Su Ekstresi şeklinde olduğu tespit edilmiştir.

Süperoksit anyon radikallerinin organizmada meydana gelebileceğinden daha önceden bahsedilmişti. Süperoksit anyon radikalleri lipit peroksidasyonuna sebep olan radikallerdir. Bu radikaller biyokimyasal yapılar ile tekimeye girerek doku hasarlarına sebep olurlar [23].

Tez kapsamında yapılan çalışmalarda bütün ekstrelerden en yüksek süperoksit giderme aktivitesinin su ekstrelerinde olduğu belirlenmiştir. Ekstrelerin çoğunun standart bir antioksidan olan  $\alpha$ - tokoferol'den yüksek süperoksit giderme aktivitesi sergiledikleri görülmüştür. Bütün ekstreler içerisinde ise en yüksek süperoksit giderme aktivitesinin MA ham meyve su ekstresinde olduğu belirlenmiştir. Ekstrelerin içerisinde en yüksek süperoksit giderme aktivitesine sahip olma sıralaması ise BHA> MA Ham Meyve Su Ekstresi>MA Meyve Su Ekstresi> MA Yaprak Su Ekstresi> BHT> MA Ham Meyve Etanol Ekstresi> MA Yaprak Etanol Ekstresi>  $\alpha$ - tokoferol>MA Meyve Etanol Ekstresi şeklindedir.

H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> bir serbest radikal değildir, fakat membranı baştan sona geçebilir ve membrandaki birçok bileşiği de oksitleyebilir. Daha önceden de anlatıldığı gibi H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, süperoksit dismutaz ve diğer birçok enzim tarafından in vivo olarak meydana getirilebilir. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> mikromolar düzeyde daha az reaktiftir, fakat yüksek düzeyde birçok selüler enerji üretim sistemlerine saldırabilmektedir. Örneğin bir glikolitik enzim olan gliseraldehit-3-fosfat dehidrogenaz metal iyonlarının varlığında hidroksil radikallerini de oluşturabilmektedir. Ayrıca oksijenin de meydana geldiği bu reaksiyonu hızlandırmaktadır.

Bu çalışmada ekstrelerin sahip oldukları H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> giderme aktiviteleri de araştırılmış ve bu çerçevede yapılan çalışmalarda bütün ekstrelerde en yüksek H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> giderme aktivitesi *M. alba*'nın meyve etanol ekstrelerinde görülmüştür.

Metal şelatlamada, lipit peroksidasyonuna sebep olan metaller tutukladığından dolayı büyük bir önem arz etmektedir [22]. Fenton reaksiyonunda daha önceden anlatıldığı gibi antioksidan kapasite açısından OH<sup>•</sup> radikallerinin oluşmasına sebep olan Fe<sup>+2</sup> ve Cu<sup>+</sup> gibi

merallerinin tutuklanması son derece önemlidir. Bu metal iyonlarının bulunması OH<sup>-</sup> radikalleri gibi reaktif radikallerin meydana gelmesini sağlar.

Çalışma kapsamında kullanılan ekstraların Fe<sup>+2</sup> iyonu şelatlama aktiviteleri incelenmiştir. Metot olarak indirgeme kuvveti ile metal şelatlama aktiviteleri arasında bir benzerlik olmasına rağmen temelde birbirinden tamamen farklıdır. Çünkü metal şelatlamada metal iyonları tutuklanırken, indirgeme kuvvetinde ise indirgeme söz konusudur. Ekstrelerin metal şelatlama sıralaması ise MA Yaprak Su Ekstresi> MA Ham Meyve Su Ekstresi> MA Meyve Su Ekstresi> α-tokoferol> MA Yaprak Etanol Ekstresi> MA Meyve Etanol Ekstresi>BHT>MA Ham Meyve Etanol Ekstresi şeklinde artmaktadır.

Total antioksidan aktivitenin düşük olduğu ekstradaki bileşiklerin antioksidan aktivitelerinin de düşük olacağını söylemek mümkün değildir. Ekstrelerde oksidasyonu hızlandırıcı maddelerin varlığı (serbest geçiş metalleri gibi), o ekstrede bulunabilecek yüksek antioksidan aktiviteye sahip bileşiklerin etkisini perdeleyebilir. Bu sebeple fenolik bileşik miktarı ve indirgeme kuvveti yüksek olan ekstralarda düşük antioksidan aktivite gözlenebilir. Sonuçlarımıza göre en yüksek fenolik bileşik miktarları kuersetin bakımından *M. alba* yapraklarının su ekstresinde, pirokatekol bakımından ise *M. alba*'nın meyvelerinin su ekstresinde gözlenmiştir.

Dut (*Morus alba* L.) yaprak, kabuk ve dalları ateş tedavisi, karaciğeri korumak, görmeyi geliştirmek, eklemleri güçlendirmek, idrar boşaltımını kolaylaştırmak ve düşük kan basıncı için Çin tıbbında uzun zamandır kullanılmaktadır [26]. Japonya'da, çay veya toz meyve suyu olarak dut yapraklarının tüketimi son yıllarda artmıştır. Birkaç yeni çalışmada dut yapraklarının antioksidan aktivitesi rapor edilmiştir. Dut yapraklarından izole edilen izokuersitrinin DPPH radikalini temizlediği, insan ve tavşan LDL'sinin oksidatif modifikasyonunu inhibe ettiği bulunmuştur. Dut yapraklarında izole edilen pirenilflavonlarında kuersetinden daha yüksek antioksidan aktivite gösterdiği tespit edilmiştir [27]. Yaptığımız çalışmalar sonucunda da dutun yaprak, meyve ve ham meyvelerinin DPPH<sup>•</sup> radikalini temizleme

aktivitesi gösterdikleri bulunmuştur. Özellikle ekstrelerin 50 ile 500 µg/mL arasındaki konsantrasyonlarda etkin aktivite gösterdiği bulunmuştur. Yani yüksek konsantrasyonlarda daha iyi aktivite gösterdiği gözlenmiştir [28]. Kantitatif olarak dut yapraklarında önemli antioksidan bileşik olarak quercetin-3 (6-malonylglucoside) tespit edilmiştir [29]. Aynı zamanda dut yaprakları oksidatif modifikasyona LDL direncinin geliştirme yoluyla nakavt fareler LDL reseptörlerinde aterosklerotik lezyonların gelişimini azaltmıştır ve bu antioksidan ve antiaterojenik koruyucu etkiler esas olarak kuersetin 3-(6-malonylglucoside)'e atfedilmiştir [30].

Taze meyve ve sebze tüketimi ile koroner kalp hastalığı riskini azaltabilmektedir. Düşük yoğunluklu lipoprotein (LDL) oksidasyonu aterosklerozda bir rol oynar: bu nedenle oksidatif LDL (oxLDL)'nin oluşumu ne kadar azsa, koroner kalp hastalıkları (KKH) alt oluşum o kadar azdır. Dut, *M. alba* L.'nin meyveleri, KKH önlenmesi için Çin tıbbında etkili olarak kullanılmaktadır. Ancak bu işlemin mekanizması belirsizdir. Dut ekstraktları, dut suyu ekstresi ve dut antosiyanin-zengin ekstresi, in vitro antioksidan ve anti-aterosklerogenesis yeteneklerini sergilemiştir. Ekstreler aynı zamanda bakır iyonları ile serbest radikallerin oluşumunu azalttığı için 1,1-difenil-2-pikrilhidrazil (DPPH<sup>•</sup>) radikal süpürücü yeteneği göstermiştir. Ayrıca, ekstraların oxLDL tarafından uyarılan makrofaj ölümünü (p<0.05) azaltabildiği gözlenmiştir. Buna ek olarak, ekstralar köpük hücre oluşumunda (p <0.05) engelleyebildiği ileri sürülmüştür. Bu bulgular, dut antosiyaninlerinin atherogensisi azaltmış olabileceğini göstermiştir [31].

Her geçen gün, radikallerin çeşitli hastalıkların patojenezindeki etkileri ve yeni antioksidanlar ortaya konmaktadır. Özellikle radikallerin günümüz tıbbını en çok uğraştıran hastalıklar olan diabetes mellitus, kanser ve kardiyovasküler hastalıklar ile yaşlanma olayındaki etkileri çok büyük ilgi uyandırmıştır. Hastalıklardaki bu artış insanları bitkisel ilaçlar gibi alternatif yöntemler aramaya itmiştir.

Günümüzde kullanılan ilaçların 1/4'ünün temel veya tamamlayıcı etkin maddesi bitkisel kaynaklıdır. Bitkisel ilaçların, bitkilerin de hücrelerden oluşmasından dolayı biyokimya

seyrinde mühim uyumlulukları vardır. Bu sebeple bitkilerdeki aktif maddeler zehirli olsalar bile sentetik ilaçlar gibi hücrelerde ani ve kuvvetli tahribat yapmazlar. Bitkisel kaynaklı ilaçların bu önemli etkilerinden dolayı çalışmada *M. alba* (dut) bitkilerinin yaprak, ham meyve ve meyvelerinin su ve etanol ekstrelerinin antioksidan özellikleri incelenmiştir.

Cansız ortamda çeşitli antioksidan sistemlerde *M. alba* (dut)'nın su ve etanol ekstrelerinin güçlü bir antioksidan kapasiteye sahip olduğu bu çalışmanın sonucunda bulunmuştur. Bitkilerin ilaç endüstrisi ve gıda katkı endüstrisi için doğal antioksidanların kolay bulunur bir kaynağı olarak kullanılabilir. Bununla birlikte numune ekstraktının antioksidan aktivitelerinden sorumlu olan bileşenleri tam olarak açık değildir. Bundan sonra yapılacak çalışmalarda bitkilerin içerdiği aktif bileşikler farklı yöntem ve teknikler kullanılarak kimyasal analizleri yapılabilir ve farmakolojik özellikleri incelenebilir. Bitkinin içerdiği aktif bileşikler izole edilerek canlı sistemlerdeki antioksidan özellikleri araştırılabilir. Ayrıca bitkinin içerdiği aktif maddeler dikkate alınarak antioksidan aktivitesi ile birlikte başka tedavi edici özellikleri de araştırılabilir.

## 5. Teşekkür

Bu çalışma TÜBİTAK 107T898, Fırat Üniversitesi FÜBAP 1937 numaralı proje ile destek sağlamıştır.

## 6. Kaynaklar

1. Rang, R.Y., Tsou, S.C.S., Lee, T.C., Wu, W.J., Hanson, P.M., Kuo, G., Engle, L.M. and Lai, P.Y. (2006). Distribution of 127 Edible Plant Species for Antioxidant Activities by Two Assays. *J. Sci. Food. Agric.*, **86**, 2395-2403.
2. Anon. (2002). 1997 *Köy Envanteri*, T.C. Başbakanlık Devlet İstatistik Enstitüsü, Yayın No: 2618, S. 161, Ankara.
3. Huo, Y. (2002). Mulberry Cultivation and Utilization In China, Mulberry for Animal Production, *FAO Animal Production and Health Paper*, **147**, 11-44.
4. Moore, L.M. (2002). White Mulberry (*Morus alba* L.). [www.plants.usda.gov/plantguide/pdf](http://www.plants.usda.gov/plantguide/pdf)
5. Duke, J.A. (1983). Handbook of Energy Crops, [www.newcrop.hort.purdue.edu/newcrop/nexus/morus\\_spp\\_nex.html](http://www.newcrop.hort.purdue.edu/newcrop/nexus/morus_spp_nex.html).
6. Behferooz, F. (1993). *M. alba* L. ve *M. nigra* L. Üzerinde Farmakognozik Araştırma, Ankara Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Farmakognozi Anabilim Dalı, *Yüksek Lisans Tezi*, S. 119, Ankara.
7. Kim, and., Park, S. (2006). Mulberry extract supplement ameliorate the inflammation related hemalotological parameters in Carrageenan - induced arthritic rats. *Journal of Medicinal Food Sep.*, **9**(3), 431-435.
8. Bart, C. (1932). Hypoglysemic action of the leaves of *Morus Alba*. *Compt.Rend.Soc.Biol.*, **109**, 897-9.
9. Miyahara, C., Miyazawa, M., Satoh, S., Sakai, A. and Mizusaki S. (2004). Inhibitory effects of mulberry leaf extract on postprandial hyperglycemia in normal rats. *J Nutr Sci Vitaminol*, **50**, 161-4.
10. Yen, G.C. and Chen, H.W. (1995). Antioxidant activity of various tea extracts in relation to their antimutagenicity. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. **43**, 27-32.
11. Oyaizu, M. (1986). Studies on products of browning reaction prepared from glucoseamine. *Japanese Journal of Nutrition*, **44**, 307-315.
12. Soares, J.R., Dins, T.C.P., Cunha, A.P. and Ameida, L.M. (1997). Antioxidant activity of some extracts of *Thymus zygis*. *Free Radical Research*. **26**, 469-478.
13. Ruch, R.J., Cheng, S.J. and Klaunig, J.E. (1989). Prevention of cytotoxicity and inhibition of intercellular communication by antioxidant catechins isolated from Chinese green tea. *Carcinogenesis*, **10**, 1003-1008.
14. Dinis, T.C.P., Madeira, V.M.C. and Almeida, L.M. (1994). Action of phenolic derivatives (acetoaminophen, salicylate, and 5-aminosalicylate) as inhibitors of membrane lipid peroxidation and as peroxy radical scavengers. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, **315**, 161-169.
15. Singleton, V.L., Orthofer, R. and Lamuela-Raventos, R.M. (1999). Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin-Ciocalteu reagent. *Oxidants and Antioxidants*, **299**, 152-178.
16. Benzie, I.F.F., Strain, J.J. (1996). The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure

- of “antioxidant power” the FRAP assay. *Analytical Biochemistry*, **239**, 70-76.
17. Yu, L.L., Haley, S., Perret, J., Harris, M., Wilson, J. and Qian, M. (2002). Free radical scavenging properties of wheat extracts. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **50**, 1619-1624.
  18. Meir, S., Kanner, J., Akiri, B. and Hadas, S.P. (1995). Determination and involvement of aqueous reducing compounds in oxidative defense systems of various senescing leaves. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. **43**, 1813-1819.
  19. Diplock, A.T. (1997). Will the good fairies please prove us that vitamin E lessens human degenerative disease? *Free Rad. Res.*, **27**, 511-532.
  20. Gülcin, İ., Oktay, M., Küfrevioğlu O.I. and Aslan, A. (2002). Determination of antioxidant activity of Lichen *Ceiraria islandica* (L) Ach. *Journal of Ethnopharmacology*, **79** (3), 325-329.
  21. Halliwell, B., Gutteridge, J.M.C. (1990). Role of free radicals and catalytic metal ions in human disease: An overview, *Methods Enzymol.* **186**, 1-85.
  22. Duh, P.D., Tu, Y.Y. and Yen, G.C. (1999). Antioxidant activity of Harnğ Jyur (*Cheysatheumum morifolium* Ramat). *Lebnesm-VViss.u TechnoL*, **32**, 269-277.
  23. Halliwell, B., Gutteridge, J.M.C. (1989). Free radicals in biology and medicine, Oxford Universty Press, London, 36-245.
  24. Diplock, A.T. (1997). Will the good fairies please prove us that vitamin E lessens human degenerative disease? *Free Rad. Res.*, **27**, 511-532.
  25. Cai, Y., Luo, Q., Sun, M. and Corke, H. (2004). Antioxidant activity and phenolic compounds of 112 traditional Chinese medicinal plants associated with anticancer. *Life Sci.*, **74**, 2157-84.
  26. Jia, Z.S., Tang, M.C. and Wu, J.M. (1995). The determination of flavonoid contents in mulberry and their scavenging effects on superoxide radicals. *Food Chemistry*, **64**, 555-559.
  27. Doi, K., Kojima, T., Makino, M., Kimura, Y. and Fujimoto, Y. (2001). Studies on the constituents of the leaves of *M. alba* L.. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*, **49**, 151-153.
  28. Matsuoka, T., Kimura, T. and Muraoka, N. (1994). Research of the available constituents from mulberry tree. *Tohoku Agricultural Research*, **47**, 361-362.
  29. Katsube, T., Imawaka, N., Kawano, Y., Yamazaki, Y., Shiwaku, K. and Yamane, Y. (2006). Antioxidant flavonol glycosides in mulberry (*M. alba* L.) leaves isolated based on LDL antioxidant activity. *Food Chemistry*, **97**, 25-31.
  30. Enkhmaa, B., Shiwaku, K., Katsube, T., Kitajima, K., Anuurad, E. and Yamasaki, M. (2005). Mulberry (*M. alba* L.) leaves and their major flavonol quercetin 3-(6- malonylglucoside) attenuate atherosclerotic lesion development in LDL receptor-deficient mice. *Journal of Nutrition*, **135**, 729-734.
  31. Liu, L.K., Lee, H.J., Shih, Y.W., Chyau, C.C. and Wang, C.J. (2008). Mulberry Anthocyanin Extracts Inhibit LDL Oxidation and Macrophage-Derived Foam Cell Formation Induced by Oxidative LDL. *Journal of Food Science*, **73**, 6.