



T.C.
AKSARAY ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**BİYOTEKNOLOJİ VE MOLEKÜLER BİYOLOJİ ANABİLİM
DALI**

**TRİFOLIUM PRATENSE var. PRATENSE'NİN ANTIOKSİDAN
KAPASİTESİ VE FENOLİK BİLEŞİMİNİN BELİRLENMESİ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Yavuz DUMAN

DANIŞMAN

Prof. Dr. Yavuz Selim ÇAKMAK

AKSARAY, 2024

Aksaray Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü'nün 222330705 numaralı Yüksek Lisans öğrencisi Yavuz DUMAN tarafından hazırlanan “**Trifolium Prantese var. Prantense'nin Antioksidan Kapasitesi ve Fenolik Bileşiminin Belirlenmesi**” adlı tez çalışması aşağıdaki jüri tarafından OY BİRLİĞİ/OY ÇOKLUĞU ile Biyoteknoloji ve Moleküler Biyoloji Anabilim Dalında YÜKSEK LİSANS TEZİ olarak kabul edilmiştir.

Danışman: Prof. Dr. Yavuz Selim ÇAKMAK

Aksaray Üniversitesi

Bu tezin, kapsam ve kalite olarak Yüksek Lisans Tezi olduğunu onaylıyorum/onaylamıyorum.....

Üye: Prof. Dr. Gökhan ZENGİN

Selçuk Üniversitesi

Bu tezin, kapsam ve kalite olarak Yüksek Lisans Tezi olduğunu onaylıyorum/onaylamıyorum.....

Üye: Dr. Öğr. Üyesi Bülent ESKİN

Aksaray Üniversitesi

Bu tezin, kapsam ve kalite olarak Yüksek Lisans Tezi olduğunu onaylıyorum/onaylamıyorum.....

Tez Savunma Tarihi: 27/09/2024

Jüri tarafından kabul edilen bu tezin Yüksek Lisans Tezi olması için gerekli şartları yerine getirdiğini onaylıyorum.

.....

Prof. Dr. Mehmet Ali HINIS

Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürü

DOĐRULUK BEYANI

Yüksek lisans tezi olarak sunduğum bu çalışmayı, akademik kurallara ve bilimsel etik, ahlak ve geleneklere aykırı dűşecek bir yol ve yardıma başvurmaksızın yazdığımı, yararlandığım eserlerin kaynakçada gösterilenlerden olduğunu, çalışmamda kullandığım verilerin orijinalliğini ve her türlü intihalden uzak olduğunu beyan ederim.

Enstitü tarafından belli bir zamana bağlı olmaksızın, tezimle ilgili yaptığım bu beyana aykırı bir durumun saptanması durumunda, ortaya çıkacak tüm ahlaki ve hukuki sonuçlara katlanacağımı bildiririm.



Yavuz DUMAN

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans eğitimim süresince engin bilgileri, donanımı, tecrübeleri ile bana yol gösteren, pozitif kişiliğı ile her zaman her anlamda destek olan ve bu çalışmanın yürütülmesinde maddi ve manevi anlamda yardımını esirgemeyen danışman hocam sayın Prof. Dr. Yavuz Selim ÇAKMAK'a, laboratuvar çalışmaları ve sonuçların değerlendirilmesinde yardımcı olan İsmail ŞEN ve Ako Hamasaeed ABDULQADİR'e, çalışmada kullanılan bitki materyalinin teşhis edilmesinde destek olan Dr. Öğr. Üyesi Bülent ESKİN'e sonsuz teşekkür ve saygılarımı sunarım.

Tezin yazım aşamasında destek olan Fen Bilimleri Öğretmeni Murat PINARDAĞ arkadaşıma teşekkür ederim.

Bugünlere gelmemde en emeğı büyük olan, maddi ve manevi olarak her anlamda destek olan, eğitim hayatımdaki başarıımı borçlu olduğum aileme, eşim Sevgi DUMAN' a ve evladım Yavuz Selim'e minnettarım.

Yavuz DUMAN

AKSARAY, 2024

İÇİNDEKİLER

TEŞEKKÜR	i
İÇİNDEKİLER	ii
ÖZET.....	iii
ABSTRACT	iv
ŞEKİLLER DİZİNİ	v
ÇİZELGELER DİZİNİ	vi
SİMGELER VE KISALTMALAR	vii
1. GİRİŞ	1
2. KAYNAK ÖZETLERİ	4
2.1 Trifolium Pratense Var Pratense Türünün Sistematik Şeması	4
2.2 Serbest Radikaller.....	4
2.3 Oksidatif Stres	6
2.4 Antioksidanlar	5
2.5 Fitokimyasallar	6
3. MATERYAL VE YÖNTEM.....	12
3.1 Bitki Materyali	12
3.2 Bitki Özütlerinin Hazırlanması	12
3.3 Antioksidan Aktivite Metotları.....	12
3.3.1 Toplam fenolik içerik (TPC).....	12
3.3.2 Toplam flavonoid içerik (TFC)	13
3.3.3 DPPH serbest radikal giderme aktivitesi	13
3.3.4 Demir indirgeme antioksidan gücü (FRAP)	13
3.3.5 Toplam antioksidan kapasite (PBD).....	14
3.4 Yüksek Basınçlı Sıvı Kromatografi Analizleri (HPLC/DAD).....	14
4. ARAŞTIRMA BULGULARI VE TARTIŞMA.....	16
4.1 Toplam Fenolik İçerik	16
4.2 Toplam Flavonoid İçerik	18
4.3 DPPH Serbest Radikal Giderme Aktivitesi	20
4.4 Toplam Antioksidan Kapasite	22
4.5 FRAP İyon İndirgeme Gücü.....	24
4.5 Yüksek Basınçlı Sıvı Kromatografi Analizleri (HPLC).....	26
5. SONUÇ VE ÖNERİLER.....	29
KAYNAKLAR	30
ÖZGEÇMİŞ.....	35

YÜKSEK LİSANS TEZİ

TRİFOLIUM PRATENSE var. PRATENSE’NİN ANTIOKSİDAN KAPASİTESİ VE FENOLİK BİLEŞİMİNİN BELİRLENMESİ

Yavuz DUMAN

Aksaray Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Biyoteknoloji ve Moleküler Biyoloji Anabilim Dalı

Danışman: Prof. Dr. Yavuz Selim ÇAKMAK

ÖZET

Dünya genelinde artan hastalıklarla beraber bu hastalıkların tedavisi için yeni ve doğal alternatiflerin arayışları devam etmektedir. Hastalıkların tedavisinde özellikle son dönemlerde sentetik veya yarı sentetik ilaçların kullanımı artış göstermekle birlikte yan etkileri göz ardı edilemeyecek düzeydedir. Bu durum yan etkisi olan ilaçlara alternatif olabilecek bileşenlerin tespiti ve izolasyonu ile ilgili çalışmaları ön plana çıkartmaktadır. Bitkisel biyoaktif bileşenler sentetik ilaçlara alternatif olma anlamında önemli bir potansiyele sahiptir. Bitkiler buldukları çevre ve yaşam koşullarına göre geliştirmiş olabilecekleri farklı fitokimyasal profiller sayesinde ön plana çıkmaktadırlar. Mevcut çalışmada ülkemizde oldukça yaygın bulunan bir bitki türü olarak yüksek protein içeriği ile bazı yörelerde protein kaynağı şeklinde insan beslenmesinde kullanılan *Trifolium pratense* var. *pratense* bitkisinin farklı özütlerinin (etilasetat, metanol) biyolojik aktivitelerinin araştırılması amaçlanmıştır. Bazı bölgelerde alternatif tıpta da kullanımları bulunan bitkinin antioksidan kapasitesinin ve tıbbi potansiyelinin belirlenmesi açısından önem taşımaktadır. Bu amaçla da bitkinin toplam fenolik ve flavonoid içerikleri ve bazı yaygın metotlar kullanılarak (DPPH, FRAP ve PBD) antioksidan aktiviteleri belirlenmiştir. Toplam antioksidan kapasite dışındaki diğer tüm antioksidan analizlerinde metanol özütünün yüksek aktivite gösterdiği, HPLC analizine göre ise bitki yapısında yüksek oranda Gallik asit ve Rosmarinik asit bulunduğu tespit edilmiştir. Sonuç olarak yürütülen çalışma ile *Trifolium pratense* var. *pratense* bitkisinin önemli bir biyoaktivite kaynağı olduğu, antioksidan aktivitesi açısından önemli bir potansiyele sahip olduğu ortaya çıkarılmıştır.

Anahtar Kelimeler: Biyolojik Aktivite, Fitokimyasallar, Kimyasal Bileşim, *Trifolium Pratense* Var *Pratense*.

Eylül, 2024; 35 sayfa

M.Sc. THESIS

DETERMINATION OF ANTIOXIDANT CAPACITY AND PHENOLIC COMPOSITION OF *TRIFOLIUM PRATENSE* var. *PRATENSE*

Yavuz DUMAN

Aksaray University
Graduate School of Natural and Applied Sciences
Department of Biotechnology and Molecular Biology

Supervisor: Prof. Dr. Yavuz Selim ÇAKMAK

ABSTRACT

With the increasing number of diseases worldwide, the search for new and natural alternatives for the treatment of these diseases continues. Although the use of synthetic or semi-synthetic drugs has increased considerably in the treatment of diseases, their side effects are at a level that cannot be ignored. This situation brings to the forefront the studies on the identification and isolation of components that can be an alternative to drugs with side effects. Plant bioactive components have an important potential as an alternative to synthetic drugs. Plants come to the forefront thanks to the different phytochemical profiles they may have developed according to their environment and living conditions. In the present study, it was aimed to investigate the biological activities of different extracts (ethyl acetate, methanol) of *Trifolium pratense* var. *pratense*, which is a very common plant species in our country and used in human nutrition as a protein source in some regions with its high protein content. Determination of the antioxidant capacity of the plant, which is also used in alternative medicine in some regions, is important in terms of determining its medicinal potential. For this purpose, total phenolic and flavonoid contents and antioxidant activities of the plant were determined using some common methods (DPPH, FRAP and PBD). In all antioxidant analyses except total antioxidant capacity, methanol extract showed high activity, and according to HPLC analysis, high levels of Gallic acid and Rosmarinic acid were found in the plant structure. In conclusion, the study revealed that *Trifolium pratense* var. *pratense* is an important source of bioactivity and has an important potential in terms of antioxidant activity.

Keywords: Biological Activity, Phytochemicals, Chemical Composition, *Trifolium Pratense* Var *Pratense*.

September 2024; 35 pages

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1.1. Serbest radikal oluşumuna neden olan dış faktörler.	2
Şekil 2.1. Oksidatif stresin sebep olduğu hastalıklar	4
Şekil 2.2. Enzimatik ve non-enzimatik antioksidanlar.	5
Şekil 4.1. Trifolium pratense var pratense özütlerinin toplam fenolik içeriği.	17
Şekil 4.2. Trifolium pratense var pratense özütlerinin toplam flavonoid içeriği.	19
Şekil 4.3. DPPH serbest radikal giderme aktivitesi.	21
Şekil 4.4. Toplam antioksidan kapasite.	23
Şekil 4.5. FRAP iyon indirgeme gücü	24



ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 2.1. Trifolium pratense var pratense'nin sistematik şeması	4
Çizelge 2.2. Reaktif oksijen türleri ve reaktif nitrojen türlerinin sınıflandırılması	5
Çizelge 2.3. Serbest radikal oluşumuna sebep olan endojen ve eksojen kaynaklar	4
Çizelge 4.1. Trifolium pratense var pratense özütlerinin toplam fenolik içeriği.	16
Çizelge 4.2. Trifolium pratense var. pratense özütlerinin toplam flavonoid içeriği. .	19
Çizelge 4.3. Trifolium pratense var. pratense özütlerinin toplam fenolik içeriği.	20
Çizelge 4.4. Trifolium pratense var. pratense özütlerinin toplam antioksidan kapasitesi.....	22
Çizelge 4.5. Trifolium pratense var. pratense özütlerinin FRAP iyon indirgeme gücü.	
Çizelge 4.6. Fenolik bileşim analizi.....	27



SİMGELER VE KISALTMALAR

A0:	Kontrolün absorbansı
A1:	Özütün absorbansı
ATP:	Adenozin Trifosfat
CAT:	Katalaz
CH₃COONa:	Sodyum Asetat
DDA:	Diyot Dizisi Dedektörü
DNA:	Deoksiribonükleik Asit
DPPH:	2,2-difenil-1-pikrilhidrazil
DSÖ:	Dünya Sağlık Örgütü
FeCl₃:	Demir (III) Klorür
FRAP:	Demir İyonu İndirgeyici Antioksidan Güç
g:	Gram
GAE:	Gallik Asit Eşdeğeri
GALAE:	Galantamin Eşdeğeri
GR:	Glutasyon Redüktaz
H₂O₂:	Hidrojen Peroksit
HPLC:	Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi
HO₂:	Hidroperoksil
HOCl:	Hipokloröz Asit
KOAH:	Kronik Obstrüktif Akciğer Hastalığı
M:	Molar
MDA:	Malondialdehit
mg:	Miligram
ml:	Mililitre
mM:	Milimolar
mmol:	Milimol
N:	Nitrojen
Na₂CO₃:	Sodyum Karbonat
nm:	Nanometre
NO:	Nitrojen Oksit
NO₂:	Nitrojen Di Oksit
O:	Oksijen
OH-:	Hidroksil
OHG:	Hidroksiguanin
PBD:	Fosfomolibdat
PCO:	Protein Karbonil
PG:	Profil Gallat
RE:	Rutin Eşdeğeri
RNS:	Reaktif Nitrojen Türleri
ROO-:	Peroksil
ROS:	Reaktif Oksijen Türleri
TE:	Troloks Eşdeğeri
TFC:	Toplam Flavonoid İçerik
TG :	Tiroglobulin
TPC:	Toplam Fenolik İçerik
TPTz:	2,4,6-tripiryridyl-s-triazine
uv:	Ultraviyole Işımlar
µg:	Mikrogram

μl:	Mikrolitre
μmol:	Mikromol
%:	Yüzde
$^{\circ}$C:	Santigrat

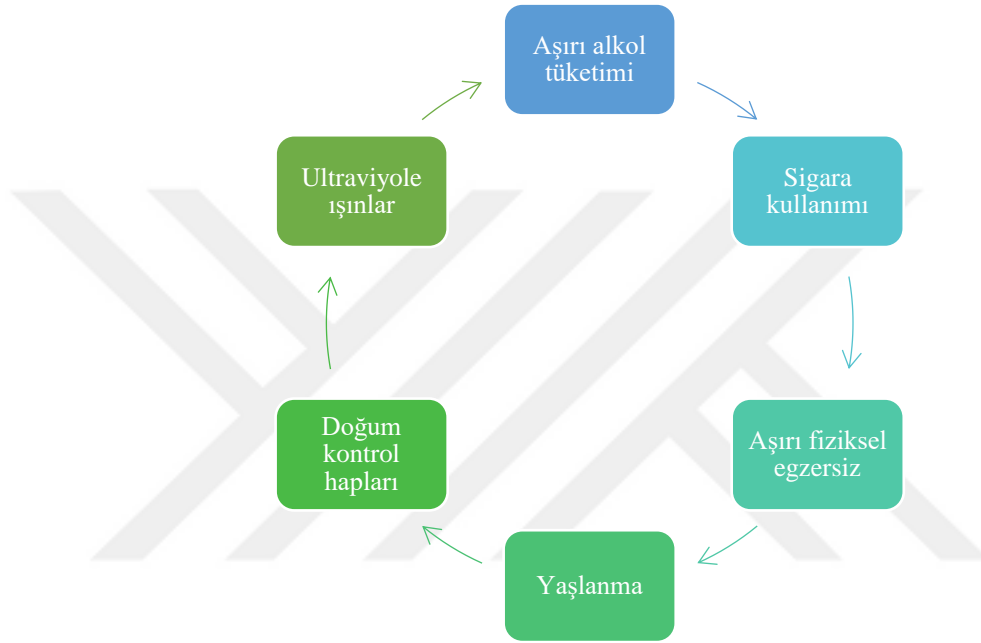


1. GİRİŞ

İnsan nüfusu genel sağlık bakımının önemini ve hastalık yükünü kavradığı zamandan beri, doğal çevresinde bulunan şifalı özellikler taşıyan bitkilere yönelmiştir. Alternatif tıp halkın gelenek ve göreneklerine göre şekillenmiş yakın yüzyılda da daha disiplinler hale gelerek bilimsel süreç odaklı olarak gelişimini sürdürmüştür. Halkın kaliteli ve uzun yaşama sürecini iyileştirebilen alternatif tıp günümüzde de çözüm yollarını araştırarak ve geliştirerek devam etmektedir. Gelişmekte olan tıp bilimine rağmen insanların geleneksel tıp anlayışı değişmemekte veya bazı insanların modern tıba ulaşamamasından dolayı geleneksel tıba ihtiyaç halen devam etmektedir. Günümüzde alternatif tıbbın bahsedilen pozitif etkilerine ilaveten dünya düzeninin değişmesi, küresel salgınlar ve hastalıkların tedavisi için kullanılan sentetik ilaçların yan etkileri gibi negatif etkenler göz önüne alındığında insanların yaşam kalitesini arttırma arayışları ve doğala yönelerek tedavi arayışlarını sürdürmeleri ile alternatif tıba eğilim de artmıştır (Öztürk, 2020). Alternatif tıp bitkisel özütler, homeopatik ilaçlar ve uçucu yağlar olarak da tanımlanmaktadır (Little, 2004).

Bir çok bitki ve türevleri yüksek biyoaktiviteleri ve çok düşük toksisiteleri nedeniyle önemli doğal antioksidanlar içerir ve serbest radikallerin sebep olduğu oksidatif stresi önlemede önemli ölçüde kullanılmaktadırlar (Akbari vd., 2022). Serbest radikaller son yörüngelerinde en az bir adet eşlenmemiş elektron bulunduran atom veya moleküllerdir. Bu atom ve molekül grubu kararlı hale gelebilmek için diğer moleküllerle reaksiyona girme eğilimindedirler. Bu şekilde reaksiyona girdiğinde ise kararlı hale gelmek için reaksiyona girdiği molekülü kararsız hala getirerek serbest radikal haline çevirir. Bu durum zincirleme bir şekilde devam eder ve iki serbest radikal birbiri ile reaksiyona girene kadar bu süreç sonlanmaz (Juan vd., 2021). Serbest radikaller temelde oksijen (O) ve nitrojen (N) kaynaklı olmak üzere iki gruba ayrılmaktadırlar. Serbest radikallerin reaktif oksijen türlerinden örnekleri hidroksil (OH), peroksil ve süperoksit (O²⁻) radikalleri şeklinde sayılabilir. Nitrojen kaynaklı serbest radikaller ise nitrik oksit (NO) ve nitrojen dioksittir (NO₂). Kaynak olarak baktığımızda serbest radikaller endojen ve eksojen kaynaklı olarak meydana gelebilmektedirler. Hücre organellerinden olan ve enerji üreten mitokondri endojen üretim noktasıdır. Eksojen üretim yerleri (Şekil 1.1) ise ultraviyole ışınlar (uv), kirlilik, tütün, ilaçlar, duman, ksenobiyotikler veya iyonlaştırıcı radyasyon gibi kaynaklar

olarak sıralanabilir. Aerobik organizmaların verimli enerji üretimi için oksijeni kullanmasının sonucu olarak, mitokondrilerin iç zarında oluşan serbest radikallerin normal seviyenin üzerinde olduğu durumda, kompleks besin olan lipitlerde, proteinlerde, kalıtım yapılarımız olan nükleik asitler, gen ve nükleotidlerde mutasyonel ve yapısal bozukluklar oluşturmak kaydıyla organizmaya çeşitli zararlar verebilmektedirler. Serbest radikaller vücutta düşük konsantrasyonda bulduklarında canlılarda yararlı etkilerinden bahsedilebilir (Karabulut, 2016; Gülay, 2016).



Şekil 1.1. Serbest radikal oluşumuna neden olan dış faktörler.

Bazı durumlarda hücreler yüksek konsantrasyonlarda serbest radikaller üretebilirler. Bu durumun sonucu olarak hücrelerde serbest radikal birikmesi meydana gelebilir. Bu durumun sonucu olarak mevcut antioksidan savunma sistemi, serbest radikallerin etkisini tamamen önleyemez. Bu noktada oksidatif stres olarak adlandırılan durum meydana gelmektedir (Pizzino vd., 2017).

Serbest oksijen radikalleri oksidatif stres kaynağıdır. Oksidatif stres, hücrenin metabolik faaliyetleri sonucunda oluşan reaktif oksijen türleri (ROS) ve reaktif nitrojen türlerinin (RNS) organizmaya zararlı olan toksik maddelerden arınmasına neden olan antioksidanların yetersizliği sonucu oksidatif dengenin bozulması şeklinde tanımlanmaktadır (Biswass vd., 2017).

Çalışma materyali olarak kullanılan *Trifolium pratense* var. *pratense* türünün tıbbi amaçlarla veya diyet besini olarak kullanıldığına dair herhangi bir bilgiye ulaşılamamıştır. Bitki ülkemizin çeşitli bölgelerinde yayılış göstermektedir. Literatür taraması sonucunda *Trifolium pratense* var. *pratense* ile ilgili olarak yürüttüğümüz çalışma konusunda daha önce yapılmış kapsamlı herhangi bir çalışma bulunmadığı sonucuna varılmıştır.

Mevcut tez çalışmamızda *Trifolium pratense* var. *pratense* bitkisinin ülkemiz genelinde yayılış gösteren tür olarak, farklı fitokimyasal bileşime sahip olduğu düşünülerek bitkinin vejetasyon döneminde toplanan toprak üstü kısımlarının etil asetat ve metanol olmak üzere iki farklı özütünün biyolojik aktivitelerinin ortaya çıkarılması amaçlanmıştır. Buna bağlı olarak bitkinin toplam flavonoid ve fenolik içeriklerinin yanı sıra HPLC analizi ile bitkinin fitokimyasal bileşimi tespit edilmeye çalışılmıştır. PBD testi ile toplam antioksidan kapasite tespit edilmiştir. FRAP testi ile iyon indirgeme potansiyelinin belirlenmesi ve DPPH testi ile serbest radikal giderme aktiviteleri belirlenmiştir. Bu çalışma *Trifolium pratense* var. *pratense* bitkisi özelinde yapılan ilk fitokimyasal profil araştırması olması bakımından önem arz etmektedir. Bu noktada literatürdeki boşluk değerlendirildiğinde çalışmanın sonucundan elde edilecek verilere göre bitki ile ilgili yapılabilecek yeni çalışma alanlarına kapı aralaması beklenmektedir.

2. KAYNAK ÖZETLERİ

2.1 *Trifolium Pratense* Var *Pratense* Türünün Sistematik Şeması

Trifolium pratense var. *pratense*, Fabaceae (baklagiller) familyasına ait çok yıllık bir bitkidir. Bu bitkinin sistematik sınıflandırılması, bitkinin taksonomik hiyerarşisini ve biyolojik ilişkilerini anlamak açısından önemlidir. *Trifolium pratense* var. *pratense*'nin sistematik şeması şu şekildedir (Çizelge 2.1):

Çizelge 2.1. *Trifolium pratense* var *pratense*'nin sistematik şeması

Alem	: Plantae
Şube	: Magnoliophyta
Sınıf	: Magnoliopsida
Takım	: Fabales
Familiya	: Fabaceae
Cins	: <i>Trifolium</i>
Tür	: <i>Trifolium pratense</i>
Alt tür	: <i>Trifolium pratense</i> var. <i>pratense</i>

Botanik özelliklerine baktığımızda yapraklar, üçlü yaprakçıklar şeklindedir ve genellikle oval veya yuvarlak şekillidir. Yaprakçıkların kenarları dişli olabilir. Çiçekler ise pembe veya kırmızı renkte olup küresel çiçek başları oluşturur. Kök sistemi, derin ve yaygın kök sistemi, bitkinin su ve besin maddelerini verimli bir şekilde almasını sağlar.

2.2 Serbest Radikaller

Serbest radikaller canlı organizmalarda kimyasal reaksiyonlar sırasında oluşan ve hücrelerimizde zarar oluşturabilen reaktif moleküllerdir. Serbest radikaller, bir veya daha fazla eşlenmemiş elektrona sahip atomlar, moleküller veya iyonlardır. Bu özellikleri, onları oldukça reaktif ve kararsız kılar. Vücudumuzda serbest radikallerin oluşumu ve bunların zararlı etkileri üzerine yapılan çalışmalar, bu moleküllerin yaşlanma, kanser ve çeşitli kronik hastalıklardaki rollerini anlamada önemli bilgiler sunmaktadır (Halliwell ve Gutteridge, 2015).

Serbest radikaller, hem endojen hem de eksojen faktörlerin etkileriyle oluşabilmektedir. Endojen faktörler arasında mitokondriyal solunum, NADPH oksidazlar, lipoksijenazlar, immün sistemin aktivitesi, sitokrom P450 ve çeşitli enzimatik reaksiyonlar bulunmaktadır. Eksojen faktörlerde ise çevresel kirleticiler, sigara dumanı, radyasyon, ilaçlar, çeşitli kimyasallar gibi kaynaklar yer almaktadır. Örneğin, vücutta enerji üretimi sırasında mitokondrilerde oksijen kullanımını serbest radikallerin oluşumuna yol açabilir (Sies, 2017).

Serbest radikaller başlıca reaktif oksijen türleri ve reaktif nitrojen türleri olmak üzere iki başlık altında sınıflandırılır (Çizelge 2.2). Bu sınıflandırmada bulunan ve en yaygın olan serbest radikaller arasında süperoksit anyonu ($O_2^{\bullet-}$), hidroksil radikali (OH^{\bullet}) ve nitrik oksit (NO^{\bullet}) bulunur. Hidroksil radikali, bilinen en reaktif serbest radikaldir ve hücrel bileşenlerle hızla reaksiyona girerek büyük hasarlara yol açabilir. Süperoksit anyonu ve nitrik oksit ise daha az reaktif ancak yine de biyolojik sistemlerde önemli zararlara neden olabilir (Pham-Huy vd., 2008). Serbest radikaller, hücrelerde proteinler, lipitler ve DNA gibi biyomoleküllerle reaksiyona girerek oksidatif stres adı verilen duruma yol açar.

Çizelge 2.2. Reaktif oksijen türleri ve reaktif nitrojen türlerinin sınıflandırılması (Nene, 2020).

Reaktif Oksijen Türleri		Reaktif Nitrojen Türleri	
Hidrojen peroksit	H_2O_2	Nitrik oksit	NO
Singlet oksijen	1O_2	Lipid peroksil	LOO^{\bullet}
Hipoklorik asit	HOCl	Nitrojen dioksit	NO_2
Ozon	O_3	Peroksinitrit	$ONOO^-$
Peroksit	ROOH		

Serbest radikaller ikili bir rol oynamaktadırlar. Düşük veya orta konsantrasyonlarda tutulduğunda, serbest radikaller organizma için çeşitli yararlı roller oynar. Örneğin, bazı hücrel yapıları sentezlemek ve patojenlerle savaşmak için konak savunma sistemi tarafından kullanılmak için gereklidirler. Fagositler, istilacı patojenik mikroplar yok edildiğinde sentezledikleri ve depoladıkları serbest radikalleri serbest

bırakılırlar. ROS'un bağışıklık sistemi için temel rolü, granüloamatöz hastalığı olan hastalar tarafından iyi bir şekilde örneklendirilmiştir. Bu kişiler, kusurlu bir NADPH oksidaz sistemi nedeniyle O^{2-} üretemezler, bu nedenle birden fazla ve çoğu durumda kalıcı enfeksiyonlara eğilimlidirler. Serbest radikaller ayrıca bir dizi hücrel sinyal yolunda da görev alırlar.

Fagositik olmayan NADPH oksidaz izoformları tarafından üretilebilirler. Bu gibi durumlarda, serbest radikaller fibroblastlar, endotel hücreleri, vasküler düz kas hücreleri, kardiyak miyositleri ve tiroid dokusu gibi çeşitli hücre tiplerinde hücre içi sinyalleme kaskadlarında önemli bir düzenleyici rol oynar. Sinyalleme molekülü olarak hareket eden en iyi bilinen serbest radikal nitrik oksittir (NO). Uygun bir kan akışı modülasyonu için gerekli olan önemli bir hücre habercisidir. Trombozda rol oynar ve normal sinirsel aktivite için çok önemlidir (Pacher vd., 2007).

NO ayrıca, hücre içi patojenleri ve tümör hücrelerini ortadan kaldırmak için gerekli olan spesifik olmayan konak savunmasında da rol oynamaktadır. Serbest radikallerin bir diğer fizyolojik aktivitesi, mitojenik bir yanıtın indüklenmesidir. Özetle, düşük veya orta seviyelerde tutulduğunda serbest radikaller insan sağlığı için oldukça önemlidirler (Pizzino vd., 2017).

2.3 Oksidatif Stres

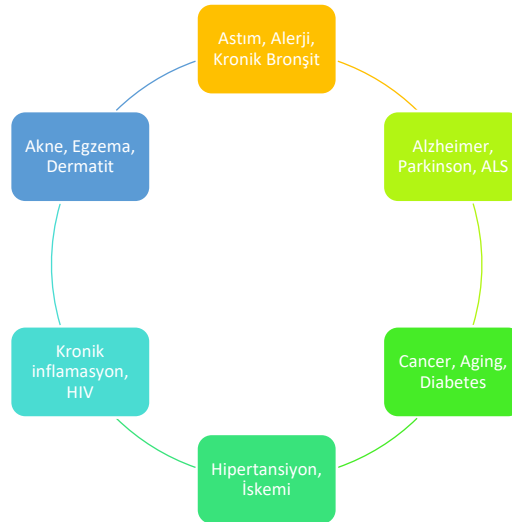
Oksidatif stres, serbest radikaller ve antioksidan sistemler arasındaki dengenin bozulması sonucu oluşan ve hücrel hasara yol açan bir durum olarak tanımlanmaktadır. Serbest radikaller, vücudumuzda oksijenin kullanılmasıyla enerji üretimi gibi normal biyokimyasal süreçler sırasında ve çeşitli çevresel faktörlerin de etkileriyle oluşmaktadır (Çizelge 2.3).

Antioksidanlar ise bu serbest radikalleri nötralize ederek hücreleri korumakla görevlilerdir. Ancak, serbest radikallerin aşırı üretimi veya antioksidan savunma mekanizmalarının yetersiz kalması durumunda meydana gelen dengesizlik oksidatif stresi meydana getirmektedir (Sies, 2017).

Çizelge 2.3. Serbest radikal oluşumuna sebep olan endojen ve eksojen kaynaklar (Karabulut ve Gülay, 2016).

Endojen kaynaklar	Eksojen kaynaklar
Mitokondride aerobik solunum sırasında.	UV-ışınları, X-ray, mikrodalga ışınları.
Lipid peroksidasyonu ve ksantin oksidaz gibi kaynaklar.	Organik maddelerin yakılması.
Düz kas hücreleri, araşidonik asit ve plateletlerin metabolizması.	Volkanik faaliyetler.
Sitokrom-p450 sistemi.	Karbonmonoksit ve asbest gibi hava kirleticileri.
İmmün sistem hücreleri.	Pestisit, insektisit gibi kimyasallar.
Vücut yorgunluğundan veya zihinsel olarak oluşan stres.	Alkol ve sigara kullanımı.

Oksidatif stres, hücrelerde lipitler, proteinler ve DNA gibi makromoleküllere zarar verebilmektedir. Bu hasar, hücre fonksiyonlarının bozulmasına ve hücre ölümüne kadar gidebilen bir sürece yol açabilmektedir. Oksidatif stresin uzun vadede, yaşlanma sürecini hızlandırabilmesi, kanser, kardiyovasküler hastalıklar, diyabet ve nörodejeneratif hastalıklar gibi kronik hastalıkların gelişimine de sebep olduğu tespit edilmiştir (Şekil 2.1) (Liguori vd., 2018)

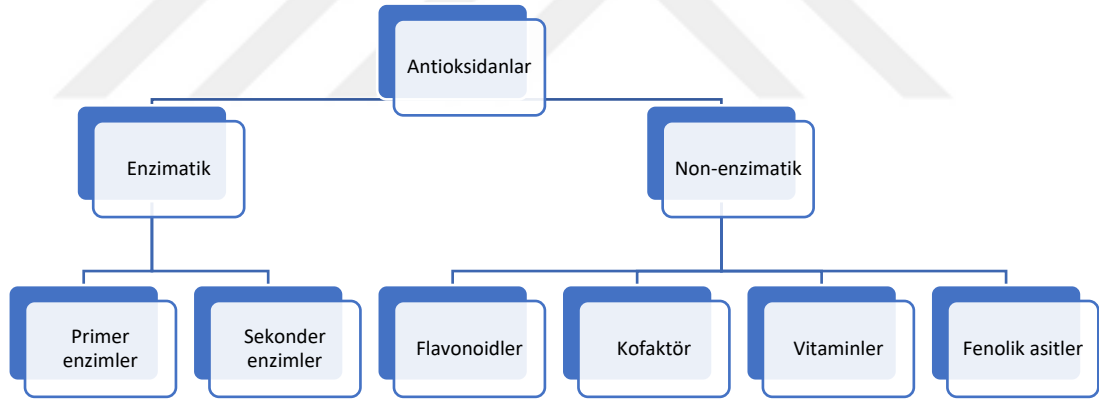


Şekil 2.1. Oksidatif stresin sebep olduğu hastalıklar (Kıran vd., 2023).

Vücutumuz, serbest radikallerin zararlı etkilerini dengelemek için diyetle alınan antioksidanlara ihtiyaç duyarken bunun yanında doğal antioksidan savunma mekanizmalarına da sahiptir. Antioksidan açısından zengin besinlerin tüketimi, oksidatif stresin neden olduğu hücre hasarı önlemeye yardımcı olabilir (Halliwell, 2006).

2.4 Antioksidanlar

Antioksidanlar bir hedef moleküle oksidatif hasarı geciktiren, engelleyen veya ortadan kaldıran herhangi bir madde olarak tanımlanmaktadır (Halliwell, 2007). Genel olarak, antioksidan savunma mekanizmaları enzimatik ve enzimatik olmayan sistemler olarak gruplandırılır. ROS detoksifikasyonunun enzimatik mekanizmaları, bu reaktif türlerin tam detoksifikasyonuna yol açan enzimatik kaskadlardır. Enzimatik olmayan antioksidatif sistemler, enzimatik olanlar kadar spesifik değildir, ancak yine de antioksidatif savunmanın ilk sırasında yer alırlar ve bu nedenle hücre oksidatif strese yanıtta büyük önem taşırlar (Augustyniak vd., 2010).



Şekil 2.2. Enzimatik ve non-enzimatik antioksidanlar (Carocho ve Ferreira, 2013).

Antioksidan maddeler doğal veya sentetik olabilir. Doğal antioksidanlar tamamen doğal kaynaklardan elde edilir ve bir süredir gıda, kozmetik ve ilaç endüstrilerinde kullanılmaktadır. Öte yandan sentetik antioksidanlar kimyasal sentezle oluşturulan maddelerdir (Mahmoud vd., 2021).

Sentetik antioksidanlar, doğal olanların yerine kullanılmıştır, bunun başlıca nedeni daha yüksek stabilite ve performans, düşük maliyetler ve geniş bulunabilirlik sunmalarıdır. Gıda endüstrisinde en çok referans alınan sentetik antioksidanlar bütillenmiş hidroksianisol (BHA), bütillenmiş hidroksitoluen (BHT), propil gallat (PG) ve tert-bütül hidrokinondur (TBHQ). Sentetik antioksidanlar yaygın olarak kullanılmasına rağmen zamanla sağlık açısından risk oluşturduğu tespit edilmiştir. (Lourenço vd., 2019). Bu durum doğal antioksidan kaynaklarının keşfine ve mevcut doğal antioksidanların kullanımında artışa sebep olmuştur. Doğal antioksidanlar gıda ve tıbbi bitkilerde yaygın olarak bulunmaktadır. Bu doğal antioksidanlar, özellikle polifenoller ve karotenoidler, anti-inflamatuar, anti-aging, anti-ateroskleroz ve antikanser gibi çok çeşitli biyolojik etkiler gösterir. Gıda ve tıbbi bitkilerden antioksidanların etkili bir şekilde çıkarılması ve uygun şekilde değerlendirilmesi, potansiyel antioksidan kaynaklarını keşfetmek ve fonksiyonel gıdalarda, ilaçlarda ve gıda katkı maddelerinde uygulamayı teşvik etmek için çok önemlidir (Xu vd., 2017).

2.5 Fitokimyasallar

Fitokimyasallar, bitkilerde doğal olarak bulunan ve insan sağlığı üzerinde olumlu etkileri olan kimyasal bileşiklerdir. Bu bileşikler, bitkilerin kendilerini zararlılardan, hastalıklardan ve çevresel streslerden korumalarına yardımcı olur. Fitokimyasallar, antioksidan, anti-inflamatuar, antimikrobiyal ve antikanser gibi çeşitli özellikleriyle bilinmektedir. Bu nedenle, fitokimyasallar açısından zengin gıdaların tüketimi, sağlığın korunması ve hastalıkların önlenmesinde önemli bir rol oynar (Dillard ve German, 2000).

Fitokimyasallar, çeşitli sınıflara ayrılabilir ve her sınıf farklı biyolojik aktiviteler sergiler. Fitokimyasallar, vücutta çeşitli biyolojik süreçlere müdahale ederek sağlık üzerinde olumlu etkiler yaratır. Antioksidan özellikleri sayesinde, serbest radikalleri nötralize eder ve oksidatif stresi azaltır. Bu, hücresel hasarı önlemede ve kronik hastalıkların gelişme riskini azaltılması noktasında önemlidir. Anti-inflamatuar etkileri, inflamasyonla ilişkili hastalıkların (örneğin, artrit, kalp hastalıkları) tedavisinde yardımcı olabilir. Ayrıca, bazı fitokimyasallar antimikrobiyal özellikleriyle enfeksiyonlara karşı koruma sağlar ve bağışıklık sistemini güçlendirir (Liu, 2004). Başlıca fitokimyasal sınıfları flavonoidler, tanenler, glukozinolatlar,

ligninler, fenolik asitler, alkaloidler, terpenoidler ve saponinler olarak karşımıza çıkmaktadır.

Flavonoidler, bitkilerden elde edilen ve birçok bitki bölümünde bulunan doğal olarak üretilen bileşiklerdir. Bunlar, yaygın olarak dağılmış düşük moleküler ağırlıklı fenolik moleküllerin bir sınıfıdır ve gelişmiş bitkilerde bulunan benzersiz özelliklere sahip molekül sınıfları arasındadır (Hasnat vd., 2024). Flavonoidler ayrıca meyve, sebze, çay, kakao ve şarap gibi bitki kökenli yiyecek ve içeceklerde bol miktarda bulunur. Flavonoidler; anti-inflamatuar, antibakteriyel, antiviral, antialerjik, sitotoksik antitümör, nörodejeneratif hastalıkların tedavisi, vazodilatör etki gibi birçok çeşitli biyolojik aktivelere sahiptirler.

Karotenoidler canlı organizmalardaki kırmızı, sarı ve turuncu renklendirmeden sorumlu biyoaktif pigmentlerdir. Kimyasal yapılarında çoklu konjuge çift bağlardan oluşan kromoforlar, karotenoidlere sarıdan turuncuya ve kırmızıya kadar renkler verir (Meléndez-Martínez vd., 2007). Bitkilerde sekonder metabolitler olarak, insan diyetinde biyoaktif besin maddeleri olarak da görev alırlar, A vitamini öncülleri ve antioksidanlar olarak hareket ederler ve yaşa bağlı makula dejenerasyonu, kardiyovasküler hastalıklar, obezite ve kanserler dahil olmak üzere çeşitli hastalıklara karşı dirençte önemli roller oynarlar (Hermanns vd., 2020).

Glukozinolatlar (GSL'ler), Brassicaceae familyasındaki biyoaktif ikincil metabolitlerin başlıca sınıfı olan amino asitlerden üretilen kükürt içeren ikincil metabolitlerdir. GSL'lerin çeşitli yapıları, çok çeşitli işlevler sunarak onları bitki bileşiklerinin incelenmesi için ideal bir model haline getirir (Cheng vd., 2024). Cruciferae, Brassicaceae ailesine ait lahanalar, brokoli, Brüksel lahanası, turp ve karnabahar gibi sebzeler yüksek GSL içeriğine sahiptir. GSL, kardiyometabolik, nörolojik ve kas-iskelet sistemi süreçleri gibi birçok fizyolojik süreçte önemli bir rol oynar (Maina vd., 2020). GSL'ler ve türevleri antifungal, antibakteriyel, biyoherbisit, antioksidan, antimutajenik ve antikarsinojenik gibi özelliklere sahiptir (Vig vd., 2009).

Fenolik asitler bitkilerde bulunan bir grup ikincil metabolitlerdir ve güçlü antioksidan özelliklere ve çeşitli biyolojik aktivitelere sahiptirler. Bu doğal bileşikler anti-inflamatuar, anti-kanser, anti-bakteriyel, anti-alerjik, anti-viral, anti-trombotik ve serbest radikal temizleyiciler gibi geniş bir yelpazede faydalı etkiler sergilerler.

(Vargas-Ramella vd., 2021). Tam tahıllar, meyve ve sebzelerde bulunurlar. Fenolik asitler, kalp hastalıkları ve kanser riskini azaltabilir (Shahidi ve Yeo, 2018).

Saponinler, çeşitli bitki türlerinde ve bazı deniz organizmalarında bulunan, doğal olarak oluşan çeşitli bir kimyasal bileşik sınıfıdır (Juang ve Liang, 2020). Çeşitli biyoaktif bileşiklerden oluşan saponinler, çeşitli insan gıda kaynaklarında bol miktarda bulunur ve diyetlerimizi çeşitli sağlık geliştirici elementlerle zenginleştirir. Saponinler, bitkilerin çoğunda yaygın olarak bulunan ve doğası gereği uçucu olmayan doğal glikozidik bileşiklerdir (Góral ve Wojciechowski, 2020). Kolesterol düşürücü etkileri ile bilinirler ve bağışıklık sistemini güçlendirebilirler (Shi vd., 2004).



3. MATERYAL VE YÖNTEM

3.1 Bitki Materyali

Tez materyali olan *Trifolium pratense* var. *pratense* bitkisi Aksaray ili merkez ilçesi sınırları içerisindeki Yuva kasabasından vejetasyon dönemi içerisinde toplanmıştır. Bitki Aksaray üniversitesi İktisadi ve İdari Bilimler Fakültesinde görev yapan Dr. Öğr. üyesi Bülent ESKİN ve Mustafa KESKİN tarafından tanımlanmıştır.

3.2 Bitki Özütlerinin Hazırlanması

Bitki örnekleri gölge bir ortamda kurutulmuştur. Kurutulduktan sonra örnekler laboratuvar tipi blender yardımıyla öğütülmüştür. Öğütülmüş bitki materyali 15'er gr tartıldıktan sonra özüt çıkarmak üzere balon jodelere aktarılmıştır. Çözücü olarak her bir numune için 250'şer ml metanol ve etil asetat kullanılmıştır.

Özüt çıkartma işlemi ultrasonik su banyosu kullanılarak tamamlanmıştır. Bu işlemde geçirilen örnekler filtre kağıdından iki defa geçirilerek süzümüştür. Örnekler 150 rpm dönme hızında 50-60 °C sıcaklıkta çalışan Rotary Evaporatör cihazı yardımıyla saf hale getirilmiştir. Hazırlanan özütler analiz sürecine kadar -20 °C'de depolanmıştır. Her bir test için stok çözeltiler 2 mg/ml konsantrasyonda hazırlanmıştır.

3.3 Antioksidan Aktivite Metotları

3.3.1 Toplam fenolik içerik (TPC)

Folin-Ciocalteu yönteminde yapılan ufak revizyonlarla toplam fenolik içerik test edilmiştir (Juranović Cindrić vd., 2011; Agbor vd., 2014). Özetle, 1.5 ml saf su, 0.5 ml %7'lik Na₂CO₃ sırasıyla eklenerek karıştırılmıştır. 3 dakika süre ile beklenecek şekilde hazırlanan stok örneklerden 0.2 ml alınmıştır. Daha sonra Folin-Ciocalteu reaktifinden 1 ml ilave edilmiştir.

Gallik asitin 100, 50, 25, 12.5 µg/ml konsantrasyonlarından alınmak kaydıyla aynı yöntemler uygulandı. Kör ölçümünde 0.2 ml metanol, numune yerine kullanılmıştır. Daha sonra karanlık bir ortamda 2 saatlik zaman sürecinde 25 °C inkübe edilen örneklerin absorbansları 760 nm'de belirlendi. Örneklerin fenolik oranlarındaki değişikliğinden dolayı yeşil tondan mavi tona doğru renk farklılığının tespit ettiği

gözlemlendi. Numuneler üç tekrar şeklinde ölçülmüştür. Örneklerin fenolik içerikleri gallik asit eşdeğeri olacak şekilde standardın absorbans konsantrasyon grafiğinde belirlenmiş olan denklemden faydalınalarak saptanmıştır.

3.3.2 Toplam flavonoid içerik (TFC)

Toplam flavonoid içerik Arvouet-Grand vd., (1994)'nin metoduna göre spektrofotometrik olarak saptanmıştır. Bu testte, hazırlanan özütten 1 ml alınıp ardından hazırlanan 1 ml %2'lik AlCl₃ ile çözelti karıştırılmıştır. Kör olarak 1 ml özüt ve 1 ml metanol karışımı kullanılmıştır.

Rutin'in farklı yoğunluklarında standart olarak hazırlanan homojen karışımlar kullanılmıştır. Numuneler normal şartlar altında 10 dakika süreden sonra 415 nm'de köre karşı absorbans seviyeleri belirlenmiştir. Numunelerin flavonoid muhtevası kuersetin eşdeğeri(QE) standartı absorbans yoğunluk denklemi grafiğinden elde edilmiştir.

3.3.3 DPPH serbest radikal giderme aktivitesi

Bitki ekstralarının DPPH serbest radikal giderme faaliyeti Sarikurkcu vd., (2008)'nin yönteminde ufak değişikliklerle uygulanmıştır. Yöntem için DPPH'ın mM'lık homojen karışım yapılmıştır. Sabit değişken tüpüne 1 ml DPPH homojen karışımı ve 1 ml metanol, kör tüpüne ise sadece metanol bırakılmıştır. Numuneler için ise 1 ml DPPH, farklı yoğunluklarda hazırlanmış olan 1 ml özüt yerine normal şartlar altında ışık almayan yerde 30 dk. zaman dahilinde inkübasyona bırakılmıştır. Bu sürenin bitiminde 517 nm'de numunelerin, standartların ve kontrol absorbansları ölçülmüştür. DPPH radikali inhibe oranları (%I) 3.1'de ki formüle göre hesaplanmıştır.

$$\%I = 100 \times (A_0 - A_1) / A_0 \quad (3.1)$$

(A₀:Kontrolün absorbansı, A₁:Özütün absorbansı)

3.3.4 Demir indirgeme antioksidan gücü (FRAP)

Bu teknikte bitki ekstralarının demir elementlerinin iyon halini indirgeme gücü seviyesinin belirlenmesi ilkesine bağlı olarak gerçekleştirilmiştir (Aktumsek vd., 2013). İlk önce 10 ml saf su, 31.2 mg TPTz ve 50 µl hidroklorik asit karışımında çözülmüştür. Daha sonra 10 ml saf suda 32 mg FeCl₃ eklenerek çözülmüştür. En son olarak 4.1 ml asetik asit sıvımıza (%80) 250 ml saf su katılarak 0.66 gr sodyum asetat homojen karışım içerisinde hepsi karışım olana kadar karıştırma işlemi yapılmıştır.

Tampon, TPTz 10/1/1 ve FeCl₃ oranlarında karıştırılmıştır ve çözeltinin 2 ml'si ile 0.1 ml bitki ekstresi hazırlanıp sonrasında 30 dakika 30 santigrat derecede uygun sıcaklıkta bekletilmiştir. Normal olarak troloks homojen karışımının farklı yoğunlukları (25, 50, 100, 75, 150, ve 200 µg/ml) ekstre için kullanılmıştır. Etkenin ortaya çıkış sürecinde, örneklerin absorbans değerleri 593 nm'de belirlenmiştir.

3.3.5 Toplam antioksidan kapasite (PBD)

Bütünsel antioksidan potansiyeli Cakmak vd., (2012)'nin metodu olan fosfomolibdenum göre uygulanmıştır. Test için 3 farklı homojen karışım yapıp devamında karıştırma ile reagent homojeni hazırlanmıştır. Çözeltiler 4 mM amonyum molibdat, 28 mM sodyum fosfat ve 6 M sülfürik asit çözeltileri karıştırılarak elde edilmiştir. Daha sonra elde ettiğimiz çözeltiden 3 ml eklenerek üstüne farklı yoğunluklardaki (0.0625-1 mg/ml) askorbik homojen karışım asiti ve 0.1 ml özüt katılmıştır.

0.3 ml metanolde kör için katılmıştır. Sonrasında tüpler 95 °C'de 90 dakikalık süre içerisinde inkübe olduktan sonra 695 nm'de absorbans seviyeleri ortaya çıkmıştır. Elde edilen veriler akarboz eşdeğerinde (AE) verilmiştir.

3.4 Yüksek Basıncılı Sıvı Kromatografi Analizleri (HPLC/DAD)

Farklı ekstraların fenolik bileşim analizi, Caponio vd. (1999) tarafından verilen teknikle ve değiştirilen küçük eklemelerle elde edilmiştir. Analizde kullandığımız cihaz HP Agilent marka 1200 Infinity Series modeli HPLC cihazıdır.

Hareketli faz, (A) su ve (B) metanol içinde %3 asetik asit (v/v) kullanılmıştır. Enjeksiyon hacimleri 10 µL ve ekstrakt konsantrasyonları 2 mg/ml olarak ayarlanmıştır. Eluatlar 278 nm'de tespit edilmiştir. Test edilen örnekler metanol

içerisinde hazırlanmıştır. Elüsyon gradyanından faydalanılmıştır ve takip oranı ; %93 A-%7 B (0,1 dk), %72 A-%28 B (20 dk), %75 A-%25 B (8 dk), %70 A- %30 B (7dk); ve 15 dakika süresince benzer gradyan %67 A-%33 B (10 dakika), %58 A-%42 B (2 dakika), %50 A-%50 B (8 dakika), %30 A-%70 B idi (3 dk), %20 A-%80 B (2 dk) ve %100 B çalışmanın son 5 dakikası süresince kullanılmıştır. Çalışmamızda, (ppm=mg/kg-mg/L) olarak ifade edilen her bir bileşik her bir ekstre için belirlenerek incelenmiştir.



4. ARAŞTIRMA BULGULARI VE TARTIŞMA

Çalışmada kullanılan bitki materyali Yuva Kasabasından vejetasyon döneminde toplanmıştır. Kurutulan numunelerin metanol ve etil asetat ekstraksiyonları hazırlanmıştır. Ekstraktların antioksidan kapasite tayin yöntemleri olarak toplam antioksidan kapasite testi (Fosfomolibdat testi), DPPH (2,2-difenil-1-pikrilhidrazil) yöntemi ve FRAP olmak üzere 3 farklı metot uygulanmıştır.

Bunun dışında ekstrelerin toplam fenolik madde (Folin-Ciocalteu Yöntemi) ve toplam flavonoid madde tayini de yapılmıştır. Ayrıca HPLC ile fenolik bileşenleri de belirlenmiştir. Hazırlanan metanol ve etil asetat özütleri için tüm testler in vitro koşullarda uygulanmıştır.

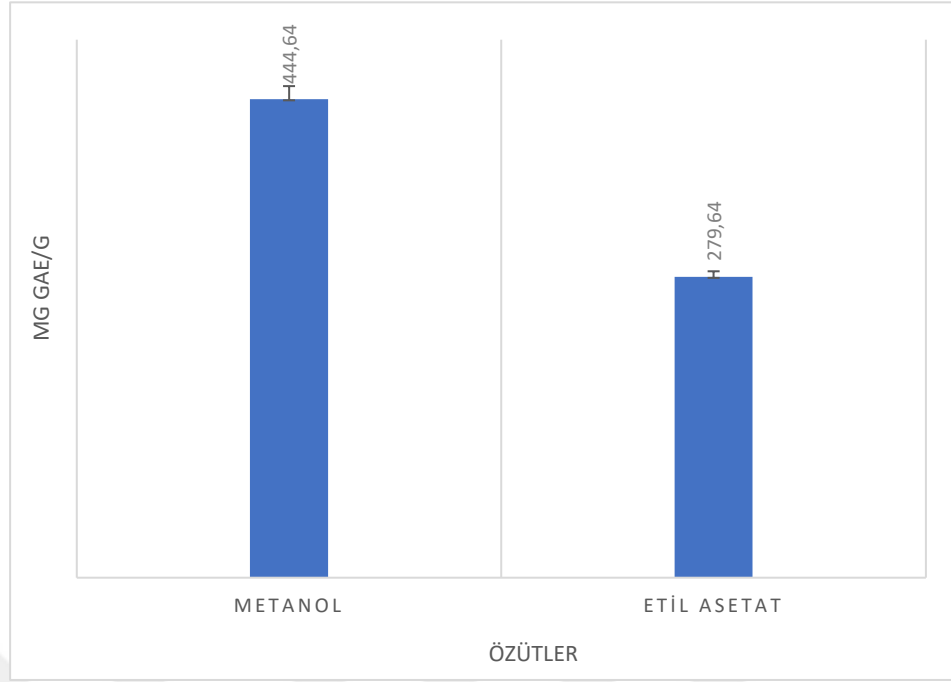
4.1 Toplam Fenolik İçerik

Bitkilerde fenolik içerik seviyesi ne kadar yüksek ise özütün serbest radikal türlerini gidermesinin o kadar yüksek olduğu ve sağlık açısından daha güçlü hale geldiği bilinmektedir (Kolaç vd., 2017; Uyar vd., 2013).

Bundan dolayı *Trifolium pratense* var. *pratense*'nin toplam fenolik içeriği etil asetat ve metanol çözücülerini kullanılarak hazırlanan özütler ile hesaplanmaya çalışılmıştır. Sonuçlar gallik asit eşdeğeri cinsinden verilmiştir. Metanol ekstraktı 444.64 ± 12.21 mg GAE/g olarak gözlemlenmiştir ve en güçlü sonuç bu özütte tespit edilmiştir. Toplam fenolik içerik açısından etil asetat özütü ise 279.64 ± 5.14 mg GAE/g olarak tespit edilmiştir. Sonuçlar Çizelge 4.1 ve Şekil 4.1'de verilmiştir.

Çizelge 4.1. *Trifolium pratense* var *pratense* özütlerinin toplam fenolik içeriği.

Özütler	GAE (mg/g)
Metanol	444.64 ± 12.21
Etil Asetat	279.64 ± 5.14



Şekil 4.1. *Trifolium pratense* var *pratense* özütlerinin toplam fenolik içeriği.

Esmaceli vd., (2015) yapmış oldukları bir çalışmada *Trifolium pratense* türünün toprak üstü kısımlarından hazırlamış oldukları metanol, n-hekzan fraksiyonu, etil asetat fraksiyonu ve kloroform fraksiyonlarının toplam fenolik içeriğini araştırmışlardır. Çalışmanın sonucunda en iyi sonucu 31.94 ± 1.68 mg GAE/g olarak metanol özütünde tespit ettiklerini bildirmişlerdir. Bir diğer çalışmada ise Antonescu vd. (2019) *Trifolium pratense* türünün hidro-alkolik ekstraksiyonunun toplam fenolik içeriğini araştırmıştır. Çalışmanın sonucunda toplam fenolik içeriği 46.56 mg GAE/100g DW olarak bildirmişlerdir. Kolodziejczyk-Czepas vd. (2014) yapmış oldukları bir çalışmada 6 farklı *Trifolium* türünün toplam fenolik içeriğini araştırmışlardır. Çalışmanın sonucunda bitkilerin fenolik içeriklerini sırasıyla *T. alexandrinum* 52.55 mg/g, *T. incarnatum* 47.97 mg/g, *T. resupinatum* var. *majus* 22.54 mg/g, *T. resupinatum* var. *resupinatum* 17.32 mg/g, *T. hybridum* 15.24 mg/g ve *T. fragiferum* ssp. *bonanni* 11.30 mg/g olarak tespit etmişlerdir. Vlaisavljević vd. (2017) yapmış oldukları çalışmada *T. pratense* türünün 30 cm uzamış toprak üstü kısımlarının, 50 cm uzamış toprak üstü kısımlarının ve tohum kısmının metanol özütünü hazırlayarak toplam fenolik içeriklerini araştırmışlardır. Çalışmanın sonucunda tüm özütlerin toplam fenolik içeriklerini 30.99 ± 1.02 mg gallik asit eşdeğeri/g⁻¹ ve 41.96 ± 0.93 mg gallik asit eşdeğeri/g⁻¹ aralığında tespit etmişlerdir. Kaurinovic vd. (2012) çalışmalarında *T. pratense* türünün yaprak kısımlarından hazırlamış oldukları eter, kloroform, etilasetat, n-butanol ve su özütlerinin toplam fenolik içeriğini

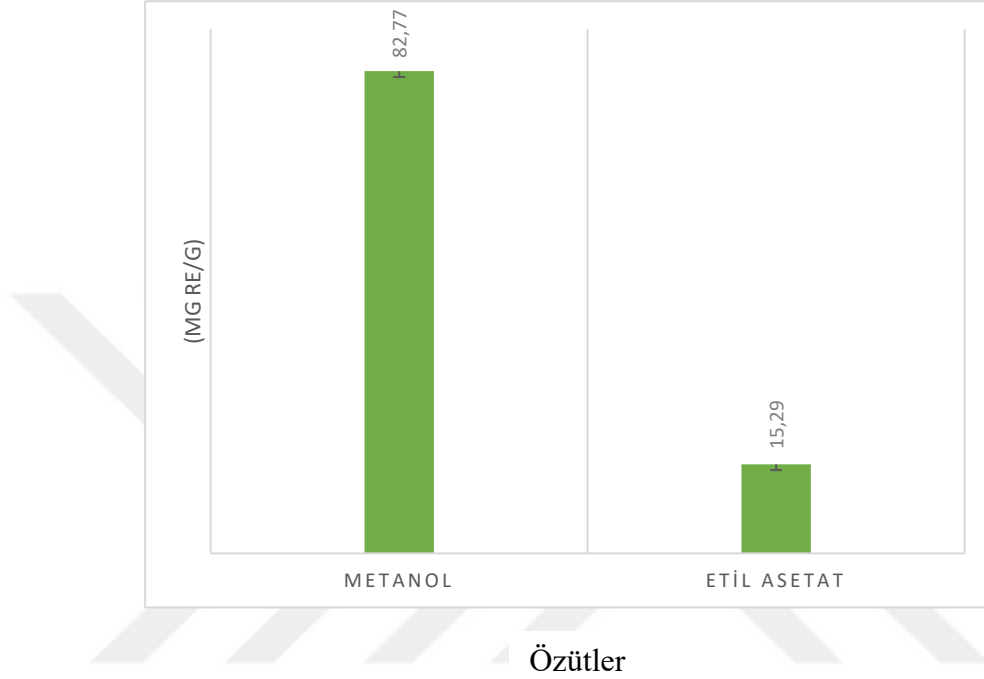
araştırmışlardır. Çalışmanın sonucunda tüm özütler için toplam fenolik içeriği $0,16 \pm 0,02$ GAE/g - $0,43 \pm 0,01$ GAE/g aralığında tespit etmişlerdir. Hanganu vd. (2017) yapmış oldukları bir çalışmada *T. pratense* ve *T. repens* türlerinin yaprak ve çiçek kısımlarından hazırlamış oldukları etanol özütlerinin toplam fenolik içeriklerini araştırmışlardır. Çalışmanın sonucunda *T. pratense* için çiçek kısmından hazırlanan özütü 61.80 ± 1.20 mg GAE/g ve yaprak kısımlarından hazırlanan özütü 76.16 ± 0.84 mg GAE/g olarak tespit etmişlerdir. *T. repens* için ise çiçek kısmından hazırlanan özütün toplam fenolik içeriğini 49.80 ± 2.20 mg GAE/g ve yaprak kısımları için hazırlanan özütlerin toplam fenolik içeriğini 62.06 ± 1.94 mg GAE/g olarak tespit etmişlerdir. Küçükboyacı vd., (2013) yapmış oldukları bir çalışmada *Trifolium pratense* var. *sativum* ve *trifolium pratense* var. *pratense* türlerinin toprak üstü kısımlarından hazırlamış oldukları metanol (%80) özütlerinin toplam fenolik içeriklerini araştırmışlardır ve çalışmanın sonucunda sırasıyla 48.60 ± 0.86 mg gallik asit/g ve 52.30 ± 1.20 mg gallik asit/g olarak tespit ettiklerini bildirmişlerdir. Erenler vd., (2024) *T. pratense* türünün yaprak kısımlarından hazırlamış oldukları metanol özütünün toplam fenolik içeriğini araştırmışlardır ve çalışmanın sonucunda toplam fenolik içeriği 82.44 ± 0.15 mg GA/g olarak tespit etmişlerdir.

4.2 Toplam Flavonoid İçerik

Bitkilerin büyüme, fotosentez, ürün dönüşüm fonksiyonlarının gerçekleşmesinde, biyolojik görevleri ve hastalık yapıcı etkenlerle mücadeledeki rolü bakımından en stratejik bileşik gruplardan birisi de flavonoidlerdir (Özyurt, 2005). Tarihsel zamanda yapılan çalışmalarda birçok bitkide 4000'den fazlaca flavonoidin izolesi ortaya çıkmış ve yapıları açıklığa kavuşturulmuştur (Bakır, 2010). Tez çalışmamız kapsamında *Trifolium pratense* var. *pratense* türünden hazırlamış olduğumuz farklı özütlerin (metanol ve etil asetat) toplam flavonoid içerikleri araştırılmıştır. Metanol ekstraktının toplam flavonoid içeriği 82.77 ± 1.01 ($\mu\text{g/g}$) QE olarak hesaplanmış ve en iyi sonuç bu özütte elde edilmiştir. Toplam flavonoid içerik bakımından etil asetat özütü ise 15.29 ± 0.73 ($\mu\text{g/g}$) QE en iyi ikinci sonuç olarak tespit edilmiştir. Analizler Çizelge 4.2 ve Şekil 4.2'de özetlenmiştir.

Çizelge 4.2. *Trifolium pratense* var. *pratense* özütlerinin toplam flavonoid içeriği.

Özütler	QE ($\mu\text{g/g}$)
Metanol	82.77 \pm 1.01
Etil asetat	15.29 \pm 0.73



Şekil 4.2. *Trifolium pratense* var *pratense* özütlerinin toplam flavonoid içeriği.

Trifolium cinsine ait yapılan diğer çalışmalarda Akbaribazm vd., (2020) *Trifolium pratense* türünün toprak üstü kısımlarından hazırlanmış oldukları hidroalkolik/alkolik özütün toplam flavonoid içeriğini araştırmışlardır. Çalışmanın sonucunda toplam flavonoid içeriği 39.21 \pm 4.26 mg RUE/g olarak bildirmişlerdir. Dragusha vd. (2023) çalışmalarında *Trifolium pratense* türünün çiçek kısımlarından hazırlanmış oldukları metanol ve su özütlerinin toplam flavonoid içeriklerini araştırmışlardır. Çalışmanın sonucunda su özütü için toplam flavonoid içeriği 1.57 \pm 0.01 mg CE/g DW ve metanol özütü için toplam flavonoid içeriği 1.36 \pm 0.02 mg CE/g DW olarak tespit etmişlerdir. Esmaceli vd. (2015) *Trifolium pratense* türünün toprak üstü kısımlarından hazırlanmış oldukları metanol özütü, n-hekzan fraksiyonu, kloroform fraksiyonu ve etil asetat fraksiyonlarının *in vivo* ve *in vitro* koşullarda toplam flavonoid içeriğini araştırmışlardır. Çalışmanın sonucunda *in vivo* koşullarda en etkili sonucu kloroform

fraksiyonunda gözlemlerken (19.56±1.11 mg RE/g) *in vitro* koşullarda en etkili sonucu metanol özütünde (13.03±0.79 mg RE/g) tespit ettiklerini bildirmişlerdir.

Kaurinovic vd., (2012) çalışmalarında *Trifolium pratense* türünden hazırlanmış oldukları farklı özütlerin (dieter, kloroform, etilasetat, n-butanol ve su) toplam flavonoid içeriğini araştırmışlardır. Çalışmanın sonucunda en yüksek içeriği 15.23±0.01 µg RE/g ile etilasetat özütünde tespit etmişlerdir.

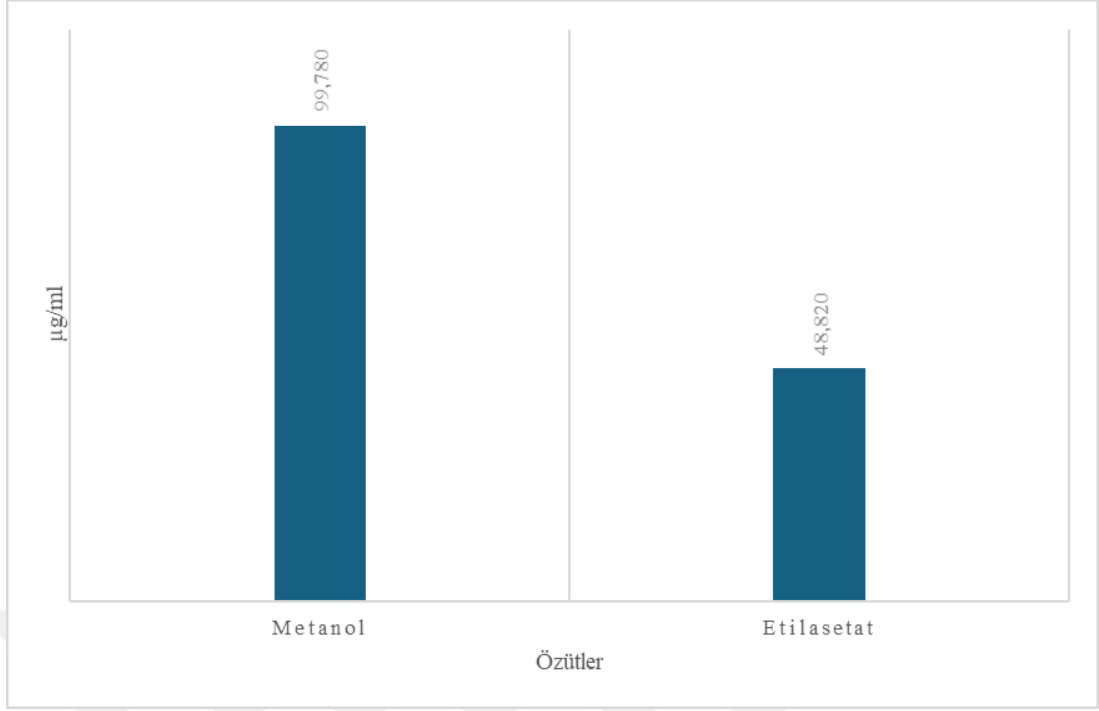
Fabaceae familyasından olan bazı türlere ait literatür taramalarına baktığımızda ise Tungmunnithum vd., (2021) yaptıkları çalışmada *Vigna unguiculata* subsp. *sesquipedalis* türü üzerinde TFC içeriğini araştırmışlardır ve çalışmanın sonucunda toplam flavonoid içeriği 13,4 ila 41,6 mgRE/100 arasında tespit etmişlerdir. Miceli vd., (2015) ise *Bauhinia forficata* türünden hazırlanmış oldukları etanol ekstraktının flavonoid içeriğini araştırmışlardır. Çalışmanın sonucunda toplam flavonoid içeriği 62.59 ± 0.32 mgQE/g olarak tespit etmişlerdir.

4.3 DPPH Serbest Radikal Giderme Aktivitesi

Özütlerin DPPH serbest radikal giderme aktivitesi Sarikurkcu vd. (2008)'in yöntemi üzerinde küçük modifikasyonlarla gerçekleştirilmiştir. DPPH serbest radikal giderme aktivitesi fenolik içerikle bağlantılı olabileceği için antioksidan aktivitenin belirlenmesi açısından ölçülmelidir. Sonuçlar radikalın %50'nin giderildiği bir konsantrasyon olarak tanımlanan IC50 cinsinden verilmiştir. *Trifolium pratense* var. *pratense* türünden hazırlanmış olduğumuz etil asetat ve metanol özütlerinin DPPH serbest radikal giderme aktiviteleri IC50 cinsinden sırasıyla 48.820±1.25 µg/ml ve 99.780±2.17 µg/ml olarak tespit edilmiştir. Sonuçlar Şekil 4.3 ve Çizelge 4.3'te özetlenmiştir.

Çizelge 4.3. *Trifolium pratense* var. *pratense* özütlerinin toplam fenolik içeriği.

Özütler	IC50 (µg/ml)
Metanol	99.780±2.17
Etilasetat	48.820±1.25



Şekil 4.3. DPPH serbest radikal giderme aktivitesi.

Kolodziejczyk-Czepas vd., (2015) yaptıkları çalışmada *Trifolium pratense* ham ekstraktı, *Trifolium pratense* fenolik fraksiyonu, *Trifolium pallidum* fenolik fraksiyonu ve *Trifolium scabrum* fenolik fraksiyonlarının farklı konsantrasyonlardaki DPPH serbest radikal giderme aktivitelerini araştırmışlardır. Çalışmanın sonucunda tüm özütlerin aktivitesinin % 25.59±1.41 ve % 91.82±0.14 aralığında tespit edildiğini bildirmişlerdir. Kaurinovic vd., (2012) çalışmalarında *Trifolium pratense* türünden hazırlamış oldukları farklı özütlerin (dietileter, kloroform, etilasetat, n-butanol ve su) DPPH serbest radikal giderme aktivitelerini incelemişlerdir. Çalışmanın sonucunda tüm özütlerin DPPH serbest radikal giderme aktiviteleri 17.47 µg/mL ve 34.19 µg/mL aralığında tespit edilmiştir. Sabudak vd., (2013) *Trifolium echinatum* türünden hazırlamış oldukları hekzan, diklorometan, etil asetat ve bütanol özütlerinin DPPH serbest radikal giderme aktivitelerini incelemişlerdir. Etil asetat özütünün aktivitesi 10.32±0.67 µM ile en düşük sonuç olarak tespit edilirken hekzan özütünün aktivitesi 129.1±1.76 µM ile en etkili sonuç olarak tespit edilmiştir. Demirkiran vd., (2013) ise çalışmalarında *Trifolium nigrescens* türünden hazırlamış oldukları hekzan, diklorometan, etilasetat ve bütanol özütlerinin DPPH serbest radikal giderme aktivitelerini araştırmışlardır. Çalışma sonucunda 12.38±0.55 µM ile en düşük aktivite etil asetat özütünde tespit edilmiştir. Hekzan özütü ise 398.65 ± 4.01 µM ile en yüksek

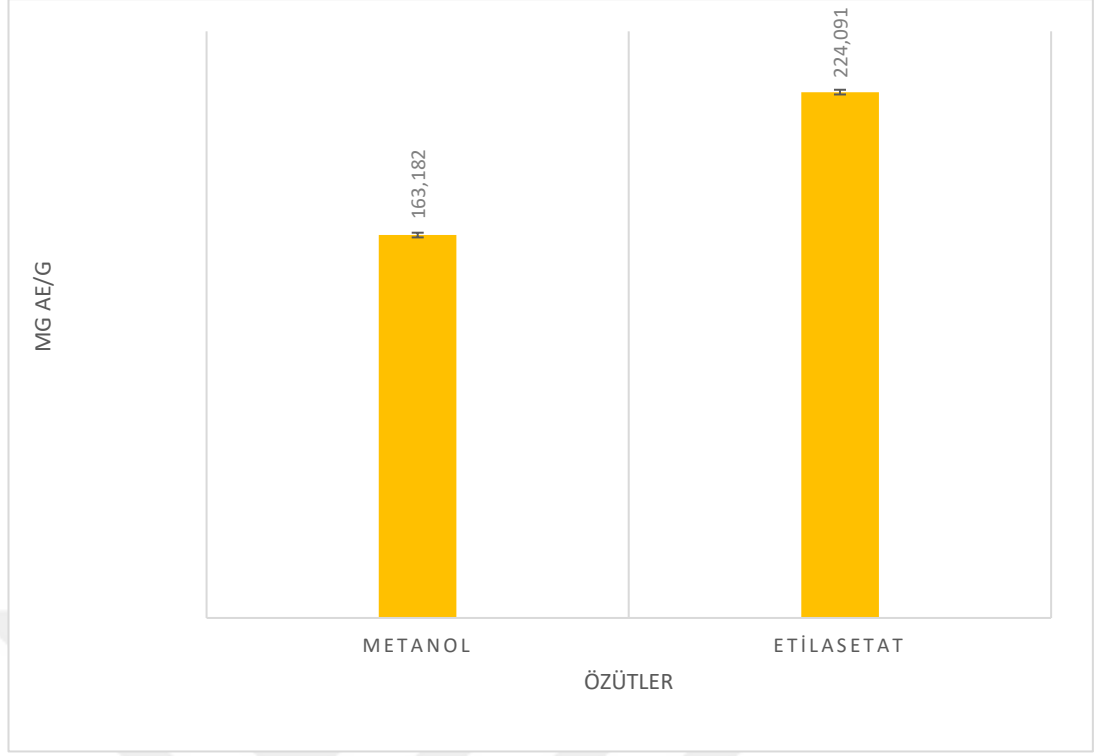
aktivite gösteren özüt olarak bildirilmiştir. Tundis vd., (2015) çalışmalarında *Trifolium pratense* ve *Trifolium repens* türlerinin etanol özütlerinin DPPH serbest radikal giderme aktivitelerini araştırmışlardır. Çalışmanın sonucunda *T. repens*'in serbest radikal süpürme aktivitesi 10.3 ± 1.2 $\mu\text{g/mL}$, *T. pratense*'nin serbest radikal süpürme aktivitesi ise 34.0 ± 1.6 $\mu\text{g/mL}$ olarak tespit edilmiştir. Antonescu vd., (2019) *Trifolium pratense* türünden hazırlamış oldukları hidro-alkolik ekstraksiyonun DPPH serbest radikal giderme aktivitesini araştırmışlardır. Çalışmanın sonucunda özütün serbest radikal giderme aktivitesini %14.49 olarak tespit etmişlerdir. Akbaribazm vd., (2020) ise yapmış oldukları bir çalışmada *Trifolium pratense* türünün toprak üstü kısımlarından hazırlamış oldukları etanol ekstraktının DPPH serbest radikal süpürme aktivitesini araştırmışlardır. Çalışmanın sonucunda serbest radikal giderme aktivitesi 149 ± 11.61 ($\mu\text{mol eq. Trolox/10 g}$) olarak bildirilmiştir.

4.4 Toplam Antioksidan Kapasite

Fosfomolibdat testi ile toplam antioksidan kapasite ölçülmüştür. Yapılan test, bir elektron aktarımı sistematığı içermektedir. Bitkilerdeki flavonoidler ve fenolikler bu testlerde ölçülebilir. Ahmed vd., (2015). Çalışmada fosfomolibdat testi ile belirlenen seviyeler trolox eş değeri türünden hesaplanmıştır. *Trifolium pratense* var. *pratense* türünün ekstratları bu testte sırasıyla etil asetat özütü için 224.09 ± 10.29 mg AE (mg/g), metanol özütü için 163.18 ± 2.57 AE (mg/g), sonuçlarını vermiştir. Sonuçlar Çizelge 4.4 ve Şekil 4.4'te verilmiştir.

Çizelge 4.4. *Trifolium pratense* var. *pratense* özütlerinin toplam antioksidan kapasitesi.

Özütler	AE (mg/g)
Metanol	163.18 ± 2.57
Etil asetat	224.09 ± 10.29



Şekil 4.4. Toplam antioksidan kapasite.

Erbil vd., (2015) yapmış oldukları çalışmada *Trifolium ochroleucum* türünün toprak üstü kısımlarından hazırlamış oldukları metanol özütünün toplam antioksidan kapasitesini araştırmışlardır. Çalışmanın sonucunda toplam antioksidan kapasiteyi 2.546 ± 0.191 mM olarak tespit etmişlerdir. Khalil vd., (2022) yapmış oldukları çalışmada *Trifolium repens*, *Dumasia villosa* ve *Medicago laciniata* türlerinin kök, yaprak ve gövde kısımlarından hazırlamış oldukları metanol, etanol ve kloroform özütlerinin toplam antioksidan kapasitesine bakmışlardır. Çalışmanın sonucunda tüm özütlerin 7.703 ± 1.20 mg/g ile 44.08 ± 0.98 mg/g aralığında olduğunu tespit etmişlerdir. Erbil vd., (2014) çalışmalarında Fabaceae familyasından *Adenocarpus complicatus* türünün farklı kısımlarından (kök, gövde, yaprak, çiçek, ve tohum) hazırlamış oldukları metanol özütünün toplam antioksidan kapasitesini araştırmışlardır.

Çalışmanın sonucunda karışık materyallerin toplam antioksidan kapasitesini 105.75 mgAE/g ve 251.53 mgTE/g, meyve kısımlarının toplam antioksidan aktivitesini ise 90.75 mgAE/g ve 207.53 mgTE/g olarak tespit etmişlerdir. Borquaye vd., (2020) çalışmalarında Fabaceae familyasının bir üyesi olan *Tamarindus indica* türünün kök ve gövde kısımlarından hazırlamış oldukları etanol özütlerinin toplam antioksidan kapasitesini araştırmışlardır. Çalışmanın sonucunda kök özütü için toplam antioksidan

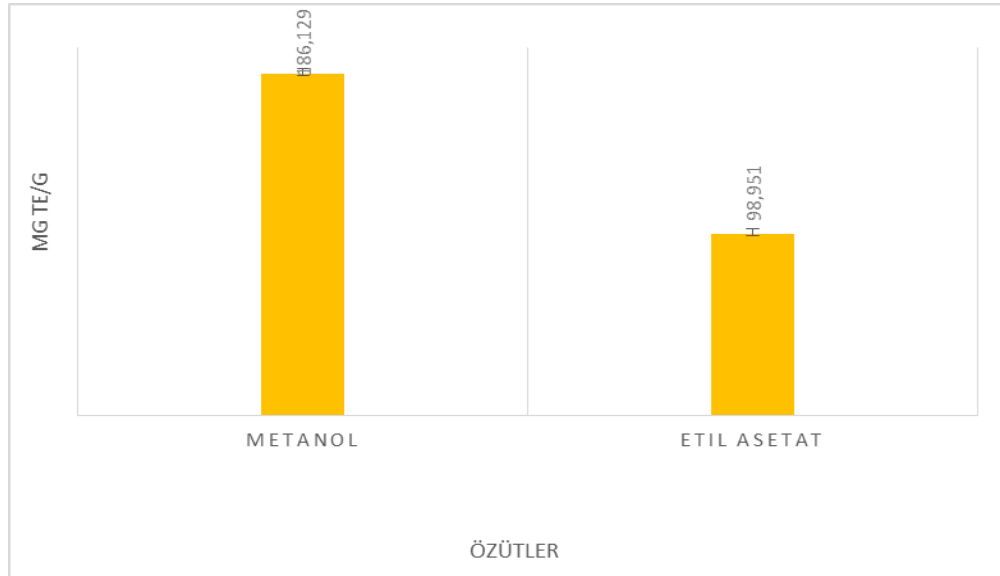
kapasiteyi 27.29 ± 3.7 g/100 g AAE ve gövde özütü için toplam antioksidan aktiviteyi 27.16 ± 4.5 g/100 g AAE olarak bildirmişlerdir.

4.5 FRAP İyon İndirgeme Gücü

Antioksidanların varlığında ve asidik bir ortamda (pH 0-7) ferrictripirydyltriazine kompleksi Fe^{+3} 'den elektron alarak Fe^{+2} 'ye indirgenir. Oluşan renkli homojen karışım 595 nm absorbansda yükselişe neden olur. Elde edilen sonuçlar troloks eşiti olarak ifade edilir (Albayrak vd., 2010). Yapılan testlerde *Trifolium pratense* var. *pratense* türünün ekstratları sırasıyla metanol özütü için 186.13 ± 3.02 mg TEs/g, etanol özütü için 98.95 ± 2.95 mg TEs/g olarak hesaplanmıştır. Çalışmamızı yaptığımız *Trifolium pratense* var. *pratense* bitkisinin demir indirgeme gücü (FRAP) sonuçları Çizelge 4.5 ve Şekil 4.5'de özetlenmiştir.

Çizelge 4.5. *Trifolium pratense* var *pratense* özütlerinin FRAP iyon indirgeme gücü.

Özütler	TE (mg/g)
Metanol	186.13 ± 3.02
Etilasetat	98.95 ± 2.95



Şekil 4.5. FRAP iyon indirgeme gücü

Kolodziejczyk-Czepas vd., (2014) yapmış oldukları çalışmalarında farklı konsantrasyonlardaki (1.5, 3, 6.25, 12.5, 25, 50 µg/ml) altı farklı trifolium türünün metanol özütlerinin FRAP iyon indirgeme güçlerini araştırmışlardır. Çalışmanın sonucunda bitkilerin FRAP iyon indirgeme güçleri en yüksek konsantrasyon olan 50 µg/ml'de *T. alexandrinum* için 1.701 ± 0.410 µg/ml, *T. incarnatum* için 0.368 ± 0.009 µg/ml, *T. hybridum* için 0.662 ± 0.020 µg/ml, *T. fragiferum* L. ssp. *bonanni* için 0.436 ± 0.029 µg/ml, *T. resupinatum* L. var. *resupinatum* için 0.888 ± 0.012 µg/ml ve *T. resupinatum* L. var. *majus* için ise 1.014 ± 0.048 µg/ml olarak tespit etmişlerdir. Kolodziejczyk-Czepas vd. (2015) yaptıkları bir diğer çalışmada ise üç farklı trifolium türünün farklı konsantrasyonlardaki (1.5, 3, 6.25, 12.5, 25, 50 µg/ml) %80'lik metanol özütlerinin fenolik fraksiyonlarının FRAP iyon indirgeme güçlerini araştırmışlardır. Çalışmanın sonucunda 50 µg/ml konsantrasyonda *Trifolium pratense* için FRAP iyon indirgeme gücünü 2.606 ± 0.355 mM of Fe^{2+} , *Trifolium pallidum* için 0.809 ± 0.018 mM of Fe^{2+} ve *Trifolium scabrum* için 0.197 ± 0.036 mM of Fe^{2+} olarak tespit etmişlerdir. Tundis vd. (2015) çalışmalarında *Trifolium pratense* ve *Trifolium repens* türlerinin etanol özütlerinin FRAP iyon indirgeme gücünü araştırmışlardır. Çalışmanın sonucunda *T. repens* 44.2 ± 4.5 µM Fe(II)/g olarak tespit edilirken, *T. pratense* türünün FRAP iyon indirgeme gücü tespit edilememiştir. Antonescu vd. (2019) *Trifolium pratense* türünden hazırlamış oldukları hidro-alkolik ekstraktın FRAP iyon indirgeme potansiyelini incelemişlerdir ve 17.14 mg TE/mL olarak bildirmişlerdir. Akbaribazm vd., (2020) yapmış oldukları araştırmada *Trifolium pratense* türünün toprak üstü kısımlarından hazırlamış oldukları etanol ekstraktının FRAP iyon indirgeme gücünü araştırmışlar ve 6620.15 ± 43.26 mmol Fe(II)/mg olarak tespit etmişlerdir. Jakubczyk vd., (2021) çalışmalarında *Trifolium repens* ve *Trifolium pratense* türlerinden hazırlamış oldukları etanol özütlerinin FRAP iyon indirgeme potansiyellerini araştırmışlardır. Çalışmanın sonucunda *T. repens* 88.71 ± 3.16 uM Fe(II)/L, *T. pratense* ise 100.20 ± 4.96 uM Fe(II)/L olarak tespit edilmiştir. Fabaceae familyasına ait bazı türler üzerinde yapılan FRAP iyon indirgeme gücü araştırmalarına bakıldığında ise Madrid vd., (2012) *Psoralea glandulosa* türünün diklorometan özütünün FRAP aktivitesini 2.71 mM, Madubunyi ve Ode (2011), ise *Cassia singueana* türünün yaprak kısımlarından hazırlanan metanol özütlerinin FRAP aktivitesini 100 µg/ml konsantrasyonda 1.9 mM/ml olarak tespit etmişlerdir. Literatürdeki diğer çalışmaların verileri ve çalışmamızdan elde edilen sonuçlar göz önüne alındığında *Trifolium*

pratense var. *pratense* türünün demir indirgeme potansiyelinin verimli olduğu gözlemlenmiştir.

4.5 Yüksek Basınçlı Sıvı Kromatografi Analizleri (HPLC)

Trifolium pratense var. *pratense* bitkisinin toprak üstü kısımlarından hazırlanan metanol ve etil asetat özütlerinin fenolik bileşim analizi, Caponio vd. (1999) tarafından açıklanmış olan yöntem izlenerek elde edilmiş olup kalibrasyon eğrilerinde hesaplandı ve µg/g ekstrakt olarak ifade edildi; sonuçlar Çizelge 4.6'da özetlenmiştir. Bu çalışmada, (ppm=mg/kg-mg/L) olarak ifade edilen her bir bileşiğin her bir özütü (metanol, etil asetat) için incelenmiştir. Sonuçlara göz attığımızda gallik asit (MeOH : 92,230 ppm), hesperidin (MeOH : 49,074 ppm) ve rosmarinik asit (MeOH : 50,741 ppm) analizde yüksek sonuç vermiştir. Gallik asit fenolik bileşiklerde bulunan saf maddelerden biridir. Bu saf madde bitkilerde ve tohum taslağının olgun halinde (meyve) genel olarak bulunur ve yaygın bir endüstriyel kullanıma potansiyeli vardır. Ester formu genellikle gıda, kozmetik ve farmakoloji de antioksidan olarak kullanılmaktadır. Mürekkep ve boya endüstrisinde kullanılabilir (Stupans ve Ow 2003; Flórez-Fernández vd., (2020). Mekanik açıdan bakıldığında, gallik asit *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus mutans* ve *Listeria monocytogenes*'in yapışmasını, hareketliliğini ve biyofilm oluşumunu inhibe edebilir (Kahkeshani vd., 2019). Bileşik ayrıca gram pozitif ve gram negatif bakterilerde hücre zarının bütünlüğünü bozabilir ve zar yüzeyinin yükünü, hidrofobitesini ve geçirgenliğini değiştirebilir. Hesperidin, flavonoid alt sınıflarından biri olan flavanon bileşiklerindedir (Pyrzynska, 2022). Yapısal olarak, aglikon hesperetin ve disakkarit rutinozdan oluşan bir flavon glikozididir (Choi vd., 2022). Çeşitli turuncgillerde (özellikle portakal kabuklarında) bol miktarda bulunan bir flavonoiddir. Özellikle, turuncgil kabuğu, posasından daha yüksek flavonoid içeriğine sahiptir ve bu sayede daha güçlü anti-inflamatuar özellikler sergiler (Tian vd., 2024).

Hesperidin, antioksidan, fotokoruyucu, anti-inflamatuar, antikarsinojenik ve antibakteriyel aktiviteler dahil olmak üzere cilde çok çeşitli potansiyel olarak değerli özellikler sunduğu için son derece ilgi çekici bir bileşik olarak kabul edilir (Rodrigues ve Pintado, 2024). Ayrıca kardiyovasküler hastalıklar, diyabet modellerinde ve ayrıca kanserin önlenmesinde çeşitli biyolojik etkilere sahiptir (Kim vd., 2019). Rosmarinik asit (RA) ise kekik, biberiye, nane, adaçayı gibi bitkilerde varolan doğal bir

antioksidandır (Saçlı, 2019). RA, antiviral, antibakteriyel, antikanser, antioksidan, yaşlanma karşıtı, antidiyabetik, kardiyoprotektif, hepatoprotektif, nefroprotektif, antidepresan, antialerjik ve antiinflamatuvar aktiviteler dahil olmak üzere dikkate değer biyolojik etkilere sahiptir (Nadeem vd., 2019). Ayrıca bitkilerde, RA kümülatif bir savunma bileşiği olarak kabul edilmektedir (Luo vd., 2020).

Çizelge 4.6. Fenolik bileşim analizi.

Fenolik Bileşik*	Correlation (r ²)	λ (nm)	RT (min.)	Metanol (ppm***)	Etil asetat (ppm***)
3-Hidroksi Benzoik Asit	0,99928	287	22.545	5,353	2,539
4- Hidroksi Benzoik Asit	0,99994	278	17.647	3,974	1,065
Benzoik Asit	0,99986	278	47.629	N.D.	1,227
Kateşin Hidrat	0,99906	278	11.499	N.D.	3,441
Klorojenik Asit	0,99970	330	16.239	3,948	0,988
Kafeik Asit	0,99892	330	21.476	N.D.	N.D.
Epikateşin	0,99879	278	20.169	19,214	N.D.
Gallik Asit	0,99966	278	5.912	92,230	6,133
Hesperidin	0,99705	287	65.989	49,074	15,78
P-Kumarik Asit	0,99982	330	33.597	1,994	0,623
Kuersetin	0,99962	254	76.313	14,265	12,312
Rosmarinik Asit	0,99907	330	70.655	50,741	2,308
Sinnapik Asit	0,99925	330	37.264	1,681	N.D.
Şiringik Asit	0,99839	278	22.628	2,961	0,982
t-Sinnamik Asit	0,99998	278	75.207	1,295	0,618
t-Ferrulik Asit	0,99993	330	37.202	1,093	0,181

*1, 5, 10, 20, 50, 70, 100 ppm konsantrasyonlarında saf standart çözeltileri okutulmuş kalibrasyon eğrisi hazırlanmıştır. **RT=Retention Time (Alınma zamanı), N.D.=Not Detected (Algılanmadı). ***ppm=mg/kg-mg/L

Kicel ve Wolbis (2006) yapmış oldukları bir çalışmada *Trifolium repens* ve *Trifolium pratense* türlerinin çiçek ve yaprak kısımlarından hazırlanmış oldukları metanol özütlelerinin fenolik bileşimini araştırmışlardır. Çalışmanın sonucunda her iki tür için de salisilik asit diğer bileşenlere göre daha yüksek oranda tespit edilmiştir. Ahmad vd., (2019) çalışmalarında *Trifolium repens* türünün yaprak kısımlarından hazırlanmış oldukları metanol özütlelerinin fenolik bileşimini araştırmışlardır. Analiz sonucunda tirosol (11.1 ± 0.2 mg/g) en bol bulunan bileşik olarak bildirilmiştir. Tundis vd., (2015) *Trifolium repens* ve *Trifolium pratense* türlerinin çiçek kısımlarından hazırlanmış oldukları etanol özütlelerinin fenolik içeriğini araştırmışlardır. Araştırma sonucunda *T. repens* için klorojenik asit (79.2 mg/g) ve *T. pratense* için luteolin (16,7 mg/g) en

yoğun tespit edilen bileşenler olarak bildirilmiştir. Chiriac vd., (2020) yapmış oldukları araştırmalarında *Trifolium pratense* türünün tohum kısımlarından hazırlamış oldukları etanol özütünün fenolik bileşimini çalışmışlardır. Çalışmanın sonucunda farklı miktarlarda 15 flavonoid, 8 fenolik asit ve 7 izoflavon bileşeninin tespit edildiğini bildirmişlerdir. Fabaceae familyasına ait bazı bitki türlerinden hazırlanan özütlerin HPLC analizleri değerlendirildiğinde ise; Elbanoby vd., (2024) çalışmalarında *Leucaena leucocephala* türünün çeşitli kısımlarından hazırlamış oldukları metanol özütünün fenolik bileşimini araştırmışlardır ve sonucunda benzoik asid (1520.44 mg/kg ME), mirisetin (848.73 mg/kg ME), rosmarinik asid (792.46 mg/kg ME) bileşiklerinin bol bulunduğunu bildirmişlerdir. Bir diğer çalışmada ise Kumar vd., (2018) *Astragalus membranaceus* türünden hazırlamış oldukları farklı özütlerin (su, etanol, metanol ve etil asetat) fenolik bileşimini araştırmışlardır. Çalışmanın sonucunda kuersetin, kumarin, lanatozid C, gallik asit ve kafein bileşiklerinden farklı oranlarda tespit etmişlerdir. Odion vd., (2024) *Solenostemon monostachyus* yapraklarından hazırlamış oldukları metanol özütünün fenolik bileşimini araştırmışlar ve çalışmanın sonucunda kateşinin (33.334 µg/ml) en bol bulunan bileşik olduğunu tespit etmişlerdir.

5. SONUÇ VE ÖNERİLER

Yapmış olduğumuz tez çalışması, *Trifolium pratense* var. *pratense* bitkisinin toprak üstü kısımlarından hazırlanan farklı özütlerin (metanol ve etilasetat) biyolojik ve fitokimyasal özelliklerini araştırmayı temel almıştır. Çalışma kapsamında *Trifolium pratense* var. *pratense* türünün fitokimyasal analizi antioksidan kapasite bakımından yaygın bazı testler (TPC, TFC, DPPH, FRAP, PBD, HPLC) uygulanarak tespit edilmeye çalışılmıştır. Analizler sonucunda bitki metabolitlerinin metanol çözücüsüyle daha iyi bir etkileşime girdiği ve özellikle fenolik ve flavonoid bileşenlerce önemli bir potansiyele sahip olduğu tespit edilmiştir. Ayrıca demir iyonlarını indirgeme potansiyelinin de yüksek olduğu gözlemlenmiştir. Toplam antioksidan kapasite açısından ise etil asetat özütünün daha aktif olduğu tespit edilmiştir. Çalışma HPLC analizi ile desteklenerek fenolik bileşenler açısından zenginliği kanıtlanmıştır. Farmakoloji alanında bu bitki türü özelinde yapılabilecek daha kapsamlı çalışmalarla bitkinin yapısında bulunan önemli moleküllerin keşfedilmesi ve kullanım potansiyelinin ortaya konulmasına ihtiyaç vardır.

KAYNAKLAR

- Akbaribazm, M., Khazaei, M. R. ve Khazaei, M., 2020. Phytochemicals and antioxidant activity of alcoholic/hydroalcoholic extract of *Trifolium pratense*. *Chinese Herbal Medicines*, 12, 3, 326-335.
- Antonescu, A. I., Jurca, T., Gligor, F., Craciun, I., Fritea, L., Patay, E. B., ve Bodog., 2019. Comparative phytochemical and antioxidative characterization of *Trifolium pratense* L. and *Ocimum basilicum* L. *Farmacia*, 67, 146-153.
- Biswas, S., Das, R. ve Banerjee, E. R., 2017. Role of free radicals in human inflammatory diseases, *Aims Biophysics*, 4, 4, 596-614.
- Borquaye, L. S., Doetse, M. S., Baah, S. O. ve Mensah, J. A., 2020. Anti-inflammatory and anti-oxidant activities of ethanolic extracts of *Tamarindus indica* L.(Fabaceae), *Cogent Chemistry*, 6, 1, 1743403.
- Carocho, M. ve Ferreira, I. C., 2013. A review on antioxidants, prooxidants and related controversy: Natural and synthetic compounds, screening and analysis methodologies and future perspectives, *Food and chemical toxicology*, 51, 15-25.
- Cheng, B., Ran, R., Qu, Y., Verkerk, R., Henry, R., Dekker, M. ve He, H., 2024. Advancements in balancing glucosinolate production in plants to deliver effective defense and promote human health, *Agriculture Communications*, 100040.
- Chiriac, E. R., Chițescu, C. L., Borda, D., Lupoe, M., Gird, C. E., Geană, E. I. ve Boscencu, R., 2020. Comparison of the polyphenolic profile of *Medicago sativa* L. and *Trifolium pratense* L. sprouts in different germination stages using the UHPLC-Q exactive hybrid quadrupole orbitrap high-resolution mass spectrometry, *Molecules*, 25, 10, 2321.
- Choi, S. S., Lee, S. H. ve Lee, K. A., 2022. A comparative study of hesperetin, hesperidin and hesperidin glucoside: Antioxidant, anti-inflammatory, and antibacterial activities in vitro, *Antioxidants*, 11 ,8, 1618.
- Dillard, C. J. ve German, J. B., 2000. Phytochemicals: Nutraceuticals and human health, *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 80, 12, 1744-1756.
- Dragusha, S., Qazimi, B. ve Ejupi, V., 2023. Assessment of total phenolic and flavonoid content of medicinal plant extracts from kosovo, *Journal of Medicinal plants and By-product*, 12, 2, 175-180.

- Elbanoby, N. E., El-Settawy, A. A., Mohamed, A. A. ve Salem, M. Z., 2024. Phytochemicals derived from *Leucaena leucocephala* (Lam.) de Wit (Fabaceae) biomass and their antimicrobial and antioxidant activities: HPLC analysis of extracts, *Biomass Conversion and Biorefinery*, 14, 13, 14593-14609.
- Erbil, N., Duzguner, V., Durmuskahya, C. ve Alan, Y., 2015. Antimicrobial ve antioxidant effects of some Turkish fodder plants belongs to Fabaceae family (*Vicia villosa*, *Trifolium ochroleucum* and *Onobrychis altissima*), *Oriental Journal of Chemistry*, 31, 3, 1263-1268.
- Erenler, R., Hosaflioglu, I., Yildiz, I., Atalar, M. N., Celik, S. M. ve Alma, M. H., 2024. Quantitative analysis of phenolics in *Trifolium pratense* L. flowers and evaluation of antioxidant activity by sensory, *Journal of New Results in Science*, 13, 2, 165-174.
- Góral, I. ve Wojciechowski, K., 2020. Surface activity and foaming properties of saponin-rich plants extracts, *Advances in colloid and interface science*, 279, 102145.
- Halliwell, B., 2006. Reactive species and antioxidants. Redox biology is a fundamental theme of aerobic life. *Plant Physiology*, 141, 2, 312-322.
- Halliwell, B. ve Gutteridge, J. M. C., 2015. *Free radicals in biology and medicine*. Oxford University Press, United Kingdom.
- Hanganu, D., Benedec, D., Vlase, L., Olah, N., Damian, G., Silaghi-Dumitrescu, R. ve Toma, C. C., 2017. Polyphenolic profile and antioxidant and antibacterial activities from two *Trifolium* species, *Farmacina*, 65, 3, 449-453.
- Hasnat, H., Shompa, S. A., Islam, M. M., Alam, S., Richi, F. T., Emon, N. U. ve Ahmed, F., 2024. Flavonoids: A treasure house of prospective pharmacological potentials, *Heliyon*, 21, 5, 257-264.
- Hermanns, A. S., Zhou, X., Xu, Q., Tadmor, Y. ve Li, L., 2020. Carotenoid pigment accumulation in horticultural plants, *Horticultural Plant Journal*, 6, 6, 343-360.
- Jakubczyk, K., Łukomska, A., Gutowska, I., Kochman, J., Janił, J. ve Janda, K., 2021. Edible Flowers Extracts as a Source of Bioactive Compounds with Antioxidant Properties—In Vitro Studies, *Applied Sciences*, 11, 5, 2120.
- Juang, Y. P. ve Liang, P. H., 2020. Biological ve pharmacological effects of synthetic saponins, *Molecules*, 25, 21, 4974.
- Kahkeshani, N., Farzaei, F., Fotouhi, M., Alavi, S. S., Bahramsoltani, R., Naseri, R. ve Bishayee, A., 2019. Pharmacological effects of gallic acid in health ve diseases: A mechanistic review, *Iranian journal of basic medical sciences*, 22, 3, 225.
- Kaurinovic, B., Popovic, M., Vlaisavljevic, S., Schwartzova, H. ve Vojinovic-Miloradov, M., 2012. Antioxidant profile of *Trifolium pratense* L. *Molecules*, 17, 9, 11156-11172.

- Kicel, A. ve Wolbis, M., 2006. Phenolic acids in flowers and leaves of *Trifolium repens* L. and *Trifolium pratense* L. *Herba Polonica*, 52, 4, 51-58.
- Kolodziejczyk-Czepas, J., Nowak, P., Kowalska, I. ve Stochmal, A., 2014. Biological activity of clovers—Free radical scavenging ability and antioxidant action of six *Trifolium* species, *Pharmaceutical Biology*, 52, 10, 1308-1314.
- Kolodziejczyk-Czepas, J., Nowak, P., Moniuszko-Szajwaj, B., Kowalska, I. ve Stochmal, A., 2015. Free radical scavenging actions of three *Trifolium* species in the protection of blood plasma antioxidant capacity in vitro, *Pharmaceutical Biology*, 53, 9, 1277-1284.
- Kumar, S., Sepuhle, N., Bouic, P. J. ve Rosenkranz, B., 2018. HPLC/LC-MS guided phytochemical ve in vitro screening of *Astragalus membranaceus* (Fabaceae), ve prediction of possible interactions with CYP2B6. *Journal of herbal medicine*, 14, 35-47.
- Liguori, I., Russo, G., Curcio, F., Bulli, G., Aran, L., Della-Morte, D. ve Abete, P., 2018. Oxidative stress, aging, and diseases, *Clinical Interventions in Aging*, 13, 757-772.
- Luo, C., Zou, L., Sun, H., Peng, J., Gao, C., Bao, L. ve Sun, S. 2020. A review of the anti-inflammatory effects of rosmarinic acid on inflammatory diseases, *Frontiers in pharmacology*, 11, 153.
- Madrid, A. M., Espinoza, L. J., Mellado, M. A., Osorio, M. E., Montenegro, I. J. ve Jara, C. E., 2012. Evaluation of the antioxidant capacity of *Psoralea glandulosa* L.(Fabaceae) extracts, *Journal of the Chilean Chemical Society*, 57, 3, 1328-1332.
- Madubunyi, I. I. ve Ode, O. J., 2011. In vitro and in vivo antioxidant potential of the methanolic extract of *Cassia singueana* Delile (Fabaceae) Lock leaves, *Comparative Clinical Pathology*, 21, 1565-1569.
- Maina, S., Misinzo, G., Bakari, G. ve Kim, H. Y., 2020. Human, animal and plant health benefits of glucosinolates and strategies for enhanced bioactivity: A systematic review, *Molecules*, 25, 16, 3682.
- Meléndez-Martínez, A. J., Britton, G., Vicario, I. M. ve Heredia, F. J., 2007. Relationship between the colour and the chemical structure of carotenoid pigments, *Food Chemistry*, 101, 3, 1145-1150.

- Miceli, N., Buongiorno, L. P., Celi, M. G., Cacciola, F., Dugo, P., Donato, P. ve Taviano, M. F., 2015. Role of the flavonoid-rich fraction in the antioxidant and cytotoxic activities of *Bauhinia forficata* Link.(Fabaceae) leaves extract. *Natural product research*, 30, 11, 1229-1239.
- Nadeem, M., Imran, M., Aslam Gondal, T., Imran, A., Shahbaz, M., Muhammad Amir, R. ve Martins, N., 2019. Therapeutic potential of rosmarinic acid: A comprehensive review *Applied Sciences*, 9, 15, 3139.
- Odion, E. E., Ambe, D. A. E., Ifejika, K. N., Odiete, E. C. ve Osigwe, C. C., 2024. Phytochemical Profiling, Cytotoxicity, and Antiproliferative Potential of *Solenostemon monostachyus* (Fabaceae) Leaves, *Sciences of Phytochemistry*, 3, 2, 72-81.
- Pham-Huy, L. A., He, H. ve Pham-Huy, C., 2008. Free radicals, antioxidants in disease and health, *International Journal of Biomedical Science*, 4, 2, 89-96.
- Pizzino, G., Irrera, N., Cucinotta, M., Pallio, G., Mannino, F., Arcoraci, V. ve Bitto, A., 2017. Oxidative stress: harms and benefits for human health. *Oxidative medicine and cellular longevity*, 2017, 1, 8416763.
- Pyrzynska, K., 2022. Hesperidin: A review on extraction methods, stability and biological activities, *Nutrients*, 14, 12, 2387.
- Rodrigues, C. V. ve Pintado, M., 2024. Hesperidin from orange peel as a promising skincare bioactive: an overview, *International Journal of Molecular Sciences*, 25, 3, 1890.
- Sabudak, T., Demirkiran, O., Ozturk, M. ve Topcu, G., 2013. Phenolic compounds from *Trifolium echinatum* Bieb. and investigation of their tyrosinase inhibitory and antioxidant activities, *Phytochemistry*, 96, 305-311.
- Shahidi, F. ve Yeo, J. D., 2018. Bioactivities of phenolics by focusing on suppression of chronic diseases: A review, *International Journal of Molecular Sciences*, 19, 6, 1573.
- Shi, J., Arunasalam, K., Yeung, D., Kakuda, Y., Mittal, G. ve Jiang, Y., 2004. Saponins from edible legumes: Chemistry, processing, and health benefits, *Journal of Medicinal Food*, 7, 1, 67-78.
- Sies, H., 2017. Hydrogen peroxide as a central redox signaling molecule in physiological oxidative stress: Oxidative eustress, *Redox Biology*, 11, 613-619.
- Tian, X., Wang, H., Penglong, Y. U., Lyu, S., Yonghua, L. I., Jiang, X. ve Yuexiang, M. A., 2024. Anticancer Mechanism of Hesperidin and Its Derivatives: A Review, *Chinese Journal of Experimental Traditional Medical Formulae*, 30, 13, 259-270.

Tundis, R., Marrelli, M., Conforti, F., Tenuta, M. C., Bonesi, M., Menichini, F. ve Loizzo, M. R., 2015. *Trifolium pratense* and *T. repens* (Leguminosae): Edible flower extracts as functional ingredients, *Foods*, 4, 3, 338-348.

Vargas-Ramella, M., Pateiro, M., Gavahian, M., Franco, D., Zhang, W., Khaneghah, A. M. ve Lorenzo, J. M., 2021. Impact of pulsed light processing technology on phenolic compounds of fruits and vegetables, *Trends in Food Science ve Technology*, 115, 1-11.

Vig, A. P., Rampal, G., Thind, T. S. ve Arora, S., 2009. Bio-protective effects of glucosinolates—A review, *LWT-Food Science and Technology*, 42, 10, 1561-1572.

Vlaisavljević, S., Kaurinović, B., Popović, M. ve Vasiljević, S., 2017. Profile of phenolic compounds in *Trifolium pratense* L. extracts at different growth stages and their biological activities, *International journal of food properties*, 20, 12, 3090-3101.

ÖZGEÇMİŞ

Adı ve Soyadı: Yavuz DUMAN

EĞİTİM BİLGİLERİ (Kurum ve Yıl)

Lisans: Ahi Evran Üniversitesi Eğitim Fakültesi İlköğretim Bölümü Fen Bilimleri Öğretmenliği 2006-2010

Yüksek Lisans: Aksaray Üniversitesi Biyoteknoloji ve Moleküler Biyoloji Ana Bilim Dalı 2022-2024

TEZDEN ÜRETİLEN YAYINLAR, SUNUMLAR VE PATENTLER

Kongrelerde sunulan makaleler

Duman, Y., Abdulqadir, A. H., Şen İ. Ve Çakmak Y. S., 2024. *Trifolium Pratense* var. *pratense*'nin antioksidan kapasitesi ve fenolik bileşiminin belirlenmesi, Anadolu 14th International Conference on Applied Sciences, Gaziantep, 68.