

Araştırma Makalesi

**Sıvı/Katı Oranı ve Etanol Konsantrasyonuna Göre Karahindiba (*Taraxacum officinale*)
Tentürünün Verim ve Biyoaktivitesindeki Değişimin İncelenmesi**

¹Mahmut KAPLAN*, ^{2,3}Mustafa Mücahit YILMAZ, ²Serap KÖPRÜ, ²Hürmet GÖZELLE, ²Gamze MUHDEREM,
²Rabia USLU

¹Erciyes Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Tarla Bitkileri Bölümü, Kayseri

²Dr. Yılmaz Tıbbi Bitkiler ve İlaç Hammaddeleri A.Ş. Kayseri

³Dr. Yılmaz Klinik, Kayseri

*Sorumlu yazar: mahmutk@erciyes.edu.tr

Geliş Tarihi: 22.01.2018

Düzeltilme Geliş Tarihi: 26.03.2018

Kabul Tarihi: 29.03.2018

Özet

Bu çalışmada, bir hidroalkolik ekstrakt tipi olan tentür üretimi amacıyla karahindiba (*Taraxacum officinale*) bitkisi kullanılmış ve son ürün kalitesini artırmaya yönelik olarak üretim şartlarını optimize etmek üzere proses faktör seviyelerinin belirlenmesi amaçlanmıştır. Bu amaçla, optimizasyon işlemi için tepki yüzey yöntemi tabanlı merkezi tümleşik tasarım dizaynından faydalanılmıştır. Örneklerin hazırlanması amacıyla sıvı/katı oranı ve etanol konsantrasyonu faktör olarak seçilmiştir. Örneklerin biyoaktif özelliklerinin belirlenmesi amacıyla toplam fenolik madde miktarı, antiradikal kapasite ve EC₅₀ değeri ile verim özellikleri hesaplanmıştır. Sıvı/katı oranı ve etanol konsantrasyonunun örneklerin toplam fenolik madde miktarı üzerinde oldukça etkili olduğu görülmüştür. Örneklerin toplam fenolik madde miktarı değerleri 605-1754 mg GAE/L aralığında, EC₅₀ değerleri 9.80-199.2 aralığında, ekstrakt verimleri ise %2.32-6.49 aralığında değişim göstermiştir. Bitki örneklerinde sıvı miktarının artışı toplam fenolik madde miktarını artırırken ekstrakt veriminde düşüşe yol açmıştır. Optimizasyon işlemi sonucunda en yüksek toplam fenolik madde miktarının %57 etanol konsantrasyonunda ve 1:4 katı/sıvı oranında elde edilebileceği sonucuna ulaşılmıştır.

Anahtar kelimeler: Karahindiba, tentür, biyoaktivite, optimizasyon, tepki yüzey yöntemi

**Investigation of the Change in Yield and Bioactivity of Dandelion (*Taraxacum officinale*)
Tincture Depending on Liquid/Solid Ratio and Ethanol Concentration**

Abstract

In this study, dandelion (*Taraxacum officinale*) plant was used for the production of tincture, a hydroalcoholic extract type, and it was aimed to determine process factor levels for the optimization of the production conditions in order to increase the final product quality. For this purpose, central composite rotatable design based on response surface methodology was utilized for the optimization process. The liquid / solid ratio and the ethanol concentration were chosen as factors for the preparation of the samples. In order to determine bioactive properties of samples, total phenolic content, antiradical capacity (EC₅₀) value and extract yield properties were determined. Liquid / solid ratio and ethanol concentration were found to be very effective over the total amount of phenolic materials. The total phenolic content values of the samples ranged from 605-1754 mg GAE/L, EC₅₀ values ranged from 9.80-199.2, and extract yields ranged from 2.32-6.49%. Increasing the amount of liquid for herbs increased the total phenolic content, which led to a decrease in the yield of the extract. The result of the optimization process showed that the highest total phenolic content could be achieved in a 1: 4 solid / liquid ratio at a concentration of 57% ethanol.

Key words: Dandelion, tincture, bioactivity, optimization, response surface methodology

Giriş

Taraxacum officinale (Asteraceae), karahindiba olarak adlandırılan ve kuzey yarım kürede yayılış gösteren çok yıllık bir bitkidir. Uzun yıllardan bu yana halk tarafından ateş düşürme, boğaz ağrısını hafifletme ve mide yanmalarını gidermek amacıyla kullanılmıştır (You ve ark., 2010). Karahindiba bitkisi farmasötik amaçlı kullanımının dışında, bitkinin çiçek salkımları, yaprakları ve kökleri gıda amaçlı kullanılabilir. Taze yaprakları salatalara ilave edilmekte, kökleri kurutulup kavru olarak kahve şeklinde tüketilebilmektedir. İlave olarak özütleri gazsız içecekler, tatlılar, şekerlemeler, unlu mamuller gibi çeşitli gıdalarda aroma verici olarak kullanılabilir (Rivera-Nunez, 1991; Leung ve Foster, 1996). Farmakolojik çalışmalar karahindiba bitkisinin antioksidan, antifertilite, hepatoprotektif, antiinflamatuvar ve antitümör özelliklerinin yanında koleretik, diüretik ve antiromatizmal etkilere sahip olduğunu ortaya koymuştur (Baba ve ark., 1981; Bisset, 1994; Jeon ve ark., 2008; Park ve ark., 2010; Tahtamouni ve ark., 2011). Karahindiba bitkisinin sahip olduğu biyoaktiviteden sorumlu flavanoid ve fenolik fraksiyonları Williams ve ark. (1996) tarafından kapsamlı olarak ele alınmıştır.

Tentür tıbbi amaçlı kullanılan çeşitli bitkilerin hidroalkolik ekstraktları olup fitoterapide yaygın ve etkili bir şekilde kullanılmaktadır. Fitoterapide kullanılan tentürlerden bitkinin hastalık üzerindeki etkinliğini artırmak amacıyla yaygın bir şekilde faydalanılmaktadır (Olech ve ark., 2012). Fitoterapide bitkilerin toz formda kullanımı yaygın bir uygulama olsa da tentür şeklinde uygulamaları birçok avantaja sahiptir. Tentürler toz formdaki bitkiye kıyasla daha az işlem içermekte ve kimyasal spektrumu daha net yansıtmakta, aynı zamanda sıvı formdaki tentür toz forma göre etken maddelerin çözünür formda olması sebebiyle daha iyi bir biyoyararlılık göstermektedir. Ayrıca tentür kullanımı hasta bakımından daha esnek ve kolay bir kullanım sunmakta, özellikle çocuklar tarafından tüketimi tentür tipi ürünler için daha kolay olmaktadır (Bone, 2003).

Tepki yüzey yöntemi karmaşık işlemleri daha kolay hale getirmek ve proses parametrelerini optimize etmek amacıyla yaygın şekilde kullanılan önemli bir istatistiksel modelleme tekniğidir (Tang ve Choi, 2013; Sheng ve ark., 2013; Wang ve ark., 2013). Birden fazla parametre ve etkileşimi değerlendirmek üzere daha az sayıda denemeye gereksinim duyması nedeniyle etkili bir şekilde kullanılan önemli bir yöntemdir (Ma ve ark., 2010). Bir problemin analiz edilmesi ve modellenerek çözüme ulaşılabilmesi için belirlenen deneysel faktörler ile bunlara karşılık olarak belirlenen tepkiler arasında ilişki kurulması ve bu ilişkinin

kuvvetinin belirlenmesi amacıyla kullanılmaktadır. Tepki yüzey yöntemi çalışma başlangıcında bağımsız değişkenlere bağlı olarak değişim gösterecek tepkileri öngörebilecek fonksiyonlar ortaya koyarak optimum çalışma şartlarını belirlemektedir (Myers ve Montgomery, 2002; Koç ve Kaymak Ertekin, 2010). Bu çalışmanın temel amacı, fitoterapide kullanım alanı bulmuş karahindiba bitkisinden tentür üretim şartlarının tepki yüzey yöntemi kullanılarak optimize edilmesidir. Bu amaçla tentür üretiminde biyoaktiviteyi doğrudan etkilediği bilinen sıvı/katı oranı ve etanol konsantrasyonu proses faktörü olarak seçilmiş ve son ürünün temel biyoaktif özellikleri ile verim değerleri üzerine etkisi incelenmiş ve maksimum biyoaktiviteye sahip tentür üretimine yönelik proses şartları optimize edilmiştir.

Materyal ve Yöntem

Materyal

Çalışmada materyal olarak kullanılan karahindiba bitkisi toprak üstü kısmı (*Taraxacum officinale*) Bora Tohumculuk Şirketi'nden (Ankara, Türkiye) kurutulmuş olarak satın alınmış ve öğütülerek toz hale getirilmiştir. Folin Ciocalteu reaktifi ve sodyum karbonat, Merck (Almanya)'den, 2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) radikali Sigma-Aldrich (Madrid, İspanya)'den ve tentür hazırlamada kullanılan etanol ise Tekkim'den (İstanbul, Türkiye) satın alınmıştır.

Yöntem

Deneme tasarımı ve örneklerin hazırlanması

Çalışma kapsamında örneklerin biyoaktif özellikleri ile ekstrakt verim değerlerinin belirlenerek proses faktörlerinin etkilerinin tespiti ve optimum değerlerin ortaya konabilmesi amacıyla tepki yüzey yöntemi tabanlı merkezi tümleşik deneme tasarımı kullanılmıştır (Çizelge 1). Bağımsız değişken olarak katı/sıvı oranı ve etanol konsantrasyonu, bağımlı değişken olarak ise biyoaktif özellikler (toplam fenolik madde ve antiradikal kapasite) ile ekstrakt verimi seçilmiş ve 11 noktalı deneme tasarımına göre analizler yapılmıştır. Sıvı/katı oranı 3-10, etanol konsantrasyonu ise %25-75 aralığında belirlenmiştir. Tentür üretimi için 1 g öğütülerek toz hale getirilmiş bitki örneği ağzı kapaklı şişelere tartılmış ve üzerine ilgili miktar ve konsantrasyonda (Çizelge 1) etanol ilave edilerek karanlık ortamda 14 gün süreyle bekletilmiştir. Süre sonunda örnekler kaba filtre kâğıdından süzülmuş ve ardından 0.45 µm enjektör filtreden geçirilerek analize hazır hale getirilmiştir.

Çizelge 1. Çalışma kapsamında uygulanan tepki yüzey yöntemi tabanlı merkezi tümleşik tasarım dizaynı

D.N	Kodlu değerler		Aktüel değerler	
	A	B	A: Sıvı/katı oranı (ml)	B: Etanol konsantrasyonu (%)
1	0.00	0.00	6.5	50
2	-1.00	1.00	4.03	67.68
3	1.00	-1.00	8.97	32.32
4	0.00	0.00	6.5	50
5	0.00	1.414	6.5	75
6	1.00	1.00	8.97	67.68
7	0.00	0.00	6.5	50
8	-1.00	-1.00	4.03	32.32
9	0.00	-1.414	6.5	25
10	1.414	0.00	10	50
11	-1.414	0.00	3	50

Toplam fenolik madde miktarının belirlenmesi

Örneklerin toplam fenolik madde miktarının tayini Singleton ve Rossi (1965) tarafından bildirilen yöntem esas alınarak gerçekleştirilmiştir. Bu amaçla belirli oranda seyreltilmiş (1:10) 200 µl tentür örneği 1800 µl destile su ile karıştırılmış ve ardından tüplere 1/10 oranında seyreltilmiş 1 mL Folin Ciocalteu reagenti ilave edilmiştir. Daha sonra tüplere 5 s aralıklarla 2000 µl sodyum karbonat (%2) çözeltisi eklenmiştir. İşlem sonunda tüplerin ağızları sıkıca kapatıldıktan sonra vortekslenmiş ve 2 saat süreyle karanlık ortamda ve oda sıcaklığında inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonunda örneklerin absorbans değerleri UV-VIS spektrofotometre ile (Schimadzu, Japan) 765 nm dalga boyunda kaydedilmiştir. Toplam fenolik madde miktarları gallik asit standardı ile hazırlanmış olan kalibrasyon eğrisi kullanılarak gallik asit eşdeğeri (GAE) olarak hesaplanmıştır. Örneklerin absorbans okumaları 4 paralel şekilde gerçekleştirilmiştir.

Antiradikal aktivite ve EC₅₀ değerinin belirlenmesi

Örneklerin antiradikal aktivitesinin tayini 2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) radikali kullanılarak tespit edilmiştir. Bu amaçla 100 µl tentür örneği 3900 µl DPPH radikal solüsyonu (0.1 mM) ile karıştırılmış, ağızları sıkıca kapatıldıktan sonra vortekslenip karanlık ortamda 30 dk süreyle inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonunda örneklerin absorbans değerleri UV-VIS spektrofotometre ile (Schimadzu, Japan) 517 nm dalga boyunda kaydedilmiştir. Elde edilen absorbans değerleri DPPH solüsyonunun doğrudan kontrol olarak okunduğu aşağıdaki denklemde yerine konarak sonuçlar % inhibisyon şeklinde hesaplanmıştır.

$$\% \text{inhibisyon} = \frac{(Abs_c - Abs_s)}{Abs_c} \times 100 \quad (\text{Denklem 1})$$

Abs_c kontrol örneğinin absorbans değeri, Abs_s ise tentür örneğinin absorbans değeridir.

Örneklerin EC₅₀ değerini belirlemek amacıyla Moreno ve ark. (1998) ile Brand-Williams ve ark. (1995) tarafından önerilen yöntem uygulanmıştır. Bu amaçla, her bir örnek 4 farklı oranda seyreltilmiş ve her bir seyreltilmiş örnekte yukarıda bahsedildiği gibi DPPH radikali süpürme gücü belirlenmiştir. Aynı şekilde 100 µl örnek, 3900 µl DPPH radikal solüsyonu ile karıştırılmış, ağızları sıkıca kapatıldıktan sonra vortekslenip karanlık ortamda 30 dk süreyle inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonunda örneklerin absorbans değerleri UV-VIS spektrofotometre ile (Schimadzu, Japan) 517 nm dalga boyunda kaydedilmiştir. Daha sonra her bir seyreltme oranına karşı ortalama absorbans değerleri dikkate alınarak ortamda süpürülmeyen DPPH radikal miktarı aşağıdaki denklem ile hesaplanmıştır.

$$DPPH_{\text{Kalan}}(\text{mg/ml}) = [37.92 \times Abs_{517} + 0.27] \times 1000 \quad (\text{Denklem 2})$$

% kalan DPPH oranı ise reaksiyon sonunda kalan DPPH miktarının başlangıçtaki oranına bölünmesiyle hesaplanmıştır.

$$\% DPPH_{\text{Kalan}} = \frac{[DPPH]_t}{[DPPH]_{t=0}} \quad (\text{Denklem 3})$$

Başlangıçta ortamda var olan radikal miktarının %50'sini inhibe etmek için gerekli olan bitki miktarını ifade eden EC₅₀ değeri ise, ortamda kalan radikal ile örnek miktarı kullanılarak hazırlanan lineer regresyon küresel vasıtasıyla hesaplanmıştır. Tüm işlemler 4 paralel olacak

şekilde gerçekleştirilmiştir.

Ekstrakt verimi

Örneklerin ekstrakt verimleri kurutma yöntemi ile hesaplanmıştır. Bu amaçla alüminyum folyodan yapılmış tartım kaplarına belirli miktar ekstrakt tartımı yapılmış ve örnekler 105 °C sıcaklıkta 2 saat süreyle etüvde kurutulmuş ve ağırlık kaybı dikkate alınarak sonuçlar % ekstrakt verimi olarak verilmiştir. Tüm işlemler 3 paralel olacak şekilde gerçekleştirilmiştir.

Veri analizi, modelleme ve optimizasyon

Mevcut çalışmada tepki yüzey yöntemi tabanlı merkezi tümleşik deneme tasarımı kullanılmıştır. İki bağımsız değişkenin (sıvı/katı oranı ve etanol konsantrasyonu) 5 farklı seviyesi ile 3 tekerrürlü ve 11 noktalı deneme tasarımı oluşturulmuş ve Çizelge 1’de hem kodlu hem de aktüel değerler gösterilmiştir. Tepki olarak ise toplam fenolik madde miktarı, EC₅₀ değeri (antiradikal kapasite) ve ekstrakt verimi seçilmiştir. Çalışma kapsamında yapılan modelleme aşağıda gösterilen polinomial denklem baz alınarak gerçekleştirilmiştir. Bu denklemde;

$$Y - \varepsilon = \beta_0 + \sum_{i=1}^N \beta_i x_i + \sum_{i=1}^N \beta_{ii} x_i^2 + \sum_{\substack{i=1 \\ i < j}} \sum_{j=i+1}^N \beta_{ij} x_i x_j$$

(Denklem 4)

Y ilgili bağımsız değişkeni, β_0 denklem sabitini, β_i lineer olan terimi, β_{ii} kuadratik, β_{ij} ise interaksiyon etkiyi göstermekte, X_i ve X_j ise bağımsız değişkenin kodlu değerlerini ifade etmektedir. Bu denklem baz alınarak gerçekleştirilen modelleme işlemi sonucunda her bir tepkiye ait regresyon denklem katsayıları ve denklemin tahminleme performansını gösteren determinasyon katsayıları ile proses faktörü olarak belirlenen bağımsız değişken konumundaki faktörlerin etkisini ortaya koyan varyans analizleri Design-Expert® Software Version 7.0 (Stat-Ease Inc., Minneapolis, USA) yazılımı kullanılarak gerçekleştirilmiştir.

Bulgular ve Tartışma

Karahindiba bitkisi ve bu bitki kullanılarak üretilen tentür örneklerinin biyoaktif özellikleri ile verim değerleri Çizelge 2’de gösterilmiştir. Çizelgeden de görüldüğü üzere kullanılan sıvı/katı oranına ve etanol konsantrasyonuna göre bağımlı değişken değerleri geniş bir aralıkta değişim göstermiştir. Tentür örneklerinin toplam fenolik madde değerleri (TTFM) 605.95-1754.59 mg GAE/L aralığında değişmiş, en fazla fenolik madde değeri

sıvı/katı oranının en düşük olduğu 3:1 seviyesinde ve %50 etanol konsantrasyonunda gözlenirken en düşük toplam fenolik madde değeri 6.5:1 sıvı/katı oranında ve %25 alkol konsantrasyon seviyesinde belirlenmiştir. Tentür örnekleri için sıvı/katı oranının artışı örneklerin toplam fenolik madde değerlerinde düşüşe yol açmış ve bu düşüş ANOVA sonuçlarına bakıldığında istatistiksel olarak önemli bulunmuştur ($p < 0.01$, Çizelge 3). Benzer şekilde etanol konsantrasyonundaki değişim de tentür örneklerinin toplam fenolik madde değerlerini önemli seviyede etkilemiş ($p < 0.01$, Çizelge 3), belirli bir değer altı ve üstü örneklerin toplam fenolik madde miktarlarında önemli düşüşe yol açmıştır (Şekil 1). Tepki yüzey yöntemi ile modelleme neticesinde tentür örneklerinin toplam fenolik madde miktarını bağımsız değişkenler olan sıvı/katı oranı ve etanol konsantrasyonuna göre tahmin etmek amacıyla kurulan regresyon denklemi Çizelge 4’de gösterilmiştir. Çizelgeden görüldüğü üzere determinasyon katsayısı oldukça yüksek bulunmuştur ($R^2 = 0.973$). Bone (2003) tentür üretim şartlarını anlattığı çalışmasında genel olarak alkol konsantrasyonunun örneklerin biyoaktivitesini önemli derecede etkilediğini, alkol konsantrasyonunun %25 seviyesinde olduğu durumlarda daha çok musilaj, tannin ve bazı glikozidler gibi suda çözünür bileşiklerin, alkol konsantrasyonunun yüksek olduğu durumlarda ise resin ve oleoresin gibi maddelerin ekstrakte edildiğini bildirmiş, %45-60 seviyelerinde ise esansiyel yağlar, alkaloidler, çoğu saponin yapılı bileşik ile bazı glikozitlerin elde edildiğini ifade etmiştir. Örneklerin etanol konsantrasyonuna göre toplam fenolik madde miktarındaki değişim yapıda bulunan biyoaktif maddelerin su ve alkoldeki çözünürlük durumuna göre farklılık sergilemiştir. Sun ve ark. (2014) karahindiba bitkisinden flavonoid ekstraksiyonu için proses şartlarını belirlemek üzere gerçekleştirdikleri çalışmalarında, farklı etanol seviyelerine göre flavonoid veriminin önemli ölçüde değişim gösterdiğini ve en iyi konsantrasyonun %40 seviyelerinde olduğunu bildirmişlerdir.

Karahindiba bitkisinin toplam fenolik madde miktarı ekstraksiyon koşullarına bağlı olarak 3.94-9.32 mg GAE/g örnek aralığında değişim göstermiş, en yüksek fenolik madde miktarı 6 nolu deneme noktasında, en düşük toplam fenolik madde miktarı ise 9 nolu deneme noktasındaki şartlarda elde edilmiştir (Çizelge 2). Proses faktörlerinin her ikisi de bitkiden ekstrakte edilebilecek fenolik madde yoğunluğunu istatistiksel olarak önemli ölçüde etkilemiştir ($p < 0.01$, Çizelge 3). Şekil 2 sıvı/katı seviyesi ve etanol konsantrasyonuna göre karahindiba bitkisinden ekstrakte edilebilecek toplam fenolik madde miktarındaki değişimi göstermektedir. Sıvı/katı seviyesinde sabit örnek

miktarına kıyasla artan alkol miktarı örneklerden alınabilecek fenolik madde miktarını önemli seviyede artırmış, etanol konsantrasyonunun da fenolik madde ekstraksiyonunda istatistiksel olarak etkili olduğu ve %55-60 seviyelerinin altında ya da üstündeki oranlarda fenolik madde miktarının azalış gösterdiği belirlenmiştir (Şekil 2). Bitki toplam fenolik madde miktarını tahminlemek üzere yapılan modelleme sonucunda kurulan regresyon denklemleri Çizelge 4'te gösterilmiş ve oldukça yüksek determinasyon katsayısı ile ($R^2=0.980$) toplam varyasyonun sadece %2'lik kısmını açıklayamamıştır. Sengul ve ark. (2009) bazı tıbbi bitkilerin biyoaktif ve antimikrobiyal özelliklerini irdeledikleri çalışmalarında karahindiba bitkisinin

metanol ile hazırlanan ekstralarında toplam fenolik madde miktarını 15.5 mg GAE/ g kuru bitki şeklinde bildirmişlerdir. Çalışmada kaydedilen sonuçlar ile literatür bulgularının yakın olduğu, kısmi farklılığın kullanılan solvent tipinin farklı olmasından kaynaklandığı öngörülmüştür. Bir başka çalışmada Hu ve Kitts (2005) karahindiba bitkisinin çiçek kısımlarından elde ettikleri etanolik ekstralarda toplam fenolik madde miktarını 195 µg GAE/ mg örnek olarak bildirmişlerdir. Karahindiba bitkisinin fenolik kompozisyonunun ağırlıklı olarak hidrokisnamik asit türevleri, klorojenik asit, dikaffeoltartarik asit gibi kafeik asit esterlerinden oluştuğu bildirilmiştir (Williams ve ark., 1996; Budzianowski, 1997).

Çizelge 2. Örneklerin verim ve biyoaktif özellikleri

D.N	Sıvı/katı oranı (ml)	Etanol konsantrasyonu (%)	TTFM (mg GAE/L)	BTFM (mg GAE/g)	EC ₅₀	EV (%)
1	6.5	50	1408.65	8.98	15.74	4.31
2	4.03	67.68	1501.89	5.86	50.19	4.35
3	8.97	32.32	711.35	6.33	9.80	2.93
4	6.5	50	1219.46	7.93	34.06	3.96
5	6.5	75	1191.53	7.58	13.80	3.07
6	8.97	67.68	1024.86	9.32	11.64	2.32
7	6.5	50	1353.24	8.80	29.62	4.08
8	4.03	32.32	1169.46	4.68	297.69	6.36
9	6.5	25	605.95	3.94	199.22	4.40
10	10	50	914.05	9.14	27.27	2.58
11	3	50	1754.59	5.26	201.22	6.49

D.N.: Deneme noktası, TTFM: Tentür toplam fenolik madde, BTFM: Bitki toplam fenolik madde, EC₅₀: Etkin konsantrasyon, EV: Ekstrakt verimi

Çizelge 3. Analiz sonuçlarına göre bağımlı değişkenlere ait varyans analiz (ANOVA) sonuçları

	Bağımlı değişkenler [§]				
	S.D	TTFM	BTFM	EC ₅₀	EV
Model	5	0.0006 ^a	0.0003 ^a	0.0030 ^a	0.0001 ^a
<i>Lineer</i>					
<i>A^φ</i>	1	0.0002 ^a	0.0002 ^a	0.0012 ^a	0.0001 ^a
<i>B</i>	1	0.0012 ^a	0.0004 ^a	0.0030 ^a	0.0004 ^a
<i>İnteraksiyon</i>					
<i>AB</i>	1	0.9096	0.0707 ^c	0.0235 ^b	0.0131 ^b
<i>Kuadratik</i>					
<i>A²</i>	1	0.9995	0.0102 ^b	0.0377	0.0784 ^b
<i>B²</i>	1	0.0013 ^a	0.0004 ^a	0.0764 ^c	0.0348 ^b
Residual	5				
Uyum eksikliği	3	0.7494	0.9199	0.2127	0.4908
Hata	2				
Toplam	10				

^φA:Sıvı/katı oranı (ml), B: Etanol konsantrasyonu (%), S.D.: Serbestlik derecesi [§] TTFM: Tentür toplam fenolik madde, BTFM: Bitki toplam fenolik madde, EC₅₀: Etkin konsantrasyon, EV: Ekstrakt verimi, ^a $p<0.01$, ^b $p<0.05$, ^c $p<0.1$.

Tentür örneklerinin radikal süpürme aktivitesinin belirlenmesine yönelik gerçekleştirilen radikal yakalama testi sonucunda hesaplanan EC₅₀ değerleri Çizelge 2'de gösterilmiştir. Ortamdaki radikalın en az %50'sini süpürmek için gerekli örnek

miktarını ifade eden EC₅₀ değeri geniş bir aralıkta değişim göstermiş, Çizelgeden görüldüğü üzere 9.80-297.69 aralığında hesaplanmıştır. En yüksek değer 8 nolu deneme noktasında, en düşük değer ise 3 nolu deneme noktasında tespit edilmiştir.

Tentür örneklerinin radikal yakalama kapasitesi sıvı/katı oranı ve etanol konsantrasyonuna göre önemli seviyede değişim göstermiş ve her iki bağımsız değişkenin etkisi de istatistiksel olarak çok önemli bulunmuştur ($p<0.01$, Çizelge 3). Şekil 3 tentür örneklerinin EC_{50} değerlerinin proses faktörlerine göre değişimini göstermektedir. Şekilden görüldüğü üzere örneklerin EC_{50} değeri alkol konsantrasyonu ve sıvı/katı oranının düşmesiyle önemli seviyede artış göstermiştir ($p<0.01$, Çizelge 3). Örneklerin EC_{50} değerlerini tahminlemeye yönelik olarak oluşturulan regresyon denklemi toplam varyansın yaklaşık %95'lik kısmını

açıklamıştır ($R^2=0.949$, Çizelge 4). Yapılan bir çalışmada karahindiba bitkisinin metanolik ekstresinin antioksidan aktivitesi %43.05 olarak bildirilmiştir (Sengül ve ark., 2009). Hu ve Kitts (2005) yaptıkları bir çalışmada karahindiba bitkisinin çiçeklerinden elde edilen ekstrenin radikal süpürme gücünü 40 $\mu\text{g/ml}$ konsantrasyon için %35.6, 100 $\mu\text{g/ml}$ için ise %90.2 olarak bildirmişlerdir. Sun ve ark (2014) karahindiba bitkisi ekstresi için EC_{50} değerini 180.11 $\mu\text{g/ml}$ olarak bildirmiş, aynı çalışmada sentetik antioksidanlardan BHT 69.13 $\mu\text{g/ml}$, C vitamini ise 77.98 $\mu\text{g/ml}$ olarak rapor edilmiştir.

Çizelge 4. Bağımsız değişkenlere ait regresyon denklemleri

Parametre	Regresyon denklemi	R^2
TTFM	$Y=-274-101.2A+80.8B-0.108AB-0.001A^2-0.69B^2$	0.973
BTFM	$Y=-10.55+1.44A+0.45B+0.01AB-0.11A^2-0.004B^2$	0.980
EC_{50}^ϕ	$Y=68.63-8.60A-1.05B+0.06AB+0.31A^2+0.0050.69B^2$	0.949
EV	$Y=11.33-1.33A-0.01B+0.009AB+0.03A^2-0.0007B^2$	0.991

A: Sıvı/katı oranı (ml), B: Etanol konsantrasyonu (%), TTFM: Tentür toplam fenolik madde, BTFM: Bitki toplam fenolik madde, EC_{50} : Etkin konsantrasyon, EV: Ekstrakt verimi, R^2 : Determinasyon katsayısı $^\phi$ EC_{50} değeri için karekök transformasyon işlemi uygulanmıştır.

Çizelge 5. Bağımsız değişkenlerin maksimizasyon ve minimizasyon değerlerini gösteren optimizasyon sonuçları

Parametre	A	B	Max	Min	İstenirlik
TTFM	4.03	57.68	1633.8		0.895
	8.97	32.32		663.9	0.949
BTFM	8.89	60.45	9.69		1.000
	4.03	32.32		4.47	0.900
EC_{50}	6.26	32.32	6.36		0.967
	8.97	64.23		2.48	0.962
EV	4.03	32.32	4.63		0.477
	8.97	67.68		2.60	0.943

A: Sıvı/katı oranı (ml), B: Etanol konsantrasyonu (%), TTFM: Tentür toplam fenolik madde, BTFM: Bitki toplam fenolik madde, EC_{50} : Etkin konsantrasyon, EV: Ekstrakt verimi.

Tentür örneklerinin ekstrakt verimleri elde edilen süzüntülerin kurutulup oransal olarak hesaplanmasıyla belirlenmiş ve Çizelge 2'de verilmiştir. Görüldüğü üzere ekstrakt verim değerleri %2.32-6.49 değerleri arasında değişim göstermiştir. En düşük verim 6 nolu deneme deseninde gözlenmiş, buna paralel olarak birbirine yakın sıvı/katı oranı değerlerine sahip olan 3 ve 10 nolu deneme noktaları ile de benzer verim değerleri tespit edilmiştir. En yüksek verim değeri ise sıvı/katı oranının en düşük olduğu 11 nolu deneme noktasında tespit edilmiştir. Örneklerin ekstrakt verimi sıvı/katı oranı ve etanol konsantrasyonunun değişimiyle önemli seviyede değişim göstermiş ($p<0.01$, Çizelge 3), sıvı/katı oranındaki artış ekstrakt

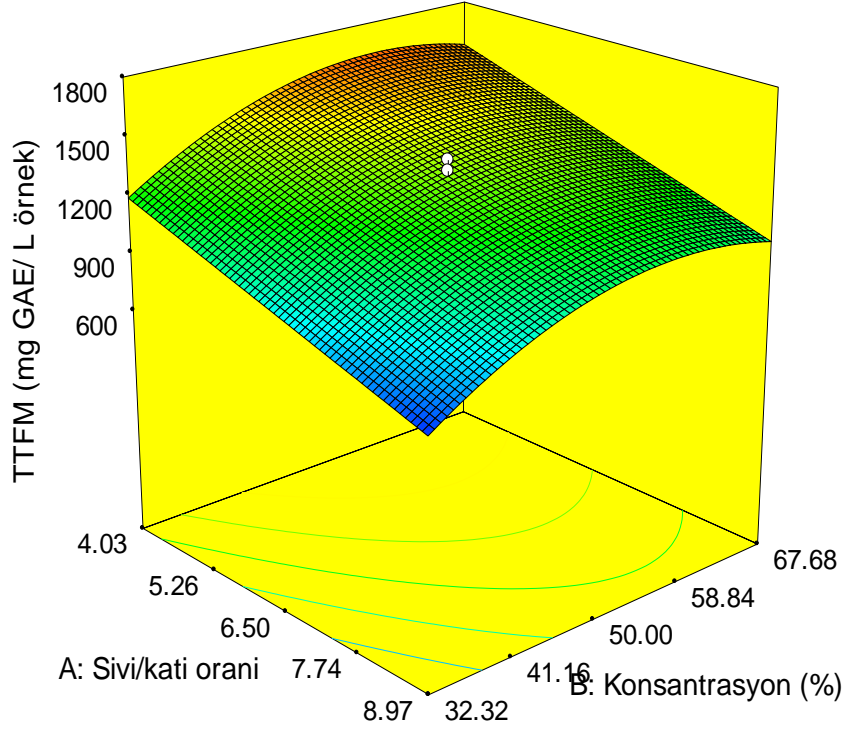
verimini düşürürken etanol konsantrasyonunun artışı verimde düşüşe yol açmıştır ($p<0.01$, Şekil 4). Ekstrakt verimi için oluşturulan regresyon denklemi Çizelge 4'te verilmiş, denkleme ait determinasyon katsayısı oldukça yüksek bulunmuştur ($R^2=0.991$). Sun ve ark. (2014) üç faktörlü (etanol konsantrasyonu, sıvı/katı oranı ve ekstraksiyon süresi) Box-Behnken deneme tasarımı kullanarak karahindiba bitkisinden flavonoid ekstraksiyonu gerçekleştirmiş ve etanol konsantrasyonu ile sıvı/katı oranının artışıyla belirli bir noktaya kadar verimde artış tespit etmişler ancak oluşan etkiyi istatistiksel olarak önemsiz bulmuşlardır.

Design-Expert® Software

TTFM (mg GAE/ L örnek)



X1 = A: Sivi/kati oranı
X2 = B: Konsantrasyon (%)

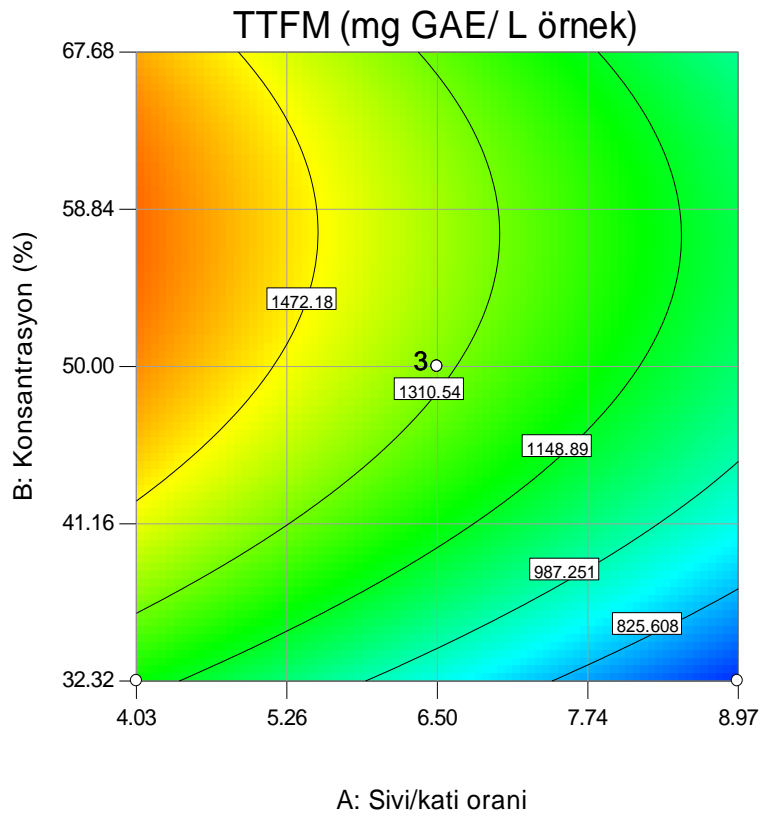


Design-Expert® Software

TTFM (mg GAE/ L örnek)



X1 = A: Sivi/kati oranı
X2 = B: Konsantrasyon (%)



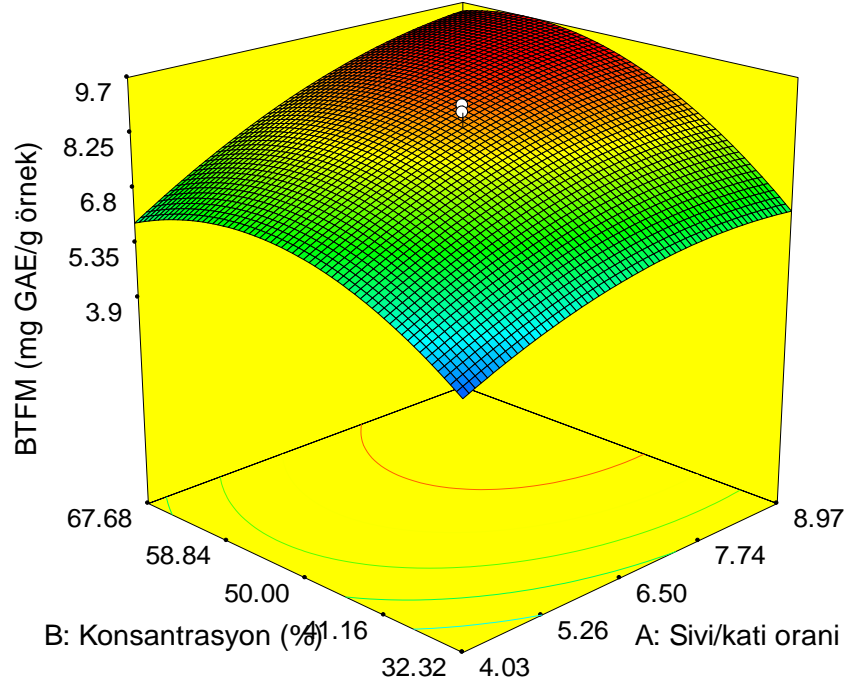
Şekil 1. Proses faktörlerinin tentür toplam fenolik madde miktarı üzerine etkisi.

Design-Expert® Software

BTFM (mg GAE/g örnek)

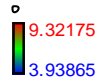


X1 = A: Sivi/kati oranı
X2 = B: Konsantrasyon (%)

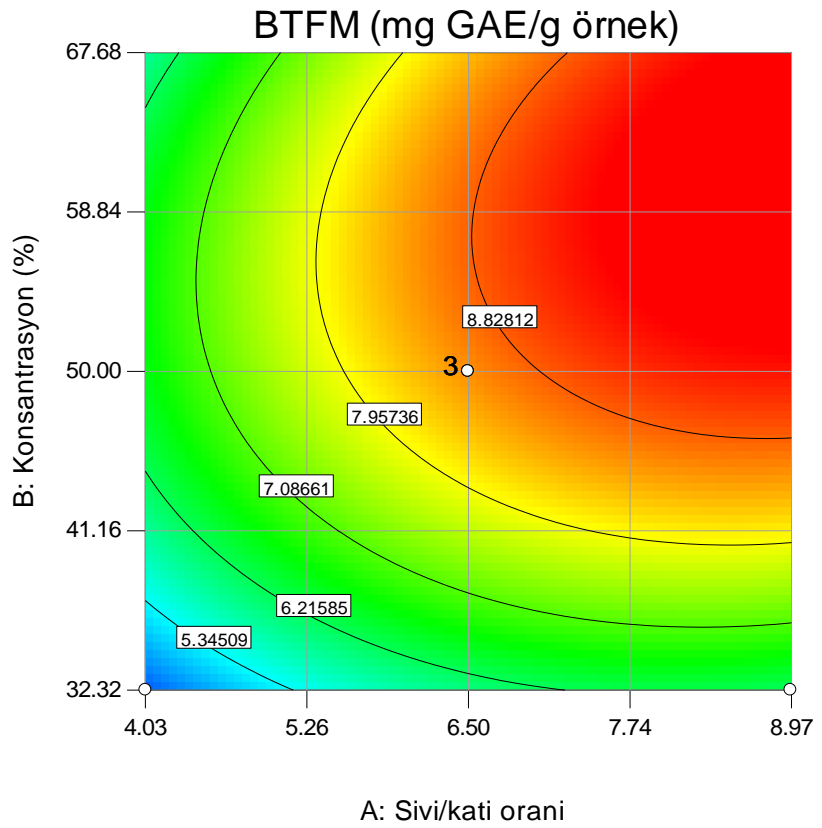


Design-Expert® Software

BTFM (mg GAE/g örnek)

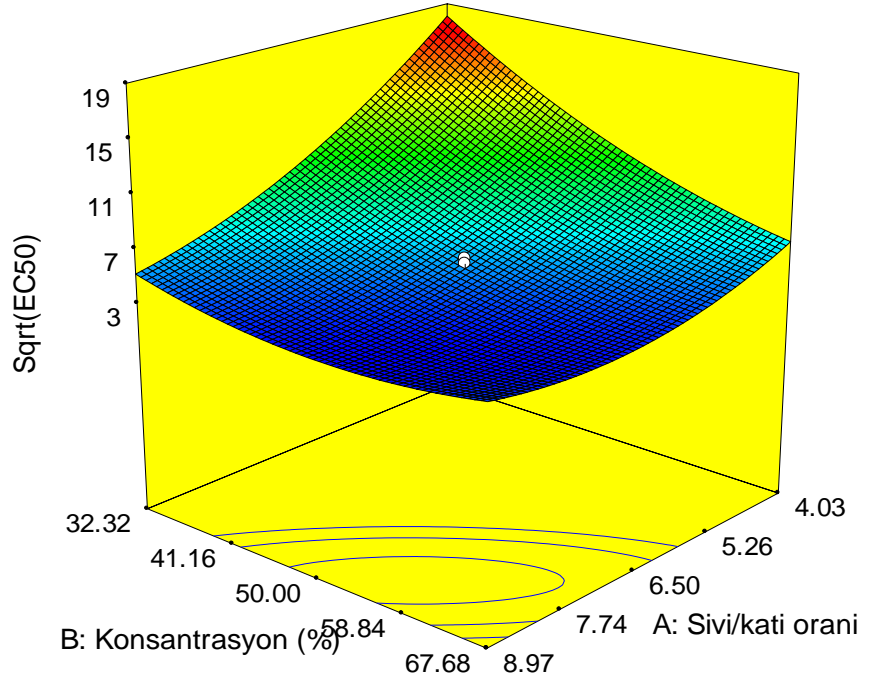


X1 = A: Sivi/kati oranı
X2 = B: Konsantrasyon (%)

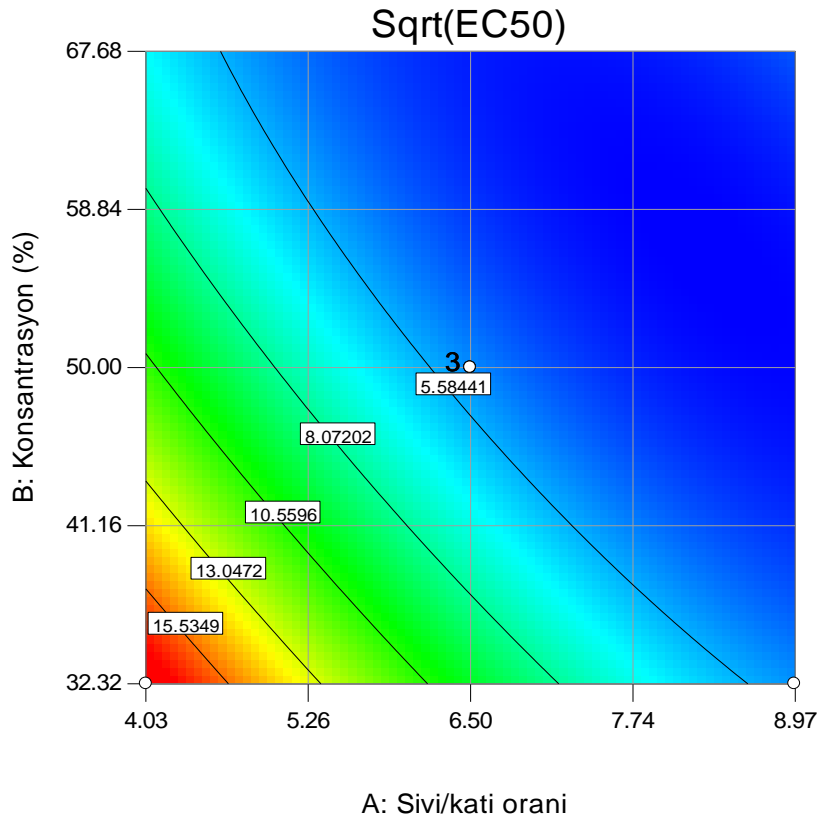


Şekil 2. Proses faktörlerinin bitki toplam fenolik madde miktarı üzerine etkisi.

Design-Expert® Software
Transformed Scale
Sqrt(EC50)
17.2537
3.13081
X1 = A: Sivi/kati oranı
X2 = B: Konsantrasyon (%)



Design-Expert® Software
Transformed Scale
Sqrt(EC50)
17.2537
3.13081
X1 = A: Sivi/kati oranı
X2 = B: Konsantrasyon (%)



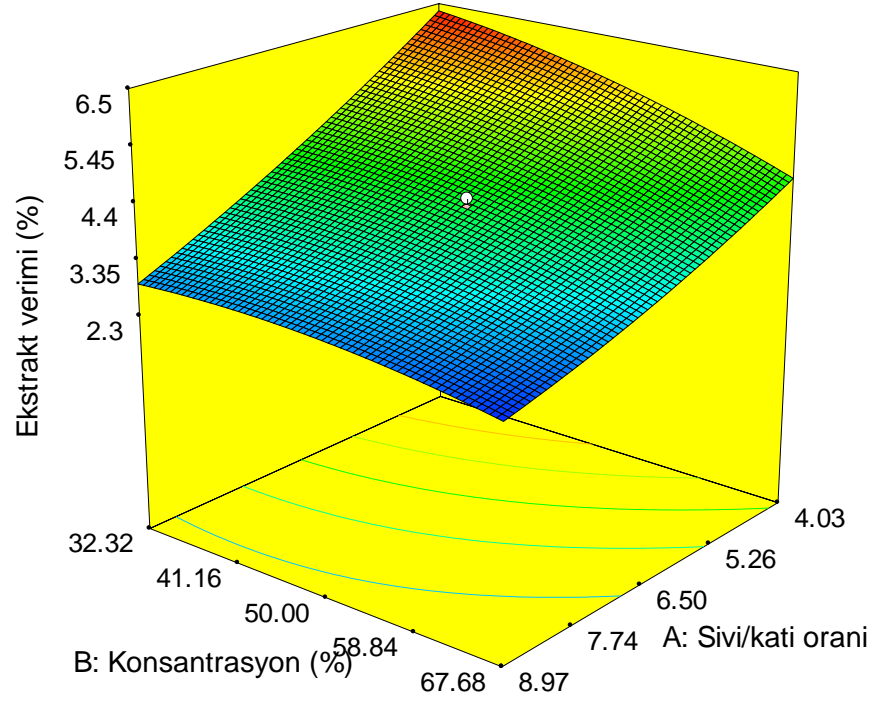
Şekil 3. Proses faktörlerinin EC₅₀ değeri üzerine etkisi.

Design-Expert® Software

Ekstrakt verimi (%)



X1 = A: Sivi/kati oranı
X2 = B: Konsantrasyon (%)

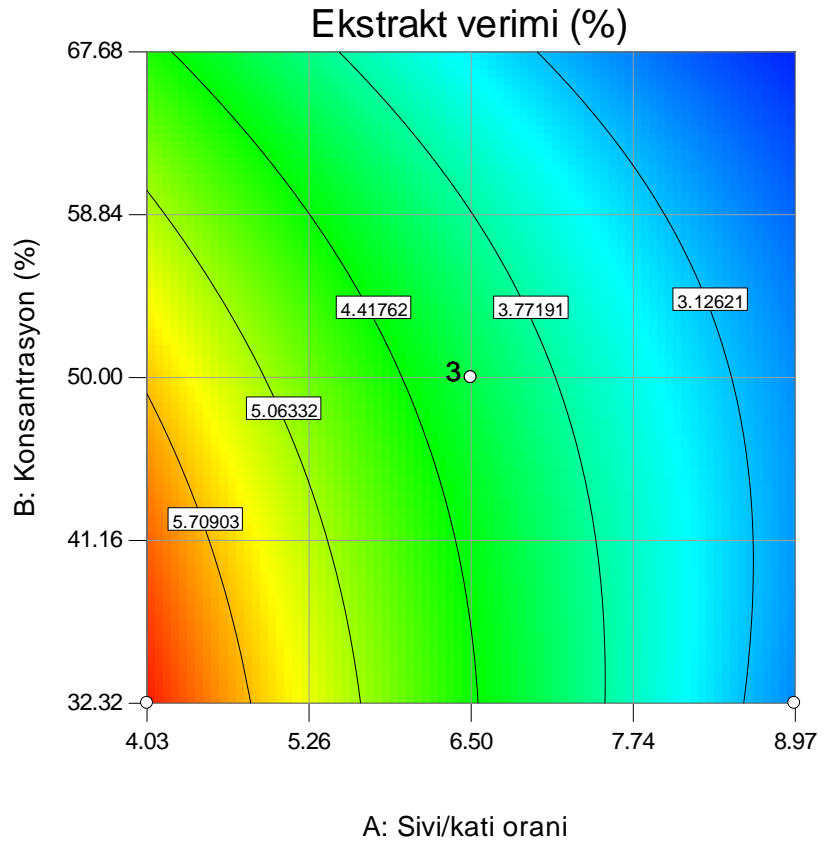


Design-Expert® Software

Ekstrakt verimi (%)



X1 = A: Sivi/kati oranı
X2 = B: Konsantrasyon (%)



Şekil 4. Proses faktörlerinin ekstrakt verimi üzerine etkisi.

İstenirlik fonksiyonu kullanılarak gerçekleştirilen optimizasyon işlemi sonucunda elde edilen maksimum ve minimum değerler ile bunlara ait istenirlik dereceleri Çizelge 5'te gösterilmiştir. En yüksek toplam fenolik madde değeri (1633.8 mg GAE/L), tentür örnekleri için sıvı/katı oranının 4:1, etanol konsantrasyonunun ise %57.68 olduğu durumda alınabileceken, bitki minimum toplam fenolik madde miktarı değeri (663.9 mg GAE/L) 8.97:1 sıvı/katı oranı ve %32.32 etanol konsantrasyonunda tespit edilmiştir. Bitki toplam fenolik madde miktarı ise tentür örneklerine kıyasla ters bir ilişki sergilemiş, en yüksek fenolik madde miktarı 8.89:1 sıvı/katı oranı ve %60.45 etanol konsantrasyonunda tespit edilmiştir. EC₅₀ için en düşük değer bitki fenolik madde miktarının maksimum olduğu noktada görülmüştür. Ekstrakt veriminin minimum olduğu nokta 8.97:1 sıvı/katı oranı ve %67.68 etanol konsantrasyonunda tespit edilirken, sıvı/katı oranının 4.03 ve alkol konsantrasyonunun da %32.32 olduğu durumda en yüksek verim değeri gözlenmiştir. İlgili parametreler için istenirlik fonksiyon değeri genel olarak oldukça yüksek seviyelerde hesaplanmıştır.

Sonuç ve Öneriler

Çalışma kapsamında karahindiba bitkisinin ve bu bitkiden üretilen tentür örneklerinin biyoaktif özellikleri ve verim değerleri üzerine sıvı/katı oranı ve etanol konsantrasyonuna göre değişimi incelenmiş ve her iki değişkenin de çalışılan biyoaktif özellikler ve verim üzerinde önemli derecede etkili olduğu sonucuna varılmıştır. Özellikle sıvı/katı oranında sıvı miktarının artışı bitki toplam fenolik madde miktarı üzerinde artışa yol açarken, tentür örneklerinin fenolik konsantrasyonunda düşüşe neden olmuştur. Etanol konsantrasyonunun belirli bir seviyenin altına düşmesi ya da üstüne çıkması sonucunda da toplam fenolik madde değerlerinin önemli ölçüde azaldığı sonucuna varılmıştır. Örneklerin EC₅₀ değerleri ile bitki toplam fenolik madde değerleri arasında da önemli ve negatif bir korelasyon tespit edilmiştir. Maksimum biyoyararlılığın gözlenebilmesi amacıyla karahindiba bitkisinden tentür üretiminin 4:1 sıvı/katı oranında ve ortalama %57 etanol konsantrasyonunda gerçekleştirilmesi gerektiği belirlenmiştir.

Kaynaklar

Baba, K., Abe, S., Mizuno, D. 1981. Antitumor activity of hot water extract of dandelion, *Taraxacum officinale*: correlation between antitumor activity and timing of administration, *Yakugaku Asshi*. 101(6). 538-543.

- Bisset, N.G. 1994. *Taraxaci radicum herba*. In: *Herbal Drugs and Phytopharmaceuticals: A Handbook for Practice in Scientific Basis* CRC Press, Boca Raton, FL, pp. 486-489.
- Brand-Williams, W., Cuvelier, M.E., Berset, C. 1995. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *Food Science and Technology*. 28(1): 25-30.
- Bone, K. 2003. A clinical guide to blending liquid herbs. *Herbal Formulations for the individual patients*. Churchill Livingstone, Elsevier, Missouri.
- Budzianowski, J. 1997. Coumarins, caffeoyltartaric acids and their artefactual methyl esters from *Taraxacum officinale* leaves. *Planta Medica*. 63: 288.
- Hu, C., Kitts, D.D. 2005. Dandelion (*Taraxacum officinale*) flower extract suppresses both reactive oxygen species and nitric oxide and prevents lipid oxidation in vitro. *Phytomedicine*. 12: 588-597.
- Jeon, H.J., Kang, H.J., Jung, H.J., Kang, Y.S., Lim, C.J., Kim, Y.M., Park, E.H. 2008. Anti-inflammatory activity of *Taraxacum officinale*. *Journal of Ethnopharmacology*. 115(1): 82-88.
- Koç, B., Kaymak Ertekin, F. 2010. Yanıt yüzey yöntemi ve gıda işleme uygulamaları. *Gıda*, 35(1): 63-70.
- Leung, A.Y., Foster, S. 1996. Dandelion root. In: *Encyclopedia of Common Natural Ingredients Used in Food, Drugs and Cosmetics*, second ed. John Wiley & Sons, New York, pp. 205-207.
- Ma, T., Wang, Q.H., Wu, H. 2010. Optimization of extraction conditions for improving solubility of peanut protein concentrates by response surface methodology. *LWT-Food Science and Technology*. 43(9): 1450-1455.
- Moreno, C.S., Larrauri, J.A., Calixto, F.S. 1998. A procedure to measure the antiradical efficiency of polyphenols. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 76: 270-276.
- Myers, R., Montgomery, D.C. 2002. *Response Surface Methodology: Process and Product Optimization Using Designed Experiments*. 2nd Edition, John Wiley and Sons, New York, USA, 798 s.
- Olech, M., Nowak, R., Los, R., Rzymowska, J., Malm, A., Chrusciel, K. 2012. Biological activity and composition of teas and tinctures prepared from *Rosa rugosa* Thunb. *Open Life Science*. 7(1): 172-182
- Park, C.M., Youn, H.J., Chang, H.K., Song, Y.S. 2010. TOP1 and 2, polysaccharides from *Taraxacum officinale*, attenuate CCL₄-

- induced hepatic damage through the modulation of NF- κ B and its regulatory mediators. *Food and Chemical Toxicology*. 48: 1255-1261.
- Rivera-Nunez, D. 1991. *Taraxacum vulgare* (Lam.) Schrank *T. officinale* Weber. In: Aritio, L.B. (Ed.), *La guía de incafo de las plantas utiles y venenosas de la Península Iberica y Baleares (excluidas medicinales)*. Incafo, Madrid, pp. 1024-1026.
- Sengul, M., Yıldız, H., Gungor, N., Cetin, B., Eser, Z., Ercisli, S. 2009. Total phenolic content, antioxidant and antimicrobial activities of some medicinal plants. *Pakistan Journal of Pharmaceutical Sciences*. 22(1): 102-106.
- Sheng, Z.L., Wan, P.F., Dong, C.L., Li, Y.H. 2013. Optimization of total flavonoids content extracted from *Flos populi* using response surface methodology. *Industrial Crops and Products*. 43(1): 778-786.
- Singleton, V.L. Rossi Jr., J.A. 1965. Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. *American Journal of Enology and Viticulture*. 16: 144-158.
- Sun, Z., Su, R., Qiao, J., Zhao, Z., Wang, X. 2014. Flavonoids extraction from *Taraxacum officinale* (dandelion): Optimization using response surface methodology and antioxidant activity. *Journal of Chemistry*. <http://dx.doi.org/10.1155/2014/956278>.
- Tahtamouni, L.H., Alqurna, N.M., Al-Hudhud, M.Y., Al-Hajj, H.A. 2011. Dandelion (*Taraxacum officinale*) decreases male rat fertility *in vivo*. *Journal of Ethnopharmacology*. 135(1): 102-109.
- Tang, H., Choi, Y.H. 2013. Optimum extraction of bioactive Alkaloid compounds from *Rhizome coptidis* (Coptis Chinese Franch.) using response surface methodology. *Solvent Extraction Research and Development*. 20: 91-104.
- You, Y., Yoo, S., Yoon, H.G., Park, J., Lee, H.Y., Kim, S., Oh, K.T., Lee, J., Cho, H.Y., Jun, W. 2010. *In vitro* and *in vivo* hepatoprotective effects of the aqueous extract from *Taraxacum officinale* (dandelion) root against alcohol-induced oxidative stress. *Food and Chemical Toxicology*. 48(6): 1632-1637.
- Wang X.S., Wu, Y.F., Chen, G.Y., Yue, W., Liang, Q.L., Wu, Q.N. 2013. Optimization of ultrasound assisted extraction of phenolic compounds from *Sparganii rhizoma* with response surface methodology. *Ultrasonics Sonochemistry*. 20(3): 846-854.
- Williams, C.A., Goldstone, F., Greenham, J. 1996. Flavonoids, cinnamic acids and coumarins from the different tissues and medicinal preparations of *Taraxacum officinale*. *Phytochemistry*. 42: 121-127.