

Medicago rigidula (L.) ALL.'nın Antioksidan ve Enzim İnhibisyon Aktiviteleri ve Fenolik Bileşiminin İncelenmesi

Yavuz Selim Çakmak, Gökhan Zengin, Bülent Eskin, Kevser Yıldırım, Müge Topal, Gözde Hatun Aydın, Emre Ünlü, Merve Baydemir, Kübra Erten

ÖZ

Çalışma *Medicago rigidula* (L.) All. metanol ekstresinin antioksidan kapasitesi, fenolik bileşimi ve enzim inhibisyon aktivitesinin değerlendirilmesi üzerine odaklanmıştır. Antioksidan aktivite 2,2-difenill-1-pikrilhidrazil (DPPH), demir indirgeme antioksidan gücü (FRAP), bakır iyonu indirgeme gücü (CUPRAC) ve total antioksidan kapasite (fosfomolibdat) testini içeren farklı yöntemler kullanılarak değerlendirilmiştir. Aynı zamanda total fenolik ve flavonoid içerikler de belirlenmiştir. Enzim inhibisyon aktiviteleri antikolinesteraz, tirozinaz, alfa-amilaz ve alfa-glukozidaza karşı incelenmiştir. *M. rigidula* bitkisinin fenolik bileşenlerinin

kateşin, sinnamik asit, klorojenik asit, gallik asit ve sirinjik asit bileşikleri olduğu saptanmıştır. Metanol ekstresinin serbest radikal giderici aktivitesi 1 mg/mL konsantrasyonda %20.30'dur. Fosfomolibdat ve FRAP testlerinde sırası ile 167.27 mg AAE/g ve 67.01 mg TE/g bulundu. Total fenolik ve flavonoid içerik sırasıyla 79.61 mg GAE/g ve 27.38 µg QE/g olarak belirlenmiştir. Sonuçlar *M. rigidula*'nın iyi bir antioksidan ve enzim inhibisyon kapasitesine sahip olduğunu gösterdi. Bu nedenle *Medicago rigidula* bitkisinin gıda ve ilaç endüstrisinde hammadde olarak kullanılabilmesi düşünülmektedir.

Anahtar kelimeler: Kimyasal kompozisyon, biyoaktivite, HPLC analizi, Fabaceae.

Yavuz Selim Çakmak, Bülent Eskin, Kevser Yıldırım, Müge Topal, Gözde Hatun Aydın, Emre Ünlü, Merve Baydemir, Kübra Erten
Aksaray Üniversitesi, Fen Edebiyat Fakültesi, Biyoteknoloji ve Moleküler Biyoloji Bölümü, Aksaray, Türkiye

Gökhan Zengin
Selçuk Üniversitesi, Fen Fakültesi, Biyoloji Bölümü, Konya, Türkiye

Sorumlu Yazar:
Yavuz Selim Çakmak
e-posta: yavuzselimcakmak@gmail.com

Submitted / Gönderilme: 24.01.2017 **Revised / Düzeltme:** 13.02.2017
Accepted / Kabul: 16.02.2017

GİRİŞ

Medicago L. cinsi (Leguminosae) familyasına ait olup dünyada yaygın olarak kültürü yapılan bir yem bitkisi olarak bilinmektedir. Bu cins dünyada 87 tür, Türkiye'de ise yaklaşık 40 tür ile temsil edilmektedir. Genellikle Akdeniz ülkelerinde yaygın olarak yetişen, ayrıca sert kış koşullarına tolerans gösterebilen çok yıllık otsu ve çalimsı bitkilerdir (1, 2).

Medicago L. türleri protein içeriği ve bazı diğer faydalı bileşenleri yüksek oranda içermesi nedeniyle hayvanlarda yem olarak oldukça değerlidir (3). Ayrıca yüksek protein içeriğinden dolayı yaprakları bazı ülkelerde beslenme salatalarda, çorba ve sandviçlerde tercih edilmektedir (4, 5). Bazı türleri bitki çayı olarak da kullanılmaktadır. Yaprakları ve gövdeleri protein, vitamin ve mineral bakımından zengindir (6). Aynı zamanda sağlık açısından faydalı ve pek çok hastalığa karşı koruyucu etkileri olan fitokimyasalları da içermektedir. İzoflavonlar, lignanlar ve kümestan (östrojenik aktivite gösteren bitkisel fenolik grubu) fitoöstrojenlerin üç ana sınıfını oluşturur (7). *Medicago* türlerinde en bol bulunan fitoöstrojen izoflavondur ve bu madde antifungal ve antimikrobiyal özellikleri nedeniyle tıbbi amaçlarla

kullanılmaktadır (8). Laktasyon süresince sütü artırıcı ve kolesterol seviyesini düşürücü etkileri yanısıra menopozal semptomlar (7), bazı kanserler (9), koroner hastalıklar (10), osteoporoz (11), anemi, diyabet ve ülser gibi pek çok hastalığın etkilerini azaltıcı ve önleyici rol oynamaktadır (12, 13). Farmakolojik çalışmalar yaygın tür olan *Medicago sativa* bitkisinin antioksidan (14), anti bakteriyel (15), antikanser (16), antihiperlipidemik (17) ve anksiyolitik (18) aktiviteler gibi önemli biyolojik aktivitelere sahip olduğunu göstermiştir.

Serbest radikaller aerobik solunum sırasında oksijenden üretilmektedir ve aşırı miktarda oluşum ve birikimi ise oksidatif strese neden olmaktadır (19). Oksidatif stresin canlılarda birikimi özellikle proteinler, DNA ve lipitler gibi biyomoleküllere zarar vermekte ve buna bağlı olarak hipertansiyon, iskele, nörodejeneratif hastalıklar ve romatoid artrit gibi pek çok hastalığa neden olabilmektedir (20, 21). Antioksidanlar ise oksidatif stresin zararlarının önlenmesine ya da bu zararların azaltılmasına yardım eder (22).

Enzim inhibisyon teorisi Alzheimer ve diyabet gibi küresel sağlık problemleri için tedavi stratejileri içerisinde çok popülerdir. Enzim inhibitörleri küçük moleküler kimyasal bileşenlerdir ve enzimin katalitik aktivitesini inhibe ederek düşürebilirler (23). Günümüzde enzim inhibisyonu önemli bir farmakolojik araştırma alanıdır. Doğal ürünler enzimlerle reaksiyona girerek enzimlerin aktivitesini kontrol edilebilmektedir. Enzim inhibitörlerinin en önemli rollerinden birisi birçok fizyolojik şartlarda ilaç olarak kullanılmalarıdır (24).

Medicago cinsi üzerine yapılan çalışmaların büyük bir kısmı günümüzde yaygın bir şekilde kültüre edilen yem bitkisi olan yonca (*Medicago sativa* L.) üzerindedir. Mevcut çalışmada araştırılan tür olan *Medicago rigidula* (L.) All. ile ilgili oldukça sınırlı çalışma bulunmaktadır. Bu nedenle mevcut çalışmada ülkemizde yaygın bir şekilde doğal olarak yetişen *M. rigidula*'nın antioksidan, enzim inhibisyon aktiviteleri ve bu aktivitelerden sorumlu olabilecek fenolik maddeler araştırılmıştır. Bu şekilde bitkinin faydalı etkileri belirlenerek ilaç ve gıda endüstrileri açısından değerlendirilmesi amaçlanmıştır.

GEREÇ ve YÖNTEM

Kimyasallar

Antioksidan ve enzim inhibisyon aktivitelerini belirlenmesi için uygulanan testlerde kullanılan tüm kimyasallar Sigma-Aldrich'den elde edilmiş ve analitik saflıktadır.

Bitkisel Örneklerin Toplanması ve Ekstrelerin Hazırlanması

Çalışmada kullanılan bitki örnekleri Aksaray ili, Karaören köyü civarından çiçeklenme döneminde 02.07.2015 tarihinde toplanmış, örnekler Aksaray Üniversitesi, Fen Edebiyat Fakültesi, Biyoloji Bölümü herbaryumunda (AKSU) BE-2225 toplayıcı numarası ile saklanmaktadır. Bitkilerin teşhisleri Yrd. Doç. Dr. Bülent Eskin ve Mustafa Keskin tarafından yapılmıştır.

Bitkinin toprak üstü kısımlarından oluşan örnekler gölgede kurutulduktan sonra tamamen toz haline getirilmiştir. 15 g toz edilen bitki Soxhlet cihazı kullanılarak yaklaşık 6 saat süresince metanol ekstraksiyonuna tabi tutulmuştur. Ekstreler süzülerek rotary evaporatörde yaklaşık 40°C'de vakum altında çözücüsü tamamen uçuncaya kadar buharlaştırılmıştır. Elde edilen ekstre analizler yapıncaya kadar -20°C'de saklanmıştır.

Antioksidan Aktivite Testleri

Total Fenolik ve Flavonoit İçerik

Total fenolik içerik küçük değişiklikler ile Folin-Ciocalteu yöntemine göre belirlenmiştir (25, 26). 0.2 mL stok çözeltisi (2 mg/mL) üzerine 1.5 mL distile su ve 0.5 mL %7'lik Na_2CO_3 çözeltisi eklenerek 3 dakika bekletilmiştir. Daha sonra 1 mL Folin-Ciocalteu eklenmiştir. Standart olarak gallik asidin farklı konsantrasyonlarından (100, 50, 25, 12.5 $\mu\text{g/mL}$) alınarak aynı işlemler tekrarlanmıştır. Kör olarak örnek yerine 0.2 mL metanol kullanılmıştır. Daha sonra oda sıcaklığında 2 saat karanlık bir ortamda inkübe edilen örneklerin 760 nm'de spektrofotometrede absorbansları okunmuştur. Analizler 3'er kez tekrarlanmıştır. Standartın absorbans konsantrasyon grafiği kullanılarak örneklerin fenolik içerikleri gallik asit eşdeğeri olarak belirlenmiştir.

Total flavonoit içerik Arvout-Grand ve ark. (27)'na göre spektrofotometrik olarak belirlenmiştir. Metotta, 1 mL ekstre (2 mg/mL) 1 mL %2'lik AlCl_3 ile karıştırıldı. Her örnek için hazırlanan kör örneğinde 1 mL ekstre ve 1 mL metanol eklenmiştir. Standart olarak kersetin'in farklı konsantrasyonlarda hazırlanan çözeltileri kullanılmıştır. Örnekler 10 dakika oda sıcaklığında bekletildikten sonra 415 nm'de köre karşı absorbansları okunmuştur. Standartın absorbans konsantrasyon grafiğinde elde edilen denklem kullanılarak örneklerin flavonoit içerikleri kersetin eşdeğeri olarak belirlenmiştir.

DPPH Radikali Giderici Aktivite

Ekstrelerin DPPH radikali giderici aktivitesi Kirby ve Schmidt (28)'e göre uygulanmıştır. Metot için öncelikle DPPH'nin 6×10^{-5} M'lık çözeltisi hazırlanmıştır. Kontrol tüpüne 1 mL metanol ve 1 mL DPPH çözeltisi, kör tüpüne ise metanol konulmuştur. Örnekler için ise farklı konsantrasyonlarda hazırlanan 1 mL ekstre üzerine 1 mL DPPH eklenmiş ve 30 dakika oda sıcaklığında karanlık bir ortamda inkübasyona bırakılmıştır. Bu süre sonunda 517 nm'de örnekler, kontrol ve standartların absorbans değerleri ölçülmüştür. Absorbans değerleri kullanılarak ekstrelerin DPPH radikali inhibe oranları (%İnhibisyon) aşağıdaki formüle göre hesaplanmıştır:

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

(A_0 : Kontrolün absorbansı, A_1 : Ekstrenin absorbansı)

Ayrıca her bir ekstre için radikalın %50'sinin inhibe edildiği konsantrasyon olan IC_{50} değerleri hesaplanmıştır.

Total Antioksidan Kapasite

Total antioksidan kapasite fosfomolibdat yöntemi kullanılarak Prieto ve ark., (29)'na göre uygulanmıştır. Karışım çözeltisi 4 mM amonyum molibdat, 6 M sülfürik asit ve 28 mM sodyum fosfat çözeltileri karıştırılarak elde edilmiştir. Daha sonra bu karışımdan 3 mL alınarak üzerine 0.1 mL ekstre (2 mg/mL) ve farklı konsantrasyonlardaki (0.0625-1 mg/mL) askorbik asit çözeltileri eklenmiştir. Kör için 0.3 mL metanol eklenmiştir. Daha sonra tüpler 95°C'de 90 dakika inkübe edildikten sonra 695 nm'de absorbansları okunmuştur. Sonuçlar askorbik asit eşdeğeri olarak verilmiştir (mg AAE/g).

Demir İndirgeme Antioksidan Gücü (FRAP)

Metot ekstrelerin demir iyonlarını indirgeme gücünün belirlenmesi prensibine bağlı olarak gerçekleştirilmiştir (28). Öncelikle 31.2 mg 2,4,6-tripiridil-s-triazine (TPTz), 50 µL hidroklorik asit ve 10 mL distile su karışımında çözülmüştür. Daha sonra 32 mg $FeCl_3$ 10 mL distile suda çözülmüştür. Son olarak 4.1 mL asetik aside (%80) 250 mL distile su ilave edilmiş ve 0.66 g sodyum asetat bu çözelti içinde tamamen çözündürülmüştür. Tampon, TPTz ve $FeCl_3$ 10/1/1 oranlarında karıştırılarak bu karışımın 2 mL'si ile 0.1 mL ekstre (2mg/mL) karıştırılarak 30°C'de 30 dakika inkübe edilmiştir. Standart olarak ekstre yerine troloks çözeltisinin farklı konsantrasyonları (25, 50, 75, 100, 150 ve 200 µg/mL) kullanılmıştır. İnkübasyon sonunda örneklerin absorbansı

593 nm'de okunmuştur. Sonuçlar troloks eşdeğeri olarak verilmiştir.

Bakır İyonları İndirgeme Aktivitesi (CUPRAC)

Bu yöntem, Apak ve ark. (30)'na göre gerçekleştirilmiştir. Amonyum asetat (1 M), $CuCl_2$ (10 mM) ve neokuproin (7.5 mM) çözeltilerinin her birinden 1'er mL alınmıştır. 0.5'er mL farklı konsantrasyonlardaki bitki ekstrelerinden ve standartlardan (BHA ve BHT) ilave edilerek her bir tüpe 1'er mL distile su eklenmiştir. Oda sıcaklığında, karanlık bir ortamda 30 dakika bekletildikten sonra 450 nm'de köre karşı okunmuştur.

Enzim İnhibisyon Testleri

Antikolinesteraz Aktivite

Kolinesteraz (ChE) inhibitör aktivitesi Ellman yöntemi kullanılarak ölçülmüştür (28). Örnek çözeltisi (50 µL) DTNB (125 µL) ve antikolinesteraz (veya bütirilkolinesteraz) çözeltisi (25 µL) Tris-HCl tamponu (pH 8.0) içerisinde karıştırılmıştır. Daha sonra 96 kuyucuklu mikrolaka içerisinde 15 dakika 25°C'de inkübe edilmiştir. Reaksiyon asetiltiyokolin iyodür veya butiriltiyokolin klorür eklenmesiyle başlatılmıştır. Benzer şekilde, enzim içermeyen bir tüp kör olarak hazırlanmıştır. Örnek ve kör absorbansları 405 nm'de 25°C'de 10 dakika inkübasyondan sonra okunmuştur. Kolinesteraz inhibitör aktivitesi galantamine eşdeğer olarak verilmiştir.

α-Amilaz İnhibisyonu

α-Amilaz inhibitör aktivitesi Caraway-Somogyi iyodür/potasyum iyodür (IKI) yöntemi kullanılarak uygulanmıştır (31). Örnek çözeltileri (25 µL) α-amilaz çözeltisi ile (50 µL) fosfat tamponunda (pH 6.9, 6 mM sodyum klorür) 96 kuyucuklu mikrolaka içinde karıştırılmıştır. Karışım 10 dakika 37°C'de inkübe edilmiştir. Ön inkübasyondan sonra reaksiyon nişasta çözeltisi (50 µL, %0.05) eklendiğinde başlatılmıştır. Benzer şekilde enzim içermeyen kör çözeltisi hazırlanmıştır. Reaksiyon karışımı 10 dakika 37°C'de inkübe edilmiş ve reaksiyon HCl (25 µL, 1 M) eklendiğinde durdurulmuştur. Bunu takiben iyodin-potasyum iyodid çözeltisi (100 µL) eklenmiştir. Örnek ve kör absorbansları 630 nm'de okunmuştur. α-Amilaz inhibitör aktivitesi sonuçları akarboz eşdeğeri olarak verilmiştir.

α -Glukozidaz İnhibisyonu

α -Glukozidaz inhibitör aktivitesi Palanisamy ve ark., (32)'nin yöntemine göre uygulanmıştır. Örnek çözeltisi (50 μ L), glutatyon (50 μ L), α -glukozidaz çözeltisi (50 μ L) fosfat tamponu (pH 6.8) ve PNPG (4-Nitrofenil β -D-glukuronid) (50 μ L) çözeltisi 96 kuyucuklu mikropilaka içinde karıştırılmış ve 15 dakika 37°C'de inkübe edilmiştir. Benzer şekilde enzim içermeyen bir kör hazırlanmıştır. Reaksiyon sodyum karbonat (50 μ L, 0.2 M) eklendiğinde durdurulmuştur. Örnek ve kör absorbansları 400 nm'de okunmuştur. α -Glukozidaz inhibitör aktivitesi akarboz eşdeğeri olarak verilmiştir.

Tirozinaz İnhibisyonu

Tirozinaz inhibitör aktivitesi substrat olarak L-DOPA kullanılarak dopachrome yöntemi ile gerçekleştirilmiştir (33). Örnek çözeltisi (25 μ L), tirozinaz çözeltisi (40 μ L) ve fosfat tamponu (100 μ L, pH 6.8) ile 96 kuyucuklu mikropilaka içerisinde karıştırılmış ve 15 dakika 25°C'de inkübe edilmiştir. Reaksiyon L-DOPA (40 μ L) eklenmesi ile başlatılmıştır. Benzer şekilde enzim içermeyen kör çözeltisi hazırlanmıştır. Örnek ve kör absorbansları 10 dakika 25 °C'de inkübe edildikten sonra 492 nm'de okunmuştur. Tirozinaz inhibitör aktivitesi sonuçları kojik asite eşdeğer olarak verilmiştir.

İstatistik Değerlendirme

Antioksidan ve enzim inhibisyon aktivite analizleri 3'er tekrarlı olarak yapılmış ve sonuçlar 3 paralel analiz ortalaması ve standart sapma değerleri hesaplanarak verilmiştir.

Fenolik Bileşenlerin Belirlenmesi

M. rigidula'nın fenolik bileşenleri Agilent marka 1290 Infinity model HPLC cihazı, C18 kolonu ve DAD dedektörü

kullanılarak Caponio ve ark. (34)'na göre belirlenmiştir. Hareketli faz olarak %2'lik asetik asit (A) ve metanol (B) kullanılmıştır. Akış hızı 1 ml/dk'dır. Hareketli faz için; 3 dk %95 A/%5 B, 15 dk %80 A/%20 B, 2 dk izokratik, 10 dk %60 A/%40 B, 10 dk %50 A/%50 B ve analiz sonlanıncaya kadar geçen süre (10 dk) %100 B olacak şekilde gradient uygulanmıştır. Ekstre 20 mg/mL konsantrasyonu sağlayacak şekilde metanol ile hazırlanan çözeltiden 10 μ L enjeksiyon yapılmıştır.

BULGULAR ve TARTIŞMA

Antioksidan Aktivite

Çalışmada *Medicago rigidula*'dan elde edilen metanol ekstresinin antioksidan aktiviteleri araştırılmıştır. Metanol ekstresinin verimi %11.78 olarak bulunmuştur. Antioksidan kapasite total antioksidan kapasite (fosfomolibdat testi), demir iyonları indirgeme antioksidan gücü (FRAP), bakır iyonları indirgeme gücü ve serbest radikal giderme aktivitesi (DPPH) testleri uygulanmıştır. Bunlara ek olarak total fenolik ve flavonoid içerikler de belirlenmiştir.

M. rigidula'nın total fenolik ve flavonoid içerikleri sırasıyla 79.61 mg GAE/g ekstre ve 27.38 μ g QE/g ekstre olarak bulunmuştur (Tablo 1). Kicel ve Olszewska (35), *M. lupulina*'dan elde edilen farklı fraksiyonların total fenolik içeriklerinin 6.6-162.4 mg GAE oranları arasında değiştiğini göstermişlerdir. Diğer bir çalışmada bazı *Medicago* türlerinin (*M. minima*, *M. tornata*, *M. truncatula*, *M. rigidula*, *M. scutellata*, *M. segitalis* ve *M. sativa*) total fenolik içerikleri 21.96-36.41 mg GAE arasında bulunmuştur (36). Araştırmacılar aynı zamanda bu türlerin total flavonoid içeriklerini de incelemiş ve 5.54-11.67 mg kateşin eşdeğeri olarak gözlemlemişlerdir.

FRAP testinde *M. rigidula* ekstresi 67.01 mg troloks eşdeğeri antioksidan aktiviteye sahip olduğu bulunmuştur (Tablo 1). *Medicago lupulina*'dan elde edilen metanol ekstresine

Tablo 1. *M. rigidula* (L.) All. metanol ekstresinin verim, total fenolik içerik, total flavonoid içerik, total antioksidan kapasite ve demir iyonu indirgeme antioksidan gücü*

	Verim (%)	TPC (mg GAE/g)	TFC (μ g QE/g)	TAC (mg AAE/g)	FRAP (mg TE/g)
<i>Medicago rigidula</i>	11.78	79.61±0.32	27.38±3.42	167.27±3.21	67.01±5.89

* Üç paralel analiz ortalaması \pm Standart sapma.

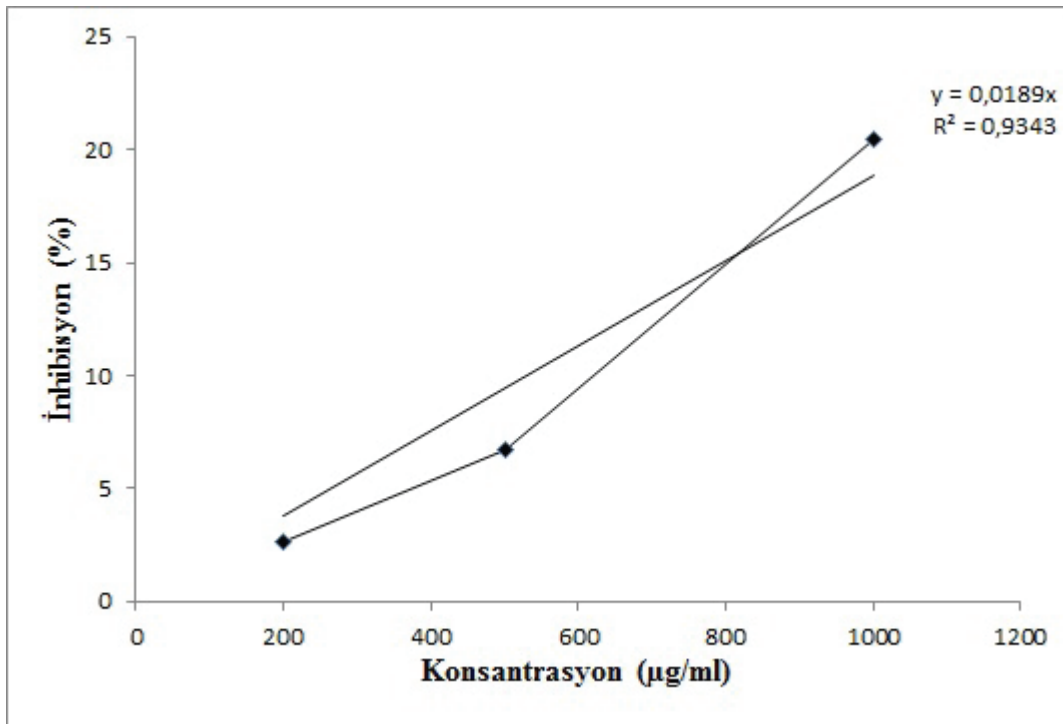
TPC: Total Fenolik İçerik; TFC: Total Flavonoid İçerik; TAC: Total Antioksidan Kapasite; FRAP: Demir İyonu İndirgeme Antioksidan Gücü GAE: Gallik asit eşdeğeri; QE: Kersetin eşdeğeri; AAE: Askorbik asit eşdeğeri; TE: Troloks eşdeğeri.

FRAP testi uygulandığında, ekstrenin 0.2 mmol Fe²⁺ /g kuru ekstre aktiviteye, standart olarak kullanılan trolöks ve kersetinin 9.2 ve 36.7 0.2 mmol Fe²⁺ /g kuru ekstre aktiviteye sahip olduğu görülmüştür (35). Farklı *Medicago* türlerinin araştırıldığı diğer bir çalışmada, *M. segitalis*'in 120.84 µmol TE/g değeriyle en yüksek, *M. minima*'nın ise 58.05 µmol/g değeriyle en düşük aktiviteye sahip örnek olduğu gösterilmiştir (36). Serbest radikal giderme aktivitesinin araştırıldığı DPPH yönteminde 1 mg/mL konsantrasyondaki örnek çözeltisi %20.30 inhibisyon göstermiştir (Şekil 1). Bu testte konsantrasyon-inhibisyon grafiği kullanılarak serbest radikalın %50'sini gideren konsantrasyon anlamına gelen IC₅₀ değeri de hesaplanmıştır. Buna göre *M. rigidula* metanol ekstresi 25.73 µg/mL IC₅₀ değerine sahip olduğu tespit edilmiştir. Rodrigues ve ark., (36) çalışmalarında *M. rigidula* 127.18 µmol TE/g değeriyle en düşük aktivite gösteren örnek olmuştur. *M. sativa* bitkisinin metanol ekstresinin DPPH giderici aktivitesinin araştırıldığı çalışmada IC₅₀ değeri hesaplanarak 100.381 µg/mL düzeyinde olduğu görülmüştür (37). Bora ve Sharma (38) *M. sativa* bitkisinin iskemi ve reperfüzyon hasarı gibi durumlara karşı koruyucu etkisi ve antioksidan aktivitesinin araştırıldığı çalışmalarında metanol ekstresinin BHA'dan daha düşük iken BHT'den daha yüksek aktivite gösterdiğini bildirmişlerdir. Araştırmacılar 75 µg/mL konsantrasyondaki BHA, bitki ekstresi ve BHT'nin

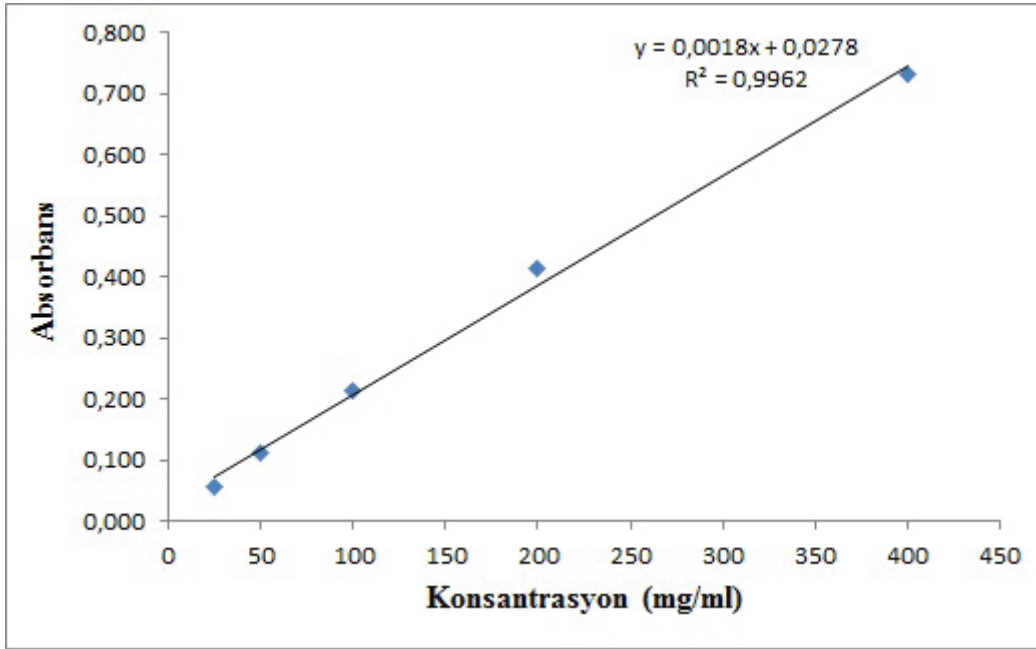
sırası ile %77, %70 ve %67 inhibisyona sahip olduğunu belirlemişlerdir. Al-Dosari (39) *M. sativa* bitkisinin özellikle Orta Doğu ülkelerinde besinsel ve tıbbi amaçlarla yaygın kullanıldığını belirtmiş ve bitkiden elde edilen su ekstresinin *in vitro* ve *in vivo* antioksidan aktivitelerini araştırmıştır. Bitkinin 1 mg/mL konsantrasyondaki ekstresi DPPH radikalını %21.0 inhibe ettiği görülmektedir.

Bakır iyonları indirgeme testi olan CUPRAC'da konsantrasyonla antioksidan aktivite arasında doğru orantı olduğu görülmüştür. Buna göre *M. rigidula* 25-400 µg/mL konsantrasyon aralığında 5 farklı konsantrasyonda bakır iyonu indirgeme gücü araştırılmış ve 0.058-0.733 arasında değişen absorbans değerleri gösterdiği bulunmuştur (Şekil 2).

Total antioksidan kapasitenin araştırıldığı test olan fosfomolibdat testinde *M. rigidula* metanol ekstresi 167.27 mg AAE/g aktivite göstermiştir. *Medicago* türlerinin fosfomolibdat testi ile antioksidan kapasitesinin değerlendirmesi konusunda sınırlı sayıda çalışma bulunmaktadır. Hindistan'da *M. sativa* türünün antioksidan aktivitesinin araştırıldığı çalışmada total antioksidan kapasite testinde etanol ekstresinin (10 mg/mL konsantrasyonda) 91.0 µg/mL askorbik asit eşdeğeri aktiviteye sahip olduğu görülmüştür (37).



Şekil 1. *M. rigidula* (L.) All. metanol ekstresinin DPPH radikali giderme aktivitesi



Şekil 2. *M. rigidula* (L.) All. metanol ekstresinin bakır iyonu indirgeme gücü (CUPRAC)

Enzim İnhibisyon Aktivitesi

M. rigidula'nın metanol ekstresinin enzim inhibisyon aktivitesi kolinesteraz (asetil ve bütiril kolinesteraz) α -amilaz, α -glukozidaz ve tirozinaz enzimlerine karşı araştırılmış ve Tablo 2'de verilen sonuçlar elde edilmiştir. Kolinesteraz aktivite testlerinde antikolinesteraz ve bütiril kolin esteraz enzimleri inhibisyon aktiviteleri sırasıyla 2.05 ve 0.94 mg GALAE/g ekstre olarak bulunmuştur. α -Amilaz ve α -glukozidaz enzimlerinin inhibisyonu *Diabetes mellitus* tedavisinde giderek artan bir tedavi yöntemi olarak iş görmektedir. Çalışmamızda kullanılan *M. rigidula* metanol ekstresi α -amilaz enzimi için 0.73 mmol ACAE/g ekstre inhibisyon değeri gösterirken, α -glukozidaz için 1.30 mmol ACAE/g ekstre inhibisyon göstermiştir. Tirozinaz enzim inhibisyon aktivitesi 16.36 mg KAE/g ekstre olarak belirlenmiştir. Tirozinaz inhibitörlerinin kullanımı özellikle güneş yanıkları sonrası deri beyazlatıcı ve pigmentasyonu

önleyici etkilerinden dolayı ilaç ve kozmetik endüstrilerinde giderek artmaktadır.

Fenolik Bileşim

M. rigidula'nın fenolik bileşimi üzerine daha önce herhangi bir çalışma bulunmamaktadır. Mevcut çalışmada *M. rigidula*'nın metanol ekstresinde gallik asit, kateşin, klorojenik asit, kafeik asit, hidroksibenzoik asit, epikateşin, sirinjik asit, kumarik asit, t-ferrulik asit, sinapik asit, benzoik asit, hesperidin, rosmarinik asit, sinnamik asit ve kersetini içeren 15 fenolik bileşenin varlığı ve miktarları araştırılmış ve elde edilen bulgular Tablo 3'de verilmiştir. Bu verilere göre araştırılan ekstre bileşiminde bu bileşenlerden gallik asit, kateşin, klorojenik asit, sirinjik asit ve sinnamik asit bulunmuştur. Bunlardan kateşin (3828.32 μ g/g) en yüksek oranda bulunan bileşen olurken sirinjik asit (26.26 μ g/g) en

Tablo 2. *M. rigidula* (L.) All. metanol ekstresinin enzim inhibisyon sonuçları*

Samples	AChE inhibisyonu İnhibisyonu (mg GALAE/g ekstre)	BChE İnhibisyonu (mg GALAE/g ekstre)	Amilaz İnhibisyonu (mmol ACAE/g ekstre)	Glukozidaz İnhibisyonu (mmol ACAE/g ekstre)	Tirozinaz İnhibisyonu (mg KAE/g ekstre)
<i>Medicago rigidula</i>	2.05±0.08	0.94±0.11	0.73±0.04	1.30±0.09	16.36±0.85

* Üç paralel analizlerin ortalaması \pm Standart sapma.

GALAE: Galantamin eşdeğeri; ACAE: Akarboz eşdeğeri; KAE: Kojik asit eşdeğeri; na: Aktivite yok.

Tablo 3. *M. rigidula* (L.) All. metanol ekstresinin fenolik bileşenleri (µg/g).

Fenolik Bileşenler	<i>Medicago rigidula</i>
Gallik Asit	40.92
Kateşin	3828.32
Klorojenik asit	56.11
Epikateşin	26.26
Sinamik asit	215.75

düşük oranda bulunan bileşen olmuştur. Bizim çalışmamızda ise hidroksibenzoik asit, ferrulik asit ve sinapik asit bulunmazken sinamik asit kateşinden sonra en bol bulunan fenolik bileşen olmuştur.

SONUÇ

Ülkemizde yaygın olarak yetişen ve hayvancılığın yaygın olduğu bölgelerde hayvanların temel besin kaynaklarından olan *Medicago* cinsi yüksek protein içeriğiyle oldukça önemli bir yem bitkisidir. Bunun yanında günümüzde insan beslenmesinde de alternatif protein kaynağı olarak iş görmektedir. Ayrıca içerdiği önemli fitokimyasallar bakımından pek çok hastalığın tedavisi ve önlenmesinde önemli bir yere sahiptir. *Medicago* cinsi ile yapılan önceki çalışmalar ışığında bitkinin önemli bir potansiyele sahip olduğu açıktır. Bu çalışma sonucunda elde edilen verilere bakıldığında *M. rigidula*'nın iyi bir antioksidan kaynağı olduğu, çalışılan metabolik hastalıklarla ilgili enzimleri orta düzeyde inhibe etme özelliğine ve faydalı fenolik bileşime sahip olduğu görülmüştür. Bu nedenle çalışılan tür doğal antioksidanların ve enzim inhibitörlerinin önemli bir kaynağı olarak düşünülebilir.

Investigation of Antioxidant and Enzyme Inhibition Activities and Phenolic Compound of *Medicago rigidula* (L.) All.

ABSTRACT

The study focused on evaluating of antioxidant capacity, phenolic compounds and enzyme inhibition activity of methanolic extract *Medicago rigidula*. Antioxidant activity was evaluated using different assays including 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH), ferric ion reducing antioxidant power (FRAP), cupric ion reducing antioxidant capacity (CUPRAC) and total antioxidant capacity (phosphomolybdenum) test. Total phenolic and flavonoid contents were also determined. Enzyme inhibition activities were examined against

anticholinesterase, tyrosinase, alpha-amylase and alpha-glucosidase. Phenolic content of *M. rigidula* included catechin, cinnamic, chlorogenic, gallic and syringic acids. Free radical scavenging activity of methanol extract was 20.30% at 1 mg/mL concentration. In phosphomolybdenum and FRAP tests were found 167.27 mg AAE/g and 67.01 mg TE/g, respectively. Total phenolic and flavonoid contents were determined as 79.61 mg GAE/g and 27.38 µg QE/g, respectively. The results showed that *M. rigidula* has a good source of antioxidants and enzyme inhibition capacity. Thus, it can be used as raw material in food and pharmaceutical industry.

Keywords: Chemical composition, bioactivity, HPLC analysis, Fabaceae.

Kaynaklar

- Cocks PS. The Adaptation of Perennial Legumes to Mediterranean Conditions: New Perennial Legumes for Sustainable Agriculture. University of Western Australia Press, Crawley, WA. 2003.
- Farag MA, Hufman D, Lei Z, Summer LW. Metabolic profiling and systematic identification of flavonoids and isoflavonoids in roots and cell cultures of *Medicago truncatula* using HPLC-UV-ESI-MS and GC-MS. *Phytochem* 2007; 68: 342-54.
- Yildiz F. Phytoestrogens in Functional Foods. Taylor & Francis. London. 2005.
- Facciola S. Cornucopia – A Source Book Of edible Plants. Kampong Publications Vista, California. 1990.
- Koschuh W, Povoden G, Thang VH, Kromus S, Kulbe KD, Novalin S, Krotscheck C. Production of leaf protein concentrate from ryegrass (*Lolium perenne* × *multiflorum*) and alfalfa (*Medicago sativa* subsp. *sativa*). Comparison between heat coagulation/centrifugation and ultrafiltration. *Desalination* 2004; 163: 253-9.
- Hanif MA, Al-Maskari AY, Al-Sabahi JN, Al-Hdhrani I, Khan MM, Al-Azkawi A, Hussain AI. Chemical characterisation of bioactive compounds in *Medicago sativa* growing in the desert of Oman. *Nat Prod Res* 2015; 29: 2332-5.
- Jacobs A, Wegewitz U, Sommerfeld C, Grossklaus R, Lampen A. Efficacy of isoflavones in relieving vasomotor menopausal symptoms – a systematic review. *Mol Nutr Food Res* 2009; 53: 1084-97.
- Javid T, Adnan M, Tariq A, Akhtar B, Ullah R, Abdelsalam NM. Antimicrobial activity of three medicinal plants (*Artemisia indica*, *Medicago falcata* and *Tecoma stans*). *Afr J Trad Comp Altern Med* 2015; 12: 91-6.

9. Jian L. Soy, isoflavones, and prostate cancer. *Mol Nutr Food Res* 2009; 53: 217-26.
10. Wu J, Muir AD. Isoflavone content and its potential contribution to the antihypertensive activity in soybean angiotensin I converting enzyme inhibitory peptides. *J Agr Food Chem* 2008; 56: 9899-9904.
11. Sabudak T, Guler N. *Trifolium L.* – review on its phytochemical and pharmacological profile. *Phytother Res* 2009; 23: 439-46.
12. Mortensen A, Kulling SE, Schwartz H, Rowland I, Ruefer CE, Rimbach G, Cass-idy A, Magee P, Millar J, Hall WL, Kramer Birkved F, Sorensen IK, Sontag G. Analytical and compositional aspects of isoflavones in food and their biological effects. *Mol Nutr Food Res* 2009; 53: 266-309.
13. Rostagno MA, Villares A, Guillamón E, García-Lafuente A, Martínez JA. Sample preparation for the analysis of isoflavones from soybeans and soy foods. *J Chromatogr A* 2009; 1216: 2-29.
14. Guo JY, Yang XL. In vitro antioxidation activity of extracts from different parts of Alfalfa plant. *Crops* 2013; 3: 45-8.
15. Dong XN, Zhao HF, Zhao Q, Yi RR, Jin ZJ. Study on extraction technology and antibacterial of flavonoids from space breeding alfalfa. *Pratacult Sci* 2013; 31: 771-5.
16. Pan WC. Main composition of alfalfa and its application in animal husbandry. *J Tradit Chin Vet Med* 2015; 34: 73-7.
17. Reilly P. Clinical application-*Medicago sativa* extracts. *J Naturopathic Med* 1989; 1: 1-7.
18. Selvan AT, Prithvi S, Suthakaran S, Ravali R, Kumar GM, Ravali R. Anxiolytic effect of medicine of *Medicago sativa* seeds extract on rodents. *Indo Am J Pharm Res* 2014; 4: 406-15.
19. Kumar A. Antioxidant effect of *Adiantum capillus veneris* Linn on human lymphocyte: an in vitro study. *J Cell Tissue Res* 2009; 9: 1899-1902.
20. Halliwell B. Free Radicals and other reactive species in Disease. *Encyclopedia of Life Sciences*. Nature Publishing Group, New York. 2005.
21. disease. *Int J Biochem Cell Biol* 2006; 39: 44-84.
22. Finaud J, Lac G, Filaire E. Oxidative Stress Relationship with Exercise and Training. *Sports Med* 2006; 36: 327-58.
23. Chauhan PS, Puri N, Sharma P, Gupta N. Mannanases: microbial sources, production, properties and potential biotechnological applications. *App Microbiol Biotechnol* 2012; 93: 1817-30.
24. Amtul Z, Siddiqui RA, Choudhury MI. Chemistry and mechanism of urease inhibition. *Curr Med Chem* 2002; 9: 1323-48.
25. capacity of apple juices. *Croat Chem Acta* 2011; 84: 435-8.
26. Agbor GA, Vinson JA, Donnelly PE. Folin-Ciocalteu reagent for polyphenolic assay. *Int J Food Sci Nutr Diet* 2014;3: 147-56.
27. Arvouet-Grand A, Vennat B, Pourrat A, Legret P. Standardization of a propolis extract and identification of the main constituents. *J Pharm Belg* 1994; 49: 462-8.
28. Kirby AJ, Schmidt RJ. The antioxidant activity of Chinese herbs for eczema and of placebo herbs. *J Ethnopharmacol* 1997; 56: 103-8.
29. Prieto P, Pineda M, Aguilar M. Spectrophotometric quantitation of antioxidant capacity through the formation of a phosphor molybdenum complex: Specific application to the determination of vitamin E. *Anal Biochem* 1999; 269:337-41.
30. Apak R, Guclu K, Ozyurek M, Karademir SE, Ergac E. The cupric ion reducing antioxidant capacity and polyphenolic content of some herbal teas. *Int J Food Sci Nutr* 2006; 57: 292-304.
31. Yang XW, Huang MZ, Jin YS, Sun LN, Song Y, Chen HS. Phenolics from *Bidens bipinnata* and their amylase inhibitory properties. *Fitoterapia* 2012; 83: 1169-75.
32. Palanisamy UD, Ling LT, Manaharan T, Appleton D. Rapid isolation of geraniin from *Nepheleium lappaceum* rind waste and its anti-hyperglycemic activity. *Food Chem* 2011; 127: 21-7.
33. Orhan IE, Senol FS, Gulpinar AR, Sekeroglu N, Kartal M, Sener B. Neuroprotective potential of some terebinth coffee brands and the unprocessed fruits of *Pistacia terebinthus* L. and their fatty and essential oil analyses. *Food Chem* 2012; 130: 882-8.
34. Caponio F, Alloggio V, Gomes T. Phenolic compounds of virgin olive oil: influence of paste preparation techniques. *Food Chem* 1999, 64: 203-9.
35. Kicel A, Olszewska MA. Evaluation of Antioxidant Activity, and Quantitative Estimation of Flavonoids, Saponins and Phenols in Crude Extract and Dry Fractions of *Medicago lupulina* Aerial Parts. *Nat Prod Comm* 2015; 10: 483-6.
36. Rodrigues F, Palmeira-de-Oliveira A, das Neves J, Sarmento B, Amaral MH, Oliveira MB. *Medicago* spp. extracts as promising ingredients for skin care products. *Ind Crop Prod* 2013; 49: 634-44.
37. Rana MG, Katbamna RV, Padhya AA, Dudhrejiya AD, Jivani NP, Sheth NR. In vitro antioxidant and free radical scavenging studies of alcoholic extract of *Medicago sativa* L. *Rom J Biol-Plant Biol* 2010; 55: 15-22.
38. Bora SK, Sharma A. Evaluation of Antioxidant and Cerebroprotective Effect of *Medicago sativa* Linn. against Ischemia and Reperfusion Insult. *J Evid Based Complementary Altern Med* 2011; Article ID 792167.
39. Al-Dosari MS. In Vitro and in Vivo Antioxidant Activity of Alfalfa (*Medicago sativa* L.) on Carbon Tetrachloride Intoxicated Rats. *Am J Chin Med* 2012; 40: 779-93.