

Endemik *Haplophyllum* A. Juss. Türlerinin Antioksidan Aktivitesi Üzerine Lokasyon ve Tür Farkının Etkisi

Cennet YAMAN^{1*}, Osman TUGAY², Deniz ULUKUŞ³

ÖZET: Bu çalışmanın amacı Türkiye'nin farklı lokasyonlarından toplanmış bazı endemik *Haplophyllum* A. Juss. (*H. myrtifolium*, *H. vulcanicum*, *H. pumiliforme* ve *H. sahinii*) türlerinin toplam fenolik, toplam flavonoid ve antioksidan aktivitelerinin belirlenmesidir. Örneklerin toplam fenolik miktarı 31.8 ila 49.8 mg GAE g⁻¹ ekstrakt arasında değişmiştir. *H. vulcanicum* ve *H. sahinii* diğer türlere göre daha yüksek toplam fenolik içeriğine sahip olmuştur. En yüksek toplam flavonoid miktarı *H. myrtifolium* türünün her iki lokasyonundaki örneklerinde (62.0 ve 63.0 mg KE g⁻¹ ekstrakt), en düşük ise *H. pumiliforme* türünün her iki lokasyonundaki örneklerinde (36.2 ve 31.7 mg KE g⁻¹ ekstrakt) tespit edilmiştir. Antioksidan aktivitesi olarak DPPH ve ABTS radikal kovucu aktiviteleri incelenmiştir. *H. myrtifolium* türünün lokasyon1 örnekleri ile *H. pumiliforme* türünün lokasyon2 örnekleri en yüksek ABTS radikal kovucu aktivitesi sergilemiştir (sırasıyla %78.6 ve %79.0). *H. vulcanicum* türünün iki lokasyonundaki örnekleri ise iki aktivite içinde en düşük değer göstermiştir. Sonuç olarak, *H. pumiliforme* türünün düşük fitokimyasal içerdiğine sahip olduğu, fakat yüksek oranda antioksidan aktivite sergilediği tespit edilmiştir. *H. vulcanicum*, *H. sahini* ve *H. pumiliforme* hakkındaki toplam biyoaktif madde içeriği ve antioksidan aktivitesi ilk kez tarafımızdan bildirilmiştir.

Anahtar Kelimeler: *H. myrtifolium*, *H. vulcanicum*, *H. pumiliforme*, *H. sahinii*, antioksidan.

The Effect of Location And Species Differences on Antioxidant Activities of Endemic *Haplophyllum* A. Juss.

ABSTRACT: The aim of current study was to determinate antioxidant activities, the total flavonoid and phenolic contents of aerial parts of some endemic *Haplophyllum* A. Juss. (*H. myrtifolium*, *H. vulcanicum*, *H. pumiliforme* and *H. sahinii*) collected from different locations of Turkey. The total phenolic content of the samples ranged from 31.8 to 49.8 mg GAEg⁻¹ extract. *H. vulcanicum* and *H. sahinii* had higher total phenolic content than other species. The highest total flavonoid amount was detected in the samples of both locations of *H. myrtifolium* (62.0 and 63.0 mg KE g⁻¹ extract) whereas the lowest was reported in the samples of both locations of *H. pumiliforme* (36.2 and 31.7 mg KE g⁻¹ extract). Antioxidant activities were measured by radical scavenging activities such as the 2, 2'-azino-bis-3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid (ABTS) and 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH). Location1 samples of *H. myrtifolium* and location2 samples of *H. pumiliforme* showed the strongest ABTS radical scavenging activity (78.6% and 79.0%, respectively). The samples in two locations of *H. vulcanicum* had the lowest value for two activities. As a result, *H. pumiliforme* was found to have low phytochemical content but exhibited high antioxidant activity. The results of antioxidant activities and total bioactive contents about *H. vulcanicum*, *H. sahini* and *H. pumiliforme* is reported by us for the first time.

Keywords: *H. myrtifolium*, *H. vulcanicum*, *H. pumiliforme*, *H. sahinii*, antioxidant activity

¹Cennet YAMAN (Orcid ID: 0000-0002-2364-8171), Bozok Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Tarla Bitkileri Bölümü, Yozgat, Türkiye

²Osman TUGAY (Orcid ID: 0000-0003-3980-7648), Selçuk Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi, Farmasötik Botanik Anabilim Dalı, Konya, Türkiye

³Deniz ULUKUŞ (Orcid ID: 0000-0002-9627-5492), Selçuk Üniversitesi, Fen Fakültesi, Biyoteknoloji Bölümü, Konya, Türkiye

*Sorumlu Yazar/Corresponding Author: Cennet YAMAN, e-mail: cennet.yaman@bozok.edu.tr

GİRİŞ

Haplophyllum cinsi Rutaceae familyasına ait çok yıllık ve kokulu bitkilerdir. Akdeniz bölgesinden Doğu Sibirya'ya kadar geniş bir coğrafi dağılımı olan *Haplophyllum* cinsi, dünyada yaklaşık 70 tür ile temsil edilmektedir (Townsend, 1986; Tugay ve Ulukuş, 2017; Ulukuş ve Tugay, 2018). Türkiye *Haplophyllum* cinsi için %58 endemizm oranı (11'i endemik 19 takson) ile önemli bir gen merkezine sahiptir (Ulukuş ve Tugay, 2018).

Bitkinin herba ve özellikle yaprak kısımları geleneksel tıpta sıtma, romatoid artrit, jinekolojik hastalıkları, kabızlık, ishal ve cilt hastalıkları gibi pek çok hastalığın tedavisinde kullanılmaktadır (Kuete ve ark., 2013; Raissi ve ark., 2016). Ayrıca, bu cinsin üyeleri antioksidan (Hamdi ve ark., 2018), anti mikrobiyal ve anti inflamatuvar (Sabry ve ark., 2016b), kardiovasküler etki (Mohamed ve ark., 2008), sıtma (Ulubelen ve Öztürk, 2008), anti ülser (Awaad ve Alothman, 2018) dahil olmak üzere önemli biyolojik aktiviteler göstermektedir. Ayrıca zirai mücadele amaçlı insektisel aktivite sergilediği bilinmektedir (Al-Rehaily ve ark., 2014). Bu aktivitelerin potansiyeli bitki bünyesinde bulunan fotokimyasallardan kaynaklanmaktadır. Önceki literatürlerde, *Haplophyllum* türlerinin alkaloid, ligan, kumarin, flavonoid, esansiyel ve uçucu yağ içerdiği bildirilmiştir (Ulubelen ve Öztürk, 2008; Sabry ve ark., 2016a). Son zamanlarda yapılan bir çalışmada *H. sahinii* ve *H. vulcanicum* köklerinde γ -fagarin alkaloidi tespit edilmiş, ayrıca her iki türün kolinesteraz ve trizonaz inhibitör etkileri ortaya çıkarılmıştır (Karahisar ve ark., 2019).

Gıda, tıp, farmakoloji ve kozmetik gibi endüstrilerde koruyucu ve katkı maddesi amaçlı antioksidan özelliğine sahip birçok bileşik sınıfları veya bileşikler kullanılmaktadır. Bu bileşikler çoğunlukla ucuz ve çabuk ulaşılabilirliğinden dolayı sentetik ürünlerdir. Yapılan araştırmalar neticesinde sentetik bileşiklerin toksik ve kanserojen etkilerinin bulunduğu ortaya çıkarılmış, bunların yerine yüksek antioksidan aktivitesine sahip doğal ürünler/preparatlar tercih edilmeye başlamıştır (Pasqualon ve ark., 2015; Narayanasamy ve ark., 2018). Bitkisel kökenli doğal ekstraktlar, sentetik antioksidanlara alternatifler sağlamaktadır. Bu yüzden aromatik bitkilerden, baharatlardan ve meyve tozundan doğal antioksidan amaçlı ekstraktlar geliştirilmiş, geliştirmeye de devam edilmektedir (Bajaj ve ark., 2006, Shah ve ark., 2014).

Endüstri alanlarında kullanılabilecek bileşikler (ör:şikonin, hiperisin, kateşin vb.) kendi aralarında antioksidan aktivite seviyelerinde farklılık gösterirken, bitkilerde (cins, familya, tür vb.) bulunmalarına göre de farklılık göstermektedir (Skrzypczak ve ark., 2015; Napoli ve ark., 2018; Orhan ve ark., 2019). Bu bileşiklerin bitkilerde biyosentezi, biriktirilmesi ve biyolojik aktiviteleri çevresel gibi dış faktörler ile bitkinin fizyolojik ve genetik yönleri gibi iç faktörlere bağlı olarak değişmektedir (Ashraf ve ark., 2018; Deng ve ark., 2019). Bu yüzden, ticari amaç için kullanılabilecek preparatın/ekstraktın yada spesifik bir bileşiğin doğadan tespit edilmesi önemli ilk adımdır.

Haplophyllum cinsinin fenolik bileşikleri ve antioksidan aktiviteleri hakkında şimdiye kadar çok az türünde araştırma yapılmıştır. Bu çalışmanın amacı farklı habitatlardan toplanan Türkiye endemiği *Haplophyllum* türlerinin antioksidan aktivitesi ile birlikte fenolik içeriği incelemektir. Bu çalışmanın sonuçları *Haplophyllum* türlerinin gıda ve farmasötik ürünlerde potansiyel bir doğal antioksidan kaynağı olarak kullanılabilirliği açısından önemlidir.

MATERYAL VE YÖNTEM

Materyal

Materyal olarak Türkiye endemiği olan *Haplophyllum myrtifolium* Boiss., *Haplophyllum vulcanicum* Boiss. & Heldr., *Haplophyllum pumiliforme* Hub.-Mor. & Reese ve *Haplophyllum sahinii* Tugay & Ulukuş türlerinin toprak üstü kısımları kullanılmıştır. Türlerin örnekleri doğadan çiçeklenme

döneminde, tamamen rastgele, her tür için toplamda 40 sürgün olacak şekilde toplanmıştır. Her bir türe ait lokasyon ve herbaryum numarası çizelge 1’de verilmiştir.

Çizelge 1. *H. myrtifolium*, *H. vulcanicum*, *H. pumiliforme* ve *H. sahinii* türlerinin habitatları ve herbaryum numaraları

Lokasyon	Bitki İsmi	Tehlike Kategorisi ¹	Rakım (m)	Toplama Zamanı	Toplama Yeri ²	Toplayıcı Numarası
Lokasyon1	<i>Haplophyllum vulcanicum</i>	VU	1000	10.06.2012	C4 ³ Konya; Karapınar,	OT-7466-DU
Lokasyon 2			1200	15.07.2014	C4 Karaman; Karadağ	OT-9614-DU
Lokasyon1	<i>Haplophyllum pumiliforme</i>	VU	1450	12.06.2012	C3 Konya; Derebucak, Soğukoluk yolu	OT-7495-DU
Lokasyon 2			1470	12.06.2012	C3 Konya; Derebucak	OT-7481-DU
Lokasyon1	<i>Haplophyllum myrtifolium</i>	EN	1070	01.07.2012	C4 Konya; Çumra, Apasaraycık Köyü	OT-7392-DU
Lokasyon 2			1090	18.05.2014	C4 Konya; Çumra, Apasaraycık Köyü, batı yamaçlar	OT-9264-DU
Lokasyon1	<i>Haplophyllum sahinii</i>	EN	1090	18.06.2014	C4 Konya; Çumra, Apasaraycık-Apa köyü	OT-7410-DU

¹VU, zarar görebilir; EN, tehlikede (IUCN 2014)

²Türkiye

³Türkiye haritasının kareleme sistemi

Ekstraksiyon

Haplophyllum'ın toprak üstü kısımları kurutuldu ve blender yardımı ile öğütülmüştür. Numuneler yaklaşık 4 g ağırlığında tartılmış, 24 saat boyunca 40 °C'de (1/10) etanol içerisinde bekletilmiştir. Elde edilen çözeltiler Whatman kâğıdı ile filtrelendi ve çözücüler evaporatör yardımı ile uzaklaştırılmıştır. Ekstraktların verimleri hesaplandıktan sonra ekstraktlar etanolde tekrar çözülmüştür (Şekil 2). Her bir deneme 3 tekerrürlü yapılmış olup, örnekler analiz sonuna kadar +4 °C'de ağız parafinli şekilde bekletilmiştir.

Toplam fenolik içerik

Örneklerin toplam fenolik içeriği Folin-Ciocalteu reaktif metoduna göre modifiye edilerek belirlenmiştir (Singleton ve ark., 1999). Her örnek (200 µL) distile su (9 mL) ile seyreltikten sonra Folin-Ciocalteu reaktifi (200 µL) ile karıştırıldı ve 3 dakika boyunca kuvvetlice çalkalandı. En son Na₂CO₃ (% 20) çözeltisi (600 µL) eklenmiştir. Daha sonra numuneler karanlıkta 2 saat oda sıcaklığında inkübe edildi ve absorbans ölçümleri 760 nm'de okutulmuştur. Her bir deneme 4 tekerrürlü olarak kurulmuştur. Örneklerin toplam fenolik içerikleri, standart gallik asit grafiğinden elde edilen denkleme ($y = 0,0089x - 0,0003$; $R^2 = 0,999$) göre mg gallik asit eşdeğeri (GAE) g⁻¹ ekstrakt olarak ifade edilmiştir.

Toplam flavonoid içerik

Örneklerin toplam flavonoid içerikleri Arvouet-Grand ve ark. (1994) göre modifiye edilerek yapılmıştır. Kısaca, her örnek (200 µL) ayrı tüplerde 100 µL alüminyum nitrat (% 10) ve 100 µL potasyum asetat (1 M) ile karıştırılmıştır. Toplam çözelti hacmi etanol ile 4 mL'ye ayarlanmıştır.. Daha

sonra, numuneler oda sıcaklığında 40 dakika karanlıkta inkübe edildi ve absorbans ölçümleri 417 nm'de okundu. Her bir deneme 4 tekerrürlü olarak kurulmuştur. Örneklerin toplam flavonoid içerikleri standart kuersetin grafiğinden elde edilen denkleme ($y = 0,0122x + 0,065$; $R^2 = 0,9997$) göre mg kuersetin eşdeğeri (KE) g^{-1} ekstrakt olarak ifade edilmiştir.

DPPH Radikal Kovucu Aktivite

Örneklerin 2,2-difenil-1-pikrilhidrazil (DPPH) radikal kovucu aktiviteleri Gezer ve ark. (2006) göre analiz edilmiştir. Her numuneden iki yüz mikrolitre ($500 \mu g mL^{-1}$) alınmış ve 3.2 mL DPPH çözeltisine (% 0.004 metanol) ilave edilmiştir. Kontrol numunelerin hazırlanmasında örnek yerine örnek çözeltisi eklenmiştir. Daha sonra, numuneler oda sıcaklığında 30 dakika karanlıkta inkübe edildi ve absorbans ölçümleri 517 nm'de okutulmuştur. Her bir deneme 2 tekrarlı 3 tekerrürlü olarak kurulmuştur. Radikal süpürme aktivitesinin sonuçları, DPPH radikalinin % inhibisyonu olarak aşağıdaki denkleme göre hesaplanmıştır.

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

ABTS Radikal Kovucu Aktivite

Örneklerin 2,2'-azinobis (3-etil-bezotiazolin 6 sulfonat) (ABTS) radikal kovucu aktiviteleri Re ve ark. (1999) göre modifiye edilerek analiz edilmiştir. ABTS çözeltisi 7.8 mL distile saf su içerisinde 6.6 mg potasyum persülfat ile 30 mg ABTS reaksiyonu ile elde edildi ve karışım oda sıcaklığında karanlıkta 12-16 saat bekletilmiştir. Daha sonra ABTS çözeltisi metanol ile 734 nm'de 0.700 ± 0.020 absorbansa ayarlandı. Her bir örnekten 100 μL ($200 \mu g mL^{-1}$) ABTS çözeltisine (2.9 mL) eklenmiş ve karıştırılmıştır. Kontrol numunelerin hazırlanmasında örnek yerine örnek çözeltisi eklenmiştir. Daha sonra numuneler oda sıcaklığında 30 dakika karanlıkta inkübe edildi ve absorbans ölçümleri 734 nm'de okutulmuştur. Radikal süpürme aktivite sonuçları ABTS radikalinin % inhibisyonu aşağıdaki denkleme göre hesaplanmıştır.

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

İstatistiksel Analizler

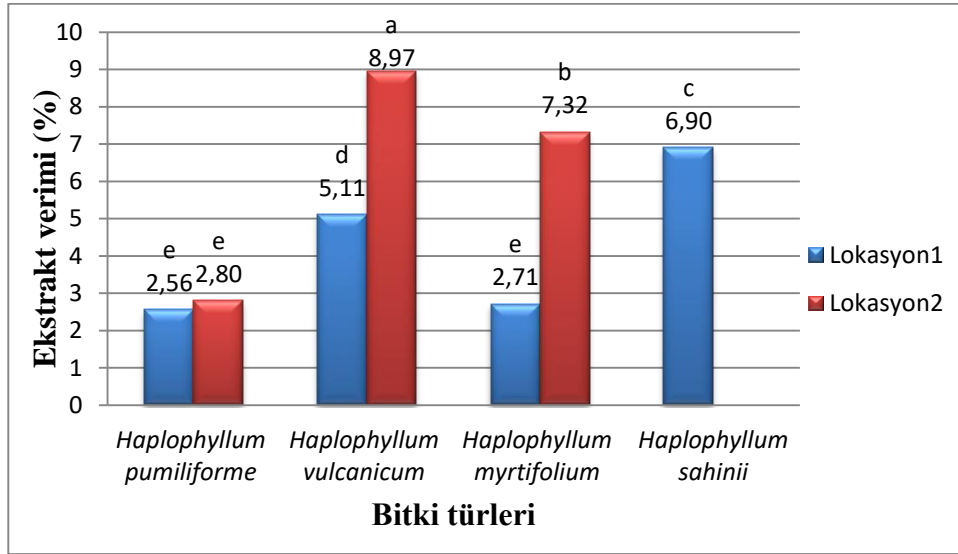
Her türün ekstrakt verimleri, toplam fenolik ve flavonoid içeriği ile DPPH ve ABTS radikal kovucu aktivitelerinin verileri Düzgüneş vd. (1983) tarafından bildirildiği şekilde varyans analizi ve Duncan testi uygulanmıştır. Yüzde değerler istatistiki analizden önce açı değerlerine dönüştürülmüştür (Snedecor ve Cochran, 1967). Sonuçlar, tekerrürlerin ortalaması olarak verilmiştir.

BULGULAR VE TARTIŞMA

Bu çalışmada, iki farklı lokasyondan toplanmış *Haplophyllum* türlerine ait etanol ekstraktların toplam fenolik ve flavonoid içerikleri ile antioksidan aktiviteleri incelenmiştir. Her bir lokasyon'a ait *Haplophyllum* türlerinin ekstrakt verimleri Şekil 1'de verilmiştir.

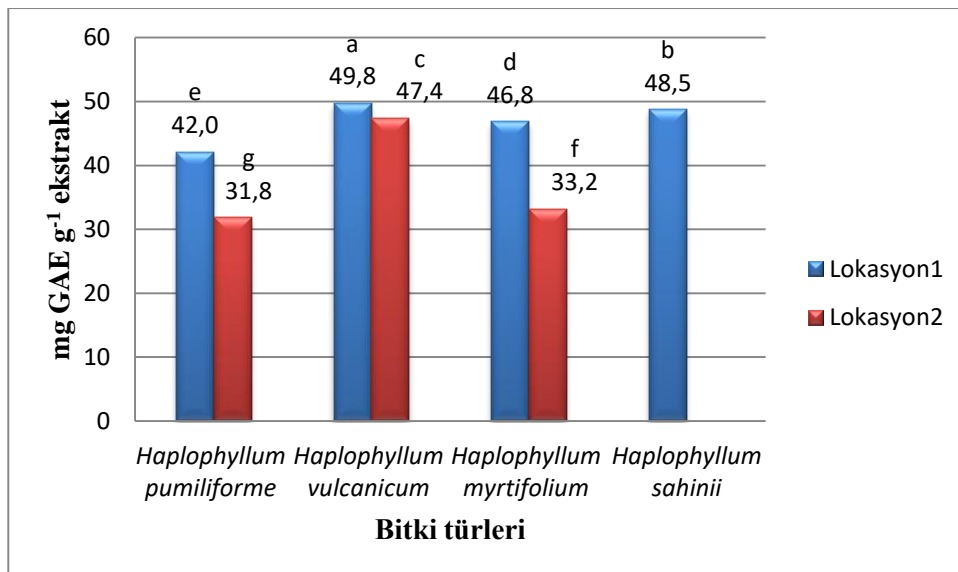
Haplophyllum türlerinin farklı lokasyonlarına ait ekstrakt verimleri %2.56 ile %8.97 arasında değişmiştir. En yüksek ekstrakt verimi %8.97 ile *H. vulcanicum* türünün lokasyon2'deki örneklerinde gözlenmiştir. En düşük ise *H. pumiliforme* türünün her iki lokasyon'unda (%2.56 ve %2.80) ve *H. myrtifolium* türünün lokasyon1 (%2.71) örneklerinde saptanmış ve istatistiki olarak aralarında fark olmadığı tespit edilmiştir. Debouba ve ark. (2014) *Haplophyllum tuberculatum* türünün hekzan, kloroform ve metanol çözücülerindeki ekstrakt verimini sırasıyla %0.70, %0.58 ve %1.94 olarak bulmuşlardır. Bu çalışmadaki türlerin *Haplophyllum tuberculatum* türünden daha fazla ekstrakt verimine sahip olduğu gözlenmiştir.

Her türün lokasyon 2'deki örnekleri lokasyon1'deki örneklerinden daha yüksek rakımda yer almaktadır. Şekil 2 incelendiğinde, her bir *Haplophyllum* türünün yüksek rakımda bulunan bitki örnekleri düşük rakımda bulunan örneklerden daha yüksek ekstrakt verimine sahip olduğu gözlenmiştir. *Haplophyllum* türleri için rakım'ın ekstrakt verimi üzerine etkili olabileceği tespit edilmiştir. *H. pumiliforme* türü diğer türlerin lokasyonlarından çok daha fazla yüksek rakıma sahip olmasına rağmen her iki lokasyon'da da en düşük ekstrakt verime sahip olmuştur. Ekstrakt verimindeki bu farklılıklar tür ve lokasyon farkından kaynaklanabileceği gibi toprak, bitki popülasyonu ve iklim özelliklerinden de kaynaklanabilir.



Şekil 1. Farklı lokasyondaki *H. myrtifolium*, *H. vulcanicum*, *H. pumiliforme* ve *H. sahinii* türlerinin ekstrakt verimi.

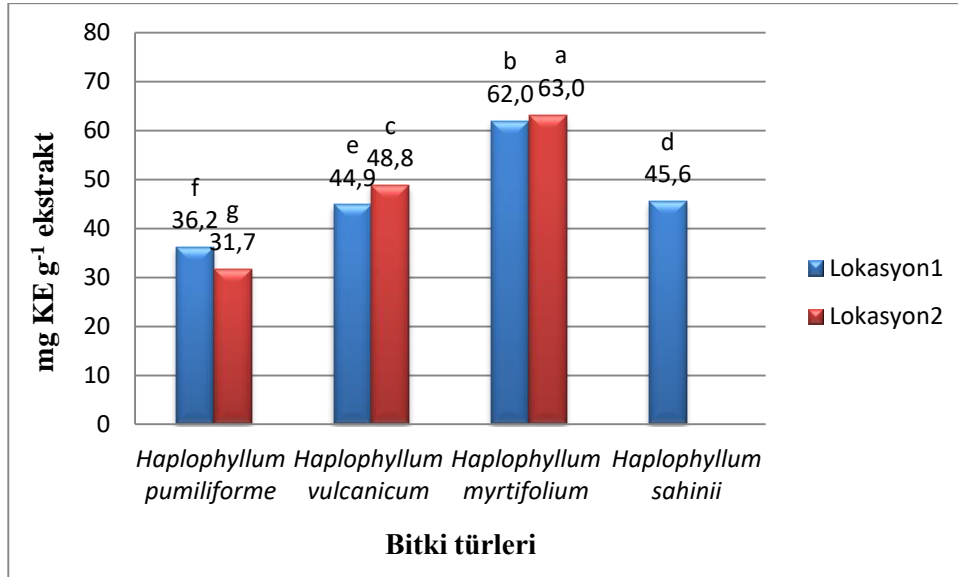
Haplophyllum türlerinin toplam fenolik ve toplam flavonoid içerikleri sırasıyla Şekil 2 ve Şekil 3'de sunulmuştur. Ekstraktlar tür ve lokasyon farkına bağlı olarak toplam biyoaktif miktarlarında varyasyon göstermiştir.



Şekil 2. Farklı lokasyondaki *H. myrtifolium*, *H. vulcanicum*, *H. pumiliforme* ve *H. sahinii* türlerin toplam fenolik içerikleri (Duncan çoklu karşılaştırma testi, $p < 0.05$).

Örneklerin toplam fenolik içerikleri 49.8 ila 31.8 mg GAE g⁻¹ ekstrakt arasında değiştiği kaydedilmiştir. *H. vulcanicum* ve *H. sahinii* türlerinin lokasyon1 örnekleri en yüksek toplam fenolik bileşik değerleri sergilemiştir (sırasıyla 49.8 ve 48.5 mg GAE g⁻¹ ekstrakt). Bu değerler *H. myrtifolium* (46.8 ve 33.2 mg GAE g⁻¹ ekstrakt) ve *H. pumiliforme* (42.0 ve 31 mg GAE g⁻¹ ekstrakt) türlerinin her iki lokasyondaki örneklerinde saptanan değerlerden anlamlı derecede daha yüksek olduğu belirlenmiştir. Her bir lokasyon ayrı ayrı dikkate alındığında, en yüksekten en aza doğru tür sıralamasının *H. vulcanicum*, *H. sahinii*, *H. myrtifolium* ve *H. pumiliforme* olarak gözlenmiştir. Yüksek rakımlardaki bitki örneklerinin toplam fenolik içeriklerinin daha düşük olduğu rapor edilmiştir.

Şekil 3. incelendiğinde, toplam flavonoid miktarların 63.0 ila 31.7 mg KE g⁻¹ ekstrakt arasında değiştiği gözlenmiştir. En yüksek toplam flavonoid miktarı *H. myrtifolium* türünün her iki lokasyonundaki örneklerinde (62.0 ve 63.0 mg KE g⁻¹ ekstrakt), en düşük ise *H. pumiliforme* türünün her iki lokasyonundaki örneklerinde (36.2 ve 31.7 mg KE g⁻¹ ekstrakt) tespit edilmiştir. Toplam flavonoid içerik yönünden türler arasında sıralı azalma (sırasıyla *H. myrtifolium*, *H. vulcanicum*, *H. pumiliforme*) olduğu, lokasyon farkının bu sıralamayı etkilemediği gözlenmiştir. Fakat türlerin farklı lokasyonlarındaki örneklerde toplam flavonoid miktarının varyasyon gösterdiği saptanmıştır.

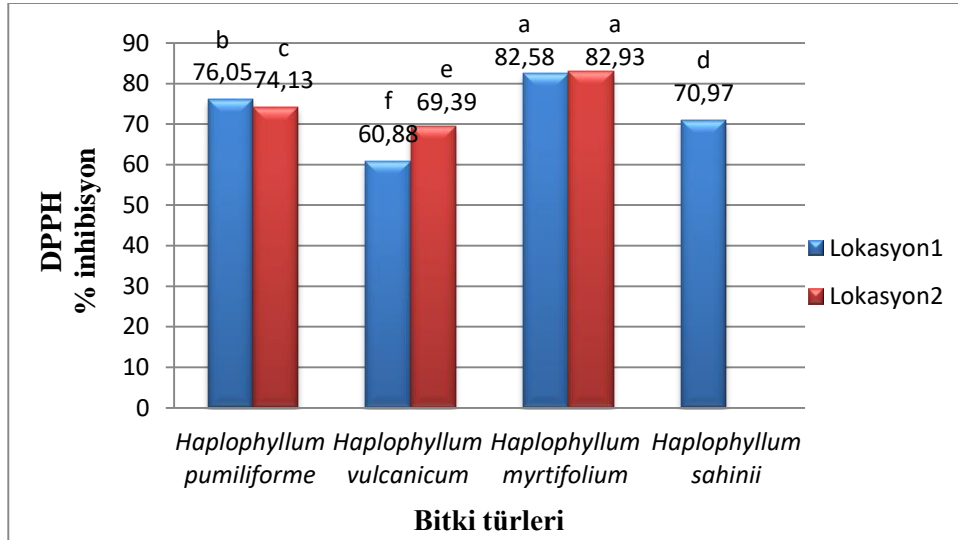


Şekil 3. Farklı lokasyondaki *H. myrtifolium*, *H. vulcanicum*, *H. pumiliforme* ve *H. sahinii* türlerin toplam flavonoid içerikleri (Duncan çoklu karşılaştırma testi, $p < 0.05$).

Toplam fenolik ve toplam flavonoid bileşiklerin bireysel içerikleri için tür ve lokasyonlar arasındaki farklar istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur (Duncan çoklu karşılaştırma testi, $p < 0.05$). *H. myrtifolium* her iki lokasyonundan ekstre edilen toplam flavonoid miktarı diğer tür ve lokasyonlarından önemli ölçüde daha yüksek kaydedilmiştir.

Bu çalışmadaki türlerin çoğu ilk kez analiz edilmiş olup, toplam biyoaktif miktarları hakkında ilk veriler rapor edilmiştir. Bu yüzden önceki çalışmalarda yer alan *Haplophyllum* cinsinin farklı türleri ile kıyaslanmıştır. Hamdi ve ark. (2018) *H. tuberculatum* yaprak kısmının etanol ekstraktları diğer çözücülerden daha yüksek toplam fenolik ve flavonoid miktarlarına sahip olduğunu bildirmiştir (sırasıyla 262 mg GAE g⁻¹ ekstrakt ve 99.1 mg KE g⁻¹ ekstrakt). Eissa ve ark. (2014) *H. tuberculatum* toprak üstü kısmının etanol ekstraktlarındaki polifenol miktarının 46.2 mg GAE g⁻¹ olduğu ve sonuçlarımıza göre bu çalışmadaki türler ile benzer aralıklarda bulunduğu gözlenmiştir. Gholivand ve ark. (2012) *H. robustum* toprak üstü kısımlarının farklı çözücülerdeki toplam fenolik miktarının 32.1 ila

58.7 mg GAE g⁻¹ arasında değiştiğini ve etanol ekstraktlarında ise 35.1 mg GAE g⁻¹ olduğunu ifade etmiştir. Ayrıca önceki çalışmalarda lokasyonun toplam biyoaktif miktar üzerine istatistiksel olarak anlamlı etkiye sahip olduğu rapor edilmiştir (Tlili ve ark., 2015). Sonuç olarak, toplam biyoaktif madde içeriği üzerine bitki türü etkili olduğu kadar lokasyon, ekstraksiyon çözücüsü ve ekstraksiyon işlemi gibi faktörleri sıralayabiliriz.

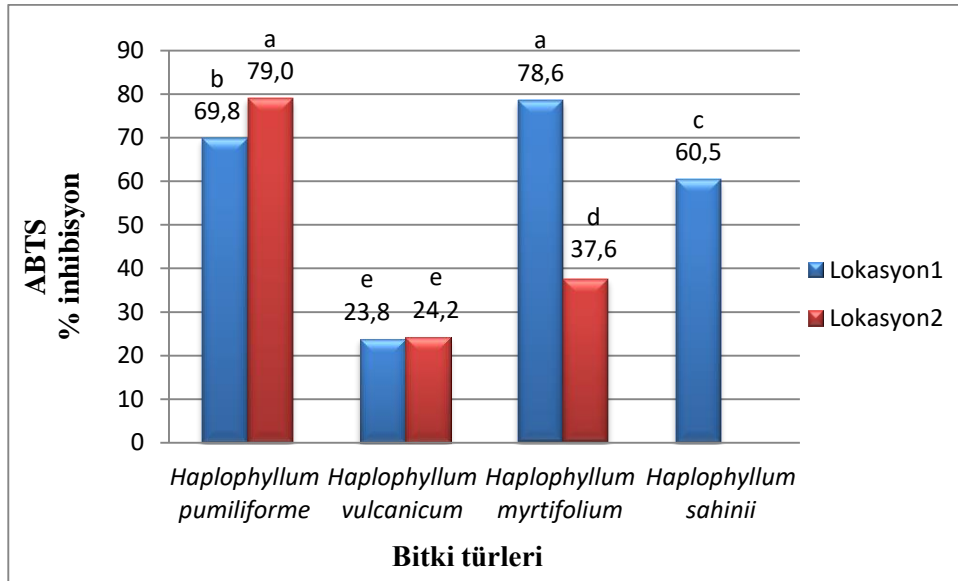


Şekil 4. Farklı lokasyondaki *H. myrtifolium*, *H. vulcanicum*, *H. pumiliforme* ve *H. sahinii* türlerinin DPPH radikal kovucu aktiviteleri (Duncan çoklu karşılaştırma testi, $p < 0.05$).

Haplophyllum türlerinin antioksidan aktiviteleri DPPH ve ABTS radikalleri tarafından belirlenmiştir. DPPH analizi, örneklerin nötr DPPH oluşturmak için hidrojen vererek DPPH radikalının indirgenmesine dayanan ve yaygın bir şekilde kullanılan bir yöntemdir (Noipa ve ark., 2011). Bu çalışmada da *Haplophyllum* L. türlerinin yüksek oranda DPPH radikal kovucu aktivite sergilediği tespit edilmiştir. *H. myrtifolium* her iki lokasyonundaki örnekler en yüksek (%82.58 ve %82.93), *H. vulcanicum* türlerin her iki lokasyonundaki örnekler ise en düşük (%60.88 ve %69.39) aktivite sergilemiştir. Şekil 4 incelendiği zaman, türlerin DPPH aktivitelerini en yüksekten az doğru *H. myrtifolium*, *H. pumiliforme*, *H. sahinii* ve *H. vulcanicum* olarak sıralanmaktadır. Türlerin lokasyonları arasında fark olduğu fakat bu sıralamayı değiştirmedeği gözlenmiştir.

ABTS testi, esasen polifenoller olan antioksidanlarla azaltılabilen spesifik bir ABTS • + (mavi-yeşil) renginin üretilmesiyle karakterize edilir. Şekil 5 incelendiğinde, *Haplophyllum* A. Juss. türlerinin yüksek oranda ABTS radikal kovucu aktivite sergilediği tespit edilmiştir. *H. myrtifolium* türünün lokasyon1 örnekleri ile *H. pumiliforme* türünün lokasyon2 örnekleri en yüksek antioksidan aktivite sergilemiş (sırasıyla %78.6 ve %79.0) ve istatistiksel olarak aynı grupta yer almıştır ($p < 0.05$). DPPH aktivitesi ile benzer olarak *H. vulcanicum* türünün her iki lokasyonunda en düşük ABTS aktivite kaydedilmiş ve istatistiksel olarak aynı grupta yer almıştır (%23.8 ve %24.2).

Türlerin lokasyonları arasındaki fark, ABTS aktivitesi üzerine tür etkisini kıyaslamada karmaşa oluşturduğu tespit edilmiştir. Birçok araştırmacıda, ABTS radikali ve fenolik bileşikler arasındaki reaksiyon kinetiğinin göreceli olarak karmaşık olduğunu bildirmiştir (Henriquez ve ark., 2004). Ayrıca çeşitli bitki örneklerinin antioksidan aktivitelerinde gözlemlenen farklılıklar, esas olarak toplandıkları bölgeye bağlı olarak farklılık gösteren fenolik bileşiklerin varlığına bağlanabilir (Ben Farhat ve ark., 2013; Tlili ve ark., 2014). Dahası, kullanılan testler arasındaki değişken sonuçlar muhtemelen karışımdaki antioksidan molekülleri arasındaki sinerjik etki ve etkileşimden kaynaklandığı söylenebilir (Tlili ve ark., 2013).



Şekil 5. Farklı lokasyondaki *H. myrtifolium*, *H. vulcanicum*, *H. pumiliforme* ve *H. sahinii* türlerinin ABTS radikal kovucu aktiviteleri (Duncan çoklu karşılaştırma testi, $p < 0.05$).

SONUÇ

H. myrtifolium, *H. vulcanicum*, *H. pumiliforme* ve *H. sahinii* türlerinin iki lokasyonuna ait bitki örneklerinin toplam fenolik ve toplam flavonoid miktarları incelenmiştir. Bazı türlerin ekstraktları fenolik bileşikler bakımından zengin bulunmuştur. Fakat ilaç, besin ve kozmetik gibi endüstrilerde kullanılacak antioksidanın düşük miktarda yüksek aktivite göstermesi önem arz etmektedir. Bu çalışmada türler arasında *H. pumiliforme* düşük miktarda yüksek antioksidan aktivite sergilediği tespit edilmiştir. Türkiye endemiği olan *H. pumiliforme* türünün ekonomiye kazandırılması için bilinmeyen bileşiklerinin tanımlanması, *in vivo* antioksidan potansiyellerinin doğrulanması, aktif bileşenlerinin ekstraktlardan izole edilmesi ve antioksidan etkisinin tam mekanizmasının açıklaması için ileri çalışmalara ihtiyaç duyulmaktadır.

TEŞEKKÜR

Bu proje çalışması, Selçuk Üniversitesinin Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğü (Proje no: 13201023) tarafından desteklenen proje ile toplanmış bitkiler üzerinde yapılmıştır.

KAYNAKLAR

- Al-Rehaily AJ, Alqasoumi SI, Yusufoglu HS, Al-Yahya MA, Demirci B, Tabanca N, Wedge DE, Demirci F, Bernier UR, Becnel JJ, Temel HE, Can Baser KH, 2014. Chemical composition and biological activity of *Haplophyllum tuberculatum* Juss essential oil. *Journal of Essential Oil Bearing Plants*, 17(3): 452-459.
- Arvouet-Grand A, Vennat B, Pourrat A, Legret P, 1994. Standardization of a propolis extract and identification of the main constituents. *Journal de pharmacie de Belgique*, 49: 462-468.
- Ashraf MA, Iqbal M, Rasheed R, Hussain I, Riaz M, Arif MS, 2018. Chapter 8 - Environmental Stress and Secondary Metabolites in Plants: An Overview. *Plant Metabolites and Regulation Under Environmental Stress*, 153-167.
- Awaad AS, Alothman, EAA, 2018. Antiulcer and Anti-ulcerative Colitis Activities of *Haplophyllum tuberculatum* (Forsskal). *International Journal of Pharmacology*, 14(1): 31-38.
- Bajaj S, Urooj A, Prabhasankar P, 2006. Effect of incorporation of mint on texture, colour and sensory parameters of biscuits. *International Journal of Food Properties*, 9: 691-700.

- Ben Farhat M, Landoulsi A, Chaouch-Hamada R, Sotomayor JA, Jordanc MJ, 2013. Characterization and quantification of phenolic compounds and antioxidant properties of *Salvia* species growing in different habitats. *Industrial Crops and Products*, 49: 904–914.
- Deng B, Fang S, Shang X, Fu X, Yang W, 2019. Influence of genotypes and environmental factors on leaf triterpenoid content and growth of *Cyclocarya paliurus*. *Journal of Forestry Research*, 30(3): 789–798.
- Debouba M, Khemakhem B, Zouari S, Meskine A, Gouia H, 2014. Chemical and Biological Activities of *Haplophyllum tuberculatum* Organic Extracts and Essential Oil. *Journal of Essential Oil Bearing Plants*, 17(5): 787-796.
- Düzgüneş O, Kesici T, Gürbüz F, 1983. İstatistik Metotları 1. Ankara Üniversitesi Ziraat Fakültesi Yay. No: 862, Ankara.
- Eissa T, González-Burgos E, Carretero M, Gómez-Serranillos M, 2014. Biological activity of HPLC-characterized ethanol extract from the aerial parts of *Haplophyllum tuberculatum*, *Pharmaceutical Biology*, 52(2): 151–156.
- Gezer K, Duru ME, Kivrak I, Turkoglu A, Mercan N, Turkoglu H, Gülcan S, 2006. Free-radical scavenging capacity and antimicrobial activity of wild edible mushroom from Turkey. *African Journal of Biotechnology*, 5(20): 1924-1928.
- Gholivand MB, Rahimi-Nasrabadi M, Batooli H, Samimi H, 2012. Chemical composition and antioxidant activity of the essential oil and various extracts of *Haplophyllum robustum* Bge, *Natural Product Research*, 26(10): 883-891.
- Hamdia A, Vianea J, Mahjoub MA, Majouli K, Gad MHH, Kharbach M, Demeyer K, Marzouk Z, Heyden YV, 2018. Polyphenolic contents, antioxidant activities and UPLC–ESI–MS analysis of *Haplophyllum tuberculatum* A. Juss leaves extracts. *International Journal of Biological Macromolecules*, 106: 1071–1079.
- Henriquez C, Aliaga C, Lissi E, 2004. Kinetics profiles in the reaction of ABTS derived radicals with simple phenols and polyphenols. *Journal of the Chilean Chemical Society*, 49: 65–67.
- Karahisar E, Tugay O, Erdoğan Orhan İ, Şenol Deniz FS, Luca SV, Skalicka-Wozniak K, Sahin M, 2019. Metabolite Profiling by Hyphenated Liquid Chromatographic Mass Spectrometric Technique (HPLC-DAD-ESI-Q-TOF-MS/MS) and Neurobiological Potential of *Haplophyllum sahinii* and *H. vulcanicum* Extracts. *Chemistry & Biodiversity*, 16(9): 1-14.
- Kuete V, Wiench B, Alsaid MS, Alyahya MA, Fankam AG, Shahat AA, Efferth T, 2013. Cytotoxicity, mode of action and antibacterial activities of selected Saudi Arabian medicinal plants. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, 13(1): 354..
- Mohamed AH, Ali MB, Bashir Ak and Salih AM, 2008. Influence of *Haplophyllum tuberculatum* on the cardiovascular system. *Pharmaceutical Biology*, 34(3): 213-217.
- Napoli E, Siracusa L, Ruberto G, Lazzara ACS, Speciale A, Cimino F, Saija A, Cristani M, 2018. Phytochemical profiles, phototoxic and antioxidant properties of eleven *Hypericum* species – A comparative study. *Phytochemistry*, 152: 162-173.
- Narayanasamy B, Jeyakumar N, Manoharan DK, 2018. Effect of natural antioxidants on the oxidation stability of methyl ester of rubber seed oil. *Journal Energy Sources, Part A: Recovery, Utilization, and Environmental Effects*, 40(6): 680-687.
- Noipa T, Srijaranai S, Tuntulani T, Ngeontae W, 2011. New approach for evaluation of the antioxidant capacity based on scavenging DPPH free radical in micellesystems. *Food Research International*, 44: 798–806.
- Orhan IE, Küpeli Akkol E, Suntar I, Yesilada E, 2019. Assessment of anticholinesterase and antioxidant properties of the extracts and (+)-catechin obtained from *Arceuthobium oxycedri* (D.C.) M. Bieb (dwarf mistletoe). *South African Journal of Botany*, 120: 309-312.
- Pasqualone A, Bianco AM, Paradiso VM, Summo C, Gambacorta G, Caponio F, Blanco A, 2015. Production and characterization of functional biscuits obtained from purple wheat. *Food Chemistry*, 180: 64-70.
- Raissi A, Arbabi M, Roustakhiz J, Hosseini M, 2016. *Haplophyllum tuberculatum*: An overview. *J. HerbMed Pharmacol*, 5(4): 125-130.

- Re R, Pellegrini N, Proteggente A, Pannala A, Yang M, Rice-Evans C, 1999. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radical Biology & Medicine*, 26:1231–1237.
- Sabry OMM, El Sayed AM, Sleem A, 2016b. Potential anti-microbial, anti-inflammatory and anti-oxidant activities of *Haplophyllum tuberculatum* growing in Libya. *Journal of Pharmacognosy and Natural Products*, 2:1.
- Sabry OMM, El Sayed AM, Alshalmani SK, 2016a. GC/MS analysis and potential cytotoxic activity of *Haplophyllum tuberculatum* essential oils against lung and liver cancer cells. *Pharmacognosy Journal*, 8(1): 66-69.
- Shah MA, Don Bosco SJ, Mir SA, 2014. Plant extracts as natural antioxidants in meat and meat products. *Meat Science*, 98: 21-33.
- Singleton VL, Orthofer R, Lamuela-Raventós RM, 1999. Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of folin-ciocalteu reagent. *Methods in Enzymology*. Academic Press, p. 152–178.
- Skrzypczak A, Przystupa N, Zgadzaj A, Parzonko A, Sykłowska-Baranek K, Paradowska K, Nałęcz-Jaweck G, 2015. Antigenotoxic, anti-photogenotoxic and antioxidant activities of natural naphthoquinone shikonin and acetylshikonin and *Arnebia euchroma* callus extracts evaluated by the umu-test and EPR method. *Toxicology in Vitro*, 30(1): 364-372.
- Snedecor GW, Cochran WG, 1967. *Statistical Methods*. The Iowa State University.
- Tlili N, Elfalleh W, Hannachi H, Yahia Y, Khaldi A, Ferchichi A, Nasri N, 2013. Screening of natural antioxidants from selected medicinal plants. *International Journal of Food Properties*, 16: 1117–1126.
- Tlili N, Mejri H, Anouer F, Saadaouie E, Khaldie A, Nasri N, 2015. Phenolic profile and antioxidant activity of *Capparis spinosa* seeds harvested from different wild habitats. *Industrial Crops and Products*, 76: 930–935.
- Tlili N, Mejri H, Yahia Y, Saadaoui E, Rejeb S, Khaldi A, Nasri N, 2014. Phyto-chemicals and antioxidant activities of *Rhus tripartitum* (Ucria) fruits depending on locality and different stages of maturity. *Food Chemistry*, 160: 98–103.
- Townsend CC, 1986. Taxonomic revision of the genus *Haplophyllum* (Rutaceae). In: *Hooker's icones plantarum* vol 40 parts 1, Bentham-Moxon Trustees Royal Botanical Gardens, Kew.
- Tugay O, Ulukuş D, 2017. *Haplophyllum sahinii* (Rutaceae), a new species from Central Anatolia (Turkey). *Phytotaxa*, 297: 265–272.
- Ulubelen A, Öztürk M, 2008. Alkaloids, coumarins and lignans from *Haplophyllum* species. *Records of Natural Products*, 2(3): 54-69.
- Ulukuş D, Tugay O, 2018. *Haplophyllum ermenekense* (Rutaceae), a new species from Turkey. *Phytokeys*, 8(111): 119–131.