

## Research on the Antioxidant Efficiency of Black Seed Essential Oil Using by *in vitro* Method\*

Gülcan AVCI<sup>1,a</sup>, Barış DENK<sup>1,b</sup>, Aziz BÜLBÜL<sup>2,c</sup>

<sup>1</sup>Department of Biochemistry, Faculty of Veterinary Medicine, University of Afyon Kocatepe, Afyonkarahisar, TURKEY

<sup>2</sup> Department of Physiology, Faculty of Milas Veterinary Medicine, University of Muğla Sıtkı Kocman, Muğla, TURKEY

ORCIDs: <sup>a</sup> 0000-0001-8767-4507; <sup>b</sup> 0000-0002-7586-0895; <sup>c</sup> 0000-0003-0995-3986

### ABSTRACT

Medicinal plants such as black seed have antioxidant properties due to their essential oils. In this study, antioxidant property of particular black seed (*Nigella sativa* L.) essential oil containing many bioactive substances such as thymoquinone, dithymoquinone, timol, nigellon, carvacrol was investigated *in vitro* with various methods. Total phenolic substances, DPPH radical removal activity, antioxidant activity with ferric thiocyanate method in linoleic acid system, chelation activity of Fe+2 ions, superoxide radical removal activity and reduction capacity were determined by spectrophotometric methods for black seed essential oil. Accordingly, total phenolic substances was 30.5 µg/mL, 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) radical removal activity was 25.10% inhibition, linoleic acid reduction activity was 23% inhibition, Fe+2 ions reduction activity was 52.33% inhibition, superoxide radical removal activity was 20.63% inhibition and reduction capacity was 0.66 absorbance for *Nigella sativa* seed essential oil. In conclusion, considering their *in vitro* antioxidant activities, it can be stated that *Nigella sativa* L. seed essential oil can be evaluated as a natural and cheap alternative antioxidant in different fields such as human and veterinary medicine.

**Key words:** Antioxidant activity, Black seed essential oil, Total phenolic substance.

## Çörek Otu Tohumu Esansiyel Yağının Antioksidan Etkinliğinin *in vitro* Yöntemlerle Araştırılması

### ÖZ

Çörek otu gibi tıbbi bitkiler esansiyel yağları nedeniyle antioksidan özellikler göstermektedir. Bu çalışmada timokinon, ditimokinon, timol, nigellon ve karvakrol gibi pek çok biyoaktif maddeleri içeren çörek otu (*Nigella sativa* L.) tohumu esansiyel yağının antioksidan özellikleri çeşitli *in vitro* yöntemlerle araştırıldı. Çörek otu tohumu esansiyel yağı için toplam fenolik madde tayini, 1,1-difenil-2-pikrilhidrazil (DPPH) radikali giderme aktivitesinin tayini, linoleik asit sisteminde antioksidan aktivite, Fe+2 iyonlarını şelatlama aktivitesi, süperoksit radikali giderme aktivitesi tayini ve indirgeme kapasitesi spektrofotometrik olarak belirlendi. Buna göre çörek otu tohumu esansiyel yağında toplam fenolik madde miktarı 30.5 µg/ml, DPPH radikali giderme aktivitesi %25.10 inhibisyonda, linoleik asit sisteminde ferrik tiyosiyanat metodu ile belirlenen antioksidan aktivite %23 inhibisyonda, Fe+2 iyonlarını şelatlama aktivitesi %52.33, süperoksit radikali giderme aktivitesi %20.63 inhibisyonda ve indirgeme kapasitesi ise 0.66 absorbans olarak belirlendi. Sonuç olarak, bu *in vitro* antioksidan aktiviteleri dikkate alındığında, *Nigella sativa* L. tohumu esansiyel yağının beşeri ve veteriner hekimliği gibi farklı alanlarında doğal ve ucuz alternatif bir antioksidan olarak değerlendirilebileceği söylenebilir.

**Anahtar kelimeler:** Antioksidan aktivite, Çörek otu tohumu esansiyel yağı, Toplam fenolik madde.

## GİRİŞ

Siyah kimyon adıyla bilinen çörek otu (*Nigella sativa* L.) *Ranunculacea* (Düğünçeğigiller) familyasından bir bitki türü olup bu bitkinin tohumlarından gaz gidermede, soğuk algınlığında, astımda, romatizmal ve iltihabi hastalıklarda ya da diüretik olarak faydalanıldığı bilinmektedir (Darakhshan ve ark. 2015; Randhawa ve Al-Ghamdi 2002). Çörek otu tohumu ile ilgili yapılan pek çok araştırmada ise bitkinin antitümöral, antibakteriyel, antioksidan, antiinflamatuvar (Al-Ghamdi 2001; Badary 1999; Burits ve Bucar 2000; Ferdous ve ark. 1992) gibi çeşitli özelliklerinin bulunduğu dikkat çekmektedir. Çörek otu tohumlarının yapısında genel olarak uçucu yağlar (%0.4-0.45), sabit yağlar (%32-40), proteinler (%16-19.9), karbonhidratlar (%33.9) aynı zamanda amino asitler, alkaloidler, tanenler, saponinler, lifler, askorbik asit, tiamin ve minerallerin bulunduğu bilinmektedir. Linoleik asit, eikozadienoik, araşidonik asit, linolenik asit, oleik asit, miristik asit, palmitik asit ve stearik asit sabit yağları arasında bulunurken biyoaktif bileşenlerinden timokinon (TQ), ditimokinon, timol, nigellon, timohidrokinon, karvakrol, p-simen, d-limonen,  $\alpha$  ve  $\beta$ -pinen ise uçucu yağları arasında yer almaktadır (Randhawa ve Al-Ghamdi 2002).

Organizmada *in vivo* koşullarda sürekli devam eden metabolik reaksiyonlar sonucu reaktif oksijen türleri (ROT) olarak bilinen süperoksit radikali, hidroksil radikali ve hidrojen peroksit (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) gibi radikal türleri oluşmaktadır (Onat ve ark. 2006). Dış orbitallerinde ortaklanmamış elektron bulunduran serbest radikaller kararsız yapıda olup buldukları ortamda radikal olmayan reaktiflerle oldukça kolay reaksiyona girmekte ve farklı ürünler oluşturmaktadır (Halliwell ve Gutteridge 1990). Hücre içindeki serbest radikal oluşumu yine hücre içindeki antioksidan savunma mekanizmaları ile kontrol altına alınmaktadır. Ancak savunmanın yetersiz kaldığı durumlarda artan ROT'lar oksidatif strese yol açarak membran lipidlerinin peroksidasyonu sonucu geçirgenliğin bozulmasına neden olmaktadır (Vansteenhout 1985).

Çörek otu tohumlarının geleneksel tıpta kullanımına ilişkin *in vivo* araştırmalar olmasına rağmen bu bitki tohumunun ya da bileşenlerinin *in vitro* antioksidan etkinliğinin belirlendiği çalışmalar sınırlıdır. Bu çalışma kapsamında antilipidemik,

antihipertansif, antioksidan, antikanserojen, antimikrobiyal etkinlikler gösteren çörek otu tohumundan elde edilen esansiyel yağın çeşitli *in vitro* yöntemlerle antioksidan etkinliğinin belirlenmesi amaçlanmakta ve gıda, farmasötik gibi farklı alanlarda esansiyel yağının *in vitro* kullanımına ilişkin yeni alanların geliştirilebileceği öngörülmektedir.

## MATERYAL VE METOT

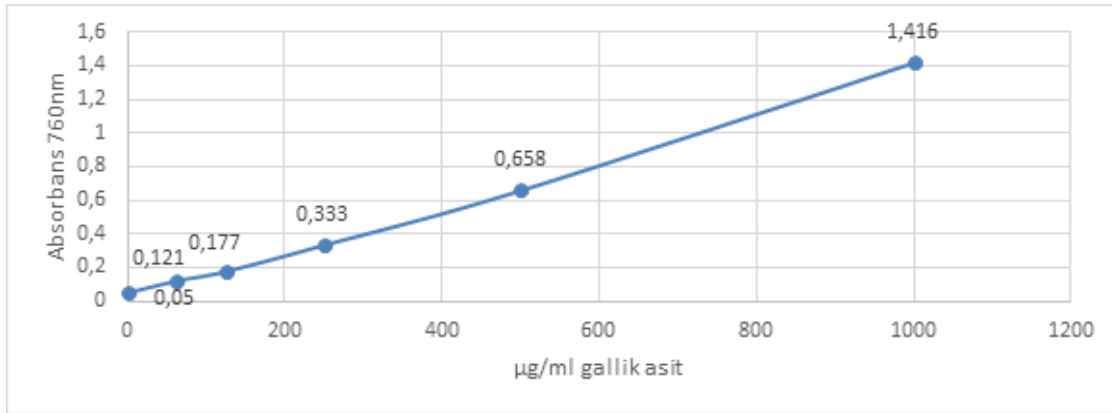
### Çörek otu uçucu yağı eldesi

Çalışmada kullanılan çörek otu tohumu toz haline getirilerek esansiyel yağı elde edilmek üzere Clevenger cihazında katı/sıvı oranı 100g kuru numune/L olacak şekilde hazırlanıp 3 saat boyunca su distilasyonuna tabi tutuldu. Distilasyon sonucu elde edilen çörek otu tohumu uçucu yağının miktarı volumetrik olarak ölçülüp % yağ miktarı belirlendi. Tüm prosedürler Afyon Kocatepe Üniversitesi Hayvan Deneyleri Etik Kurulunun (AKÜHADYEK) 23-18 referans numaralı onayı ile yapıldı.

### *In vitro* Analizler

#### Toplam Fenolik Madde Tayini

Çörek otu uçucu yağındaki toplam çözünebilir fenolik maddeler fosfotungustik asit (H<sub>3</sub>PW<sub>12</sub>O<sub>40</sub>) ve fosfomolibdik asit (H<sub>3</sub>PMo<sub>12</sub>O<sub>40</sub>) karışımından oluşan Folin-Ciocalteu reaktifi (FCR) kullanılarak tespit edildi (Singleton ve Rossi 1965). Bu metoda göre Folin-Ciocalteu reaktifi, fenolik bileşiklerle oksidasyonu sonucu indirgenmiş mavi renkli bileşiklere dönüşür ki bu renk şiddeti polifenolikler ile doğru orantılıdır. Buna göre spektrofotometrede mavi renkli kompleks oluşumu 760 nm'de okunan absorbanlar ile kaydedildi. Bu metoda göre NS tohumundan elde edilen uçucu yağdan 0.5 mL alınıp distile su ile 23 ml'ye tamamlanarak üzerine 0.5 mL FCR ilave edildi. Sonrasında 3 dakika beklenip üzerine %2 Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> çözeltisi konarak karışım oda sıcaklığındaki çalkantılı su banyosunda 2 saat tutuldu. Distile su blank olarak kullanıldı ve numune 3 tekrarlı olacak şekilde 760 nm'de absorbanları okundu. 0-1000 µg/mL olacak şekilde hazırlanan gallik asit standart çözelti olarak kullanılarak elde edilen standart grafiğin denkleminde NS esansiyel yağının toplam fenolik madde düzeyi µg/ml gallik asit eşdeğeri şeklinde hesaplandı.



Şekil 1. Gallik asit standart grafiği (µg/ml)

### DPPH Radikali Giderme Aktivitesinin Tayini

Bu metoda göre ortamdaki antioksidanların DPPH radikalini süpürmesi sonucu çözeltideki menekşe renginin açılması esas alınmaktadır. Böylece absorbansın düşmesi ortamdaki yüksek serbest radikal giderme aktivitesinin göstergesi kabul edilmektedir (Blois 1958). Yönteme uygun olarak numunenin birer mL'sine 4 mL 0.1 mM DPPH (etanolda) çözeltisi ilave edildi. Karışım vortekslenildikten sonra karanlıkta ve oda sıcaklığında 30 dakika bekletilip 517 nm'deki absorbansları okundu. Kontrol için 1 mL etil alkol alınarak aynı metot ve şartlarda kontrol absorbansı belirlendi. Belirtilen formül ile % DPPH radikali giderme aktivitesi hesaplandı.

% DPPH Radikali Giderme Aktivitesi= (Kontrol Abs- Numune Abs)/ Kontrol Abs x 100

### Linoleik Asit Sisteminde Ferrik Tiyosiyanat (FTC) Metodu ile Antioksidan Aktivite Tayini

Bu yöntemin esasına göre *in vitro* koşullarda linoleik asit oksidasyonu esnasında  $Fe^{2+}$  iyonları  $Fe^{3+}$  iyonlarına oksitlenir. Belirlenen sürelerde inkübasyon halindeki karışımdan numune alınarak spektrofotometrik ölçüm ile peroksitlerin verdiği absorbans ölçülür. Elde edilen absorbans değeri ile peroksit konsantrasyonunu doğru orantılıdır (Pan ve ark. 2007). Ölçüm için NS uçucu yağı ve 2.5-1000 µg/mL aralığında olan standart madde çözeltisinin 1 mL'si ile linoleik asit emülsiyonu (2.5 mL) ve fosfat tamponu (0.04 M pH =7.0, 1.5 mL) karıştırılır. Linoleik asit emülsiyonu için Tween 20 (175

mg) ve linoleik asit karışımı (0.04 M pH=7.0, 155 µL) belirtilen miktarda alınarak fosfat tamponuyla 50 mL'ye tamamlandı. Kontrol için ise 2.5 mL fosfat tamponu ve 2.5 mL linoleik asit emülsiyonu bulunmaktadır. Tüm çözeltiler vortekslenerek 37 °C'de inkübasyona bırakıldı. 24 saat boyunca 8 saatte bir inkübasyon çözeltisinden (0.1 mL) alınarak etil alkol (%75'lik, 4.7 mL) ve  $NH_4SCN$  (%30, 0.1 mL) eklendi. Reaksiyon karışımına 3 dakika sonra %3.5'lük HCl'de hazırlanmış olan 20 µM  $FeCl_2$  (0.1 mL) çözeltisi eklendi. Oluşan kırmızı renk şiddeti 5 dakika sonra 500 nm'de ölçüldü. Linoleik asit peroksidasyonunun % inhibisyonu belirtilen formül ile hesaplandı.

% İnhibisyon =

$1 - (\text{Numune Absorbansı} / \text{Kontrol Maksimum Absorbansı}) \times 100$

### Demir (II) İyonlarını Şelatlama Aktivitesinin Tayini

Bu metodun prensibi demir şelatlayıcısı olan ferrozin reaktifi ile ortamda bulunan metal bağlayıcı bileşiklerin  $Fe^{2+}$  iyonlarını bağlamak üzere birbiri ile yarışması temeline dayanmaktadır (Dinis ve ark. 1994). Buna göre numunede bulunan maddelerin  $Fe^{2+}$  iyonlarını şelatlama aktivitesi arttığında kırmızı renkli  $Fe^{2+}$ /ferrozin kompleksinin oluşumu azalmaktadır. Buna göre 1 mL numune, 3.7 mL deiyonize su ve 100 µL  $FeCl_2$  çözeltisi (2 mM) karıştırılıp oda koşullarında 30 dakika inkübe edildi. Daha sonra 200 µL 5 mM ferrozin çözeltisi eklenerek vortekslenip 10 dakika sonra absorbansları 562 nm'de belirlendi. Kontrol için 1 mL deiyonize su kullanılarak aynı metot tekrarlanırken standart olarak EDTA çözeltileri (50-250 µg/mL) kullanıldı.

Ferrozin/ $Fe^{2+}$  kompleksinin inhibisyon yüzdesi aşağıdaki formüle göre hesaplandı.

% Şelatlama Aktivitesi =  $1 - (\text{Numune Absorbansı} / \text{Kontrol absorbansı}) \times 100$

### Süperoksit Radikali Giderme Aktivitesinin Tayini

Bu metodun prensibine göre NADH/PMS/O<sub>2</sub> sisteminde oluşan süperoksit radikali sarı renkli NBT'yi mavi-mor renkli formazon türevine indirgemektedir. Buna göre ekstraktlarda bulunan indirgeyici bileşikler nedeniyle süperoksit radikali giderme aktivitesi ile absorbans ters orantılıdır (Nishimiki ve ark, 1972). Bu metoda uygun olarak 1 mL numune ile 1 mL 156  $\mu$ M NBT (0.1 M fosfat tamponunda, pH=7.4) ve 1 mL 468  $\mu$ M NADH (0.1 M fosfat tamponunda, pH=7.4) karıştırıldı. Reaksiyon karışımlarına 100  $\mu$ L 60  $\mu$ M PMS 58 çözeltisi (0.1 M fosfat tamponu pH=7.4) ilave edildikten sonra 5 dakika beklenip ve 560 nm'de absorbansları okundu. Kontrol için 1 mL su ile deney tekrarlandı. Belirtilen formül kullanılarak aktivite hesaplandı.

%Süperoksit Radikali Giderme Aktivitesi =  $(\text{Kontrol Abs} - \text{Numune Abs}) / \text{Kontrol Abs} \times 100$

### İndirgeme Kapasitesi Tayini

Numunenin indirgeme kapasitesi Oyaizu (1986) metodunun prensibine göre numunede bulunan indirgeyici bileşik  $Fe^{3+}$  iyonlarını  $Fe^{2+}$  iyonlarına indirgerken,  $FeCl_3$  ilavesiyle oluşan Prusya mavisi kompleksin absorbansı ölçülür. Elde edilen absorbans değeri ile indirgeme kapasitesi doğru orantılıdır. Buna göre numune (1 mL), fosfat tamponu (2.5 mL, 0.2 M, pH=6.6) ve  $K_3Fe(CN)_6$  (%1, 2.5 mL) karışımı 50°C'de 20 dakika inkübe edildikten sonra 2.5 mL %10'luk TCA eklendi. Daha sonra 2500 rpm'de 10 dakika santrifüj edildi. Süpernatandan 2.5 mL alınıp eşit hacimde distile su ve 0.5 mL %0.1'lik  $FeCl_3$  ilave edildi. Sonra absorbansları 700 nm'de okundu.

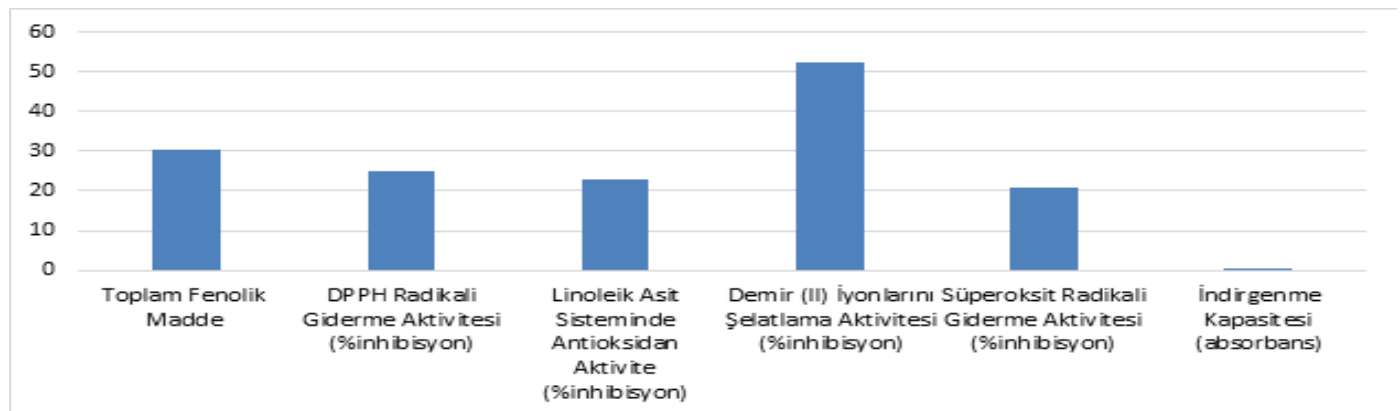
Şekil 1'de gösterilen 0-1000  $\mu$ g/mL konsantrasyonunda hazırlanan gallik asit kalibrasyon grafiği esas alınarak çörek otu tohumu esansiyel yağında toplam fenolik madde miktarı

## BULGULAR

Çörek otu tohumu esansiyel yağına ait çeşitli metotlarla belirlenen antioksidan aktivite değerleri Tablo 1 ve Şekil 2'de gösterildi.

**Tablo 1.** Çörek otu esansiyel yağının in vitro antioksidan aktivite değerleri

<i>In vitro</i> testler	Toplam Fenolik Madde( $\mu$ g/ml)	DPPH Radikali Giderme Aktivitesi (%inhibisyon)	Linoleik Asit Sisteminde Antioksidan Aktivite (%inhibisyon)	Demir (II) İyonlarını Şelatlama Aktivitesi (%inhibisyon)	Süperoksit Radikali Giderme Aktivitesi (%inhibisyon)	İndirgenme Kapasitesi (Absorbans)
Çörek otu esansiyel yağı	30.5	25.10	23.0	52.33	20.63	0.66



**Şekil 2.** Çörek otu esansiyel yağının in vitro antioksidan aktivite değerleri

30.5 µg/mL olarak bulundu. Çörek otu tohumu esansiyel yağının DPPH radikali giderme aktivitesi %25.10 inhibisyon düzeyinde belirlendi. Linoleik asit sisteminde ferrik tiyosiyanat metodu ile belirlenen antioksidan aktivite çörek otu tohumu esansiyel yağı için %23 inhibisyon olarak bulundu. Demir (II) iyonlarını şelatlama aktivitesi %52.33 ve süperoksit radikali giderme aktivitesi %20.63 inhibisyonda belirlenirken indirgeme kapasitesi ise 0.66 absorbansta bulundu.

### TARTIŞMA VE SONUÇ

Çörek otu tohumu ve yağının eski çağlardan günümüze kadar özellikle Ortadoğu ve bazı Asya ülkelerinde folklorik bir tıp bitkisi olarak soğuk algınlığı, gaz giderici, burun tıkanıklığı, baş ağrısı, baş dönmesi, ateş, bronşit, sarılık, süt artırıcı, bağırsak parazitlerini düşürücü, idrar söktürücü, hipertansiyon, romatizma, diyabet, kanser ve iltihabi hastalıklar gibi pek çok rahatsızlıklarda yaygın olarak kullanıldığı bilinmektedir (Badary ve ark 2003; Darakhshan ve ark 2015; Randhawa ve Al-Ghamdi 2002; Salem 2005).

Günümüzde çörek otu tohumu, yağı ve bundan elde edilen ekstreler antioksidan özelliklerinden dolayı ilaç, eczacılık, gıda endüstrisi ve kozmetik sektörü gibi farklı alanlarda yaygın bir şekilde kullanılmaktadır. Özellikle besinlerin depolanma şartlarından kaynaklanan fiziksel, kimyasal ve mikrobiyolojik bozulmalarının önlemesi amacıyla kullanılan bitkisel uçucu yağlardan biri de çörek otu esansiyel yağıdır (Bulca 2014). Çörek otu tohumunun %30'dan fazla sabit yağ ve %0.4-0.45 arasında uçucu yağ içermekte olduğu ve bu uçucu yağların %18-24'ünün TQ'dan kaynaklandığı bildirilmektedir (Al-Saleh ve ark 2006). Bunun yanı sıra uçucu yağında diğer bileşiklerden timol, karvakrol, nigellimin-N-oksit, nigellisin, nigellidin ve α-hederin de bulunmaktadır (Randhawa ve Al-Ghamdi 2011). Ayrıca çörek otu yağında proteinler, amino asitler, indirgeyici şekerler, toksik glikozidler, alkaloidler, organik asitler, metarbin, müsilaj, taninler, glikozidal saponinler, mineral ve vitaminler bulunduğu bilinmektedir (Ramadan 2007). Uras ve ark (2010) yaptıkları çalışmada çörek otu tohumlarından elde edilen sabit yağda tek çift bağ taşıyan oleik asidin (C18:1n9) %20 düzeyinde ve çoklu doymamış yağ asitlerinden linoleik asidin (C18:2n-6) %51.8 ile eikozadienoik asidin (C20:2) %3.3 düzeyinde olduğunu dolayısıyla çörek otu tohumunun

esansiyel yağ asitlerinden zengin olduğunu bildirmektedir. Aynı çalışmada uçucu yağdaki TQ miktarı %18.93 olarak ölçülürken total yağ asitlerinin %20.5'ini doymuş yağ asitlerinin oluşturduğu belirtilmektedir. Çörek otu ve tohumundan elde edilen çeşitli ekstrelerine ilişkin *in vitro* ve *in vivo* çalışmalar bulunmasına karşın çörek otu tohumu esansiyel yağının antioksidan etkilerine ilişkin çalışmalar sınırlıdır.

Çörek otu tohum yağının en aktif bileşiği TQ olup *in vitro* ve *in vivo* çalışmalarda bunun astım, diyabet, ensefalomiyelit, sinir dejenerasyonları ve kansere karşı antioksidan ve antiinflamatuvar etkinliği gösterilmektedir (Ramadan ve ark 2003). Çörek otu tohumunun metanolik ekstrelerinde yapılan çalışmalarda TQ miktarı 268.3 µg/mL (Uras ve ark 2010) ve 614.25 µg/mL (Butt ve ark 2019) olarak bildirilmektedir. Mohammed ve ark. (2016) çörek otu tohumundan soğuk sıkım ile elde edilen yağında TQ miktarı 1.78 mg/mL ve süperkritik sıvı ekstraksiyon yöntemi (600 bar, 40°C) ile elde edilen yağında ise 6.37 mg/mL TQ bildirilmekte olup tohum yağındaki başlıca bileşenler karyofilen (%17.47), TQ (%11.80), 1,4-Sikloheksadien (%7.17), longifolen (%3.5) ve karvakrol (%1.82) olarak belirtmektedir. Ayrıca Kiralan (2014) yaptığı çalışmada soğuk sıkım yağdaki major uçucu bileşiklerden TQ'nun (%28.64) değişen sıcaklıklarda (60°C ve 100°C) stabil kaldığını buna karşın terpenler ve diğer uçucu bileşiklerin (p-cymene, %44.77) ise azaldığını bildirmektedir.

Uras ve ark (2010) yaptıkları çalışmada çörek otu tohum ekstresinin total flavonoid miktarının 106.10-118.062 mg (rutin equivan/g) arasında bulunduğunu ve bu düzeyin bitkinin toprak üstü ekstresinden daha yüksek miktarda olduğunu bildirmektedir. Çalışmamızda gallik asit standart olarak esas alındığında çörek otu tohumu esansiyel yağında toplam fenolik madde miktarı 30.5 µg/mL gallik asit eşitliğinde bulunmuş olup bu değer ekstre ve total sabit yağdan farklı olarak esansiyel yağa ait bir değerdir. Thippeswamy ve Naidu (2005) yaptıkları çalışmada üç farklı çörek otu tohumu türünün (kumin, siyah kumin (*Nigella sativa*) ve acı kumin) metanolik ekstrelerinde toplam fenolik madde içeriğini 4.1-53.6 mg gallik asit eşdeğeri/g ekstre olarak bildirmektedir.

DPPH radikali antioksidan bileşiklerin serbest radikal giderme aktivitelerinin tayini için kullanılan bir indikatördür (Chen ve



ark 2007). Çalışmamızda çörek otu tohumu esansiyel yağının DPPH radikali giderme aktivitesi %25.10 inhibisyon düzeyinde belirlenirken Uras ve ark(2010) çörek otu tohumunun metanolik ekstresinde DPPH radikal süpürücü aktivitesinin % 90-95 inhibisyon düzeyinde olduğunu belirtmektedir. Mohammed ve ark (2016) ise soğuk sıkım ve süperkritik sıvı ekstraksiyon yöntemiyle elde edilen yağda DPPH için IC50 değerini sırasıyla 2.30 mg/ml ve 1.58 mg/ml olarak bildirmektedir. Buna göre çalışma sonuçlarının farklı olmasında kullanılan çözücü ve ekstraksiyon yöntemlerinin farklılığı, tohumdan yağ eldesindeki metod farklılıkları ve elde edilen yağın sabit yağ yada esansiyel yağ olmasının etkili olduğu görülmektedir. Buna göre çözücüler açısından değerlendirildiğinde Miliauskas ve ark (2004) aseton, metanol ve etil asetat ile elde edilen bitki ekstraktları arasında DPPH radikali gidermede en etkili ekstraktın metanol ekstraktı olduğunu bildirirken Shon ve ark (2003) sıcak su ve metanol ekstraktlarının bütanol, etil asetat ve kloroform ekstraktlarına göre daha iyi olduğunu belirtmektedir. Ayrıca bitkilerin barındırdığı ve pek çok biyolojik özelliklerinde sorumlu olan fenolik madde içerikleri; aynı bitkinin farklı türleri, farklı tarımsal uygulamalar, gün ışığı, coğrafi koşullar, iklim, hasat zamanı ve depolama şartları gibi pek çok dış etkenden de etkilenmektedir (Heimler ve ark 2007).

Lipidlerin peroksidasyonu, serbest radikallerin hücre membranının yapısında yer alan çoklu doymamış yağ asitleri (PUFA) ile reaksiyona girmesi ve bunların lipid radikallerine (L●) dönüşmesi ile başlayan, zincirleme reaksiyonla ilerleyen nonenzimatik bir oksidasyondur (Halliwell ve Gutteridge 1990). Zincirleme reaksiyonlar sonucu oluşan lipid peroksitleri son olarak aktif aldehit ve diğer karbonil bileşiklerine yıkımlanır ki bunlar da hücre düzeyinde metabolize edilebilir ya da hücreye difüze olup hücrede hasara neden olurlar. Çoklu doymamış yağ asitlerinin oksidasyonu ile açığa çıkan malondialdehit lipid peroksidasyon düzeyinin bir belirteci olarak bilinir. Lipid peroksidasyonu, membran yapısına direkt ya da indirek olarak zarar veren geri dönüşümsüz bir olaydır (Onat ve ark 2006). Çalışmada çörek otu tohumu esansiyel yağı için ferrik tiyosiyanat metodu ile yapılan linoleik asidin peroksidasyonunu önlemedeki aktivitesi %23 inhibisyon olarak belirlenirken Fe<sup>2+</sup> iyonlarını şelatlama aktivitesi %52.33 inhibisyonda bulundu. Konunun tartışılması için yeterli kaynak olmamakla birlikte Mohammed ve ark (2016) yaptıkları

çalışmada çörek otu tohumundan soğuk sıkım ve süperkritik sıvı ekstraksiyon yöntemiyle elde edilen yağda Fe<sup>3+</sup> indirgeme gücü (FRAP) değerini sırasıyla 329.00 mmol/100 ml ve 538.67 mmol/100 ml olarak bildirmektedir. Lipid oksidasyonunda geçiş metallere Fe<sup>2+</sup>, prooksidan olup Fenton reaksiyonu (Fe<sup>2+</sup> + H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> → Fe<sup>3+</sup> + OH<sup>-</sup> + ●OH) ile reaktif oksijen türlerini oluşturarak lipid oksidasyonunu hızlandırır (Halliwell ve Gutteridge 1990). Buna karşın bitkilerdeki fenolik maddeler geçiş ortamdaki metal iyonlarını bağlamak suretiyle konsantrasyonlarını azaltarak lipidlerin peroksidasyonunu yavaşlatır. İndirgeme kapasitesi bir bileşiğin elektron transfer edebilmesiyle ilişkili olup Fe<sup>3+</sup>ü Fe<sup>2+</sup>ye dönüştürmesi o bileşiğin potansiyel antioksidan aktivitesini göstermektedir. Süperoksit dismutaz hücrede metabolik reaksiyonlar sonucu oluşan süperoksit radikallerini H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ve O<sub>2</sub>e dönüştüren bir metalloenzimdir (Halliwell ve ark 2000). Bu enzimin Mn, Fe ve CuZn prostetik gruba sahip üç farklı tipi (Fridovich 1986) bulunmakla birlikte zeytin yaprağının sitozol ve nucleus gibi çeşitli organellerinde CuZn prostetik grubunu içeren SOD tipi bulunmaktadır. Total SOD aktivitesinin %52'sini CuZn-SOD'un oluşturduğu ve nükleusta bulunduğu gözönüne alındığında DNA'nın oksidatif strese karşı koruduğunun göstergesi olabilir (Corpas ve ark 2006). Elde edilen sonuçlar değerlendirildiğinde çalışmada süperoksit radikali giderme aktivitesi %20.63 inhibisyonda belirlenmesine karşın konuya ilişkin yeterli çalışmaya rastlanılmamıştır. Çalışmamızda sonuçlar değerlendirildiğinde indirgeme kapasitesinin 0.66 absorbans düzeyinde bulunduğu görülmektedir. Bir bileşik veya ekstrenin indirgeme kapasitesi onun elektron transfer edebilmesiyle ilişkili olup antioksidan aktivitesinin önemli bir göstergesi olarak bilinmektedir. Konuya ilişkin yeterli araştırma olmamasına rağmen, yapılan bir çalışmada doğal fenoliklerden kateşin, kafeik asit, kuarsetin ve rutin demir şelatlayıcı aktivitesinin olduğunu belirtilmektedir (Chen ve Ahn 1998). Benzer şekilde yapılan diğer bir çalışmada ise fesleğen ve havlıcan ekstrelerinin de Fe<sup>2+</sup>yi şelatlayıcı birer ajan olarak değerlendirilebileceği bildirilmektedir (Juntachote ve Berghofer 2005).

Çörek otu esansiyel yağının *in vitro* koşullarda antioksidan etkinliklerinin farklı yöntemlerle belirlendiği bu çalışma sonuçlarının oksidan-antioksidan denge ile ilgili ileride yapılacak *in vivo* araştırmalara ışık tutabileceği aynı zamanda

beşeri ve veteriner hekimlik açısından doğal ve ucuz bir antioksidan kaynağı olarak gıda, yem ve ilaç gibi farklı sektörlerde alternatif kullanımlarının olabileceği kanaatine varıldı.

### YAZARLIK KATKISI

Fikir/Hipotez: GA; Veri Toplama/ Veri İşleme/ Veri Analizi: BD; Makale Taslağının Hazırlanması/Verilerin Değerlendirilmesi: AB

### ÇIKAR ÇATIŞMASI

Yazarlar tarafından çıkar çatışması bildirilmemiştir.

### FİNANSAL DESTEK

Yazarlar tarafından finansal destek almadıkları bildirilmiştir.

### KAYNAKLAR

- Al-Ghamdi MS. (2001). The anti-inflammatory, analgesic and antipyretic activity of *Nigella sativa*. *Journal of Ethnopharmacology*, 76: 45-48.
- Al-Saleh IA, Billedo G, El-Doush II. (2006), Level of selenium, tocopherol, thymoquinone and thymol of *Nigella sativa* seed *J Food Compos Anal*, 19:167-175.
- Badary OA. (1999). Thymoquinone attenuates ifosfamide-induced Fanconi syndrome in rats and enhances its antitumor activity in mice. *Journal of Ethnopharmacology*, 67:135-142.
- Badary OA, Taha RA, Gamal El-Din AM, Abdel-Wahab MH (2003). Thymoquinone is a potent superoxide anion scavenger. *Drug Chem Toxicol* 26(2): 87-98.
- Blois MS (1958). Antioxidant determinations by the use of stable free radical. *Nature*, 1199-1200.
- Bulca S. (2014). Çörek otunun bileşenleri ve bu yağın ve diğer bazı uçucu yağların antioksidan olarak gıda teknolojisinde kullanımı. *Journal of Adnan Menderes University Agricultural Faculty*, 11(2):29- 36.
- Burits M, Bucar F. (2000). Antioxidant activity of *Nigella sativa* essential oil. *Phytother Res*, 14:323-328.
- Butt AS, Nisar N, Mughal TA, Ghani N, Altaf I (2019). Antioxidative and anti-proliferative activities of extracted phytochemical compound thymoquinone. *J Pak Med Assoc*, 69(10):1479-1485.
- Chen X, Ahn DU (1998). Antioxidant activities of six natural phenolics against lipid oxidation induced by Fe<sup>2+</sup> or ultraviolet light. *Journal of the American Oil Chemist's Society*, 75: 1717-1721.
- Chen HY, Lin YC, Hsieh CL (2007). Evaluation of antioxidant activity of aqueous extract of some selected nutraceutical herbs. *Food Chemistry*, 104: 1418-1424.
- Corpas FJ, Fernandez-Ocana A, Carreras A, Valderrama R, Luque F, Esteban FJ, Rodriguez-Serano M, Chaki M, Pedrajas JR, Sandalio LM, Del Rio LA, Barroso JB (2006). The expression of different superoxide dismutase forms is cell-type dependent in olive (*Olea europaea* L.) leaves. *Plant Cell Physiol*, 47(7): 984-994.
- Darakhshan S, Bidmeshki Pour A, Hosseinzadeh Colagar A, Sisakhtnezhad S (2015). Thymoquinone and its therapeutic potentials. *Pharmacol Res*, 95-96:138-58.
- Dinis TCP, Madeira VMC, Almeida LM (1994). Action of phenolic derivatives (acetaminophen, salicylate, and 5-aminosalicylate) assay inhibitors of membrane lipid peroxidation and assay peroxy radical scavengers. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 315(1): 161-169.
- Ferdous AJ, Islam, SN, Ashan M, Hasan CM, Ahmed ZU (1992). *In vitro* antibacterial activity of the volatile oil of *Nigella sativa* seeds against multiple drug resistant isolates of *Shigella*, *V. Cholerae* and *E. Coli*. *Phytother Res*, 6: 137-140.
- Fridovich I (1986). Biological effects of the superoxide radical. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 247(1): 1-11.
- Halliwell B, Clement MV, Long LH (2000). Hydrogen peroxide in the human body. *FEBS Letter*, 486: 10-13.
- Halliwell B, Gutteridge JMC (1990). Role of free radicals and catalytic metal ions in human disease: An overview. In: *Methods in Enzymology* 186: 1-85.
- Heimler D, Isolani L, Vignolini P, Tombelli S, Romani A. (2007). olyphenol content and antioxidative activity in some species of freshly consumed salads. *J Agric Food Chem*, 55(5): 1724-9.
- Juntachote T, Berghofer E (2005). Antioxidative properties and stability of ethanolic extractions of holy basil and galangal. *Food Chemistry*, 92: 193-202.
- Kiralan M (2014). Changes in volatile compounds of black cumin (*Nigella Sativa* L.) seed oil during thermal oxidation. *International Journal of Food Properties*, 17:1482-1489.
- Miliauskas G, Venskutonis PR, Van Beek TA (2004). Screening of radical scavenging activity of some medicinal and aromatic plant extracts. *Food Chemistry*, 85: 231-237.
- Mohammed NK, Abd Manap MY, Tan CP, Muhiaddin BJ, Alhelli AM, Meor Hussin AS (2016). The effects of different extraction methods on antioxidant properties, chemical composition, and thermal behavior of black seed (*Nigella sativa* L.) Oil: Evidence-based complement. *Altern. Med*, pp. 1-10.
- Onat T, Emerk K, Sözmen EY. İnsan Biyokimyası. 2. Baskı,

- Palme Yayıncılık, 2006, Ankara.
- Oyaizu M (1986). Studies on product of browning reaction prepared from glucose amine. Japan Journal of Nutrition, 44: 307-315.
- Pan Y, Zhang X, Wang H, Liang Y, Zhu J, Li H, Zhang Z, Wu Q (2007). Antioxidant potential of ethanolic extract of *Polygonum cuspidatum* and application in peanut oil. Food Chemistry, 105: 1518-1524.
- Ramadan MF (2007). Nutritional value, functional properties and nutraceutical applications of black cumin (*Nigella sativa L.*): an overview. International Journal of Food Science and Technology, 42(10): 1208-1218.
- Ramadan MF, Kroh LW, Mörsel JT (2003). Radical scavenging activity of black cumin (*Nigella sativa L.*), coriander (*Coriandrum sativum L.*), and niger (*Guizotia abyssinica Cass.*) crude seed oils and oil fractions. J Agric Food Chem, 51:6961-6969.
- Randhawa MA, Al-Ghamdi MS (2002). A review of the pharmacotherapeutic effects of *Nigella sativa*. Pakistan J Med Res, 41(2): 77-83.
- Randhawa MA, Al-Ghamdi MS (2011). Anticancer Activity of *Nigella sativa* (Black Seed) - A Review. The American Journal of Chinese Medicine 39(6):1075-91.
- Salem ML (2005). Immunomodulatory and therapeutic properties of the *Nigella sativa L.* seed. Int. Immunopharm, 5: 1749-1770.
- Shon MY, Kim TH, Sung NJ (2003). Antioxidants and free radical scavenging activity of *Phellinus baumii* (*Phellinus of Hymenochaetaceae*) extracts. Food Chemistry, 82: 593-597.
- Singleton VL, Rossi JA (1965). Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. American Journal of Enology and Viticulture, 16: 144-158.
- Thippeswamy NB, Naidu KA (2005). Antioxidant potency of cumin varieties- cumin, black cumin and bitter cumin-on antioxidant systems. European Food Reserach Technology, 220: 472-476.
- Uras ŞS, Silahtaroglu S, İlçim A, Kökdil G (2010). Fatty Acid, tocopherol, mineral composition, total phenolic, flavonoid, thymoquinone content, and antioxidant activity of *Nigella Sativa L.* J Fac Pharm, 39 (3): 173-186.
- Vansteenhuse JL (1985). Free radicals: relation to tissue damage-a review. Vet Clin Pathol, 16: 29-35.