



ARAŞTIRMA

F.Ü.Sağ.Bil.Tıp Derg.
2017; 31 (1): 25 - 31
http://www.fusabil.org

***Onobrychis Oxyodonta*'nın Topraküstü Kısımında Antioksidan, Antimikrobiyal ve Tirozinaz İnhibitör Aktivitesi**

Rezzan ALİYAZICIOĞLU¹
Şeyda AKKAYA¹
Nuriye KORKMAZ¹
Sıla Özlem ŞENER²
Merve BADEM²
Ufuk ÖZGEN²
Şengül ALPAY KARAOĞLU³

¹Karadeniz Teknik Üniversitesi,
Eczacılık Fakültesi,
Biyokimya Anabilim Dalı,
Trabzon, TÜRKİYE

² Karadeniz Teknik Üniversitesi,
Eczacılık Fakültesi,
Farmakognози Anabilim Dalı,
Trabzon, TÜRKİYE

³ Recep Tayyip Erdoğan
Üniversitesi,
Fen Fakültesi,
Biyoloji Bölümü,
Rize, TÜRKİYE

Geliş Tarihi : 12.04.2017
Kabul Tarihi : 22.06.2017

Yazışma Adresi Correspondence

Rezzan ALİYAZICIOĞLU
Karadeniz Teknik Üniversitesi
Eczacılık Fakültesi,
Biyokimya Anabilim Dalı,
Trabzon - TÜRKİYE

rezzanaoglu@mynet.com

Amaç: Dünyada geniş bir alana yayılmış olan *Onobrychis* türleri, yüksek antioksidan aktiviteye sahip fenolik madde içeriğinden dolayı tıbbi aromatik bitkiler arasında önemli bir yere sahiptir. Bu çalışmanın amacı, *Onobrychis oxyodonta* bitkisinden elde edilen metanolik ekstrenin fenolik asit bileşenlerini, antioksidan, antimikrobiyal ve tirozinaz inhibitör aktivitesini değerlendirmektir.

Gereç ve Yöntem: 2,2-difenil-1-pikrilhidrazil serbest radikali (DPPH[·]), demir indirgeyici antioksidan güç (FRAP) ve total fenol içeriği (TPC) metanolik ekstrenin antioksidan kapasitenin değerlendirilmesi için çalışıldı. Fenolik kompozisyon ters faz yüksek performans sıvı kromatografisi (RP-HPLC) ile araştırıldı. Antimikrobiyal aktivite disk difüzyon metodu ile belirlendi. Tirozinaz inhibitör aktivite ise kolorimetrik metod kullanılarak test edildi.

Bulgular: Ekstrenin toplam fenolik içeriği, FRAP ve DPPH aktiviteleri sırasıyla; 8.0±0.115 mg gallik asid eşdeğeri/gram numune, 323±5.773 µM Trolox/g numune ve 1.333±0.0026 mg/mL olarak bulundu. Ferulik asid, benzoik asid, sinapik asid, syringaldehid ekstrenin temel fenolik bileşikleridir. Tirozinaz üzerine yarı maksimum inhibitör konsantrasyonu (IC₅₀) kojik asitten daha yüksek bulundu. Ekstre, asid-hızlı bakteri (*Mycobacterium smegmatis*) ve gram negatif (*Yersinia pseudotuberculosis*) bakterilere karşı ılımlı antibakteriyal aktivite gösterdi.

Sonuç: *O. oxyodonta* ekstresi içerdiği zengin fenolik bileşenlerle güçlü antioksidan, antimikrobiyal ve ılımlı tirozinaz inhibitör aktivitesine sahip olduğundan faydalı bir farmasötik ajan olarak kullanılabilir.

Anahtar Kelimeler: HPLC, antioksidan, antimikrobiyal

Antioxidant, Antimicrobial, and Tyrosinase Inhibitor Activities in the Aerial Parts of *Onobrychis oxyodonta*

Objective: The genus *Onobrychis* occurs widely across the world and occupies an important place among medical aromatic plants due to its antioxidant and phenolic contents. The aim of this study was to evaluate the constituents of phenolic acids, volatile components, antioxidant, antimicrobial, and tyrosinase inhibitor activities of *Onobrychis oxyodonta*.

Materials and Methods: 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl free radical (DPPH[·]), ferric reducing antioxidant power (FRAP), and total phenol content (TPC) were used to evaluate the antioxidant capabilities of the methanolic extract. The phenolic composition was investigated by means of reverse phase-high performance liquid chromatography (RP-HPLC). Antimicrobial activity was determined using the disc diffusion method. Tyrosinase inhibitor activity was tested using the colorimetric method.

Results: The IC₅₀ value for DPPH assay was 1.333±0.0026 (mg/mL), the FRAP value 323±5.773 (µM Trolox/g sample) and the total phenolic content value 8.0±0.115 mg gallic acid per gram of sample. Ferulic acid, benzoic acid, sinapic acid, syringaldehyde were the main phenolic compounds in the extract. The half-maximal inhibitory concentrations (IC₅₀) of the extract for tyrosinase were higher than for kojic acid. The extract exhibited moderate antibacterial activity against acid-fast bacterium (*Mycobacterium smegmatis*) and gram negative (*Yersinia pseudotuberculosis*) bacteria.

Conclusion: *O. oxyodonta* extract may be a useful pharmaceutical agent due to its powerful antioxidant, antimicrobial and moderate tyrosinase inhibitor activities.

Key Words: HPLC, antioxidant, antimicrobial

Giriş

Tüm dünyada olduğu gibi ülkemizde de birçok bitki türü yıllardan beri halk arasında çeşitli amaçlarda kullanılmaktadır. Dünya Sağlık Örgütü'nün (WHO), 91 ülkenin farmakopelerine ve tıbbi bitkiler üzerine yapılmış olan bazı yayınlara bakılarak tedavi amaçlı kullanılan tıbbi bitkilerin sayısı 20.000 civarındadır. Bitkilerin insan sağlığı için önemli olan özellikleri 1926 yılından beri laboratuvarlarda araştırılmaya başlanmıştır (1).

Türkiye'de doğal olarak yetişen *Onobrychis* cinsi, *Onobrychis* ve *Sisyrosema* olmak üzere iki alt cinsten meydana gelir. Bu alt cinslerden *Onobrychis*; *Dendrobrychis*, *Laphobrychis* ve *Onobrychis* olmak üzere 3 farklı seksiyona ayrıldığı bilinmektedir (2). *Fabaceae* ailesi Türkiye'de *Asteraceae*'den sonra ikinci büyük ailedir ve halk arasında çeşitli kullanımları vardır. Örneğin *Onobrychis gracilis* soğuk algınlığı ve nezle

tedavisinde, *Vicia faba* gastrovasküler hastalıklarda, *Vicia cracca* subsp. *stenophylla* soğuk algınlığında ve *Vicia ervilia* diyabet tedavisinde kullanılmaktadır (3-5).

Organizmada normal metabolik yolların işleyişi sırasında ya da pestisidler, aromatik hidrokarbonlar, toksinler, çözücüler gibi çevresel ajanlar ile ya da stres, radyasyon gibi çeşitli dış faktörlerin etkisiyle serbest radikaller meydana gelmektedir (6). Vücutta sürekli üretilen oksijen merkezli serbest radikaller ve reaktif oksijen türleri doku tahribatlarına ve ardından da hücre ölümlerine neden olabilirler. Serbest radikallerden kaynaklanan oksidatif hasar, yaşlanma ve bazı hastalıklara neden olabilmektedir (7). Fenolik bileşiklerce zengin meyve ve sebzeler, insan vücudunu serbest oksijen radikallerine karşı korurlar. Yapılan epidemiyolojik çalışmalar reaktif oksijen türlerine karşı bitkisel kaynaklardaki fitonutrientlerin yararlı olduğu; meyve ve sebzelerin koruyucu etkilerinin içerdikleri askorbik asit (C vitamini), α -tokoferol (E vitamini), karotenoidler, glutatyon, flavonoidler ve fenolik asitler gibi doğal bileşiklerden dolayı olduğunu göstermiştir (8). Gıdalarda ya da biyolojik sistemlerde serbest radikaller ve reaktif oksijen türleri oksidasyona neden olduğunda, antioksidanlar bu süreci çeşitli mekanizmalarla önleyebilir ya da erteleyebilir (9). Gıdalardaki antioksidan kapasitesinin ölçülmesiyle insanların sağlık amacıyla farmosötik ve kozmetik ürünlerde doğal olan ürünlerin kullanımına olan ilgisi her geçen gün artmaktadır (10).

Son yıllarda bütün dünyada antibiyotiklerin gelişigüzel kullanımı ile ilaç direnci yakından ilişkilidir (11). Özellikle immün sistemi zayıflatan AIDS, kanser gibi hastalıkların ve enfeksiyonların tedavisinde ilaçlara dirençli patojen mantar ve bakteriler nedeniyle zorlaştığı görülmüştür (12). Bu durum bilim adamlarını değişik kaynaklardan yeni antimikrobiyal bileşiklerin araştırılmasına teşvik etmiştir. Bitkiler, yeni antimikrobiyal kemoterapotik maddelerin elde edilebileceği kaynak teşkil ettiğinden araştırmalar özellikle tıbbi bitkiler üzerinde yoğunlaşmıştır (12).

Tirozinaz, vücutta melanin sentezinin aşırı olmasından kaynaklanan cilt lekeleri gibi hiperpigmentasyon problemlerinde; psoriasis, vitiligo gibi melanin sentezinin yeterli olmamasından kaynaklı hipopigmentasyon problemlerinde rolü olduğu bilinen önemli bir enzimdir. Bu enzimi inhibe eden ajanlar hiperpigmentasyon problemlerinin tedavisinde ve aktive eden ajanlar ise hipopigmentasyon problemlerinin tedavisinde kullanılabilir (13).

Farklı *Onobrychis* türlerinin halk arasında çeşitli hastalıkların tedavisinde kullanıldığına dair literatür bilgileri mevcut olmasına rağmen (3-5) *O. oxyodonta* bitkisinin antioksidan, antimikrobiyal, total fenolik içeriği, HPLC ile fenolik bileşenlerin tespiti ve tirozinaz inhibitör aktivite açısından araştırılması ve literatüre kazandırılması açısından ilk olma özelliği taşımaktadır.

Gereç ve Yöntem

Bitkisel Materyalin Temini: Araştırmada kullanılan bitkisel materyal *O. oxyodonta* türünün topraküstü kısımları 2014 yılında Mayıs ayında Sinop'tan kuru ağırlığı 100 g olacak şekilde toplandı. Tür teşhisi Gazi Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Biyoloji bölümü öğretim üyelerinden Prof. Dr. Zeki AYTAÇ tarafından yapıldı. Bitki numunesi Ankara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi'nde bulunan herbaryumda saklandı (AEF 26703). Temin edilen örnekler oda koşullarında ve gölgede kurutulduktan sonra analizde kullanılmak üzere renkli kavanozlarda muhafaza edildi.

Kullanılan Kimyasal Maddeler: Antioksidan, antimikrobiyal, tirozinaz inhibitör aktivite ve fenolik bileşenleri belirlemek için kullanılan tüm kimyasallar analitik ya da HPLC sınıfı saflıkta olup Sigma-Aldrich (St. Louis, ABD) firmasından temin edildi.

Kullanılan Laboratuvar Cihazları: Çalışmada HPLC (Agilent 1100, DAD 1200 Agilent Technologies, Waldbronn, Germany) cihazı, UV-VIS spektrofotometre (Spectro UV-VIS Double PC-8 auto cell, Labomed), rotary evaporator sistemi (IKA®, Werke, USA), çalkalayıcı (Heidolph Promax 2020), su banyosu (Nüve, ST 402), pH metre (Hanna pH 213, Romania), magnetik karıştırıcı (Heidolph MR 3001, Germany), bitki öğütme değirmeni (Retsch RM200, Germany) kullanıldı.

Ekstraksiyon: Kurutulan topraküstü kısmı değirmen yardımıyla toz haline getirilip konsantrasyonu 10 mg/mL olacak şekilde metanol ile ekstrakte edildi. Ekstrakte edilen *O. oxyodonta* bitkisi biyolojik aktivite tayinlerinde kullanılmak üzere 4 °C'de muhafaza edildi.

Toplam Fenolik Madde İçeriğinin Belirlenmesi (TPC): *O. oxyodonta* metanol ekstresinin toplam fenolik madde tayini kolorimetrik olarak ölçüldü (14). Öncelikle, bitki özütünden (10 mg/mL) 50 μ L ve farklı konsantrasyonlarda (31.25; 62.5; 125; 250; 500; 1000 μ g/mL) standart olarak kullanılan gallik asitten 50 μ L alınarak deney tüplerine sırasıyla pipetlendi. Sonra her bir tüpe 2,5 mL saf su ve 250 μ L Folin-Ciocalteu Reaktif eklenecek şekilde karıştırıldı. 3 dk oda sıcaklığında bekletilerek üzerine 750 μ L 7.5%'lik Na_2CO_3 ilave edilerek karıştırıldı. Karışımlar oda sıcaklığında 2 saat bekletilerek 765 nm'de tüplerdeki karışımın absorbansları okundu. Sonuçlar mg gallik asit eşdeğeri/g numune olarak verildi.

Demir İndirgeyici Antioksidan Güç Tayini (FRAP): Bu metodun prensibi, Fe(III)-TPTZ (2,4,6-tripiridil-s-triazin) kompleksinin antioksidanlar varlığında indirgenerek mavi renkli kompleks olan Fe(II)-TPTZ'yi oluşturması ve bu kompleksin 595 nm'de maksimum absorbans vermesi esasına dayanan bir methoddur (15). Bu amaçla, FRAP reaktif [300 mM pH 3.6 asetat tamponu:10 mM TPTZ:20 mM FeCl_3 (10:1:1)] taze olarak hazırlandı. Deney 3 paralel ölçüm olacak şekilde düzenlendi. Hazırlanan numune ve numune körü tüplerine bitki ekstresinden 100 μ L ve reaktif körü tüplerine numune çözücüsünden 100 μ L pipetlendi. Numune tüplerine ve reaktif körü sıralarına 3.0 mL FRAP reaktif, numune körü sırasına ise 3.0 mL FRAP

çözücüsü (su-metanol (2:3)) 20 sn arayla pipetleterek karıştırıldı. Tüpler 20 dakika bekletildikten sonra absorban ölçümleri 595 nm'de gerçekleştirildi. Standart olarak Troloks, 5 farklı konsantrasyonda (1000- 500-250-125-62.5 µM) hazırlanarak aynı işlemlere tabi tutuldu. Sonuçlar µM trolox eşdeğeri (TE)/g numune olarak verildi.

2,2-difenil-1-pikrilhidrazil (DPPH) Radikal Süpürme Kapasitesi Tayini: Molyneux metoduna göre, *O. oxyodonta* ekstresinin serbest radikali süpürme aktivitesini belirlemek için DPPH radikali kullanıldı (16). Bu metotta, ekstre 5 farklı konsantrasyonda (100, 250, 500, 750 ve 1000 µg/mL) hazırlanırken DPPH çözeltisi ise 100 µM olacak şekilde metanolde çözülerek hazırlandı. Kontrol ve numune tüplerine 750 µL numune konuldu. Numune körü tüplerine numune yerine 750 µL numune çözücüsü ilave edildi. Numune pipetlemesi bitince 20 sn arayla önce kontrol tüplerine ve daha sonra numune tüplerine ve en son olarak da numune körlerine 750 µL DPPH çözücüsü (metanol) pipetlendi ve karıştırıldı. 50 dakika karanlık ortamda bekletildikten 517 nm'de absorban ölçümleri yapıldı. Ölçüm sonrası elde edilen sonuçlar grafiğe geçirilip DPPH yarı maksimum engelleyici konsantrasyon (IC₅₀) değerleri (mg/mL) hesaplandı. Bu çalışmada standart olarak bütillenmiş hidroksitoluen (BHT) kullanıldı.

Fenolik Bileşiklerin HPLC Analizi: Bu çalışmada, standart bileşikler olarak gallik asit, protokatekuik asit, protokatekuik aldehit, klorojenik asit, p-OH benzoik asit, vanilik asit, kafeik asit, vanilin, şiringaldehit, ferulik asit, p-kumarik asit, sinapik asit, benzoik asit kullanıldı. Standart karışımın stok çözeltisi, 5-100 µg/mL konsantrasyon aralığında seyreltilerek kalibrasyon eğrisi oluşturuldu. Fenolik bileşiklerin HPLC analizi [A: 100% metanol; B: su içinde 2% asetik asit (pH: 2,8)], bir HPLC cihazında (Shimadzu Corporation, LC 20AT, Kyoto, Japonya) 1.5 mL/dk sabit bir çözücü akış oranında bir ters faz kolon kullanılarak gerçekleştirildi. Enjeksiyon hacmi 20 µL, kolon sıcaklığı 25 °C olarak belirlendi. Sinyaller, 232 °C, 246 °C, 260 °C, 270 °C, 280 °C, 290 °C, 308 °C ve 328 °C'de DAD dedektörü kullanılarak kaydedildi. HPLC analizinde bir ters faz kolon olan LiChoCART RP-18 (12,5 cm x 0,4 cm, partikül büyüklüğü 5µm) kullanılarak ayırım gerçekleştirildi. 1 mL/dk akış hızında hareketli faz olarak su-formik asit (19:1) (çözücü A) karışımı ve sabit faz olarak metanol (çözücü B) çözücüsü kullanıldı. Fenolik asitlerin tanınması ve miktarının belirlenmesi için UV spektrumları ve alıkonma zamanları standartlarla karşılaştırıldı.

Antimikrobiyal Aktivite Tayini: Antimikrobiyal aktivite testleri agar kuyucuk difüzyon metoduna göre çalışıldı (17). *Escherichia coli*, *Yersinia pseudotuberculosis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis*, *Bacillus cereus*, *Mycobacterium smegmatis* bakterileri ve *Candida albicans*, *Saccharomyces cerevisiae* mantarları çalışmamızda kullanıldı. Test edilecek bakterilerin bir gecelik kültürlerinden sıvı besiyeri içinde yaklaşık olarak 10⁶ kob/mL (koloni oluşturan birim=colony forming unit) şeklinde dilüsyonlar hazırlandı ve katı besiyerlerine yaygın ekimleri yapıldı.

Sonrasında steril cam boru ile besiyerleri üzerinde 2 cm aralıklarla 5 mm çapında kuyucuklar açıldı. Her bir kuyucuğa ekstrenin 1 mL'sinde hazırlanmış stok çözeltilerden 50 µL ilave edildi. İnkübasyon işlemi bakteriler için 24 saat, mayalar için 48 saat olacak şekilde 36 °C'de petrilere gerçekleştirildi. İnhibisyon zonları bir cetvel yardımıyla ölçüldü. Standart olarak ampisilin, flukonazol ve streptomycin ilaçları kullanıldı.

Tirozinaz İnhibitör Aktivite Tayini: Bitki ekstresinin tirozinaz enzim inhibisyonu aktivitesi L-DOPA substratı kullanılarak dopakrom metoduna göre çalışıldı (18). Mikroplakadaki kuyucuklara 25 µL örnek çözelti, 40 µL tirozinaz çözeltisi ve 100 µL fosfat tamponu (pH 6.8) ilave edilerek karıştırıldı. Bu karışım 25 °C'de 15 dakika bekletildikten sonra üzerine 40 µL L-DOPA ilave edildi. Tirozinaz enzim çözeltisi olmadan hazırlanmış tepkime reaktiflerine örnek çözeltisi eklendi ve kör olarak hazırlandı. Bitki ekstresinin ve körlerin absorbanları 10 dakika oda sıcaklığında inkübe edildi. Daha sonra karışımın absorbanı 492 nm'de okundu. Gerçek absorbanları elde etmek için körlerin absorbanları örneklerin absorbanından çıkarıldı ve sonuçlar IC₅₀ değeri olarak verildi.

Bulgular

O. oxyodonta ekstresi DPPH yöntemiyle incelendiğinde IC₅₀ değeri 1.333±0.0026 mg/mL olarak bulunmuştur. Standart olarak kullanılan bütillenmiş hidroksi toluen (BHT) ile karşılaştırıldığında IC₅₀ değerinin BHT'ye göre daha yüksek çıktığı görülmektedir. FRAP değeri 323±5.773 µM Troloks/g ekstre, toplam fenolik içeriği 8.0±0.115 mg gallik asit eşdeğeri/g ekstre bulunmuştur (Tablo 1).

Tablo 1. *Onobrychis oxyodonta*'nın metanol ekstresinin antioksidan değerleri

Test bileşikleri	TPC ¹	FRAP ²	DPPH ³
Ekstre	8.0±0.115	323±5.773	1.333±0.0026
BHT			0.0099±0.0002

¹TPC değeri total fenolik içeriğini (mg gallik asit eşdeğeri/gram), ²FRAP değeri demir indirgeyici antioksidan gücünü (µM trolox eşdeğeri/gram), ³DPPH değeri 2,2-difenil-1-pikrilhidrazil radikali süpürme kapasitesini (mg/mL), BHT değeri bütillenmiş hidroksi tolueni gösterir.

HPLC ile fenolik madde içeriğinin incelenmesi sonucunda bitkinin içeriğinde 13 standart bileşiğin tümünün (gallik asit, protokatekuik asit, protokatekuik aldehit, p-OH benzoik asit, klorojenik asit, vanilik asit, kafeik asit, vanilin, şiringaldehit, p-kumarik asit, ferulik asit, sinapik asit ve benzoik asit) bulunduğu tesbit edilmiştir. Sonuca bakıldığında fenolik içerik bakımından oldukça zengin bulunmuştur. Bileşiklerin alıkonma zamanı, piklerin kapladığı alan ve bitkide buldukları konsantrasyonları Tablo 2'de, bitkinin kromatogramı ise Şekil 1'de gösterilmiştir.

Antimikrobiyal aktivite sonuçları bitkinin akciğer enfeksiyonu etkenleri olabilen grubu temsil eden *Y. pseudotuberculosis* üzerinde etkili olduğunu göstermiştir. Bitkinin *M. smegmatis* üzerinde de etkili olduğu

çalışmalarımız sonucunda belirlenmiştir. *E. coli*, *E. faecalis*, *C. albicans* ve *S. cerevisiae* üzerinde etki gözlenmemiştir (Tablo 3).

Tirozinaz inhibitör aktivite tayini çalışmaları sonuçları incelendiğinde ekstrenin IC₅₀ değeri 331.131 µg/mL olarak bulunmuştur.

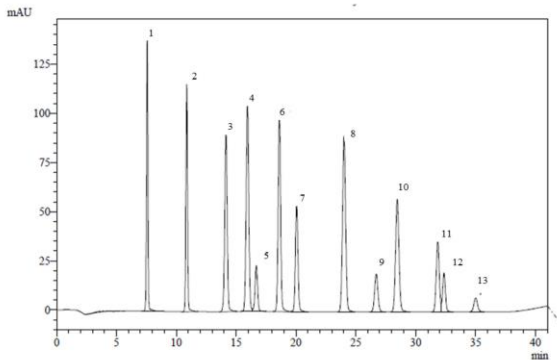
Tablo 2. *Onobrychis oxyodonta*'nın metanolik ekstresinin fenolik bileşenleri

Fenolik Bileşik	Alınma zamanı (dk)	Standard Eğri	Korelasyon katsayısı (r)	Miktar (mg/100g)
Gallik Asit	7.319	Y=46685x-33209	0,9935	6.84
Protokatekuik Asit	10.506	Y=39214x-27944	0,9984	45.12
Protokatekuik Aldehit	14.069	Y=46438x+6147,1	0,9968	8.67
p-OH Benzoik Asit	15.584	Y=39080x-10794	0,9974	3.73
Klorojenik Asit	16.720	Y=9208,8x-399,4	0,9930	9.65
Vanilik Asit	18.557	Y=49369x-631102	0,9980	9.11
Kafeik Asit	19.900	Y=27764x-9126,7	0,9973	32.64
Vanilin	24.020	Y=38753x-1671,6	0,9976	4.30
Şiringaldehit	26.646	Y=13655x-2503,5	0,9982	258.15
p-Kumarik Asit	27.949	Y=53747x-39534	0,9955	39.08
Ferulik Asit	31.682	Y=81674x-55584	0,9975	601.25
Sinapik Asit	32.531	Y=63367x-44638	0,9997	271.49
Benzoik asit	35.361	Y=6422x-11532	0,9967	387.97

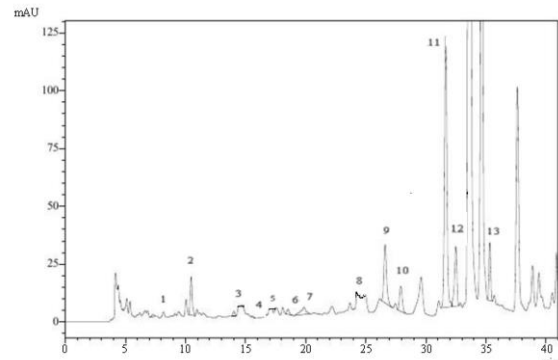
Tablo 3. *Onobrychis oxyodonta* ekstresinin antimikrobiyal aktivite taraması (50 µL)

Test edilen bileşikler	Microorganizmalar ve inhibisyon çapı (mm)								
	Ec	Yp	Pa	Sa	Ef	Bc	Ms	Ca	Sc
Ekstre	-	6	-	-	-	-	16	-	-
Ampisilin	10	10	18	10	35	15			
Streptomisin							35		
Flukonazol								25	25

Ec: *Escherichia coli*, Yp: *Yersinia pseudotuberculosis*, Pa: *Pseudomonas aeruginosa*, Sa: *Staphylococcus aureus*, Ef: *Enterococcus faecalis*, Bc: *Bacillus cereus*, Ms: *Mycobacterium smegmatis*, Ca: *Candida albicans*, Sc: *Saccharomyces cerevisiae*, (-): aktivite yok.



Şekil 1. Fenolik standardın RP-HPLC kromatogramı. Pikler: (1) gallik asit, (2) proto-katekuik asit, (3) protokatekuik aldehid, (4) p-OH benzoik asit, (5) klorojenik asit, (6) vanilik asit, (7) kafeik asit, (8) vanilin, (9) şiring aldehid, (10) p-kumarik asit, (11) ferulik asit, (12) sinapik asit, (13) benzoik asit



Şekil 2. *Onobrychis oxyodonta*'nın RP-HPLC kromatogramı. Pikler: (1) gallik asit, (2) proto-katekuik asit, (3) protokatekuik aldehid, (4) p-OH benzoik asit, (5) klorojenik asit, (6) vanilik asit, (7) kafeik asit, (8) vanilin, (9) şiring aldehid, (10) p-kumarik asit, (11) ferulik asit, (12) sinapik asit, (13) benzoik asit

Tartışma

Fenolik bileşikler bitkiler aleminin önemli doğal bileşenleridir ve son yıllarda gıdalardaki fenolik bileşiklerin antioksidan etkilerinin incelenmesi giderek önem kazanmaktadır (19). Geniş bir aile olan fenolik bileşiklerin spesifik bir grubunun ayrı ayrı analizleri mümkün olsa da gıdalardaki toplam fenolik bileşiklerin tayini her zaman gereksinim duyulan bir analizdir. Farklı *Onobrychis* türlerinin antioksidan etkinliği çeşitli çalışmalarda rapor edilmiştir (20, 21). Bu bağlamda çalışmamızın sonuçlarını önceki raporlarla karşılaştırmak olanaksızdır. Bu nedenle çalışma sonuçlarımız farklı *Onobrychis* türleri ile karşılaştırıldı. Çalışmamızda bitki ekstresindeki toplam fenoliklerin miktarı kolorimetrik olarak tayin edilerek ekstredeki toplam fenolik madde miktarı 8.0 ± 0.115 mg GAE/g ekstre şeklinde hesaplandı (Tablo 1). Karamian ve Asadbegy (20)'nin yaptığı çalışmada *O. viciifolia*'nın (10.38 ± 0.33 mg GAE/g) en yüksek total fenolik madde içeriğini *O. melanotricha*'nın ise (6.25 ± 0.28 mg GAE/g) en düşük değeri gösterdiği belirtilmiştir. Ince ve ark. (21)'nin yaptığı çalışmada *O. viciifolia* bitkisinden hazırlanan metanol, aseton, su ve etilasetat ekstralarında total fenolik madde içeriğini Folin-Ciocalteu metoduna göre çalışmışlar ve sonuçlarının 11.35 ± 0.82 ile 38.26 ± 0.15 µg Tannik asit/g ekstre aralığında değiştiğini bulmuşlardır. *O. oxyodonta* ekstresindeki fenolik bileşenler RP-HPLC ile belirlendi. Bu amaçla 13 fenolik asit standardı kullanıldı (Şekil 1). *O. oxyodonta* ekstresi HPLC analizi ile incelendiğinde galik asit, protokatekuik asit, protokatekuik aldehit, p-OH benzoik asit, klorojenik asit, vanilik asit, kafeik asit, vanilin, şiringaldehit, p-kumarik asit, ferulik asit, sinapik asit ve benzoik asit pikleri belirlendi (Şekil 2) ve miktarları hesaplandı (Tablo 2). Doğal antioksidanlar arasında önemli rol oynayan bitkisel polifenol içeriği; bitki türüne, tarımsal prosese, işiğe, iklime, hasat zamanına ve depolama şartlarına göre birçok dış etkenden etkilenebilir (22). Ayrıca çözücü ve ekstraksiyon proseslerindeki çeşitlilik de fenolik bileşiklerde gözlenen miktar değişikliklerinin sorumluları arasındadır.

Doğal antioksidanların serbest radikal giderme aktivitesini ölçmek için kullanılan DPPH radikali yaygın olarak kullanılmaktadır. DPPH'nin etanoldeki çözeltisi mor renklidir ve absorbanası 517 nm'de ölçülür. DPPH çözeltisine antioksidanların ilave edilmesiyle absorbansta bir düşüş meydana gelir ve çözeltinin rengi mordan sarıya doğru değişir. Absorbansın düşmesinin sebebi radikal ile antioksidan moleküllerin etkileşime girmesi, radikale hidrojen bağlanması ile radikalin giderilmesidir. Antioksidan ile DPPH'nin oluşturduğu reaksiyon karışımının ölçülen absorbanası ne kadar düşük ise antioksidanın serbest radikali giderme aktivitesi de o kadar yüksek olacaktır.

Yapılan antioksidan testleri sonucunda, DPPH IC_{50} 1.333 ± 0.0026 mg/mL ve FRAP 323 ± 5.773 µM TE/g ekstre olarak belirlenmiştir. Toplam fenolik içeriği 8.0 ± 0.115 mg GAE/g ekstre olarak tespit edilmiştir (Tablo 1). Karamian ve Asadbegy (20)'nin çalışmasında *O. viciifolia* ekstresinde toplam fenolik içeriği 10.38 ± 0.33 mg GAE/g

DW olarak bulunmuştur. *O. sosnowiec*, *O. viciifolia* ve *O. melanotricha* türleri ile yaptıkları çalışmada DPPH radikal yakalama aktivitesini (IC_{50} ; 0.121 ± 0.005 to 0.129 ± 0.001 mg/mL) ve metal şelatlama aktivitesini (IC_{50} ; 1.10 ± 0.006 to 1.80 ± 0.003 mg/mL) askorbik asit ile karşılaştırdıklarında daha yüksek aktivite gösterdiğini bulmuşlardır. Ayrıca β-karoten beyazlatma yönteminde sonuçlarını sentetik antioksidan olan BHT ile karşılaştırdıklarında daha yüksek bir aktivite bulmuşlardır.

Bitki ekstralarının indirgeyici gücü onların antioksidan aktiviteleri ile ilişkilidir (23). FRAP değeri ne kadar yüksekse bitki ekstresinin Fe^{+3} indirgeyici kapasitesi o kadar yüksektir. Çalışmamızda ekstremizin iyi derecede Fe^{+3} indirgeyici kapasitesi ve dolayısıyla elektron verebilme yeteneği olduğu gözlemlendi. Bu özelliğinden dolayı ekstremizin reaktif serbest radikal türlerini, daha stabil radikal olmayan türlere dönüştürerek serbest radikal zincirini sonlandırmak üzere rol oynayabilecekleri söylenebilir. Bazı çalışmalarda da Fe^{+3} indirgeyici kapasite ile lipid peroksidasyonunun inhibisyonu arasında güçlü bir ilişki olduğu belirtilmiştir (24, 25).

Günümüzde birçok faktöre bağlı olarak çeşitli hastalıklar çok sık görülmeye başlanmıştır. Alzheimer hastalığı ve diyabet bunlardan sadece ikisidir. Örneğin, Amerika'da her 67 saniyede bir kişi Alzheimer'a yakalanmakta ve bu durumun 2050'de 33 saniye gibi kısa bir süreye düşmesi beklenmektedir (26). Ayrıca, günümüzde 366 milyon insan diyabetten etkilenirken bu sayının 2050'de 552 milyona yükseleceği tahmin edilmektedir (27). Bu bağlamda bu hastalıkların tedavisine yönelik yeni stratejilerin ortaya konulması çok önemlidir. Bu stratejiler arasında en çok kabul göreni anahtar enzimlerinin inhibisyon araştırmalarıdır. Böylece hastalıkların patolojisinde rol oynayan anahtar enzimler inhibe edilerek hastalıktan kaynaklanacak semptomların hafifletilmesi sağlanır. Örneğin, tirozinaz enzimi melanin sentezinin en önemli enzimidir ve bu enzimin inhibe edilmesi deri hastalıklarının kontrolünde bilgi vericidir (28). Tirozinaz inhibitörlerinin kullanımına ilgi, özellikle güneş yanıkları sonrası deri beyazlatıcı ve pigmentasyonu önleyici etkilerinden dolayı ilaç ve kozmetik endüstrilerinde gün geçtikçe giderek artmaktadır. Bu amaçla çok çeşitli enzim inhibitörleri (kolinesteraz için galantamin, amilaz ve glukozidaz için akarboz, tirozinaz için kojik asit) sentetik olarak üretilmiştir. Bununla birlikte bu sentetik inhibitörlerin sindirim sistemi bozukluklara yol açması, hepatotoksik özelliklere sahip olması gibi pek çok dezavantajları olması bunların kullanımlarını kaygılı hale getirmiştir (29). Bu noktadan hareketle bitkisel kaynaklı doğal inhibitörlere olan ilgi her geçen gün artmaktadır. Ekstremizin tirozinaz enzim inhibisyonu IC_{50} değeri 331.131 µg/mL olarak belirlendi ve kojik asitle karşılaştırıldığında *O. oxyodonta* metanol ekstresinde ılımlı tirozinaz inhibisyon aktivitesi gözlemlendi. Zengin ve ark. (30) *O. hypargyrea*'nın metanolik ekstraktının tirozinaz enzimi üzerindeki inhibitör etkisini (3.5 ± 0.069 mg/mL IC_{50}), standart olarak kullanılan kojik asitten (0.14 ± 0.001 mg/mL IC_{50}) anlamlı olarak yüksek bulmuşlardır.

Son yıllarda çoklu antibiyotik direncine sahip mikroorganizmaların artması yüzünden bu mikropların neden olduğu enfeksiyonun tedavisi gittikçe zorlaşmaktadır. Bazı çalışmalar, bitkilerin tedavi edici etkilerinin tek bir etken maddeden ziyade çok sayıda bileşimin sinerjik etkisinden kaynaklandığını, bu nedenle bitkisel bileşimlerin tek bir antibiyotikle öldürülmesi zor olan mikroorganizmaların dirençliliğine karşı koyarak daha etkin bir tedavi sağladığını göstermektedir (31, 32). Bu durum, araştırmacıları bitki ekstraktlarından elde edilen doğal antimikrobiyal ajanların inhibitör etkiye sahip bileşimlerini araştırmaya sevk etmektedir (33). Bitkisel ekstraktlar; flavonoid, polifenolik bileşikler, taninler ve terpenler gibi çok sayıda fitokimyasal maddeyi içermektedir. Yapılan çalışmalar, mikroorganizmalara karşı yüksek düzeyde antimikrobiyal aktiviteden bu tür bileşiklerin sorumlu olduğunu göstermektedir (34).

Ülkemiz dâhil dünyanın her yerinde pek çok familyaya mensup bitki türlerinden elde edilen ekstraktların çeşitli patojenlere karşı antimikrobiyal aktivitelerini kapsayan çok sayıda çalışma yapılmıştır (35, 36). Bizim çalışmamız ile uyumlu bir şekilde, *O. oxyodonta* türüne ait yapılan bir çalışmada test edilen bazı gram pozitif ve gram negatif bakterilere karşı ılımlı derecede antibakteriyel aktivite bulunmuştur (37). Bu çalışmada ise *Yersinia pseudotuberculosis* pozitif kontrol olarak kullanılan Ampiciline karşı; *M. smegmatis* ise yine pozitif

kontrol olarak kullanılan Streptomisine karşı direnç gösterir iken, bitki ekstresi bu bakterilere karşı antimikrobiyal aktivite göstermiştir (Tablo 3). Bu çalışma ile *O. oxyodonta*'nın antibiyotiklere direnç gösteren bakterilere karşı, tıbbi bitkilerin antimikrobiyal amaçla kullanımlarının gerekli olduğu durumlarda bitki seçimine yardımcı olabilecek nitelikte olduğu belirlenmiştir.

Şimdiye kadar yapılan *Onobrychis* bitkisinin farklı türlerinin halk arasında çeşitli hastalıkların tedavisinde kullanıldığını biliyoruz. Ancak çalışılmamış bir tür olan *O. oxyodonta*'nın gerek antioksidan gerekse antimikrobiyal olarak etkili olduğu yapılan bu çalışma ile ortaya konmuştur. Hem antibakteriyel hem de antifungal aktiviteye sahip olması nedeniyle enfeksiyonların tedavisinde yardımcı olarak kullanılabilir. Tirozinaz enzimini inhibe etmesinden dolayı hiperpigmentasyon tedavisinde de yardımcı olarak kullanılabilir. Ayrıca sahip olduğu güçlü antioksidan özellikten dolayı, gıda sanayinde kullanımı ile antioksidan savunma sistemimizin serbest radikallerle mücadelesinde katkı sağlayacağı açıktır. Çalışma sonuçlarımıza bakıldığında *O. oxyodonta*'nın iyi bir antioksidan ve antimikrobiyal kaynağı olduğu, tirozinaz enzimini orta düzeyde inhibe etme özelliğine ve zengin fenolik bileşime sahip olduğu söylenebilir. Bu nedenle çalışılan tür doğal antioksidanların ve enzim inhibitörlerinin önemli bir kaynağı olarak düşünülebilir.

Kaynaklar

1. Toroğlu S, Çenet M. Tedavi amaçlı kullanılan bazı bitkilerin kullanım alanları ve antimikrobiyal aktivitelerinin belirlenmesi için kullanılan metodlar. KSÜ Fen ve Mühendislik Dergisi 2006; 9: 12-9.
2. Aktoklu E. Türkiye'de yetişen *Onobrychis miller* (Fabaceae) Türlerinin Revizyonu. Doktora Tezi, Malatya: İnönü Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalı, 1995.
3. Demirci S, Ozhatay N. An ethnobotanical study in Kahramanmaraş, (Turkey); wild plants used for medicinal purpose in Andirin, Kahramanmaraş. Turk J Pharm Sci 2012; 9: 75-92.
4. Sargin SA, Akcicek E, Selvi S. An ethnobotanical study of medicinal plants used by the local people of Alasehir (Manisa) in Turkey. J Ethnopharmacol 2013; 150: 860-874.
5. Hayta S, Polat R, Selvi S. Traditional uses of medicinal plants in Elazığ (Turkey). J Ethnopharmacol 2014; 154: 613-623.
6. Yesilada E, Honda G, Sezik E, et al. Traditional medicine in Turkey. V. Folk medicine in the inner Taurus Mountains. J Ethnopharmacol 1995; 46: 133-152.
7. Akkuş İ. Serbest Radikaller ve Fizyopatolojik Etkileri. Konya: Mimoza Yayınları, 1995.
8. Halvorsen BL, Holte K, Myhrstad MCW, et al. A systematic screening of total antioxidants in dietary plants. J Nutr 2002; 132: 461-471.
9. Ulusoy E, Kolaylı S, Sarıkaya O. Antioxidant antimicrobial activity of different floral origin honeys from Turkey. J Food Biochem 2010; 34: 321-335.
10. Lopez-Alarcon C, Lissi E. A novel and simple ORAC methodology based on the interaction of Pyrogallol Red with peroxyl radicals. Free Radic Res 2006; 40: 979-985.
11. Çelik A, Herken EN, Arslan İ, Özel MZ, Mercan N. Screening of the constituents, antimicrobial and antioxidant activity of endemic *Origanum hypericifolium*. Nat Prod Res 2010; 24: 1568-1577.
12. Ünal L. Türkiye Florasında Doğal Olarak Yetişen Bazı Bitki Türlerinin Antimikrobiyal ve Antioksidan Aktivitelerinin Belirlenmesi. Yüksek Lisans Tezi, Erzurum: Atatürk Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, 2006.
13. Gholamhoseinian A, ZohreRazmi Z. Screening the methanolic extracts of some plants for tyrosinase inhibitory activity. Toxicol Environ Chem 2012; 94: 310-318.
14. Singleton VL, Rossi Jr JA. Colorimetry of total phenolics with phosphomolibdic-phosphotungstic acid reagents. Am J Enol Vitic 1965; 16: 144-158.
15. Benzie IF, Szeto YT. Total antioxidant capacity of teas by the ferric reducing/antioxidant power assay. J Agr Food Chem 1999; 47: 633-636.
16. Molyneux P. The use of the stable free radical diphenylpicryl-hydrazyl (DPPH) for estimating antioxidant activity. Songklanakarın J Sci Technol 2004; 26: 211-219.
17. Woods GL, Brown-Elliott BA, Desmond EP, et al. In susceptibility testing of mycobacteria, nocardiae, and other aerobic actinomycetes; approved standard, NCCLS document M24-A, 2003; 23: 18.
18. Masuda T, Yamashita D, Takeda Y, Yonemori S. Screening for tyrosinase inhibitors among extracts of seashore plants and identification of potent inhibitors from

- Garcinia subelliptica. Biosci Biotechnol Biochem 2005; 69: 197-201.
19. Aliyazicioglu R, Sahin H, Ulusoy E, Erturk O, Kolayli S. Properties of the phenolic composition and biological activity of the propolis from Turkey. Int J Food Prop 2011; 16: 277-287.
 20. Karamian R, Asadbegy M. Antioxidant activity, total phenolic and flavonoid contents of three Onobrychis species from Iran. Pharm Sci 2016; 22: 112-119.
 21. Ince S, Ekici H, Yurdakok B. Determination of in vitro antioxidant activity of the sainfoin (*Onobrychis viciifolia*) extracts. Ank Univ Vet Fak Derg 2012; 59: 23-27.
 22. Heimler D, Isolani L, Vignolini P, Tombelli S, Romani A. Polyphenol content and antioxidative activity in some species of freshly consumed salads. J Agric Food Chem 2007; 55: 1724-1729.
 23. Blois MS. Antioxidants determination by the use of a stable free radical. Nature 1958; 4617: 1199-1200.
 24. Juntachote T, Berghofer E. Antioxidative properties and stability of ethanolic extracts of holy basil and galangal. Food Chem 2005; 92: 193-202.
 25. Hinneburg I, Dorman Hjd, Hiltunen R. antioxidant activities of extracts from selected culinary herbs and spices. Food Chem 2006; 97: 122-129.
 26. Alzheimer Association. Alzheimer's disease facts and figures. Alzheimer's & Dementia 2014; 10: e47-e92.
 27. Whiting DR, Guariguata L, Weil C, Shaw J. IDF Diabetes Atlas: Global estimates of the prevalence of diabetes for 2011 and 2030. Diabetes Res Clin Pr 2011; 94: 311-321.
 28. Kim YJ, Uyama H. Tyrosinase inhibitors from natural and synthetic sources: structure, inhibition mechanism and perspective for the future. Cell Mol Life Sci 2005; 62: 1707-1723.
 29. Bhat M, Zinjarde SS, Bhargava SY, Kumar AR, Joshi BN. Antidiabetic Indian plants: A good source of potent amylase inhibitors. Evid-Based Complement Alternat Med 2011: 1-6.
 30. Zengin G, Guler GO, Aktumsek A, et al. Enzyme inhibitory properties, antioxidant activities, and phytochemical profile of three medicinal plants from Turkey. Adv Pharmacol Sci 2015; 2015: 1-8.
 31. Shanthi Sree KS, Yasodamma N, Paramageetham CH. Phytochemical screening and in vitro antibacterial activity of the methanolic leaf extract: *Sebastiania chamaelea* Müell Arg. The Bioscan 2010; 5: 173-175.
 32. Mohd Nazri NAA, Ahmat N, Adnan A, Syed Mohamad SA, Syaripah Ruzaina SA. In vitro Antibacterial and Radical Scavenging Activities of Malaysian Table Salad. Afr J Biotech 2011; 10: 5728-5735.
 33. Dash BK, Sultana S, Sultana N. Antibacterial activities of methanol and acetone extracts of fenugreek (*Trigonella foenum*) and Coriander (*Coriandrum sativum*). Life Sci Med Res 2011; 27: 1-8.
 34. Mojab F, Poursaeed M, Mehrgan H, Pakdaman S. Antibacterial activity of *Thymus daenensis* methanolic extract. Pak J Pharm Sci 2008; 21: 210-213.
 35. Aliyazicioglu R, Korkmaz N, Akkaya S, et al. Phenolic components, antioxidant and antimicrobial activities of *Centranthus longiflorus* L. Int J Adv Res Biol Sci 2016; 3: 80-87.
 36. Maregesi SM, Pieters L, Ngassapa OD, et al. Screening of some tanzanian medicinal plants from bunda district for antibacterial, antifungal and antiviral activities. J Ethnopharmacol 2008; 119: 58-66.
 37. Usta C, Birinci Yildirim A, Ucar Turker A. Antibacterial and antitumour activities of some plants grown in Turkey. Biotechnol Biotec Eq 2014; 28: 306-315.