

***Medicago sativa* Bitkisinin Antioksidan Kapasitesinin Belirlenmesi**

Deniz İRTEM KARTAL^{1*}, Oktay ŞAYAK¹

¹Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü, Van Yüzüncü Yıl Üniversitesi, Van, Türkiye
*e-mail: denizirtem@gmail.com

Geliş tarihi/Received:21/01/2020

Kabul tarihi/Accepted:12/02/2020

Özet

Tıbbi ve aromatik bitkilerin çok eskiden beridir çeşitli alanlarda tedavi ve gıda amaçlı kullanımları oldukça yaygındır. Tıbbi ve aromatik bitkiler sağlığı sürdürmek ve vücutta oluşan hastalıkları iyileştirmek için ilaç olarak kullanılan bitkilerdir. Bu bitkilerde fitokimyasal bileşikler yaygın olarak bulunmaktadır. Aromatik bitkilerin yapılarında buldukları bu bileşikler bitkinin antioksidan aktiviteye sahip olduğunu göstermektedir. Bu aromatik bitkilerin ülkemiz florasında oldukça fazla bulunması kullanımlarının da gün geçtikçe artmasını sağlamaktadır. Antioksidan etki gösteren fitokimyasal bileşikler en çok bitkinin yaprak ve çiçek kısımlarında bulunurlar. Bu çalışmada kullanılan *Medicago sativa* tıbbi ve aromatik bir bitki olup zengin fitokimyasal içeriği ile halk arasında tedavi edici ve gıda olarak oldukça sık kullanılmaktadır. Bunun yanı sıra yüksek protein içeriğinden dolayı yem bitkisi olarak da bu türden faydalanılmaktadır. *M. sativa* bitkisinin çiçek, gövde ve yaprak bölümlerinin su ekstraktları alınarak antioksidan aktiviteleri araştırılmıştır. Antioksidan aktiviteleri yapılan toplam fenol ve toplam flavonoid metodları ile değerlendirilmiştir. Yapılan analizler sonucunda en yüksek fenolik bileşik içeriği bitkinin gövdesinde 274.752 mg GAE/g olarak saptanmıştır. En yüksek toplam flavonoid içeriği kateşin eş değerine göre bitkinin yaprağında 76.553 mg KE/g kuru ekstre iken, kuersetin eş değerine göre bitkinin yaprağında 453.340 mg QE/g kuru ekstre olarak belirlenmiştir.

Anahtar kelimeler: *Medicago sativa*, Toplam fenol, Toplam flavonoid, Aromatik bitki, Antioksidan aktivite

Determination of Antioxidant Capacity of *Medicago sativa*

Abstract

Medicinal and aromatic plants have been used for treatment and food in various fields since ancient times. These plants are used as medicines for protection and treatment of diseases. Phytochemical compounds are commonly found in aromatic plants and these compounds in the structure of aromatic plants indicate that the plant has antioxidant activity. As the flora of our country are rich in these aromatic plants use of the plants is increasing day by day. Phytochemical compounds exhibiting antioxidant effect are mostly found in the leaves and flower parts of the plant. *Medicago sativa* is a medicinal and aromatic plant with rich phytochemical content and is widely used as a therapeutic plant and as a food by local community. In addition it is used as forage plant due to its high protein content. antioxidant activities were observed in Water extracts of plant parts of *M. sativa*. Antioxidant activities were evaluated using total phenol and total flavonoid methods. The highest phenolic compound content was 274.752 mg GAE/g of dried extract in the body. While the highest total flavonoid content was 76.553 mg KE/g dried extract on the leaf of the plant according to catechin equivalent and 453.340 mg QE/g dried extract on the leaf of the plant according to equivalent of quercetin.

Key words : *Medicago sativa*, Total phenol, Total flavonoid, Medicinal plant, Antioxidant activity

Giriş

Tıbbi ve aromatik bitkiler çok eskilerden beridir gıda, ilaç ve tedavi amacıyla insanlar tarafından fazlaca kullanılmaktadır. Tıbbi ve aromatik bitkiler farklı alanlarda da kullanılabilir olması bu ürünlere olan talebi artırmış ve gün geçtikçe tıbbi bitkilerin kullanımı da yaygınlaşmıştır (Kumar, 2009).

Tıbbi ve aromatik bitkiler öncelikle hastalıkları iyileştirmek, önlemek ve sağlığı sürdürmek için ilaç olarak kullanılan bitkilerdir. Bu bitkiler gıda, kozmetik gibi alanlarda değerlendirilmesinin yanı sıra güzel koku ve tatları olmasından ötürü de oldukça kullanılmaktadır (Anonim, 2005). İnsan sağlığına yararlı olan bitkilerin tedavi edici özellikleri olduğundan bitkisel ilaç yapımında faydalanılmaktadır. Ülkemizin florasına bakıldığında tıbbi olarak kullanılan bitkilerin sayısı tam olarak bilinmezken, yaklaşık 500 kadar tıbbi bitkinin olduğu varsayılmaktadır (Baytop, 1999; Ekim ve ark. 2000; Aydın, 2004).

Ülkemizin coğrafi konumu, geniş yüzölçümü, iklimi ve bitki çeşitliliği ile tıbbi aromatik bitkilerin bolca bulunduğu bir ülkedir. Gelişmiş ülkelerde kullanılan bitkisel ilaçlar katkı maddeleri ve kozmetik alanlarında kullanılan birçok bitki ülkemizin florasından çıkmıştır (Bayram ve ark. 2010). Aromatik bitkilerin yapılarında buldukları fenolik bileşikler bitkinin antioksidan aktivitesi olduğunu göstermektedir (Skerget ve ark. 2005). Bu bileşiklerin en çok bulunanları flavonoidler, fenolik asitler ve fenolik terpenlerdir (Javanmardi ve ark. 2003).

Antioksidan aktivite gösteren fenolik bileşiklerin vücutta oluşan serbest radikalleri temizleme, engelleme ve azaltıcı gibi özellikleri vardır. Fenolik bileşikler biyomoleküllerin serbest radikaller tarafından okside olmalarını engellemektedirler (Burda ve ark. 2001).

Fenolik bileşikler ve flavonoidler en çok bitkinin çiçek ve yaprak kısımlarında bulunmaktadır (Kähkönen ve ark. 1999). Aromatik bitkilerin antioksidan kapasiteleri bazı etmenlere bağlı olarak kimyasal yapılarındaki değişimler sonucu değişebilmektedir (Akgül ve Ayar. 1993; Javanmardi ve ark. 2003). Aromatik bitkilerin antioksidan aktivitesi yapısındaki bileşiklerden ve sekonder metabolitlerden kaynaklanmaktadır. Bu bitkilerdeki sekonder metabolitlerin sayısı (morfogenetik, ontogenetik, diurnal, ekolojik faktörler ve genom farklılıkları) değişmektedir (Ceylan, 1995).

Ülkemiz bitki çeşitliliği bakımından önemli bir potansiyele sahiptir. Bu potansiyelin bilimsel çalışmalara temel oluşturması açısından doğru bir şekilde değerlendirilmesi gerekir. Bu bitkilerin özellikle çeşitli hastalıklarda tedavi edici etkilerinin bilimsel yöntemlerle ispatlanması elbette hayati bir öneme sahiptir.

Medicago sativa Leguminosae familyasına ait bir yem bitkisidir. Yaygın olarak Akdeniz ülkelerinde yetişen ve diğer bir yandan sert kış koşullarına uyum sağlayabilen çok yıllık otsu bitkilerdir (Cocks, 2003; Farag ve ark. 2007). Hayvanlarda yem olarak çokça kullanılan *Medicago* türlerinin etken madde olarak yüksek oranda faydalı bileşenleri içeren ve protein içerikleri bakımından oldukça değerli bitkilerdir (Yildiz, 2005). *Medicago* türlerinin içerisindeki protein yoğunluğundan dolayı insanlar çeşitli şekillerde (salata, çorba, ve çay) yararlanmaktadırlar (Facciola, 1990; Koschuh ve ark. 2004).

İnsanlar birçok hastalığa karşı immün sistemi koruması için bitkideki fitokimyasallardan yararlanmaktadır. Bu fitokimyasallar lignanlar, izoflavonlar, kümestan olarak tanımlanmıştır (Jacobs ve ark. 2009). *Medicago* türlerinde en fazla bulunan fitokimyasal izoflavondur ve bu fitokimyasal madde antimikrobiyal ve

antifungal özellikleriyle tıpta çokça kullanılmaktadır (Javid ve ark. 2015). Pek çok hastalığın (bazı kanser türleri, koroner, osteoporoz, anemi, diabet, ülser) etkisini azaltan yanı sıra kolesterol seviyesinin artmasını önleyici rolü vardır (Jian, 2009; Wu ve ark. 2008; Sabudak ve Guler. 2009; Mortensen ve ark. 2009). Selvan ve ark. (2014) yaptıkları çalışma ile *M. sativa* türünün anksiyolitik aktivite gösterdiğini tespit etmişlerdir. Aneta Krakowska ve ark. (2018) yaptığı çalışma da *M. sativa* yapraklarının antioksidan özellik taşıdığını ve HPLC-MS/MS karakterizasyonu sonucu çokça fenolik bileşik tanımlandığı kanıtlamışlardır. *M. sativa* alkol ekstralarında yapılan (lipid peroksidasyonu, DPPH, ABTS) antioksidan kapasitelerine bakılmış ve antioksidan aktivite gösterdikleri belirlenmiştir (M.G. Rana ve ark. 2010). *M. sativa* bitkisinin antidiabetik, anti-inflamatuar ve antioksidan etkilerinin olduğu yapılan çalışma ile ortaya konmuştur (Kundan Singh Bora ve ark. 2010). *M. rigidula* türü üzerinde yapılan çalışma da bitkinin metanol ekstralarının antioksidan kapasitesi, fenolik bileşimi ve enzim inhibisyonu aktivitesi çalışılmış yapılan araştırmalar neticesinde bitkinin güçlü bir antioksidan ve enzim inhibisyon kapasitesine sahip olduğu tanımlanmış olup bu türün gıda ve ilaç sektöründe hammadde olarak kullanılabilmesi öne sürülmüştür (Çakmak ve ark. 2017).

Materyal ve Yöntem

Bitkisel Örneklerin Toplanması

Çalışmada kullanılan bitki örnekleri Van Yüzüncü Yıl Üniversitesi Kampüsünden toplanarak Fen Fakültesi, Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü araştırma laboratuvarında incelenmiştir. Bitki teşhisi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü Öğretim üyelerinden Dr. Öğretim Üyesi Fazlı ÖZTÜRK tarafından yapılmıştır.

Ekstraksiyon (*M. sativa*)

İlk olarak bu cins içerisindeki türler üzerinde yapılan diğer çalışmalardan yola çıkılarak hangi yöntemlerin yapıldığı belirlenmiştir.

M. sativa bitkisinin gövde, yaprak ve çiçek bölümleri direkt güneş ışığına maruz bırakılmadan ayrı ayrı kurutulup, öğütülerek toz hale getirilmiştir. Örnekler hassas terazide 5'er gr tartılmış üzerine 75 mL hekzan konularak 40°C'de 8 saat süreyle ısıtıcı manyetik karıştırıcıda bırakılmıştır. Örneklerden hekzan süzülmesi ve tüpte kalan bitki örneklerinin üzerine 75 mL etanol eklenerek 48 saat inkubasyona bırakılmıştır. 48 saat sonunda etanol süzülmesi ve etanol uçması sağlandıktan sonra bitki örneklerinin üzerine 100 mL su eklenmiş 48 saat inkübe edilmiştir. Karışımdan su süzülmesi 50 mL'lik falcon tüplere alındıktan sonra 45° lik açı ile -80°C de 1 gece kalacak şekilde konulmuştur. Örnekler -80 °C den çıkarıldıktan sonra liyofilizatörde 72 saat bekletilerek su uzaklaştırılmıştır. Elde edilen ekstratlar analizler yapılncaya kadar -20°C'de saklanmıştır. Kurutulan örneklerin verimliliği Formül 1'e göre hesaplanmıştır.

Formül 1:

$$\text{Ekstraksiyon yüzdesi(w/w)} = (\text{kurutulmuş ekstrenin kütlesi}) / (\text{toplam örnek kütlesi}) \times 100$$

Toplam Fenol Kapasitesi

Toplam fenol kapasitesinin belirlenmesi için Singleton ve ark. (1999) Folin-Ciocalteu metodunun modifiye şekli kullanılmıştır. Standart olarak Gallik Asit kullanılmıştır. GA standart grafiği Şekil 1’de verilmiştir. Örneklerin absorbansları 750 nm de okunmuştur. Standart grafiğe göre hesaplamalar Formül 2’ye göre yapılmıştır. Bitkinin fenol içeriği 0.25-0.5-1 mg/mL konsantrasyonlarda 3 tekrar ve n;5 değer elde edilmiştir.

Formül 2:

$$\text{Ekstre yüzdesi(w/w)} = \left(\frac{(A_1 - A_0) / y \text{ değeri}}{\text{konsantrasyon}} \right) \times 100$$

(A₀: Kontrolün absorbansı, A₁: Ekstrenin absorbansı, y değeri: Grafik de denklemde oluşan y değeri)

Toplam Flavonoid İçeriği

Flavonoid içeriği Zhishen ve ark. (1999) yaptığı çalışma baz alınarak yapılmıştır. Standart olarak Kuersetin ve Kateşin kullanılmıştır. Sırasıyla 415 ve 510 nm de ölçümler alınmıştır. Kateşin ve kuersetin standart grafikleri Şekil 2 ve 3’de verilmiştir. Standart grafiklere göre hesaplamalar Formül 3’e göre yapılmıştır. Bitkinin flavonoid içeriği 0.25-0.5-1 mg/mL konsantrasyonlarda 3 tekrar ve n;5 değer elde edilmiştir.

Formül 3:

$$\text{Ekstre yüzdesi(w/w)} = \left(\frac{(A_1 - A_0) / y \text{ değeri}}{\text{konsantrasyon}} \right) \times 100$$

(A₀: Kontrolün absorbansı, A₁: Ekstrenin absorbansı, y değeri: Grafik de denklemde oluşan y değeri)

İstatistiksel Analiz

M. sativa toplam fenol ve flavonoid içerikleri tek yönlü varyans analizi (ANOVA) testi ve student t-test uygulanarak *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001, ****p<0.0001 değeri kullanılarak analiz edildi. p<0.05 istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

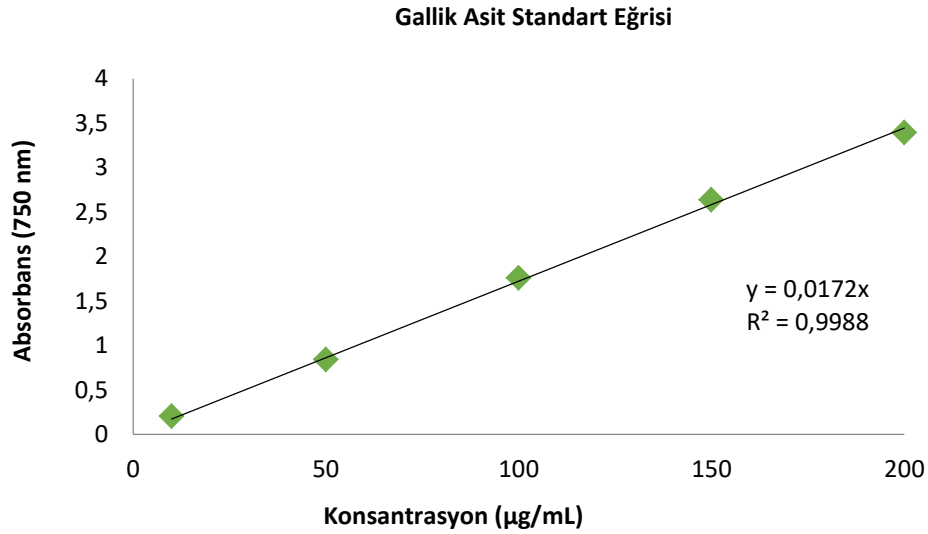
Bulgular ve Tartışma

Yapılan çalışmada *M. sativa* bitkisinin çeşitli organları; çiçek, yaprak ve gövde ayrıştırılarak elde edilen su ekstralarının antioksidan aktivitelerine bakılmıştır. Su ekstre verimleri Tablo 1’de verilmiştir. *M. sativa* 'nın çiçek, yaprak ve gövde kısımlarının antioksidan aktiviteleri toplam fenol ve flavonoid metodları kullanılarak araştırılmıştır.

Tablo 1. *M. sativa* su ekstralarının verimlilikleri

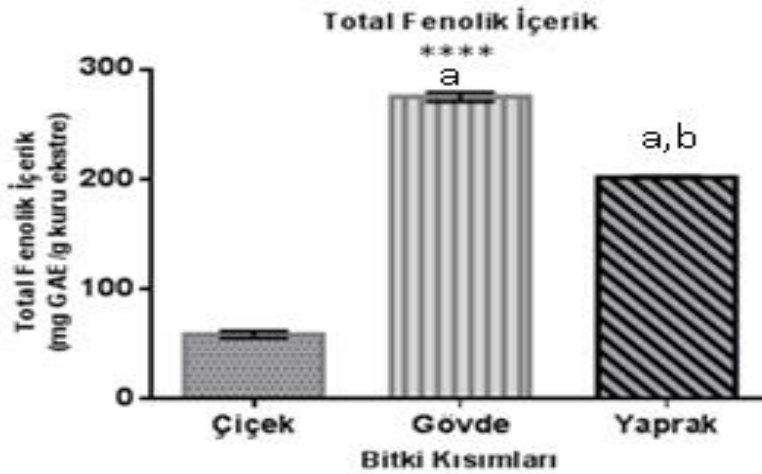
<i>Medicago sativa</i> bölümleri	Çiçek	Gövde	Yaprak
Verim (%)	0.998	1.018	1.005

Toplam fenol içeriğinin belirlenmesi için Gallik Asit standart olarak kullanılmıştır. Gallik Asit Standart Eğrisi Şekil 1’de verilmiştir.



Şekil 1. Gallik Asit Standart Eğrisi, Deneyle 3 tekrar olacak şekilde çalışıldı.

M. sativa bitkisinin toplam fenolik içeriği 3 ayrı konsantrasyona göre hesaplanmıştır. Bitki kısımlarından elde edilen sonuçlar Şekil 2’de verilmiştir.



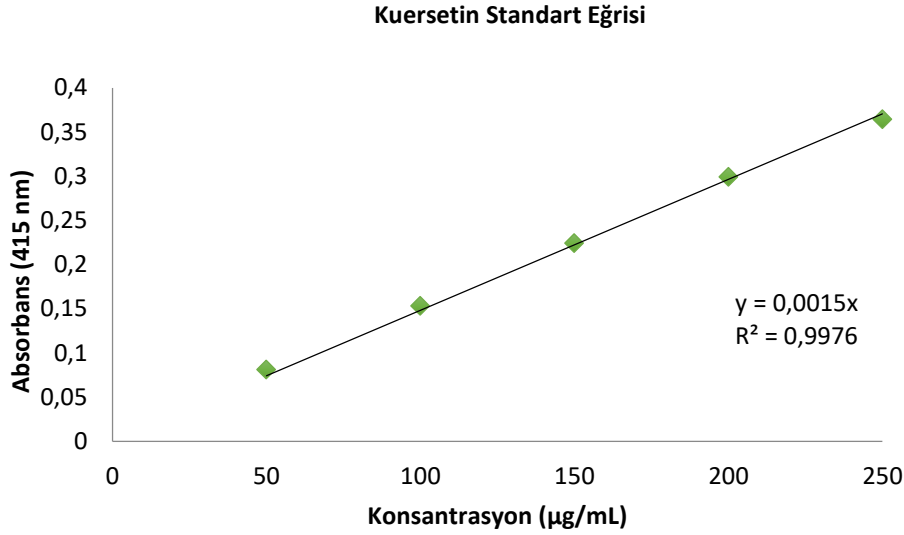
Şekil 2. *M.sativa* bitkisinin toplam fenol içeriği.

Her parametre 3 ayrı deneyden alınan 5’li ölçümlerin ortalamasıdır. ****p<0.0001. Değerler ± S.E.M olarak gösterildi. Çiçeğe ait parametre baz alınarak a; çiçeğe göre %95 anlamlılığı ifade eder. b; yaprağa göre %95 anlamlılığı ifade eder.

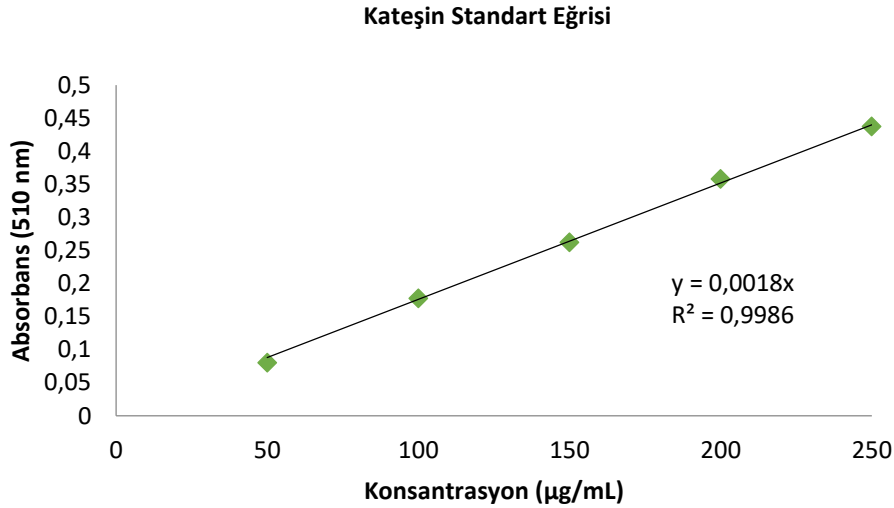
İkili yapılan unpaired t-testine göre bütün istatistiksel analiz sonuçları istatistiksel olarak anlamlı bir fark olduğunu göstermiştir.

Çakmak ve arkadaşları (2017) yaptıkları çalışmada *M. rigidula*'nın fenol ve flavonoid içeriklerine bakmışlardır. *M. rigidula*'nın fenol içeriği 79.61 mg GAE/g olarak bulunmuşken flavonoid içeriği 27.38 mg QE/g bulunmuştur. En yoğun olarak bulunan fenolik bileşik 215.75 mg ile kateşin olmuştur.

Toplam flavonoid içeriğinin belirlenmesi için standart olarak Kateşin ve Kuersetin kullanılmış ve standart eğrileri çıkartılmıştır. Şekil 3 ve 4'te sırası ile Kateşin ve Kuersetin standart eğrileri verilmiştir.



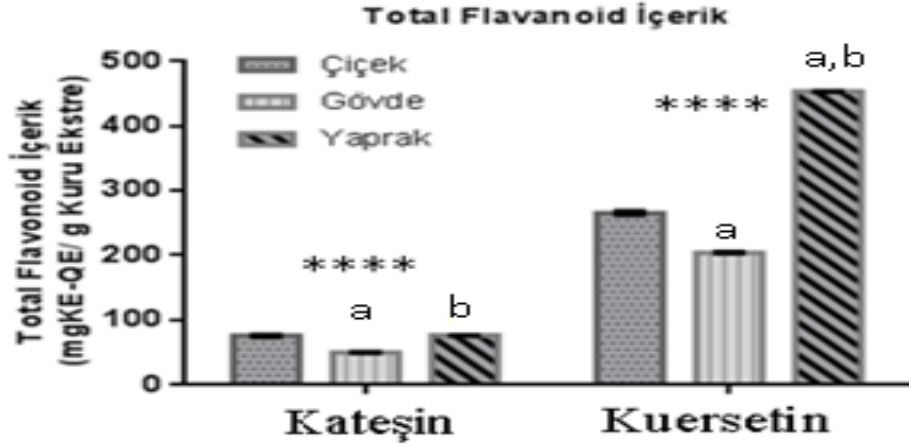
Şekil 3. Kuersetin Standart Eğrisi, Deneyle 3 tekrar olacak şekilde çalışıldı.



Şekil 4. Kateşin Standart Eğrisi, Deneyle 3 tekrar olacak şekilde çalışıldı.

M. sativa bitkisinin toplam flavonoid içerikleri 3 ayrı konsantrasyona göre hesaplanmıştır. Bitki kısımlarından elde edilen sonuçlar Şekil 5'de verilmiştir.

Yapılan bir diğer çalışmada *M.sativa* etanol ekstralarının 10 mg/mL konsantrasyonda toplam antioksidan kapasitesine bakılmış ve askorbik asit eş değeri 91.0 µg/mL ulaştığı belirlenmiştir (Kicel ve Olszewska, 2015). Bir başka çalışma da ise *Medicago lupulina*'dan farklı ekstralar alınmış ve içerdiği fenolik bileşik miktarları araştırılmış ve fenolik içeriklerinin 6.6 -162.4 mg GAE/g değerleri arasında olduğu belirlenmiştir (Rana ve ark. 2010).



Şekil 5. *M.sativa* bitkisinin toplam flavonoid içeriği.

Her parametre 3 ayrı deneyden alınan 5'li ölçümlerin ortalamasıdır. ****p<0.0001. Değerler ± S.E.M olarak gösterildi. Çiçeğe ait parametre baz alınarak a; çiçeğe göre %95 anlamlılığı ifade eder. b; yaprağa göre %95 anlamlılığı ifade eder.

İkili yapılan unpaired t-testine göre istatistiksel analiz sonucu a-b kateşin eş değerine göre farklı bulunmamıştır. Diğer bütün sonuçlar istatistiksel olarak anlamlı bir fark olduğunu göstermiştir.

Bu çalışmada *M. sativa* bitkisinin çeşitli bölümlerinden elde edilen toplam fenolik ve flavonoid sonuçları Tablo 2'de verilmiştir. Toplam fenolik içerik en yüksek bitki gövdesinde 274,752 mg GAE/g kuru ekstre olarak bulunmuşken en düşük total flavonoid içerik gövde de 50,233 mg KE/g kuru ekstre; 204,470 QE/g kuru ekstre olarak bulunmuştur. Yaprığın flavonoid içeriği kuersetin eş değerine göre diğer bitki bölümlerinin yaklaşık 2 katı bulunmuştur.

Tablo 2. *M. sativa* bitki bölümlerinin total fenol ve flavonoid içerikleri

M.sativa Bitki Bölümleri		Çiçek	Gövde	Yaprak
		(mg/g kuru ekstre) n;5	(mg/g kuru ekstre) n;5	(mg/g kuru ekstre) n;5
Total Fenolik İçerik (Gallik Asit)		58.094 ± 1.4	274.752 ± 1.8 ^a	201.291 ± 0.40 ^{a,b}
Total Flavonoid İçerik	Kateşin	76.003 ± 0.84	50.233 ± 1.1 ^a	76.553 ± 0.82 ^b
	Kuersetin	265.777 ± 1.7	204.470 ± 1.3 ^a	453.340 ± 0.81 ^{a,b}

(a; çiçeğe göre %95 anlamlılığı ifade eder. b; yaprağa göre %95 anlamlılığı ifade eder.)

Sonuçlar

Medicago türleri üzerinde yapılan çalışmalar neticesinde bu türün daha çok hayvancılık yapılan bölgelerde hayvanlara temel besin kaynağı olarak kullanıldığı tespit edilmiştir. Bu türler içeriğindeki yüksek protein miktarı bakımından insanlar tarafından da diyet amaçlı kullanılmaya başlanmıştır. Bu yüksek protein içeriğinden yola çıkılarak yapılarındaki bileşikler tespit edilmiş ve bu bileşikler insan sağlığına olan etkileri yapılan antioksidan ve antiinflamatuvar çalışmalar ile belirlenmiştir. Antioksidan aktivitelerine bakılan bu türlerde bazılarının yüksek antioksidan kaynağı olduğu birçok araştırmacı tarafından bulunmuştur. *Medicago* türlerinin bazı metabolik hastalıklarda rol alan enzimlerin vücutta oluşabilecek risklere karşı enzimleri inhibe edebilme özelliğinin olduğu araştırılmıştır.

Bu çalışmamızda *M. sativa* türünün halk tarafından tedavi amaçlı çokca kullanıldığı görülmüştür. Antioksidan kaynağın insanlar için ne denli önemli olduğu aşikardır. Bundan esinlenerek *M. sativa* 'nın antioksidan aktivitelerine bakılmış olup veriler grafikler ile desteklenmiştir. Yaptığımız çalışmalar göstermektedir ki *M. sativa* bitkisi yüksek antioksidan özelliğindedir.

İleri çalışmalarla bu türün ilaç ve kozmetik gibi diğer sanayi dallarında da kullanılması desteklenebilir. Bu türün bazı metabolik hastalıklar ve cilt hastalıklarında tedavi amaçlı kullanılması için ön ilaç olarak işlenip tıbbi bir ürün olarak kullanımı yaygınlaştırılabilir.

Teşekkür

Yüzüncü Yıl Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü Öğretim Üyelerinden Dr. Fazlı Öztürk'e bitki teşhisindeki yardımlarından dolayı teşekkür ederiz.

Yüzüncü Yıl Üniversitesi Fen Fakültesi Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü 2018-2019 yılı mezunlarından Rojbin Kara'ya bitki eldesi ve ekstraksiyon işlemlerindeki katkılarından dolayı teşekkür ederiz.

Kaynaklar

- Akgül, A., Ayar, A. (1993). Yerli Baharatların Antioksidan Etkileri. *J. Agric. For*, 17, 1061-1069.
- Anonim, (2005). Medicinal And Aromatic Plants Working Group-ECP/GR.
- Aydın, S. (2004). Anadolu Diyagonali: Ekolojik Kesinti Tarihsel-Kültürel Bir Farklılığa İşaret Edebilir Mi. *Kebikeç İnsan Bilimleri İçin Kaynak Araştırmaları Dergisi*, 17, 117-137.
- Bayram, E., Kırıcı, S., Tansı, S., Yılmaz, G., Kızıl, O. A. S., & Telci, İ. (2010). Tıbbi Ve Aromatik Bitkiler Üretiminin Arttırılması Olanakları. *Tmmob Ziraat Mühendisleri Odası, Ziraat Mühendisliği Vü. Teknik Kongresi*, 11-5.
- Baytop, T. (1999). *Türkiye'de Bitkilerle Tedavi*, Nobel Tıp Kitapevleri Yayını, 2. Baskı, 480s, İstanbul.
- Bora, K. S., & Sharma, A. (2011). Evaluation Of Antioxidant And Cerebroprotective Effect Of *Medicago Sativa* Linn. Against Ischemia And Reperfusion Insult. *Evidence-Based Complementary And Alternative Medicine*, 2011.
- Burda, S., & Oleszek, W. (2001). Antioxidant And Antiradical Activities Of Flavonoids. *Journal Of Agricultural And Food Chemistry*, 49(6), 2774-2779.
- Ceylan, A. (1995). *Tıbbi Bitkiler I*. . E. Ü. Zir. Fak. Yayın No:312.

- Cocks, P. S. (2003). The Adaptation Of Perennial Legumes To Mediterranean Conditions. In *New Perennial Legumes For Sustainable Agriculture* (Pp. 35-54). UWA Publishing.
- Çakmak, Y. S., Zengin, G., Eskin, B., Yıldırım, K., Topal, M., Aydın, G. H., ... & Erten, K. (2017). Medicago Rigidula (L.) ALL.'Nın Antioksidan Ve Enzim İnhibisyon Aktiviteleri Ve Fenolik Bileşiminin İncelenmesi. *Marmara Pharm. J*, 21(3), 522-529.
- Ekim, T., Koyuncu, M., Vural, M., Duman, H., Aytaç, Z., Adiguzel, N. (2000). Türkiye Bitkileri Kırmızı Kitabı (Egrelti Ve Tohumlu Bitkiler).
- Facciola, S. (1990). *Cornucopia: A Source Book Of Edible Plants* (No. BOOK). Kampong Publications.
- Farang, M. A., Huhman, D. V., Lei, Z., Sumner, L. W. (2007). Metabolic Profiling And Systematic Identification Of Flavonoids And Isoflavonoids In Roots And Cell Suspension Cultures Of Medicago Truncatula Using HPLC–UV–ESI–MS And GC–MS. *Phytochemistry*, 68(3), 342-354.
- Hanif MA, Al-Maskari AY, Al-Sabahi JN, Al-Hdhami I, Khan MM, Al-Azkawi A, Hussain AI. (2015). Chemical Characterisation Of Bioactive Compounds In *Medicago Sativa* Growing In The Desert Of Oman. *Nat Prod Res*, 29: 2332-5.
- Jacobs, A., Wegewitz, U., Sommerfeld, C., Grossklaus, R., & Lampen, A. (2009). Efficacy Of Isoflavones In Relieving Vasomotor Menopausal Symptoms—A Systematic Review. *Molecular Nutrition & Food Research*, 53(9), 1084-1097.
- Javanmardi, J., Stushnoff, C., Locke, E., & Vivanco, J. M. (2003). Antioxidant Activity And Total Phenolic Content Of Iranian Ocimum Accessions. *Food Chemistry*, 83(4), 547-550.
- Javid, T., Adnan, M., Tariq, A., Akhtar, B., Ullah, R., & El Salam, N. A. (2015). Antimicrobial activity of three medicinal plants (*Artemisia indica*, *Medicago falcata* and *Tecoma stans*). *African Journal of Traditional, Complementary and Alternative Medicines*, 12(3), 91-96.
- Jian, L. (2009). Soy, isoflavones, and prostate cancer. *Molecular nutrition & food research*, 53(2), 217-226.
- Kähkönen, M. P., Hopia, A. I., Vuorela, H. J., Rauha, J. P., Pihlaja, K., Kujala, T. S., & Heinonen, M. (1999). Antioxidant Activity Of Plant Extracts Containing Phenolic Compounds. *Journal Of Agricultural And Food Chemistry*, 47(10), 3954-3962.
- Kicel, A. ve Olszewska, MA (2015). Medicago lupulina hava parçalarının ham ekstraktında ve kuru fraksiyonlarında antioksidan aktivitenin değerlendirilmesi ve flavonoidlerin, saponinlerin ve fenollerin kantitatif tahmini. *Doğal ürün iletişimi*, 10 (3), 1934578X1501000326.
- Koschuh, W., Povoden, G., Thang, V. H., Kromus, S., Kulbe, K. D., Novalin, S., & Krottscheck, C. (2004). Production Of Leaf Protein Concentrate From Ryegrass (*Lolium Perenne X Multiflorum*) And Alfalfa (*Medicago Sativa* Subsp. *Sativa*). Comparison Between Heat Coagulation/Centrifugation And Ultrafiltration. *Desalination*, 163(1-3), 253-259.
- Krakowska, A., Rafińska, K., Walczak, J., & Buszewski, B. (2018). Enzyme-Assisted Optimized Supercritical Fluid Extraction To Improve Medicago Sativa Polyphenolics Isolation. *Industrial Crops And Products*, 124, 931-940.
- Kumar, S. A. (2009). Plants-Based Medicines In India. Retrieved In February, 15, 2013.

- Mortensen, A., Kulling, S. E., Schwartz, H., Rowland, I., Ruefer, C. E., Rimbach, G., ... & Kramer Birkved, F. (2009). Analytical and compositional aspects of isoflavones in food and their biological effects. *Molecular nutrition & food research*, 53(S2), S266-S309.
- Pan, W. C. (2015). Main composition of alfalfa and its application in animal husbandry. *J. Tradit. Chin. Vet. Med*, 34, 73-77.
- Rana, M. G., Katbamna, R. V., Padhya, A. A., Dudhrejiya, A. D., Jivani, N. P., & Sheth, N. R. (2010). In Vitro Antioxidant And Free Radical Scavenging Studies Of Alcoholic Extract of *Medicago Sativa* L. *Romanian Journal Of Biology-Plant Biology*, 55(1), 15-22.
- Sabudak, T., & Guler, N. (2009). Trifolium L.–a review on its phytochemical and pharmacological profile. *Phytotherapy Research: An International Journal Devoted to Pharmacological and Toxicological Evaluation of Natural Product Derivatives*, 23(3), 439-446.
- Selvan, A. T., Prithvi, S., Suthakaran, S., Ravali, R., Kumar, G. M., & Ravali, R. (2014). Anxiolytic Effect Of Medicine Of *Medicago Sativa* Seeds Extract On Rodents. *Indo Am. J. Pharm. Res*, 4, 406-415.
- Singleton, V. L., Orthofer, R., Lamuela-Raventós, R. M. (1999). Analysis Of Total Phenols And Other Oxidation Substrates And Antioxidants By Means Of Folin-Ciocalteu Reagent. *Methods In Enzymology*. P. Lester, Academic Press. Vol. 299, Pp. 152-178.
- Škerget, M., Kotnik, P., Hadolin, M., Hraš, A. R., Simonič, M., & Knez, Ž. (2005). Phenols, Proanthocyanidins, Flavones And Flavonols In Some Plant Materials And Their Antioxidant Activities. *Food Chemistry*, 89(2), 191-198.
- Yildiz, F. (2005). *Phytoestrogens In Functional Foods*. CRC Press.
- Zhishen, J., Mengcheng, T., & Jianming, W. (1999). The Determination Of Flavonoid Contents In Mulberry And Their Scavenging Effects On Superoxide Radicals. *Food Chemistry*, 64(4), 555-559.
- Wu, J., & Muir, A. D. (2008). Isoflavone content and its potential contribution to the antihypertensive activity in soybean angiotensin I converting enzyme inhibitory peptides. *Journal of agricultural and food chemistry*, 56(21), 9899-9904.