



TRAKYA BÖLGESİNDE YETİŞEN *Allium rumelicum*, *Jurinea kilaea*, *Peucedanum obtusifolium* BİTKİLERİNİN TOPLAM FENOLİK, FLAVONOİD MADDE, ANTİOKSİDAN VE ANTİMİKROBİYAL ÖZELLİKLERİNİN BELİRLENMESİ

Orhan KILIÇ

Yüksek Lisans Tezi

Kimya Anabilim Dalı

Danışman: Doç. Dr. Ayça KARASAKAL

2020

T.C.
TEKİRDAĞ NAMIK KEMAL ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

TRAKYA BÖLGESİNDE YETİŞEN *Allium rumelicum*, *Jurinea kilaea*, *Peucedanum obtusifolium* BİTKİLERİNİN TOPLAM FENOLİK, FLAVONOİD MADDE, ANTİOKSİDAN VE ANTİMİKROBİYAL ÖZELLİKLERİNİN BELİRLENMESİ

Orhan KILIÇ

KİMYA ANABİLİM DALI

DANIŞMAN: Doç. Dr. Ayça KARASAKAL

TEKİRDAĞ-2020

Her hakkı saklıdır.



Bu tezde görsel, işitsel ve yazılı biçimde sunulan tüm bilgi ve sonuçların akademik ve etik kurallara uyularak tarafımdan elde edildiğini, tez içinde yer alan ancak bu çalışmaya özgü olmayan tüm sonuç ve bilgileri tezde eksiksiz biçimde kaynak göstererek belirttiğimi beyan ederim.

Orhan KILIÇ



Bu tez NKÜBAP tarafından NKUBAP.00.YL.19.226 numaralı proje ile desteklenmiştir.

Doç. Dr. Ayça KARASAKAL danışmanlığında, Orhan KILIÇ tarafından hazırlanan “TRAKYA BÖLGESİNDE YETİŞEN *Allium rumelicum*, *Jurinea kilaea*, *Peucedanum obtusifolium* BİTKİLERİNİN TOPLAM FENOLİK, FLAVONOİD MADDE, ANTİOKSİDAN VE ANTİMİKROBİYAL ÖZELLİKLERİNİN BELİRLENMESİ” başlıklı bu çalışma aşağıdaki jüri tarafından 13.08.2020 tarihinde Kimya Anabilim Dalı’nda Yüksek Lisans tezi olarak oy birliği ile kabul edilmiştir.

Jüri Başkanı : Doç. Dr. Yelda Yalçın GÜRKAN

İmza:

Üye : Dr. Öğr. Üyesi Kenan SEZER

İmza:

Üye : Doç. Dr. Ayça KARASAKAL

İmza:

Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu adına

Doç. Dr. Bahar UYMAZ
Enstitü Müdürü

ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

TRAKYA BÖLGESİNDE YETİŞEN *Allium rumelicum*, *Jurinea kilaea*, *Peucedanum obtusifolium* BİTKİLERİNİN TOPLAM FENOLİK, FLAVONOİD MADDE, ANTİOKSİDAN VE ANTİMİKROBİYAL ÖZELLİKLERİNİN BELİRLENMESİ

Orhan KILIÇ

Tekirdağ Namık Kemal Üniversitesi

Fen Bilimleri Enstitüsü

Kimya Anabilim Dalı

Danışman: Doç. Dr. Ayça KARASAKAL

Bu tez çalışmasında, Trakya bölgesinde yetişen *Allium rumelicum*, *Jurinea kilaea*, *Peucedanum obtusifolium* bitkilerinin toplam antioksidan aktivite ve kapasitelerinin, CUPRAC, ABTS/Persülfat ve DPPH yöntemleri ile analizlerinin yapılması planlanmaktadır. Ayrıca *Allium rumelicum*, *Jurinea kilaea*, *Peucedanum obtusifolium* bitkilerinin toplam fenolik ve flavonoid madde içeriklerinin ise Folin-Ciocalteu ve $AlCl_3/KAc$ yöntemleri kullanılarak belirlenmesi hedeflenmektedir. Bitkilerin antimikrobiyal özelliklerinin disk difüzyon yöntemi ile analizi sağlanacaktır. Bu çalışma sonucunda, CUPRAC ve ABTS/Persülfat yöntemleri ile analizlenen en yüksek toplam antioksidan kapasite/aktivite değerleri *Jurinea kilaea* bitkisinde gözlenmiştir. Aynı bitkinin DPPH yöntemiyle analiz edilen % inhibisyon değerinin en düşük olduğu tespit edilmiştir. Toplam fenolik madde içeriği tayininde ise Folin-Ciocalteu yöntemi kullanılmış ve burada da en yüksek gallik asit içeriğine sahip olan bitkinin *Jurinea kilaea* olduğu görülmüştür. $AlCl_3/KAc$ yöntemiyle toplam flavonoid içerik tayininde *Peucedanum obtusifolium* bitkisi en düşük kuarsetin içeriğine sahip iken, en yüksek kuarsetin içeriği *Allium rumelicum* bitkisinde saptanmıştır. Disk difüzyon yöntemi ile elde edilen antimikrobiyal aktivite analizi sonuçlarına göre; *Peucedanum obtusifolium* bitkisinin; üzerinde çalışılan 5 mikroorganizmadan 3'üne etkisinin olduğu belirlenmiştir. *Jurinea kilaea* bitkisi; üzerinde çalışılan mikroorganizmalardan sadece *Salmonella enteritidis* ATCC13076 üzerinde etkili olurken, *Allium rumelicum* bitkisinin ise üzerinde çalışılan mikroorganizmalardan sadece *Staphylococcus aureus* ATCC6538 üzerinde etkili olduğu tespit edilmiştir.

Anahtar kelimeler: *Allium rumelicum*, *Jurinea kilaea*, *Peucedanum obtusifolium*

2020, 62 sayfa

ABSTRACT

MSc. Thesis

DETERMINATION OF TOTAL PHENOLIC, FLAVONOID SUBSTANCE,
ANTIOXIDANT AND ANTIMICROBIAL PROPERTIES OF *Allium rumelicum*, *Jurinea*
kilaea, *Peucedanum obtusifolium* PLANTS GROWING IN THRACE REGION

Orhan KILIÇ

Tekirdag Namık Kemal University

Graduate School of Natural and Applied Sciences

Department of Chemistry

Supervisor: Assoc. Prof. Dr. Ayça KARASAKAL

In this thesis, analysis of total antioxidant activities and capacities of *Allium rumelicum*, *Jurinea kilaea*, *Peucedanum obtusifolium* plants growing in Thrace region is planned with CUPRAC, ABTS/Persulfate and DPPH methods. In addition, it is aimed to determine the total phenolic and flavonoid substance contents of *Allium rumelicum*, *Jurinea kilaea*, *Peucedanum obtusifolium* plants using Folin-Ciocalteu and AlCl₃/KAc methods. Analysis of the antimicrobial properties of plants will be provided by disc diffusion method. As a result of this study, the highest total antioxidant capacity/activity values analyzed by CUPRAC and ABTS/Persulfate methods were observed in the *Jurinea kilaea* plant. It was determined that the % inhibition value of the same plant analyzed by DPPH method was the lowest. In determining the total phenolic substance content, Folin-Ciocalteu method was used and it was found that the plant with the highest gallic acid content was *Jurinea kilaea*. In determining the total flavonoid content by AlCl₃/KAc method, the *Peucedanum obtusifolium* plant had the lowest quercetin content, while the highest quercetin content was determined in the *Allium rumelicum* plant. According to the results of antimicrobial activity analysis obtained by disk diffusion method; *Peucedanum obtusifolium* plant; it has been determined that it has an effect on 3 of 5 microorganisms studied. *Jurinea kilaea* plant; while *Salmonella enteritidis* ATCC13076 was effective only on microorganisms studied, *Allium rumelicum* plant was found to be effective only on *Staphylococcus aureus* ATCC6538 from the microorganisms studied.

Key words: *Allium rumelicum*, *Jurinea kilaea*, *Peucedanum obtusifolium*

2020, 62 pages

İÇİNDEKİLER

ÖZET	i
ABSTRACT	ii
İÇİNDEKİLER.....	iii
ÇİZELGE DİZİNİ.....	vi
ŞEKİL DİZİNİ.....	vii
SİMGELER ve KISALTMALAR.....	viii
TEŞEKKÜR.....	xi
1. GİRİŞ.....	1
2. KURAMSAL TEMELLER VE KAYNAK ÖZETLERİ	3
2.1. Bitki Tanımı ve Yapılan Bazı Çalışmalar.....	3
2.2. Serbest Radikal, Antioksidanlar ve Antioksidanların Etki Mekanizması.....	8
2.2.1. Serbest Radikal	8
2.2.2. Antioksidanlar.....	9
2.2.3. Antioksidanların Etki Mekanizması	10
2.2.3.1. Toplayıcı etki (scavenging effect)	10
2.2.3.2. Bastırıcı etki (quencher effect).....	10
2.2.3.3. Zincir kırıcı etki (chain breaking effect).....	10
2.2.3.4. Onarıcı etki (repair effect)	10
2.3. Antioksidanların Sınıflandırılması.....	11
2.4. Antioksidan Kapasite/Aktivite Tayin Yöntemleri	13
2.4.1. Hidrojen Atomu Transferine Dayalı Antioksidan Kapasite Tayin Yöntemleri.....	14
2.4.1.1. Oksijen radikal absorban kapasitesi (ORAC) yöntemi	14
2.4.1.2. Toplam radikal tutma parametresi (TRAP) yöntemi	15
2.4.1.3. Luminol yöntemi.....	15
2.4.1.4. Krosin beyazlatma yöntemi (Crocine Bleaching Assay).....	15
2.4.1.5. Toplam oksiradikal uzaklaştırma kapasitesi (TOSC) yöntemi	15
2.4.2. Elektron Transferine Dayalı Antioksidan Kapasite Tayin Yöntemleri	16
2.4.2.1. Folin-Ciocalteu yöntemi ile toplam fenolik madde tayini	16
2.4.2.2. ABTS/Persülfat antioksidan aktivite tayin yöntemi	16
2.4.2.3. Demir(III) indirgeme antioksidan gücü (FRAP) yöntemi	17
2.4.2.4. DPPH antioksidan aktivite tayin yöntemi.....	17
2.4.2.5. Bakır(II) iyonu indirgeyici antioksidan kapasite (CUPRAC) tayin yöntemi.....	18

2.5. Alüminyum Klorür/KAc Yöntemiyle Toplam Flavonoid Madde Tayini.....	19
2.6. Antimikrobiyal Aktivite Tayini	19
2.6.1. Disk Difüzyon Yöntemi.....	19
2.7. Literatürde Antioksidan Aktivite Analizine Yönelik Yapılan Bazı Çalışmalar	20
3. MATERYAL VE YÖNTEM.....	25
3.1. Kullanılan Kimyasal Maddeler.....	25
3.2. Kullanılan Cihazlar	25
3.3. Bitkisel Materyal	25
3.4. Kullanılan Bakteriler ve Kodları.....	26
3.5. Çözeltilerin Hazırlanışı.....	26
3.6. Numune Hazırlama Prosedürü.....	27
3.7. Spektrofotometrik Yöntemle Toplam Antioksidan Kapasite/Aktivite Tayini.....	27
3.7.1. CUPRAC Yöntemi	27
3.7.2. ABTS/Persülfat Yöntemi.....	28
3.7.3. DPPH Yöntemi	28
3.8. Folin-Ciocalteu Yöntemi ile Toplam Fenolik Madde Tayini	28
3.9. Alüminyum Klorür/KAc Yöntemiyle Toplam Flavonoid Madde Tayini.....	29
3.10. Antimikrobiyal Aktivite Analizi.....	29
3.10.1. Disk Difüzyon Yöntemi.....	29
4. ARAŞTIRMA BULGULARI.....	31
4.1. <i>Allium rumelicum</i> , <i>Peucedanum Obtusifolium</i> ve <i>Jurinea Kilaea</i> Bitkilerinin Absorpsiyon Spektrumları	31
4.2. Spektrofotometrik Yöntemlerin Uygulanması	35
4.3. <i>Allium rumelicum</i> , <i>Peucedanum obtusifolium</i> ve <i>Jurinea kilaea</i> Bitkilerinin Toplam Antioksidan Kapasite/Aktivite Analiz Sonuçları.....	38
4.3.1. CUPRAC Yöntemi ile Elde Edilen Analiz Sonuçları.....	38
4.3.2. ABTS/Persülfat Yöntemi ile Elde Edilen Analiz Sonuçları	39
4.3.3. DPPH Yöntemi ile Elde Edilen Analiz Sonuçları	40
4.4. <i>Allium rumelicum</i> , <i>Peucedanum obtusifolium</i> ve <i>Jurinea kilaea</i> Bitkilerinin Toplam Fenolik Madde İçeriklerinin Belirlenmesi	41
4.4.1. Folin-Ciocalteu Yöntemi ile Elde Edilen Analiz Sonuçları	41
4.5. <i>Allium rumelicum</i> , <i>Peucedanum obtusifolium</i> ve <i>Jurinea kilaea</i> Bitkilerinin Toplam Flavonoid Madde İçeriklerinin Belirlenmesi	42
4.5.1. Alüminyum Klorür/KAc Yöntemi ile Elde Edilen Analiz Sonuçları.....	42

4.6. <i>Allium rumelicum</i> , <i>Peucedanum obtusifolium</i> ve <i>Jurinea kilaea</i> Bitkilerinin Toplam Antimikrobiyal Aktivite Analiz Sonuçları.....	43
4.6.1. Disk Difüzyon Yöntemi ile Elde Edilen Analiz Sonuçları.....	43
5. SONUÇ VE TARTIŞMA	44
KAYNAKLAR.....	46
ÖZGEÇMİŞ	50



ÇİZELGE DİZİNİ

Çizelge 3.1. Antimikrobiyal aktivite analizinde kullanılan test bakterileri.....	26
Çizelge 4.1. Çeşitli fenolik bileşik standartlarının CUPRAC yöntemi ile belirlenen kalibrasyon denklemi, korelasyon katsayısı ve lineer aralıkları.....	35
Çizelge 4.2. Çeşitli fenolik bileşik standartlarının ABTS/Persülfat yöntemi ile belirlenen kalibrasyon denklemi, korelasyon katsayısı ve lineer aralıkları.....	36
Çizelge 4.3. Çeşitli fenolik bileşik standartlarının Folin-Ciocalteu yöntemi ile belirlenen kalibrasyon denklemi, korelasyon katsayısı ve lineer aralıkları.....	37
Çizelge 4.4. Çeşitli fenolik bileşik standartlarının AlCl ₃ yöntemi ile belirlenen kalibrasyon denklemi, korelasyon katsayısı ve lineer aralıkları	37
Çizelge 4.5. CUPRAC yöntemi ile analizlenen <i>Allium rumelicum</i> , <i>Peucedanum obtusifolium</i> , <i>Jurinea kilaea</i> bitkilerinin toplam antioksidan madde içerikleri.....	38
Çizelge 4.6. ABTS yöntemi ile analizlenen <i>Allium rumelicum</i> , <i>Peucedanum obtusifolium</i> , <i>Jurinea kilaea</i> bitkilerinin toplam antioksidan madde içerikleri.....	39
Çizelge 4.7. DPPH yöntemiyle elde edilen % inhibisyon değerleri.....	40
Çizelge 4.8. <i>Allium rumelicum</i> , <i>Peucedanum obtusifolium</i> , <i>Jurinea kilaea</i> bitkilerinin Folin-Ciocalteu yöntemi ile analizlenen toplam fenolik madde içerikleri	41
Çizelge 4.9. <i>Allium rumelicum</i> , <i>Peucedanum obtusifolium</i> , <i>Jurinea kilaea</i> bitkilerinin AlCl ₃ /KAc yöntemi ile analizlenen toplam flavonoid madde içerikleri.....	42
Çizelge 4.10. Disk difüzyon yöntemi ile antimikrobiyal aktivite analiz sonuçları	43

ŞEKİL DİZİNİ

Şekil 2.1. <i>Allium rumelicum</i> (Özhatay, Koçyiğit ve Akalın, 2010).....	4
Şekil 2.2. <i>Jurinea kilaea</i> bitkisinden bir görüntü (Xaver, 2008).....	5
Şekil 2.3. <i>Jurinea kilaea</i> bitkisinin farklı bir açıdan görüntüsü (Tosun, 2011).....	6
Şekil 2.4. <i>Peucedanum obtusifolium</i> bitkisi (Sözen, 2014).....	7
Şekil 2.5. Çalışılacak olan bitkilerin kurutulmuş hallerinden bir görüntü.....	7
Şekil 2.6. Antioksidanların sınıflandırılması (Karabulut ve Gülay, 2016).....	11
Şekil 2.7. Flavonoidlerin genel iskeleti	12
Şekil 2.8. Hidroksisinamik asit.....	13
Şekil 2.9. Hidroksibenzoik asit.....	13
Şekil 2.10. ABTS molekülü.....	17
Şekil 2.11. DPPH molekülü.....	18
Şekil 2.12. Cu(II)-Nc reaktifinin antioksidanlarla verdiği reaksiyon sonucunda Cu(I)-Nc renkli kelatının oluşumu (Apak vd., 2004).....	19
Şekil 4.1. %80 (v/v) metanol ile ekstrakte edilmiş <i>Allium rumelicum</i> 'un 1:10 oranında seyreltilmesiyle alınan spektrumu	32
Şekil 4.2. %80 (v/v) metanol ile ekstrakte edilmiş <i>Peucedanum obtusifolium</i> 'un 1:20 oranında seyreltilmesiyle alınan spektrumu	33
Şekil 4.3. %80 (v/v) metanol ile ekstrakte edilmiş <i>Jurinea kilaea</i> 'nın 1:30 oranında seyreltilmesiyle alınan spektrumu	34

SİMGELER VE KISALTMALAR

AAPH	: 2,2-azobis(2-amidinopropan) dihidroklorür
ABTS	: 2,2-azinobis(3-etilbenzotiazolin-6-sülfonik asit)
KMBA	: α -keto- γ -metiltiyobütirik asit
Al	: Alüminyum
AlCl ₃	: Alüminyum klorür
AlCl ₃ .6H ₂ O	: Alüminyum klorür heksahidrat
NH ₄ Ac	: Amonyum asetat
ABD	: Anabilim dalı
Cu(II)	: Bakır(II)
Cu(II)-H ₂ O ₂	: Bakır(II)-hidrojen peroksit
CUPRAC	: Bakır(II) indirgeyici antioksidan kapasite
Cu ⁺²	: Bakır(II) iyonu
CuCl ₂	: Bakır(II) klorür
CuCl ₂ .2H ₂ O	: Bakır(II) klorür dihidrat
CuSO ₄	: Bakır(II) sülfat
Fe	: Demir
Fe ⁺³	: Demir(III) iyonu
DNA	: Deoksiribonükleik asit
<i>c</i>	: Derişim
DPPH	: 1,1-difenil-2-pikrilhidrazil
e ⁻	: Elektron
ET	: Elektron transferi
FRAP	: Ferrik iyonu indirgeme antioksidan gücü
FCR	: Folin-Ciocalteu reaktifi
GA	: Gallik asit
g	: Gram
V	: Hacim
v/v	: Hacimce yüzde

HAT	: Hidrojen atomu transferi
pH	: Hidrojen gücü
H ₂ O ₂	: Hidrojen peroksit
HSO ₃ ⁻	: Hidrojen sülfid
kg	: Kilogram
r	: Korelasyon katsayısı
MS	: Kütle spektrometresi
L	: Litre
λ_{\max}	: Maksimum dalga boyu
μg	: Mikrogram
μL	: Mikrolitre
μm	: Mikrometre
μmol	: Mikromol
mg	: Miligram
mL	: Mililitre
mm	: Milimetre
mmol	: Milimol
mM	: Milimolar
ppm	: Milyonda bir
ϵ	: Molar absorpsiyon katsayısı
M	: Molar
Mo	: Molibden
Mo ⁺⁵	: Molibden(V) iyonu
Mo ⁺⁶	: Molibden(VI) iyonu
nm	: Nanometre
Nc	: Neokuproin
A _{numune}	: Numune absorbansı
NMR	: Nükleer manyetik rezonans spektroskopisi
ORAC	: Oksijen radikal absorbans kapasitesi

y	: Pik alanı
PTFE	: Politetrafloretillen
KAc	: Potasyum asetat
K ₂ S ₂ O ₈	: Potasyum persülfat
RNS	: Reaktif azot (nitrojen) türleri
ROS	: Reaktif oksijen türleri
°C	: Santigrat derece
LC-MS	: Sıvı kromatografisi-kütle spektrometresi
LC-MS-SPE-NMR	: Sıvı kromatografisi-kütle spektrometresi-katı faz ekstraksiyonu-nükleer manyetik rezonans spektroskopisi
NaOH	: Sodyum hidroksit
Na ₂ CO ₃	: Sodyum karbonat
NaNO ₂	: Sodyum nitrit
NaKC ₄ H ₄ O ₆	: Sodyum potasyum tartarat
TAK (TAC)	: Toplam antioksidan kapasite
TFİ	: Toplam fenolik madde içeriği
TRAP	: Toplam radikal yakalama antioksidan kapasite
TOSC	: Toplam oksiradikal uzaklaştırma kapasitesi
TPTZ	: Tripiridiltriazin
TEAC	: Troloks eşdeğeri antioksidan kapasite
UV	: Ultraviyole (morötesi)
vd.	: Ve diğerleri
HPLC	: Yüksek performanslı sıvı kromatografisi
%	: Yüzde
W	: Watt

TEŞEKKÜR

Bu tez çalışmasının başından sonuna kadar ihtiyacım olduğu anda yanımda olan, bilgilerini ve birikimlerini benimle paylaşan, fikirlerini ve desteğini esirgemeyen her türlü konuda yardımcı olan hocam ve tez danışmanım Sayın Doç. Dr. Ayça KARASAKAL'a,

Lisans eğitim sürecim ve daha sonrasında da bilgi ve birikimleri ile bana ışık olan sevgili hocalarım Sayın Prof. Dr. Temine ŞABUDAK ve Sayın Doç. Dr. Yelda YALÇIN GÜRKAN'a,

Antimikrobiyal aktivite analizlerinin yapılmasında ve yorumlanmasında yardımcı olan Sayın Dr. Öğr. Üyesi Nazan TOKATLI DEMİROK'a

Eğitim-öğretim ve özel hayatım süresince gerek maddi gerekse manevi yönden desteklerini benden esirgemeyen ve her türlü şartta yanımda olarak beni destekleyen ve bu günlere gelmemde en büyük paya sahip olan çok değerli ve saygıdeğer annem Kıymet Kılıç, babam Kemal KILIÇ, kardeşim Sayın Arş. Gör. Burhan KILIÇ'a (İstanbul Aydın Üniversitesi İletişim Fakültesi Radyo, Televizyon ve Sinema Bölümü) ve daha ismini saymadığım tüm aile bireylerime sonsuz teşekkür eder, saygı ve sevgilerimi sunarım.

NKUBAP tarafından NKUBAP.00.YL.19.226 numaralı proje kapsamında sağlanan maddi destek için teşekkür ederim.

Temmuz, 2020

Orhan KILIÇ



Anne ve babama...

Sizin için...

Sizin sayenizde...

1. GİRİŞ

Tüm canlılar yaşamı boyunca çeşitli hastalıklara maruz kalmıştır. Yakalanmış oldukları bu hastalıklardan kurtulmak amacıyla bilim adamları tarafından birçok tedavi yöntemi geliştirilmiştir. Bulunan tedavi yöntemleri çoğunlukla bitkisel kaynaklı olmuştur. Günümüzde ise bitkiler üzerinde çalışılarak izole edilen bileşikler çeşitli yöntemlerle analiz edilmiş ve içerdikleri yapıların çoğunlukla antioksidan oldukları anlaşılmıştır. Derinleştirilen araştırmalar sonucu elde edilen bu antioksidanların; vücutta çeşitli hastalıklara ve hasarlara sebep olan serbest radikalleri pasifleştirdiği ya da oluşumlarını engellediği görülmüştür. Bitkiler üzerinde çalışmalar yapılmaya devam edilmektedir (Öztürk, Kolak ve Meriç, 2011).

Moleküler veya atomik orbitallerinde eşleşmemiş elektron içeren molekül veya atomlara serbest radikal denir. Antioksidan ise bu serbest radikallerin oluşumuna ayrıca lipidlerin oksidasyonuna engel olan veyahut lipid oksidasyonunu geciktiren ve serbest radikalleri toksik etkisi bulunmayan ürünlere dönüştüren, vücut hücrelerince üretilmediği gibi gıda yoluyla da alınabilen kimyasal maddelere verilen isimdir. Serbest radikaller oksijen kaynaklı olabildiği gibi nitrojen kaynaklı da olabilir. Kaynak olarak oksijenden meydana gelen serbest radikaller reaktif oksijen türlerinin kısaltması ROS ve kaynak olarak nitrojenden meydana gelen serbest radikaller ise reaktif nitrojen (azot) türleri olup kısaltması RNS olacak şekilde isimlendirilir. Reaktif oksijen türlerinin (ROS) vücutta birikimi organizmada bulunan veya gıdalar aracılığıyla alınan antioksidanlarla dengede tutulmadığı takdirde; gerçekleşen oksidatif gerilim koşulları sonucunda koroner kalp rahatsızlıkları, kanser, hücrelerde yaşlanma ve yıpranma, bağışıklık sistemi hastalıkları ve lipoprotein oksidasyonu ile son bulan, DNA ve hücre zarları başta olmak üzere biyolojik yapıların oksidatif hasara uğramasına sebep olan ya da olabilen radikalik zincir reaksiyonları oluşmaktadır. Görüldüğü üzere vücutta veya hücresel boyutta meydana gelebilecek bu tür zararlardan korunmak amacıyla antioksidanlara ihtiyaç oldukça yüksektir. Reaktif oksijen türlerinin neden olduğu hastalıklarla mücadele etmenin en iyi yöntemi antioksidan içeriği zengin olan gıdaları tüketerek reaktif oksijen türlerinin seviyesini dengelemektir. Antioksidanlar meydana gelen veya gelebilecek olan oksidasyonu engelleyen, geciktirebilen önemli maddelerdir. Günümüze gelindiğinde reaktif oksijen türlerinin canlı olan organizmalardan uzak tutulması ve bu türleri süpürebilen antioksidanların tespit edilmesi veya araştırılmasına olan ilgi gün geçtikçe artmaktadır ve artmaya da devam edecektir. (Bener, Şen ve Apak, 2018).

Günümüzde ilaç sektörü hastalıklara önlem amacıyla üretmiş oldukları ilaçları geliştirmeden önce, hastalıkları gidermek amacıyla birçok bitki ve bitki içeriği ilaç yerine kullanılmıştır. Eskiden olduğu üzere günümüzde de insanlar çeşitli hastalıkların tedavisinde bitkileri ya da bitkilerden elde edilen ilaçları kullanarak tedavi olma yoluna gitmektedir (Öztürk vd., 2011).

Bu tez çalışmasında; daha önce literatürde herhangi bir çalışmasına rastlanılmamış olan *Allium rumelicum* bitkisi, antioksidan ve antimikrobiyal özellikleri ile yapılmış herhangi bir çalışmaya literatürde rastlanmamış olan *Jurinea kilaea* bitkisi ve yine antioksidan ve antimikrobiyal özellikleri ile yapılmış herhangi bir çalışmaya literatürde rastlanmamış olan *Peucedanum obtusifolium* bitkisi kullanılmıştır.

Tez çalışmasında; tıp bilimi açısından değeri iyi bilinen bir bitki türünün taşıdığı olduğu biyoaktif maddelerin, bu türle akrabalığı bulunan diğer bitki türlerinde de var olması yüksek bir olasılığa sahip olduğundan dolayı *Allium rumelicum*, *Jurinea kilaea*, *Peucedanum obtusifolium* bitkilerinin de kendi familyasındaki diğer türler gibi antioksidan ve antimikrobiyal özellik göstereceği düşünülerek bitki ekstraktlarındaki; antioksidan kapasite, antioksidan ve antimikrobiyal aktivite, toplam fenolik madde ve toplam flavonoid madde içerik analizlerinin yapılması amaçlanmıştır.

2. KURAMSAL TEMELLER VE KAYNAK ÖZETLERİ

2.1. Bitki Tanımı ve Yapılan Bazı Çalışmalar

Allium rumelicum bitkisi endemik bir bitki olup meşe körmeni olarak da bilinmektedir. Sadece Türkiye’de Kırklareli Yıldız dağlarında yetişmektedir. Kendi familyasından olan *Allium cepa liliaceae*’nin literatürdeki tıbbi faydaları incelendiğinde, damarlarda yaşa bağlı olarak meydana gelen değişikliklerden koruma ve iştahsızlık tedavisinde etkisinin var olduğu bildirilmiştir. Trombosit agregasyonunu ve tromboksanın sentezini inhibe edebildiği yapılan deneylerle ispatlanmıştır. Dizanteri gibi bakterilerin sebep olduğu enfeksiyonlarda, skar, yara, ülser ve keloid tedavisinde etkisi bulunmakla birlikte astım tedavisinde de kullanımının tercih edildiği görülmüştür. Diyabet hastalığında adjuvan tedavi olarak kullanılmaktadır. 50-100 mg *Allium cepa liliaceae* plazma fibrinojen ve serum kolesterol düzeyini aşağıya indirdiği bildirilmektedir. Yapılan klinik çalışmalar, *Allium cepa liliaceae*’nin anti-hiperglisemik aktivitesinin olduğunu ispatlamaktadır. 100 mg ekstraktının kullanılması, insanda glukozla indüklenen hiperglisemi azalttığı saptanmıştır. Şeker hastalığı olarak da bilinen diyabette ağız yoluyla alınan (50 mg) sıvısının, kanda bulunan glikoz düzeyini düşürdüğü görülmüştür. *Allium cepa liliaceae* suyunun bakterilerin çoğuna antimikrobiyal etkinlik gösterdiği bildirilmiştir. Ayrıca vitiligo ve alopesi areata tedavisinde etkili bir yöntem olduğu şeklinde vaka bildirimleri yer almaktadır. Literatürde *Allium* familyası türlerinin tıbbi özelliğinin yanı sıra antioksidan özellikleri ile ilgili yapılmış çalışmalara da rastlanmaktadır fakat endemik bir tür olan *Allium rumelicum* bitkisi ile yapılmış hiçbir çalışmaya rastlanmamıştır (World Health Organization [WHO], 1999; Sharma K. K. ve Sharma S. P., 1976).



Şekil 2.1. *Allium rumelicum* (Özhatay, Koçyiğit ve Akalın, 2010)

Jurinea kilaea bitkisi ulusal ölçekte nadir tür olup kıyı kumullarının ilgi çekici bir türüdür. Bu kumul bitkisi bilim dünyasına Kilyos'ta toplanan örneklerle ilk defa tanıtıldığı için bu türe *kilaea* (Kilyos) adı verilmiştir. Diğer bir adı ise Kilyos moru'dur. *Jurinea kilaea* dünya yayılışı Bulgaristan kumullarıdır. Ülkemizde de Kırklareli'de rastlanmaktadır (Davis, 1975). *Jurinea consanguinea* ile yapılan çalışmada antikolinesteraz, antibakteriyel ve antioksidan özellikleri incelenmiştir (Öztürk vd., 2011). *Jurinea* familyasından olan *Jurinea dolomiaea* bitkisinde yapılan fitokimyasal, toplam flavonoid ve fenolik bileşenleri, antioksidan özellikleri belirlenmiştir. Yapılan çalışmalar sonucunda bitkinin halk sağlığı açısından çok faydalı bir bitki olduğu ortaya çıkmıştır (Naseer, Muhammad, Kiran ve Mubarak, 2014). *Jurinea kilaea* bitkisinin antioksidan ve antimikrobiyal özellikleri ile yapılmış herhangi bir çalışmaya literatürde rastlanmamaktadır.



Şekil 2.2. *Jurinea kilaea* bitkisinden bir görüntü (Xaver, 2008)



Şekil 2.3. *Jurinea kilaea* bitkisinin farklı bir açıdan görüntüsü (Tosun, 2011)

Kim, Seo ve Yun (2018) tarafından *Peucedanum japonicum* bitkisinde yapılan çalışmada bitkinin antioksidan ve antimikrobiyal özellikleri araştırılmıştır. Movehedian, Zolfaghari ve Mirshekari (2016) tarafından yapılan çalışmada *Peucedanum pastinacifolium* bitkisinin antioksidan özellikleri incelenmiştir. *Peucedanum* bitkisinin dört farklı türü olan *Peucedanum officinale*, *Peucedanum longifolium*, *Peucedanum aegopodioides*, *Peucedanum alsaticum* bitkilerinin antioksidan ve antimikrobiyal özellikleri ile çalışılmıştır (Matejic, Dzamic, Ciric, Krivosej, Randelović ve Marin, 2013). *Peucedanum obtusifolium* bitkisinin antioksidan ve antimikrobiyal özellikleri ile yapılmış herhangi bir çalışmaya literatürde rastlanmamaktadır.



Şekil 2.4. *Peucedanum obtusifolium* bitkisi (Sözen, 2014)



Şekil 2.5. Çalışılacak olan bitkilerin kurutulmuş hallerinden bir görüntü

2.2. Serbest Radikal, Antioksidanlar ve Antioksidanların Etki Mekanizması

2.2.1. Serbest Radikal

Moleküler veya atomik orbitallerinde eşleşmemiş elektron içeren molekül veya atomlara serbest radikal denir. Serbest radikaller eşleşmemiş elektron içerdiklerinden ötürü diğer maddelerle rahatlıkla tepkimeye girebilirler.

Elektronlarını çiftlenmiş halde barındıran atomlar ya da moleküller ise kararlı bir yapı durumu teşkil ettiklerinden, diğer moleküllerle tepkime oluşturma istekleri serbest radikallerde olduğu gibi fazla değildir. Sahip oldukları özelliklerinden dolayı böyle moleküllere nonradikal moleküller denir.

Serbest radikaller oksijen kaynaklı olabildiği gibi nitrojen kaynaklı da olabilir. Kaynak olarak oksijenden meydana gelen serbest radikaller reaktif oksijen türlerinin kısaltması ROS ve kaynak olarak nitrojenden meydana gelen serbest radikaller ise reaktif nitrojen (azot) türleri olup kısaltması RNS olacak şekilde isimlendirilirler ve bu türler diğer nonradikal reaktif türlere kolaylıkla dönüşebilirler.

Serbest radikaller oksijenli solunum, metabolizma ve enfeksiyon gibi vücudumuz tarafından üretilen endojen kaynakların yanında;

- UV ışınlar, X-ray,
- Pişirilirken yanan organik maddeler,
- Volkanik faaliyetler,
- Karbonmonoksit, toluen, ozon ve diğer kirletici gazlar,
- Temizlik ürünleri, boya, tiner, parfümler ve böcek ilaçları gibi kimyasallar,
- Kloroform ve diğer su kirleticiler,
- Sigara kullanımı, egzoz kaynaklı duman gibi çevresel faktörler de serbest radikallerin oluşmasına katkı sağlayabilir.

Görüldüğü üzere canlıların hücrelerinde meydana gelen metabolik faaliyetler dışında; insanların istemli ya da istemsiz olarak gerçekleştirmiş oldukları eylemler sonucunda da serbest radikaller oluşmaktadır. Her ne kadar doğa olayları nedeniyle oluşuyor olsa da bu oluşumun canlıların faaliyetleri yanında oldukça az olduğu yadsınamayacak bir gerçektir.

Vücutta düşük yoğunluklarda bulduklarında reaktif oksijen ve reaktif azot türlerinin enfeksiyonlara karşı savunma ve kanser hücrelerini yok etme gibi yararlı etkilerinden de bahsetmek mümkündür.

Vücutta ROS birikimi organizmada yer alan veya gıdalar tarafından sağlanan antioksidanlarla dengelenmediği takdirde; meydana gelen “oksidatif gerilim” koşullarında;

- Kalp rahatsızlıkları,
- Hücrelerde meydana gelen yaşlanma ve yıpranma,
- Kanser,
- Bağışıklık sistemi rahatsızlıkları,
- Mutajenizm,
- Lipoprotein oksidasyonu ile sonuçlanan, biyolojik olan yapılarda oksidatif hasara neden olabilen radikalik zincir tepkimeleri gerçekleşmektedir.

Oksidatif gerilim; antioksidan savunma ve oksidan oluşumu arasında olan dengenin oksidan oluşumu yönüne kayması durumudur. Bu ifadeden de anlaşıldığı üzere yeterli miktarda antioksidan varlığı sağlanamadığı durumlarda canlı vücudunda yaşamsal faaliyetler azalmakta ve ciddi hastalıklar gözlemlenebilmektedir. Tüm bu bilgiler ışığında antioksidana olan ihtiyacın büyüklüğü ve tüketiminin ne kadar önemli olduğu anlaşılmaktadır. Günümüz şartlarında bitkilerden izole edilen birçok antioksidan başta gıda takviyesi ürünleri olmak üzere birçok alanda sıklıkla kullanılmaktadır.

2.2.2. Antioksidanlar

Canlılar için olmazsa olmaz bir ihtiyaç olan oksijen; yaşam faaliyetlerini sürdürebilmek amacıyla canlılar tarafından vücutta kullanılırken vücutta oksijen kaynaklı radikaller oluşmaktadır. Oksijen kaynaklı bu radikaller yüksek aktiviteye sahiptir. Serbest radikaller hücrelere saldırarak tahribat oluşturabilirler. Bir elektron ve bir protona sahip hidrojen atomu bilinen en basit serbest radikaldir. Antioksidan, lipid oksidasyonunu ve serbest radikal oluşumunu geciktiren veya engelleyen, onları toksik olmayan ürünlere dönüştüren, vücut hücrelerince üretilebildiği gibi gıda yoluyla da alınabilen kimyasal maddelerdir. Aynı zamanda serbest radikallerin vücutta sebebiyet verdiği oksidasyon faaliyetlerini önleyen, serbest radikalleri yakalama ve stabil hale getirme gücüne sahip moleküllerdir (Elliot, 1999).

2.2.3. Antioksidanların Etki Mekanizması

Birçok molekül ya da atomun kendine özgü etki mekanizması vardır. Vücut için yaşamsal faaliyetlerin devamında önemli bir yere sahip olan antioksidanlar dört ayrı şekilde radikallere etki ederler (Türkyılmaz, 2003). Bunlar;

- Toplayıcı etki
- Bastırıcı etki
- Zincir kırıcı etki
- Onarıcı etki

2.2.3.1. Toplayıcı etki (scavenging effect)

Serbest oksijen radikallerini daha zayıf olan yeni moleküle çevirme veya tutma şeklindeki etki **toplayıcı etkidir**. Trakeobronşiyal mukus ve enzim yapısındaki antioksidanlar toplayıcı etkiye sahiptirler.

2.2.3.2. Bastırıcı etki (quencher effect)

Serbest oksijen radikali ile etkileşime girip bir hidrojen aktarmak suretiyle aktif olan şekillerini inaktif şekle dönüştürme veya azaltma türündeki etki **bastırıcı etkidir**. Flavonoidler ve vitaminler bu etkiye sahiptirler.

2.2.3.3. Zincir kırıcı etki (chain breaking effect)

Serbest oksijen radikallerini bağlamak suretiyle içermiş oldukları zincirleri kırarak onların fonksiyonlarını engelleme esasına dayanan etki şekli **zincir kırıcı etkidir**. Bu şekildeki etkinlik seruloplazminde, minerallerde görülür.

2.2.3.4. Onarıcı etki (repair effect)

Serbest radikallerin sebep olduğu hasarların onarılması **onarıcı etkidir**. Hücrede meydana gelen birçok enzimler aracılığıyla gerçekleşen tamir mekanizmaları onarıcı etki gösterir (Akkuş, 1995).

2.3. Antioksidanların Sınıflandırılması

ENDOJEN ANTIOKSİDANLAR		
ENZİMATİK ANTIOKSİDANLAR	NONENZİMATİK ANTIOKSİDANLAR	
Süperoksit dismutaz (SOD)	Glutasyon	Koenzim Q 10
Katalaz (CAT)	Melatonin	Selenyum
Glutasyon peroksidaz (GPx)	Ürik asit	α -lipoik asit
Glutasyon redüktaz (GR)	Bilirubin	Transferrin
	Albümin	Seruloplazmin
EKSOJEN ANTIOKSİDANLAR		
VİTAMİN EKSOJEN ANTIOKSİDANLAR	İLAÇ OLARAK KULLANILAN EKSOJEN ANTIOKSİDANLAR	
α -Tokoferol (Vitamin E)	Ksantin oksidaz inhibitörleri (allopürinol, oksipürinol, pterin aldehit, tungsten)	
β -karoten (Vitamin A)	NADPH oksidaz inhibitörleri (adenozin, lokal anestezipler, kalsiyum kanal blokerleri, nonsteroid antiinflatuvar ilaçlar)	
Askorbik asit (Vitamin C)	Rekombinant süperoksit dismutaz	
Folik asit (Vitamin B9)	Trolox-C (vitamin E analogu)	
	Endojen antioksidan aktiviteyi artıranlar (GPx aktivitesini artıran ebselen ve asetilsistein)	
	Nonenzimatik serbest radikal toplayıcılar (mannitol, albümin)	
	Demir redoks döngüsü inhibitörleri (desferroksamin)	
	Nötrofil adezyon inhibitörleri	
	Sitokinler (TNF ve IL-1)	
	Barbitüratlar	
	Demir şelatörleri	

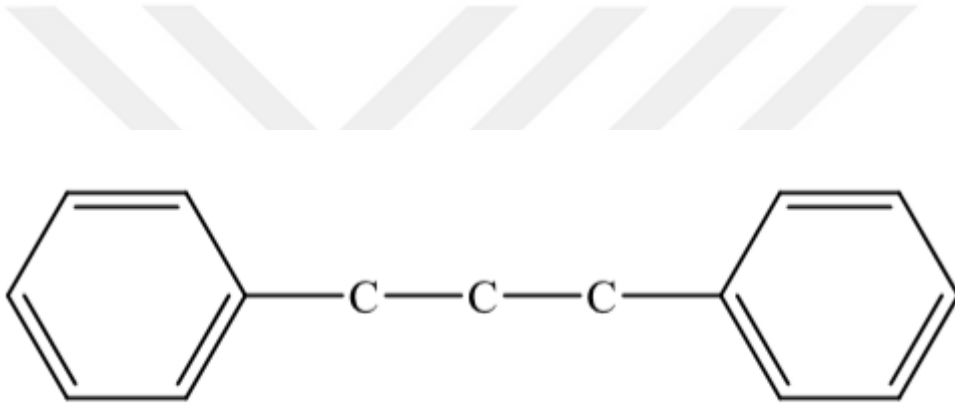
Şekil 2.6. Antioksidanların sınıflandırılması (Karabulut ve Gülay, 2016)

Antioksidanlar eksojen ve endojen olarak iki grup halinde incelenebilirler (Aydemir ve Sarı Karadağ, 2009; Sen ve Chakraborty, 2011). Oksidan/antioksidan arasındaki dengeyi sağlamak amacıyla vücudu serbest radikallerden koruyan endojen ve eksojen antioksidanlar aynı zamanda serbest radikalleri etkisizleştirmek için de kullanılırlar (Sen ve Chakraborty, 2011).

Fenolik madde: Polifenoller olarakta adlandırılan fenolik maddeler ya da bileşikler neredeyse tüm sebze ve meyvelerde az ya da çok bulunurlar. Fenolik asitler ve flavonoidler olarak sınıflandırılırlar.

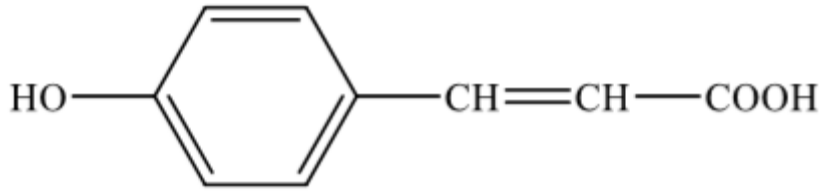
Flavonoidler: Bitkilerin sekonder metabolitlerinin önemli bir kolu olan ve bitkilere lacivert, mor, kırmızı, sarı ve benzeri renkleri veren pigmentlerdir. Genel olarak bitkilerin tohum, yaprak, çiçek, meyve ve dallarında bulunurlar. Günümüz şartlarında sentetik olarak üretilmesi mümkün olmayan flavonoidlerin tek kaynağı şuan için bitkilerdir. Bu nedenle; yapı ve özelliklerinin belirlenmesi, yeni kaynaklarının bulunması oldukça önemlidir.

Flavonoidlerin genel karbon iskeletini, propan zincirinin iki fenil halkasıyla birleşerek meydana getirdiği difenilpropan ($C_6 - C_3 - C_6$) oluşturmaktadır (Şekil 2.7).

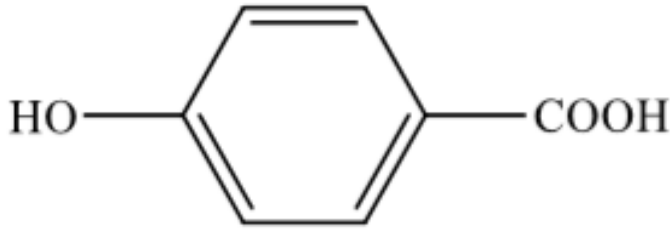


Şekil 2.7. Flavonoidlerin genel iskeleti

Fenolik asitler: Serbest halde pek rastlanılmayan fenolik asitler içerdikleri karboksil grupları sayesinde protein, aminoasit ve karbonhidratlarla reaksiyona girebilirler. Fenolik asitler temel iki yapıya sahip olup bunlar; hidroksisinamik asit (Şekil 2.8) ve hidroksibenzoik asit (Şekil 2.9) yapılarıdır (Huang, Ho ve Lee, 1992).



Şekil 2.8. Hidroksisinamik asit



Şekil 2.9. Hidroksibenzoik asit

2.4. Antioksidan Kapasite/Aktivite Tayin Yöntemleri

Antioksidan kapasite, yaşamsal faaliyet gösteren hücrede meydana gelen oksidasyonu inhibe etme kabiliyetini açıklamaktadır.

Antioksidan aktivite tayin yöntemleri, gerçekleşen kimyasal tepkime bakımından temelde iki sınıfa ayrılabilir:

- i) HAT (Hidrojen atomu transferi) tepkimesine dayananlar
- ii) ET (Tek elektron transferi) tepkimesine dayananlar

Hidrojen atomu transferi esasına dayanan analizlerde çoğunlukla tepkime kinetik türlerinden yarışmalı olanı gözlemlenir ve kantitasyon verileri kinetik eğrilerden yararlanılarak türetilir. Hidrojen atomu transferi esasına dayanan yöntemler genellikle bir oksitlenebilen prob, bir adet sentetik serbest radikal oluşturucu ve bir antioksidandan oluşur. Tek elektron transferi temelli yöntemler reaksiyon bitiminin indikatörü olarak bir oksidan (oluşan tepkimenin takibi amacıyla prob olarak kullanılır) ile redoks tepkimesini içerir.

Hidrojen atomu transferi ve tek elektron transferi esasına dayanan yöntemler bir örneğin radikal ya da oksidan süpürücü kapasitesini belirlemeye yöneliktir. Hidrojen atomu transfer yöntemlerinin çoğu peroksil radikallerinin substrat ve antioksidan tarafından yarışmalı olarak giderilmesi esasına dayanır. Hidrojen atomu transferi analizine dayanan yöntemler:

1. Oksijen Radikal Absorbans Kapasitesi (ORAC) Yöntemi,
2. Toplam Radikal Tutma Parametresi (TRAP) Yöntemi,
3. Luminol Yöntemi,
4. Krosin Beyazlatma Yöntemi (Crocine Bleaching Assay),
5. Toplam Oksiradikal Uzaklaştırma Kapasitesi (TOSC) Yöntemi

olarak beş başlıkta incelenebilir.

Tek elektron transferi esaslı analiz yöntemleri, antioksidanın indirgendikten sonra renk değiştirdiği gözlemlenen bir oksidantı indirgeme kapasitesinin ölçülmesi esasına dayanır. Renk değişimi derecesi örnekte yer alan antioksidan derişimi ile ilişkilendirilir. Tek elektron transferi esasına dayalı analiz yöntemleri:

1. Folin-Ciocalteu Yöntemi ile Toplam Fenolik Madde Tayini,
2. ABTS/Persülfat Antioksidan Aktivite Tayin Yöntemi,
3. FRAP (Fe^{+3} iyonunu indirgeme) Antioksidan Kapasite Yöntemi,
4. DPPH Antioksidan Aktivite Tayin Yöntemi,
5. CUPRAC (Cu^{+2} iyonunu indirgeme) Antioksidan Kapasite Yöntemi

olarak beş gruba ayrılır.

2.4.1. Hidrojen Atomu Transferine Dayalı Antioksidan Kapasite Tayin Yöntemleri

2.4.1.1. Oksijen radikal absorbans kapasitesi (ORAC) yöntemi

AAPH peroksil radikali ve hidroksil radikali eldesi amacıyla $Cu(II)-H_2O_2$ ve yükseltgenme özelliğine sahip olan fikoeritrin (protein substratı) kullanılmaktadır. Elde edilen radikaller ile fikoeritrin arasında gerçekleşen yükseltgenme reaksiyonunun sonunda, fikoeritrinin floresansının zamana bağlı değişiminin ölçülmesi esasına dayanan bu yöntemde toplam antioksidan kapasitesi hesaplanmaktadır (Glazer, 1990).

2.4.1.2. Toplam radikal tutma parametresi (TRAP) yöntemi

Wayner, Burton, Ingold ve Locke (1985) yaptıkları çalışmalarla geliştirdikleri bu yöntemde; biyolojik sıvılar ya da plazmada yer alan peroksitelebilen maddelerden ve AAPH'dan çeşitli yollarla oluşan peroksil radikalleri kullanılmaktadır. Plazmaya AAPH'ın eklenmesinin ardından yükseltgenebilen maddelerin oksidasyonu, reaksiyon esnasında tüketilmiş olan oksijenin ölçümü yolu ile belirlenir.

2.4.1.3. Luminol yöntemi

AAPH bileşiminden çeşitli reaksiyonlar sonucu oluşan peroksil radikallerinin yükseltgenebilir substratının (luminol) oksidasyonu sonucu meydana gelen tepkime ile ışık saçan luminol radikalleri oluşmaktadır. Oluşan bu ışık luminolmetre olarak adlandırılan cihazlar yardımıyla ölçülmektedir (Alho ve Leinonen, 1999).

2.4.1.4. Krosin beyazlatma yöntemi (Crocine Bleaching Assay)

2,2-azobis(2-amidinopropan) dihidroklorür'den meydana gelebilen peroksil radikalleri ortamda krosin bulunması durumunda bir tepkime gerçekleştirir. Bu tepkime krosinin yükseltgenme tepkimesidir ve reaksiyon krosinin renginin giderildiği bu olaya dayanır (Tubaro, Ghiselli, Papuzzi, Maiorino ve Ursini, 1998). Anlaşıldığı üzere yöntemde; peroksil radikallerinin krosinde oluşturduğu renk değişimi izlenmektedir.

2.4.1.5. Toplam oksiradikal uzaklaştırma kapasitesi (TOSC) yöntemi

Winston, Regoli, Dugas, Fong ve Blanchard (1998) tarafından geliştirilen bu yöntemde, AAPH'dan meydana gelen peroksil radikalleri, α -keto- γ -metiltiyobütirik asidi (KMBA) etilene okside eder ve yöntem bu esasa dayanır. En önemli antioksidanlar polifenoller ve bunların türevleridir. Polifenolik bileşikler; basit kimyasal yapıya sahip olan bileşiklerden yüksek seviyede polimerleşmiş maddelere kadar çeşitliliği olan bitkisel kökenli maddelerdir (Keskin ve Erkmén, 1987). Polifenolik bileşikler; oksidatif düzende farklı davranışlar sergilerler. Örnek vermek gerekirse; ortamdaki oksijen derişimini düşürebilir ya da singlet oksijeni durdurabilirler. Hidroksil radikalleri başta olmak üzere birincil radikalleri süpürücü özelliği vasıtasıyla zincir tepkimelerinin gerçekleşmesini önlerler ve metal iyonu katalizörleri bağlarlar (Shahidi, 1996).

2.4.2. Elektron Transferine Dayalı Antioksidan Kapasite Tayin Yöntemleri

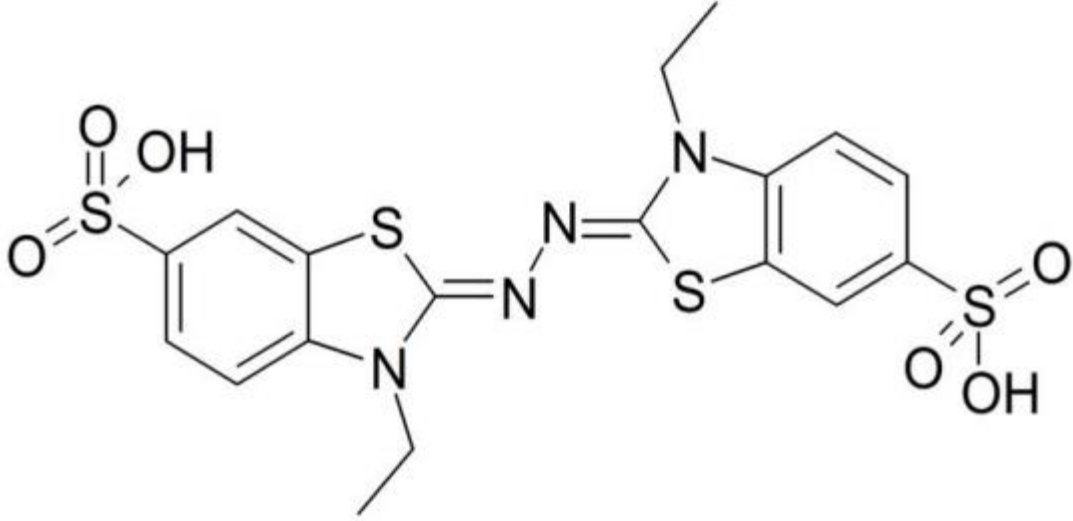
2.4.2.1. Folin-Ciocalteu yöntemi ile toplam fenolik madde tayini

Toplam fenolik madde tayini için kullanılmakta olan Folin-Ciocalteu yöntemini Singleton ve arkadaşları; antioksidanların içerdiği toplam fenol miktarını ölçmek için geliştirmiştir. Folin-Ciocalteu reaktifi fosfotungstat ve fosfomolibdat karışımı bir reaktif olup hem polifenolik hem de fenolik antioksidanların kolorimetrik analizinde kullanılır (Singleton, Orthofer ve Lamuela-Raventos, 1999). Yöntemin temeli başta fenolik bileşikler olmak üzere indirgeyici bileşiklerden molibdenyuma e^- transferi olayına dayanır. Renk olarak mavi olan kompleksin oluşumu 750-765 nm dalga boyunda spektrofotometrik olarak belirlenir. Standart maddenin genellikle gallik asit olduğu yöntemde yapılan son çalışmalarda alışlagelmiş gallik asit kullanımı yerine klorojenik, tannik, protokateşik, kaffeik, ferrulik ve vanilik asit de kullanıldığı görülmektedir (Prior, Wu ve Karen, 2005). Folin-Ciocalteu reaktifi yönteminin, bitkisel ekstraktların ve gıdaların antioksidan kapasitesinin tespitinde tercih edilmesinin en önemli nedenleri uygulanmasının basit, güvenilir ve tekrarlanabilir oluşudur.



2.4.2.2. ABTS/Persülfat antioksidan aktivite tayin yöntemi

ABTS/Persülfat antioksidan aktivite yöntemi Miller, Rice, Davies, Gopinathan ve Milner (1993) tarafından ilk kez raporlanmıştır. ABTS^{*+} kromojenik bir redoks radikali olup 2,2'-azinobis(3-etilbenzotiazolin-6-sülfonik asit) olarak adlandırılır (Şekil 2.10). Yöntem ABTS^{*+} radikal iyonunun antioksidanlarca absorbansının engellenmesi olayına dayanır ve karakteristik olan 660 nm, 734 nm ve 820 nm dalga boyunda maksimum absorpsiyon gerçekleştirir (Prior vd., 2005). Radikal katyon olarak üretilen ABTS^{*+} , temel spektrofotometrik bir yöntem olarak çeşitli birçok maddenin toplam antioksidan aktivitesini ölçmede kullanılır. Deneyler renksiz bir sıvı olan potasyum persülfat ile ABTS^{*+} 'nin oksidasyonu sonucu ABTS^{*+} 'de meydana gelen renk değişimini içermekte olup lipofilik ve hidrofilik bileşenlere uygulanabilir. ABTS^{*+} çözeltisi seyreltilerek yaklaşık 10 dakikalık bir süre içerisinde absorbans ölçümünden sonra 1 mL'lik çözeltiler ile farklı konsantrasyonlarda hazırlanmış olan ekstraktların ilk karışımları ölçülür.



Şekil 2.10. ABTS molekülü

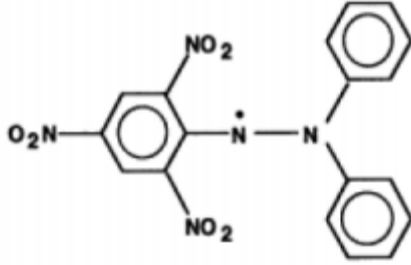
2.4.2.3. Demir(III) indirgeme antioksidan gücü (FRAP) yöntemi

Benzie ve Strain (1996) geliştirdikleri FRAP yönteminde demir(III)'in indirgenmesi sonucu antioksidanlara ait olan toplam miktar analizi işlemi gerçekleştirilmektedir. Düşük pH'larda meydana gelen Fe(III)'in, tripiridiltriiazin ile tepkimeye girmesi sonucunda [Fe(III)-TPTZ] oluşur ve ortamda bulunan antioksidan etkisiyle Fe(II)-tripiridiltriiazin'e indirgenir. Tepkime sonucunda oluşan Fe(II)-TPTZ kompleksine ait olan renk koyu mavi olup maksimum absorbanası 593 nm'de vermektedir.

2.4.2.4. DPPH antioksidan aktivite tayin yöntemi

1,1-difenil-2-pikrilhidrazil (DPPH) ticari amaçla elde edilebilen stabil karakterli organik bir azot radikalidir (Huang, Ou ve Prior, 2005). DPPH[•] tayin yöntemleri doğal olan ekstraktların sahip olduğu antioksidan kapasitesini ölçmek amacıyla araştırmacılar tarafından sıklıkla başvurulan ve kullanılan bir metottur (Mot, Dumitrescu ve Sarbu, 2011). Yöntemde antioksidanın DPPH[•] serbest radikaline proton transfer etme reaksiyonu 517 nm dalga boyunda gerçekleşen absorbansta azalmaya neden olur. Görünür olarak nitelendirilen bölgede spektrofotometre yardımıyla absorban değeri sabit olana değin takip edilmesi esasına dayanmaktadır. DPPH[•] radikali metanol ile hazırlanmış çözeltisinde okside formunda yaklaşık olarak 520 nm değerinde maksimum absorbanıya sahip olan bir kimyasal maddedir.

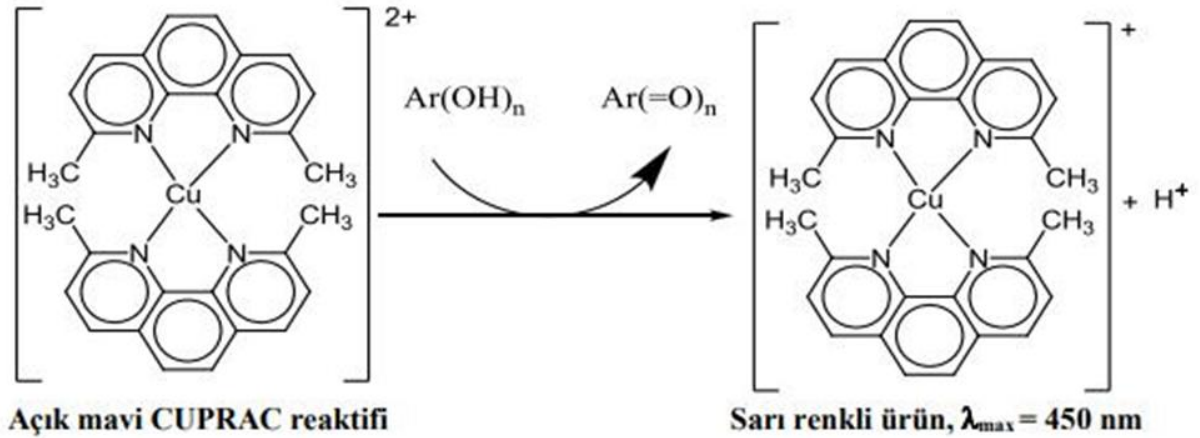
Bu metod basit olmasının yanında hızlı ve birden fazla örneğin radikal süpürme aktivitesini gözlemek için farklı örneklerin sahip olduğu çözünürlüklerine elverişli bir yöntem olarak lanse edilir.



Şekil 2.11. DPPH molekülü

2.4.2.5. Bakır(II) iyonu indirgeyici antioksidan kapasite (CUPRAC) tayin yöntemi

Apak, Güçlü, Özyürek ve Karademir (2004) tarafından ilk defa geliştirilen bu yöntem; temel olarak 2,9-dimetil-1,10-fenantrolin (Neokuproin)'in bakır(II) ile oluşturmuş olduğu (Cu(II)-Nc) kompleksinin, bakır(I)-neokuproin kelatına (maksimum absorbanı 450 nm'de verir) indirgenme özelliğinden yararlanılarak antioksidan kapasitesi hesaplanmaktadır. Yöntemde meydana gelen tepkimede elektron transferi söz konusudur. CUPRAC yönteminin TAC (toplam antioksidan kapasite) analizini diğer elektron transferi (ET) esasına dayanan yöntemlerden ayırıcı avantajı; pH değerinin kolay ayarlanabilir olması, stabil olması, basit olması, düşük maliyetli olması, rejanların kolay kullanılabilmesi ve hidrofilik antioksidanlara uygulanabildiği gibi lipofilik antioksidanlara da uygulanabilmesidir (Özyürek, Güçlü ve Apak, 2011). Yönteme göre reaksiyon çözeltileri hazırlanırken bir deney tüpü içerisine sırasıyla 1 mL 10 mM CuCl₂, 1 mL 7,5 mM etanollü neokuproin çözeltisi ve 1 mL 1 M pH 7,0 amonyum asetat tampon çözeltisi ilave edilir. Daha sonra numune çözeltisinden 0,2 mL alınır ve 0,9 mL destile su ilave edilerek karıştırılır. 30 dakikalık inkübasyon (oda sıcaklığında) sonunda reaktifin körüne karşı 450 nm dalga boyundaki absorbanlar ölçülür.



Şekil 2.12. Cu(II)-Nc reaktifinin antioksidanlarla verdiği reaksiyon sonucunda Cu(I)-Nc renkli kelatının oluşumu (Apak vd., 2004)

2.5. Alüminyum Klorür/KAc Yöntemiyle Toplam Flavonoid Madde Tayini

AlCl₃/KAc spektrofotometrik yöntemiyle toplam flavonoid madde tayininde alüminyum klorür, flavon ve flavonol grubuna ait bileşiklerin keto ve hidroksil gruplarının herhangi biriyle stabil bir kelat oluşturmaktadır. Ayrıca alüminyum, flavonoid grubu bileşiklerin halkalarında yer alan ortodihidroksi gruplarıyla da kararsız olan kompleksler oluşturmaktadır.

Toplam flavonoid madde tayininde kullanılan AlCl₃/KAc spektrofotometrik yöntemi; etanol, AlCl₃ ve potasyum asetat çözeltilerinin birbiriyle karıştırılmasının ardından, üzerine flavonoid çözeltisinin (flavonol, flavon ya da isoflavon bileşikleri) eklenmesi ve bu işlem sonrasında geçen 30 dakikanın sonunda referansa karşı 415 nm dalga boyunda absorbans ölçümüne dayanır (Woisky ve Salatino, 1998).

2.6. Antimikrobiyal Aktivite Tayini

2.6.1. Disk Difüzyon Yöntemi

Disk difüzyon yöntemi; bitki ekstrakt ve uçucu yağlarının antimikrobiyal özelliklerinin belirlenmesi amacıyla kullanılmıştır. *Enterococcus faecalis* ATCC51299, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Staphylococcus aureus* ATCC6538, *Listeria monocytogenes* DSM12464, *Salmonella Enteritidis* ATCC 13076 test bakterileri Mueller-Hinton brothta aktiveleştirildikten sonra süspansiyon 0,5 Mcfarlanda ayarlanmıştır. 6 mm çapta disklere 20'şer

μ L bitki ekstraktı ve uçucu yağlar eklenmiş, 24 saat 37 °C'de inkübasyon sonucu zon çapları ölçülmüştür. Analiz 3 tekrar olacak şekilde gerçekleştirilmiştir (National Committee for Clinical Laboratory Standards [NCCLS], 1997).

2.7. Literatürde Antioksidan Aktivite Analizine Yönelik Yapılan Bazı Çalışmalar

Surveswaran, Cai, Corke ve Sun (2007) yaptıkları çalışmada, Hindistan'daki 133 adet tıbbi bitkinin antioksidan kapasiteleri ABTS, FRAP ve DPPH yöntemleriyle değerlendirilmiş ve toplam fenolik madde içerikleri Folin-Ciocalteu yöntemiyle hesaplanmıştır. Bu bitkilerin antioksidan aktiviteleri, ABTS yöntemi çalışmasında 0.16 – 500.7 mmol troloks eşdeğeri/100 g arasında değişen kuru ağırlık aralığı göstermektedir ve görüldüğü üzere oldukça geniş bir aralıktır. Antioksidan aktivite değerleri FRAP ve DPPH yöntemlerinde yine aynı şekilde değişmektedir. Toplam antioksidan kapasitesi ile toplam fenolik madde içeriği arasında önemli ve pozitif lineer (doğrusal) korelasyon bulunmuştur. Bu durum, üzerinde çalışılan tıbbi bitkilerdeki baskın olarak bulunan antioksidan bileşenlerin çoğunlukla fenolik yapılar olduğunu göstermektedir. Seçilmiş 83 bitkinin ters-faz HPLC kullanılarak yapılan analizlerinde, temel fenolik bileşiklerin; tanenler, flavonoidler, fenolik asitler, kurkuminoidler, lignanlar, kumarinler ve kuininler olduğu belirlenmiştir. Bu çalışmanın ışığında Hindistan sınırları içerisinde yetişmekte olan tıbbi bitkilerin antioksidan içeriklerinin büyük bir kısmının fenolik yapılardan oluştuğu varsayımını çıkarmak yanlış olmayacaktır.

Iqbal, Bhangar ve Anwar (2007) yaptıkları çalışmada Pakistan'da yetişen 5 adet buğday türünün kepeklerinden elde edilmiş ekstraktlarının antioksidan aktiviteleri değerlendirilmiştir. Bütün kepek ekstraktları, önemli miktarda toplam fenolik içeriği (2.12 – 2.37 mg gallik asit eşdeğeri/g kepek), toplam flavonoid içeriği (epikateşin eşdeğeri 262-304 μ g/g kepek), DPPH aktivitesi (%51-79), kelatlama aktivitesi (etilendiamintetraasetikasit eşdeğeri 597-716 μ g/g kepek) göstermektedir. ORAC kapasitesi 97-123 μ mol/g; ABTS kapasitesi 27-36 μ mol/g ve toplam antosiyanin içeriği 30-38 mg/kg kepek olarak ölçülmüştür. Tokotrienol içerikleri (59-74 ppm) ve tokoferol (22-26 ppm) ters faz-HPLC yöntemiyle değerlendirilmiştir. Görüldüğü üzere bu tür içerik çalışmalarının aydınlatılması için ters faz-HPLC yöntemi oldukça önemlidir.

Oszmianski, Wojdylo, Lamer-Zarawska ve Swiader (2007) yaptıkları çalışmada, *Rosaceae* familyasından bazı bitkilerin köklerinde antioksidan tanenleri tespit etmeye çalışmışlardır. Polifenoller, proantosiyanidin polimerlerinin tiyoasidoliz, fenolik asit

esterlerinin asit hidrolizi sonrasında analiz edilmiştir. *Potentilla alba* ve *Aruncus silvester* köklerinin en fazla baskın prosiyanidin birimleri (-) epikateşin, *Waldsteinia geoides* ve *Geum rivale* köklerinde ise (+) kateşin olarak bulunmuştur. En yüksek miktarda proantosiyanidin derişimi, *Waldsteinia geoides* (64 g/kg) ve *Potentilla alba* (80 g/kg) köklerinde belirlenmiştir. *Waldsteinia geoides* (2.75 g/kg) ve *Geum rivale* (2.68 g/kg) kuru köklerinde oldukça yüksek miktarda ellagik asit olduğu görülmüştür. ABTS yöntemi ile antioksidan aktivite 1.50 - 6.60 mM troloks eşdeğeri/kg kuru kök, DPPH yönteminde ise bitkilerin türüne göre 4.40 (*Waldsteinia geoides*) ile 0.72 (*Filipendula vulgaris*) mM troloks eşdeğeri/kg kuru kök aralığında değışen miktarlarda bulunmaktadır. Çalışmada elde edilen verilerden de anlaşılacağı gibi *Waldsteinia geoides* bitkisinin; çalışılan bitkiler arasında antioksidan içeriğı ve çeşitliliğı en fazla olan bitki olduğu sonucuna varılmaktadır.

Chun, Vatterm, Lin ve Shetty (2005) yaptıkları çalışmada, mercanköşk (*oregano*) doku kültürlerinde yüksek miktarda antimikrobiyal potansiyel ve antioksidan aktivite gösteren, birkaç rozmarinik ve fenolik asit izole edilmiştir. Araştırmada, fenolik içeriğı zengin olan mercanköşk ekstraktlarının antimikrobiyal ve antioksidan aktivitesi *Helicobacter pylori* kaynaklı ülser hastalığına karşı değerlendirilmiştir. Ekstraktlar farklı birkaç bölgeden sağlanmış ticari mercanköşkler ile karşılaştırılmıştır. Toplam fenolik içeriğı en yüksek miktarlarda %60 etanol ekstraktlarında bulunmuştur. Çalışma sırasında uygulanan ABTS yöntemiyle toplam fenolik madde miktarı arasında korelasyon vardır. Mercanköşk ekstraktlarının fenolik profilleri (kafeik asit, protokateşuik asit, rozmarinik asit, kumarik asit, kuersetin) HPLC yardımı ile analizi yapılmıştır. Hidroksisinnamik ve fenolik asitlerin fizikokimyasal özellikleri arasında var olan farklılığın *Helicobacter pylori* gelişimini engellediğı düşüncesi varsayılmaktadır.

Apak, Güçlü, Özyürek, Karademir ve Erçağ (2006) yaptıkları çalışmada, demlenerek hazırlanmış olan bazı endemik bitki örneklerinin içeriğindeki toplam antioksidan kapasitesi, CUPRAC yöntemiyle belirlenmiştir. Türkiye'nin yerel marketlerinde bulunabilen bitkilerden siyah çay dışındaki en yüksek antioksidan kapasite, *Anagallis arvensis* (fare kulağı-çuha çiçeğı), *Ocimum basilicum* (fesleğen), *Camellia sinensis* (yeşil çay) ve *Melissa officinalis* (oğulotu) bitkilerinde sırasıyla; 1.63, 1.18, 1.07, ve 0.99 mmol troloks eşdeğeri/g kapasite olarak belirlenmiştir. Demlenerek hazırlanmış olan, hazır poşet çay örneklerinde CUPRAC değerleri en yüksek olarak, harmanlanmış klasik çay olan Ceylon (4.41), klasik İngiliz çayı (1.26), limonlu yeşil çay (1.61) ve yeşil çay (0.94) mmol troloks eşdeğeri/g şeklinde

saptanmıştır. Kekik, kişniş, adaçayı, böğürtlen, öksürük otu ve altın otunun kapasite değerleri ise 0.5 mmol troloks eşdeğeri/g civarında tespit edilmiştir. Bitkisel çayların Folin-Ciocalteu yöntemi ile sağlanan toplam fenolik içerikleri, ABTS ve CUPRAC toplam antioksidan kapasite yöntemleri ile sırasıyla 0.936 ve 0.966 korelasyon katsayılarıyla doğrusallık gösterdiği görülmektedir. Çalışma sonucunda CUPRAC yöntemi ile elde edilen sonuçlar değerlendirildiğinde harmanlanmış klasik çay olan Ceylon 4.41 mmol troloks eşdeğeri/g içerik ile toplam antioksidan kapasitesi en yüksek endemik bitki olduğu sonucu çıkmaktadır.

Güçlü, Altun, Özyürek, Karademir ve Apak (2006) yaptıkları çalışmada, Malatya'nın 5 farklı bölgesinden elde edilmiş olan taze, süflitlenerek ve güneşte kurutulmuş kayısı örneklerine ait antioksidan kapasitesi, ABTS, CUPRAC ve toplam polifenol ölçümleri Folin-Ciocalteu yöntemleriyle yapılmıştır. CUPRAC yöntemiyle renk veren süflit, pH 3'te kuvvetli bazik anyon değiştirici reçinede HSO₃⁻ formunda toplanarak ayrılmıştır. CUPRAC yönteminin Folin-Ciocalteu ve ABTS yöntemleri ile korelasyonu (0.93) uygun bulunmuştur. Standart katkı yapılmış kayısı ekstraktlarının ve saf flavonoidlerin kalibrasyon doğruları paralellik göstermektedir. CUPRAC yöntemiyle yapılmış olan bu çalışma, hem çeşitli kayısı örneklerinin süflit miktarını hem de toplam antioksidan kapasitesini belirlemektedir.

Toker, Aslan, Yeşilada, Memişoğlu ve Ito (2001) çalışmalarında, *Tilia platyphyllos* (ıhlamur) türlerinin, taç yaprak, çiçek ve yapraklarının flavonoid bileşimini, geliştirmiş oldukları ters faz-HPLC yöntemiyle değerlendirmişlerdir. Sonuçlar, Türkiye'de yetişmekte olan iki ıhlamur türünün (*Tilia argentea* ve *Tilia rubra*) belirtilen kısımlarıyla karşılaştırılmıştır. Her iki türün yapılmış olan HPLC analizleri sonucu, çiçek kısımlarında kuersetin-3,7-diramnozid, kuersitrin, izokuersitrin+rutin ve astragallin; yaprak ve taç yaprak kısımlarında ayrıca kamferol-3,7-diramnozid saptanmıştır. *Tilia argentea* türünün taç yaprak, yaprak ve çiçek kısımlarında birbirinden farklı miktarlarda tiliozid saptanmıştır. Bu çalışmada da görüldüğü üzere değerlendirme sürecinde ters faz-HPLC yönteminin ne kadar aydınlatıcı ve önemli olduğu bir kez daha anlaşılmaktadır.

Exarchou, Fianegos, Van Beek, Nanos ve Vervoort (2006) yaptıkları çalışmada, eczacılıkta kullanılmakta olan bazı metanollü bitki ekstraktlarında, hızlı bir şekilde antioksidanların belirlenmesi amacıyla birleştirilmiş kromatografik yöntemlerden faydalanılmıştır. *Urtica dioica* (ısırgan), *Lonicera periclymenum* (hanımeli), *Tilia europea* (ıhlamur) ve *Hypericum perforatum* (sarı kantaron)'un metanollü ekstraktlarında yer alan antioksidan bileşenler öncelikle ABTS ve DPPH radikal süpürme yöntemleri aracılığıyla

görüntülenmiştir. Analitlere ait yapısal yorum LC-MS ve LC-MS-SPE-NMR yardımıyla belirlenmiştir. NMR, UV ve MS uygulama esaslı bu çalışmada, ekstraktların antioksidan bileşenleri olarak hem monokaffeoilkuinik ve dikaffeoilkuinik asitler hem de flavonoid glikozitleri bulunmuştur. Yapılan bu çalışmada da görüldüğü üzere araştırmacılar; elde ettikleri sonuçlara sadece bir yöntem kullanarak değil birden fazla yöntemden yararlanarak ulaşmaktadır. Bazı durumlarda ise yapısal yorum amacıyla birkaç yöntemin birlikte kullanılması da söz konusudur. Bu çalışmada olduğu gibi LC, MS, SPE, NMR ve UV birbirinden farklı yöntemler olmasına rağmen elde edilen ölçüm sonuçlarına daha net bir yapısal yorum getirebilmek adına birleştirilerek kullanılmıştır.

Urbonavičiūtė, Jakstas, Kornysova, Janulis ve Maruska (2006) yaptıkları bir çalışmada, alıç (*Crataegus monogyna Jacq.*) isimli bir bitkinin filiz ve yaprak kısımlarının sulu etanol ekstraktları hazırlanıp kapiler bölge elektroforezi yardımıyla analizlenmiştir. Ekstraktın flavonoid miktarı ve kalitatif bileşimi üzerinde bitki örtüsünün oluşturduğu etki incelenmiştir. Farklı sulu etanol derişimleri (%40-96) aracılığıyla ekstraksiyon yapılarak örnek hazırlanmış ve flavonoidlerin geri kazanımı üzerine ekstraktant bileşiminin etkisi incelenmiştir. Kapiler bölge elektroforezi yapılarak elde edilen sonuçlar, spektrofotometrik analizler ve HPLC analizleri ile karşılaştırılmış ve etanollü alıç ekstraktlarında; viteksin-2-o-ramnozid, viteksin, rutin, hiperosid, klorojenik asit belirlenmiştir. Flavonoidlerin bozunmasında ekstrakta ait saklama koşullarının etkisi de (sıcaklık, güneş ışığı, saklama süresi) incelenmiştir. Çalışma sonucunda anlaşıldığı üzere bitkilerden elde edilen ekstraktların muhafaza koşulları; içerikleri üzerinde etkiye sahiptir. Bu durumda çalışılacak olan bitki ekstraktının ve ulaşılması hedeflenen antioksidan türünün hangi şartlarda korunduğunun bilinmesinin, yapılacak olan çalışmanın başarılı bir şekilde sonuçlandırılabilmesi için ciddi anlamda önemli olduğu sonucuna varılmaktadır.

Justesen, Knuthsen ve Leth (1998) yaptıkları çalışmada bazı sebze, meyve ve içeceklerdeki flavon, flavonol ve flavononları miktarlandırmak ve belirlemek amacıyla, kütle spektrometrik dedeksiyonlu yüksek performanslı sıvı kromatografisi ve foto-diyot array yardımıyla ayırma yöntemi geliştirilmiştir. Dondurularak kurutulmuş olan gıdaların asit hidrolizinden sonra, elde edilen bileşikler aglikon olarak analizlenmiştir. Gıda bileşiminde yer alan flavonoidler, ticari standartların alıkonma zamanları, kütle spektrumları ve UV ile karşılaştırılmış ardından flavonoid içerikleri pik alanları ile hesaplanmıştır. Çalışmada analizi yapılan kereviz yaprağında luteolin ve apigenin; ıhlamurda naringenin, kuersetin ve

hesperetin; maydanozda ise kamferol, apigenin ve luteolin içeriği belirlenmiş ve miktarlandırılmıştır.

Justesen ve Knuthsen (2001) yaptıkları başka bir çalışmada, sık sık tüketilen 15 adet taze bitkinin flavonoid miktarlarının belirlenmesi amaçlanmıştır. Bu nedenle; fesleğen, frenk soğanı, tere, kişniş, oğulotu, selamotu, mercanköşk, dereotu, maydanoz, adaçayı, biberiye, nane, tarhun, su teresi ve kekik bitkileri taze halde kütle spektrometrisi ve HPLC ile analizlenmiştir. Asit hidrolizinin ardından, 5 temel aglikon flavonoid olan izoramnetin, kamferol, apigenin, luteolin ve kuersetin içeriği belirlenmiş ve miktarlandırılmıştır. En yüksek flavonoid miktarları, selamotunda (170 mg kuersetin/100 g), maydanozda (510-630 mg apigenin/100 g), nanede (18-100 mg apigenin/100 g, ayrıca luteolin) ve dereotunda (48-110 mg kuersetin/100 g, ayrıca izoramnetin ve kamferol) olarak belirlenmiştir. Çalışma sonuçları göz önüne alındığında en yüksek flavonoid miktarının kuersetin içeriği açısından selamotunda (170 mg kuersetin/100 g), apigenin içeriği açısından ise maydanozda (510-630 mg apigenin/100 g) olduğu sonucuna varılmaktadır.

3. MATERYAL VE YÖNTEM

3.1. Kullanılan Kimyasal Maddeler

Troloks, kuersetin, 2,9-dimetil-1,10-fenantrolin (Neokuproin), gallik asit, bakır(II) sülfat, folin reaktifi, sodyum potasyum tartarat, alüminyum klorür heksahidrat, bakır(II)klorür dihidrat, 2,2-azinobis[3-etilbenzotiazolin-6-sülfonik asit] (ABTS), sodyum hidroksit, amonyum asetat, sodyum karbonat, etanol, metanol, potasyum persülfat, potasyum asetat, 1,1-difenil-2-pikrilhidrazil (DPPH), Mueller-Hinton Broth besiyeri.

3.2. Kullanılan Cihazlar

- Analitik terazi
- Mikrodalga ekstraksiyon sistemi
- UV/Vis Spektrofotometre

3.3. Bitkisel Materyal

Allium rumelicum (meşe körmeni), *Peucedanum obtusifolium* Sibth. & Sm. (kıyı kerevizi) ve *Jurinea kilaea* Azn. (kilyos moru) taksonlarına ait örnekler 2019 yılında Tekirdağ Namık Kemal Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü Botanik ABD Öğretim Üyesi Prof. Dr. Evran Cabi tarafından, Trakya bölgesinde gerçekleştirilmiş muhtelif arazi çalışmaları esnasında toplanmış ve teşhis edilmiştir. *Allium rumelicum* Kırklareli, Demirköy, Dupnisa mağarası çevresinden, *Peucedanum obtusifolium* Edirne Keşan Gökçetepe sahil boyundan ve son olarak *Jurinea kilaea* ise Tekirdağ Saray Kastro kumullarından toplanılıp Davis (1965-1985)'in Türkiye Florası, Özhatay vd. (2010)'nin yeni tür makaleleri kullanılarak gerçekleştirilmiştir.

3.4. Kullanılan Bakteriler ve Kodları

Çizelge 3.1. Antimikrobiyal aktivite analizinde kullanılan test bakterileri

Bakteri	Bakteri Kodu
<i>Enterococcus faecalis</i>	ATCC51299
<i>Escherichia coli</i>	ATCC 25922
<i>Staphylococcus aureus</i>	ATCC6538
<i>Listeriamonocytogenes</i>	DSM12464
<i>Salmonella Enteritidis</i>	ATCC 13076

3.5. Çözeltilerin Hazırlanışı

Tüm standart maddeler %80 (v/v) metanol-su karışımında çözülerek hazırlandı.

CUPRAC yönteminde;

Cu(II) klorür çözeltisi, $1,0 \cdot 10^{-2}$ M olacak şekilde bakır(II)klorür dihidrat'tan ($\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) 0,4262 g tartım alınıp su ile 250 mL'ye tamamlanarak hazırlandı. Amonyum asetat (NH_4Ac) tamponu, 1 M (pH 7) olacak şekilde NH_4Ac 'tan 19,27 g tartılıp su ile hacim 250 mL'ye tamamlanarak hazırlandı. Nc çözeltisi, $7,5 \cdot 10^{-3}$ M olacak şekilde Nc'den 0,039 g tartılarak hacim %96'luk etil alkolle 25 mL'ye tamamlanmak suretiyle hazırlandı.

ABTS yönteminde;

ABTS'den 0,1920 g tartılıp hacim su ile 50 mL'ye getirilerek ABTS çözeltisi 7 mM olacak şekilde hazırlandı. ABTS stok çözeltisi içine, son derişimi 2,45 mM olacak şekilde 0,0331 g potasyum persülfat ($\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_8$) ilave edildi. Elde edilen ABTS radikal çözeltisi, 12-16 saat boyunca karanlıkta ve oda sıcaklığında bekletildikten sonra kullanıma hazır hale gelmektedir.

Folin-Ciocalteu yönteminde;

Lowry A: %2 Na_2CO_3 (0,1 M NaOH çözeltisinde)

Lowry B: 0,5 M CuSO_4 (%1'lik $\text{NaKC}_4\text{H}_4\text{O}_6$ çözeltisinde)

Lowry C: 50 mL Lowry A + 1 mL Lowry B

Folin-Ciocalteu reaktifi distile su ile 1:3 oranında (v/v) seyreltildi.

AlCl₃/KAc yöntemi;

AlCl₃ çözeltisi, %10'luk olacak şekilde alüminyum klorür heksahidrat'tan (AlCl₃.6H₂O) 9,06 g tartılıp hacim 50 mL'ye su ile tamamlanarak hazırlandı. Potasyum asetat ile hazırlanacak olan tampon çözelti, KAc'den 4,90 g tartılıp hacim 50 mL'ye su ile tamamlanarak 1 M olacak şekilde hazırlandı.

3.6. Numune Hazırlama Prosedürü

Mikrodalga ekstraksiyon işlemi, teflon (PTFE) kaplarda, fiber optik sıcaklık kontrol sistemi ve kapalı fırın sistemi kullanılarak gerçekleştirildi. Homojen hale getirilmiş kuru ham bitki örneğinden 0,1 g tartım alınmak suretiyle üzerine 15 mL çözücü (%80 metanol-su (v/v)) eklendikten sonra teflon ekstraksiyon kaplarına konularak cihaz içerisine yerleştirildi. Ekstraksiyon işlemi sırasında 500 W güç uygulanarak 3 dakikada çalışma sıcaklığı olan 80°C'ye ulaşıldı (1. aşama). Bunu takip eden 3 dakika içerisinde sıcaklık 80°C' de sabit tutuldu (2. aşama) ve son 5 dakikada içerisinde soğumaya bırakılarak ekstraksiyon işlemi 11 dakikada tamamlandı (3. aşama). Elde edilen tüm bitki ekstraktları 0.45 µm membran filtreden süzüldü.

3.7. Spektrofotometrik Yöntemle Toplam Antioksidan Kapasite/Aktivite Tayini

3.7.1. CUPRAC Yöntemi

Test yapılacak olan tüpe 1 mL (0,01 M) CuCl₂ çözeltisine 1 mL neokuproin (2,9-dimetil-1,10-fenantrolin) ($7,5 \times 10^{-3}$ M alkolde) ve NH₄Ac'den hazırlanan 1 mL amonyum asetat (NH₄Ac) tampon çözeltisi eklendikten sonra karıştırıldı. Ardından ham olan ekstrakt saflaştırılarak gerekli olan bileşikler karıştırılan çözelti üzerine eklendi. Karışımın toplam hacim değeri su ile 4,1 mL olacak şekilde ayarlandı ve 30 dakika oda şartlarında inkubasyondan sonra elde edilen absorbans değeri 450 nm dalga boyunda kaydedildi. Kalibrasyon eğrisinden yararlanılarak sonuçlar mmol troloks, gallik asit, kuersetin, rutin ve flavon eşdeğeri/g olarak aşağıdaki formüle göre hesaplandı.

$$(\text{mmol/g}) = (A_{\text{numune}}/\epsilon) \times (V_{\text{toplaml}}/V_{\text{numune}}) \times (V_{\text{ekstre}}/g_{\text{numune}}) \quad (3.1)$$

3.7.2. ABTS/Persülfat Yöntemi

Ekstraktların içerdiği antioksidan kapasitesi, ABTS radikal katyon yakalama yeteneğine dayanılarak ölçülmüştür. Metotta ABTS, diğer oksidanlarla veya peroksille okside olur. Böylece ABTS^{•+} radikali oluşur. Bu yöntemle göre ABTS^{•+} radikal katyonu, ABTS çözeltisinin persülfat ile oksidasyona uğraması sonucunda oluşturulmuştur. 7 mM ABTS suda çözüldükten sonra 2,45 mM potasyum persülfat ile muamele edilmiştir. Elde edilen ABTS^{•+} radikal çözeltisi, 12-16 saat boyunca karanlıkta ve oda sıcaklığında bekletildikten sonra kullanıma hazır hale geldi. ABTS^{•+} çözeltisi etanol ile 1:10 (v/v) oranında seyreltilerek kullanıldı. 0,2 mL örnek çözeltisine 2,8 mL etanol ilave edildi ve seyreltilmiş ABTS^{•+} çözeltisinden 1 mL alınarak 6 dakika 25 °C'de karanlıkta bekletildikten sonra 734 nm'de troloks, gallik asit, kuersetin, rutin ve flavon eşdeğeri olarak toplam antioksidan miktarı aşağıdaki formüle göre hesaplanmıştır.

$$(\text{mmol/g}) = (A_{\text{numune}}/\epsilon) \times (V_{\text{toplaml}}/V_{\text{numune}}) \times (V_{\text{ekstre}}/g_{\text{numune}}) \quad (3.2)$$

3.7.3. DPPH Yöntemi

1 mM DPPH radikal çözeltisi etil alkolle hazırlandı. 2 mL DPPH çözeltisi üzerine 2 mL etanol ilave edilip 517 nm'de 30 dakika sonunda absorbans değerleri kaydedildi (A_0). 1:5 (v/v) seyreltilmiş bitki ekstraktından 0,2 mL alınıp yöntem uygulandı. Ardından aynı dalga boyunda 30 dakika bekleyip numune varlığında ortamda süpürülmeden kalan DPPH radikalinin absorbansı ölçüldü. Numunelerin % inhibisyon değerleri;

$$\% \text{ İnhibisyon} = (A_0 - A)/A \quad (3.3)$$

formülüne göre hesaplandı.

3.8. Folin-Ciocalteu Yöntemi ile Toplam Fenolik Madde Tayini

Lowry A çözeltisi; 2,0 g Na₂CO₃'ün, 100 mL 0,1 M NaOH çözeltisinde çözünmesi sonucu hazır hale getirilmiştir. Gerek duyulan Lowry B çözeltisi; 0,5 M CuSO₄'ün, %1'lik sodyum potasyum tartarat (NaKC₄H₄O₆) çözeltisi içerisinde çözünmesi ile hazırlanmıştır. Lowry C çözeltisi ise; hazır halde bulunan 50 mL Lowry A çözeltisine 1 mL Lowry B çözeltisi eklenerek Folin reaktifi 1:3 (v/v) oranında saf su yardımıyla seyreltilmesi sonucu hazırlanmıştır. 0,1 mL örnek çözeltisi + 0,9 mL H₂O + 2,5 mL Lowry C çözeltisi eklendikten

sonra elde edilen çözelti karışımı 10 dakika boyunca bekletilir. Ardından bu çözeltinin üzerine folin reaktifinden 0,25 mL eklenir ve toplam hacmi 3,75 mL olacak şekilde çözeltiler hazırlanır. Hazırlanmış olan çözeltiler 40 dakika oda koşullarında bekletilmesinin ardından 750 nm dalga boyunda kör olan çözeltilere karşı absorbansları ölçülmüştür. Toplam fenolik madde içeriği aşağıdaki formüle göre gallik asit türünden hesaplanmıştır.

$$(\text{mmol/g}) = (A_{\text{numune}}/\epsilon) \times (V_{\text{toplaml}}/V_{\text{numune}}) \times (V_{\text{ekstre}}/g_{\text{numune}}) \quad (3.4)$$

3.9. Alüminyum Klorür/KAc Yöntemiyle Toplam Flavonoid Madde Tayini

AlCl₃ çözeltisi, %10'luk olacak şekilde alüminyum klorür heksahidrat'tan (AlCl₃.6H₂O) 9,06 g tartım alınıp su ile hacim 50 mL'ye tamamlanarak hazırlandı. Potasyum asetat ile hazırlanacak olan tampon çözelti, KAc'den 4,90 g tartılıp hacim 50 mL'ye su ile tamamlanarak 1 M olacak şekilde hazırlandı. AlCl₃/potasyum asetat yöntemine göre; bir cam tüp içerisine sırasıyla 1,5 mL etanol çözeltisi, 1 mL örnek çözeltisi, 0,1 mL %10'luk AlCl₃ çözeltisi, 0,1 mL 1 M KAc çözeltisi ilave edilip çalkalandı ve son hacim 5 mL olacak şekilde 2,3 mL su eklendikten sonra tekrar iyice çalkalandı. Üzerinde çalışılacak olan tüpler ağzı kapalı olacak bir şekilde 30 dakika boyunca oda koşullarında bekletildi. Bu 30 dakikanın sonunda örnek içermeyen referansa karşı 427 nm dalga boyunda absorbans değerleri ölçüldü. Toplam flavonoid madde içeriği kuersetin cinsinden hesaplanmıştır.

$$(\text{mmol/g}) = (A_{\text{numune}}/\epsilon) \times (V_{\text{toplaml}}/V_{\text{numune}}) \times (V_{\text{ekstre}}/g_{\text{numune}}) \quad (3.5)$$

3.10. Antimikrobiyal Aktivite Analizi

3.10.1. Disk Difüzyon Yöntemi

Doğal bitkilerin ekstrakt ve uçucu yağları, başta ilaç sanayi olmak üzere çeşitli sanayi alanlarında kullanılmakta, bu bileşenlerin antimikrobiyal özellikleri ise birçok araştırmaya konu olmaktadır. Özellikle insanların günümüzde doğal ürünlere yönelmeleri antimikrobiyal ve antioksidan özelliklere sahip bitkilerin önemini arttırmaktadır.

Disk difüzyon, bilinen en eski antimikrobiyal duyarlılık yöntemi olmakla birlikte, günümüzde laboratuvarlarda antimikrobiyal özelliklerin belirlenmesinde kullanılan en yaygın test olarak güncelliğini korumaktadır. Bu analizle birlikte birçok antimikrobiyal bileşen kolay bir şekilde tespit edilebilmektedir.

Bitki ekstrakt ve uçucu yağlarının antimikrobiyal özelliklerinin belirlenmesi amacıyla disk difüzyon yöntemi uygun bulunmuş ve kullanılmıştır. *Enterococcus faecalis* ATCC51299, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Staphylococcus aureus* ATCC6538, *Listeriamonocytogenes* DSM12464, *Salmonella Enteritidis* ATCC 13076 test bakterileri Mueller-Hinton brothta aktifleştirildikten sonra süspansiyon 0,5 Mcfarlanda ayarlanmıştır. 6 mm çapta disklere 20'şer μL bitki ekstraktı ve uçucu yağlar eklenmiş, 24 saat 37 ° C'de inkübasyon sonucu zon çapları ölçülmüştür. Analiz 3 tekrar olacak şekilde gerçekleştirilmiştir (NCCLS, 1997).

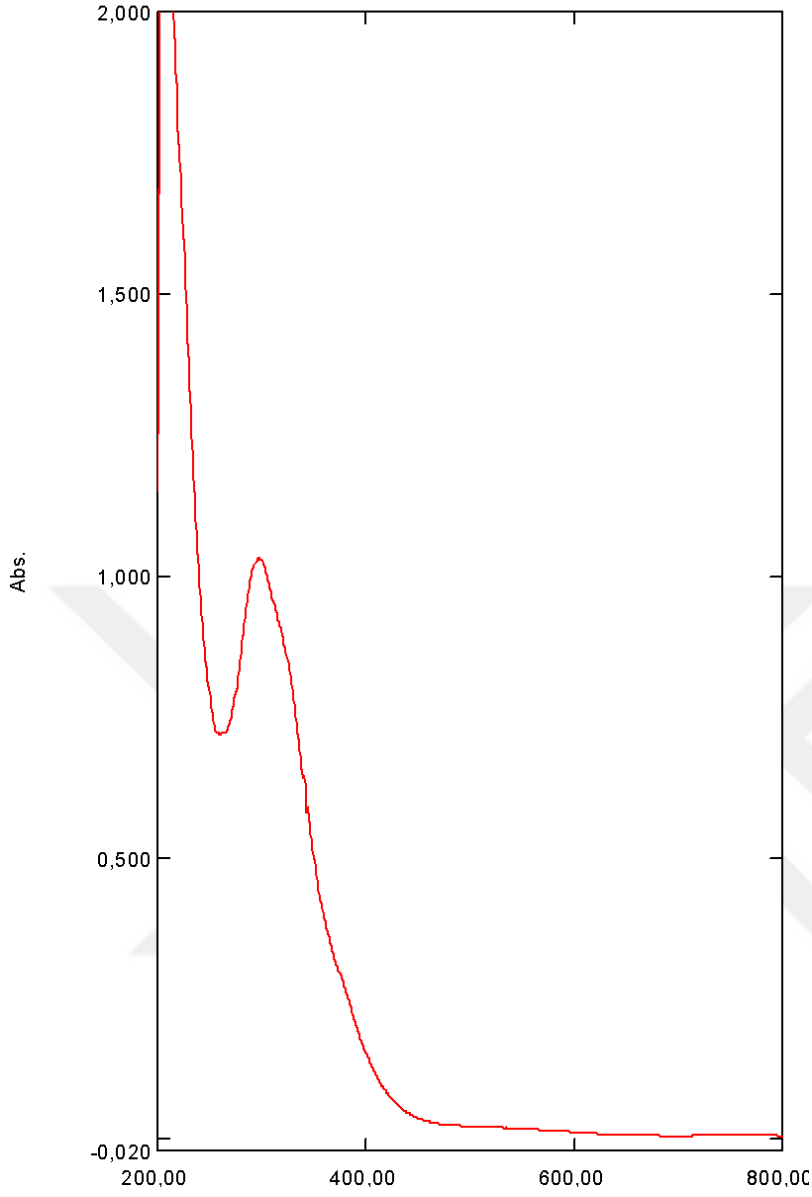


4. ARAŞTIRMA BULGULARI

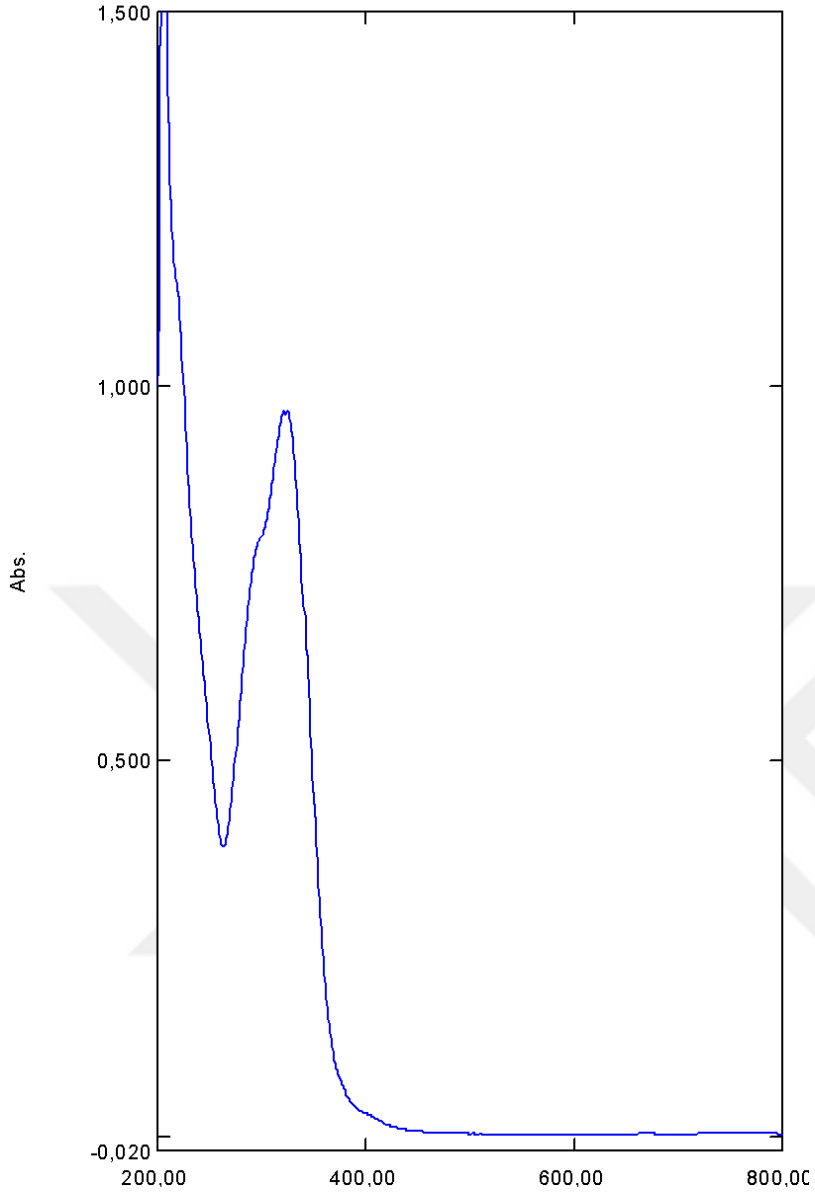
Bu tez çalışmasında, Trakya bölgesinde yetişen *Allium rumelicum*, *Jurinea kilaea* ve *Peucedanum obtusifolium* bitkilerinin toplam antioksidan kapasite tayini (bakır iyonu indirgeme antioksidan kapasite yöntemi, ABTS⁺ radikal süpürme aktivite ve DPPH radikal süpürme aktivite analiz yöntemi), toplam fenolik ve flavonoid madde içeriklerinin tayini (Folin-Ciocalteu ve AlCl₃ kolorimetrik yöntemleri) ve antimikrobiyal özelliklerinin belirlenmesi (disk difüzyon yöntemi) işlemleri gerçekleştirilmiştir. Literatürde *Allium rumelicum*, *Jurinea kilaea* ve *Peucedanum obtusifolium* bitkileriyle yapılan çalışmalarla ilgili makale mevcut değildir. Bu durumda yapılan tüm çalışmalar literatüre ilk kez sunulmuş olacaktır.

4.1. *Allium rumelicum*, *Peucedanum Obtusifolium* ve *Jurinea Kilaea* Bitkilerinin Absorpsiyon Spektrumları

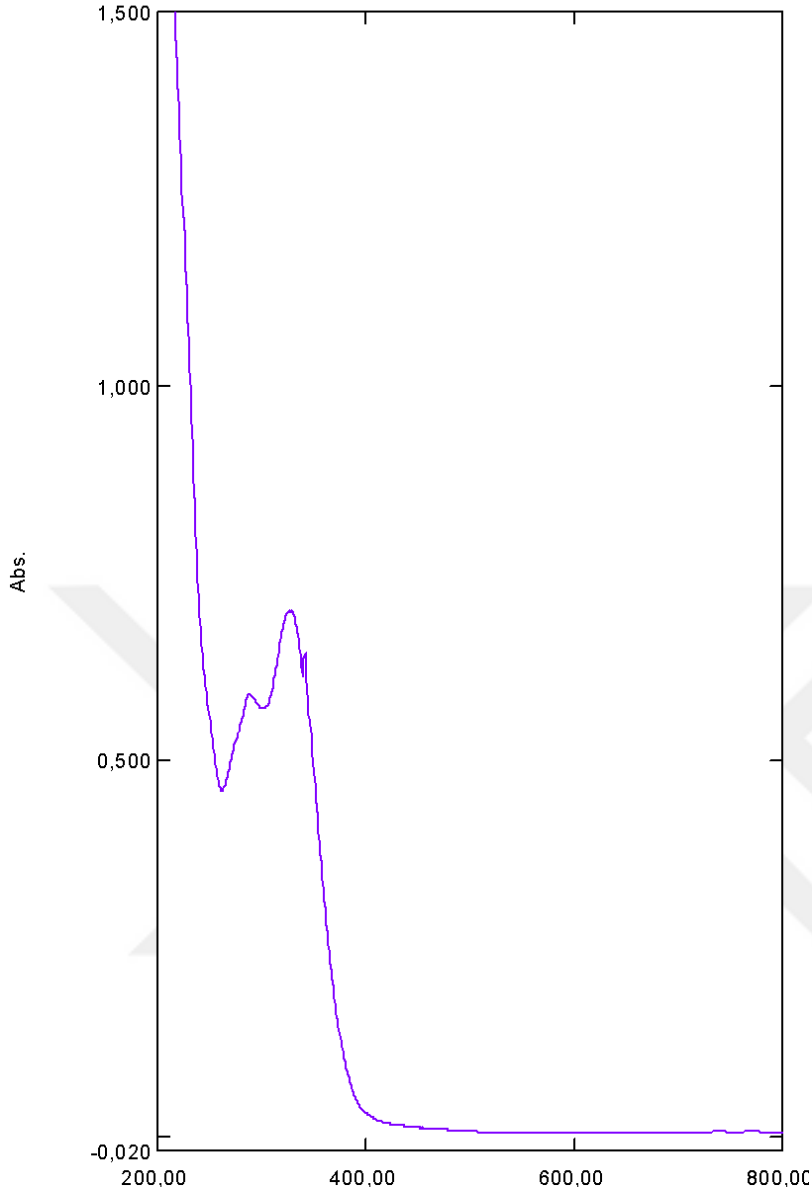
%80 (v/v) metanol-su karışımı kullanılarak hazırlanan *Allium rumelicum*, *Peucedanum obtusifolium* ve *Jurinea kilaea* bitki ekstraktlarının 200-800 nm dalga boyu aralıklarındaki spektrumları, uygun oranlarda seyreltme yapılarak alındı. Şekil 4.1-4.3 bitkilerden elde edilen absorpsiyon spektrumlarını göstermektedir.



Şekil 4.1. %80 (v/v) metanol ile ekstrakte edilmiş *Allium rumelicum*'un 1:10 oranında seyreltilmesiyle alınan spektrumu



Şekil 4.2. %80 (v/v) metanol ile ekstrakte edilmiş *Peucedenum obtusifolium*'un 1:20 oranında seyreltilmesiyle alınan spektrumu



Şekil 4.3. %80 (v/v) metanol ile ekstrakte edilmiş *Jurinea kilaea*'nın 1:30 oranında seyreltilmesiyle alınan spektrumu

4.2. Spektrofotometrik Yöntemlerin Uygulanması

Literatür verilerine göre, çalışılan *Allium rumelicum*, *Peucedanum obtusifolium* ve *Jurinea kilaea* türlerine ait bitkilerde troloks, gallik asit, kuersetin, rutin ve flavon bileşiklerinin bulunabildiği bilindiğinden bu maddelerin standartları kullanılarak, CUPRAC, ABTS/Persülfat, DPPH, Folin-Ciocalteu ve $AlCl_3/KAc$ yöntemleriyle çalışma grafikleri oluşturuldu. Bu grafiklerden molar absorpsiyon katsayıları belirlendi. Çizelge 4.1-4.4 bu grafiklerden elde edilen kalibrasyon denklemleri, korelasyon katsayıları ve doğrusal çalışma (linear) aralıklarını göstermektedir.

Tablolarda verilen denklemlerde y : pik alanı, c : derişim ve r : korelasyon katsayısını ifade etmektedir.

Çizelge 4.1. Çeşitli fenolik bileşik standartlarının CUPRAC yöntemi ile belirlenen kalibrasyon denklemi, korelasyon katsayısı ve lineer aralıkları

Fenolik bileşik	Lineer aralık (mol/L)	Kalibrasyon denklemi	Korelasyon katsayısı (r)
Troloks	$8 \times 10^{-2} - 3 \times 10^{-3} M$	$y = 1.60 \times 10^4 c - 0.002$	0,999
Gallik asit	$1 \times 10^{-5} - 2 \times 10^{-6} M$	$y = 5 \times 10^4 c + 0.02$	0,999
Kuersetin	$1 \times 10^{-5} - 1.2 \times 10^{-6} M$	$y = 8 \times 10^4 c + 0.01$	0,999
Rutin	$2 \times 10^{-5} - 5 \times 10^{-6} M$	$y = 5 \times 10^4 c + 0.026$	0,993
Flavon	$2 \times 10^{-3} - 5.10^{-4} M$	$y = 0.6 \times 10^4 c + 0.006$	0,998

Çizelge 4.2. Çeşitli fenolik bileşik standartlarının ABTS/Persülfat yöntemi ile belirlenen kalibrasyon denklemi, korelasyon katsayısı ve lineer aralıkları

Fenolik Bileşik	Lineer Aralık (mol/L)	Kalibrasyon Denklemi	Korelasyon Katsayısı (r)
Troloks	$5 \times 10^{-2} - 1.2 \times 10^{-3} \text{ M}$	$y = 2.65 \times 10^4 c + 0.018$	0,999
Gallik asit	$1 \times 10^{-5} - 3 \times 10^{-6} \text{ M}$	$y = 1 \times 10^5 c - 0.08$	0,999
Kuersetin	$2 \times 10^{-6} - 8 \times 10^{-6} \text{ M}$	$y = 1 \times 10^5 c + 0.02$	0,999
Rutin	$8 \times 10^{-5} - 2 \times 10^{-6} \text{ M}$	$y = 8 \times 10^4 c + 0.03$	0,999
Flavon	$1 \times 10^{-5} - 5 \times 10^{-5} \text{ M}$	$y = 0.14 \times 10^4 c + 0.027$	0,998

Çizelge 4.3. Çeşitli fenolik bileşik standartlarının Folin-Ciocalteu yöntemi ile belirlenen kalibrasyon denklemi, korelasyon katsayısı ve lineer aralıkları

Fenolik Bileşik	Lineer Aralık (mol/L)	Kalibrasyon Denklemi	Korelasyon Katsayısı (r)
Gallik asit	$2 \times 10^{-1} - 6 \times 10^{-3} \text{ M}$	$y = 6.10 \times 10^3 c + 0.011$	0,999

Çizelge 4.4. Çeşitli fenolik bileşik standartlarının AlCl_3 yöntemi ile belirlenen kalibrasyon denklemi, korelasyon katsayısı ve lineer aralıkları

Fenolik bileşik	Lineer aralık (mol/L)	Kalibrasyon denklemi	Korelasyon katsayısı (r)
Kuersetin	$5.5 \times 10^{-2} - 1.4 \times 10^{-3} \text{ M}$	$y = 2.31 \times 10^4 c + 0.018$	0,999

4.3. *Allium rumelicum*, *Peucedanum obtusifolium* ve *Jurinea kilaea* Bitkilerinin Toplam Antioksidan Kapasite/Aktivite Analiz Sonuçları

4.3.1. CUPRAC Yöntemi ile Elde Edilen Analiz Sonuçları

Çizelge 4.5’de çalışılan bitkilerin CUPRAC yöntemi ile mmol/g troloks, gallik asit, kuersetin, rutin ve flavon eşdeğeri cinsinden hesaplanmış toplam antioksidan kapasite değerleri görülmektedir.

Çizelge 4.5. CUPRAC yöntemi ile analizlenen *Allium rumelicum*, *Peucedanum obtusifolium*, *Jurinea kilaea* bitkilerinin toplam antioksidan madde içerikleri

Bitki türü	Troloks (mmol/g)	Gallik asit (mmol/g)	Kuersetin (mmol/g)	Rutin (mmol/g)	Flavon (mmol/g)
<i>Allium rumelicum</i>	0,103	0,033	0,022	0,033	0,294
<i>Peucedanum obtusifolium</i>	0,007	0,002	0,001	0,002	0,020
<i>Jurinea kilaea</i>	0,190	0,061	0,041	0,061	0,543

4.3.2. ABTS/Persulfat Yöntemi ile Elde Edilen Analiz Sonuçları

Çizelge 4.6’da çalışılan bitkilerin ABTS yöntemi ile mmol/g troloks, gallik asit, kuersetin, rutin ve flavon eşdeğeri cinsinden hesaplanmış toplam antioksidan kapasite değerleri görülmektedir.

Çizelge 4.6. ABTS yöntemi ile analizlenen *Allium rumelicum*, *Peucedanum obtusifolium*, *Jurinea kilaea* bitkilerinin toplam antioksidan madde içerikleri

Bitki türü	Troloks (mmol/g)	Gallik asit (mmol/g)	Kuersetin (mmol/g)	Rutin (mmol/g)	Flavon (mmol/g)
<i>Allium rumelicum</i>	0,065	0,017	0,016	0,021	1,23
<i>Peucedanum obtusifolium</i>	0,040	0,011	0,010	0,013	0,756
<i>Jurinea kilaea</i>	0,084	0,022	0,020	0,027	1,59

4.3.3. DPPH Yöntemi ile Elde Edilen Analiz Sonuçları

DPPH yöntemi ile elde edilen antioksidan aktivite tayini sonuçları % inhibisyon değerleri cinsinden verilmiştir (Çizelge 4.7).

Çizelge 4.7. DPPH yöntemiyle elde edilen % inhibisyon değerleri

Bitki türü	% İnhibisyon
<i>Allium rumelicum</i>	54,34
<i>Peucedanum obtusifolium</i>	64,34
<i>Jurinea kilaea</i>	51,01

4.4. *Allium rumelicum*, *Peucedanum obtusifolium* ve *Jurinea kilaea* Bitkilerinin Toplam Fenolik Madde İçeriklerinin Belirlenmesi

4.4.1. Folin-Ciocalteu Yöntemi ile Elde Edilen Analiz Sonuçları

Çalışılan bitkilerin Folin-Ciocalteu yöntemi ile analizlenen mmol/g cinsinden gallik asit miktarları görülmektedir (Çizelge 4.8).

Çizelge 4.8. *Allium rumelicum*, *Peucedanum obtusifolium*, *Jurinea kilaea* bitkilerinin Folin-Ciocalteu yöntemi ile analizlenen toplam fenolik madde içerikleri

Bitki türü	Gallik asit (mmol/g)
<i>Allium rumelicum</i>	0,179
<i>Peucedanum obtusifolium</i>	0,099
<i>Jurinea kilaea</i>	0,277

4.5. *Allium rumelicum*, *Peucedanum obtusifolium* ve *Jurinea kilaea* Bitkilerinin Toplam Flavonoid Madde İçeriklerinin Belirlenmesi

4.5.1. Alüminyum Klorür/KAc Yöntemi ile Elde Edilen Analiz Sonuçları

Çizelge 4.9’da çalışılan bitkilerin AlCl₃/KAc yöntemi ile analizlenen mmol/g cinsinden kuersetin miktarları görülmektedir.

Çizelge 4.9. *Allium rumelicum*, *Peucedanum obtusifolium*, *Jurinea kilaea* bitkilerinin AlCl₃/KAc yöntemi ile analizlenen toplam flavonoid madde içerikleri

Bitki türü	Kuersetin (mmol/g)
<i>Allium rumelicum</i>	0,017
<i>Peucedanum obtusifolium</i>	0,0032
<i>Jurinea kilaea</i>	0,013

4.6. *Allium rumelicum*, *Peucedanum obtusifolium* ve *Jurinea kilaea* Bitkilerinin Toplam Antimikrobiyal Aktivite Analiz Sonuçları

4.6.1. Disk Difüzyon Yöntemi ile Elde Edilen Analiz Sonuçları

Antimikrobiyal aktivite analizi disk difüzyon yöntemi kullanılarak yapılmış ve elde edilen değerler Çizelge 4.10’da verilmiştir.

Çizelge 4.10. Disk difüzyon yöntemi ile antimikrobiyal aktivite analiz sonuçları

Mikroorganizmalar	<i>Allium rumelicum</i> (mm)	<i>Jurinea kilaea</i> (mm)	<i>Peucedanum obtusifolium</i> (mm)
<i>Enterococcus faecalis</i> ATCC51299	0,00	0,00	65,0
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	0,00	0,00	72,3
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC6538	64,6	0,00	68,7
<i>Listeria monocytogenes</i> DSM12464	0,00	0,00	0,00
<i>Salmonella Enteritidis</i> ATCC 13076	0,00	65,0	0,00

5. SONUÇ VE TARTIŞMA

Bu çalışmada, Trakya bölgesinde yetişen ve daha önce biyolojik aktiviteleri konusunda çalışılmamış olan *Allium rumelicum*, *Jurinea kilaea* ve *Peucedanum obtusifolium* bitkilerinin toplam fenolik ve toplam flavonoid madde içeriklerinin, antioksidan ve antimikrobiyal özelliklerinin belirlenmesi amaçlanmış ve gerçekleştirilmiştir.

%80(v/v) metanol çözücüsü kullanılarak *Allium rumelicum*, *Jurinea kilaea* ve *Peucedanum obtusifolium* bitkilerinin ekstraksiyon işlemleri gerçekleştirildi. Elde edilen tüm ekstraktların UV-görünür bölge spektrofotometresi kullanılarak 200-800 nm dalga boyu aralığında spektrumları alındı.

İnsan sağlığı ve gıda maddeleri için önemli olan antioksidanların analizi için basit, tekrarlanabilirliği yüksek, reaksiyon basamakları az, ucuz ve spesifik olmayan cihazlarla yapılan CUPRAC, ABTS/Persülfat, DPPH yöntemleri ile antioksidan aktivite/kapasite özellikleri belirlenmiştir. Toplam fenolik ve flavonoid bileşenlerin analizi için Folin-Ciocalteu ve $AlCl_3/KAc$ metotları kullanılmıştır. Antimikrobiyal aktivite analizleri de disk difüzyon yöntemi ile analiz edilmiştir.

CUPRAC ve ABTS yöntemlerinde troloks, gallik asit, kuarsetin, rutin ve flavon miktarları, Folin Ciocalteu ve $AlCl_3/KAc$ metotlarında ise gallik asit ve kuarsetin miktarları sırasıyla mmol/g cinsinden hesaplanmıştır. DPPH metodunda ise antioksidan özellikler % inhibisyon değeri olarak verilmiştir. Literatür çalışmaları incelendiğinde tez konusu olan bitki türleri üzerinde antioksidan aktivite, antimikrobiyal özellik, toplam fenolik madde ve toplam flavonoid madde içeriği konusundaki çalışmalara literatürde rastlanmamıştır.

Molar absorpsiyon katsayısı, analizlenen fenolik bileşiğin lineer kalibrasyon denkleminde bulunan eğime karşılık gelmektedir. CUPRAC, ABTS/Persülfat, $AlCl_3/KAc$ ve Folin-Ciocalteu yöntemleriyle troloks, gallik asit, rutin, kuarsetin ve flavon bileşenleri için ϵ değeri Çizelge 4.1, 4.2, 4.3 ve 4.4'de görülmektedir.

Bu çalışma sonucunda;

Toplam antioksidan kapasite (TAK) ölçümü amacıyla CUPRAC ve ABTS analiz yöntemleri kullanılmış ve sonuç olarak en yüksek toplam antioksidan kapasite değerinin; CUPRAC ve ABTS yöntemlerinin her ikisinde de *Jurinea kilaea* bitkisinde olduğu

görülmüştür (Çizelge 4.5; Çizelge 4.6). ABTS/Persülfat yöntemiyle elde edilen sonuçların CUPRAC yöntemiyle elde edilen sonuçlara göre daha düşük değerlerin elde edilmesinin nedeni, örneğin redoks potansiyeli veya çözünme özellikleri itibarıyla yetersiz kalması ve aynı zamanda iki yöntemin mekanizma farklılıkları ile açıklanabilir.

DPPH yöntemiyle analiz edilen % inhibisyon değerinin en düşük olduğu bitkinin *Jurinea kilaea* olduğu yapılan çalışmalarda görülmüştür. Aynı çalışma sonucunda elde edilen % inhibisyon değerinin en yüksek olduğu bitki ise *Peucedanum obtusifolium* olmuştur (Çizelge 4.7).

Toplam fenolik madde içerik (TFİ) ölçümü amacıyla Folin-Ciocalteu yöntemi kullanılmış ve burada da en yüksek toplam fenolik madde içeriğine sahip olan bitkinin *Jurinea kilaea* olduğu görülmüştür (Çizelge 4.8).

$AlCl_3$ yöntemiyle toplam flavonoid içerik tayininde ise; *Peucedanum obtusifolium* bitkisi en düşük içeriğe sahip iken, *Allium rumelicum* bitkisinin en yüksek flavonoid içeriğine sahip olduğu görülmüştür. *Jurinea kilaea* bitkisi ise 0.013 mmol/g değeriyle flavonoid içerik bakımından *Allium rumelicum* bitkisinden çok az bir farkla ikinci sırada yer aldığı belirlenmiştir (Çizelge 4.9).

Disk difüzyon yöntemi ile elde edilen antimikrobiyal aktivite analizi sonuçlarına göre; *Peucedanum obtusifolium* bitkisinin; üzerinde çalışılan beş mikroorganizmadan üçüne (*Enterococcus faecalis* ATCC51299, *Escherichia coli* ATCC25922, *Staphylococcus aureus* ATCC6538) etkisinin olduğu belirlenmiştir. *Jurinea kilaea* bitkisi; üzerinde çalışılan mikroorganizmalardan sadece *Salmonella enteritidis* ATCC13076 üzerinde etkili olmuşken, *Allium rumelicum* bitkisinin ise üzerinde çalışılan mikroorganizmalardan sadece *Staphylococcus aureus* ATCC6538 üzerinde etkili olduğu tespit edilmiştir (Çizelge 4.10).

Yapılan bu tez çalışması, Türkiye’de yetişen *Allium rumelicum*, *Jurinea kilaea* ve *Peucedanum obtusifolium* bitkilerinin biyolojik olarak aktif bileşenlerinin araştırılmasında bilimsel birikime önemli katkı sağlayacaktır. Ayrıca bu konuda hazırlanan projenin, literatüre başta kimya bilimi olmak üzere gıda, tıp gibi çalışma alanlarına ve yeni bitki droglarının hazırlanmasında ilaç ve doğal bileşikler endüstrisine önemli katkılar sağlayabilecektir.

KAYNAKLAR

- Akkuş, İ. (1995). *Serbest Radikaller ve Fizyopatolojik Etkileri*. Konya: Mimoza Yayınları.
- Alho, H. ve Leinonen, J. (1999). Total antioxidant activity measured by chemiluminescence methods. *Methods of Enzymology*, 299, 3-14.
- Apak, R., Güçlü, K., Özyürek, M. ve Karademir, S. E. (2004). Novel total antioxidant capacity index for dietary polyphenols and vitamins C and E, using their cupric ion reducing capability in the presence of neocuproine: CUPRAC method. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52(26), 7970-7981.
- Apak, R., Güçlü, K., Özyürek, M., Karademir, S. E. ve Erçağ, E. (2006). The CUPRAC antioxidant capacity and polyphenolics content of some herbal teas. *International Journal of Food Sciences and Nutrition*, 57, 292-304.
- Aydemir, B. ve Sarı, Karadağ, E. (2009). Antioksidanlar ve büyüme faktörleri ile ilişkisi. *Kocatepe Veterinary Journal*, 2(2), 56-60.
- Bener, M., Şen, F.B. ve Apak, R. (2018). Heparin-stabilized gold nanoparticles-based CUPRAC colorimetric sensor for antioxidant capacity measurement. *Talanta*(187), 148-155.
- Benzie, I. F. F. ve Strain, J. J. (1996). Ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of "antioxidant power"; the FRAP assay. *Analytical Biochemistry*, 239, 70-76.
- Chun, S. S., Vatter, D. A., Lin, Y. T. ve Shetty, K. (2005). Phenolic antioxidants from clonal oregano (*Origanum vulgare*) with antimicrobial activity against *Helicobacter pylori*. *Process Biochemistry*, 40, 809-816.
- Davis, P. H. (1965-1985). *Flora of Turkey and the East Aegean Islands*. Edinburgh: Edinburgh University Press.
- Elliot, J. G. (1999). Application of antioxidant vitamins in foods and beverages. *Food Technol.*, 53, 46-48.
- Exarchou, V., Fianegos, Y. C., Van Beek, T. A., Nanos, C. ve Vervoort, J. (2006). Hyphenated chromatographic techniques for the rapid screening and identification of antioxidants in methanolic extracts of pharmaceutically used plants. *Journal of Chromatography A*, 1112, 293-302.
- Glazer, A. (1990). Phycoerythrin fluorescence-based assay for reactive oxygen species. *Methods in Enzymology*, 186, 161-168.
- Güçlü, K., Altun, M., Özyürek, M., Karademir, S. E. ve Apak, R. (2006). Antioxidant capacity of fresh, sun- and sulfited-dried Malatya apricot (*Prunus Armeniaca*) assayed by CUPRAC, ABTS/TEAC and Folin methods. *International Journal of Food Science Technology*, 41, 76-85.
- Huang, D., Ou, B. ve Prior, R. L. (2005). The chemistry behind antioxidant capacity assays. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 53, 4303-4310.

- Huang, M. T., Ho, C. T. ve Lee C. Y. (1992). Antioxidants and cancer prevention. *Phenolic Compounds in Food and Their Effects on Health II*, 507.
- Iqbal, S., Bhangar, M. I. ve Anwar, F. (2007). Antioxidant properties and components of bran extracts from selected wheat varieties commercially available in Pakistan. *Food Science and Technology*, 40, 361-367.
- Justesen, U., Knuthsen, P. ve Leth, T. (1998). Quantitative analysis of flavonols, flavones, and flavanones in fruits, vegetables and beverages by high- performance liquid chromatography with photo-diode array and mass spectrometric detection. *Journal of Chromatography A*, 799, 101-110.
- Justesen, U. ve Knuthsen, P. (2001). Composition of flavonoids in fresh herbs and calculation of flavonoid intake by use of herbs in traditional Danish dishes. *Food Chemistry*, 73, 245-250.
- Karabulut, H. ve Gülay, M. Ş. (2016). Antioksidanlar. *Mehmet Akif Ersoy Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*, 1(1), 66.
- Keskin, H. ve Erkmen, G. (1987). *Besin Kimyası*. İstanbul: Güryay Matbaacılık Beşinci Basım.
- Kim, M., Seo, K. S. ve Yun, K. W. (2018). Antioxidant activity of *Saposhnikovia divaricata*, *Peucedanum japonicum*, and *Glehnia littoralis*. *Indian Journal Pharmaceutical Sciences*, 80(3), 560.
- Kıyak, G. (2013). *Solanum nigrum* L. (Solanaceae) bitkisinin yağ asidi kompozisyonu ve *Solanum dulcamara* L. (Solanaceae) bitkisinin diklormetan/metanol ekstratlarının antioksidan aktivitesinin belirlenmesi. *Yüksek Lisans Tezi*. Tekirdağ, TÜRKİYE: Namık Kemal Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü.
- Matejic, J. S., Dzamic, M. A., Ciric, A. D., Krivosej, Z., Randelović, L. N. ve Marin, P. D. (2013). Antioxidant and antimicrobial activities of extracts of four *peucedanum* L. species. *Digest Journal of Nanomaterials And Biostructures*, 8(2), 655-665.
- Miller, N. J., Rice, E. C., Davies, M. J., Gopinathan, V. ve Milner, A. (1993). A novel method for measuring antioxidant capacity and its application to monitoring the antioxidant status in premature neonates. *Clinical Science*, 84, 407-412.
- Mot, C. A., Dumitrescu, S. R. ve Sarbu, C. (2011). Rapid and effective evaluation of the antioxidant capacity of propolis extracts using DPPH bleaching kinetic profiles, FT-IR and UV-VIS spectroscopic data. *Journal of Food Composite and Analysis*, 24, 516-522.
- Movehedian, A., Zolfaghari, B. ve Mirshekari, M. (2016). Antioxidant effects of hydroalcoholic and polyphenolic extracts of *Peucedanum pastinacifolium*. *Research in Pharmaceutical Sciences*, 11(5), 405-411.
- Naseer, A. S., Muhammad, R. K., Kiran, N. ve Mubarak, A. K. (2014). Antioxidant potential, DNA protection and HPLC-DAD analysis of neglected medicinal *Jurinea dolomiaea* roots. *Journal of Biomedicine and Biotechnology*.

- National Committee for Clinical Laboratory Standards, (NCCLS). (1997). *Performance Standards for Antimicrobial Disk Susceptibility Tests, 6th Ed, Approved Standard M2–A6*. Wayne PA: NCCLS.
- Oszmianski, J., Wojdylo, A., Lamer-Zarawska, E. ve Swiader, K. (2007). Antioxidant tannins from Rosaceae plant roots. *Food Chemistry*, 100, 579-583.
- Özhatay, N., Koçyiğit, M. ve Akalın, E. (2010). *Allium rumelicum* sect. *Codonoprasum* a new species from European Turkey. *Phytologia Balcanica*(16), 355-359.
- Öztürk, H., Kolak, U. ve Meriç, Ç. (2011). Antioxidant, anticholinesterase and antibacterial activities of *Jurinea consanguinea* DC. *Records Of Natural Products*, 5(1), 43-51.
- Özyürek, M., Güçlü, K. ve Apak, R. (2011). The main and modified CUPRAC methods of antioxidant measurement. *Trends in Analytical Chemistry*, 30(4), 652-664.
- Prior, R. L., Wu, X. ve Karen, S. (2005). Standardized methods for the determination of antioxidant capacity and phenolics in food and dietary supplements. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 53, 4290-4302.
- Sen, S. ve Chakraborty, R. (2011). The role of antioxidants in human health. *Oxidative Stress: Diagnostics, Prevention and Therapy*, 1-37.
- Shahidi, F. (1996). *Natural Antioxidants Chemistry, Health Effects and Applications*. Illinois: AOCS Press, Campaign.
- Sharma, K. K. ve Sharma, S. P. (1976). Effect of onion on blood cholesterol, fibrinogen and fibrinolytic activity in normal subjects. *Indian Journal of Pharmacology*, 8, 232-233.
- Singleton, V. L., Orthofer, R. ve Lamuela-Raventos, R. M. (1999). Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin-ciocalteu reagent. *Methods in Enzymology* (Cilt 299, s. 152-178). içinde
- Sözen, İ. (2014). 7 13, 2020 tarihinde dogalhayat.org: <http://dogalhayat.org/property/peucedanum-obtusifolium-kiyi-kerevizi/> adresinden alındı
- Surveswaran, S., Cai, Y., Corke, H. ve Sun, M. (2007). Systematic evaluation of natural phenolic antioxidants from 133 Indian medicinal plants. *Food Chemistry*, 102, 938-953.
- Toker, G., Aslan, M., Yeşilada, E., Memişoğlu, M. ve Ito, S. (2001). Comparative evaluation of the flavonoid content in officinal *Tiliae flos* and Turkish lime species for quality assessment. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 26, 111-121.
- Tosun, N. (2011). 7 13, 2020 tarihinde dogalhayat.org: <http://dogalhayat.org/property/jurinea-kilaea/> adresinden alındı
- Tubaro, F., Ghiselli, A., Papuzzi, P., Maiorino, M. ve Ursini, F. (1998). Analysis of plasma antioxidant capacity by competition kinetics. *Free Radical Biology & Medicine*, 24, 1228-1234.

- Türkyılmaz, Z. (2003). İskemi-reperfüzyon zedelenmesinde pentoksifilin, dimetilsülfoksit ve eksojen melatoninin koruyucu etkilerinin karşılaştırılması. *Genel Cerrahi Uzmanlık Tezi*. EDİRNE.
- Urbonavičiūtė, A., Jakstas, V., Kornysova, O., Janulis, V. ve Maruska, A. (2006). Capillary electrophoretic analysis of flavonoids in single- styled hawthorn (*Crataegus monogyna* Jacq.) ethanolic extracts. *Journal of Chromatography A*, 1112, 339-344.
- Wayner, D. D. M., Burton, G. W., Ingold, K. ve Locke, U. S. (1985). Quantitative measurement of the total peroxy radical-trapping antioxidant capability of human blood plasma by controlled peroxidation. *FEBS Letters*, 187, 33-37.
- Winston, G. W., Regoli, F., Dugas, A. J. Jr., Fong, J. H. ve Blanchard, K. A. (1998). A rapid gas chromatographic assay for determining oxyradical scavenging capacity of antioxidants and biological fluids. *Free Radical Biology & Medicine*, 24, 480-493.
- Woisky, R. ve Salatino, A. (1998). Analysis of propolis: some parameters and procedures for chemical quality control. *Journal Apicultural Research*, 37, 99-105.
- World Health Organization. (1999). World Health Organization library cataloguing in publication data. 1, s. 5-32.
- Xaver, F. (2008). 7 13, 2020 tarihinde https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Jurinea_kilaea_2.jpg adresinden alındı.

ÖZGEÇMİŞ

1991 yılı Aralık ayında İSTANBUL ili Bakırköy ilçesinde doğdu. Eğitim hayatına Vali Cahit Bayar İlköğretim Okulu'nda başladı. İlk ve orta öğretimini 5/5 not ile burada tamamladı.

Lise eğitimini Barbaros Lisesi'nde aldı ve 69.71/100 notu ile mezun oldu.

Üniversite eğitimini Tekirdağ ilinde bulunan Namık Kemal Üniversite Fen Edebiyat Fakültesi Kimya Bölümü'nde aldı ve 2.88/4 notu ile mezun oldu. Eğitime ve kişisel gelişimine önem verdiği ve hayvanlara olan sevgisi sebebiyle ikinci üniversite kapsamında Anadolu Üniversitesi Açıköğretim Fakültesi Laborant ve Veteriner Sağlık Programı'nı 2.45/4 notu ile tamamladı.

Mesleki hayatına özel sektörde başladı ve kendini çalışmış olduğu ilaç, kozmetik ve gıda takviyesi sektöründe geliştirdi.