

T.C
TRAKYA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

KARADUT MEYVE VE YAPRAKLARININ
ANTIOKSİDAN AKTİVİTELERİNİN DEĞERLENDİRİLMESİ

BURCU MANGAN

Yüksek Lisans Tezi

KİMYA ANABİLİM DALI

Tez Danışmanı: Prof. Dr. YEŞİM YEŞİLOĞLU

EDİRNE – 2019

Burcu Mangan'ın hazırlamış olduğu "Karadut Meyve ve Yapraklarının Antioksidan Aktivitelerinin Değerlendirilmesi" başlıklı tez tarafımızca incelenmiş olup, niteliği ve kapsamı bakımından Kimya Anabilim Dalı Yüksek Lisans Tezi olarak uygun görülmüştür.

Jüri Üyeleri

İmza

Prof. Dr. Yeşim YEŞİLOĞLU

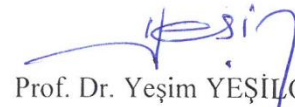
Prof. Dr. Yüksel BAYRAK

Prof. Dr. Meryem ÇAMUR



Tez Savunma Tarihi: 12/09/2019

Bu tezin Yüksek Lisans Tezi olarak uygun koşullara sahip olduğunu onaylıyorum.



Prof. Dr. Yeşim YEŞİLOĞLU
Tez Danışmanı

Trakya Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü onayı



Prof. Dr. Murat YURTCAN
Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürü

TRAKYA ÜNİVERSİTESİ FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
KİMYA ANABİLİM DALI YÜKSEK LİSANS TEZİ
DOĞRULUK BEYANI

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

12/09/2019

Burcu MANGAN



Yüksek Lisans Tezi

Karadut Meyve ve Yapraklarının Antioksidan Aktivitelerinin Değerlendirilmesi

Trakya Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü

Kimya Anabilim Dalı

ÖZET

Antioksidanlar hücre metabolizması reaksiyonlarının yan ürünü olan serbest radikallerle savaşarak, oluşturabilecekleri hasarları önleyen maddelerdir. Vücudun savunma sisteminde aktif olarak görev alırlar.

Metabolizmamızdaki doğal antioksidanların yanı sıra, birçok antioksidan beslenme yolu ile de alınabilir. Meyve ve sebzeler antioksidanlarca zengin gıda maddeleridir. Yapılan bu tez çalışmasında karadut meyve ve yapraklarının aseton, su ve metanol ekstraktlarının fenolik bileşen tayini, flavonoid bileşen tayini, DPPH radikali yakalama aktivitesi tayini, ABTS radikali yakalama aktivitesi tayini, demir (II) iyonlarını şelatlama aktivitesi tayini, linoleik asit sisteminde FTC yöntemi ile antioksidan aktivitesi tayini deneyleri yapılarak antioksidan aktivitesi araştırılmıştır.

Yıl: 2019

Sayfa Sayısı: 69

Anahtar Sözcükler: antioksidan, serbest radikal, fenolik madde, flavonoid

Master's Thesis

Evaluation of Antioxidant Activities of Black Mulberry Fruit and Leaves

Trakya University Institute of Science

Department of Chemistry

ABSTRACT

Antioxidants are called substances that inhibit the damages free radicals can constitute, by fighting free radicals which are side product of cell metabolism reactions. They actively take part in the defense system of the body.

In addition to natural antioxidants in our metabolism, many antioxidants can be taken in our body through nutrition. Fruit and vegetables are food stuffs that are rich in antioxidants. In this study, antioxidant activity has been investigated, doing the experiments; phenolic substance determination of extracts from black mulberry fruit and leaves, acetone, water and methanol, determination of flavonoid substance, determination of DPPH radical scavenging activity, determination of ABTS radical scavenging activity, determination of ferric (II) ions chelation, determination of antioxidant activity in linoleic acid system with FTC method.

Year: 2019

Number of Pages: 69

Keywords: antioxidant, free radical, phenolic substance, flavonoid.

TEŞEKKÜR

Uzun süren çalışmalarım boyunca büyük bir sabır, ilgi ve destekle her zaman yanımda olan, birlikte çalışmaktan onur duyduğum, ahlaki değerleri ile de kendime örnek edindiğim, çok sevdiğim, tez danışmanım, sayın hocam Prof. Dr. Yeşim YEŞİLOĞLU'na,

Destegini ve her zaman yanımda olduğunu hep hissettirmiş olan, ufkumu açan, sayın hocam Prof. Dr. Ayten SAĞIROĞLU'na,

Çalışmaların esnasında tecrübelerinden faydalandığım sayın hocam Doç. Dr. Hakkı Mevlüt ÖZCAN'a,

Yardımları ve destekleriyle bu süreci benim için kolaylaştıran, minnet duyduğum sayın hocam Doç. Dr. H. R. Ferhat KARABULUT'a,

Tüm öğretmen ve öğretenlerime,

Varlıklarını her daim hissettiren, dostluklarını ve yardımlarını hiçbir zaman esirgemeyen, değerli arkadaşlarım Bircan ENGİN, Gökhan GÜNDOĞAN, Tuğçe GÜNDOĞAN ve Ali DEMİRKAN'a,

Aldığım tüm kararlarda beni destekleyen, her zaman yanımda olduklarını bildiğim sevgili aileme; babam Mehmet MANGAN'a, annem Emine MANGAN'a, abilerim Selçuk MANGAN ve Yakup Sinan MANGAN'a, ablalarım Hacer MANGAN ve Gülcan MANGAN'a teşekkürlerimi sunarım.

İÇİNDEKİLER

| | |
|--|------|
| ÖZET..... | iv |
| ABSTRACT..... | v |
| TEŞEKKÜR..... | vi |
| KISALTMALAR DİZİNİ..... | x |
| ÇİZELGELER DİZİNİ..... | xi |
| ŞEKİLLER DİZİNİ..... | xiii |
| BÖLÜM 1..... | 1 |
| 1. GİRİŞ..... | 1 |
| BÖLÜM 2..... | 2 |
| 2.GENEL BİLGİLER..... | 2 |
| 2.1. Serbest Radikaller..... | 2 |
| 2.1.1. Serbest Radikallerin Etkileri..... | 3 |
| 2.2. Antioksidanlar..... | 4 |
| 2.2.1. Antioksidanların Bölümlendirilmesi..... | 5 |
| 2.2.2. Antioksidanların Faydaları..... | 6 |
| 2.2.3. Antioksidan İçeren Gıdalar..... | 7 |
| 2.3. Fenolik Bileşikler..... | 8 |
| 2.3.1. Fenolik Bileşiklerin Sınıflandırılması..... | 9 |
| 2.3.2. Flavonoidler..... | 10 |
| 2.3.2.1. Flavonoidlerin Sınıflandırılması..... | 11 |
| 2.3.3. Flavonoid Olmayan Fenolik Bileşikler..... | 12 |
| 2.3.3.1. Fenolik Asitler..... | 13 |

| | |
|--|----|
| 2.3.3.2. Ligninler..... | 13 |
| 2.3.3.3. Hidrolize Tanenler | 14 |
| BÖLÜM 3 | 15 |
| 3. KULLANILAN MATERYAL VE YÖNTEMLER..... | 15 |
| 3.1. Materyal..... | 15 |
| 3.1.1. Karadut..... | 15 |
| 3.1.2. Karadut Meyvesinin Antioksidan Aktivitesi | 16 |
| 3.2. Kullanılan Cihazlar..... | 17 |
| 3.3. Kullanılan Çözeltiler | 18 |
| 3.4. Uygulanan Yöntemler | 19 |
| 3.4.1. Ekstraktların Hazırlanması | 19 |
| 3.4.2. Fenolik Bileşen İçeriğinin Belirlenmesi | 19 |
| 3.4.3. Flavonoid Bileşen İçeriğinin Belirlenmesi | 20 |
| 3.4.4. Metal İyonları ile Şelat Oluşturma Aktivitesinin Belirlenmesi | 20 |
| 3.4.5. Süperoksit Radikali Yakalama Aktivitesinin Belirlenmesi | 21 |
| 3.4.6. İndirgeme Kapasitesinin Belirlenmesi..... | 21 |
| 3.4.7. ABTS Denemesi | 22 |
| 3.4.8. DPPH Radikali Yakalama Aktivitesinin Belirlenmesi | 22 |
| 3.4.9. Toplam Antioksidan Kapasitesi Tayini | 23 |
| 3.4.10. Yapılan Çalışmaların Değerlendirilmesi | 23 |
| BÖLÜM 4 | 24 |
| 4. BULGULARIN DEĞERLENDİRİLMESİ | 24 |
| 4.1. Ekstrakt Hazırlama | 24 |
| 4.2. Fenolik Bileşen İçeriğinin Belirlenmesi..... | 25 |
| 4.3. Flavonoid Bileşen İçeriğinin Belirlenmesi | 29 |
| 4.4. Metal İyonları ile Şelat Oluşturma Aktivitesinin Belirlenmesi..... | 32 |

| | |
|---|----|
| 4.5. Süperoksit Radikali Yakalama Aktivitesinin Belirlenmesi..... | 34 |
| 4.6. İndirgeme Kapasitesinin Belirlenmesi | 36 |
| 4.7. ABTS Denemesi..... | 38 |
| 4.8. DPPH Radikali Yakalama Aktivitesinin Belirlenmesi..... | 40 |
| 4.9. Toplam Antioksidan Kapasitesi Tayini | 43 |
| BÖLÜM 5 | 45 |
| 5. SONUÇLAR VE TARTIŞMA | 45 |
| 5.1. Ekstrakt Verimi | 45 |
| 5.2. Fenolik Bileşen İçeriğinin Belirlenmesi..... | 45 |
| 5.3. Flavonoid Bileşen İçeriğinin Belirlenmesi | 46 |
| 5.4. Metal İyonları ile Şelat Oluşturma Aktivitesinin Belirlenmesi..... | 47 |
| 5.5. Süperoksit Radikali Yakalama Aktivitesinin Belirlenmesi..... | 47 |
| 5.6. İndirgeme Kapasitesinin Belirlenmesi | 48 |
| 5.7. ABTS Denemesi..... | 48 |
| 5.8. DPPH Radikali Yakalama Aktivitesinin Belirlenmesi..... | 49 |
| 5.9. Toplam Antioksidan Kapasitesi Tayini | 49 |
| KAYNAKLAR | 51 |
| ÖZGEÇMİŞ | 55 |

KISALTMALAR DİZİNİ

| | |
|-------|---|
| ABTS | 2,2-azino-bis(3-etilbenzotiazolin-6-sülfonat) |
| BHA | Bütillendirilmiş hidroksi anisol |
| BHT | Bütillendirilmiş hidroksi toluen |
| DPPH | 1,1-Difenil-2-pikrilhidrazil |
| FCR | Folin-Ciocalteu reaktifi |
| FTC | Ferrik tiyosiyanat |
| NADH | Nikotinamid adenin dinükleotid |
| NADPH | Nikotin amid adenin di nükleotid fosfat |
| NBT | Nitroblue tetrazolium klorür |
| PMS | Fenazin metasülfat |
| UV | Ultraviolet |

ÇİZELGELER DİZİNİ

| | |
|---|----|
| Çizelge 2.1. Reaktif oksijen türleri | 2 |
| Çizelge 2.2. Reaktif azot türleri | 3 |
| Çizelge 2.3. Endojen antioksidanlar | 5 |
| Çizelge 2.4. Eksojen antioksidanlar | 6 |
| Çizelge 2.5. Üzümsü meyvelerin fenolik madde içeriği | 9 |
| Çizelge 2.6. Fenolik bileşiklerin sınıflandırılması | 10 |
| Çizelge 2.7. Flavonoidlerin sınıflandırılması..... | 12 |
| Çizelge 4.1. Karadut meyvesinin aseton, metanol, su ekstraksiyonu verimi | 24 |
| Çizelge 4.2. Karadut yapraklarının aseton, metanol, su ekstraksiyonları verimi..... | 24 |
| Çizelge 4.3. Karadut ekstraktlarının gallik asit eşdeğerli fenolik bileşen içeriği..... | 26 |
| Çizelge 4.4. Karadut ekstraktlarının pirogallol eşdeğerli fenolik bileşen içeriği..... | 27 |
| Çizelge 4.5. Karadut ekstraktlarının epikateşin eşdeğerli flavonoid bileşen içeriği | 30 |
| Çizelge 4.6. Karadut ekstraktlarının gallik asit eşdeğerli flavonoid bileşen içeriği..... | 30 |
| Çizelge 4.7. Standart çözeltilerin Fe^{+2} iyonu ile şelat oluşturma aktivitesi % değerleri | 32 |
| Çizelge 4.8. Karadut meyve ve yapraklarının Fe^{+2} iyonu ile şelat oluşturma aktivitesi % değerleri..... | 32 |
| Çizelge 4.9. Standart çözeltilerin süperoksit radikali yakalama aktivitesi % değerleri.. | 34 |
| Çizelge 4.10. Karadut meyve ve yapraklarının süperosit radikali yakalama aktivitesi % değerleri..... | 34 |
| Çizelge 4.11. Standart çözeltilerin indirgeme gücü değerleri | 36 |
| Çizelge 4.12. Karadut meyve ve yapraklarının indirgeme gücü değerleri..... | 36 |
| Çizelge 4.13. Standart çözeltideki ABTS radikali değişim değerleri (%) | 38 |
| Çizelge 4.14. Karadut meyve ve yaprak ekstraktlarındaki ABTS radikali değişim değerleri (%)..... | 39 |
| Çizelge 4.15. Standart çözeltilerin DPPH radikali yakalama aktivitesi % değerleri | 41 |
| Çizelge 4.16. Karadut meyve ve yapraklarının DPPH radikali yakalama aktivitesi % değerleri..... | 41 |

| | |
|---|----|
| Çizelge 4.17. Standart çözeltilerin lipid peroksidasyonu inhibisyon değerleri (%)..... | 43 |
| Çizelge 4.18. Karadut meyve ve yapraklarının lipid peroksidasyonu inhibisyon değerleri (%)..... | 43 |

ŞEKİLLER DİZİNİ

| | |
|--|----|
| Şekil 2.1. Serbest radikallerin hücrede oluşturduğu hasarlar | 4 |
| Şekil 2.2. Flavonoid iskeleti | 10 |
| Şekil 2.3. Hidroksibenzoik ve hidroksisinnamik asitlerin yapıları | 13 |
| Şekil 2.4. Lignin biyosentezi | 14 |
| Şekil 2.5. Hidrolize olabilen tanenlerin (a) ve kondanse tanenlerin (b) molekül yapıları | 14 |
| Şekil 3.1. Karadut | 16 |
| Şekil 3.2. Karadut meyve ve yaprakları | 16 |
| Şekil 4.1. Gallik asit standardı grafiği | 25 |
| Şekil 4.2. Pirogallol standardı grafiği | 26 |
| Şekil 4.3. Karadut meyve ve yapraklarının gallik asit eşdeğerli fenolik bileşen içeriği | 28 |
| Şekil 4.4. Karadut meyve ve yapraklarının pirogallol eşdeğerli fenolik bileşen içeriği | 28 |
| Şekil 4.5. Epikateşin standardı grafiği | 29 |
| Şekil 4.6. Gallik asit standardı grafiği | 29 |
| Şekil 4.7. Karadut meyve ve yapraklarının epikateşin eşdeğerli flavonoid bileşen içerikleri | 31 |
| Şekil 4.8. Karadut meyve ve yapraklarının gallik asit eşdeğerli flavonoid bileşen içerikleri | 31 |
| Şekil 4.9. Karadut yaprağı ekstraktlarının Fe^{+2} iyonu ile şelat oluşturma aktivitesi | 33 |
| Şekil 4.10. Karadut meyve ekstraktlarının Fe^{+2} iyonu ile şelat oluşturma aktivitesi | 33 |
| Şekil 4.11. Karadut yaprağı ekstraktlarının süperoksit radikali yakalama aktivitesi | 35 |
| Şekil 4.12. Karadut meyve ekstraktlarının süperoksit radikali yakalama aktivitesi | 35 |
| Şekil 4.13. Karadut yaprağı ekstraktlarının indirgeme gücü | 37 |
| Şekil 4.14. Karadut meyve ekstraktlarının indirgeme gücü | 38 |
| Şekil 4.15. Karadut yaprağı ekstraktlarının ABTS radikali yakalama aktivitesi | 40 |
| Şekil 4.16. Karadut meyve ekstraktlarının ABTS radikali yakalama aktivitesi | 40 |
| Şekil 4.17. Karadut yaprağı ekstraktlarının DPPH radikali yakalama aktivitesi | 42 |

| | |
|---|----|
| Şekil 4.18. Karadut meyve ekstraktlarının DPPH radikali yakalama aktivitesi | 42 |
| Şekil 4.19. Karadut yaprağı ekstraktlarının lipid peroksidasyonu inhibisyonu değerleri. | 44 |
| Şekil 4.20. Karadut meyve ekstraktlarının lipid peroksidasyonu inhibisyonu değerleri | 44 |

BÖLÜM 1

1. GİRİŞ

Serbest radikaller ve bu radikallerin zararlı olan etkilerini en aza indiren ya da yok eden antioksidanlar son zamanların hakkında en çok araştırma yapılan konularından biridir. Canlı organizma sağlıklıyken bir serbest radikal/antioksidan dengesi varlığı söz konusudur. Fakat X-ray ve UV ışınları, egzoz ve sigara dumanları, alkol ve sigara kullanımları, çevre kirleticiler, stres gibi faktörler serbest radikal oluşumunu tetikleyip arttırınca bu denge bozulmaktadır. Bu dengenin bozulması durumunda antioksidanca zengin gıdalardan faydalanılarak oksidan/antioksidan dengesinin tekrar kurulması sağlanabilir.

Bitkisel besinler antioksidanca zengin kaynaklardır. Bitkisel besinleri antioksidanca zengin yapan içerikleri fenolik bileşiklerdir (Shahidi & Ambigaipalan, 2015). Latince adı *Morus nigra* L. olan karadut meyvesi de iyi bir antioksidan kaynağı olup, fenolik bileşiklerce zengindir. Ayrıca karadut meyve yapraklarının antioksidatif özelliklerinin yanında antimikrobiyal, antidiabetik etkileri de vardır.

Yapılan bu çalışmayı kapsayan tüm analizlerde karadut meyve ve yapraklarının antioksidan aktiviteleri araştırılmış ve antioksidan maddelerle karşılaştırılarak değerlendirmeleri yapılmıştır.

BÖLÜM 2

2.GENEL BİLGİLER

2.1. Serbest Radikaller

Radikal üzerinde eşleşmemiş elektron taşıyan, yüksek enerjili, kararsız türlere verilen isimdir. Eşleşmemiş elektron bulundurduklarından, başka maddelerle reaksiyona girerek kararlı olma eğilimindedirler. Serbest radikallere örnek olarak hidroksil, süperoksit, alkoksil, lipid peroksil ve azot türleri radikaller sayılabilir.

Çizelge 2.1 ve Çizelge 2.2’de reaktif oksijen ve reaktif azot türleri gösterilmiştir.

Çizelge 2.1. Reaktif oksijen türleri (Karabulut & Gülay, 2016b)

| Radikaller | Nonradikaller |
|----------------------------------|--------------------------------|
| Süperoksit (O_2^{\cdot}) | Hidrojen peroksit (H_2O_2) |
| Hidroksil (OH^{\cdot}) | Hipokloröz asit ($HOCl$) |
| Peroksil (ROO^{\cdot}) | Hipobromöz asit ($HOBr$) |
| Alkoksil (RO^{\cdot}) | Singlet oksijen (1O_2) |
| Hidroperoksil (HO_2^{\cdot}) | Ozon (O_3) |
| Lipid peroksil (LOO^{\cdot}) | |

Çizelge 2.2. Reaktif azot türleri (Karabulut & Gülay, 2016b)

| Radikaller | Nonradikaller |
|-------------------------------------|---|
| Azot monoksit ($\text{NO}\cdot$) | Nitröz asit (HNO_2) |
| Azot dioksit ($\text{NO}_2\cdot$) | Nitroksil katyonu (NO^+) |
| | Nitroksil anyonu (NO^-) |
| | Di azot tetraoksit (N_2O_4) |
| | Di azot trioksit (N_2O_3) |
| | Peroksi nitrit (ONOO^-) |
| | Peroksi nitrik asit (ONOOH) |
| | Nitronyum katyonu (NO_2^+) |
| | Nitril klorit (NO_2Cl) |
| | Alkil peroksi nitrit (ROONO) |

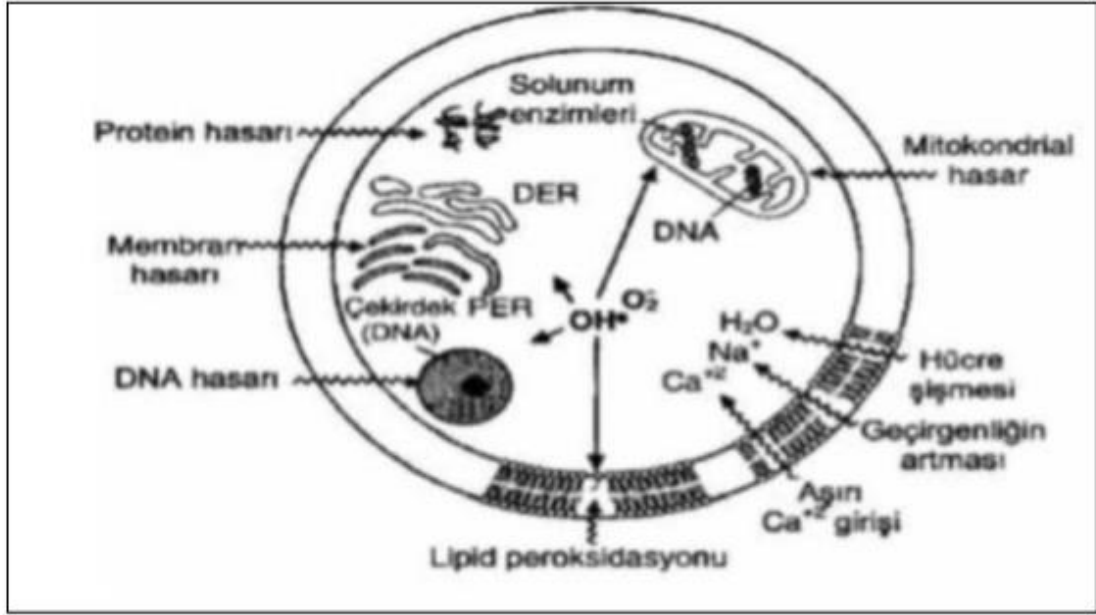
Serbest radikaller metabolizmaya dışarıdan alınabildiği gibi endojen de üretilebilir. Mitokondride enerji üretimi sırasında oluşabilecekleri gibi bazı hormonların yol açtığı stres reaksiyonları sonucu da oluşabilirler (Sakihama, Cohen, Stephen, & Yamasaki, 2002). Maruz kaldığımız UV ışınlar, egzoz dumanı, hava ve su kirleticiler, sigara ve alkol kullanımı da serbest radikal oluşumuna katkıda bulunur.

2.1.1. Serbest Radikallerin Etkileri

Serbest radikallerin metabolizmadaki yoğunlukları az olduğunda savunma sistemine katkıda bulunma, hücresel sinyallerin aktivasyonu, bazı moleküllerin biyosentezine katılıp gelişimlerini uyarma gibi faydalı etkilerinden söz edilebilir. Ancak serbest radikallerin organizmadaki yoğunluğu arttıkça zararı etkileri baş gösterir. Hücre içi organel membranlarındaki lipidler, proteinler, karbonhidratlar ve DNA ile etkileşime

geçerek oksidatif hasarlara yol açarlar. Bunun sonucunda metabolizmada meydana gelen oksidan seviyesindeki artış birçok hastalığa neden olabilir. Bu sebepten organizmada oksidan ve antioksidan seviyesinin dengeli halde bulunması gerekir.

Serbest radikallerin hücrede oluşturabileceği hasarlar Şekil 2.1’de gösterilmiştir.



Şekil 2.1. Serbest radikallerin hücrede oluşturduğu hasarlar (Güleşçi & Aygül, 2016)

2.2. Antioksidanlar

Antioksidanlar hücre metabolizması reaksiyonlarının toksik yan ürünü olan serbest radikallerle savaşarak, oluşturabilecekleri hasarları önleyen maddelerdir (Granato, ve diğerleri, 2018). Reaktif oksijen ve azot türlerinin yol açtığı oksidatif hasarları önlemek ve bu radikallerin fazlalıklarını deaktive etmek için savunma sistemi olarak görev alırlar. Metabolizmadaki oksidan seviyesini ayarlayarak oksidan/antioksidan dengesini kurarlar (Lobo, Patil, Phatak, & Chandra, 2010).

2.2.1. Antioksidanların Bölümlendirilmesi

Antioksidanlar endojen ve eksojen olabilirler. Endojen antioksidanlar enzimatik ile nonenzimatik antioksidanlar olmak üzere iki grupta incelenirken; eksojen antioksidanlar da vitamin ve ilaç olarak yararlanılanları olmak üzere iki bölümde incelenir.

Endojen antioksidanlardan enzimatik olanlara katalaz, süperoksit dismutaz, glutatyon redüktaz ve glutatyon peroksidaz örnek verilirken, nonenzimatik olanlara da glutatyon, bilirubin, albümin, ürik asit, melatonin, koenzim Q10, transferrin, selenyum,seruloplazmin α -lipoik asit örnek verilebilir (Çizelge 2.3).

Çizelge 2.3. Endojen antioksidanlar (Karabulut & Gülay, 2016a)

| ENDOJEN ANTIÖKSİDANLAR | | |
|---|-----------------------------|-----------------------|
| ENZİMATİK ANTIÖKSİDANLAR | NONENZİMATİK ANTIÖKSİDANLAR | |
| Süperoksit dismutaz (SOD) | Glutatyon | Koenzim Q 10 |
| Katalaz (CAT) | Melatonin | Selenyum |
| Glutatyon peroksidaz (GP _x) | Ürik asit | α -lipoik asit |
| Glutatyon redüktaz (GR) | Bilirubin | Transferrin |
| | Albümin | Seruloplazmin |

Eksojen antioksidanlardan vitamin olarak kullanılanlarına β -karoten, α -tokoferol, folik ve askorbik asitler örnek verilirken, kullanım alanı ilaç olanlarına allopürinol, oksipürinol, adenozin, nötrofil adezyon inhibitörleri, lokal anestetikler, rekombinant süperoksit dismutaz, sitokinler, mannitol, albümin, demir redoks döngüsü inhibitörleri, trolox-C, barbütratlar, demir şelatörleri örnek verilebilir (Çizelge 2.4).

Çizelge 2.4. Eksojen antioksidanlar (Karabulut & Gülay, 2016a)

| EKSOJEN ANTIOKSİDANLAR | |
|---------------------------------------|--|
| VİTAMİN EKSOJEN ANTIOKSİDANLAR | İLAÇ OLARAK KULLANILAN EKSOJEN ANTIOKSİDANLAR |
| α -tokoferol (Vitamin E) | Ksantin oksidaz inhibitörleri |
| β -karoten (Vitamin A) | NADPH oksidaz inhibitörleri |
| Askorbik asit (Vitamin C) | Rekombinant süperoksit dismutaz |
| Folik asit (Vitamin B9) | Trolox-C |
| | Endojen antioksidan aktiviteyi arttıranlar |
| | Nonenzimatik serbest radikal toplayıcılar |
| | Demir redoks döngüsü inhibitörleri |
| | Nötrofil adezyon inhibitörleri |
| | Sitokinler |
| | Barbitüratlar |
| | Demir şelatörleri |

2.2.2. Antioksidanların Faydaları

Hücelere zarar veren serbest radikallerin zararlı etkilerini yok eden, minimuma indiren antioksidanlar hastalıklardan korunmak, sağlıklı kalabilmek ve yaş almayla birlikte gelen olumsuz etkileri ortadan kaldırmada önemli bir görev üstlenirler.

Antioksidanlar canlılığın devamı için elzemdir. Canlı metabolizması glutatyon gibi kendi antioksidanlarını da oluşturmaktadır.

Antioksidanlar özellikle şeker ve kardiyovasküler hastalıkları, sarı nokta hastalığı ve başka birçok hastalığı önlemeye yardımcıdır (Skrovankova, Sumczynski, Mlcek, Jurikova, & Sochor, 2015). Kanser hücrelerine karşı sitotoksik etki gösterdikleri de bilinmektedir (Demir, Turan, & Aliyazıcıoğlu, 2019). Tedavi edici özelliklerinden ziyade bu gibi sağlık sorunlarıyla karşılaşmamak için bir önlem niteliği de taşırlar.

Antioksidanlar gıda ürünlerinin raf ömrünü uzattığı için gıda katkı maddesi olarak da kullanılır. Örneğin; C vitamini koruyucu olarak işlenmiş gıdalara ilave edilen bir antioksidandır.

2.2.3. Antioksidan İçeren Gıdalar

Tüm canlılar serbest radikallerin sebep olduğu hasarlara karşı savunma sistemlerine sahiptir. Savunma sistemlerine katkıda bulunacak antioksidanlar hemen hemen bütün bitkisel ve hayvansal gıdalarda bulunmaktadır.

En iyi antioksidan kaynakları bitkisel gıdalar, özellikle de meyve ve sebzelerdir.

Gıdaları bazı antioksidan ihtiva edişlerine göre şöyle sıralayabiliriz:

A vitamini ve karotenoid: Havuç, kara lahana, kabak, kavun, kayısı, şeftali, brokoli

C vitamini: Narenciyeler, turunçgiller, yeşil yapraklı sebzeler

E vitamini: Fındık, ceviz gibi kuruyemişler, yeşil sebzeler, bitkisel yağlar

Selenyum: Balık, tavuk, kırmızı et, sarımsak, tahıl ürünleri

Flavonoid ve Polifenol: Soya sosu, kırmızı şarap, çay, karadut, nar, mor üzüm kızılıcık

Likopen: Karpuz, domates

Lignan: Yulaf ezmesi, keten tohumu

Lutein: Brüksel lahanası, brokoli, ıspanak (Antioksidan Nedir?, 2016)

İyi bir antioksidan kaynağı olan besinler şunlardır:

- Patlıcan
- Fasulye ve barbunya gibi baklagiller
- Yeşil çay
- Siyah çay
- Kırmızı üzüm
- Frenk üzümü
- Karadut
- Goji dutları
- Beyaz dut
- Yaban mersini
- Bitter çikolata
- Kahve

- Elma
- Mercimek
- Brokoli
- Ispanak
- Nar
- Süt ürünleri
- Yumurta
- Böğürtlen
- Domates
- Kırmızı erik
- Keten tohumu
- Yulaf ezmesi
- Arpa
- Çavdar
- Greyfurt
- Ahududu
- Çilek
- Havuç
- Soğan
- Sarımsak

2.3. Fenolik Bileşikler

Fenolik bileşikler fenol türevi aromatik bileşiklerdir. Doğal antioksidan olup, bu etkilerini serbest radikalleri giderme, lipoksijenaz enzimini inhibe ederek ve metallerle şelat oluşturarak gerçekleştirirler (Güleşçi & Aygöl, 2016).

Fenolik bileşikler gıdaların görünüş, renk ve tatlarına etki etmekle birlikte, antioksidatif etkileri sebebiyle canlı sağlığı üzerinde olumlu etkileri bulunan bileşiklerdir.

Meyve ve sebzelerin antioksidatif özellikleri içerdikleri fenolik bileşik içeriğine bağlıdır (Yıldız & Baysal, 2003). Özellikle flavon, izoflavon, kuarsetin, kateşin ve izokateşin gibi flavonoidler antioksidatif etkiye önemli ölçüde katkı sağlamaktadır.

Üzümsü meyveler fenolik bileşenlerce oldukça zengindir. Bu meyvelerin biyolojik değeri içerdikleri vitaminler, provitaminler, mineraller, fitosteroller ve en önemlisi fenolik bileşiklerden kaynaklanır. Antioksidatif etkilerinin fazla olması içeriği olan fenolik bileşiklerle ilgilidir.

Üzümsü meyvelerin fenolik bileşik içerikleri aşağıda verilmiştir (Çizelge 2.5).

Çizelge 2.5. Üzümsü meyvelerin fenolik madde içeriği (Çağlar & Demirci, 2018)

| Üzümsü meyveler | Fenolik Bileşenler (mg/100 g taze meyvede) | Kaynaklar |
|------------------------|---|---------------------------|
| Yaban mersini | 525 | (Prior ve ark., 1998) |
| Böğürtlen | 417-555 | (Sellappan ve ark., 2002) |
| Siyah Frenk Üzümlü | 498-1342 | (Moyer ve ark., 2002) |
| Mavi Yemiş | 261-585 | (Sellappan ve ark., 2002) |
| Ayonya | 690,2 | (Benvenuti ve ark., 2004) |
| Turna Yemişi | 315 | Zheng ve Wang, 2003 |
| Ahududu | 517 | Wada ve Ou, 2002 |
| Çilek | 102 | Zheng ve ark., 2007 |

2.3.1. Fenolik Bileşiklerin Sınıflandırılması

Fenolik, benzoik ve hidrokisisinnamik asitler, hidrolize tanenler, ligninler flavonoid özellik göstermeyen fenolik bileşiklerdir. Flavonoller, flavonlar, flavanonlar, antosiyanidinler, kondanse tanenler ve izoflavonlar flavonoid olan fenolik bileşiklerdir.

Fenolik bileşiklerin sınıflandırılması Çizelge 2.6'da gösterilmiştir.

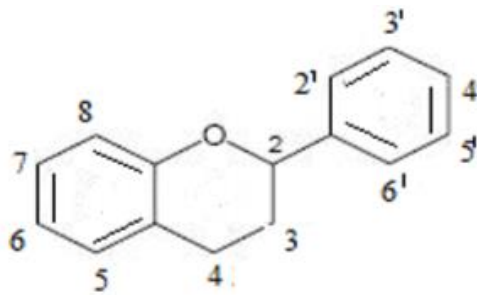
Çizelge 2.6. Fenolik bileşiklerin sınıflandırılması (Türksoy, 2019)

| Sınıflandırma | Bileşik |
|-------------------------------------|---|
| Flavonoid olmayan bileşikler | |
| Fenolik asitler | |
| Benzoik asitler | Gallik ve para-hidroksi benzoik asitler |
| Hidroksisinnamik asitler | Kumarik, kafeik ve ferulik asitler |
| Hidrolize tanenler | Penta galloil glukoz |
| Ligninler | |
| | |
| Flavonoid bileşikler | |
| Flavonollar (Flavon -3-oller) | Kaempferol, kuarsetin |
| Flavonlar | Apigenin, luteolin |
| Flavononlar | Naringenin, hesperidin |
| Antosiyanidinler | Siyanidin, pelargonidin, malvidin |
| Kondanse tanenler | Trimerik prosiyanidinler |
| İsoflavonlar | Glisitin, daidzein, genistein |
| Flavanollar | Kateşinler, gallokateşinler |

2.3.2. Flavonoidler

Flavonoidler bitki ve mantarlarda bulunan, canlı sağlığı üzerine olumlu etkileri olan sekonder metabolit sınıfı doğal bileşiklerdir.

Şekil 2.2’de bir flavonoid iskeleti yer almaktadır.



Şekil 2.2. Flavonoid iskeleti (Atınç & Kalkan, 2018)

Flavonoidler antioksidan özelliğine sahip, hücrelerin zarar görmesini engelleyen, bitkilere parlak renklerini veren bileşiklerdir. Sebze ve meyvelerin renkleri ne kadar

canlıysa flavonoid içerikleri o kadar yüksektir (Agati, Azzarello, Pollastri, & Tattini, 2012).

Çikolata, çay, şarap, turunçgiller ve brokoli, ıspanak gibi sebzelerde bolca bulunan flavonoidler serbest radikallerin zararlı etkilerini önleyerek kanser gibi hastalıklara; yağların zararlı bileşiklere dönüşümünü engelleyerek kalp, damar rahatsızlıklarına karşı savaş açar. Osteoporoz tedavisinde de kullanılırlar (Çimen, 1999). Gıdalarda bulunan formu glikozid formudur (Çapanoğlu Güven, Toydemir Otkun, & Boyacıoğlu, 2010). Gıdalarda tat, renk ve oksidasyonun engellenmesinde rol oynarlar. Flavonoidler obezite üzerine de oldukça etkilidir, yağ kütlesi oranını azalttıklarından söz edilebilir.

2.3.2.1. Flavonoidlerin Sınıflandırılması

Flavonoidler kendi aralarında 6 grupta sınıflandırılır:

1. Flavon
2. Flavonon
3. Flavonol
4. İzoflavon
5. Antosiyanidin
6. Flavanol (Kateşin)

Kateşinler şarap, çikolata, çay, kahve, elma ve üzüm gibi besinlerde bulunur. İzoflavonlar soya içerikli besinlerde, antosiyanidin ve flavonlar tahıllarda, flavonoller bitkisel besinlerin çoğunda, flavononlar turunçgillerde bulunur (Tekin Yalçın, 2013).

Flavonoidlerin sınıflandırılması Çizelge 2.7’de gösterilmiştir.

Çizelge 2.7. Flavonoidlerin sınıflandırılması (Atınç & Kalkan, 2018)

| Sınıf | Flavonoid | Gıda Kaynağı |
|----------------------|--|--|
| Flavanol | Kateşin, Epikateşin, Epigallokateşin | Çay, çikolata ve meyve çeşitleri |
| İzoflavon | Genistin, Daidzin | Soya fasulyesi |
| Antosiyanidin | Apigeninidin, Siyanidin | Kiraz, çilek ve dutsu meyveler |
| Flavanol | Tamariksetin, Kaemprefol, Kuersetin, Mirisetin | Kırmızı şarap, zeytinyağı, dutsu meyveler, greyfurt, soğan |
| Flavon | Krisin, Rutin, Luteolin, Luteolin glukozit, Apigenin | Donates, kırmızı şarap, karabuğday ve meyve çeşitleri |
| Flavanon | Hesperidin, Naringin, Naringenin, Taksifolin | Turunçgiller |

2.3.3. Flavonoid Olmayan Fenolik Bileşikler

Flavonoid özellik göstermeyen fenolik bileşikler şunlardır:

- Fenolik asitler
- Benzoik Asitler
- Hidroksisinnamik asitler
- Hidrolize Tanenler
- Ligninler

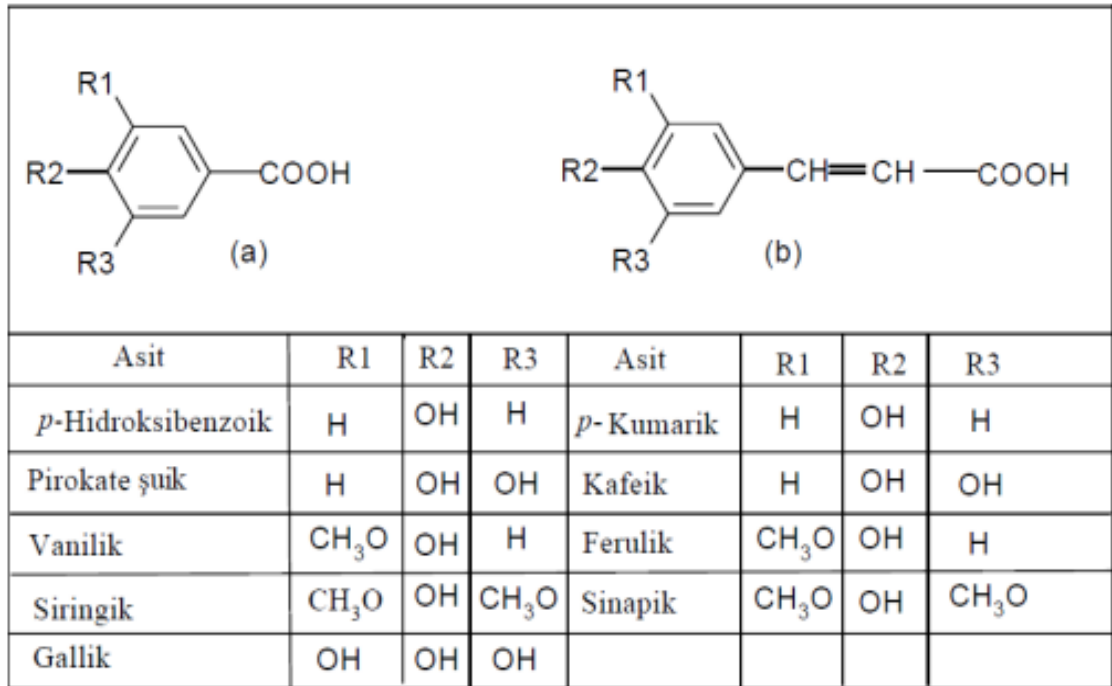
2.3.3.1. Fenolik Asitler

Fenol bileşimine asit grubu bağlanmasıyla oluşan bileşiklerdir. Benzoik asit ve hidroksisinnamik asitler de bu gruba dahil edilebilir.

Benzoik asitler gıdalarda eser miktarda bulunmakla birlikte, yüksek oranda bulunanları arasında salisilik, m- hidroksi benzoik, gallik ve vanilik asitler sayılabilir.

Hidroksisinnamik asitler fenil propan yapısındaki asitlerdir. Gıdalarda yüksek oranda bulunanları ferulik, kafeik, o-kumarik ve p-kumarik asitlerdir.

Hidroksibenzoik ve hidroksisinnamik asitlerin yapıları Şekil 2.3'te verilmiştir.

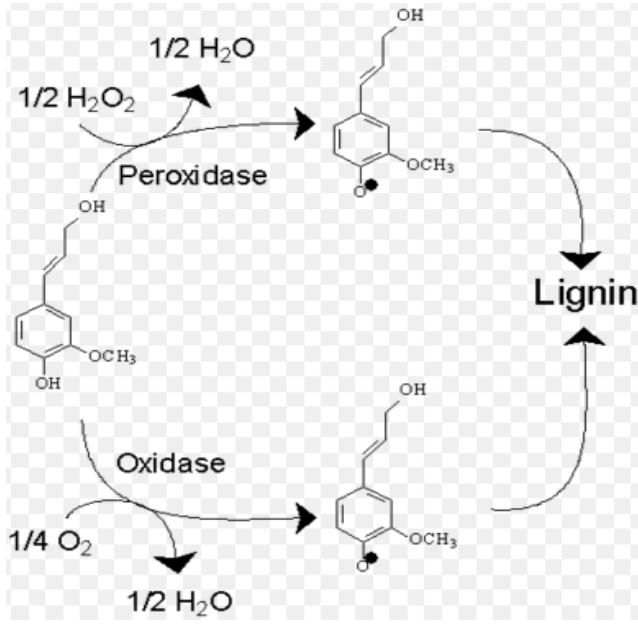


Şekil 2.3. Hidroksibenzoik ve hidroksisinnamik asitlerin yapıları (Okcu, Güneş Altunbaş, & Ayhan, 2011)

2.3.3.2. Ligninler

Fenil propan türevi bileşiklerdir. Hücre çeperinde selüloz misellerin arasını doldururlar. Dokuda odunlaşma meydana getirdiklerinden odun özü olarak da bilinirler.

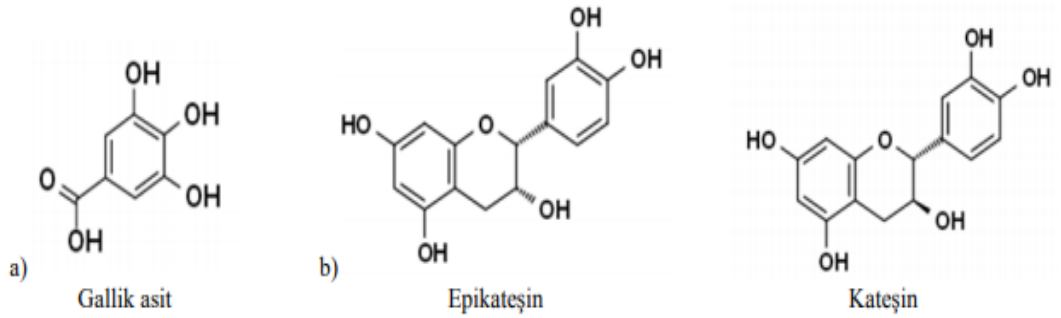
Ligninlerin biyosentezine ait döngü Şekil 2.4'te verilmiştir.



Şekil 2.4. Lignin biyosentezi (Lignin, 2019)

2.3.3.3. Hidrolize Tanenler

Polifenolik yapıya sahip, fenolik asitlerin azot içermeyen esterleridir. Hidrolize ve kondanse tanenlerin yapıları Şekil 2.5'te verilmiştir.



Şekil 2.5. Hidrolize olabilen tanenlerin (a) ve kondanse tanenlerin (b) molekül yapıları (Ünver, Ağma Okur, Tahtabiçen, Kara, & Şamlı, 2014)

BÖLÜM 3

3. KULLANILAN MATERYAL VE YÖNTEMLER

3.1. Materyal

Yapılan tüm analizlerde yararlanılan karadut örnekleri, Tekirdağ ilindeki dut ağaçlarından haziran ayında toplanarak elde edilmiştir. Toplanan karadutların bir kısmı kurutulurken, bir kısmı uygun çözücülerde çözülüp, eppendorflara konularak buzdolabında liyofilize halde bekletildi. Toplanan meyvenin yaprakları da uygun koşullarda antioksidan aktivitelerine bakılmak üzere muhafaza edildi.

Yapılan çalışmalar sırasında kullanılacak tüm çözeltiler, deney esnasında hazırlanarak, bekletilmeden kullanılmıştır.

3.1.1. Karadut

Karadut (*Morus nigra* L.) Asya kökenli bir meyvedir (Şekil 3.1). Yetiştikleri ağaçlar çok yıllık olup boyları 10-15 m, yaprak boyu 6-12 cm kadardır (Meral & Doğan, 2012).

Karadut meyve ve yapraklarından (Şekil 3.2) reçel, şurup, marmelat ve çay yapılabildiği gibi, meyveler kurutularak da tüketilmektedir.



Şekil 3.1. Karadut



Şekil 3.2. Karadut meyve ve yaprakları

3.1.2. Karadut Meyvesinin Antioksidan Aktivitesi

Karadut çeşitli mineral ve vitaminlerce zengin olup, enerji verici gıdalar arasında yer alır. Fenolik madde içeriği oldukça yüksektir. Ayrıca esansiyel yağ asitleri de içerir. Bu sağlıklı yağ asitleri hücre zarı ve hormon yapısına katılırken, sinir sisteminin fonksiyonlarını daha etkili biçimde yerine getirebilmesi için de faydalıdır.

Karadut meyvesinin canlı sağlığı üzerinde pek çok olumlu etkileri bulunmaktadır. Meyvelerinden hazırlanan şurup boğaz hastalıklarını ve ağız lezyonlarını iyileştirici etkiye sahipken, ağaç kabukları idrar söktürücü ve bağırsak parazitleri düşürücü etkiye sahiptir. Yaprakları ise kan şekerini düşürücü özellik gösterdiğinden şeker hastalıklarının tedavisinde etkilidir. Karadut meyvesi aynı zamanda iştah açıcı etkiye de sahiptir. Bağırsak alıştırıcıdır. Kalp damar sağlığı üzerinde oldukça etkilidir. (Yiğit, Yiğit, zgen, & Aktaş, 2007)

Karadutun antikanser, antimikrobiyal, antidiabetik, antienflamatuar ve antioksidan etkisi vardır (Chen, ve diğerleri, 2016). İçerdiği fenolik bileşiklerin ve özellikle antosiyaninlerin varlığı antioksidatif özelliğini pekiştirir.

Karadut flavonoller olarak rutin, kuarsetin; fenolik asitler olarak p- hidroksi benzoik, p-kumarik, gallik, vanilik asitler; flavon olarak apigenin; flavonon olarak naringenin; antosiyanin olarak siyanidin ve pelargonidin türevleri; stilben olarak resveratrol içerir. Bunların yanı sıra yapılarında daha çeşitli fenolik bileşikler de mevcuttur (Tokuşoğlu, 2017).

3.2. Kullanılan Cihazlar

- Spektrofotometre (Shimadzu UV-1601)
- pH metre
- Mutfak robotu (ev tipi)
- Hassas Terazı (Gec Avery)
- Rotary Evoparatr (Buchi R-200)
- Mikropipet (200 µl-1000 µl Eppendorff)
- Vortex
- Liyofilizatör (Lyophilizer VirTis SP SCIENTIFIC Sentry 2.0)
- Çalkalamalı su banyosu
- Santrifüj (MSE Mistral 2000)

3.3. Kullanılan Çözeltiler

- % 2'lik Na_2CO_3 çözeltisi
- Folin-Ciocalteu reaktifi
- % 5'lik NaNO_2 çözeltisi
- % 10'luk $\text{Al}(\text{NO}_3)_3 \cdot 9\text{H}_2\text{O}$ çözeltisi
- % 4,3'lük NaOH çözeltisi
- 0,1 M fosfat tamponu (pH=7,4)
- 40 mM H_2O_2 çözeltisi
- 0,2 M fosfat tamponu (pH=6,6)
- 1 mM DPPH çözeltisi
- 0,1 mM DPPH çözeltisi
- % 1'lik $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ çözeltisi
- %10'luk TCA çözeltisi
- % 0,1'lik FeCl_3 çözeltisi
- 2 mM FeCl_2 çözeltisi
- 5 mM Ferrozin çözeltisi
- 156 μM NBT çözeltisi
- 468 μM NADH çözeltisi
- 60 μM PMS çözeltisi
- 4 mM $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24}$ çözeltisi
- 28 mM Na_3PO_4 çözeltisi
- 0,6 M H_2SO_4 çözeltisi
- % 80'lik aseton çözeltisi
- 7mM ABTS çözeltisi
- %4'lük vanilin-metanol çözeltisi
- 0,04 M fosfat tamponu (pH=7)
- Linoleik asit emülsiyonu
- %30'luk NH_4SCN çözeltisi
- 20 mM FeCl_2 çözeltisi
- % 3,5'lük HCl çözeltisi
- 0,04 M fosfat tamponu (pH=7)

- % 75'lik etanol çözeltisi
- Belirteç çözeltisi: Eşit miktarlarda alınan $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24}$, Na_3PO_4 , H_2SO_4 çözeltilerinin karıştırılmasıyla hazırlandı.

3.4. Uygulanan Yöntemler

3.4.1. Ekstraktların Hazırlanması

Uygun ortam ve sıcaklıkta kurutulan karadut örnekleri mutfak robotundan geçirildi. Çözücü olarak aseton, metanol ve su kullanılarak ekstraktları hazırlandı. Aynı şekilde kurutulmuş yapraklarına da aynı işlemler uygulandı.

Ekstrakt hazırlama işleminde 25'er gram dut ve yaprak örnekleri 500'er mL çözücü eklenerek karıştırıldı ve 25 °C'de su banyosunda 300 rpm'de 180 dk inkübe edildi. Bu süre sonunda örnekler süzüldü ve çözücüler 40 °C'de evaporatörde uçuruldu. Su ile hazırlanan ekstraktın süzüntüsü liyofilize edildi.

Yapılan işlemler öncesi ve sonrası tartım alındı.

Çözücüsü uçurulmuş ekstraktlar (meyve ve yaprağın çözücü ve su ekstraktları), 0,01 gramlık porsiyonlara ayrılarak eppendorflara konuldu ve analiz işlemlerinde kullanılmak üzere derin dondurucuda saklandı.

3.4.2. Fenolik Bileşen İçeriğinin Belirlenmesi

Örneklerin 1 mL'de 1000 µg derişimli aseton ve metanol ile hazırlanmış ekstraktlarının 1'er mL'sine destile su eklenerek 46 mL'ye tamamlandı. Sonrasında 1 mL folin belirteci ilave edildi ve birkaç dk sonra % 2'lik Na_2CO_3 çözeltisinden 3 mL eklenerek oluşan çözelti 250 rpm'de 2 saat çalkalamalı su banyosunda inkübe edildi. 760 nm'de şahit çözeltiye karşı absorbanslar ölçüldü.

Derişimi 50-250 µg/mL arasında değişen standart olarak kullanılan gallik asit ve pirogallol çözeltilerine de aynı işlemler uygulandı. Meyve ve yaprak ekstraktlarının

fenolik madde miktarları derişime karşı çizilen absorbans grafiğinden mg olarak belirlendi.

3.4.3. Flavonoid Bileşen İçeriğinin Belirlenmesi

Meyve ve yaprakların 1 mL’de 1 mg derişimli su, metanol ve aseton ile hazırlanan ekstraktlardan 10 mL alındı. Üzerine % 5’lik NaNO₂ çözeltisi eklenerek kısa bir süre inkübe edildi. Bu süre sonunda flavonoid alüminyum kompleksi oluşturabilmek için çözeltiye 1 mL %10’luk Al(NO₃)₃ çözeltisinden ilave edildi. 6 dk daha bekledikten sonra % 4,3’lük NaOH çözeltisinden 10 mL kadar ekleme yapıp hacim destile suyla 25 mL’ye tamamlandı. 15 dk sonra oluşan çözelti karıştırılıp 510 nm’de absorbans ölçümü yapıldı.

Derişimi 50-250 µg/mL aralığında değişen standart olarak kullanılan gallik asit ve epikateşin çözeltilerine de aynı işlemler uygulandı. Örneklerin flavonoid madde miktarları derişime karşı çizilen absorbans grafiğinden mg olarak belirlendi.

3.4.4. Metal İyonları ile Şelat Oluşturma Aktivitesinin Belirlenmesi

50-250 µg/mL arasında değişen derişimlerde karadut ekstraktları ve standart çözeltiler hazırlandı. 0,4 mL ekstrakt üzerine 2mM 0,05 mL FeCl₂ ve 5 mM 0,2 mL ferrozin çözeltisinin ilavesiyle reaksiyonun başlaması sağlandı. Karışımın hacmi etanolle 4 mL’ye tamamlandı. Oluşan karışım vortexle karıştırıldı, 10 dk 25 °C’de inkübe edildi. Bu sürenin sonunda 562 nm’de absorbans ölçümleri yapıldı.

Standart çözelti olarak bütil hidroksi toluen, EDTA, α-tokoferol çözeltileri kullanılmıştır. Hazırlanan standartlara FeCl₂ ve ferrozin çözeltileri eklendi.

$$\text{Metal şelatlama (\%)} = [(A_{\text{kontrol}} - A_{\text{örnek}}) / A_{\text{kontrol}}] \times 100$$

A_{kontrol}: kontrol çözeltisinin absorbans değeri

A_{örnek}: örnek ve standart çözeltilerin absorbans değeri

Yukarıdaki denkleme göre örnek çözeltilerin Fe⁺² iyonlarını şelatlama aktivitesi değerleri hesaplandı.

3.4.5. Süperoksit Radikali Yakalama Aktivitesinin Belirlenmesi

0,1 M (pH=7,4) fosfat tamponu içinde 156 µM 1 mL NBT çözeltisi, 0,1 M (pH=7,4) fosfat tamponu içinde 468 µM 1 mL NADH çözeltisi ve 1 mL karadut ekstraktı karıştırıldı. Karışıma 0,1 M (pH=7,4) fosfat tamponu içinde 60 µM 100 µL PMS çözeltisi eklenip, 25 °C’de 5 dk bekletildi. 360 nm’de absorbansı ölçüldü.

Standart çözelti olarak bütil hidroksi anisol, bütil hidroksi toluen ve α tokoferol çözeltileri kullanılmıştır.

Kontrol çözeltisine ekstrakt yerine 1 mL su eklendi.

Ekstrakt ve standartların aşağıdaki eşitlikten faydalanarak % inhibisyon değerleri bulundu.

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

A_{kontrol} : kontrol çözeltisinin absorbans değeri

$A_{\text{örnek}}$: örnek ve standart çözeltilerin absorbans değeri

Bu deneyde okunan düşük absorbans değerlerinin nedeni süperoksit radikalının giderilmesidir.

3.4.6. İndirgeme Kapasitesinin Belirlenmesi

1 mL karadut ekstraktına 2,5 mL (pH=6.6) 0,2 M fosfat tamponu ve % 1’lik 2,5 mL $K_3Fe(CN)_6$ çözeltisinden ilave edildi. Oluşan karışım 50 °C sıcaklıkta 20 dk kadar inkübe edilip, üzerine 2,5 mL % 10’luk TCA çözeltisi ilave edildi ve 2000 rpm’de 10 dk santrifüj edildi. Bu işlemten sonra karışımın üstünden 2,5 mL alınıp, üzerine 2,5 mL destile su, 0,5 mL % 0,1’lik $FeCl_3$ çözeltisi eklenip, 700 nm’de absorbansı ölçüldü.

Standart çözelti olarak bütil hidroksi anisol, bütil hidroksi toluen, askorbik asit ve α-tokoferol çözeltileri kullanılmıştır.

3.4.7. ABTS Denemesi

ABTS radikali, suda hazırlanmış 7 mM derişimli ABTS ve 2,45 mM derişimli $K_2S_2O_8$ çözeltileri arasında gerçekleştirilen tepkimeyle oluşturuldu ve 12 saat 25 °C’de, ışıksız ortamda bekletildi. Bu süre sonunda 0,1 M (pH=7,4) fosfat tamponuyla absorbansları 734 nm’de $0,7\pm 0,025$ olacak şekilde seyreltme yapıldı.

Hazırlanan ABTS çözeltilerinden 1 mL, standartlara ve ekstraktlara, çözeltiler 3 mL olacak şekilde ilave edildi, yarım saat bekletilip, 734 nm’de absorbansları ölçüldü.

ABTS radikali yakalama aktiviteleri aşağıdaki denkleme göre hesaplandı.

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

A_{kontrol} : ABTS çözeltilerinin başlangıç derişimi absorbans değeri

$A_{\text{örnek}}$: örneklerde kalan ABTS derişimi absorbans değeri

3.4.8. DPPH Radikali Yakalama Aktivitesinin Belirlenmesi

Analit çözeltilerinin derişimleri 50-250 $\mu\text{g/mL}$ arasında değişen çözeltileri hazırlandı. 0,1 mM 3 mL DPPH çözeltilerine analit çözeltilerinin değişen konsantrasyonlarından 1’er mL eklenip, vortexle karıştırıldı. Oda koşullarında, ışık almayacak şekilde 30 dk bekletildi. 517 nm’de absorbansları ölçüldü.

Kontrol çözeltileri olarak bütil hidroksi tolüen, bütil hidroksi anisol ve α -tokoferol çözeltileri kullanılmıştır.

DPPH radikalini yakalama aktiviteleri aşağıdaki eşitlikten faydalanarak hesaplandı.

$$\text{DPPH radikali yakalama aktivitesi (\%)} = [(A_{\text{kontrol}} - A_{\text{örnek}}) / A_{\text{kontrol}}] \times 100$$

A_{kontrol} : kontrol çözeltilerinin absorbans değeri

$A_{\text{örnek}}$: örnek ve standart çözeltilerinin absorbans değeri

3.4.9. Toplam Antioksidan Kapasitesi Tayini

Derişimi 50-250 µg/mL arasında değişen karadut ekstraktlarının ve standart çözeltilerin 1'er mL'sine 0,04 M 1,5 mL fosfat tamponu (pH=7) ve 2,5 mL kadar linoleik asit emülsiyonu eklenip, 37 °C'de karanlıkta bekletildi. Belirli süre aralıklarıyla hazırlanan çözeltilerden 0,1 mL alınıp, üzerine 3,7 mL %7'lik etil alkol ve 0,1 mL %30'luk NH₄SCN çözeltisi ilavesinden sonra 3 dk kadar bekletilip, üzerlerine 20 mM 0,1 mL FeCl₂ çözeltisi eklenip, 5 dk daha beklendi. Hazırlanan karışımların 500 nm'de absorbans değerleri ölçümü yapıldı.

Standart çözelti olarak bütil hidroksi anisol, bütil hidroksi toluen ve α-tokoferol çözeltileri kullanılmıştır.

Çözeltilerin lipid peroksidasyonu inhibisyonu aşağıdaki eşitlikler kullanılarak hesaplandı.

$$\text{Lipid peroksidasyonu inhibisyonu (\%)} = [1 - (A_{\text{örnek}} / A_{\text{kontrol}})] \times 100$$

A_{kontrol}: kontrol çözeltisinin absorbans değeri

A_{örnek}: örnek ve standart çözeltilerin absorbans değeri

3.4.10. Yapılan Çalışmaların Değerlendirilmesi

Deneyler esnasında tüm ölçümler üçer kere yapılmış olup, standart sapma miktarları göz önünde bulundurulmuştur. Deneylere ait grafikler Excel programı kullanılarak çizilmiştir.

BÖLÜM 4

4. BULGULARIN DEĞERLENDİRİLMESİ

4.1. Ekstrakt Hazırlama

Karadut meyve ve yapraklarının aseton, metanol ve suda hazırlanan ekstraktlarının ekstraksiyon verimleri mg/g kuru örnek birimi üzerinden hesaplandı.

Hesaplanan verim değerleri aşağıda verilmiştir (Çizelge 4.1 ve Çizelge 4.2).

Çizelge 4.1. Karadut meyvesinin aseton, metanol ve su ekstraksiyonu verimi

| Karadut Meyve | | | |
|----------------------|--------|---------|-----|
| Ekstrakt | Aseton | Metanol | Su |
| Madde (g) | 25 | 25 | 25 |
| Verim (mg/g) | 275 | 287 | 473 |

Çizelge 4.2. Karadut yapraklarının aseton, metanol ve su ekstraksiyonu verimi

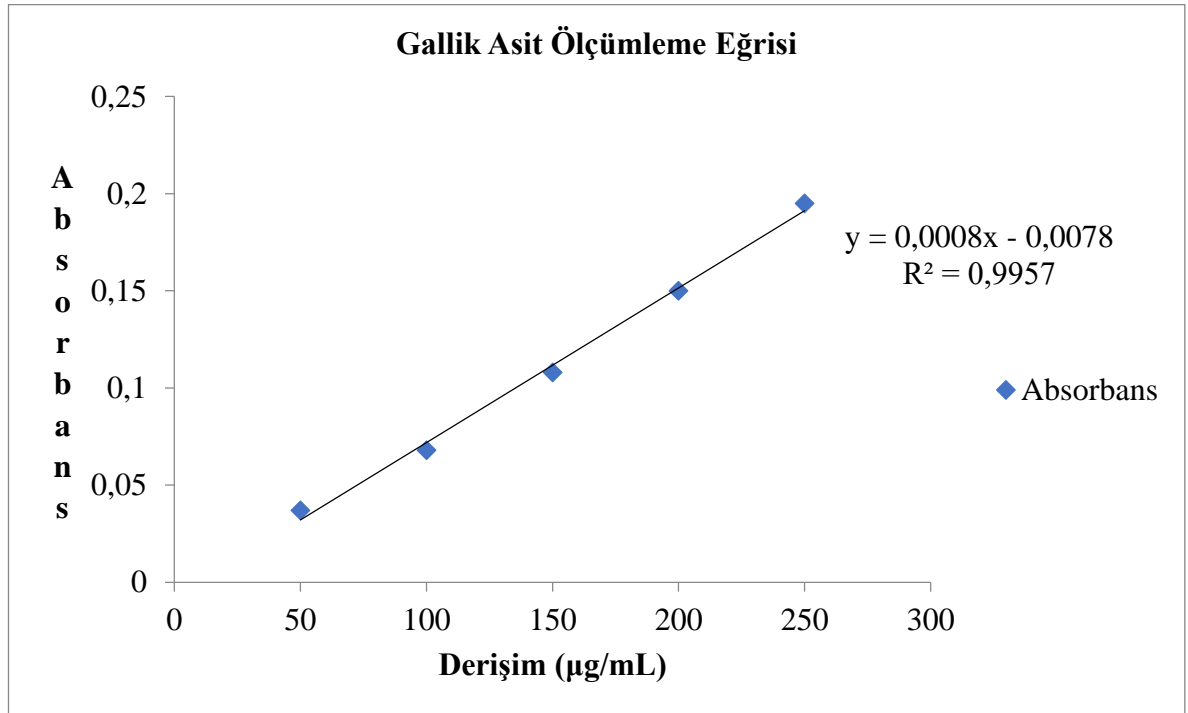
| Karadut Yaprak | | | |
|-----------------------|--------|---------|-------|
| Ekstrakt | Aseton | Metanol | Su |
| Madde (g) | 25 | 25 | 25 |
| Verim (mg/g) | 36.15 | 39.6 | 209.9 |

4.2. Fenolik Bileşen İçeriğinin Belirlenmesi

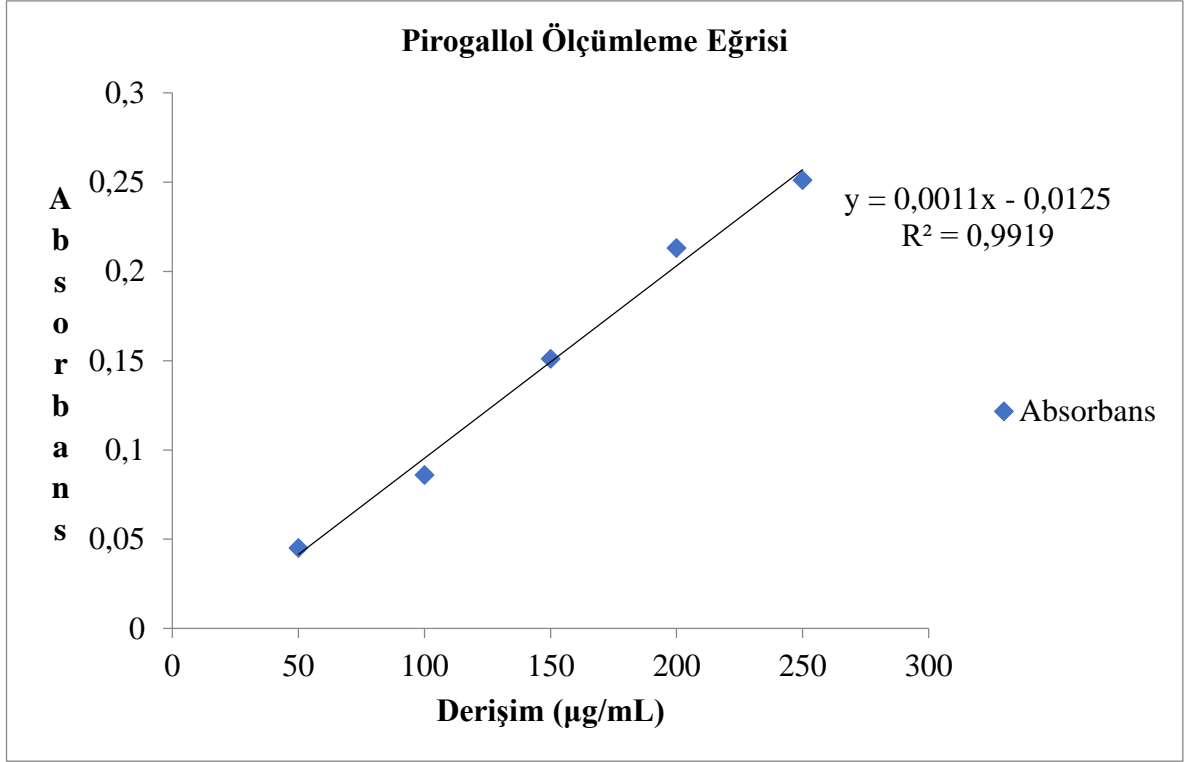
Karadut meyvesi ve yapraklarının fenolik bileşen içeriği tayini Folin-Ciocalteu reaktifi eşliğinde belirlenmiş olup, bu işlem esnasında standart çözelti olarak gallik asit ve pirogallol çözeltileri kullanılmıştır.

Gallik asit standart grafiğinde de yer alan formül kullanılarak hazırlanmış olan her bir ekstraktın fenolik madde içerik değeri gallik asit ekivalenti olarak belirlendi. Aynı şekilde pirogallol standart grafiğinde yer alan formül kullanılarak hazırlanmış her bir ekstraktın fenolik madde içerik değeri pirogallol ekivalenti olarak belirlendi.

Gallik asit ve pirogallol standart çözeltilerinin eğrileri Şekil 4.1 ve Şekil 4.2’de verilmiştir.



Şekil 4.1. Gallik asit standardı grafiği



Şekil 4.2. Pirogallol standardı grafiği

Karadut meyve ve yaprak ekstraktlarının gallik asit ve pirogallol eşdeğerli fenolik madde içerikleri sırası ile Çizelge 4.3 ve Çizelge 4.4'te yer almaktadır.

Çizelge 4.3. Karadut ekstraktlarının gallik asit eşdeğerli fenolik bileşen içeriği

| EKSTRAKT | İÇERİK (µg/g) |
|-----------------|---------------|
| Yaprak-Su | 78,271 |
| Yaprak-Metanol | 83,557 |
| Yaprak-Aseton | 102,378 |
| Karadut-Su | 85,641 |
| Karadut-Metanol | 98,341 |
| Karadut-Aseton | 118,317 |

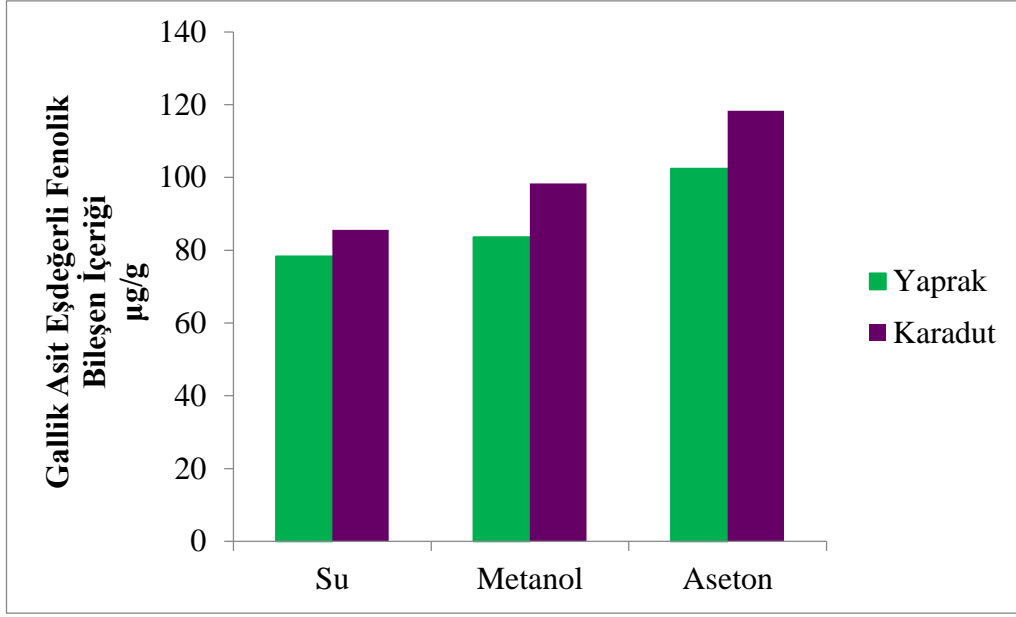
Çizelge 4.4. Karadut ekstraktlarının pirogallol eşdeğerli fenolik bileşen içeriği

| EKSTRAKT | İÇERİK (µg/g) |
|-----------------|---------------|
| Yaprak-Su | 74,361 |
| Yaprak-Metanol | 76,734 |
| Yaprak-Aseton | 110,023 |
| Karadut-Su | 81,079 |
| Karadut-Metanol | 99,831 |
| Karadut-Aseton | 123,871 |

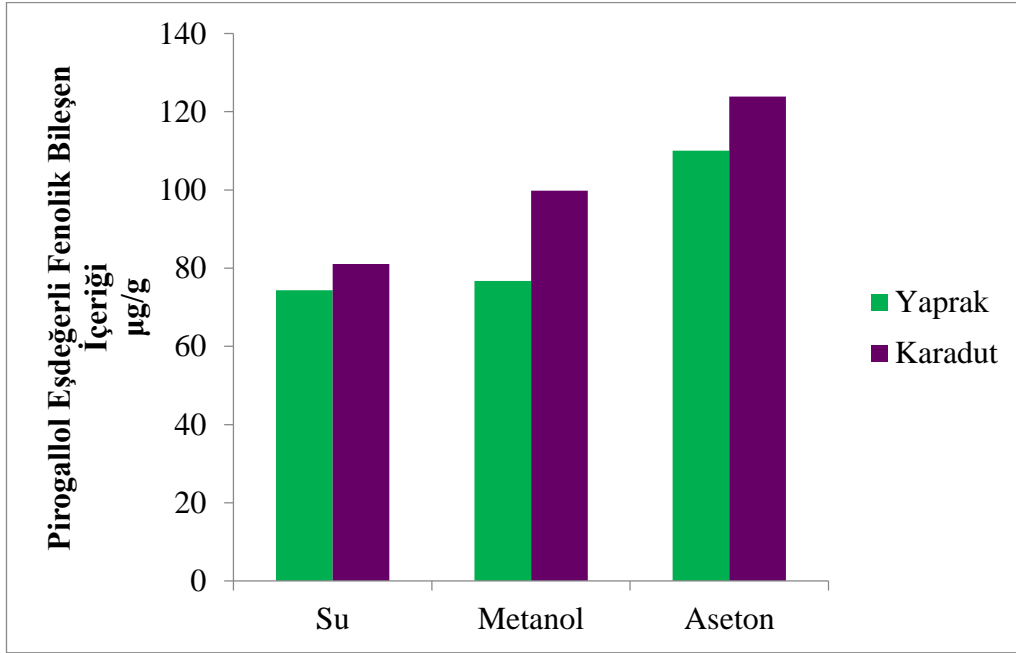
Karadut meyve ve yapraklarının fenolik bileşen içeriği gallik asit ve pirogallol standart grafikleri baz alınarak belirlenmiştir.

Hazırlanmış ekstraktlardan fenolik bileşen içeriğinin en yüksek olan ekstrakt aseton kullanılarak hazırlanmış olmaktadır. Bunu takip eden metanol kullanılarak hazırlanmış ekstrakt olup, çözücü olarak su kullanılan ekstraktlarda fenolik bileşen miktarı değeri diğerlerine oranla daha az olarak belirlenmiştir.

Gallik asit ve pirogallol çözeltileri ekivalent alınarak bulunan karadut meyve ve yapraklarının fenolik bileşen içeriği Şekil 4.3 ve Şekil 4.4'te verilmiştir.



Şekil 4.3. Karadut meyve ve yapraklarının gallik asit eşdeğerli fenolik bileşen içeriği

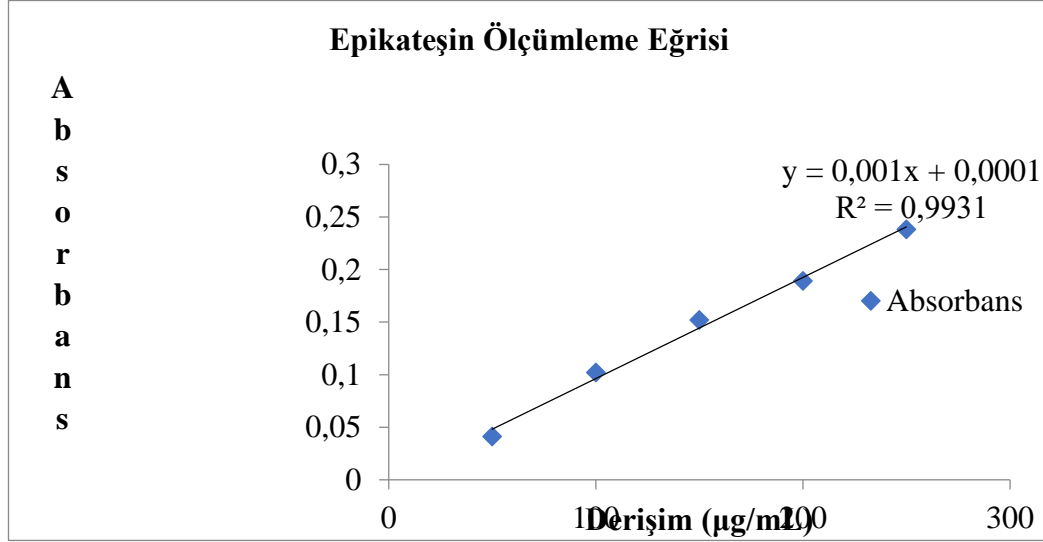


Şekil 4.4. Karadut meyve ve yapraklarının pirogallol eşdeğerli fenolik bileşen içeriği

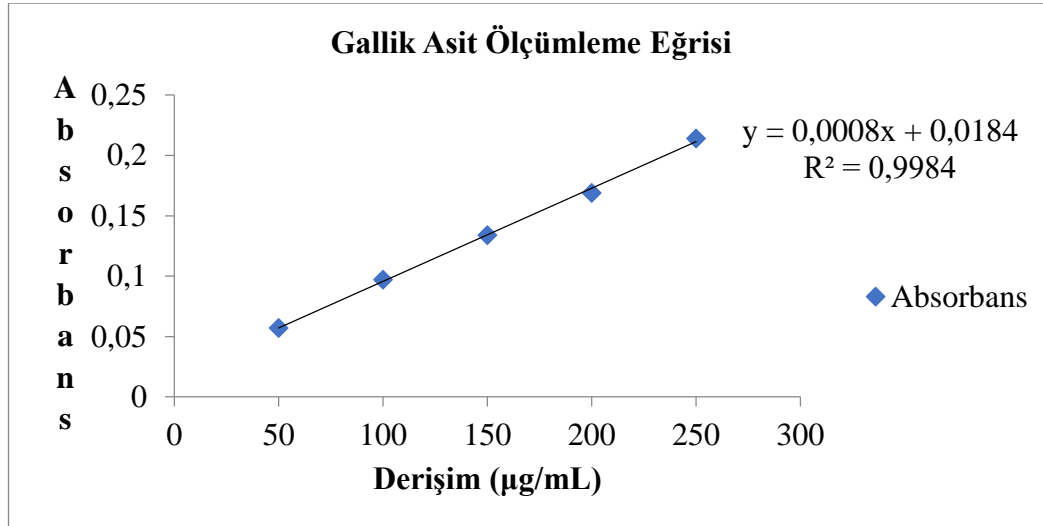
4.3. Flavonoid Bileşen İçeriğinin Belirlenmesi

Karadut meyve ve yapraklarının flavonoid bileşen içeriği epikateşin ve gallik asit standart çözeltileri kullanılarak belirlendi.

Epikateşin ve gallik asit çözeltileri ile hazırlanmış grafikler aşağıdadır (Şekil 4.5 ve Şekil 4.6).



Şekil 4.5. Epikateşin standardı grafiği



Şekil 4.6. Gallik asit standardı grafiği

Karadut meyve ve yaprak ekstraktlarının epikateşin ve gallik asit eşdeğerli fenolik bileşen içerikleri değerleri sırasıyla aşağıda verilmiştir (Çizelge 4.5 ve Çizelge 4.6).

Çizelge 4.5. Karadut ekstraktlarının epikateşin eşdeğerli flavonoid bileşen içeriği

| EKSTRAKT | İÇERİK (µg/g) |
|-----------------|---------------|
| Yaprak-Su | 19,871 |
| Yaprak-Metanol | 23,671 |
| Yaprak-Aseton | 23,472 |
| Karadut-Su | 30,473 |
| Karadut-Metanol | 32,279 |
| Karadut-Aseton | 32,324 |

Çizelge 4.6. Karadut ekstraktlarının gallik asit eşdeğerli flavonoid bileşen içeriği

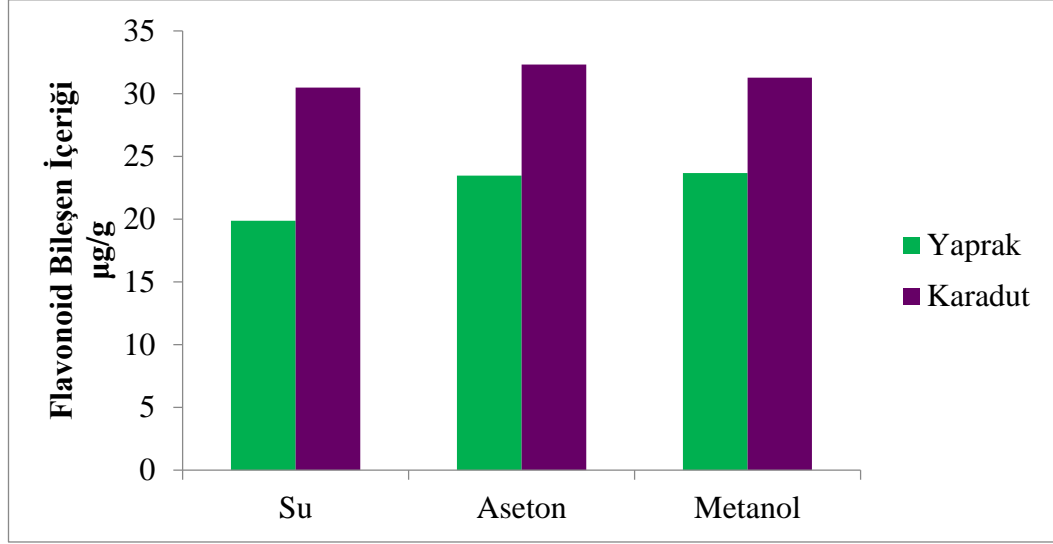
| EKSTRAKT | İÇERİK (µg/g) |
|-----------------|---------------|
| Yaprak-Su | 26,891 |
| Yaprak-Metanol | 42,317 |
| Yaprak-Aseton | 39,617 |
| Karadut-Su | 31,279 |
| Karadut-Metanol | 46,327 |
| Karadut-Aseton | 44,417 |

Karadut meyve ve yaprak örneklerinin flavonoid bileşen içeriği epikateşin ve gallik asit çözeltileri standart grafikleri baz alınarak belirlenmiştir.

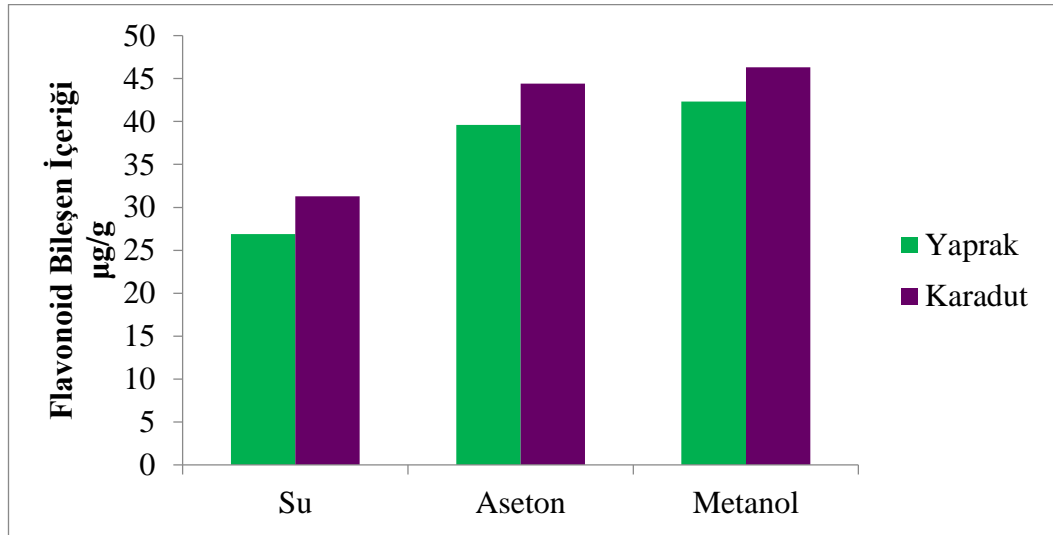
Hazırlanmış örneklerin flavonoid bileşen içeriğinin ortalama olarak en yüksek çıktıkları ekstrakt metanol kullanılarak hazırlanmış olmaktadır. Bunu takip eden asetona

kullanılarak hazırlanmış ekstrakt olup, çözücü olarak su kullanılan ekstraktlarda flavonoid bileşen içeriği değeri diğerlerine oranla daha az olarak belirlenmiştir.

Epikateşin ve gallik asit çözeltileri ekivalent alınarak bulunan karadut meyve ve yapraklarının toplam fenolik madde içeriği Şekil 4.7 ve Şekil 4.8’de verilmiştir.



Şekil 4.7. Karadut meyve ve yapraklarının epikateşin eşdeğerli flavonoid bileşen içerikleri



Şekil 4.8. Karadut meyve ve yapraklarının gallik asit eşdeğerli flavonoid bileşen içerikleri

4.4. Metal İyonları ile Şelat Oluşturma Aktivitesinin Belirlenmesi

Yapılan bu analizde standart çözelti olarak bütül hidroksi toluen, EDTA, α -tokoferol çözeltileri kullanıldı.

50-250 $\mu\text{g/mL}$ arasında değişen derişimlerde hazırlanan örnek ekstraktlarının Fe^{+2} iyonlarını şelatlama aktiviteleri belirlendi. Bu değerler aşağıdaki çizelgelerde verilmiştir (Çizelge 4.7 ve Çizelge 4.8).

Çizelge 4.7. Standart çözeltilerin Fe^{+2} iyonu ile şelat oluşturma aktivitesi % değerleri

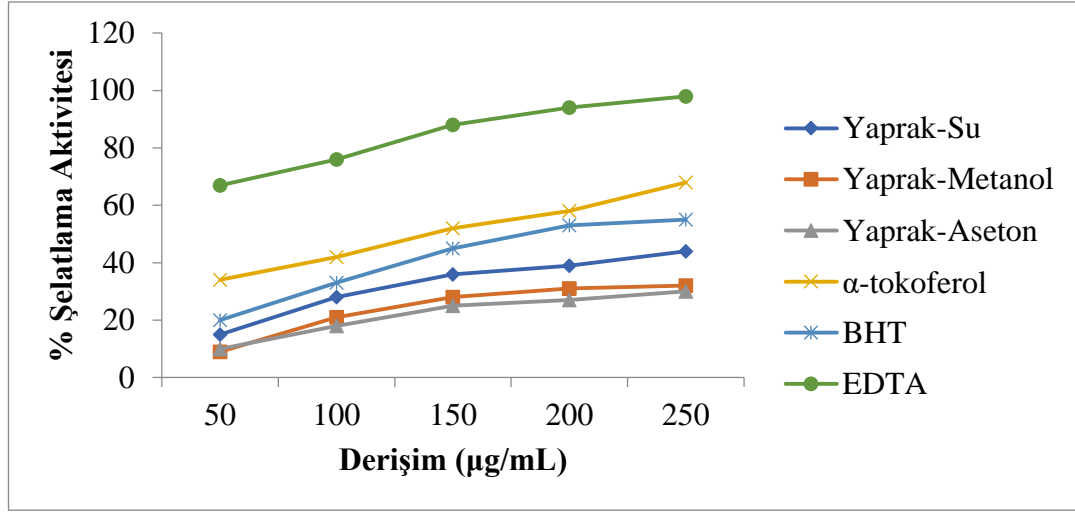
| | ($\mu\text{g/mL}$) | | | | |
|---------------------|--------------------------------------|------------|------------|------------|------------|
| Standart | 50 | 100 | 150 | 200 | 250 |
| EDTA | 67 | 76 | 88 | 94 | 98 |
| α -tokoferol | 34 | 42 | 52 | 58 | 68 |
| BHT | 20 | 33 | 45 | 53 | 55 |

Çizelge 4.8. Karadut meyve ve yapraklarının Fe^{+2} iyonu ile şelat oluşturma aktivitesi % değerleri

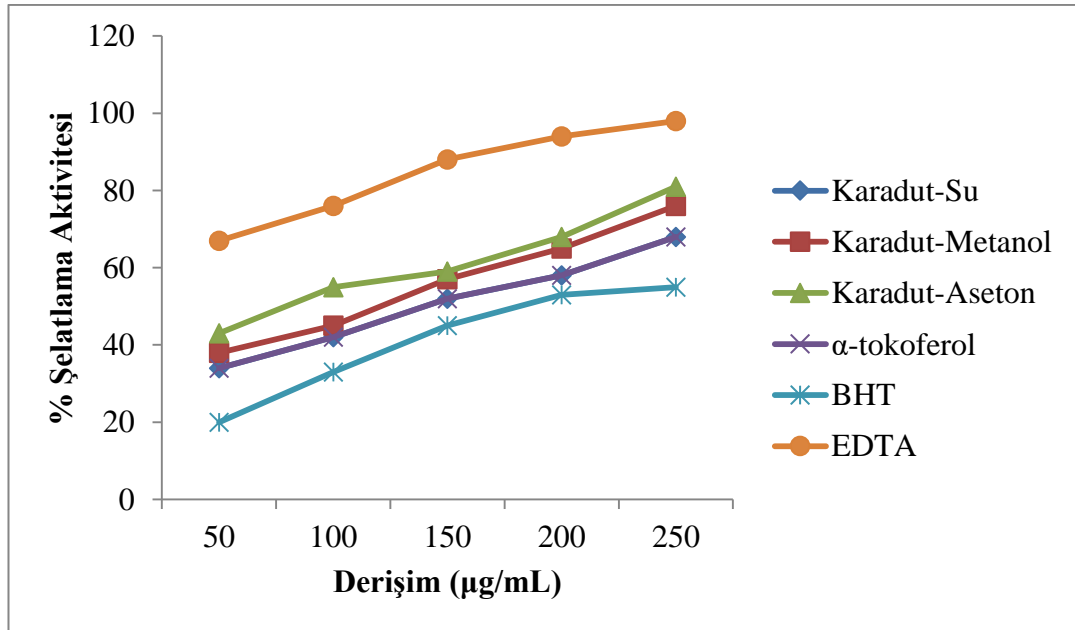
| | ($\mu\text{g/mL}$) | | | | |
|-----------------|--------------------------------------|------------|------------|------------|------------|
| Ekstrakt | 50 | 100 | 150 | 200 | 250 |
| Yaprak-Su | 15 | 28 | 36 | 39 | 44 |
| Yaprak-Metanol | 9 | 21 | 28 | 31 | 32 |
| Yaprak-Aseton | 10 | 18 | 25 | 27 | 30 |
| Karadut-Su | 34 | 40 | 51 | 56 | 70 |
| Karadut-Metanol | 38 | 45 | 57 | 65 | 76 |
| Karadut-Aseton | 43 | 55 | 59 | 68 | 81 |

Hazırlanmış örneklerde karadut meyvesinin en yüksek metal şelatlama aktivitesinin aseton ekstraktında; yapraklarının ise en yüksek metal şelatlama aktivitesinin su ile hazırlanmış ekstraktlarında olduğu görülmektedir.

Karadut yaprak ve meyve ekstraktlarının Fe^{+2} iyonu ile şelat oluşturma aktivitesi sırasıyla aşağıda gösterilmiştir (Şekil 4.9 ve Şekil 4.10).



Şekil 4.9. Karadut yaprağı ekstraktlarının Fe^{+2} iyonu ile şelat oluşturma aktivitesi



Şekil 4.10. Karadut meyve ekstraktlarının Fe^{+2} iyonu ile şelat oluşturma aktivitesi

4.5. Süperoksit Radikali Yakalama Aktivitesinin Belirlenmesi

Yapılan bu analizde standart çözelti olarak bütül hidroksi anisol, α -tokoferol, ve bütül hidroksi toluen çözeltileri kullanılmıştır.

50-250 $\mu\text{g/ml}$ aralığında değişen derişimlerde hazırlanan karadut ekstraktlarının süperoksit radikalleri yakalama aktiviteleri belirlendi. Değerler aşağıda verilmiştir (Çizelge 4.9 ve Çizelge 4.10).

Çizelge 4.9. Standart çözeltilerin süperoksit radikali yakalama aktivitesi % değerleri

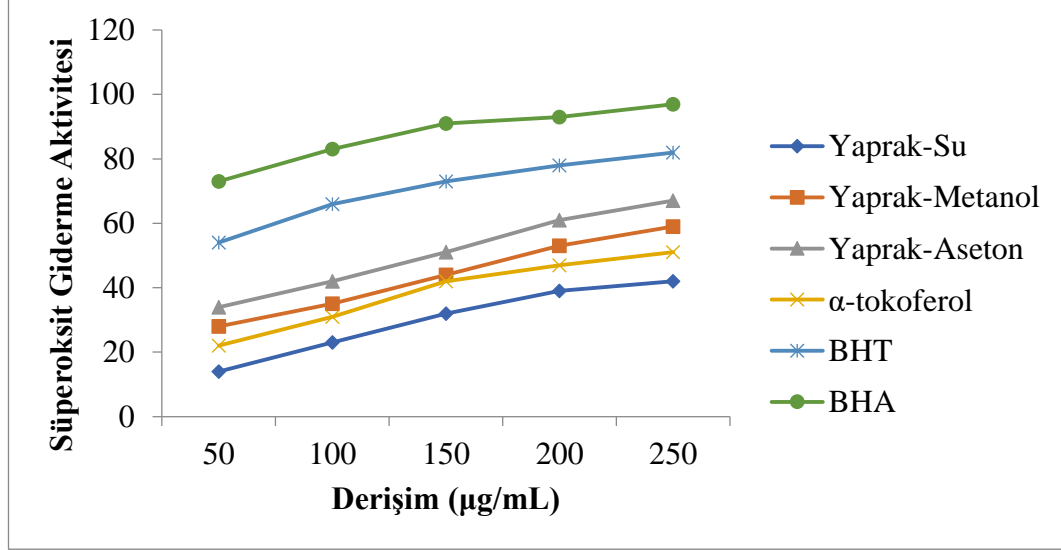
| | (µg/mL) | | | | |
|---------------------|-----------|------------|------------|------------|------------|
| Standart | 50 | 100 | 150 | 200 | 250 |
| α -tokoferol | 22 | 31 | 42 | 47 | 51 |
| BHA | 54 | 66 | 73 | 78 | 82 |
| BHT | 73 | 83 | 91 | 93 | 97 |

Çizelge 4.10. Karadut meyve ve yapraklarının süperoksit radikali yakalama aktivitesi % değerleri

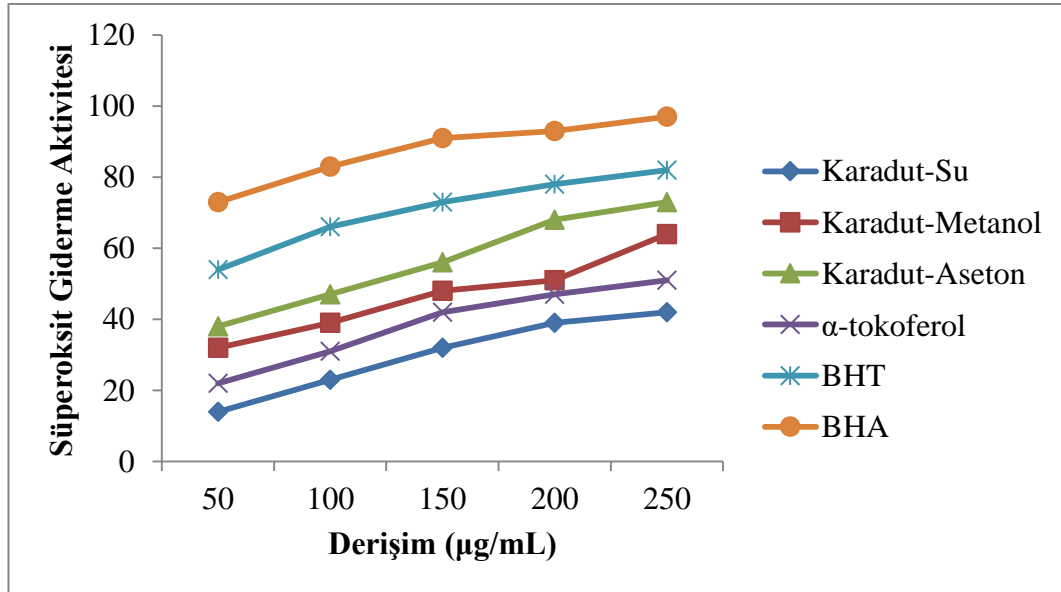
| | (µg/mL) | | | | |
|-----------------|-----------|------------|------------|------------|------------|
| Ekstrakt | 50 | 100 | 150 | 200 | 250 |
| Yaprak-Su | 14 | 23 | 32 | 39 | 42 |
| Yaprak-Metanol | 28 | 35 | 44 | 53 | 59 |
| Yaprak-Aseton | 34 | 42 | 51 | 61 | 67 |
| Karadut-Su | 14 | 23 | 32 | 39 | 42 |
| Karadut-Metanol | 32 | 39 | 48 | 51 | 64 |
| Karadut-Aseton | 38 | 47 | 56 | 68 | 73 |

Hazırlanmış ekstraktlarda süperoksit radikali yakalama aktivitesi değerinin en çok asetonlu ekstraktlarda olduğu görülmektedir. Sırasıyla metanol ve su ile hazırlanmış ekstraktlar onu takip etmektedir.

Karadut yaprak ve meyve ekstraktlarının süperoksit radikali yakalama aktiviteleri sırası ile Şekil 4.11 ve Şekil 4.12'de yer almaktadır.



Şekil 4.11. Karadut yaprağı ekstraktlarının süperoksit radikali yakalama aktivitesi



Şekil 4.12. Karadut meyve ekstraktlarının süperoksit radikali yakalama aktivitesi

4.6. İndirgeme Kapasitesinin Belirlenmesi

Analiz sırasında standart çözelti olarak bütil hidroksi anisol, bütil hidroksi toluen, α -tokoferol ve askorbik asit çözeltileri kullanılmıştır.

50-250 $\mu\text{g/mL}$ arasında değişen derişimlerde hazırlanan örnek ekstraktlarının indirgeme gücü tayin edildi. Değerler aşağıda yer alan çizelgelerde gösterilmiştir (Çizelge 4.11 ve Çizelge 4.12).

Çizelge 4.11. Standart çözeltilerin indirgeme gücü değerleri

| | ($\mu\text{g/mL}$) | | | | |
|---------------------|--------------------------------------|------------|------------|------------|------------|
| Standart | 50 | 100 | 150 | 200 | 250 |
| α -tokoferol | 0,55 | 0,61 | 0,69 | 0,69 | 0,69 |
| BHA | 0,75 | 0,83 | 0,92 | 0,95 | 0,96 |
| BHT | 0,69 | 0,89 | 0,98 | 1,03 | 1,03 |
| Askorbik Asit | 0,44 | 0,56 | 0,59 | 0,61 | 0,63 |

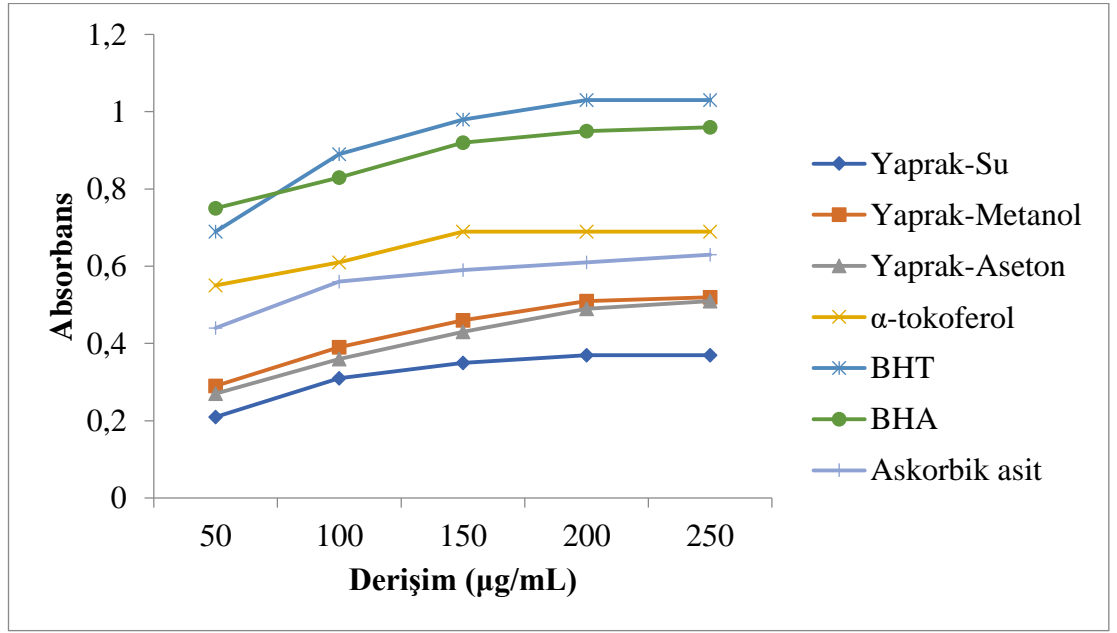
Çizelge 4.12. Karadut meyve ve yapraklarının indirgeme gücü değerleri

| | ($\mu\text{g/mL}$) | | | | |
|-----------------|--------------------------------------|------------|------------|------------|------------|
| Ekstrakt | 50 | 100 | 150 | 200 | 250 |
| Yaprak-Su | 0,21 | 0,31 | 0,35 | 0,37 | 0,37 |
| Yaprak-Metanol | 0,29 | 0,39 | 0,46 | 0,51 | 0,52 |
| Yaprak-Aseton | 0,27 | 0,36 | 0,43 | 0,49 | 0,51 |
| Karadut-Su | 0,25 | 0,35 | 0,39 | 0,41 | 0,41 |
| Karadut-Metanol | 0,33 | 0,42 | 0,48 | 0,55 | 0,56 |
| Karadut-Aseton | 0,33 | 0,4 | 0,46 | 0,52 | 0,53 |

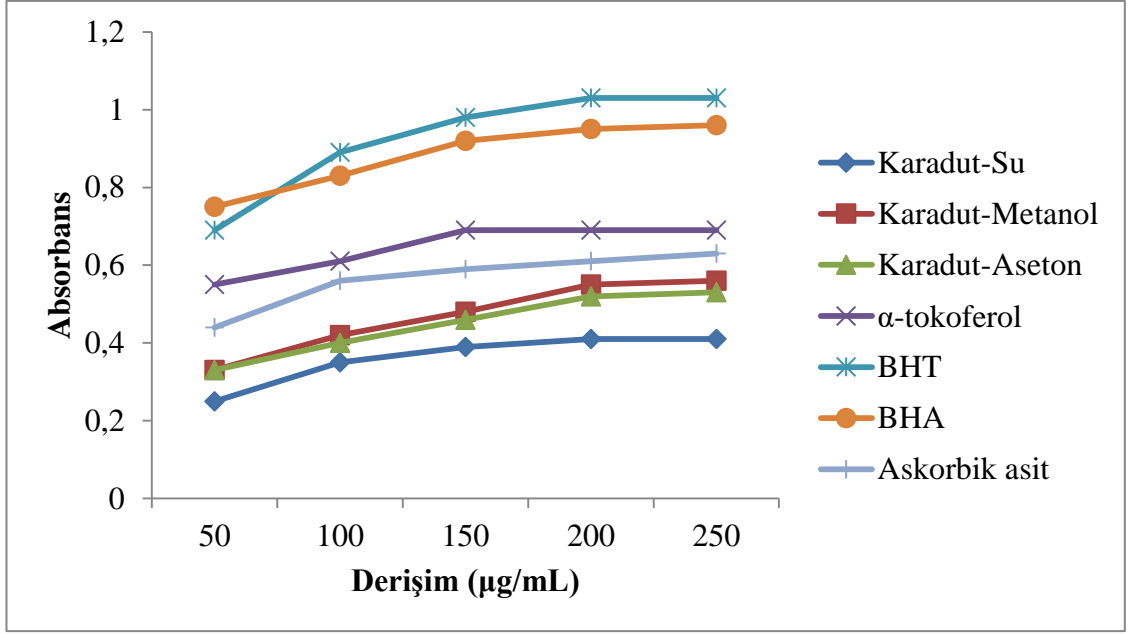
Hazırlanmış örneklerde indirgeme gücünün en yüksek çıktığı ekstrakt metanol kullanılarak hazırlanmış olandır. Sonrasında indirgeme gücü sırasıyla aseton ve su ekstraktlarında yüksek çıkmıştır.

Görüldüğü gibi artan derişimle birlikte indirgeme gücü değeri de artmaktadır. Okunan yüksek absorbans değerleri yüksek oranda indirgenmenin ölçüsüdür.

Karadut yaprak ve meyve ekstraktlarının indirgeme güçleri sırasıyla Şekil 4.13 ve Şekil 4.14'te verilmiştir.



Şekil 4.13. Karadut yaprağı ekstraktlarının indirgeme gücü



Şekil 4.14. Karadut meyve ekstraktlarının indirgeme gücü

4.7. ABTS Denemesi

Yapılan bu denemede standart çözelti olarak α-tokoferol çözeltisi kullanılmıştır. Standart çözeltinin ABTS radikali yakalama aktivitesi % değerleri Çizelge 4.13'tedir.

Çizelge 4.13. Standart çözeltideki ABTS radikali değişim değerleri (%)

| Standart | (µg/mL) | | | | |
|-------------|---------|--------|--------|--------|-------|
| | 50 | 100 | 150 | 200 | 250 |
| α-tokoferol | 60,96 | 55,253 | 50,843 | 48,379 | 47,99 |

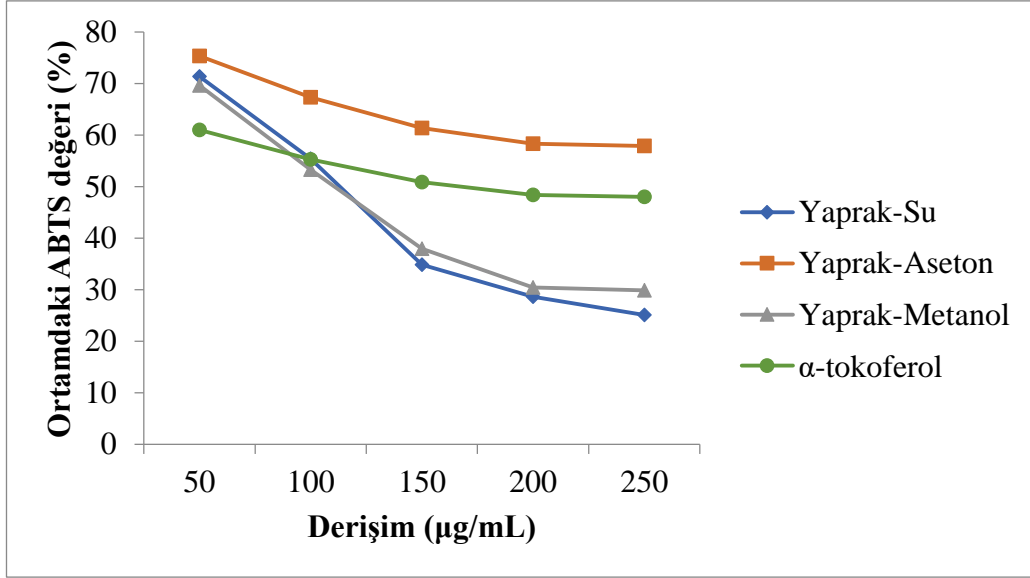
50-250 µg/mL arasında değişen derişimlerde hazırlanan analit ekstraktlarının % ABTS radikali yakalama aktiviteleri belirlendi (Çizelge 4.14).

Çizelge 4.14. Karadut meyve ve yaprak ekstraktlarındaki ABTS radikali değişim değerleri (%)

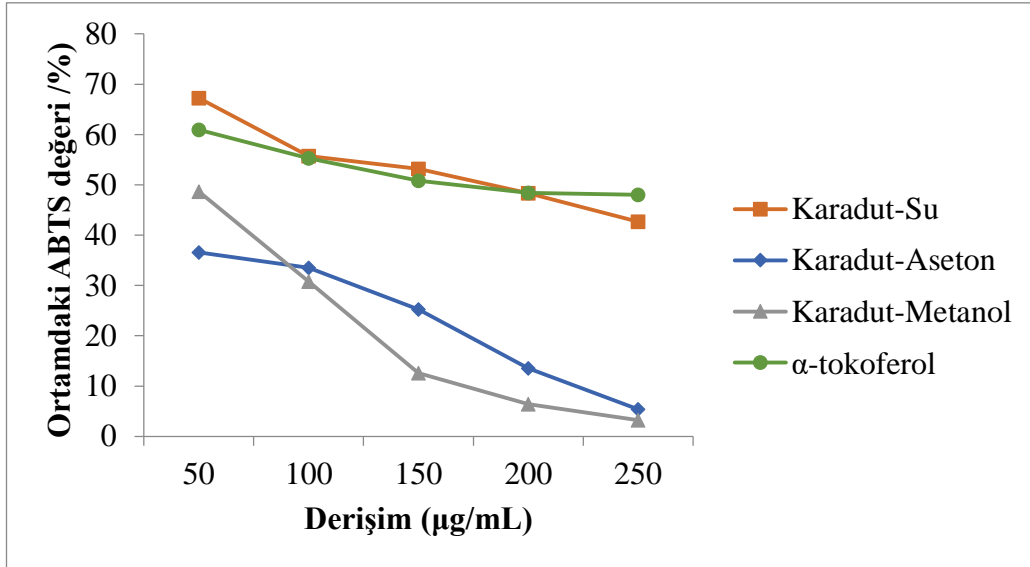
| Ekstrakt | (µg/mL) | | | | |
|-----------------|---------|--------|--------|--------|--------|
| | 50 | 100 | 150 | 200 | 250 |
| Yaprak-Su | 71,328 | 55,391 | 34,846 | 28,629 | 25,114 |
| Yaprak-Metanol | 69,637 | 53,273 | 37,973 | 30,472 | 29,899 |
| Yaprak-Aseton | 75,361 | 67,35 | 61,372 | 58,336 | 57,871 |
| Karadut-Su | 67,225 | 55,69 | 53,155 | 48,351 | 42,661 |
| Karadut-Metanol | 48,67 | 30,793 | 12,557 | 6,379 | 3,221 |
| Karadut-Aseton | 36,551 | 33,507 | 25,237 | 13,507 | 5,421 |

Karadut meyvelerinin ABTS radikali yakalama aktiviteleri metanol, aseton ve su ekstraktları sırasında azalma göstermiştir (Şekil 4.16). ABTS radikali yakalama aktivitesi en fazla olan karadutun metanol ekstraktıdır.

Karadut yapraklarının ABTS radikali yakalama aktiviteleri su, metanol ve aseton ekstraktları sırasında azalma göstermiştir (Şekil 4.15). ABTS radikali yakalama aktivitesi en yüksek olan yaprak ekstraktı su ekstraktıdır.



Şekil 4.15. Karadut yaprağı ekstraktlarının ABTS radikali yakalama aktivitesi



Şekil 4.16. Karadut meyve ekstraktlarının ABTS radikali yakalama aktivitesi

4.8. DPPH Radikali Yakalama Aktivitesinin Belirlenmesi

Yapılan bu denemede standart çözelti olarak bütül hidroksi anisol, α-tokoferol ve bütül hidroksi toluen çözeltileri kullanılmıştır.

50-250 µg/mL aralığında değişen derişimlerde hazırlanan karadut ekstraktlarının % DPPH radikali yakalama aktiviteleri belirlendi. Değerler aşağıdaki çizelgelerde verilmiştir (Çizelge 4.15 ve Çizelge 4.16).

Çizelge 4.15. Standart çözeltilerin DPPH radikali yakalama aktivitesi % değerleri

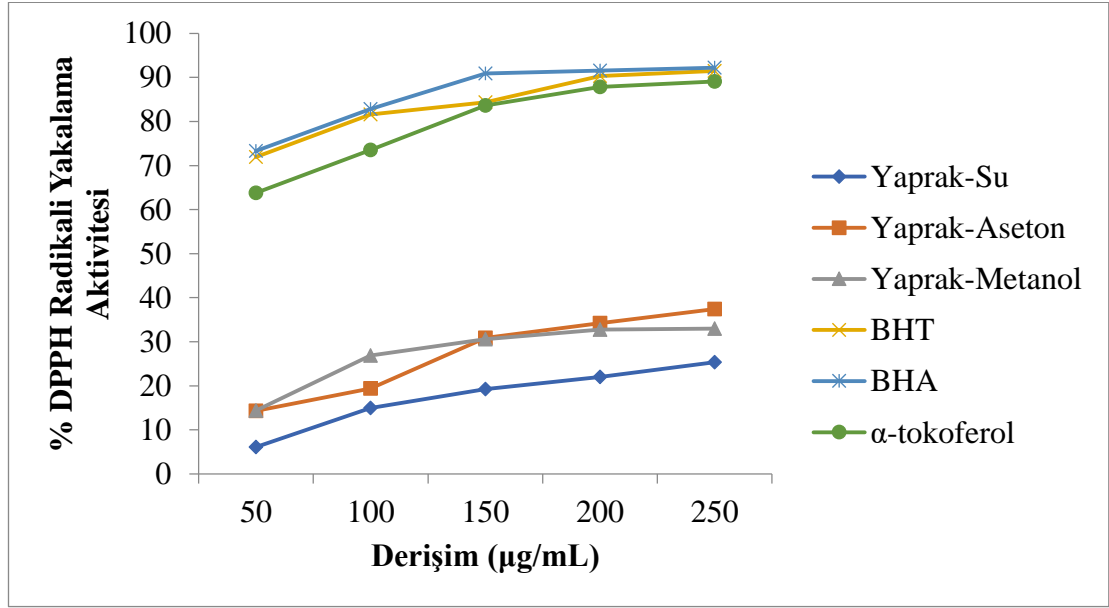
| Standart | (µg/mL) | | | | |
|-------------|---------|--------|--------|--------|--------|
| | 50 | 100 | 150 | 200 | 250 |
| α-tokoferol | 71,908 | 81,592 | 84,372 | 90,316 | 91,467 |
| BHA | 73,339 | 82,855 | 90,934 | 91,562 | 92,19 |
| BHT | 0,69 | 0,89 | 0,98 | 1,03 | 1,03 |

Çizelge 4.16. Karadut meyve ve yapraklarının DPPH radikali yakalama aktivitesi % değerleri

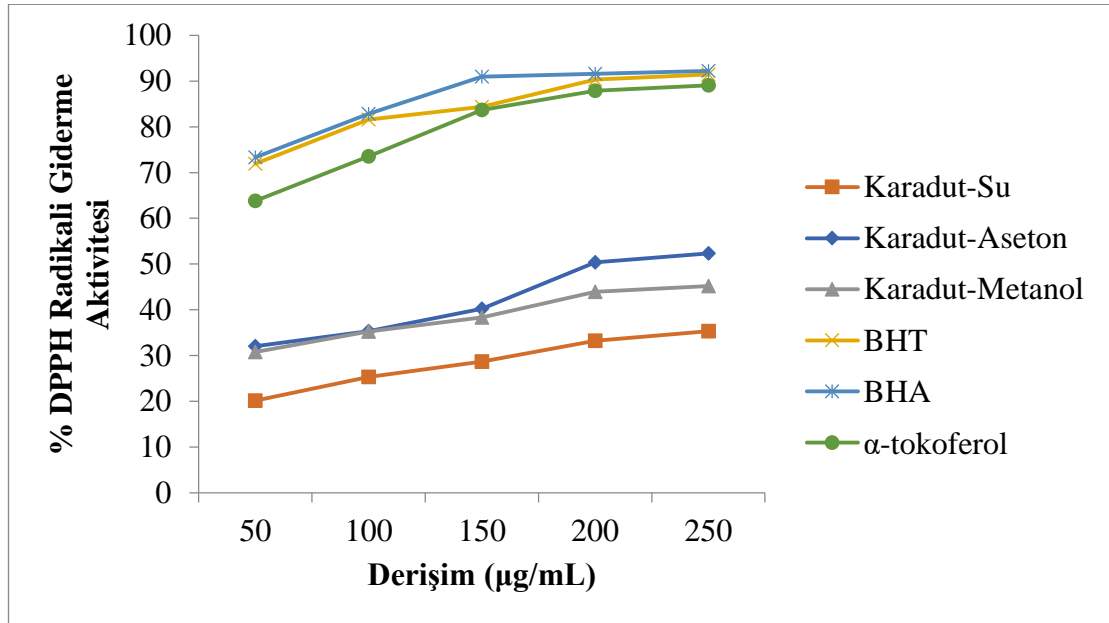
| Ekstrakt | (µg/mL) | | | | |
|-----------------|---------|--------|--------|--------|--------|
| | 50 | 100 | 150 | 200 | 250 |
| Yaprak-Su | 6,127 | 14,961 | 19,271 | 22,037 | 25,368 |
| Yaprak-Metanol | 14,397 | 26,889 | 30,617 | 32,773 | 33,012 |
| Yaprak-Aseton | 14,327 | 19,379 | 30,893 | 34,223 | 37,385 |
| Karadut-Su | 20,172 | 25,336 | 28,671 | 33,217 | 35,321 |
| Karadut-Metanol | 30,795 | 35,227 | 38,321 | 43,967 | 45,217 |
| Karadut-Aseton | 32,017 | 35,337 | 40,217 | 50,371 | 52,331 |

Karadut meyve ve yapraklarının DPPH radikali yakalama aktiviteleri oranı sırası ile aseton, metanol ve su ekstraktlarıdır. DPPH radikali yakalama aktivitesi en yüksek olan ekstraktlar aseton ekstraktlarıdır.

Karadut yaprak ve meyve ekstraktlarının DPPH radikali yakalama aktiviteleri sırasıyla aşağıda verilmiştir (Şekil 4.17 ve Şekil 4.18).



Şekil 4.17. Karadut yaprağı ekstraktlarının DPPH radikali yakalama aktivitesi



Şekil 4.18. Karadut meyve ekstraktlarının DPPH radikali yakalama aktivitesi

4.9. Toplam Antioksidan Kapasitesi Tayini

Yapılan bu denemede standart çözelti olarak bütil hidroksi anisol, α - tokoferol ve bütil hidroksi toluen çözeltileri kullanılmıştır.

50-250 $\mu\text{g/mL}$ aralığında değişen derişimlerde hazırlanan örnek ekstraktlarının lipid peroksidasyonu inhibisyonu % değerleri belirlendi. Belirlenen değerler aşağıdaki çizelgelerde yer almaktadır (Çizelge 4.17 ve Çizelge 4.18).

Çizelge 4.17. Standart çözeltilerin lipid peroksidasyonu inhibisyon değerleri (%)

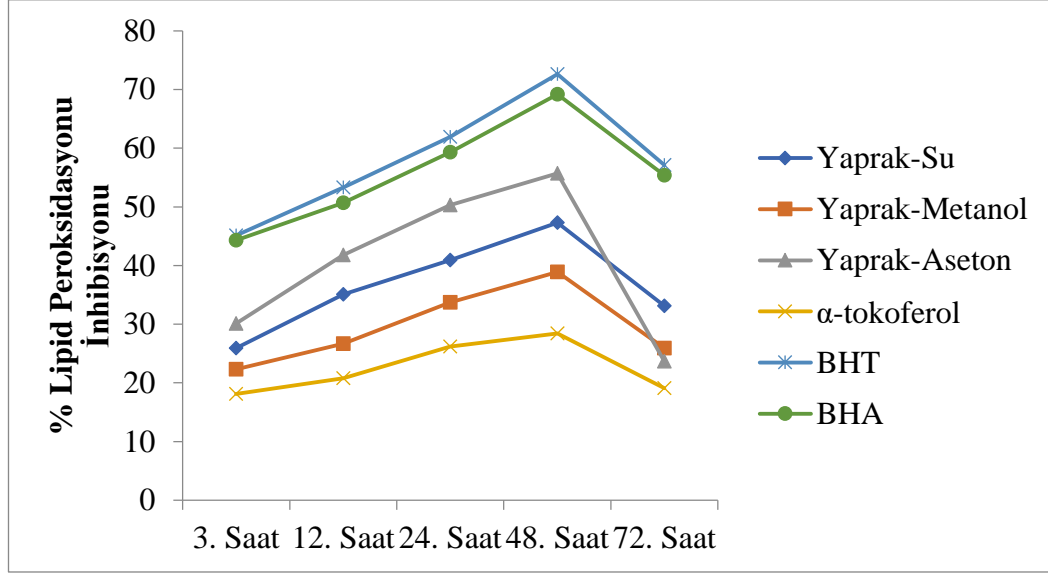
| | ($\mu\text{g/mL}$) | | | | |
|---------------------|--------------------------------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|
| Standart | 50 | 100 | 150 | 200 | 250 |
| | 3. saat | 12. saat | 24. saat | 48. saat | 72. saat |
| α -tokoferol | 18,1 | 20,8 | 26,2 | 28,4 | 19,1 |
| BHA | 44,3 | 50,7 | 59,3 | 69,2 | 55,4 |
| BHT | 45,1 | 53,3 | 61,9 | 72,6 | 57,1 |

Çizelge 4.18. Karadut meyve ve yapraklarının lipid peroksidasyonu inhibisyon değerleri (%)

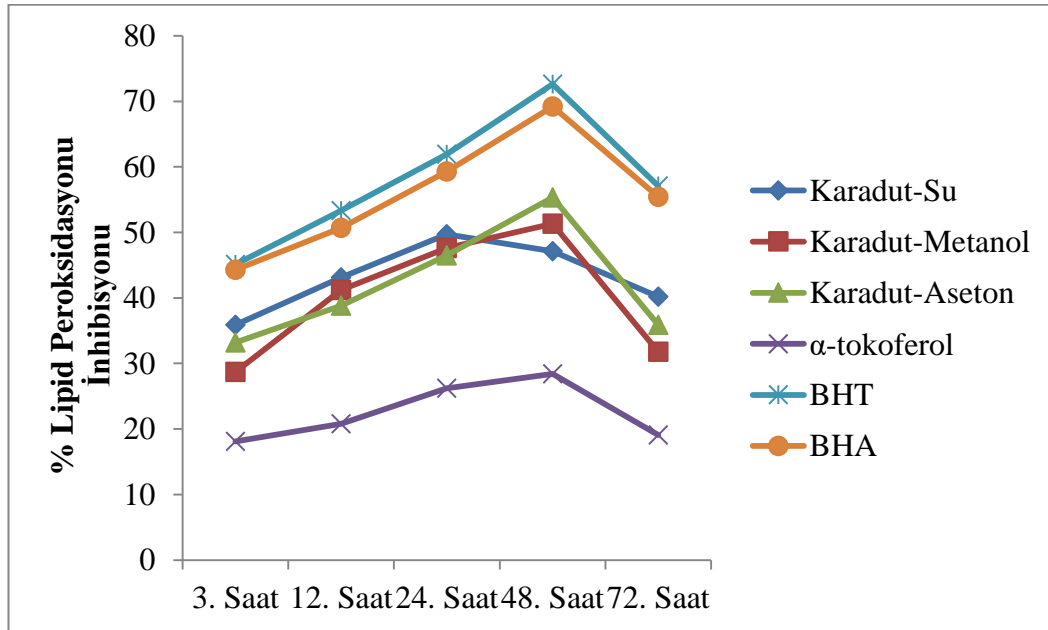
| | ($\mu\text{g/mL}$) | | | | |
|-----------------|--------------------------------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|
| Ekstrakt | 50 | 100 | 150 | 200 | 250 |
| | 3. saat | 12. saat | 24. saat | 48. saat | 72. saat |
| Yaprak-Su | 25,9 | 35,1 | 40,9 | 47,3 | 33,1 |
| Yaprak-Metanol | 22,3 | 26,7 | 33,7 | 38,9 | 25,9 |
| Yaprak-Aseton | 30,1 | 41,8 | 50,3 | 55,7 | 23,7 |
| Karadut-Su | 35,9 | 43,1 | 49,7 | 47,1 | 40,2 |
| Karadut-Metanol | 27,7 | 41,2 | 47,6 | 51,3 | 31,8 |
| Karadut-Aseton | 33,2 | 38,8 | 46,5 | 55,3 | 35,9 |

Karadut yaprakları en yüksek antioksidan aktivitesi değerlerini sırası ile aseton, su ve metanol ekstraktlarında göstermiştir (Şekil 4.19).

Karadut meyvesi ise en yüksek antioksidan aktivitesi değerlerini sırası ile su, aseton ve metanol ekstraktlarında göstermiştir (Şekil 4.20).



Şekil 4.19. Karadut yaprağı ekstraktlarının lipit peroksidasyonu inhibisyonu değerleri



Şekil 4.20. Karadut meyve ekstraktlarının lipit peroksidasyonu inhibisyonu değerleri

BÖLÜM 5

5. SONUÇLAR VE TARTIŞMA

5.1. Ekstrakt Verimi

Karadut meyve ve yapraklarının ekstraktlarını hazırlarken çözücü olarak su, aseton ve metanol kullanıldı. Hem meyve hem yaprak ekstraktları hazırlanırken en yüksek verim alınan ekstrakt çözücü olarak su kullanılan olmuştur. Aynı şekilde hem meyve hem yaprak ekstraktlarında sudan sonra en yüksek verim değerine sahip ekstraktlar sırasıyla metanol ve aseton ekstraktlarıdır. Buradan şu sonuca varılmıştır ki; çözücü polaritesi arttıkça ekstrakt verimi de artmaktadır.

5.2. Fenolik Bileşen İçeriğinin Belirlenmesi

Meyve ve sebzelerin birçoğunun bazı hastalıkların oluşumunu engellemeye ve vücut savunmasına katkıları olduğu bilinmektedir. Fenolik bileşiklerce zengin oluşları bu olumlu katkıları pekiştirmektedir. Fenolik bileşikler doğal antioksidanlardır ve oksidatif hasarlara karşı vücutta savunma sistemi oluştururlar. Fenolik bileşiklerin antioksidatif özellikleri bu konuda yapılan çeşitli çalışmalarla kanıtlanmıştır. Yapılan bu analizde karadut meyve ve yapraklarının antioksidan özellik göstermelerinin en etkili sebebi olan fenolik bileşen içerikleri araştırılmıştır.

Gallik asit ve pirogallol çözeltileri standart alınarak belirlenen fenolik madde içeriği en yüksek olan ekstrakt çözücü olarak aseton kullanılmış olan ekstrakttır. Bunu takip eden sırada fenolik madde içeriği yüksek olan metanollü ekstrakt ve daha sonra da

su kullanılarak hazırlanmış olan ekstraktır. Karadutun hem meyvesi hem de yapraklarında aseton ekstraktının en fazla fenolik madde içerdiği tespit edilmiştir.

Gallik asit ekivalent alındığında fenolik bileşen içerikleri yaprağın su ekstraktında 78,271 µg/g, karadut meyvesinin su ekstraktında 85,641 µg/g; yaprağın metanol ekstraktında 83,557 µg/g, karadut meyvesinin metanol ekstraktında 98,341 µg/g; yaprağın aseton ekstraktında 102,378 µg/g, karadut meyvesinin aseton ekstraktında ise 118,317 µg/g olarak belirlenmiştir.

Pirogallol ekivalent alındığında fenolik bileşen içerikleri yaprağın su ekstraktında 74,361 µg/g, karadut meyvesinin su ekstraktında 81,079 µg/g; yaprağın metanol ekstraktında 76,734 µg/g, karadut meyvesinin metanol ekstraktında 99,831 µg/g; yaprağın aseton ekstraktında 110,023 µg/g, karadut meyvesinin aseton ekstraktında ise 123,871 µg/g olarak belirlenmiştir.

5.3. Flavonoid Bileşen İçeriğinin Belirlenmesi

Flavonoidler bitkilere parlaklıklarını veren, antioksidan özelliğe sahip bileşiklerdir. Yiyeceklerle birlikte vücuda alındıklarında antioksidan özellikte olmaları sebebiyle oksidatif reaksiyonlar sonucu oluşmuş olan radikalleri temizleme özellikleri vardır. Bununla birlikte antioksidatif özellikleri sebebiyle metal iyonlarıyla kompleks oluştururlar. Bu analizde karadut meyve ve yapraklarının flavonoid madde içeriği araştırılmıştır.

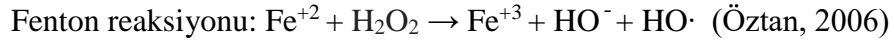
Gallik asit ve epikateşin çözeltileri standart alınarak belirlenen flavonoid bileşen içeriği ortalama olarak en yüksek olan ekstrakt metanol ekstraktıdır. Metanol ekstraktını aseton, sonrasında da su ekstraktı izlemiştir.

Gallik asit ekivalenti alındığında flavonoid bileşen içeriği, yaprağın su ekstraktında 26,891 µg/g, karadut meyvesinin su ekstraktında 31,279 µg/g; yaprağın metanol ekstraktında 42,317 µg/g, karadut meyvesinin metanol ekstraktında 46,327 µg/g; yaprağın aseton ekstraktında 39,617 µg/g, karadut meyvesinin aseton ekstraktında ise 44,417 µg/g olarak belirlenmiştir.

Epikateşin ekivalent olarak alındığında flavonoid bileşen içeriği yaprağın su ekstraktında 19,871 µg/g, karadut meyvesinin su ekstraktında 30,473 µg/g; yaprağın metanol ekstraktında 23,671 µg/g, karadut meyvesinin metanol ekstraktında 32,279 µg/g; yaprağın aseton ekstraktında 23,472 µg/g, karadut meyvesinin aseton ekstraktında ise 32,324 µg/g olarak belirlenmiştir.

5.4. Metal İyonları ile Şelat Oluşturma Aktivitesinin Belirlenmesi

Metal iyonlarını şelatlama özelliği antioksidan aktivitenin belirlenmesinde ölçüt alınabilen bir özelliktir. Metal şelatlayıcı özelliği olan antioksidanlar metal iyonlarıyla kompleks oluşturarak, oluşması muhtemel serbest radikallerin oluşumunu engellerler. Fe⁺² iyonları fenton reaksiyonları sonucu serbest radikaller oluşturabilmektedir.



Fe⁺² iyonu derişimi azaldıkça, yani antioksidatif özellik gösteren maddeler bu iyonları bağlayıp kompleks oluşturdukça reaksiyonlardaki oksidatif hasar engellenmiş olacaktır.

50-250 µg/mL arasında değişen derişimlerde hazırlanan standart çözelti ve karadut ekstraktlarının Fe⁺² iyonlarını şelatlama aktivitelerinin araştırıldığı bu deneyde derişim arttıkça metal iyonlarını şelatlama aktivitesinin arttığı belirlenmiştir.

Sonuçlara bakıldığında karadut meyvesinin en yüksek metal şelatlama aktivitesinin aseton ekstraktında; yapraklarının ise en yüksek metal şelatlama aktivitesinin su ile hazırlanmış ekstraktlarda olduğu görülmüştür. İkinci olarak metal şelatlama aktivitesi karadut meyvesi için metanol; yaprakları için de metanol ekstraktıdır. Metal şelatlama aktivitesinin en az olduğu ekstraktlar karadut meyvesi için su, yapraklar için aseton ekstraktlarıdır.

5.5. Süperoksit Radikali Yakalama Aktivitesinin Belirlenmesi

Süperoksit radikali moleküler haldeki oksijenin indirgenmesi sonucu oluşur. Oluşan süperoksit radikali reaksiyonlarında indirgen özellik gösterip, Fe⁺³ iyonlarını Fe⁺² iyonlarına indirger ve H₂O₂ oluşturur. Bu reaksiyonlar dizisi sonucunda hidroksil radikali

de oluşur. Süperoksit yakalama özelliği olan antioksidanlar oluşan bu radikalleri giderir ve oksidatif hasarın önüne geçilmiş olur.

Çalışmamızda 50-250 µg/mL arasında değişen derişimlerde hazırlanmış olan standart çözelti ve karadut ekstraktlarının süperoksit radikali yakalama aktiviteleri araştırılmıştır. Derişimler arttıkça süperoksit radikali yakalama aktiviteleri artmıştır.

Sonuç olarak süperoksit radikali yakalama aktivitesi değerinin en çok asetonlu ekstraktlarda olduğu görülmüştür. Bunu sırasıyla metanol ve su ile hazırlanmış ekstraktlardaki süperoksit radikali yakalama aktivitesi değeri takip etmektedir. Bu sonuç karadutun hem meyvesi hem yaprakları için geçerlidir.

5.6. İndirgeme Kapasitesinin Belirlenmesi

Bu yöntemde antioksidanların Fe^{+3} iyonlarını Fe^{+2} iyonlarına indirgeme gücü saptanır. Derişimleri 50-250 µg/mL arasında değişen standart çözelti ve karadut ekstraktlarının indirgeme kapasitelerinin araştırıldığı bu deneyde artan derişimle birlikte tüm çözeltilerde indirgeme gücü artışı tespit edilmiştir.

Karadut meyvesi ve yaprak ekstraktlarında Fe^{3+} iyonunu indirgeme gücünün en yüksek çıktığı ekstrakt çözücü olarak metanol kullanılarak hazırlanan ekstrakttır. Sonrasında indirgeme gücü sırasıyla aseton ve su ile hazırlanan ekstraktlarda yüksek çıkmıştır.

5.7. ABTS Denemesi

Bu deneme antioksidan özellik tespit etmede etkili bir yöntemdir. ABTS radikal katyonunun antioksidanlarca giderilmesi esasına dayanır.

Çalışmamızda 50-250 µg/mL arasında değişen derişimlerde hazırlanan standart çözelti ve örnek ekstraktlarının ABTS radikali giderme aktiviteleri belirlenmiştir. Derişimler arttıkça ABTS radikali yakalama aktivitelerinin arttığı görülmüştür.

Karadut meyvelerinin ABTS radikali yakalama aktiviteleri metanol, aseton ve su ekstraktları sırasında azalmaktadır.

Karadut yapraklarının ABTS radikali yakalama aktiviteleri su, metanol ve aseton ekstraktları sırasında azalmaktadır.

5.8. DPPH Radikali Yakalama Aktivitesinin Belirlenmesi

DPPH serbest bir radikaldir. Antioksidan varlığında ortamdaki miktarı giderek azalır. Deneme esnasındaki absorbans düşüşü DPPH radikalini yakalama aktivitesinin ölçüsüdür (Yavaşer, 2011).

Bu yöntem basit ve hızlı olup, antioksidan kapasitesi tayininde sıkça kullanılan bir yöntemdir. Ancak yöntemin ışığa ve oksijene hassasiyeti kullanımında sınırlara yol açabilmektedir (Okan, Varlıbaş, Öz, & Deniz, 2013).

Çalışmamızda derişimleri 50-250 µg/mL arasında değişen standart çözelti ve karadut ekstraktlarının DPPH radikali yakalama aktiviteleri araştırılmıştır. Araştırma sonucunda ekstrakt derişimi arttıkça DPPH radikali yakalama aktivitesinin arttığı saptanmıştır. Ancak bu artışlardan bir süre sonra karadut ekstraktlarının DPPH radikali yakalama aktivitesi değerlerinin değişmediği, sabit kaldığı gözlemlenmiştir. Bunun nedeni ortamda giderilecek DPPH radikalinin kalmamış olmasıdır.

Sonuçlara bakıldığında karadut meyve ve yapraklarının DPPH radikali yakalama aktivitesi değerleri büyükten küçüğe sıralandığında aseton, metanol ve su ekstraktları şeklindedir.

5.9. Toplam Antioksidan Kapasitesi Tayini

Bu yöntem lipid peroksidasyonu reaksiyonu sırasında oksijen tüketimini esas olarak uygulanır. Oldukça zaman alan bir yöntemdir. Yağ asitleri arasındaki reaksiyonun ilerleyişine katkıda bulunmak için linoleik asit emülsiyonundan faydalanılmıştır (Büyüktuncel, 2013).

Serbest haldeki radikaller yağ asitleriyle reaksiyona girerek lipid radikali oluşturur. Lipid radikalleri oksijenle reaksiyona girerek lipid peroksi radikalleri oluşturur.

Oluşan bu radikal peroksidasyonu yayarak zincir reaksiyon başlatır. Bu zincir reaksiyonlar antioksidan varlığında sonlanır (Doğru, 2019).

Çalışmamızda derişimleri 50-250 µg/mL arasında değişen standart çözelti ve örnek ekstraktlarının belirli süre aralıklarında yapılan ölçümlerle lipid peroksidasyonu inhibisyonu değerleri belirlenmiştir. 72. saate kadar yapılan ölçümlerde ekstrakt derişimleri arttıkça lipid peroksidasyonu inhibisyonu değerlerinde artış saptanırken, 72. saatte yapılan ölçümde 60. saatekine oranla lipid peroksidasyonu inhibisyonu değerlerinde keskin bir azalış tespit edilmiştir.

Karadut yaprakları ekstraktlarında en yüksek lipid peroksidasyonu inhibisyonu değerleri sırası ile aseton, su ve metanol ekstraktlarında görülmüştür.

Karadut meyvesi ekstraktlarında ise en yüksek lipid peroksidasyonu inhibisyonu değerleri sırası ile su, aseton ve metanol ekstraktlarında görülmüştür.

KAYNAKLAR

- Agati, G., Azzarello, E., Pollastri, S., & Tattini, M. (2012). Flavonoids as antioxidants in plants: Location and functional significance. *Plant Science*, 196, 67-76.
- Antioksidan Nedir? Ne İşe Yarar? Antioksidan İçeren Besinler Nelerdir?* (2016). 4 Nisan 2019 tarihinde <https://www.seniyyisen.com/antioksidan-nedir-ne-ise-yarar-antioksidan-iceren-besinler-nelerdir/> adresinden erişildi.
- Atınç, M., & Kalkan, İ. (2018). Flavonoidler ve İnsan Sağlığı Üzerine Etkileri. *Aydın Gastronomy*, 2(1), 31-38.
- Büyüktuncel, E. (2013). Toplam Fenolik İçerik ve Antioksidan Kapasite Tayininde Kullanılan Başlıca Spektrofotometrik Yöntemler. *Marmara Pharmaceutical Journal*, 17(2), 93-103.
- Chen, H., Junsong, P., Liu, D., Yu, W., Shao, Y., Yang, G., . . . He, N. (2016). Anti-Inflammatory and Antinociceptive Properties of Flavonoids from the Fruits of Black Mulberry (*Morus nigra* L.). *Plos One*, 11(4), 1-14.
- Çağlar, M. Y., & Demirci, M. (2018). Üzümü Meyvelerde Bulunan Fenolik Bileşikler ve Beslenmedeki Önemi. *Avrupa Bilim ve Teknoloji Dergisi*, 7(11), 18-26.
- Çapanoğlu Güven, E., Toydemir Otkun, G., & Boyacıoğlu, D. (2010). Flavonoidlerin Biyoyararlılığını Etkileyen Faktörler. *The Journal Of Food*, 35(5), 387-394.
- Çimen, M. (1999). Flavonoidler ve Antioksidan Özellikleri. *Türkiye Klinikleri Tıp Bilimleri Dergisi*, 19(5), 296-304.
- Demir, S., Turan, İ., & Aliyazıcıoğlu, Y. (2019). *Primula vulgaris* Çiçek Ekstraktının Antioksidan Özellikleri ve İnsan Kanser Hücre Serileri Üzerindeki Sitotoksik Etkisi. *Kahramanmaraş Sütçü İmam Üniversitesi Tarım ve Doğa Dergisi*, 22(1), 78-84.

- Doğru, B. (2019). *Lipid Peroksidasyonu*. 13 Haziran 2019 tarihinde <https://slideplayer.biz.tr/slide/15179771/> adresinden erişildi.
- Granato, D., Shahidi, F., Wrolstad, R., Kilmartin, P., Melton, L., Hidalgo, F., . . . Finglas, P. (2018). Antioxidant activity, total phenolics and flavonoids contents: Should we ban in vitro screening methods? *Food Chemistry*, 264, 471-475.
- Güleşçi, N., & Aygöl, İ. (2016). Beslenmede Yer Alan Antioksidan ve Fenolik Madde İçerikli Çerezler. *Gümüşhane Üniversitesi Sağlık Bilimleri Dergisi*, 5(1), 109-129.
- Karabulut, H., & Gülay, M. Ş. (2016a). Antioksidanlar. *Mehmet Akif Ersoy Üniversitesi Veterinerlik Fakültesi Dergisi*, 1(1), 65-76.
- Karabulut, H., & Gülay, M. Ş. (2016b). Serbest Radikaller. *Mehmet Akif Ersoy Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Dergisi*, 4(1), 51-52.
- Lignin. (2006, 21 Şubat). *Wikipedia, The Free Encyclopedia* içinde. 13 Mayıs 2019 tarihinde <https://www.wikiwand.com/en/Lignin> adresinden erişildi.
- Lobo, V., Patil, A., Phatak, A., & Chandra, N. (2010). Free radicals, antioxidants and functional foods: Impact on human health. *Pharmacognosy Review*, 4(8), 118-126.
- Meral, R., & Doğan, İ. S. (2012). Karadut (*Morus nigra*) Katkılı Ekmeğin Antioksidan Aktivitesi ve Fenolik Kompozisyonu. *Iğdır Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi*, 2(4), 43-48.
- Okan, O. T., Varlıbaş, H., Öz, M., & Deniz, İ. (2013). Antioksidan Analiz Yöntemleri ve Doğu Karadeniz Bölgesinde Antioksidan Kaynağı Olarak Kullanılabilecek Odun Dışı Bazı Bitkisel Ürünler. *Kastamonu Üniversitesi Orman Fakültesi Dergisi*, 13(1), 48-59.
- Okcu, G., Güneş Altunbaş, E., & Ayhan, K. (2011). Laktik Asit Fermantasyonunda Fenolik Bileşikler ve Önemi. *Ordu Üniversitesi Bilim Teknik Dergisi*, 1(1), 50-63.

- Öztan, T. (2006). *Mor Havuç Konsantresi, Şalgam Suyu, Nar Suyu ve Nar Ekşisi Ürünlerinde Antioksidan Aktivitesi Tayini ve Fenolik Madde Profilinin Belirlenmesi*. (Yüksek lisans tezi). İstanbul Teknik Üniversitesi/Fen Bilimleri Enstitüsü, İstanbul.
- Sakihama, Y., Cohen, M., Stephen, C., & Yamasaki, H. (2002). Plant phenolic antioxidant and prooxidant activities: phenolics-induced oxidative damage mediated by metals in plants. *Toxicology*, 177(1), 67-80.
- Shahidi, F., & Ambigaipalan, P. (2015). Phenolics and polyphenolics in foods, beverages and spices: Antioxidant activity and health effects. *Journal of Functional Foods*, 18, 820-897.
- Skrovankova, S., Sumczynski, D., Mlcek, J., Jurikova, T., & Sochor, J. (2015). Bioactive Compounds and Antioxidant Activity in Different Types of Berries. *International Journal of Molecular Sciences*, 16(10), 24673–24706.
- Tekin Yalçın, G. (2013). *Flavonoidlerin Kanser Hücrelerine Etkisi*. (Yüksek lisans tezi). Selçuk Üniversitesi/Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Konya.
- Tokuşoğlu, Ö. (2017). *Karadutun Biyoaktif Etken Maddeleri, Antikarsinojenite ve Sağlık Etkileri*. 3 Temmuz 2019 tarihinde <https://www.yasamicingida.com/gida-beslenme-ve-kanser/karadutun-biyoaktif-etken-maddeleri-antikarsinojenite-ve-saglik-etkileri/> adresinden erişildi.
- Türksoy, S. (2019). *Fenolik Bileşikler*. 11 Haziran 2019 tarihinde <https://slideplayer.biz.tr/slide/8909930/> adresinden erişildi.
- Ünver, E., Ağma Okur, A., Tahtabiçen, E., Kara, B., & Şamlı, H. E. (2014). Tanenler ve Hayvan Besleme Üzerine Etkileri. *Türk Tarım, Gıda ve Bilim Teknolojisi Dergisi*, 2(6), 263-267.
- Yavaşer, R. (2011). *Doğal ve Sentetik Antioksidan Bileşiklerin Antioksidan Kapasitelerinin Karşılaştırılması*. (Yüksek lisans tezi). Adnan Menderes Üniversitesi/Fen Bilimleri Enstitüsü, Aydın.
- Yiğit, N., Yiğit, D., Özgen, U., & Aktaş, A. (2007). Kara dut (*Morus nigra* L.)’un antikandidal aktivitesi. *Türk Mikrobiyoloji Cemiyeti Dergisi*, 37(3), 169-173.

Yıldız, H., & Baysal, T. (2003). Bitkisel Fenoliklerin Kullanım Olanakları ve İnsan Sağlığı Üzerine Etkileri. *Gıda Mühendisliği Dergisi*, 14, 29-35.

ÖZGEÇMİŞ

1990 yılında İstanbul'da doğdum. İlköğrenimimi Kocayusuf İlkokulu'nda, liseyi Mehmet Niyazi Altuğ Anadolu Lisesi'nde tamamladım. Trakya Üniversitesi Kimya bölümündeki lisans eğitimimi 2012'de bitirdim. 2013'te Trakya Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü'nde lisansüstü eğitime başladım. 2012 yılından beri kimya öğretmeni olarak çalışmaktayım.