



**TÜRKİYE CUMHURİYETİ
ADANA ALPARSLAN TÜRKER BİLİM VE TEKNOLOJİ
ÜNİVERSİTESİ**

**LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ
GIDA MÜHENDİSLİĞİ ANABİLİM DALI**

**FARKLI YÖNTEMLERLE EKSTRAKTE EDİLEN ZEYTİN
YAPRAKLARININ ANTİMİKROBİYAL VE ANTIQUORUM SENSİNG
AKTİVİTELERİNİN BELİRLENMESİ**

**DENİZ KARAMAZAKCADİK
YÜKSEK LİSANS TEZİ**



**TÜRKİYE CUMHURİYETİ
ADANA ALPARSLAN TÜRKER BİLİM VE TEKNOLOJİ
ÜNİVERSİTESİ**

**LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ
GIDA MÜHENDİSLİĞİ ANABİLİM DALI**

**FARKLI YÖNTEMLERLE EKSTRAKTE EDİLEN ZEYTİN
YAPRAKLARININ ANTİMİKROBİYAL VE ANTIQUORUM SENSING
AKTİVİTELERİNİN BELİRLENMESİ**

**DENİZ KARAMAZAKCADİK
YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**DANIŞMAN
DOÇ. DR. PINAR KADİROĞLU KELEBEK**

ADANA, 2023

ÖZET

FARKLI YÖNTEMLERLE EKSTRAKTE EDİLEN ZEYTİN YAPRAKLARININ ANTİMİKROBİYAL VE ANTIQUORUM SENSING AKTİVİTELERİNİN BELİRLENMESİ

Deniz KARAMAZAKCADİK

Yüksek Lisans, Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı

Danışman: Doç. Dr. Pınar KADİROĞLU KELEBEK

Temmuz 2023, 48 sayfa

Bu çalışmanın amacı; farklı çözümler ve klasik çözümlerle ekstraksiyonu, ultrason destekli ekstraksiyon ve mikrodalga destekli ekstraksiyon yöntemleri kullanılarak zeytin yapraklarından toplam fenolik madde içeriği zengin ekstrakt elde edilmesi, zeytin yaprağı ekstraktlarının antioksidan kapasitelerinin, antimikrobiyal aktivitelerinin ve antiquorum sensing (bakteriyel iletişim/çevreyi algılama) özelliklerinin belirlenmesidir.

Farklı çözümler kullanılarak ve farklı yöntemlerle elde edilen zeytin yaprağı ekstraktlarının toplam fenolik madde miktarının belirlenmesi amacıyla Folin-Ciocalteu metodu uygulanmıştır. Zeytin yapraklarının antioksidan aktivite değerleri DPPH radikal süpürücü aktivite yöntemi ve ABTS radikal katyonu kullanılarak troloks eşdeğeri antioksidan kapasite (TEAC) yöntemleri ile belirlenmiştir. Farklı çözümler ve ekstraksiyon yöntemleri ile elde edilen ekstraktların gıda kaynaklı patojen bakterilerden *Staphylococcus aureus* ATCC 29213, *Escherichia coli* ATCC 25922 ile *Bacillus subtilis* ATCC 11774 ve *Klebsiella pneumoniae* ATCC 13883 test mikroorganizmaları üzerine antimikrobiyal aktiviteleri incelenmiştir. Ayrıca quorum sensing inhibisyon etkisinin değerlendirilmesinde model mikroorganizmalar olarak *Chromobacterium (C.) violaceum* CV026, *C. violaceum* ATCC 12472, *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 kullanılmıştır. Çalışma sonucunda zeytin yaprağının su kullanılarak mikrodalga destekli ekstraksiyonu ile elde edilen ekstraktın toplam fenolik madde miktarı, antioksidan kapasitesi ve antimikrobiyal aktivitesi daha yüksek bulunmuştur. Antiquorum sensing aktivitesi açısından değerlendirildiğinde mikrodalga destekli ekstraksiyon yöntemi ile elde edilen su ve metanol-su ekstraktları *C. violaceum* CV026 ve ATCC12472 suşları üzerinde daha yüksek aktivite göstermişlerdir.

Anahtar Kelimeler: Zeytin yaprağı, ekstraksiyon, ultrason, mikrodalga, antiquorum sensing

ABSTRACT

DETERMINATION OF ANTIMICROBIAL AND ANTIQUORUM SENSING ACTIVITIES OF OLIVE LEAF EXTRACTED BY DIFFERENT METHODS

Deniz KARAMAZAKCADİK

M.Sc., Food Engineering Department

Supervisor: Assoc. Prof. Dr. Pınar KADİROĞLU KELEBEK

July 2023, 48 pages

The aim of this study was to obtain an extract rich in total phenolic content from olive leaves using different extraction methods, and to determine the antioxidant capacities, antimicrobial activities, and antiquorum sensing properties of olive leaf extracts. In this context, olive leaves were extracted using classical solvent extraction, ultrasound-assisted extraction, and microwave-assisted extraction methods, and the antimicrobial activities and quorum sensing inhibition effects of the obtained extracts were evaluated.

The total phenolic content of olive leaf extracts obtained by using different solvents and extraction methods was determined using the Folin-Ciocalteu method. The antioxidant activity values of olive leaves were assessed using the DPPH radical scavenging activity method and Trolox equivalent antioxidant capacity determination (TEAC) method using the ABTS radical cation. The antimicrobial activities of the extracts obtained using different solvents and extraction methods against the foodborne pathogenic bacteria *Staphylococcus aureus* ATCC 29213, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Bacillus subtilis* ATCC 11774, and *Klebsiella pneumoniae* ATCC 13883 were investigated. In addition, *Chromobacterium (C.) violaceum* CV026, *C. violaceum* ATCC 12472 and *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 were used as model microorganisms to evaluate the inhibition effect of quorum sensing.

The total phenolic content, antioxidant capacity, and antimicrobial activity of the extract obtained by the microwave-assisted extraction of olive leaves with water were found to be higher. When evaluated in terms of antiquorum-sensing activity, water and methanol-water extracts obtained by the microwave-assisted extraction method showed higher activity against *C. violaceum* CV026 and ATCC12472 strains.

Keywords: Olive leaf, extraction, ultrasound, microwave, antiquorum sensing

TEŞEKKÜR

Öncelikle çalışmam boyunca her türlü desteklerini, yardımlarını benden esirgemeyen, bilgisinden tecrübesinden faydalandığım, zorlandığımda yolumu aydınlatan değerli danışman hocam Doç. Dr. Pınar KADİROĞLU KELEBEK'e teşekkürlerimi borç bilirim.

Laboratuvar çalışmalarım boyunca bilgilerinden, deneyimlerinden yararlandığım, güler yüzünü ve hoşgörülerini üzerimden eksik etmeyen doktora öğrencileri Betül KILINÇLI ve Ceren İLĞAZ'a teşekkür ederim.

Beni bu günlere getiren, fedakarlıktan kaçınmayan, beni yüreklendiren ailemin değerli üyelerine sevgilerimi ve şükranlarımı sunarım.

Bu tez Adana Alparslan Türkeş Bilim ve Teknoloji Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi tarafından 21103016 proje numarası ile desteklenmiştir.

İÇİNDEKİLER

JÜRİ ONAY SAYFASI	Hata! Yer işareti tanımlanmamış.
BİLİMSEL ETİĞE UYGUNLUK BEYANNAMESİ	Hata! Yer işareti tanımlanmamış.
ÖZET	i
ABSTRACT	ii
TEŞEKKÜR	iii
İÇİNDEKİLER	iv
ŞEKİL LİSTESİ	vi
TABLO LİSTESİ	vii
KISALTMALAR	viii
SEMBOLLER	ix
1. GİRİŞ	1
2. KURAMSAL TEMELLER VE KAYNAK ARAŞTIRMASI	3
2.1. Klasik Çözücü Ekstraksiyonu	4
2.1.1. Ultrases/Ultrason Destekli Ekstraksiyon	5
2.1.2. Mikrodalga destekli Ekstraksiyon	6
2.2. Zeytin Yaprığının Antimikrobiyal Aktivitesi	8
2.3. Quorum Sensing İnhibisyon Mekanizması	12
2.3.1. <i>Pseudomonas aeruginosa</i> Quorum Sensing Mekanizması	14
2.3.2. <i>Chromobacterium violaceum</i> Quorum Sensing Mekanizması	15
2.4. Bitkisel Materyaller ile Quorum Sensing Mekanizmanın İnhibisyonu	15
3. MATERYAL VE METOT	18
3.1. Materyal	18
3.2. Metot	18
3.2.1. Örneklerin Ekstrakte Edilmesi	18
3.2.1.1. <i>Klasik çözücü ekstraksiyonu</i>	18
3.2.1.2. <i>Ultrason destekli ekstraksiyon</i>	19
3.2.1.3. <i>Mikrodalga destekli ekstraksiyon</i>	20
3.2.2. Toplam Fenolik Madde Tayini	21
3.2.3. Antioksidan Kapasite Analizi	21
3.2.3.1. <i>DPPH (2,2-Difenil-1-pikrilhidrazil) Radikal Süpürme Kapasitesi</i>	
Yöntemi	21

3.2.3.2. <i>ABTS Katyon Radikali Giderme Aktivitesi ile Antioksidan Tayini</i>	21
3.2.4. Antimikrobiyal Aktivite	21
3.2.5. Antiquorum Sensing Aktivite Tayini	22
3.2.5.1. <i>Mik Değerinin Tespiti</i>	23
3.2.5.2. <i>Viyolasin Üretiminin İnhibisyonu</i>	23
3.2.5.3. <i>Kayma Testi</i>	24
3.3. İstatistiksel Analiz	24
4. BULGULAR VE TARTIŞMA	25
4.1. Toplam Fenolik Madde Tayini	25
4.2. Antimikrobiyal Aktivite ve MİK Değerlerinin Belirlenmesi	27
4.3 Zeytin Yaprığı Ekstraktlarının Antiquorum Sensing Aktivitesinin Belirlenmesi	30
4.3.1. Viyolasin Üretiminin İnhibisyonu	33
4.3.2. Kayma hareketinin inhibisyonu	36
5. SONUÇ	37
6. KAYNAKÇA	39

ŞEKİL LİSTESİ

Şekil 2.1. Viyolasinin kimyasal yapısı	12
Şekil 2.2. <i>P. aeruginosa</i> 'nın quorum sensing sistemi aşamaları	15
Şekil 3.1. Zeytin yaprağı kurutulmuş/öğütülmüş	18
Şekil 3.2. Çözücülerin evapore edilerek uzaklaştırılması	19
Şekil 3.3. Mikrodalga destekli ekstraksiyon yöntemi	20
Şekil 3.4. Mikrodalga destekli ekstraksiyon koşulları	20
Şekil 3.5. Viyolasin üretim inhibisyonuna bağlı örneklerde renk değişimi	24
Şekil 4.1. MD ekstraktlarının <i>C.violaceum</i> CV026 üzerine antiquorum sensing aktivitesi	31

TABLO LİSTESİ

Tablo 1.1. Zeytin yaprağı ekstresinde kullanılan ekstraksiyon yöntemleri	4
Tablo 4.1. Toplam fenolik madde tayini ve antioksidan aktivitenin belirlenmesi	26
Tablo 4.2. Ekstraktların <i>S.auerus</i> ATCC 23123 bakterisi üzerine MİK değerinin belirlenmesi	28
Tablo 4.3. Ekstraktların <i>Bacillus subtilis</i> ATCC 11774 bakterisi üzerine MİK değerlerinin belirlenmesi	29
Tablo 4.4. Ekstraktların <i>K.pneumoniae</i> ATCC 13883 bakterisi üzerine MİK değerlerinin belirlenmesi	30
Tablo 4.5. Ekstraktlara ait quorum sensing inhibisyon etkisinin belirlenmesi	31
Tablo 4.6. Ekstraktların anti-quorum sensing aktivitesinin MİK değeri belirlenmesi	33
Tablo 4.7. Ekstraktların <i>C.violaceum</i> ATCC 12472 bakterisinin viyolasin pigmenti üretimi üzerine inhibisyonu	34
Tablo 4.8. Ekstraktların <i>C.violaceum</i> CV026 bakterisinin viyolasin pigmenti üretimi üzerine inhibisyonu	35
Tablo 4.9. Ekstraktların <i>P.aeruginosa</i> PA01 bakterisi üzerinde kayma hareketinin inhibisyonu	36

KISALTMALAR

AHL	: Açıl-Homoserin Lakton
C6HSL	: N-hexanoyl-L-Homoserine lactone
DMSO	: Dimetil Sülfoksit
Gram (-)	: Gram Negatif
Gram (+)	: Gram Pozitif
HHL	: Hekzanol homoserin lakton
KES	: Klasik Çözücü Ekstraksiyon Etanol-Su
KMS	: Klasik Çözücü Ekstraksiyon Metanol-Su
KS	: Klasik Çözücü Ekstraksiyon Su
LB	: Luria-Bertani
MDE	: Mikrodalga destekli ekstraksiyon
MDES	: Mikrodalga Destekli Ekstraksiyon Etanol-Su
MDMS	: Mikrodalga Destekli Ekstraksiyon Metanol-Su
MDS	: Mikrodalga Destekli Ekstraksiyon Su
MHA	: Mueller Hinton Agar
MİK	: Minimum İnhibisyon Konsantrasyonu
NA	: Nutrient Agar
NB	: Nutrient Broth
QS	: Quorum Sensing
UDE	: Ultrason Destekli Ekstraksiyon
UDEMŞ	: Ultrason Destekli Ekstraksiyon Metanol-Su
UDES	: Ultrason Destekli Ekstraksiyon Etanol-Su

SEMBOLLER

°C	: Santigrat derece
dk	: Dakika
gr	: Gram
mg	: Miligram
mg/ml	: Miligram bölü mililitre
ml	: Mililitre
nm	: Nanometre
s	: Saniye
µL	: Mikrolitre
mm	: Milimetre
kHz	: Kilohertz
W	: Watt

1. GİRİŞ

Tarım sanayisinde ürünlerin işlenmesi ve hasat edilmesi ile birçok yan ürün meydana gelmektedir. Yan ürünlerin bazıları önemli miktarda fenolik bileşikler içermektedir. Zeytin ağacı yetiştiriciliğinde ve işlenmesinde fenolik bileşikler açısından zengin yan ürünler çıkmaktadır. Bu yan ürünlerden birisi de zeytin yaprağıdır. Tarımsal ve endüstriyel bir atık olan zeytin yaprakları ucuz bir polifenol kaynağıdır (Borjan, Leitgeb, Knez ve Hrnčič, 2020). Son zamanlarda yapılan araştırmalardan elde edilen sonuçlar, zeytin yaprağının sağlığa faydalı etkilerinin olduğunu ve bu durumun yaprakta bulunan fenolik bileşikler ile ilgisini göstermektedir (Sudjana ve diğerleri, 2009). Zeytin yapraklarındaki fenolik bileşiklerce zengin ekstraktların elde edilmesinde çeşitli yöntemler kullanılmaktadır (Ahmad-Qasem ve diğerleri, 2013). Bu yöntemlerden klasik çözücü ekstraksiyonu, ultrases destekli ekstraksiyon ve mikrodalga destekli ekstraksiyon yöntemleri çalışmamızda karşılaştırılmalı olarak değerlendirilmiştir.

Halk sağlığı açısından önemli problemlerden biri gıdaların patojen mikroorganizmalarla kontaminasyonudur. Bakteriler arasında, etrafa saldıkları sinyal molekülleri sayesinde kurulan iletişim ile ortamdaki mikroorganizma popülasyon yoğunluğunun düzenlenmesi ve belirli yoğunlukta gen ekspresyonu ile kontrol sağlanması olayı bakteriyel iletişim sistemi (quorum sensing, QS) olarak adlandırılmaktadır (Wagner, Bushnell, Passador, Brooks ve Iglewski, 2003). Birçok patojen, virulans özelliklerini düzenlemek amacıyla bakteriyel iletişim sistemi mekanizmasını kullanırlar. Bakterilerin iletişim aktivitesini çeşitli ajanlarla engellemek, hastalık yapan mikroorganizmaların biyokontrolü açısından önem taşımaktadır (El-sayeed, 2020).

Bakteriyel iletişim sisteminin inaktif hale gelmesi; sinyal molekülünün üretiminin durdurulması, sinyal molekülünün etkisiz hale getirilmesi ve sinyal molekül reseptörünün engellenmesi ile gerçekleştirilmektedir. Kimyasal inhibitörler yerine onlara alternatif olabilecek bitkisel ekstraktlar kullanmak anti-quorum sensing etkiyi; sinyal moleküllerinin sentezlenmesini azaltarak, sinyal moleküllerini inhibe ederek, reseptör proteinlerinin aktivitesini azaltarak, reseptör proteinlerinden sinyal moleküllerini ayırarak ve sinyal

moleküllerinin yerine geçerek gerçekleştirmektedir (Truchado, Larrosa, Castro-Ib   ez ve Allende, 2015).

Bitkisel materyaller, antimikrobiyal aktiviteden sorumlu olan fenolik asitler, flavonlar, saponinler, terpeneoidler, kumarin türevleri ve alkaloidler gibi fitokimyasalları içermektedir. Bu sebeble quorum sensing (QS) inhibisyon için, bitkisel materyallerin iyi bir kaynak olduğu belirtilmektedir (Majik, Gawas ve Mandrekar, 2020).

Bu çalışmada; zeytin yapraklarından klasik         ekstraksiyonu, ultrases destekli ekstraksiyon ve mikrodalga destekli ekstraksiyon yöntemleri kullanılarak ekstraktlar elde edilmiş ve toplam fenolik madde içerikleri belirlenerek karşılaştırılmıştır. Ayrıca, zeytin yaprağı ekstraktlarının antioksidan kapasiteleri, antimikrobiyal aktiviteleri ve antiquorum sensing özellikleri belirlenmiştir. Bu kapsamda, elde edilen ekstraktların gıda kaynaklı patojen bakterilerden *Bacillus subtilis* ATCC 11774, *Staphylococcus aureus* ATCC 29213, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Klebsiella pneumoniae* ATCC 13883 test mikroorganizmaları üzerine antimikrobiyal aktivitesi incelenmiştir. Ayrıca model mikroorganizmalar olarak seçilen *C. violaceum* CV026, *C. violaceum* ATCC 1247 ve *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 bakterileri kullanılarak ekstraktların quorum sensing inhibisyon etkisi değerlendirilmiştir.

2. KURAMSAL TEMELLER VE KAYNAK ARAŞTIRMASI

Zeytin (*Olea europaea* L.), *Oleaceae* familyasına ait bilinen en eski bitkilerden biridir. Zeytin dünyanın çeşitli yerlerinde yetiştirilse de en çok Akdeniz’de yetiştirilmekte ve zeytin yetiştiriciliğinin yaklaşık %98’ini oluşturmaktadır (Tallhaoui, Gómez, Fernández, Taamalli ve Segura- Carretero 2015; Ghanbari, Anwar, Alkharfy, Gilani ve Saari, 2012). Zeytin ağaçları Türkiye, İtalya, Yunanistan, İspanya, Fransa, Fas, Portekiz, Cezayir, Tunus, Mısır, İsrail ve Suriye dahil olmak üzere Akdeniz ve Amerika Birleşik Devletleri'nin Kaliforniya eyaletinde yetiştirilmektedir. *Olea europaea* olarak bilinen ağacın meyvesi olan zeytin, ülkemizin Ege, Akdeniz, Marmara ve Güneydoğu Anadolu bölgelerinde yetişmektedir (Çelik, Aksoy ve Özkaya, 2016). Zeytin ağaçlarından ve zeytinyağı ekstraktlarından elde edilen yan ürünler genellikle "zeytin yan ürünleri" olarak bilinir ve zeytin yaprağı bunlardan biridir. Zeytin yaprağının elde edilmesi; zeytin ağaçlarından meyvelerin toplanması, budanması, harmanlama ve temizleme işlemleri sırasında gerçekleşmektedir. Zeytin yaprağı, yağ ekstraksiyonunun gerçekleştirilmesi için kullanılır ve toplam zeytin ağırlığının % 10’unu oluşturmaktadır (Talhaoui ve diğerleri, 2015).

Zeytin yaprağının içeriğinde bulunan fenolik bileşikler nedeniyle biyoaktivite gösterdiği belirtilmektedir. Zeytin yaprağında en çok bulunan fenolik bileşikler elenolik asit ve oleuropeindir. Zeytin yapraklarından fenolik bileşik ekstraksiyonunda genellikle klasik çözücü ekstraksiyon yöntemi kullanılmaktadır. Klasik çözücü ekstraksiyon yöntemini etkileyen parametreler; sıcaklık, çözücü tipi, pH, katı:sıvı oranı ve katı maddenin parçacık büyüklüğü gibi faktörlerdir. Ekstraksiyon yönteminde çözücü madde olarak su, metanol, etanol, hekzan, dietil eter, etil asetat kullanılmaktadır. Klasik çözücü ekstraksiyonunda, son üründe yadsınamaz derecede bulunan toksik kalıntılar, kullanılan çözücüye bağlı olarak olarak değişkenlik göstermektedir. Bunlara ilave olarak, pH ve yüksek sıcaklık fenolik bileşik kaybına neden olmaktadır (Souilem ve diğerleri, 2017).

Zeytin yaprağının ekstraksiyonunda geleneksel ekstraksiyon yöntemleri yanında yeni yöntemler de kullanılmaktadır. Geleneksel yöntemlerde daha fazla zaman harcanmakta ve çok miktarda çözücüye gerek duyulmakta iken yeni tekniklerin kullanımı ile ekstraksiyon süresi kısalmakta ve kullanılan organik çözücü miktarı azalmaktadır. Yeni ekstraksiyon yöntemlerine mikrodalga destekli ekstraksiyon, ultrason (ultrases) destekli ve süperkritik

akışkan ekstraksiyon sistemleri örnek verilebilir (Tavman, Kumcuoğlu ve Akkaya, 2009; Kutlu, İşçi, Sakiyan ve Yılmaz, 2021).

Zeytin yaprağı ekstraktı eldesinde kullanılan çözücü çeşitleri ve ekstraksiyon yöntemleri sonucunda elde edilen toplam fenolik madde içeriği ve antioksidan tayini sonuçları Tablo 1’de gösterilmiştir.

Tablo 1.1. Zeytin yaprağı ekstresinde kullanılan ekstraksiyon yöntemleri

Ekstraksiyon yöntemi	Çözücü	Toplam fenolik madde miktarı	Antioksidan aktivite	Referans
Klasik çözücü ekstraksiyonu	Su	3653 ±73 mg GAE/L	3011 ±60 mg Trolaks/L	Boli ve diğerleri, 2022
Mikrodalga destekli ekstraksiyon	Etanol	4166 ± 84 mg GAE/L kuru yaprak (Gallik asit eşdeğeri)	3848 ±77 mg Trolaks/L	Boli ve diğerleri, 2022
Soxhlet ekstraksiyon	Etanol	353,6±0,5 mmol GAE/kg kuru yaprak (Gallik asit eşdeğeri) ,	428,6 ± 4,0 mmol TE/kg kuru yaprak	Lama-Muñoz ve diğerleri, 2020
Basınçlı akışkan ekstraksiyonu	Etanol	348,9 ±3,8 mmol GAE/kg kuru yaprak (Gallik asit eşdeğeri)	431,8 ± 80,7 mmol TE/kg kuru yaprak	Lama-Muñoz ve diğerleri, 2020
Ultrason destekli ekstraksiyonu	Su	51,77 ±1,44 mg GAE/g kuru yaprak (Gallik asit eşdeğeri)	57,31 ± 0,35 mg RE/g kuru yaprak	Yao ve diğerleri., 2019

2.1. Klasik Çözücü Ekstraksiyonu

Klasik çözücü ekstraksiyonu çözücü ve katı maddenin zamanla temas etmesi ile örnekte bulunan bileşik veya bileşiklerin çözünmesi ve çözücünün katı maddeden ayrılması şeklinde gerçekleşmektedir. Klasik çözücü ekstraksiyonu, çözücünün katı madde içine girişi, kullanılan çözücüye bağlı olarak bileşiklerin çözücü içerisinde çözünmesi, ekstrakte edilen çözünen bileşenlerin katı maddeden ayrılması sonucu çözeltiye geçmesi ve çözücünün gerekli yöntemlerle ekstraktan uzaklaştırılması şeklindedir. Bu proseste çözücü de, ekstraktın hammaddeye ayrılma işlemi sırasında dokuda kalabilmektedir. Bu yüzden, verimli ekstraksiyonun yapılması için ekstraksiyon aynı hammadde üzerinde 2-3 kez tekrarlanmalıdır (Büyüktuncel, 2012). Klasik çözücü ekstraksiyon yöntemi kullanılan çalışmalardan birkaçı aşağıda özetlenmiştir.

Elmadan fenolik bileşik ekstraksiyonu için yanıt yüzey yöntemi kullanılarak optimizasyon çalışması yapılmıştır. Çalışmada sıcaklık (10-40 °C), çözücü konsantrasyonu (% 70-99.9 metanol ve % 50- 80 aseton) ve zaman (10-20 dakika) parametreleri değerlendirilmiştir. Asetonun çözücü olarak kullanıldığı ekstraksiyonda; 10 °C'de % 65 aseton ile 20 dakika olarak, metanol ile gerçekleştirilmiş olan ekstraksiyonda 28 °C'de % 84.5 metanol ile 15 dakika optimum koşullar olarak belirlenmiştir (Alberti ve diğerleri, 2014).

Vazquez ve diğerleri (2012) yaptıkları çalışmada kestane tohumu kabuğundan klasik çözücü ekstraksiyon yöntemi ile antioksidan optimizasyonu çalışması gerçekleştirmişlerdir. Etanol ve metanolün çözücü olarak kullanıldığı çalışmada bağımlı değişkenleri zaman (30-120 dakika), çözücü konsantrasyonu (% 50-90) ve sıcaklık (25-75 °C) olarak belirlemişlerdir. Çalışmada antioksidan aktivite ve fenolik madde, ekstraksiyon verimi incelenmiştir. Etanolün çözücü olarak kullanıldığı denemelerde 75°C'de 30 dakika boyunca % 50 etanol, metanol kullanılan denemelerde 75°C 'de 75 dakika boyunca %50 metanol konsantrasyonu optimum ekstraksiyon koşulları olarak tespit edilmiştir.

2.1.1. Ultrason Destekli Ekstraksiyon

Ultrason destekli ekstraksiyon, 20 kHz üstünde yüksek frekanslı ses dalgalarının sıvı ortama iletilmesi, moleküller arasında kavitasyon boşluklarının sıvı ortamda oluşması, sıvı içerisindeki katı fazı oluşturan hücre duvarını kavitasyon gücünün parçalaması ve ekstraksiyon sonucu aktif bileşenlerin maddeden ayrılması şeklinde meydana gelmektedir. Ultrason destekli ekstraksiyon ultrasonik banyo veya prob içeren sistemlerde gerçekleştirilmektedir. Ultrasonik prob içeren ekstraksiyonda, ultrasonik gücün ortama direkt olarak aktarılması probun örnek olan ortama daldırılması ile gerçekleşmektedir. Ultrasonik banyo kullanılan sistemlerde, ekstraksiyon dolaylı olarak gerçekleşmektedir. Bu yöntemde, ultrasonik güç önce banyo içerisindeki sıvıya, ardından ekstraksiyonun gerçekleştirileceği kabın dış yüzeyine, kabın dış yüzeyinden de ortama aktarılmaktadır. Bu çalışmalarda katı-madde çözücü oranının banyo hacmine göre ayarlanması gerekmektedir. Buna ek olarak, bu tip ekstraksiyon çalışmalarında ekstraksiyon boyunca çözücü konsantrasyonunun sabit olması çözücülerin uçucu özelliği olduğu için zor olmaktadır. Genellikle banyo ve prob sistemlerinin olumlu tarafları olduğu gibi olumsuz tarafları da bulunmaktadır. Ultrasonik prob sistemi, ultrasonik banyo sistemlerine göre ekstraksiyon verimi bakımından 100 kat daha etkilidir.

Prob kullanılan sistemlerde uçuşu bileşiklerin kaybının nedeni açık sistemler olması ve probun aşınması sonucu örneğe metal bulaşmasıdır (Santos ve Capelo, 2007).

Ultrason destekli ekstraksiyon, ekstraksiyon süresini kısaltmakla beraber enerji ve solvent kullanımını da azaltmaktadır. Ekstraksiyon için ultrason enerjisi daha etkili karıştırmayı aynı zamanda daha hızlı enerji transferi sağlamaktadır (Chemat, Tomao ve Viot, 2008).

Ultrason destekli ekstraksiyon ile bitkisel kaynaklardan fenolik madde ekstraksiyonu ile ilgili yapılmış birçok çalışma bulunmaktadır. Ultrason destekli ekstraksiyon yöntemi ile *Zizyphus lotus* meyvesinden ekstraksiyon koşullarının optimize edildiği çalışmada parametreler; sıcaklık, zaman, etanol konsantrasyonu, çözücü-katı oranı olarak seçilmiştir. Ekstraksiyon için optimum çalışma koşulları: % 50 etanol konsantrasyonu, 63°C sıcaklık, 67 mL/g çözücü:katı oranı, 25 dk ekstraksiyon süresi olarak belirlenmiştir. Bu koşullar altında elde edilen ekstraktın fenolik madde miktarı yüksek oranda bulunmuştur (Hammi, Jdey, Abdelly, Majdoub ve Ksouri, 2015).

Bir başka çalışmada elma posasından fenolik madde ekstraktı elde etmek için ultrason destekli ekstraksiyon uygulanmıştır. Etanol konsantrasyonu %50 olarak kullanılan çalışmada klasik çözücü ekstraksiyonu ile ultrason destekli ekstraksiyon karşılaştırılmıştır. Ultrason destekli ekstraksiyon uygulamasından klasik çözücü ekstraksiyona göre % 20 daha fazla verim elde edilmiştir (Viot, Tamao, Le Bourvellec, Renard ve Chemat, 2010).

2.1.2. Mikrodalga destekli Ekstraksiyon

Mikrodalga destekli ekstraksiyon (MDE), analitleri numune matrisinden çözücüye ayırmak amacıyla numune ile temas halindeki çözücülerini ısıtmak için mikrodalga enerjisi kullanma işlemidir. Mikrodalga destekli ekstraksiyon yöntemi yeşil bir ekstraksiyon tekniğidir ve ekstraksiyon süresinin az olması, solvent tüketiminin azaltılması, aynı anda birden fazla örneğin ekstrakte edilebilmesi ve ekstraksiyon veriminin yüksek olması gibi avantajları bulunmaktadır (Eskilsson, Björklund, 2000). MDE, modern numune hazırlama teknikleri için gereken minimum kriterlere büyük ölçüde uygundur ve çok çeşitli matrislerden organik ve organometalik bileşiklerin ekstraksiyonu için geleneksel yaklaşımlara çok çekici bir alternatif sunmaktadır (Llompert, Garcia- Jares, Celerio ve Dagnac, 2019).

Mikrodalga destekli ekstraksiyon, 300 MHz ila 300 GHz arasında değişen frekanslara sahip iyonlaştırıcı olmayan elektromanyetik dalgaların bir numune matrisine uygulanması

sonucunda hücrelerin yapısındaki bozulma veya değişikliklere dayanmaktadır (Leonelli, Veronasi ve Cravotto, 2012). MDE'deki enerji transferi, çoğu MDE uygulamasında aynı anda meydana gelebilen iyonik iletim ve dipol rotasyonu mekanizmaları aracılığıyla gerçekleşir. İyonik iletim mekanizması, elektromanyetik dalgalar uygulanırken çözücünün iyonik göçe karşı direncinden dolayı ortamda homojen bir ısıya neden olan iyonların bir çözelti içerisinde göç etmesi ile ilgilidir (Veggi, Martinez ve Meireles, 2012). Dipol rotasyonu, moleküllerin elektrik alanı yönünde yeniden yönlendirilmesine katkıda bulunur ve düzensiz bir duruma geri dönen moleküllerin çalkalanması nedeniyle elektromanyetik dalgalar kaldırıldığında termal çalkalanmaya neden olur (Chemat ve diğerleri, 2017). MDE sırasında mikrodalga ısıtmanın ana hedefi numune matrisinin nem içeriğidir. Su buharlaştıkça hücre içi basınç artar, hücre duvarları parçalanır ve değerli bileşiklerin sızması artar (Sosa-Hernandez ve diğerleri, 2018). Konvansiyonel ekstraksiyon işlemlerinde, ısıtma ortamından hücrelerin içine ısı transferi gerçekleşirken, çözünen maddelerin kütle transferi ters bir yön takip eder. MDE işleminde, hem ısı hem de kütle gradyanları, hücrelerin dışına doğru aynı yönde çalışır ve bu işlemin süresini azaltırken değerli bileşiklerin ekstraksiyon verimini artırmaya izin verir (Veggi ve diğerleri, 2012).

Mikrodalga destekli ekstraksiyon sisteminin avantajları; bitkilerden elde edilen biyoaktif maddelerin ekstraksiyonu için daha hızlı ısıtma sağlaması, termal gradyanı azaltması, ekstrak örnek olarak verilebilir. MDE, biyoaktif bileşikler daha hızlı ekstrakte edebilir ve diğer konvansiyonel ekstraksiyon işlemlerine göre geri kazanımı daha mümkün kılmaktadır. MDE aynı zamanda organik çözücü kullanımı azaltması ile çevre dostu teknoloji olarak kabul edilmektedir (Alupului, Calinescu ve Lavric, 2012).

İnce, Şahin ve Şümnü (2013) melisa bitkisinden fenolik madde ekstraksiyonu için mikrodalga, ultrason destekli ekstraksiyon ve klasik ekstraksiyon yöntemlerini uygulamışlardır. Çözücü olarak su kullanılan çalışmada mikrodalga için güç sabit tutulmuştur. Ekstraksiyon süresi 5- 10-15-20 dakika, çözücü oranları 1:10, 1:20, 1:30 g/mL olarak seçilmiştir. Toplam fenolik madde içeriği ve antioksidan aktivite diğer ekstraksiyon yöntemleri ile kıyaslandığında en yüksek mikrodalga destekli ekstraksiyon yöntemiyle elde edilmiştir.

Kapariden fenolik bileşik ekstraksiyonu için, mikrodalga destekli ekstraksiyon yöntemi ve konvansiyonel ekstraksiyonun karşılaştırıldığı çalışmada, ekstraksiyon süresi (5, 10 ve 15 dakika), katı:çözücü oranı (1:10, 1:20, 1:30 g/mL) ve farklı mikrodalga gücü (400 ve 700 W)

bağımsız değişkenler olarak belirlenmiştir. Çözücü olarak su , etanol ve etanol-su karışımı kullanılmıştır. En yüksek fenolik madde miktarına 400 W mikrodalga gücü, 5 dakika ekstraksiyon süresi, 1:30 g/mL etanol-su karışımında ulaşıldığını belirtmişlerdir. Konvansiyonel ekstraksiyon yönteminde ise, 1:30 g/mL katı:çözücü oranı ile 4 saat sonunda maksimum verime ulaşılmıştır. Böylelikle mikrodalga destekli ekstraksiyon yönteminin ekstraksiyon süresini önemli ölçüde azalttığını tespit etmişlerdir (Durmaz, Sümnü ve Şahin, 2015).

Yapılan bir çalışmada mikrodalga destekli ekstraksiyon ve maserasyon yöntemleri kullanılarak elde edilen zeytin yaprağı ekstraktının toplam fenolik madde miktarı incelenmiştir. Çözücü olarak etanol, metanol ve aseton kullanıldığı çalışmada, ekstraksiyon süresi (3, 6, 9, 12, 15, 18,21 ve 24 dakika) olarak belirlenmiştir. En yüksek fenolik madde miktarı, mikrodalga destekli ekstraksiyon yöntemi ile elde edilen, çözücünün etanol ve ekstraksiyon süresinin 15 dk olduğu ekstrakta, 88.298 mgTAE/g kuru madde olarak bulunmuştur. Ayrıca mikrodalga destekli ekstraksiyon, maserasyon yöntemi ile kıyaslandığında daha yüksek ekstraksiyon verimine sahip olduğu tespit edilmiştir (Rafiee, Jafari, Alami ve Khomeiri, 2011).

2.2. Zeytin Yapracağının Antimikrobiyal Aktivitesi

Zeytin yaprağı ekstraktı (ZYE), zeytin ağacının (*Olea europaea* L.,) yapraklarından elde edilen koyu kahverengi, acı tadı olan bir sıvıdır (Fito ve diğerleri, 2007). ZYE, geniş kapsamlı sağlık yararları olan doğal bir ilaç olarak pazarlanmaktadır. Ekstraktın antioksidan aktivitesine ve kardiyoprotektif ve kemopreventif etkiler gibi ilgili sağlık yararlarına özel vurgu yapılmaktadır (Sudjana ve diğerleri, 2009). ZYE, ekstreya çeşitli terapötik özelliklerini verdiği düşünülen, toplu olarak zeytin biyofenolleri olarak adlandırılan birçok farklı bileşik içerir. En fazla bulunan biyofenol oleuropein olup, verbaskozid, apigenin-7-glukozid ve luteolin-7-glukozid gibi diğer biyofenoller daha düşük miktarlarda bulunmaktadır (Japón-Luján ve Castro, 2006). Ekstraktın kompozisyonunu etkileyen faktörler; bitki besleme, coğrafi konum ve ürün çeşidi gibi farklılıklardan kaynaklanan varyasyonlardır (Sudjana ve diğerleri, 2009).

Zeytin yaprağının yapısında bulunan fenolik bileşenlerin antibakteriyel, antifungal ve antiviral etkileri yapılan *in vitro* çalışmalarla ortaya konmuştur. Araştırmacılar tarafından oleuropein, hidroksitirosol, 4-hidroksibenzoik asit, vanilik asit ve p-kumarik asit gibi bileşiklerin

antimikrobiyal aktivite gösteren bileşikler olduğu bildirilmiştir (Basmacı-Malayoğlu ve Aktaş, 2011).

Zeytin yaprağı ekstraktlarının *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Bacillus cereus*, *Klebsiella pneumonia*, *Vibrio parahaemolyticus* ve *Salmonella typhi* gibi birçok mikroorganizmaya karşı antimikrobiyal etkileri ortaya konmuştur (Markin, Duek ve Berdicevsky, 2003)

Zeytin yaprağı bileşiminde bulunan ve ekstraktlarından elde edilen oleuropeinin; birçok bakteri, küfler ve virüslere karşı antimikrobiyel etki gösterdiği, Gram (+) bakterilerden *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis* ve *Micrococcus luteus*, *Micrococcus sp*; Gram (-) bakterilerden ise, *Pseudomonas aeruginosa*, *Pseudomonas fluorescens*, *Salmonella typhi*, *Escherichia coli*, *Vibrio parahemolyticus* ve *Vibrio cholerae* üzerinde etkili olduğu bildirilmiştir (Keskin, Ceyhan, Uğur ve Dbeys, 2012; Sabry, 2014).

Oleuropeinin antimikrobiyel etkisinin mikroorganizmaların hücre duvarında bulunan fosfat grupları ile etkileşimi sonucu meydana geldiği, hücre duvarında fosfolipid-su yapısının dengesini değiştirdiği ve hücre duvarında bozulmaya yol açtığı bildirilmiştir (Li ve diğerleri, 2006). Başka bir çalışmada, oleuropeinin antimikrobiyal etkisini hücrenin peptidoglukan tabakasını bozarak veya bakteriyel membranlara zarar vererek gösterdiği bildirilmiştir (Bayram, Topuz ve Kaya, 2020).

Yapılan bir çalışmada, hidroksitirozolun ve oleuropein bakteri suşlarına (*Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Salmonella Typhi* ATCC 6539, *Moraxella catarrhalis* ATCC 8176, *Haemophilus influenzae* ATCC 9006, *Vibrio parahaemolyticus* ATCC 17802) ve 44 klinik izolata (*M. catarrhalis*, 6 suş, *H. influenzae*, 8 suş; *Salmonella spp.*, 15 suş; *V. cholerae*, 1 suş; *V. parahaemolyticus*, 1 suş, *V. alginolyticus*, 2 suş; *S. aureus*, 5 penisiline duyarlı suş ve 6 penisiline dirençli suş) karşı antimikrobiyal aktivitesi incelenmiştir. Oleuropeine ait MİK değerleri ATCC suşları için 62,5-500 µg/mL aralığında değişir iken, klinik izolatlar için 31,25-250 µg/mL olarak hesaplanmıştır. Hidroksitirozolun MİK değerleri ATCC suşları için; 0,24-7,85 µg/mL, klinik izolatlar için; 0,97-31,25 µg/mL aralığında belirlenmiştir (Bisignano ve diğerleri, 1999).

Gökmen, Akkaya, Kara, Gök, Önen ve Ektik (2018) yaptıkları çalışmada piyasadan sağladıkları ticari zeytin yaprağı ekstraktının 10 bakteriye karşı (*Bacillus cereus*, *Listeria*

monocytogenes, *Staphylococcus aureus*, *Proteus vulgaris*, *Enterococcus faecalis*, *Escherichia coli*, *Escherichia coli* O157, *Enterobacter sakazakii*, *Pseudomonas aeruginosa* ve *Salmonella typhimurium*) antimikrobiyal etkisini araştırmıştır. Antimikrobiyel etki , disk difüzyon metodu ve mikrodilüsyon metodu olmak üzere iki ayrı metotla belirlenmiştir. Çalışma sonucunda *Salmonella typhimurium*'a karşı zeytin yaprağı ekstraktının MİK değeri ≥ 16 mg/mL ve inhibisyon zon çapı 13.33 ± 2.08 , olarak belirlenmiştir. *E.coli* ve *E. coli* O157 için inhibisyon zon çapları sırası ile 18.00 ± 1.00 ; 17.67 ± 0.58 olarak tespit edilmiştir. MİK değerleri ise *E.coli* için ≥ 16 mg/mL ve *E.coli* O157 için ≥ 32 mg/mL olarak belirlenmiştir.

Liu, McKeever ve Malik (2017) zeytin yaprağı ekstraktının *L. monocytogenes*, *E. coli* O157:H7 ve *Salmonella enteritidis* patojenlerine karşı iki katlı dilüsyon metodu ile antimikrobiyal aktivitesini araştırmışlardır. Çalışma sonucunda zeytin yaprağı ekstraktının 62,5 mg/mL'lik konsantrasyonda patojenleri neredeyse tamamen inhibe ettiği bildirilmiştir. Ayrıca, *L. monocytogenes*'in kamçıların görevini yitirdiği taramalı elektron mikroskobu ile gözlemlenmiştir. Kamçıların görevini yitirmesi dolayısıyla hücre hareketliliğinde azalma gözlenmiştir.

Dada ve diğerleri (2013) tarafından su ve metanol kullanılarak zeytin yaprağından elde edilen ekstraktların *E. coli*'ye karşı antimikrobiyal aktivitesinin araştırıldığı bir çalışmada; metanol kullanılarak hazırlanan 50 mg/mL konsantrasyonundaki ekstraktın *E. coli*'ye karşı oluşturduğu inhibisyon zonu 10,5 mm olarak belirlenirken, su kullanılarak elde edilen ekstraktın *E. coli*'ye karşı oluşturduğu inhibisyon zonu 5,0 mm olarak belirlenmiştir.

Khanaum, Zahoor, Khan, Asghar ve Sablani (2020) tarafından bildirilen bir çalışmada çeşitli zeytin yapraklarının *E. coli*, *S. aureus*, *S. typhimurium* patojenlerine karşı antibakteriyel potansiyelini belirlemek amacıyla disk difüzyon metodu, minimum inhibisyonu konsantrasyonu ve minimum bakterisidal konsantrasyon yöntemleri kullanılmıştır. Sonuç olarak Manzanilla ve Earlik zeytin türlerinin yapraklarının *E. coli*'ye karşı bakterisidal etkisinin düşük olduğu bildirilmiştir. MİK değerleri genel olarak yüksek iken Hamdi çeşidinin *S. typhimurium* karşı MİK değerinin (0.78 ± 0.000) diğer çeşitlere göre düşük olduğu bildirilmiştir.

Aliabadi, Darsanaki, Rokhi, Nourbakhsh ve Raeisi (2012) zeytin yapraklarının sulu ekstraktlarının *S. typhimurium* PTCC 1639, *S. aureus* PTCC 1431, *B. cereus* PTCC 1274, *E. coli* PTCC 1399, *K. pneumonia* PTCC 1053 ve *B.cereus* PTCC 1274 patojenik suşlarına karşı

antimikrobiyal aktivitesini agar kuyucuk yöntemi ile belirlemişlerdir. Mikroorganizma yoğunluğu 10^9 CFU/ml olacak şekilde ayarlanmış ve Muller Hinton Agar (MHA) üzerine yayılmıştır. Kurutulmuş ekstraktlar, agar üzerinde 7 mm çapında açılan kuyucuklar içerisine konsantrasyonları DMSO ile 10, 15, 25, 30 ve 50 mg/ ml değerlerine ayarlanarak eklenmiştir 37°C ' de 24 saat inkübasyonun ardından inhibisyon zonları ölçülerek antibakteriyel aktivite değerlendirilmiştir. En yüksek inhibisyon değeri 11,5 mm olarak *S. typhimurium* PTCC 1639'a karşı bulunmuştur.

Khalil, İsmail, El-Baghdady ve Mohamed (2014) *P. aeruginosa*, *S. aureus*, *E. coli* klinik izolatlarına karşı zeytin yaprağının antibakteriyel aktivitesini agar kuyucuk yöntemi ile belirlemiştir. Zeytin yaprağı ekstraktları kullanılarak sentezlenen gümüş nanopartiküller (AgNP'ler), ilaca dirençli bakteriyel izolatlara karşı antibakteriyel aktivite için değerlendirilmiştir. Sentezlenen AgNP'lerin antibakteriyel potansiyeli, ilaca dirençli *P. aeruginosa*, *S. aureus* ve *E. coli* karşı bakteriyel gelişmeyi önemli ölçüde inhibe ettiği gözlemlenmiştir.

Kobyay, Çağlak ve Kara (2019) zeytin yaprağı ekstraktlarının antimikrobiyal aktivitesini disk difüzyon yöntemi ile *S. aureus* ATCC 25923, *Salmonella enterica* ATCC 13076, *E. coli* ATCC 25922 ve *L.monocytogenes* ATCC 43251 suşlarını kullanarak belirlemişlerdir. Çalışma sonucunda yaprakların kurutma yöntemlerinin (doğal, 60°C ve 80°C) tümünde etanol ve normal su kullanılarak elde edilen ekstraktların antimikrobiyel etkisinin olmadığı, sıcak su ile hazırlanan ekstraktların kurutma yöntemlerinin hepsinden daha fazla etkili olduğu belirtilmiştir.

Debib ve Boukhatem (2017) zeytin yaprağının antimikrobiyal aktivitesini disk difüzyon yöntemi ile belirlemişlerdir. Ekstraktlar deiyonize su, %80 metanol ve petrol eteri ile çözdürülmüştür. *S. aureus*, *B. subtilis subsp. spizizenii* ATCC 6633., *E. coli* (ATCC 25922) , *Enterobacter cloacae* (ATCC 13047), *Salmonella enterica subsp.*, *Klebsiella pneumoniae* ve *Candida albicans* test mikroorganizmaları olarak kullanılmıştır. Ekstrakte edilen zeytin yaprağı 6 mikroorganizma test suşuna karşı antimikrobiyal aktivite göstermiştir.

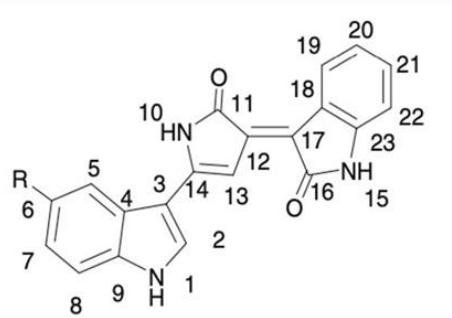
Malik (2015) zeytin yaprağının *B. cereus* ve *S. aureus* bakterileri üzerine antibakteriyel aktivitesini incelemiştir. Zeytin yaprağının metanol ekstraktı 5-8 mm inhibisyon çapı oluşturmuştur. İnhibisyon zonları incelendiğinde zeytin yaprağı ekstraktları *B. cereus*'a karşı düşük aktivite gösterirken, *S. aureus*'a karşı yüksek aktivite göstermiştir.

Sudjana ve diğerleri (2009) zeytin yaprağı ekstraktının antimikrobiyal aktivitesini araştırdıkları çalışmada 122 çeşit mikroorganizma kullanmışlar zeytin yaprağı ekstraktının en yüksek antimikrobiyal aktiviteyi *Helicobacter pylori*, *Campylobacter jejuni* ve *S. aureus*'a karşı gösterdiğini tespit etmişlerdir. *S.aureus* için MİK değeri %0.78 (v/v) olarak tespit edilmiştir.

Korukluoğlu, Sahan, Yigit ve Karakas (2006) taze zeytin yapraklarından farklı çözücüler (etanol, su, etil asetat, aseton) kullanarak elde ettikleri ekstraktların *Saccharomyces cerevisiae* ATCC 9763, *Schizosaccharomyces pombe*, *Saccharomyces uvarum*, *Candia oleophila*, *Metschnikowia fructicola* ve *Kloeckera apiculata*'ya karşı antimikrobiyal etkinliklerini belirlemişlerdir. Ekstraktların antimikrobiyal ve antifungal aktiviteleri disk difüzyon metodu ile belirlenmiştir ve MİK, minimum antifungal konsantrasyon (MFK) değerleri de belirlenmiştir. Çözücü olarak su kullanılarak elde edilen ekstrakt test mikroorganizmalarına karşı antimikrobiyal aktivite göstermemiştir. Diğer ekstraktların MİK değerleri 10-28 µg/mL, MFK değerleri 20-48 µg/mL ve inhibisyon zon çapları 1,5-9,3 mm aralığında değişiklik göstermiştir. Test edilen mayaların aseton ve etil asetat ekstraktlarına karşı daha duyarlı olduğu ve *S. cerevisiae* ATCC 9763'ün en dirençli maya olduğu tespit edilmiştir.

2.3. Quorum Sensing İnhibisyon Mekanizması

Bakteriler, düşük hücre yoğunluklarında tek hücreli organizmalar gibi davranmakta; ancak, hücre yoğunluğunun bir eşik seviyesine ulaştığını hissettiklerinde davranışlarını 'çok hücreli' tipe kaydırabilmektedirler. Bu aşamada, farklı fenotipler için genleri ifade etmelerini sağlayan ve özellikle virulans davranışlarından sorumlu olan küçük sinyal molekülleri aracılığıyla iletişim kurarlar (Dong ve Zhang 2005). Şekil 2.1 'de viyolasinin kimyasal yapısı gösterilmiştir.



Şekil 2 .1. Viyolasinin kimyasal yapısı (Hoshino, 2011)

Bakteriler arasında, etrafa saldıkları sinyal molekülleri sayesinde kurulan iletişim ile ortamdaki mikroorganizma popülasyon yoğunluğunun düzenlenmesi ve belirli yoğunlukta gen ekspresyonu ile kontrol sağlanması olayı Quorum Sensing (QS) olarak adlandırılmaktadır. Quorum: çoğunluk ve sense: hissetme (algılama) anlamındadır (Papenfort ve Bassler, 2016).

Bu olay ile bakteriler mikrokoloni oluşturma, hareket, antibiyotik üretimi, konjugasyon, virulans üretimi ve biyofilm oluşturma gibi birçok fizyolojik mekanizmayı düzenlemektedir. Biyokimyasal haberleşme sayesinde bakteri ortamdaki besinleri ölçülü kullanma, ortam içerisindeki diğer mikroorganizmalarla mücadele etme, kolonideki sayıyı ortam koşullarına göre düzenleme, konak savunma sistemine karşı korunma ve DNA taşınması gibi işlemlerini gerçekleştirmektedir. Tüm bu işlemlerin gerçekleştirilmesi için her bir mikroorganizma türü birden fazla otoindükleyici adı verilen sinyal molekülü kullanmaktadır. Salgılanan sinyal molekülleri hücre dışında birikirler ve taşıyıcılar, atım pompaları, difüzyon yöntemi ile hücre içine taşınırlar. Sentezlenen sinyal molekülleri istenen yoğunluğa ulaştığında gen ekspresyonu indüklenmektedir (Dickey, Cheung ve Otto, 2017).

En çok çalışılan iki QS sinyali şunlardır: (i) 70'den fazla Gram-negatif bakteri türü tarafından üretilen, hücre zarı boyunca yayılan ve hücre içindeki düzenleyici proteinlere bağlanan AHL'ler. ii) membrana bağlı reseptör histidin kinazlar aracılığıyla çalışan Gram pozitif bakterilerde peptit bazlı QS sistemi (Monnet, Juillard ve Gardan, 2016).

Bakterilerin sentezlediği sinyal molekülleri, bakteri hücrelerinden içeri girmektedir. Hücre yoğunluğu istenen değere ulaştığında reseptör protein molekülüne bağlanarak hedeflenen genler için uygun şartlar sağlanarak ekspresyonları tetiklenmektedir. Bakterilerin gelişimini önlemek amacıyla üretilen antibiyotikler bir süre sonra bakterilerde antibiyotik direnci oluşturmaktadır. Bakterileri öldürmektense aralarındaki iletişimin engellenmesi yeni bir yöntem olarak düşünülmüştür (Miller ve Bassler 2001).

Quorum sensing mekanizmasının bloke edilmesi; sinyal molekülünün üretiminin durdurulması, sinyal molekülünün etkisizleştirilmesi ve sinyal molekül reseptörünün engellenmesi yöntemleri ile gerçekleştirilmektedir (Chbib, 2020).

Gram negatif (-) ya da pozitif (+) bakterilerin geneli virülans faktörlerini, hücre dışı moleküllerin etkisi yoluyla popülasyon üzerindeki davranışlarını kontrol etmek için

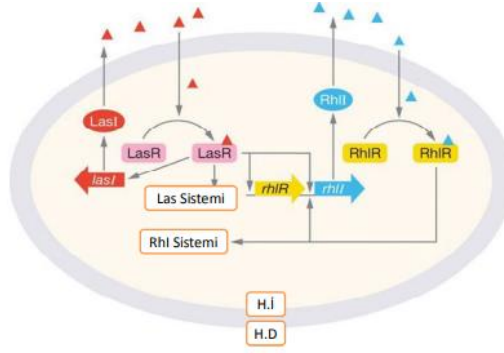
kullanmaktadır. Bu davranış otoindükleyicilerin quorum sensing aracılı gen ekspresyonlarını modüle eden transkripsiyonel bir aktivatöre bağlanması ile gerçekleşmektedir. Gram negatif bakteriler AHL'leri kullanırken, Gram pozitif bakteriler translayonel olarak işlenmiş peptitleri kullanmaktadır. QS sinyal moleküllerinin inaktivasyonu ya da degradasyonu QS inhibisyonu ya da quorum quenching olarak adlandırılmaktadır (Wang, Weng, Dong ve Zhang, 2004).

AHL (Açıl Homoserin Lakton) moleküllerini kullanarak virülans faktörleri gösteren patojenler arasında *Salmonella typhimurium*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Yersinia enterocolitica* ve *Burkholderia cepacia* yer almaktadır (Musthafa, Ravi, Annapoorani, Packiavathy ve Pandian, 2010).

2.3.1. *Pseudomonas aeruginosa* Quorum Sensing Mekanizması

Pseudomonas aeruginosa (*P.aeruginosa*), biyofilm oluşturma yeteneğine sahip gram negatif ve toprak kökenli bir bakteridir. AHL aracılı quorum sensing aktivitesinin belirlenmesi için model olarak *P. aeruginosa* kullanılmaktadır. *P. aeruginosa*'nın virülans faktörünün düzenlenmesi *Ias* ve *rhI* tarafından kontrol edilmekte ve *Ias* sistemi *rhI* sistemini aktifleştirecek şekilde hiyerarşik olarak düzenlenmektedir. *P. aeruginosa* ürettiği birçok ekstrasellüler enzimin kontrolünü sinyal molekülleriyle sağladığı için, quorum sensing üzerinde en çok çalışılan bakterilerden biridir (Bertoni, Sevo, Kojic ve Merturi, 2003). Quorum sensing aktivitesi üzerinde etkili olan enzimlerden bazıları; proteaz, eksotoksin A, piyosiyanın, eksoenzim S, elastaz ve hemolizinlerdir (Tan, Yin ve Chan, 2012). Elastaz *lasB* geni tarafından kodlanır. *lasB* geni, *LasR-LasI* çevreyi algılama sisteminin kontrolündeki LasR regülatörü tarafından kontrol edilir (Göze, 2010).

P. aeruginosa'nın quorum sensing aktivitesi ile ilgili çalışmalar genellikle piyosiyanın üretimini ve kalitatif olarak incelenmesi üzerine gerçekleştirilmiştir. Piyosiyanın *P. aeruginosa* tarafından üretilen bakteri kolonilerine mavi-yeşil renk veren pigmenttir. Düşük molekül ağırlığına sahip piyosiyanın molekülü patojenite faktörlerinden birisidir. Piyosiyanın, birçok bakteri türüne karşı antibiyotik özellik göstererek *P. aeruginosa*'nın quorum sensing aktivitesinde rol oynar (Göze, 2010). *P. aeruginosa*'nın quorum sensing sistemi aşamaları Şekil 2.2 'de verilmiştir.



Şekil 2. 2. *P. aeruginosa*'nın quorum sensing sistemi aşamaları H.D, hücre dışı; H.İ, hücre içi (Waters ve Bassler, 2005)

2.3.2. *Chromobacterium violaceum* Quorum Sensing Mekanizması

Chromobacterium violaceum, tropikal ve subtropikal bölgelerde yaşayan, toprak kökenli gram negatif bakteridir. N-hekzanol homoserin laktonu (HHL) otouyarıcı olarak kullanarak quorum sensing sonucu viyolasin pigmentini sentezler. CviI tarafından üretilen HHL, belli bir değere ulaştığında bakteri içinde çoğalır, çevreye yayılır. HHL, viyolasin üretiminden sorumlu spesifik genlere katılır ve CviR denilen transkripsiyonal düzenleyiciye (protein) bağlanır. Viyolasin pigmentinin üretiminden sorumlu gen tanımlanır ve viyolasin üretimi başlar (Choo, Rukayadi ve Hwang 2006).

2.4. Bitkisel Materyaller ile Quorum Sensing Mekanizmanın İnhibisyonu

Bitkisel materyaller fenolik asitler, flavonlar, saponinler, kumarin türevleri, alkaloidler ve terpenoidler gibi fitokimyasallar içermektedir. Bu bileşiklerin antimikrobiyal aktiviteye sahip olmaları nedeniyle quorum sensing inhibisyonu için iyi bir kaynak oldukları belirtilmektedir (Majik, Gavas ve Mandrekar, 2020). Kimyasal inhibitörlerin kullanımı yerine, bitkisel materyallerin kullanımı ile ilgili literatürde çalışmalar mevcuttur (Var ve Çelik, 2019). Son yıllarda bitki bileşik ya da ekstraktlarının anti-quorum sensing aktivitesinin tarandığı çalışmalar yapılmaktadır. Anti-quorum sensing etkili bitkilerden bazıları; vanilya (Choo ve diğerleri, 2006), zencefil (Kim, Lee, Byun ve Park, 2015), yeşilçay (Zhu, Huang, Zang, Feng ve Li, 2015), nane (Husain ve diğerleri, 2015), karabiber (Vazquez-Martinez ve diğerleri, 2020), papatya (Kazemian ve diğerleri, 2015), sarımsak (Jakobsen ve diğerleri, 2012), bögürtlen (Rodrigues ve diğerleri, 2016), yaban mersini (Tufenkji ve Maisuria, 2018) ve zeytin yaprağıdır (El-Sayeed, Samir, Jamil, Abdel-Hafez ve Ramadan, 2020).

Birçok araştırmanın sonunda, gıda ekstraktlarının antimikrobiyel ve anti-quorum aktivitesi değerlendirilmiş olup, aynı zamanda bu aktivitelerden sorumlu biyoaktif bileşikler de belirlenmiştir. Gıdanın içeriğinde bulunan fitokimyasalların sinyal reseptörlerini bozma yeteneği olması QS inhibitörü olarak görev alabileceklerini göstermiştir (Truchado, Tomás-Barberán, Larrosa ve Allende, 2012) .

Özaydın, Arın ve Önem (2020) tarafından yapılan çalışmada siyah sarımsağın quorum sensing inhibisyon aktivitesi araştırılmıştır. Siyah sarımsakta bulunan fenolik bileşikler HPLC ile belirlenmiştir. HPLC sonuçlarına göre; siyah sarımsakta benzoik asit, p-hidroksi, klorojenik asit, vanillin, p-kumarik asit ve kuersetin gibi fenolik bileşikler bulunmuştur. Çözücü olarak metanol kullanılan ekstraktın *Pseudomonas aeruginosa* PA01'in sentezlediği piyosiyenin ve elastaz üretimi ve biyofilm oluşumunda inhibisyon etkisi gösterdiği bildirilmiştir. Araştırma sonuçlarına göre siyah sarımsağın metanol ekstraktının *P. aeruginosa* virülansında ve anti quorum sensing aktivitesinde rol oynayan faktörlere karşı (piyosiyenin, elastaz, biyofilm) inhibisyon etkisi gösterdiği, en yüksek inhibisyon etkisinin % 84 oranıyla biyofilm oluşumu üzerinde olduğu görülmüştür.

Önem ve Uzman (2018) çeşitli turuncgillerin (portakal, limon ve mandalina) yaprak ekstraktlarının fenolik maddde içeriğini ve anti-quorum sensing üzerinde rol oynayan *P. aeruginosa* PA01 bakterisinin kayma hareketine karşı inhibisyon etkisini araştırmıştır. 3 turuncgil türü yapraklarının metanol ekstraktları kayma hareketi üzerine yüksek oranda inhibisyon etkisi göstermiştir.

Singh ve diğerleri (2009) tarafından Akasya (*Acacia nilotica*) bitkisinin antioksidan ve anti-quorum etkisini araştırmak için yapılan çalışmada, ekstraktın pH 4'te ekstrakte ve hidrolize edilmiş etil asetatlı çözeltisinin anti-quorum etki gösterdiği bulunmuştur. Aynı zamanda Akasya (*Acacia nilotica*) bitkisinin önemli doğal antioksidanlar içerdiği tespit edilmiştir.

61 tıbbi bitkinin anti-quorum sensing aktivitesinin incelendiği bir çalışmada *Chromobacterium violaceum* MTCC 2656 bakterisinde anti-quorum sensing etkisi ve *Pseudomonas aeruginosa* MTCC 2297 suşunda, piyosiyenin ve kayma hareketi inhibisyonunu incelenmiştir. *Astilbe rivularis*, *Fragaria nubicola* ve *Osbeckia nepalensis* bitki türleri quorum sensing inhibisyon etkisi göstermiştir (Tiwary ve diğerleri, 2017).

Gürgeç, Tabbouche, Yıldız ve Kılıç (2017) tarafından bildirilen, Karadeniz bölgesinden toplanan bazı yabani mantarların (*Russula delica*, *Amanita rubescens* ve *Lactarius sp.*) antimikrobiyal ve anti-quorum sensing özelliklerini araştırdıkları çalışmada süper kritik akışkan ekstraksiyonu ile mantar ekstraktları hazırlanmıştır. Ekstraktların anti-quorum sensing aktiviteleri *Chromobacterium violaceum* ATCC 12472 bakterisi üzerinde test edilmiştir. Mantarlardan *Lactarius sp.* ve *Amanita rubescens* ekstraktları *Chromobacterium violaceum*’a karşı anti-quorum sensing aktivitesi göstermiştir.

Noumi ve diğerleri (2022) tarafından yapılan bir çalışmada, Suudi Arabistan bölgesinde sera koşullarında yetiştirilen ender bitki türü olan *Thymus musilii* velen (*T. musilii*) bitkisinin *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Candida albicans* ATCC 10231 test şuşları üzerine antimikrobiyal aktivite gösterdiği *Listeria monocytogenes* ATCC 7644 ve *Salmonella typhimurium* ATCC 14028 şuşlarında ise biyofilm oluşturma özelliğini engellediği bildirilmiştir.

Defne yaprağı ekstraktı üzerine yapılan bir çalışmada, ekstraktın gıda kaynaklı patojen mikroorganizmalardan *S. aureus*, *P. aeruginosa*, *E. coli* ve *Salmonella enterica* bakterilerine karşı antimikrobiyal etki gösterdiği görülürken, aynı zamanda *C. violaceum* ve *P. aeruginosa* bakterilerine karşı anti-quorum sensing aktivitesi gösterdiği, biyofilm oluşumunun inhibisyonunu sağladığı bildirilmiştir (Molina ve diğerleri, 2020).

3. MATERİYAL VE METOT

3.1. Materyal

Bu çalışmada Adana'dan temin edilen Gemlik çeşidi zeytin yaprakları araştırma materyali olarak kullanılmıştır. Taze olarak toplanan zeytin yaprakları 40°C sıcaklıkta etüvde kurutulmuştur. Kuru zeytin yaprakları öğütülerek ekstraksiyon için hazır hale getirilmiştir. Kurutulmuş ve öğütülmüş zeytin yapraklarının fotoğrafı şekil 3.1'de verilmiştir.



Şekil 3.1. Zeytin yaprağı kurutulmuş/öğütülmüş

3.2. Metot

3.2.1. Örneklerin Ekstrakte Edilmesi

3.2.1.1. Klasik çözücü ekstraksiyonu

Kuru zeytin yapraklarından üç gr tartılarak 50 mL çözgen içerisinde ekstrakte edilmiştir. Ekstraksiyon işlemleri sırasında tüm yöntemlerde çözücü olarak metanol:su (50/50 v/v), etanol:su (50/50 v/v) ve distile su kullanılmıştır.

Kurutulan zeytin yaprakları öğütüldükten sonra 3 gr olacak şekilde tartılmıştır. Hammadde ve çözücü karışımları bir saat boyunca manyetik karıştırıcıda 1000-2000 rpm aralığında karıştırılmıştır. Yaprak içerisinde bulunan bileşenlerin bu işlem sayesinde çözücüye geçmesi sağlanmış, elde edilen karışımlar Whatmann (42) filtre kağıdıyla süzülerek büyük partikül uzaklaştırılmıştır.

Her ekstraksiyon işleminden sonra elde edilen zeytin yaprağı ekstraktları 500 mL'lik boynu şilifli balonlara aktararak çözgenler döner evaporatör kullanılarak uzaklaştırılmıştır (Şekil

3.2). Döner evaporatör kullanılarak organik çözücüsü uzaklaştırılan örnekler -20°C 'de bir gece dondurularak liyofilize edilmiştir. Dondurularak kurutulan örnekler su ile uygun konsantrasyonlarda hazırlanarak analizlerde kullanılmıştır. Örnekler tüm çözücüler için 2 paralel olarak hazırlanmıştır.



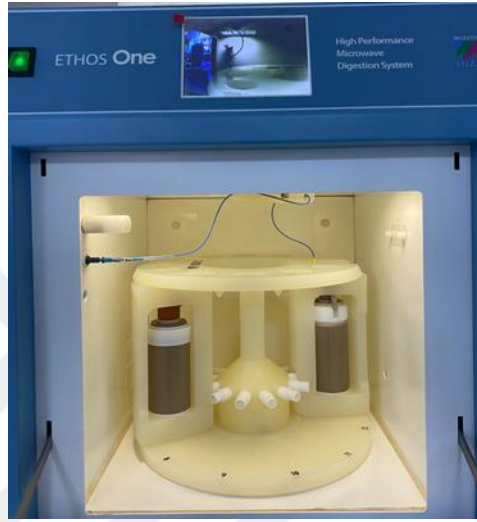
Şekil 3.2. Çözücülerin evapore edilerek uzaklaştırılması

3.2.1.2. Ultrason destekli ekstraksiyon

Ultrason destekli ekstraksiyon için kurutulmuş ve öğütülen zeytin yapraklarından 3 gr beherlere tartılmıştır. Çözgen olarak su, metanol:su (50/50 v/v) ve etanol:su (50/50 v/v) kullanılmıştır. Ekstraksiyon, ultrasonik prob içeren çıkış gücü 250 W ve ultrasonik frekansı 20 kHz olan ultrasonik cihaz (Branson Digital Sonifier SFX 250, ABD) kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Ekstraksiyon koşulu daha önce yapılan denemeler sonucunda %30 titreşim genliği ve 5 dakika ekstraksiyon süresi olarak belirlenmiştir. Sonikasyon pulse modda uygulanmıştır. Ayrıca sıcaklık kontrolü için örnekler ekstraksiyon sırasında buz banyosunda bekletilmiştir. Ekstraksiyondan sonra örnekler, 15 dakika boyunca 5000 rpm'de santrifüjlenmiştir (Hettich-Rotofix 32A).

3.2.1.3. Mikrodalga destekli ekstraksiyon

Su, metanol:su (50/50 v/v), ve etanol:su (50/50 v/v) kullanılarak hazırlanan zeytin yaprağı örneklerine mikrodalga destekli ekstraksiyon uygulanmıştır. 1 atm basınç altında 30°C sıcaklıkta % 50 rotasyon hızıyla 5 dakika boyunca mikrodalga destekli ekstraksiyon Ethos-one (Milestone, İtalya) cihazı kullanılarak uygulanmıştır. Kullanılan mikrodalga destekli ekstraksiyon sistemi ve ekstraksiyon koşulları Şekil 3.3 ve Şekil 3.4’ da verilmiştir.



Şekil 3.3. Mikrodalga destekli ekstraksiyon yöntemi



Şekil 3.4. Mikrodalga destekli ekstraksiyon koşulları

3.2.2. Toplam Fenolik Madde Tayini

Toplam fenolik madde miktarı Folin-Ciocalteu metoduna göre yapılmıştır. Seyreltme oranlarını bulmak için örnekten ön denemeler yapılmış, uygun seyreltme oranı bulunduğundan sonra stok çözeltiden 200 µL alınmıştır. Örneğe 1,5 mL Folin (1:10) eklendikten sonra karıştırılıp süre tutulmuştur. Beşinci dakikanın sonunda 1,5 mL sodyum karbonat çözeltisi (% 6) ilave edilmiş ve karışım vortekslenmiştir. Oda sıcaklığında 1,5 saat tutulan örneklerin spektrofotometrede 765 nm dalga boyunda absorbans değerleri okunmuştur. Standart gallik asit çözeltisi metanol ile seyreltilerek 12,5 µg/mL – 200 µg/mL aralığındaki konsantrasyonlar hazırlanarak kalibrasyon eğrisi elde edilmiştir. Sonuçlar kalibrasyon eğrisi kullanılarak mg gallik asit eşdeğeri cinsinden mg /g olarak hesaplanmıştır (Singleton, Orthofer ve Lamuela-Raventos, 1999).

3.2.3. Antioksidan Kapasite Analizi

3.2.3.1. DPPH (2,2-Difenil-1-pikrilhidrazil) Radikal Süpürme Kapasitesi Yöntemi

Hazırlanan zeytin ekstraktı örneklerinden 100 µL alınmış, ayarlanmış olan DPPH çözeltisinden 3,9 mL eklenmiştir. Örnekler 30 dakika karanlıkta bekletildikten sonra 515 nm dalga boyunda spektrofotometrede absorbans değerleri okunmuştur. Antioksidan aktivite değerleri troloks standardı kullanılarak elde edilen kalibrasyon grafiği yardımıyla hesaplanmıştır (Pyo, Lee, Logendra ve Rosen, 2004).

3.2.3.2. ABTS Katyon Radikali Giderme Aktivitesi ile Antioksidan Tayini

2,45 mM potasyum persülfat çözeltisi ilave edilerek hazırlanan ABTS çözeltisi kullanımdan önce 12-16 saat önce alüminyum folyoya sarılı şekilde oda sıcaklığında bekletilmiştir. ABTS çözeltisi 734 nm dalga boyunda absorbans değeri $0,70 \pm 0,02$ olacak şekilde etanol ile seyreltilmiştir. 100 µL örnek ABTS çözeltisi ile karıştırılmış 15 dakikanın sonunda spektrofotometrede 734 nm dalga boyunda absorbans değeri ölçülmüştür (Ree ve diğerleri, 1999).

3.2.4. Antimikrobiyal Aktivite

Örneklerin antimikrobiyal aktiviteleri kuyu difüzyon yöntemi kullanılarak belirlenmiştir. *S. aureus* ATCC 29213, *E. coli* ATCC 25922, *B. subtilis* ATCC 11774 ve *K. pneumoniae* ATCC

13883 test mikroorganizmaları olarak kullanılmıştır. Triptik soy agar içerisinde bakteriler 24 saat süreyle 37°C etüvde inkübe edilmiş ve aktifleşen bakterilerden alınarak steril % 0,9 NaCl çözeltisi içine batırılarak, McFarland 0.5'e (10^8 kob/mL) göre ayarlanmıştır. Muller Hinton Agar (MHA) besiyerine bakteri çözeltisinden 100 µL alınarak yayma yöntemi ile yayılmıştır. Besiyeri üzerinde 7-8 mm çapında açılan kuyucuklar içerisine hazırlanan konsantrasyonu 1,87- 60 mg/mL olacak şekilde ekstraktlar 60-80 µL eklenmiştir. Petriler 37°C de 24-48 saat boyunca inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyonun sonunda kuyucukların etrafında inhibisyon zonlarının çapları kumpasla ölçülerek değerlendirilmiştir. Kuyu difüzyon testinde her petriden 2 paralel şeklinde hazırlanmış ve oluşan inhibisyon çapından 3 ölçüm alınmıştır (Kobya, Çağlak ve Kara, 2019).

3.2.5 Antiquorum Sensing Aktivite Tayini

Antiquorum sensing aktivite tayini kuyu difüzyon yöntemi ile belirlenmiştir. Ekstraktların anti-quorum sensing aktiviteleri *C. violaceum* CV026 ve *C. violaceum* ATCC 12472 suşları kullanılarak tespit edilmiştir. *C. violaceum* CV026 bakteri suşu için, C6HSL olarak bilinen sinyal özellikli madde ve kanamisin içeren Luria-Bertani agar besiyeri, petri kaplarına dökülerek katılaşması beklenmiştir. Besiyerleri katılaştıktan sonra 0.7 McFarland konsantrasyona ayarlanan *C. violaceum* CV026 bakteri kültüründen 300 µL alınarak Luria-Bertani agar plakalarına yayma yöntemi ile yayılmıştır. Agar plakaları üzerine 7-8 mm çapı olan kuyucuklar açılmıştır. Kuyucuklar içerisine 60 mg/mL, 30 mg/mL, 15 mg/mL, 7,5 mg/mL ve 3,75 mg/mL konsantrasyonlarda hazırlanan ekstrakt solüsyonlarından 60-80 µL olacak şekilde eklenmiştir. Aynı deney prosedürü *C. violaceum* ATCC 12472 bakteri suşu için de uygulanmıştır. Nutrient Broth (NB) besiyerinde geliştirilen *C. violaceum* ATCC 12472 bakteri suşu 0.7 McFarland konsantrasyona ayarlanarak 300 µL alınıp Nutrient Agar (NA) besiyerine yayma yöntemi ile yayılmıştır. Besiyeri üzerine 7-8 mm kuyucuklar açıldıktan sonra 60 mg/mL-3,75 mg/mL konsantrasyonları arasında hazırlanan ekstraktlardan kuyucuklara 60-80 µL olacak şekilde eklenmiştir. Her iki suş için petri kapları 30°C de 24 süreyle inkübe edilmiştir. İnkübasyon süresinin sonunda antibakteriyel etki ve viyolasin inhibisyonu gösteren çaplar kumpas yardımıyla mm cinsinden ölçülmüştür. Testler 2 paralelli olarak gerçekleştirilmiştir. Oluşan inhibisyon çaplarından 3 ölçüm alınmıştır. Kontrol grubu olarak su kullanılmıştır (Koh ve Tham, 2011).

3.2.5.1. Mik Değerinin Tespiti

Çalışmada test suşları olarak kullanılan *C. violaceum* CV026, ve *C. violaceum* ATCC 12472 suşları üzerine anti-quorum sensing aktivitesine sahip ekstraktların MİK değerlerinin tespitinde su ile hazırlanılmış stok solüsyonları en yüksek 60 mg/mL olacak şekilde kullanılmış, bu konsantrasyon değerinden seyreltmeler yapılarak minimum inhibisyon konsantrasyon değerleri belirlenmiştir.

3.2.5.2. Viyolasin Üretiminin İnhibisyonu

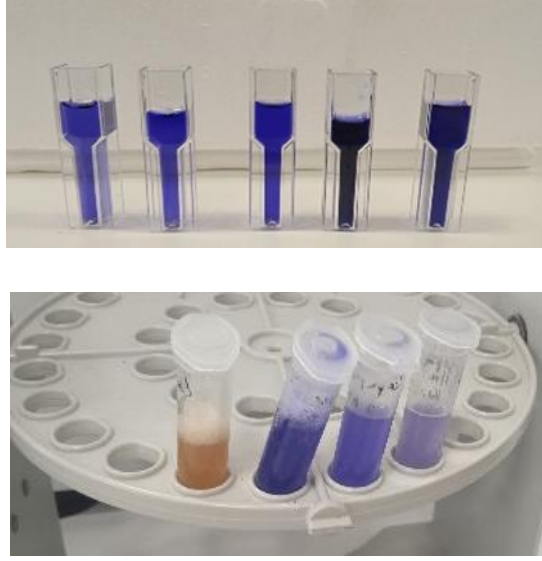
Gram negatif bakteriler tarafından üretilen mor pigment olan viyolasin, üç yapısal birimden oluşur; bir 5-hidroksilindol, bir oksindol ve bir 2- pirolidon, iki indol halkası söz konusudur, dolayısıyla bu pigment, rebekamisin 3 ve staurosporinin yanı sıra bir bisindol bileşiği olarak da adlandırılır. Viyolasin üreten bakteri çeşitlerinden biri *C.violaceum* 'dur (Hoshino, 2011).

Viyolasin üretiminin inhibisyonu analizi için Artuç (2019) yöntemi izlenmiştir. 10 mL Nutrient sıvı besiyeri içerisine McFarland 0.7 değerine göre ayarlanan 100 µL *C. violaceum* ATCC 12472 bakteri kültürü inoküle edildi. Ekstraktlar 60 mg/mL-3,75 mg/mL konsantrasyonlarında eklenip, 30°C dakikadaki devir sayısı 130 olacak şekilde 48 saat boyunca çalkalamalı inkübatörde inkübe edilmiştir. Aynı prosedür *C. violaceum* CV026 için de yapılmıştır. Diğer yapılan işlemlere ek olarak 20 µL C6HSL ve 10 µL kanamisin eklenmiştir. İnkübasyon sonunda dakikadaki devir sayısı 8500 hızda 10 dk boyunca santrifüjlenen örneklerin süpernatantları 1 mL DMSO çözeltisiyle çözündürülmüştür. 30 sn vorteksledikten sonra dakikadaki devir sayısı 16.000'de 15 dk ultrasantrifüje tabi tutuldu. Örnekler Şekil 3.5'de gösterildiği gibi spektrofotometre kuvvetlerine koyularak, 585 nm dalga boyunda absorbansları ölçülmüştür. Ekstrakt içermeyen besiyerleri kontrol grubu olarak kullanılmıştır.

$$\text{Viyolasin giderim oranı (\%)} = \frac{\text{OD } 585 - \text{OD örnek}}{\text{OD } 585} \times 100 \quad (3.1)$$

OD₅₈₅: 585 absorbans değerinde ekstraktın optik yoğunluğu

OD_{örnek}: 585 aborbans değerinde ekstrakt içermeyen kontrol grubunun optik yoğunluğu



Şekil 3. 5. Viyolasin üretim inhibisyonuna bağlı örneklerde renk değişimi

3.2.5.3. Kayma Testi

Mikrodalga, klasik çözücü ve ultrason destekli ekstraksiyon yöntemleriyle elde edilen ekstraktlar petri kaplarına döküldükten sonra LB (Luria-Bertani) besiyerlerine yayılmıştır. Bir gece önceden aktifleştirilen *P. aeruginosa* PAO1 suşu besiyerinin merkezine inoküle edilmiştir. Besiyerinin merkezinden aşılama noktasından dışarıya doğru yayılım gösterdiği çapın uzunluğu ölçülmüştür. Sonuçlar ekstrakt içermeyen besiyerinde *P. aeruginosa* PAO1 suşu ile karşılaştırılarak değerlendirilmiştir (İbrahim, 2022).

$$\text{Kayma hareketi inhibisyonu} = \frac{\text{Kontrol çapı} - \text{Örnek çapı}}{\text{Kontrol çapı}} \times 100 \quad (3.2)$$

3.3. İstatistiksel Analiz

Yapılan toplam fenolik madde ve antioksidan kapasite analizleri sonucunda elde edilen veriler Minitab 17 (Minitab Inc., State College, ABD) yazılımı kullanılarak ANOVA (varyans analizi) yöntemi uygulanarak değerlendirilmiştir. Örnekler arasındaki istatistiksel karşılaştırmalar Fisher'ın en küçük anlamlı fark yöntemine göre yapılmış ve $p < 0.05$ düzeyi dikkate alınarak değerlendirilmiştir.

4.BULGULAR VE TARTIŞMA

4.1. Toplam Fenolik Madde Tayini

Çalışmada öncelikle klasik çözgen ekstraksiyonu, mikrodalga ve ultrason destekli ekstraksiyon yöntemleri kullanılarak elde edilen ekstraktların toplam fenolik madde ve antioksidan aktiviteleri belirlenmiş ve analiz sonuçları Tablo 4.1’de verilmiştir. Toplam fenolik madde miktarı 24,46 mg/g-133,33 mg/g aralığında bulunmuştur. Sonuçlara göre en yüksek toplam fenolik madde miktarı su kullanılarak mikrodalga destekli ekstraksiyonla elde edilen ekstraktlarda belirlenmiştir.

Yapılan başka bir çalışmada, Hatay’da farklı bölgelerde yetişen zeytin yaprağının (*Olea europaea*) metanol ekstraktlarının toplam fenolik madde miktarları belirlenmiştir. Yedi ayrı bölge için incelenen zeytin yapraklarında fenolik maddde miktarları 21,99 - 169,48 mg GAE/g ekstrakt aralığında bulunmuştur. Çetenli bölgesinde fenolik madde miktarı 34,82±1,59 mg GAE/g ve Hassa bölgesinde 39,84±12,48 mg GAE/g iken, Üzümdalı bölgesinde 21,99±3,64 mg GAE/g düzeyinde bulunmuştur (Danahaliloğlu, Tekeli, Göycincik ve Yıldırım, 2018).

Demirkol, Çelik ve Tarakcı (2017) Ordu ilinin farklı bölgelerinden temin edilen sakarca bitkisinin fenolik madde içeriğini araştırmıştır. Sakarca bitkisi (*Ornithogalum umbellatum*) fenolik madde içeriği en düşük 28,35 mg GAE/g kuru madde, en yüksek 51,60 mg GAE /g kuru madde bulunmuştur.

Altı farklı bitki ekstraktı (Kaju, Chamuang, Monpu, Thurianthe, Kradon ve Pakliang) klasik ekstraksiyon, ultrasonik destekli ve mikrodalga destekli ekstraksiyon yöntemiyle elde edilmiştir. Elde edilen bitki ekstraktlarının antioksidan ve antimikrobiyal aktivitelerine bakılmıştır. Mikrodalga destekli ekstraksiyon ile elde edilen bitki ekstraktlarının, diğer ekstraksiyon yöntemlerine göre en yüksek antioksidan etkiye sahip olduğu bulunmuştur (Junsathian, Nakamura, Katayama ve Rawdkuen, 2022).

Mantardan mikrodalga destekli ekstraksiyon ve konvansiyonel ekstraksiyon yöntemi ile elde edilen ekstraktın fenolik madde miktarının incelendiği çalışmada, en yüksek fenolik madde miktarı ekstraksiyon süresinin 3.8 dakika, etanol konsantrasyonunun % 40 ve mikrodalga gücünün 125 W olduğu koşulda elde edilen ekstraktta 470 mg GAE/100 g kuru madde olarak

bulunmuştur. Mikrodalga destekli ekstraksiyon ve konvansiyonel ekstraksiyon yöntemleri karşılaştırıldığında, en etkili yöntemin mikrodalga destekli ekstraksiyon olduğu tespit edilmiştir (Maeng, Muhammad Shahbaz, Ameer, Jo ve Kwon, 2017).

Muğla'nın Fethiye ilçesinden toplanan gemlik tipi zeytinlerin fenolik bileşiklerinin ve antioksidan kapasitesinin incelendiği bir çalışmada yeşil zeytinlerin ABTS değerleri 403,10-502,77 μmol troloks/100g arasında değişmektedir. Siyah zeytinlerin ABTS değeri ise 526,34 – 526,95 μmol troloks/100g değerleri arasındadır (Köse, Semizoğlu, Kasnak ve Palamutoğlu, 2018).

Dekdouk ve diğerleri (2015) zeytin meyvesinden elde edilen ekstratların DPPH yöntemi kullanarak antioksidan aktivitesini incelemişlerdir. Yapılan çalışmada zeytin meyvelerinden elde edilen ekstratların antioksidan aktiviteleri 27.40-202.62 mg TE/g ekstrakt olarak tespit edilmiştir.

Elde ettiğimiz sonuçlarla literatür çalışmalarını karşılaştırdığımızda toplam fenolik madde miktarı benzer sonuçlar göstermiştir. Toplam fenolik madde miktarı ile DPPH ve ABTS yöntemleri ile belirlenen antioksidan kapasite analizleri sonuçlarına göre en yüksek antioksidan kapasite değeri su kullanılarak yapılan mikrodalga destekli ekstraksiyon sonucunda elde edilmiştir. İstatistiksel olarak yapılan değerlendirmede $p < 0.05$ düzeyinde örnekler arasında önemli bir farklılık bulunmaktadır.

Tablo 4. 1. Zeytin yaprağı ekstraktlarının toplam fenolik madde içerikleri ve antioksidan aktiviteleri

Örnekler	Toplam fenolik madde (mg/g zeytin yaprağı)	Antioksidan aktivite (μmol Troloks/g zeytin yaprağı)	Antioksidan aktivite (TEAC/mg)
KMS	31,83 $\pm$ 0,77 ^f	195,11 $\pm$ 4,69 ^e	316,52 $\pm$ 2,40 ^e
KES	38,36 $\pm$ 1,54 ^d	220,67 $\pm$ 5,49 ^d	215,12 $\pm$ 2,60 ^f
KS	24,46 $\pm$ 0,97 ^g	104,65 $\pm$ 3,86 ^g	310,25 $\pm$ 4,61 ^d
UDEMS	35,54 $\pm$ 5,24 ^e	130,80 $\pm$ 6,36 ^f	314,45 $\pm$ 2,26 ^{cd}
UDEES	39,68 $\pm$ 0,68 ^d	258,24 $\pm$ 9,89 ^b	111,08 $\pm$ 3,01 ^g
UDES	26,83 $\pm$ 0,22 ^g	114,19 $\pm$ 2,59 ^g	54,05 $\pm$ 1,28 ^h
MDMS	81,95 $\pm$ 0,56 ^c	250,93 $\pm$ 11,03 ^{bc}	459,22 $\pm$ 3,64 ^b
MDES	88,17 $\pm$ 0,30 ^b	241,04 $\pm$ 6,91 ^c	278,41 $\pm$ 2,19 ^e
MDS	113,33 $\pm$ 0,94 ^a	316,62 $\pm$ 11,59 ^a	503,72 $\pm$ 2,38 ^a

UDE: Ultrason destekli ekstraksiyon MD: Mikrodalga destekli ekstraksiyon K:Klasik çözücü ekstraksiyonu KMS:Klasik çözücü metanol-su KES:Klasik çözücü etanol-su KS:Klasik çözücü su UDEMS: Ultrason destekli ekstraksiyon metanol-su UDEES: Ultrason destekli ekstraksiyon etanol- su UDES: Ultrason destekli ekstraksiyon su MDMS: Mikrodalga destekli ekstraksiyon metanol-su MDES: Mikrodalga destekli ekstraksiyon etanol-su MDS: Mikrodalga destekli ekstraksiyon su

^{a-g} Üstel olarak gösterilen farklı harfler sütundaki örnekler arasında önemli bir farklılık olduğunu göstermektedir. ($p < 0.05$)

4.2. Antimikrobiyal Aktivite ve MİK Değerlerinin Belirlenmesi

Farklı yöntemlerle elde edilen ekstraktlarda antimikrobiyal aktivite analizi kuyu difüzyon yöntemi kullanılarak incelenmiş ve antimikrobiyal aktivite gösteren örneklerin MİK değerleri belirlenmiştir. Test mikroorganizmaları olarak *S. aureus* ATCC 29213, *E. coli* ATCC 25922, *B. subtilis* ATCC 11774 ve *K.pneumoniae* ATCC 13883 suşları kullanılmıştır. Zeytin yaprağı ekstraktlarının hiçbirinin *E. coli* ATCC 25922 bakterisine karşı antimikrobiyal aktivite göstermediği belirlenmiştir. Ayrıca yapılan denemeler sonucunda ultrason destekli ekstraksiyon yöntemiyle elde edilen ekstraktların test edilen bakterilere karşı antimikrobiyal etkisinin olmadığı görülmüştür. Bu durum biyolojik aktivitenin belirlenmesi açısından ekstraksiyon koşullarının optimize edilmesinin önemli olduğunu göstermektedir. Çalışmamızda ultrason destekli ekstraksiyon yönteminde bağımsız değişkenler % 50 çözücü konsantrasyonu (etanol, metanol ve su), ekstraksiyon süresi 5 dk ve % 30 titreşim genliği olarak belirlenmiştir. Bağımsız değişkenler optimize edilerek antimikrobiyal aktivitenin belirlenebilir düzeyde elde edilebileceği düşünülmektedir.

Farklı konsantrasyonlarda hazırlanan ekstraktların *S. aureus* ATCC 29213 bakterisine karşı antimikrobiyal etki sonuçlarının değerlendirilmesi amacıyla ölçülen zon çapları mm cinsinden belirlenmiş ve Tablo 4.2’de verilmiştir. Antimikrobiyal aktivite sonuçları incelendiğinde; etanol-su (1:1) ve metanol-su (1:1) çözgenleriyle yapılan klasik çözücü ekstraksiyonu sonucunda elde edilen ekstraktlar ve mikrodalga destekli ekstraksiyon yönteminde su, etanol-su (1:1) ve metanol-su (1:1) kullanılan ekstraktların antimikrobiyal aktivite gösterdiği belirlenmiştir. Klasik çözücü ekstraksiyonunda etanol-su ile hazırlanan ekstraktların antimikrobiyal aktivite analizinde $18,96 \pm 0,89$ mm inhibisyon çapı oluşurken aynı yöntemle hazırlanan metanol-su ekstraktının inhibisyon çapı $14,76 \pm 0,36$ mm bulunmuştur. MİK değerleri klasik ekstraksiyon yöntemi ile elde edilen etanol-su ekstraktında 3,75 mg/mL, metanol-su ekstraktında 30 mg/mL ve mikrodalga destekli ekstraksiyonla elde edilen su, etanol- su, ve metanol su ekstraktlarında MİK değerleri 3,75 mg/mL olarak bulunmuştur.

Tablo 4.2. Ekstraktların *S.aureus* ATCC 23123 bakterisi üzerine MİK değerinin belirlenmesi

Konsantrasyon (mg/ml)	<u>İnhibisyon zon çapı (mm)</u>				
	KES	KMS	MDS	MDES	MDMS
60	18,96±0,89	14,76±0,36	20,41±0,97	22,77±0,59	20,99±0,42
30	16,19±0,63	12,93±0,65	18,77±0,34	20,65±0,21	18,20±0,39
15	14,66±0,61	-	16,96±0,87	18,47±0,21	15,23±0,75
7,5	10,56±0,56	-	13,41±0,35	13,44±0,54	12,45±0,40
3,75	9,13±007	-	10,37±0,39	10,37±0,39	9,51±0,29
1,87	-	-	-	-	-

KES: Klasik çözücü etanol-su **KMS:** Klasik çözücü metanol-su **MDS:** Mikrodalga destekli ekstraksiyon su **MDES:** Mikrodalga destekli ekstraksiyon etanol-su **MDMS:** Mikrodalga destekli ekstraksiyon metanol-su

Tez çalışmamızda toplam fenolik madde içeriği de hesaplanan ekstraktların, antimikrobiyal aktivitesi fenolik madde içeriğiyle doğru orantı göstermiştir. Fenolik madde içeriği yüksek olan ekstraktın antimikrobiyal aktivitesi de yüksek bulunmuştur. Gram (+) bakterilerin Gram (-) bakterilerden daha hassas olduğu, bakterilerden en dirençlisi *E. coli*, en duyarlı bakteri ise *S. aureus* olarak tespit edilmiştir.

Shan, Cai, Brooks ve Corke (2007) yaptıkları bir çalışmada 46 tıbbi bitki ve baharat ekstraktının antimikrobiyal aktivitelerini *Listeria monocytogenes*, *Bacillus cereus*, *S. aureus*, *E. coli* ve *Salmonella anatum* test bakterilerini kullanarak belirlemeye çalışmışlardır. En duyarlı bakteri *S.aureus* iken, *E.coli* birçok bitkiye karşı antimikrobiyal aktivite göstermemiştir. Böylelikle en dirençli bakterinin *E.coli* olduğu gözlemlenmiştir.

B. subtilis ATCC 11774 mikroorganizması kullanılarak yapılan antimikrobiyal aktivite analizinde klasik çözücü ekstraksiyonuyla hazırlanan etanol-su ekstraktı ve mikrodalga destekli ekstraksiyonla hazırlanan su, etanol-su ve metanol-su ekstraktları antimikrobiyal etki göstermiştir. En yüksek antimikrobiyal etkiyi (23,92±0,39 mm) mikrodalga destekli ekstraksiyonla hazırlanan metanol su ekstraktı göstermiştir. Tüm ekstraktlar için MİK değerleri 3,75 mg/mL olarak belirlenmiştir. *B. subtilis* bakterisine karşı elde edilen inhibisyon zon çapları Tablo 4.3'te verilmiştir.

Tablo 4. 3. Ekstraktların *Bacillus subtilis* ATCC 11774 bakterisi üzerine MİK değerlerinin belirlenmesi

Konsantrasyon (mg/ml)	KES	İnhibisyon zon çapı (mm)		
		MDS	MDES	MDMS
60	20,82±0,28	20,22±0,79	23,32±0,89	23,92±0,39
30	19,12±0,62	19,08±0,70	20,55±0,42	21,10±0,87
15	15,87±0,18	15,69±0,59	18,09±0,55	17,54±0,10
7,5	12,75±0,32	12,41±0,62	13,76±0,37	14,73±0,04
3,75	11,14±0,16	8,83±0,25	10,40±0,38	9,12±0,52
1,87	-	-	-	-

KES: Klasik çözücü etanol-su **MDS:** Mikrodalga destekli ekstraksiyon su **MDES:** Mikrodalga destekli ekstraksiyon etanol-su **MDMS:** Mikrodalga destekli ekstraksiyon metanol-su

Benli ve Yiğit (2005) yaptığı çalışmada *Thymus vulgaris* (Kekik) bitkisinin sekiz farklı çözenle elde edilen ekstraktlarının antimikrobiyal etkisini *Bacillus subtilis* bakterisi üzerinde denemiştir. Etanol ve metanol kullanılarak ekstrakte edilmiş *Thymus vulgaris* (kekik) bitkisinin antimikrobiyal aktivitesi disk difüzyon metodu ile belirlenmiştir. Kekik bitkisinin etanol ekstraktı *Bacillus subtilis* üzerinde 9 mm inhibisyon zon çapı oluştururken, metanol ekstraktı ise 13 mm inhibisyon çapı oluşturmuştur.

Bonjar (2004) Alanya kekiğinin (*Origanum*) antimikrobiyal aktivitesini *S. aureus*, *B. cereus*, *E. coli* ve *K. pneumoniae* bakterilerini test mikroorganizması olarak kullanarak belirlemiştir. Ekstraktların *E. coli*, ve *K. pneumoniae* bakterilerine karşı antimikrobiyal etki göstermediği, *S. aureus*'a karşı 7-9 mm arasında zon çapı, *B. cereus* bakterisine karşı ise 10-14 mm arasında zon çapı oluşturarak antimikrobiyal etki gösterdiği belirlenmiştir.

Klasik çözücü ekstraksiyonu ile hazırlanan etanol-su, mikrodalga destekli ekstraksiyon ile hazırlanan su, etanol-su, ve metanol-su ekstraktlarının *K. pneumoniae* ATCC 13883 bakterisine karşı antimikrobiyal etki gösterdiği belirlenmiştir. Antimikrobiyal aktivitesi en fazla olan ekstrakt 21,01±0,74 inhibisyon çapı ile mikrodalga kullanılarak elde edilen

etanol-su ekstraktı olmuştur. Klasik yöntemle elde edilen su ekstraktının MİK değeri 7,5 mg/mL olarak belirlenmiştir. Mikrodalga destekli ekstraksiyon ile hazırlanan örneklerin MİK değeri 3,75 mg/mL bulunmuştur. Ekstraktların *K. pneumoniae* ATCC 13883 bakterisi üzerine antimikrobiyal aktivitesi Tablo 4.4’de verilmiştir.

Tablo 4.4. Ekstraktların *K.pneumoniae* ATCC 13883 bakterisi üzerine MİK değerlerinin belirlenmesi

Konsantrasyon (mg/ml)	KES	İnhibisyon zon çapı (mm)		MDMS
		MDS	MDES	
60	20,39±0,88	20,27±0,93	21,01±0,74	20,72±0,55
30	17,64±0,78	17,77±0,32	18,86±0,53	19,35±0,96
15	16,63±0,37	14,64±0,62	15,68±0,74	17,35±0,45
7,5	13,26±0,75	12,42±0,13	12,82±0,70	13,08±0,44
3,75	-	9,89±0,66	10,32±0,19	10,47±0,34
1,87	-	-	-	-

KES: Klasik çözücü etanol-su **MDS:** Mikrodalga destekli ekstraksiyon su **MDES:** Mikrodalga destekli ekstraksiyon etanol-su **MDMS:** Mikrodalga destekli ekstraksiyon metanol-su

4.3 Zeytin Yaprığı Ekstraktlarının Antiquorum Sensing Aktivitesinin Belirlenmesi

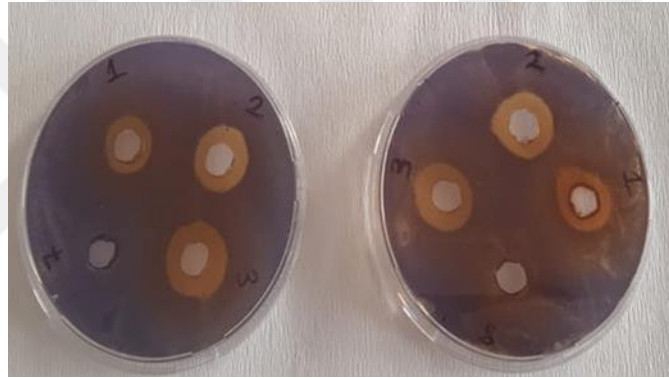
Zeytin yapraklarının klasik, ultrason, ve mikrodalga destekli ekstraksiyonu sonucu elde edilen ekstraktlarının antiquorum sensing aktiviteleri kuyu difüzyon yöntemi ile belirlenmiştir. *C. violaceum* CV026 ve *C. violaceum* ATCC 12472 bakteri suşları test organizmaları olarak kullanılmıştır. Mikrodalga destekli ekstraksiyon yönteminin uygulanmasıyla elde edilen tüm ekstraktların antiquorum sensing aktivite gösterdiği belirlenmiştir. Su kullanılarak yapılan klasik ekstraksiyonda elde edilen ekstraktın *C. violaceum* ATCC 12472 test suşu üzerine antibakteriyel ve antiquorum sensing aktivite gösterdiği bulunmuştur. İnhibisyon zon çapı oluşturan örneklerin ayrıca MİK değeri belirlenmiştir. Elde edilen sonuçlara ait değerler Tablo 4.5’te verilmiştir.

Tablo 4.5. Ekstraktların quorum sensing inhibisyon etkisinin belirlenmesi

Örnekler	Quorum sensing inhibisyon etkisi	
	İnhibisyon zon çapı (mm)	İnhibisyon zon çapı (mm)
	<i>C. violaceum</i> CV026	<i>C. violaceum</i> ATCC 12472
MDS	14,83±0,39	13,60±0,30
MDES	16,77±0,61	11,82±0,80
MDMS	17,07±0,26	12,72±0,62
KS	-	9,92±0,21

KS: Klasik çözücü su MDS: Mikrodalga destekli ekstraksiyon su MDES: Mikrodalga destekli ekstraksiyon etanol-su MDMS: Mikrodalga destekli ekstraksiyon metanol-su

C. violaceum CV026 bakteri suşu üzerinde en yüksek antiquorum sensing etkisi metanol-su kullanılarak elde edilen mikrodalga ekstraktında belirlenmiş ve inhibisyon çapı 17,07±0,26 mm olarak ölçülmüştür. İnhibisyon zon çapı ölçülen örnekler Şekil 4.1’de verilmiştir.



Şekil 4.1. MD ekstraktlarının *C.violaceum* CV026 üzerine antiquorum sensing aktivitesi

Yapılan bir çalışmada *Castanea sativa* bitkisinin antiquorum sensing etkisi araştırılmış, MİK değerleri belirlenmiştir. *Castanea sativa* çiçeğinin metanol ekstraktının antimikrobiyal aktivitesinin belirlenmesi amacıyla uygulanan test sonucunda *S. aureus* bakterisine karşı 23,33±0,47 mm inhibisyon çapı, *B. subtilis* 12,0±0,81 mm ve *K.pneumoniae* üzerine ise 7,33±0,47 mm zon çapı oluşturmuştur. *Castanea sativa* çiçeğinin etanol ekstraktı *S. aureus* bakterisine karşı 17,33±0,47 mm zon çapı oluşturmuştur. Antiquorum sensing aktivitesinin belirlenmesi amacıyla yapılan analiz sonucunda *Castanea sativa* çiçeğinin metanol ekstraktı *C. violaceum* ATCC 12472 bakterisine karşı 20,33±0,47 mm viyolasin inhibisyon çapı oluşturmuştur (Ekşi, Esertaş, Kılıç, Ejder ve Uzunok, 2020).

Çin’ de yetiştirilen bir bitki türü olan *Phyllanthus amarus* (*P.amarus*) bitkisinin 3 farklı organik çözen (hekzan, kloroform, metanol) kullanılarak hazırlanan ekstraktlarının antiqorum sensing aktiviteleri incelenmiştir. *P.amarus* bitkisinin metanol ile hazırlanan ekstraktı *Chromobacterium violaceum* CVO26 bakterisi üzerine antiqorum sensing aktivitesi göstermiştir (Priya, Yin ve Chan, 2013).

Khan, Zahin, Hasan, Husain ve Ahmad (2009) karanfil, tarçın, lavanta, nane yağlarının *C. violaceum* CV12472 ve *C. violaceum* CV026 bakterilerine karşı antiqorum sensing aktivitesi gösterdiğini rapor etmişlerdir. Karanfil yağı, *C. violaceum* CV12472 ve *C. violaceum* CV026 bakterilerine karşı sırasıyla 19 ve 17 mm inhibisyon çapı oluşturmuştur.

Yaptığımız çalışmada, zeytin yaprağı ekstraktlarının *C. violaceum* CV026 ve *C. violaceum* ATCC 12472 bakterilerine karşı antiqorum sensing aktiviteleri belirlenmiştir. *C. violaceum* ATCC 12472 bakteri suşu üzerine en yüksek antiqorum sensing aktiviteye sahip olan ekstrakt mikrodalga yöntemiyle elde edilmiş olan su ekstraktı olarak tespit edilmiş ve viyolasin inhibisyon çapı $13,60 \pm 0,30$ mm olarak ölçülmüştür. Sonuç olarak mikrodalga destekli ekstraksiyon ile hazırlanan örneklerin antiqorum sensing aktivite gösterdiği bulunmuş ve ekstraktın farklı konsantrasyonları hazırlanarak MİK değerleri belirlenmiştir. Elde edilen inhibisyon zon çapları Tablo 4.6’da verilmiştir. *C. violaceum* CV026 bakterisi kullanılarak uygulanan antiqorum sensing aktivitesine göre metanol-su mikrodalga ekstraktının antiqorum sensing aktivitesi daha yüksek bulunmuştur. Tüm ekstraktların MİK değerleri 7,5 mg/mL olarak belirlenmiştir. *C. violaceum* ATCC 12472 kullanılarak uygulanan antiqorum sensing aktivitesine göre ise mikrodalga su ekstraktının antiqorum sensing aktivitesi daha yüksek bulunmuştur. Su ekstraktının MİK değeri 7,5 mg/mL, etanol su ve metanol su ekstraktlarının MİK değerleri 15 mg/mL olarak belirlenmiştir.

Tablo 4.6. Ekstraktların anti-quorum sensing aktivitesinin MİK değerin belirlenmesi

İnhibisyon çapı (mm)			
<i>C. violaceum</i> CV026			
Konsantrasyon (mg /mL)	MDS	MDES	MDMS
60	13,10±0,40	15,83±0,80	16,25±0,36
30	11,44±0,33	12,00±0,14	12,31±0,41
15	10,84±0,08	10,49±0,24	10,42±0,25
7,5	9,51±0,29	9,61±0,17	9,23±0,12
3,75	-	-	-
<i>C. violaceum</i> ATCC 12472			
Konsantrasyon (mg /mL)	MDS	MDES	MDMS
60	13,35±0,27	12,27±0,43	12,97±0,72
30	11,69±0,33	11,19±0,38	11,51±0,30
15	10,64±0,35	9,45±0,26	9,99±0,37
7,5	9,72±0,42	-	-
3,75	-	-	-

MDS: Mikrodalga destekli ekstraksiyon-su MDES: Mikrodalga destekli ekstraksiyon etanol-su MDMS: Mikrodalga destekli ekstraksiyon metanol-su

4.3.1. Viyolasin Üretiminin İnhibisyonu

C. violaceum ATCC 12472 suşu tarafından üretilen violasin pigmenti üzerindeki etkinin % inhibisyon olarak hesaplanması ile elde edilen sonuçlar Tablo 4. 7’de gösterilmiştir. Deneyden elde edilen sonuçlar incelendiğinde mikrodalga yöntemi ile hazırlanmış ekstraktların 60, 30, 15, 7,5 ve 3,75 mg/mL konsantrasyonlarının *C. violaceum* ATCC 12472 bakterisi tarafından oluşturulan viyolasin pigmentinin üretimini engellediği görülmüştür. Ekstraktların en yüksek viyolasin inhibisyonu gösterdiği konsantrasyon 60 mg/mL olarak belirlenmiştir. 60 mg/mL konsantrasyonunda su ile hazırlanan mikrodalga destekli ekstraksiyon sonucunda elde edilen inhibisyon yüzdesi % 83,49, etanol-su ile hazırlanan mikradalga ekstraktının % 48,36, aynı şekilde mikrodalga ekstraksiyonu ile hazırlanan metanol-su örneğinin viyolasin giderim oranı % 68,32 olarak tespit edilmiştir.

Tablo 4.7. Ekstraktların *C.violaceum* ATCC 12472 bakterisinin viyolasin pigmenti üretimi üzerine inhibisyonu

Konsantrasyon (mg/ml)	% Giderim oranı		
	MDS	MDES	MDMS
60	83,49	48,36	68,32
30	67,69	47,51	44,52
15	63,27	41,36	39,91
7,5	52	37,9	6,07
3,75	28,35	27,38	1,3
1,87	-	-	-

MDS: Mikrodalga destekli ekstraksiyon su **MDE:** Mikrodalga destekli ekstraksiyon etanol-su **MDMS:** Mikrodalga destekli ekstraksiyon metanol-su

Türkiye’de Karamuk adı ile bilinen bitkinin antimikrobiyal aktivitesi agar kuyucuk yöntemi ile belirlenmiştir. *S. aerus* ATCC 25923, *B. cereus* ATCC 11778, *E. coli* ATCC 25922, *E. faecalis* ATCC 29212 ve *P.aeruginosa* PA01 test mikroorganizmaları olarak kullanılmıştır.

Bitkinin, *E. coli* ATCC 25922 ve *P. aeruginosa* PA01’e karşı aktivite göstermediği, *S. aureus* ATCC 25923 bakterisine karşı $16,0 \pm 1,0$ mm inhibisyon çapı oluşturup, *B. cereus* ATCC 11778’e karşı 19,0, *E. faecalis* ATCC 29212 bakterisi üzerine 17,0 inhibisyon çapı ile aktivite gösterdiği belirlenmiştir. Ayrıca Karamuk bitkisinin 60 mg/mL konsantrasyonda *C. violaceum* ATCC 12472 bakterisine karşı antiquorum sensing etkisi araştırılmıştır. Yapılan çalışma sonucunda ekstraktın viyolasin üretiminde inhibisyona neden olduğu böylelikle antiquorum sensing etkisi gösterdiği bildirilmiştir (Gürağaç, Dereli, Arın ve Önem,2022).

Bu çalışmada ekstraktların *C. violaceum* CV026 bakterisinin viyolasin pigmenti üretimi üzerine inhibisyonu hesaplanmıştır ve Tablo 4.8’de gösterilmiştir. Mikrodalga destekli ekstraksiyon yönteminde su ile elde edilen ekstraktın viyolasin inhibisyon yüzdesi % 76,77 olarak belirlenmiştir, bu değeri % 64,53 ile etanol-su ekstraktı, % 52,03 ile metanol su ekstraktı takip etmektedir.

Tablo 4.8. Ekstraktların *C.violaceum* CV026 bakterisinin viyolasin pigmenti üretimini üzerine inhibisyonu

Konsantrasyon(mg /ml)	MDS	MDES	MDMS
	% giderim oranı	% giderim oranı	% giderim oranı
60	76,77	64,53	52,03
30	28,93	29,08	-
15	2,74	16,19	-
7,5	-	3,89	-
3,75	-	-	-
1,87	-	-	-

MDS: Mikrodalga destekli ekstraksiyon su MDE: Mikrodalga destekli ekstraksiyon etanol-su MDMS: Mikrodalga destekli ekstraksiyon metanol-su

Husain ve diğerleri (2017) tarafından bildirilen çalışmada, mango yaprağı ekstraktının *C.violaceum*, *Aeromonas hydrophila*, ve *P. aeruginosa* mikroorganizmalarına karşı AHL sinyal molekülüne bağlı pigment üretimini azalttığı ve biyofilm oluşumunu engellendiği saptanmıştır. Mango yaprağının metanol ile hazırlanan ekstraktı, *C. violaceum* CV026 bakterisi üzerinde viyolasin pigmenti üretimi üzerinde inhibisyon etkisi göstermiş, inhibisyon yüzdesi % 83,6 olarak belirlenmiştir.

Choo, Rukayadi ve Hwang (2006) vanilya özütünün metanol ekstraktının *C.viocelaeum* CV026 bakterisinin viyolasin pigmenti üretimini engellediğini bildirmişlerdir.

Yapılan bir çalışmada nane ekstraktının *C.viocaleum* 026 bakterisi tarafından viyolasin üretimini engellediği gözlenmiştir. Viyolasin üretiminde nane ekstraktının konsantrasyonu azaldıkça, viyolasin üretim inhibisyonunda azalma görülmüştür. 400 µg/mL konsantrasyonda viyolasin giderim oranı % 85 iken, 50 µg/mL konsantrasyonda % 26 bulunmuştur (Husain ve diğerleri, 2015).

Vattem, Mihalik, Crixel ve McLean (2007) ahududu (*Rubus idaeus*), yaban mersini (*Vaccinium angustifolium*) ve üzüm (*Vitis* sp.) özütlerinin *C. violaceum* CV026 'da AHL eklenmesiyle üretilen viyolasini sırasıyla % 60, % 42 ve % 20 oranlarında azalttığını belirlemişlerdir. Ayrıca kekik (*Thymus* sp.) ve lahananın (*Brassica oleracea*) viyolasin

pigment oluşumunu % 60 oranında inhibe ettiğini de rapor etmişlerdir. Çalışmamızda elde edilen zeytin yaprağının *C. violaceum* CV026 bakterisi üzerinde viyolasin giderim oranları literatürde belirtilen değerlere benzer olarak bulunmuştur.

4.3.2. Kayma hareketinin inhibisyonu

Kayma hareketi (swarming) yarı katı ya da viskoz yüzeylerde bakteri topluluğunun hızla hareket etmesi olarak adlandırılır. Kayma hareketi sinyal moleküllerin artışıyla beraber bakterilerin cevap vermesiyle gerçekleşir. *P.aeruginosa* bakterisinin oluşturduğu kayma hareketi quorum sensing sinyal molekülü olan AHL tarafından kontrol edilmektedir (Yılmaz, 2012).

Ekstraktların *P. aeruginosa* PA01 mikroorganizmasının oluşturmuş olduğu swarming (kayabilme) hareket özelliği üzerindeki etkisinin % inhibisyon biçiminde hesaplanmış sonuçları Tablo 4.9’da belirtilmiştir. Klasik çözücü ekstraksiyonunda su kullanılarak elde edilen ekstrakt swarming (kayabilme) hareket özelliği üzerinde % 45,98 ile en yüksek inhibisyon etkiyi göstermiştir. Aynı konsantrasyonlarda hazırlanan klasik çözücü yönteminde kullanılan metanol-su % 30,47, etanol su % 21,95 inhibe edici etki göstermiştir. Mikrodalga ekstraksiyon yöntemi ile hazırlanan su ekstraktı % 41,43 hareket özelliğini inhibe edici etki gösterirken, etanol su % 28,46 ve metanol su ekstraktı % 42,3 kayma hareketi üzerinde inhibisyon etkisi göstermiştir.

Tablo 4.9. Ekstraktların *P.aeruginosa* PA01 bakterisi üzerinde kayma hareketinin inhibisyonu

Ekstraktlar	Kayma Hareketi inhibisyonu (%)
KS	45,98±1,82
KMS	30,47±0,97
KES	21,95±0,99
MDS	41,37±1,02
MDES	28,33±1,22
MDMS	42,30±1,83

MDS: Mikrodalga destekli ekstraksiyon su **MDE:** Mikrodalga destekli ekstraksiyon etanol-su **MDMS:** Mikrodalga destekli ekstraksiyon metanol-su ekstraksiyonu **KMS:** Klasik çözücü ekstraksiyon metanol-su **KES:** Klasik çözücü ekstraksiyon etanol-su **KS:** Klasik çözücü ekstraksiyon su

5.SONUÇ

Bakteriyel hücreden hücreye kimyasal iletişim, patojenlerde antibiyotik direnci, viyolasin üretimi, kayma hareketi, biyofilm oluşumu, hayatta kalma, çoğalma ve toksin üretimi ile ilgili mekanizmaları tetikleyen ve kontrol eden çevreyi algılama yoluyla gerçekleşir.

Çalışmamızda zeytin yaprağı kullanılarak üç farklı ekstraksiyon yöntemi uygulanmıştır. Bu yöntemler klasik çözücü ekstraksiyonu, ultrason destekli ekstraksiyon ve mikrodalga destekli ekstraksiyondur. Elde ettiğimiz sonuçlarla literatür çalışmalarını karşılaştırdığımızda mikrodalga destekli ekstraksiyon ile toplam fenolik madde içeriği zengin, antioksidan kapasitesi yüksek ekstraktlar elde edilebildiği tespit edilmiştir.

Ekstraktların toplam fenolik madde değeri en yüksek su kullanarak mikrodalga destekli ekstraksiyonla elde edilen ekstraktta $113,33 \pm 0,94$ mg/g kuru madde olarak bulunmuştur. Aynı zamanda en yüksek antioksidan aktivite değerleri de DPPH ve ABTS yöntemleri ile yine bu örnekte belirlenmiştir.

Ekstraktların *B. subtilis* ATCC 11774, *S. aureus* ATCC 29213 ve *K. pneumoniae* ATCC 13883 bakterileri üzerinde antimikrobiyal etki gösterdiği yöntemler klasik çözücü ekstraksiyon yöntemi ve mikrodalga destekli ekstraksiyon yöntemi ile elde edilmiştir.

Mikrodalga destekli ekstraksiyon yöntemi ile elde edilen ekstraktların, diğer ekstraksiyon yöntemleri ile kıyaslandığında, *C. violaceum* CV026 ve *C. violaceum* ATCC 12472 bakteri suşları üzerinde quorum sensing inhibisyon aktivitesinin daha etkili olduğu görülmektedir. Bunun sebebinin zeytin yapraklarından mikrodalga ekstraksiyon yöntemi ile elde edilen ekstraktlarda fenolik madde miktarının yüksek olmasına bağlı olduğu düşünülmektedir.

C. violaceum ATCC 12472 bakterisi için en yüksek quorum sensing inhibisyon etkisini $13,60 \pm 0,30$ inhibisyon çapı ile su kullanılarak gerçekleştirilen mikrodalga destekli ekstrakt göstermiştir. *C. violaceum* CV026 bakteri suşu üzerinde en yüksek anti-quorum sensing etkisi metanol-su mikrodalga (MDMS) ekstraktında belirlenmiş ve inhibisyon çapı $17,07 \pm 0,26$ mm bulunmuştur.

Literatür çalışmaları sonuçlarımızla benzer şekilde metanol ve etanol çözügenlerinin diğer çözügenlere oranla antimikrobiyal ve anti-quorum aktivitede daha etkili olduğunu göstermektedir.

Viyolasin pigmenti, genellikle bakteri hücrelerini QS aracılı bir süreçle oksidatif stresin erişiminden uzak tutan bakteri zarı üzerinde bir antioksidan koruyucu madde rolü oynar. Mikrodalga destekli ekstraktların; *C. violaceum* CV026 ve *C. violaceum* ATCC 12472 bakteri suşlarının viyolasin pigment üretimi üzerine etkisi % giderim olarak değerlendirilmiştir.

Zeytin yaprağı ekstraktlarından mikrodalga destekli farklı çözümlerle hazırlanan ekstraktların tümü, viyolasin üretimini engellemiştir. Su kullanılarak gerçekleştirilen mikrodalga destekli ekstraksiyonla elde edilen ekstraktın her iki bakteri üzerinde anti-quorum sensing etkisi etanol-su ve metanol-su kullanılarak gerçekleştirilen mikrodalga destekli ekstraksiyonla elde edilen ekstraktların anti-quorum sensing etkilerinden daha yüksek olarak gözlenmiştir. Çalışmamızda mikrodalga destekli ekstraksiyon yöntemi ile elde edilen zeytin yaprağı metanol-su ekstraktının (MDMS) *C. violaceum* CV026 bakterisinin ürettiği viyolasini giderim oranı 60 mg/mL konsantrasyonunda % 45,98 bulunmuştur. Ayrıca çalışmamızda klasik çözücü ve mikrodalga destekli ekstraksiyonla elde edilen örneklerin *P. aeruginosa* PA01 bakteri suşunun kayma hareketini engellediği belirlenmiştir.

Zeytin yaprağı ekstraktı elenolik asit türevleri ve hidroksitirosol gibi fenolik bileşikler açısından zengindir. Böylelikle güçlü antimikrobiyal aktiviteye sahip zeytin yaprağı ekstraktları gıda, kozmetik ve ilaç endüstrisindeki uygulamalar için büyük potansiyel sağlamaktadır. Çalışmamızda zeytin yaprağı ekstraktı elde etmek için farklı yöntemler kullanılmıştır. Mikrodalga destekli ekstraksiyonun klasik ve ultrason destekli ekstraksiyon ile karşılaştırıldığında, zamandan tasarruf sağlayan, etkili, alternatif bir ekstraksiyon yöntemi olduğu görülmüştür.

6. KAYNAKÇA

- Ahmad-Qasem, M. H., Cánovas, J., Barrajón-Catalán, E., Micol, V., Cárcel, J. A., & García-Pérez, J. V. (2013). Kinetic and compositional study of phenolic extraction from olive leaves (var. Serrana) by using power ultrasound. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 17, 120-129.
- Aliabadi, M. A., Darsanaki, R. K., Rokhi, M. L., Nourbakhsh, M., & Raeisi, G. (2012). Antimicrobial activity of olive leaf aqueous extract. *Annals of Biological Research*, 3(8), 4189-4191.
- Alberti, A., Zielinski, A. A. F., Zardo, D. M., Demiate, I. M., Nogueira, A., & Mafra, L. I. (2014). Optimisation of the extraction of phenolic compounds from apples using response surface methodology. *Food Chemistry*, 149, 151-158.
- Alupului, A., Calinescu, I., & Lavric, V. (2012). Microwave extraction of active principles from medicinal plants. *UPB Science Bulletin, Series B*, 74(2), 129-142.
- Artuç, C. (2019). Bazı *Streptomyces* spp.'lerden elde edilen pigmentlerin antimikrobiyal, antioksidan ve anti-quorum sensing inhibitör aktivitelerinin belirlenmesi. (Yüksek Lisans Tezi). Muğla Sıtkı Koçman Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Muğla.
- Bayram, M., Topuz, S., & Kaya, C. (2020). Antioxidant, antimicrobial activity of olive leaf extract and oleuropein, their possibilities usage in foods. *Turkish Journal of Agriculture-Food Science and Technology*, 8(2), 337-347.
- Benli, M., & Yiğit, N. (2005). Ülkemizde yaygın kullanımı olan kekik (*Thymus vulgaris*) bitkisinin antimikrobiyal aktivitesi. *Orlab On-Line Mikrobiyoloji Dergisi*, 3(8), 1-8.
- Bisignano, G., Tomaino, A., Cascio, R.L., Crisafi, G., Uccella, L., Saija, A. (1999). On the in-vitro antimicrobial activity of oleuropein and hydroxytyrosol. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*. (51), 971-974.
- Boli, E., Prinos, N., Louli, V., Pappa, G., Stamatis, H., Magoulas, K., & Voutsas, E. (2022). Recovery of bioactive extracts from olive leaves using conventional and microwave-assisted extraction with classical and deep eutectic solvents. *Separations*, 9(9), 255.
- Bonjar, S. (2004). Evaluation of antibacterial properties of some medicinal plants used in Iran. *Journal of Ethnopharmacology*, 94(2), 301-305.
- Büyüktuncel, E., 2012. Gelişmiş ekstraksiyon teknikleri I. *Hacettepe Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Dergisi*, 32(2), 209-242.
- Borjan, D., Leitgeb, M., Knez, Ž., & Hrncić, M. K. (2020). Microbiological and antioxidant activity of phenolic compounds in olive leaf extract. *Molecules*, 25(24), 5946.

Çelik, M., Aksoy, M., & Özkaya, F. D. (2016). Üniversite öğrencilerinin zeytinyağı bilgi düzeylerini belirlemeye yönelik bir araştırma. *Zeytin Bilimi*, 6(2), 69-75.

Chbib, C. (2020). Impact of the structure-activity relationship of AHL analogues on quorum sensing in Gram- negative bacteria. *Bioorg Med Chem*, 28(3): 115282.

Chemat, F., Rombaut, N., Meullemiestre, A., Turk, M., Perino, S., Fabiano-Tixier, A. S., & Abert-Vian, M. (2017). Review of green food processing techniques. Preservation, transformation, and extraction. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 41, 357-377.

Chemat, F., Tomao, V., & Viot, M. (2008). Ultrasound-assisted extraction in food analysis. *Handbook of food analysis instruments*, 11, 85-103.

Choo JH, Rukayadi Y, Hwang JK. 2006. Inhibition of Bacterial Quorum Sensing by Vanilla Extract. *Lett Appl Microbiol*, 42/6: 637–641.

Dada, N., Vannavong, N., Seidu, R., Lenhart, A., Stenström, T. A., Chareonviriyaphap, T., & Overgaard, H. J. (2013). Relationship between *Aedes aegypti* production and occurrence of *Escherichia coli* in domestic water storage containers in rural and sub-urban villages in Thailand and Laos. *Acta tropica*, 126(3), 177-185.

Danahaliloğlu, H., Tekeli, Y., Göycüncik, S., & Yıldırım, F. (2018). Hatay’da farklı bölgelerde yetiştirilen zeytin yapraklarının antioksidan özelliklerinin belirlenmesi. *Karadeniz Fen Bilimleri Dergisi*, 8(1), 77-86.

Debib, A., & Boukhatem, M. N. (2017). Phenolic content, antioxidant and antimicrobial activities of “Chemlali” olive leaf (*Olea europaea* L.) extracts. *International Journal of Pharmacology, Phytochemistry and Ethnomedicine*, 6, 38-46.

Dekdouk, N., Malafronte, N., Russo, D., Faraone, I., De Tommasi, N., Ameddah, S., Severino, L. ve Milella, L., 2015. Phenolic compounds from *Olea europaea* L. possess antioxidant activity and inhibit carbohydrate metabolizing enzymes in vitro. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2015.

Demirkol, M., Çelik, Ö. F., & Tarakçı, Z. (2017). Ordu İlinde Yetişen Sakarca (*Ornithogalum umbellatum*) bitkisinin antibakteriyel aktivitesi ve toplam fenolik madde içeriği. *Ordu Üniversitesi Bilim ve Teknoloji Dergisi*, 7(2), 312-318.

Dickey, S. W., Cheung, G. Y., & Otto, M. (2017). Different drugs for bad bugs: antivirulence strategies in the age of antibiotic resistance. *Nature Reviews Drug Discovery*, 16(7), 457-471.

Dong, Y. H., & Zhang, L. H. (2005). Quorum sensing and quorum-quenching enzymes. *Journal of Microbiology*, 43(spc1), 101-109.

Durmaz, E., Sumnu, G., & Sahin, S. (2015). Microwave-assisted extraction of phenolic compounds from caper. *Separation Science and Technology*, 50(13), 1986-1992.

- Ekşi S, Esertaş ÜZÜ, Kilic AO, Ejder N, Uzunok B (2020). Determination of the antimicrobial and antibiofilm effects and ‘quorum sensing’ inhibition potentials of *Castanea sativa* mill. extracts. *Not Bot Horti Agrobot Cluj-Napoc* 48(1), 66–78
- El-Sayed, N. R., Samir, R., Jamil M. Abdel-Hafez, L., & Ramadan, M. A. (2020). Olive leaf extract modulates quorum sensing genes and biofilm formation in multi-drug resistant *Pseudomonas aeruginosa*. *Antibiotics*, 9(9), 526.
- Eskilsson, C.S., & Björklund, E. (2000). Analytical-scale microwave-assisted extraction. *Journal of chromatography A*, 902(1), 227-250.
- Fito, M., R. de la Torre, Farré-Albaladejo, M., Khymenetz, O., Marrugat, J., and Covas, M.I., 2007. Bioavailability and antioxidant effects of olive oil phenolic compounds in humans: a review. *Annali dell'Istituto Superiore di Sanità*, 43, 375-381.
- Ghanbari, R., Anwar, F., Alkharfy, K. M., Gilani, A. H., & Saari, N. (2012). Valuable nutrients and functional bioactives in different parts of olive (*Olea europaea* L.)—a review. *International journal of molecular sciences*, 13(3), 3291-3340.
- Gökmen, M., Akkaya, L., Recep, Kara, Veli, Gök., & Ektik, N. (2016). Zeytin yaprağı ekstraktı ilavesinin köftelerde *S. typhimurium*, *E. coli* O157 ve *S. aureus* gelişimi üzerine etkisi. *Akademik Gıda*, 14(1), 28-32.
- Gürağaç Dereli, F. T. , Arın, E. & Önem, E. (2022). Evaluation of the potential antibacterial activity of berberis crataegina Dc.: with focus on quorum sensing inhibition of *Chromobacterium violaceum* ATCC 12472 . *Journal of Faculty of Pharmacy of Ankara University*, 47 (1) , 178-184.
- Gürgen, A., Tabbouche, S. A., Yıldız, S., & Kılıç, A. O. (2017). Türkiye’den toplanan bazı yabancı mantarların antimikrobiyal ve anti-Quorum sensing (Çoğunluğu algılama) aktiviteleri. *Muş Alparslan Üniversitesi Fen Bilimleri Dergisi*, 5(2), 453-457.
- Göze, E. Y. (2010). “Çeşitli bitki ekstraktlarının *Pseudomonas aeruginosa*’da çevreyi algılama sistemi üzerine etkilerinin incelenmesi”, Doktora Tezi, Moleküler Biyoloji Ana Bilim Dalı, Fen Bilimleri Enstitüsü, Süleyman Demirel Üniversitesi, Isparta, 2009.
- Hammi, K. M., Jdey, A., Abdelly, C., Majdoub, H., & Ksouri, R. (2015). Optimization of ultrasound-assisted extraction of antioxidant compounds from Tunisian *Zizyphus lotus* fruits using response surface methodology. *Food Chemistry*, 184, 80-89.
- Hoshino, T. (2011). Violacein and related tryptophan metabolites produced by *C. violaceum*: biosynthetic mechanism and pathway for construction of violacein core. *Applied Microbiology and Biotechnology* 91:1463-1475.

- Husain, F. M., Ahmad, I., Khan, M. S., Ahmad, E., Tahseen, Q., Khan, M. S., & Alshabib, N. A. (2015). Sub-MICs of *Mentha piperita* essential oil and menthol inhibits AHL mediated quorum sensing and biofilm of Gram-negative bacteria. *Frontiers in Microbiology*, 6, 420.
- Irakli, M., Chatzopoulou, P., & Ekateriniadou, L. (2018). Optimization of ultrasound-assisted extraction of phenolic compounds: Oleuropein, phenolic acids, phenolic alcohols and flavonoids from olive leaves and evaluation of its antioxidant activities. *Industrial Crops and Products*, 124, 382-388.
- Ibrahim, B. (2022). *Pinus nigra* L. ve *Pinus brutia* L.(Çam) Alkollü kabuk ekstraktlarının *Pseudomonas aeruginosa* ve *Chromobacterium violaceum*'a karşı anti-QS aktivitesi yoluyla virülans faktörlerinin üretim potansiyeli üzerindeki etkisinin değerlendirilmesi. *Süleyman Demirel Üniversitesi Sağlık Bilimleri Dergisi*, 13(2), 171-178.
- Ince, A. E., Şahin, S., & Şümnü, S. G. (2013). Extraction of phenolic compounds from melissa using microwave and ultrasound. *Turkish Journal of Agriculture and Forestry*, 37(1), 69-75.
- Choo J.H., Rukayadi, Y., Hwang, J.-K. (2006). Inhibition of bacterial quorum sensing by vanilla extract, *Letters in Applied Microbiology*, 42 (6), 637–641.
- Japón-Luján, R., & de Castro, M. L. (2006). Superheated liquid extraction of oleuropein and related biophenols from olive leaves. *Journal of Chromatography A*, 1136(2), 185-191.
- Jakobsen, T. H., van Gennip, M., Phipps, R. K., Shanmugham, M. S., Christensen, L. D., Alhede, M., ... & Givskov, M. (2012). Ajoene, a sulfur-rich molecule from garlic, inhibits genes controlled by quorum sensing. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 56(5), 2314-2325.
- Junsathian P, Nakamura S, Katayama S, Rawdkuen S. (2022). Antioxidant and antimicrobial activities of Thai edible plant extracts prepared using different extraction techniques. *Molecules*. 27(19):6489.
- Kazemian, H., Ghafourian, S., Heidari, H., Amiri, P., Yamchin, J. K., Shavalipour, A., and Sadeghifard N., (2015). Antibacterial, anti-swarming and anti-biofilm formation activities of *Chamaemelum nobile* against *Pseudomonas aeruginosa*. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical* 48, 432–436.
- Keskin, D., Ceyhan, N., Uğur, A., & Dbey, A. D. (2012). Antimicrobial activity and chemical constitutions of West Anatolian olive (*Olea europaea* L.) leaves. *Journal of Food, Agriculture & Environment*, 10(2), 99-102.
- Khalil, M. M., Ismail, E. H., El-Baghdady, K. Z., & Mohamed, D. (2014). Green synthesis of silver nanoparticles using olive leaf extract and its antibacterial activity. *Arabian Journal of Chemistry*, 7(6), 1131-1139.

- Khanum, F., Zahoor, T., Khan, M. I., Asghar, M., & Sablani, S. S. (2020). Antioxidant, antibacterial and functional-food-packaging potential of leaf extract from Pakistani olive cultivars. *Pakistan Journal of Agricultural Sciences*, 57(3).
- Khan, M. S. A., Zahin, M., Hasan, S., Husain, F. M., & Ahmad, I. (2009). Inhibition of quorum sensing regulated bacterial functions by plant essential oils with special reference to clove oil. *Letters in Applied Microbiology*, 49(3), 354-360.
- Kim, D. O., Lee, K. W., Lee, H. J., & Lee, C. Y. (2002). Vitamin C equivalent antioxidant capacity (VCEAC) of phenolic phytochemicals. *Journal of Agricultural and food chemistry*, 50(13), 3713-3717.
- Kim, H. S., Lee, S. H., Byun, Y., & Park, H. D. (2015). 6-Gingerol reduces *Pseudomonas aeruginosa* biofilm formation and virulence via quorum sensing inhibition. *Scientific reports*, 5(1), 1-11.
- Kobyas, O., Çağlak, E., & Buşra, Kara. (2019). Balıkesir-Ayvalık ve Trabzon- Çarşıbaşı 'ndan toplanan zeytin yapraklarının (*Olea europaea* L.) Farklı yöntemlerle kurutulması ile elde edilen ekstraktların antioksidan ve antimikrobiyal Etkilerinin Karşılaştırılması. *Journal of Anatolian Environmental and Animal Sciences*, 4(2), 257-262.
- Koh, K. H., & Tham, F. Y. (2011). Screening of traditional Chinese medicinal plants for quorum-sensing inhibitors activity. *Journal of Microbiology, Immunology and Infection*, 44(2), 144-148.
- Korukluoglu, M., Sahan, Y., Yigit, A., & Karakas, R. (2006). Antifungal activity of olive leaf (*Olea Europaea* L.) extracts from the Trilye region of Turkey. *Annals of microbiology*, 56, 359-362.
- Köse, M., Semizoğlu, D., Kasnak, C., Palamutoğlu, R. (2018). Gemlik tipi zeytinlerin olgunlaşma dönemindeki fenolik, flavonoid ve antioksidan kapasitesindeki değişiklikler. *Karadeniz Fen Bilimleri Dergisi*, 8(2): 49-55.
- Kutlu, N., Isci, A., Sakiyan, O., & Yilmaz, A. E. (2021). Extraction of phenolic compounds from cornelian cherry (*Cornus mas* L.) using microwave and ohmic heating assisted microwave methods. *Food and Bioprocess Technology*, 14, 650-664.
- Kutlu, N., Yeşilören, G., Aslı, İşci., & Şakiyan, Ö. (2017). Konvansiyonel ekstraksiyona alternatif: yeşil teknolojiler. *Gıda*, 42(5), 514-526.
- Lama-Muñoz, A., del Mar Contreras, M., Espínola, F., Moya, M., Romero, I., & Castro, E. (2020). Content of phenolic compounds and mannitol in olive leaves extracts from six Spanish cultivars: Extraction with the Soxhlet method and pressurized liquids. *Food Chemistry*, 320, 126626.

- Leonelli, C., Veronesi, P., & Cravotto, G. (2012). Microwave-assisted extraction: An introduction to dielectric heating. In *Microwave-assisted extraction for bioactive compounds: theory and practice* (pp. 1-14). Boston, MA: Springer US.
- Li, J., Nation, R. L., Turnidge, J. D., Milne, R. W., Coulthard, K., Rayner, C. R., & Paterson, D. L. (2006). Colistin: the re-emerging antibiotic for multidrug-resistant Gram-negative bacterial infections. *The Lancet infectious diseases*, 6(9), 589-601.
- Liu, Y., McKeever, L. C., & Malik, N. S. (2017). Assessment of the antimicrobial activity of olive leaf extract against foodborne bacterial pathogens. *Frontiers in microbiology*, 8, 113.
- Llompart, M., Garcia-Jares, C., Celeiro, M., & Dagnac, T. (2019). Extraction| Microwave-assisted extraction.
- Maeng, J. H., Muhammad Shahbaz, H., Ameer, K., Jo, Y., & Kwon, J. H. (2017). Optimization of microwave-assisted extraction of bioactive compounds from *Coriolus versicolor* mushroom using response surface methodology. *Journal of Food Process Engineering*, 40(2), e12421.
- Majik, M.S., Gawas, U.B., Mandrekar, V.K. (2020). Next generation quorum sensing inhibitors: Accounts on structure activity relationship studies and biological activities. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 28(21), 115728.
- Malik, S. N. (2015). Antibacterial activity of olive (*Olea europaea*) leaves and arugula (*Eruca sativa*) seeds extract. *International Journal of Pharmacognosy and Phytochemical Research*, 7(2), 307-310.
- Markin, D., Duek, L., & Berdicevsky, I. (2003). In vitro antimicrobial activity of olive leaves. Antimikrobielle Wirksamkeit von Olivenblättern in vitro. *Mycoses*, 46(3-4), 132-136.
- Malayoğlu, H. B., & Aktaş, B. (2011). Zeytinyağı işleme yan ürünlerinden zeytin yaprağı ile zeytin karasuyunun antimikrobiyal ve antioksidan etkileri. *Hayvansal Üretim*, 52(1).
- Miller, M. B., & Bassler, B. L. (2001). Quorum sensing in bacteria. *Annual Reviews in Microbiology*, 55(1), 165-199.
- Molina, R. D. I., Campos-Silva, R., Díaz, M. A., Macedo, A. J., Blázquez, M. A., Alberto, M. R., & Arena, M. E. (2020). Laurel extracts inhibit Quorum sensing, virulence factors and biofilm of foodborne pathogens. *LWT*, 134, 109899.
- Monnet, V., Juillard, V., & Gardan, R. (2016). Peptide conversations in Gram-positive bacteria. *Critical Reviews in Microbiology*, 42(3), 339-351.
- Musthafa, K. S., Ravi, A. V., Annapoorani, A., Packiavathy, I. S. V., & Pandian, S. K. (2010). Evaluation of anti-quorum-sensing activity of edible plants and fruits through inhibition of the N-acyl-homoserine lactone system in *Chromobacterium violaceum* and *Pseudomonas aeruginosa*. *Chemotherapy*, 56(4), 333-339.

- Noumi, E., Ahmad, I., Bouali, N., Patel, H., Ghannay, S., ALrashidi, A. A., ... & Snoussi, M. (2022). Thymus musilii Velen. Methanolic Extract: In Vitro and In Silico Screening of Its Antimicrobial, Antioxidant, Anti-Quorum Sensing, Antibiofilm, and Anticancer Activities. *Life*, 13(1), 62.
- Önem, E., & Özaydın, A. G., (2018). Çeşitli Turunçgillerin (Limon, Portakal, Mandalina) Yaprak Ekstraktlarının Fenolik Kompozisyonu ve P. aeruginosa PAO1 Üzerine Anti-Swarming Etkileri . International Conference on Multidisciplinary, Science, Engineering and Technology (pp.17-23). Dubai, United Arab Emirates.
- Özaydın, A. G., Evren, Arın., & Ebru, Önem. (2020). Türk Mutfağında Yeni Bir Fonksiyonel Gıda Olarak Siyah Sarımsak (Allium sativum L.): Fenolik Madde İçeriği ve Bakteriyel İletişim (Quorum Sensing) Üzerine Etkisi. *Akademik Gıda*, 18(1), 27-35.
- Papenfort, K., & Bassler, B. L. (2016). Quorum sensing signal–response systems in Gram-negative bacteria. *Nature Reviews Microbiology*, 14(9), 576-588.
- Priya, K., Yin, W. F., & Chan, K. G. (2013). Anti-quorum sensing activity of the traditional Chinese herb, Phyllanthus amarus. *Sensors*, 13(11), 14558–14569.
- Pyo, Y. H., Lee, T. C., Logendra, L., & Rosen, R. T. (2004). Antioxidant activity and phenolic compounds of Swiss chard (Beta vulgaris subspecies cyclo) extracts. *Food Chemistry*, 85(1), 19-26.
- Rafiee, Z., Jafari, S. M., Alami, M., & Khomeiri, M. (2011). Microwave-assisted extraction of phenolic compounds from olive leaves; a comparison with maceration. *J. Anim. Plant Sci*, 21(4), 738-745.
- Rodrigues, A. C., Zola, F. G., Oliveira, B. D. A., Sacramento, N. T.B., Silva, E. R., Bertoldi, M. C., Taylo, J. G., and Pinto, U.M., (2016). Quorum quenching and microbial control through phenolic extract of Eugenia uniflora fruits. *Journal of Food Science*, 81, 2538-2544.
- Ree, R., Pellegrini, N., Proteggente, A., Pannala, A., Yang, M., & Rice-Evans, C. (1999). Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free radical biology and medicine*, 26(9-10), 1231-1237.
- Sabry, O. M. (2014). Beneficial health effects of olive leaves extracts. *Journal of Natural Sciences Research*, 4(19), 1-9.
- Santos, H. M., & Capelo, J. L. (2007). Trends in ultrasonic-based equipment for analytical sample treatment. *Talanta*, 73(5), 795-802.
- Shan, B., Cai, Y. Z., Brooks, J. D., & Corke, H. (2007). The in vitro antibacterial activity of dietary spice and medicinal herb extracts. *International Journal of Food Microbiology*, 117(1), 112-119.

- Singh, B.N., Singh, B.R., Singh, R.L., Prakash, D., Sarma, B.K., Singh, H.B., (2009). Antioxidant and anti-quorum sensing activities of green pod of *Acacia nilotica* L. *Food and Chemical Toxicology*, 1-9.
- Singleton, V.L., Orthofer, R., Lamuela-Raventos, R.M. (1999). Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin-Ciocalteu reagent. *Methods in Enzymology*, 299:152-178
- Sosa-Hernández, J. E., Villalba-Rodríguez, A. M., Romero-Castillo, K. D., Aguilar-Aguila-Isaías, M. A., García-Reyes, I. E., Hernández-Antonio, A., ... & Iqbal, H. M. (2018). Organs-on-a-chip module: a review from the development and applications perspective. *Micromachines*, 9(10), 536.
- Souilem, S., Fki, I., Kobayashi, I., Khalid, N., Neves, M. A., Isoda, H., ... & Nakajima, M. (2017). Emerging technologies for recovery of value-added components from olive leaves and their applications in food/feed industries. *Food and Bioprocess Technology*, 10, 229-248.
- Sudjana, A. N., D'Orazio, C., Ryan, V., Rasool, N., Ng, J., Islam, N., Riley, T. V., & Hammer, K. A. (2009). Antimicrobial activity of commercial *Olea europaea* (olive) leaf extract. *International journal of antimicrobial agents*, 33(5), 461–463. <https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2008.10.026>
- Talhaoui, N., Taamalli, A., Gómez-Caravaca, A. M., Fernández-Gutiérrez, A., & Segura-Carretero, A. (2015). Phenolic compounds in olive leaves: Analytical determination, biotic and abiotic influence, and health benefits. *Food Research International*, 77, 92-108.
- Tan, L. Y., Yin, W. F., & Chan, K. G. (2012). Silencing quorum sensing through extracts of *Melicope lunu-ankenda*. *Sensors*, 12(4), 4339-4351.
- Tavman, Ş., Kumcuoğlu, S., & Akkaya, Z. (2009). Bitkisel ürünlerin atıklarından antioksidan maddelerin ultrason destekli ekstraksiyonu. *Gıda*, 34(3), 175-182.
- Tiwary, B. K., Ghosh, R., Moktan, S., Ranjan, V. K., Dey, P., Choudhury, D., ... & Chakraborty, R. (2017). Prospective bacterial quorum sensing inhibitors from Indian medicinal plant extracts. *Letters in Applied Microbiology*, 65(1), 2-10.
- Truchado, P., Larrosa, M., Castro-Ibáñez, I., Allende, A. (2015). Plant food extracts and phyto-chemicals: their role as quorum sensing inhibitors. *Trends in Food Science & Technology*, 43(2): 189-204.
- Truchado, P., Tomás-Barberán, F.A., Larrosa, M., Allende, A. (2012). Food phytochemicals act as quorum sensing inhibitors reducing production and/or degrading autoinducers of *Yersinia enterocolitica* and *Erwinia carotovora*. *Food Control*, 24(1-2): 78-85.

Tufenkji, N., and Maisuria, V., (2018). Use of cranberry derived phenolic compounds as antibiotic synergizing agent against pathogenic bacteria. Unidet States Patent Application Publication, US 2018 / 0360898 A1, 4p

Waters, C. M., & Bassler, B. L. (2005). Quorum sensing: cell-to-cell communication in bacteria. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.*, 21, 319-346.

Vattem DA, Mihalik K, Crixell SH, McLean RJC (2007). Dietary phytochemicals as quorum sensing inhibitors. *Fitoterapia*, 78, 302–310.

Var, I., Çelik, Ç. (2019). Mikroorganizmalarda çoğunluğu algılama ve çoğunluğu algılama mekanizmasının engellenmesi. *Gıda*, 44 (6): 943- 953.

Vázquez, G., Fernández-Agulló, A., Gómez-Castro, C., Freire, M. S., Antorrena, G., & González-Álvarez, J. (2012). Response surface optimization of antioxidants extraction from chestnut (*Castanea sativa*) bur. *Industrial Crops and Products*, 35(1), 126-134.

Vázquez-Martínez, J., Buitemea-Cantúa, G. V., Gutierrez-Villagomez, J. M., García-González, J. P., Ramírez-Chávez, E., & Molina-Torres, J. (2020). Bioautography and GC-MS based identification of piperine and trichostachine as the active quorum quenching compounds in black pepper. *Heliyon*, 6(1), e03137.

Veggi, P. C., Martinez, J., & Meireles, M. A. A. (2012). Fundamentals of microwave extraction. In *Microwave-assisted extraction for bioactive compounds: theory and practice* (pp. 15-52). Boston, MA: Springer US.

Viot, M., Tomao, V., Le Bourvellec, C., Renard, C. M., & Chemat, F. (2010). Towards the industrial production of antioxidants from food processing by-products with ultrasound-assisted extraction. *Ultrasonics Sonochemistry*, 17(6), 1066-1074.

Wang, L. H., Weng, L. X., Dong, Y. H., & Zhang, L. H. (2004). Specificity and enzyme kinetics of the quorum-quenching N-acyl homoserine lactone lactonase (AHL-lactonase). *Journal of Biological Chemistry*, 279(14), 13645-13651.

Wagner, V. E., Bushnell, D., Passador, L., Brooks, A. I., & Iglewski, B. H. (2003). Microarray analysis of *Pseudomonas aeruginosa* quorum-sensing regulons: effects of growth phase and environment. *Journal of bacteriology*, 185(7), 2080-2095.

Yao, Q., Shen, Y., Bu, L., Yang, P., Xu, Z., & Guo, X. (2019). Ultrasound-assisted aqueous extraction of total flavonoids and hydroxytyrosol from olive leaves optimized by response surface methodology. *Preparative Biochemistry & Biotechnology*, 49(9), 837-845.

Yilmaz, M. T. (2012). Minimum inhibitory and minimum bactericidal concentrations of boron compounds against several bacterial strains. *Turkish Journal of Medical Sciences*, 42(8), 1423-1429.

Zhu, J., Huang, X., Zhang, F., Feng, L., and Li, J., (2015). Inhibition of quorum sensing, biofilm, and spoilage potential in *Shewanella baltica* by green tea polyphenols. *Journal of Microbiology*, 53, 829.

