



**YENİ NESİL TEKNİKLER KULLANILARAK
HAZIRLANAN PROPOLİS EKSTRAKTLARININ
FİTOKİMYASAL ÖZELLİKLERİNİN VE
ANTİOKSİDAN KAPASİTELERİNİN
KARŞILAŞTIRILMASI**

Sabiha KAYABAŞI

**Yüksek Lisans Tezi
Gıda Mühendisliği Ana Bilim Dalı
Doç. Dr. Enes DERTLİ
2019
(Her Hakkı Saklıdır)**

T.C.
BAYBURT ÜNİVERSİTESİ
LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ
GIDA MÜHENDİSLİĞİ ANABİLİM DALI

YENİ NESİL TEKNİKLER KULLANILARAK HAZIRLANAN PROPOLİS
EKSTRAKTLARININ FİTOKİMYASAL ÖZELLİKLERİNİN VE ANTİOKSİDAN
KAPASİTELERİNİN KARŞILAŞTIRILMASI

(Propolis Extracted by Using New Generation Techniques Comparison of Physchemical
Properties and Antioxidant Capacity)

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Sabiha KAYABAŞI

Birinci Danışman: Doç. Dr. Enes DERTLİ

İkinci Danışman: Dr. Öğr. Üyesi Nesrin ECEM BAYRAM

Bayburt
Temmuz, 2019

KABUL VE ONAY TUTANAĞI

Doç. Dr. Enes DERTLİ ve Dr. Öğr. Üyesi Nesrin ECEM BAYRAM danışmanlığında, 142003006 numaralı Sabiha KAYABAŞI tarafından hazırlanan “Yeni nesil teknikler kullanılarak hazırlanan propolis ekstraktlarının fitokimyasal özelliklerinin ve antioksidan kapasitelerinin karşılaştırılması” konulu bu çalışma 26/07/2019 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı’nda Yüksek Lisans tezi olarak kabul edilmiştir.

Başkan : Prof. Dr. Gül CEVAHİR ÖZ

İmza:

Jüri Üyesi : Doç. Dr. Enes DERTLİ

İmza:

Jüri Üyesi : Dr. Öğr. Üyesi Sinan BAYRAM

İmza:

Bu tezin Bayburt Üniversitesi Lisansüstü Eğitim ve Öğretim Yönetmeliği'nin ilgili maddelerinde belirtilen şartları yerine getirdiğini onaylarım.

...../...../.....

.....

Enstitü Müdürü

ETİK VE BİLDİRİM SAYFASI

Yüksek Lisans Tezi olarak sunduğum ‘Yeni Nesil Teknikler Kullanılarak Hazırlanan Propolis Ekstraktlarının Fitokimyasal Özelliklerinin Ve Antioksidan Kapasitelerinin Karşılaştırılması’ başlıklı çalışmanın tarafımdan bilimsel etik ilkelere uyularak yazıldığını ve yararlandığım eserleri kaynakçada gösterdiğimi beyan ederim.



26 / 07 / 2019
İmza
Sabiha KAYABAŞI

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans tezimi olan bu çalışmada, bilgi ve deneyimlerini aktaran, her konuda elinden gelen desteği esirgemeyen değerli danışmanım Sayın Doç. Dr. Enes DERTLİ Hocam başta olmak üzere eş danışmanım Sayın Dr. Öğr. Üyesi Nesrin ECEM BAYRAM Hocam'a,

İstanbul Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Bölümü Öğretim Görevlisi Yusuf Can GERÇEK Hocam'a laboratuvar çalışmalarım esnasında bana yardımcı olduğu için,

Hayatımın her alanında bana destek olan ve hiçbir fedakârlıktan kaçınmayan aileme, yüksek lisans eğitimimde ve tüm çalışmalarımnda benim için her konuda desteğini esirgemeyen eşim Durmuş Kadir KAYABAŞI'ya en içten dileklerle teşekkür ederim.

Sabiha KAYABAŞI

Temmuz 2019

ÖZ
YÜKSEK LİSANS TEZİ
YENİ NESİL TEKNİKLER KULLANILARAK HAZIRLANAN PROPOLİS
EKSTRAKTLARININ FİTOKİMYASAL ÖZELLİKLERİNİN VE ANTIOKSİDAN
KAPASİTELERİNİN KARŞILAŞTIRILMASI
Sabiha KAYABAŞI
Temmuz 2019, 67 sayfa

Propolis, farklı bitkisel kaynaklardan bal arıları tarafından toplanan reçinemi bir madde olup, yapı maddesi olarak kovanda arılar tarafından kullanılmaktadır. Antibakteriyel, antifungal, antikanserijen, antiinflamatuvar, antipretik vb. birçok amaç doğrultusunda yüzyıllardır insanlar tarafından kullanılan bu arı ürünü, biyoaktif bileşenlerden yararlanma oranının kısıtlı olması ve bazı alerjik özelliklerin ortaya çıkma olasılığından dolayı ham olarak kullanılamaz ve bu nedenle de çözücülerle ekstraksiyon işlemine tabi tutulduktan sonra tüketime sunulur. Fakat bu işlem sırasında propolisin aktif bileşenlerinin korunması oldukça önem arz etmektedir. Bu nedenle propolis ekstraksiyonunda kullanılan yöntem oldukça önem arz etmektedir.

Bu çalışmada geleneksel bir ekstraksiyon yöntemi olan maserasyona ek olarak son yıllarda yeni nesil ekstraksiyon teknikleri arasında sayılan ultrasonik ve mikrodalga destekli ekstraksiyon yöntemleri kullanılarak propolis ekstraktları hazırlanmıştır. Propolis örneğinin ekstrakte edilmesi aşamasında maserasyon yönteminde ekstraksiyon süresi (1, 2, 5, 10, 15, 20, 25, 30 gün); mikrodalga destekli ekstraksiyonda mikrodalga gücü (50W, 100W, 200W, 400W, 500W) ve ekstraksiyon süresi (2, 4, 6, 8, 10 dk); ultrasonik destekli ekstraksiyonda ise ultrasonik genlik (%20, %40, %60, %80) ve ekstraksiyon süresi (5, 10, 20, 30, 60 dk) değişken parametreleri seçilmiştir. Bu parametreler kullanılarak elde edilen ekstraktların, Folin-Ciocalteu yöntemi ile toplam fenolik madde içerikleri ve alüminyum klorür yöntemi ile toplam flavonoid madde içeriklerine ek olarak CUPRAC, CERAC ve DPPH yöntemleri ile antioksidan kapasiteleri araştırılmıştır. Üç farklı ekstraksiyon yöntemi karşılaştırıldığında, en yüksek toplam flavonoid ve fenolik madde miktarına sahip ekstrakt örnekleri sırasıyla ultrasonik destekli ve maserasyon yöntemi ile elde edilmiştir. Bununla birlikte mikrodalga ekstraksiyon yöntemi kullanılarak elde edilen ekstraktlarda maserasyon ve ultrasonik destekli yöntemlere göre daha yüksek CERAC ve DPPH değerine sahip olan ekstraktlar bulunduğu gözlemlenmiştir.

Anahtar Kelimeler: Propolis, ekstraksiyon, maserasyon, ultrasonik, mikrodalga

ABSTRACT
MASTER THESIS
PROPOLIS EXTRACTED BY USING NEW GENERATION TECHNIQUES
COMPARISON OF PHYSICOCHEMICAL PROPERTIES AND ANTIOXIDANT
CAPACITY

Sabiha KAYABAŞI
July 2019, 67 pages

Propolis is a resinous substance collected by honey bees from different plant sources and used by bees in the hive as a building material. It has been used by people for centuries for its beneficial properties such as antibacterial, antifungal, anticarcinogenic, antiinflammatory and antipretic. This bee product cannot be used raw because of the limited rate of utilization of bioactive components and the possibility of some allergic properties, and is therefore offered for consumption after extraction with solvents. However, preservation of the active components of propolis (phenols and flavonoids) during this process is very important. Therefore, the method used in the extraction of propolis is very important.

In this study, in addition to maceration, which is a traditional extraction method, different extracts of propolis were obtained by using ultrasonic and microwave assisted extraction techniques which are considered among the new generation extraction techniques in recent years. Extraction time (1, 2, 5, 10, 15, 20, 25, 30 days) for maceration extraction; microwave power (50W, 100W, 200W, 400W, 500W) and extraction time (2, 4, 6, 8, 10 min) for microwave assisted extraction; amplitude (20%, 40%, 60%, 80%) and extraction time (5, 10, 20, 30, 60 min) for ultrasound assisted extraction were selected as the independent variables. Total phenolic contents of these extracts by Folin-Ciocalteu method and total flavonoid contents by aluminum chloride method in addition to antioxidant capacities by CUPRAC, CERAC and DPPH methods were investigated. When three different extraction methods were compared, extract samples having the highest total flavonoid and phenolic contents were obtained by ultrasonic and maceration assisted extraction, respectively. However, it was observed that extracts with microwave extraction method had higher CERAC and DPPH values than maceration and ultrasonic assisted method.

Keyword: Propolis, extraction, maceration, ultrasonic, microwave

İÇİNDEKİLER

TEŞEKKÜR.....	ii
İÇİNDEKİLER.....	v
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	viii
TABLolar DİZİNİ.....	viii
KISALTMALAR VE SİMGELER DİZİNİ.....	ixx
BİRİNCİ BÖLÜM.....	1
Giriş.....	1
İKİNCİ BÖLÜM.....	4
Literatür Özeti.....	4
Propolis.....	4
Arılar Tarafından Propolis Üretimi ve Kovandan Hasat Edilmesi.....	5
Propolisin Fiziksel Özellikleri.....	6
Propolisin Kimyasal İçeriği ve Özellikleri.....	6
Ekstraksiyon Yöntemleri.....	7
Propolis ile İlgili Yapılan Çalışmalar.....	10
ÜÇÜNCÜ BÖLÜM.....	15
Materyal ve Yöntem.....	15
Propolisin Elde Edilmesi.....	15
Kullanılan Kimyasallar.....	16
Kullanılan Cihazlar.....	16
Maserasyon ile Propolis Ekstraktlarının Elde Edilmesi.....	16
Mikrodalga Destekli Ekstraksiyon.....	17
Ultrasonik Destekli Ekstraksiyon.....	18
Toplam Flavonoid Madde İçeriğinin Belirlenmesi.....	19
Toplam Fenolik Madde İçeriğinin Belirlenmesi.....	20
Antioksidan Aktivite Tayini.....	20
Bakır(II) iyonu indirgeme antioksidan kapasite (CUPRAC) testi.....	20

Ce(IV) iyonu indirgeyici antioksidan kapasite (CERAC) tayini.....	20
2,2-Difenil-1-pikrihidrazil (DPPH) radikal söndürücü kapasite tayini	21
İstatiksel Analizler.....	21
DÖRDÜNCÜ BÖLÜM.....	22
Bulgular ve Yorum	22
Toplam Flavonoid Madde Miktarı	22
Toplam Fenolik Madde Miktarı	27
Propolis Ekstraktlarının Antioksidan Aktivite Test Sonuçları	32
CERAC Testi Sonuçları.....	32
CUPRAC Testi Sonuçları.....	32
DPPH Testi Sonuçları.....	32
BEŞİNCİ BÖLÜM.....	43
Sonuç, Tartışma ve Öneriler.....	43
KAYNAKLAR.....	47
ÖZGEÇMİŞ	55

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1. Mikrodalga Şematik Diyagramı.....	9
Şekil 2. Ultrasonik Şematik Diyagramı	10
Şekil 3. Kovandan Toplanan Ham Propolis ile Toz Haline Getirilen Propolis Örneği	15
Şekil 4. Farklı Ekstraksiyon Teknikleri Kullanılarak Hazırlanan Propolis Ekstraktları.....	15
Şekil 5. Ekstraksiyon Aşaması.....	17
Şekil 6. Test İstatistik Formülü	21
Şekil 7. Farklı Maserasyon Sürelerinin Toplam Flavonoid Madde Miktarına Etkisi.....	23
Şekil 8. Farklı Mikrodalga Destekli Ekstraksiyon Parametrelerinin Toplam Flavonoid Madde miktarına etkisi.....	24
Şekil 9. Farklı Ultrasonik Ekstraksiyon Parametrelerinin Toplam Flavonoid Madde Miktarına Etkisi	26
Şekil 10. Farklı Maserasyon Parametrelerinin Toplam Fenolik Madde Miktarına Etkisi.....	28
Şekil 11. Farklı Mikrodalga Destekli Ekstraksiyon Parametrelerinin Toplam Fenolik Madde Miktarına Etkisi.....	30
Şekil 12. Farklı Ultrasonik Destekli Ekstraksiyon Parametrelerinin Toplam Fenolik Madde Miktarına Etkisi.....	32
Şekil 13. Maserasyon Süresinin Toplam Antioksidan Kapasiteye Etkisi.....	41
Şekil 14. Mikrodalga Destekli Ekstraksiyonunun Toplam Antioksidan Kapasiteye Etkisi ..	42
Şekil 15. Ultrasonik Destekli Ekstraksiyonunun Toplam Antioksidan Kapasiteye Etkisi	42
Şekil 16. Maserasyon Yönteminin Toplam Fenolik, Toplam Flavonoid, CUPRAC, CERAC, DPPH Madde Miktarı Üzerine Etkisi	43
Şekil 17. Mikrodalga Yönteminin Toplam Fenolik, Toplam Flavonoid, CUPRAC, CERAC, DPPH Madde Miktarı Üzerine Etkisi	44
Şekil 18. Ultrasonik Ekstraksiyon Yönteminin Toplam Fenolik, Toplam Flavonoid, CUPRAC, CERAC, DPPH Madde Miktarı Üzerine Etkisi	45

TABLULAR DİZİNİ

Tablo 1. <i>Kullanılan Cihazların Özellikleri</i>	16
Tablo 2. <i>Mikrodalga Ekstraksiyon Yönteminde Uygulanan Parametreler</i>	18
Tablo 3. <i>Ultrasonik Ekstraksiyon Yönteminde Uygulanan Parametreler</i>	19
Tablo 4. <i>Maserasyon ile Elde Edilen Ekstraktların Toplam Flavonoid Madde Miktarı (g QE/g)</i>	23
Tablo 5. <i>Mikrodalga Destekli Ekstraksiyon ile Elde Edilen Ekstraktların Toplam Flavonoid Madde Miktarı (g QE/g)</i>	25
Tablo 6. <i>Ultrasonik Destekli Ekstraksiyon ile Elde Edilen Ekstraktların Toplam Flavonoid Madde Miktarı (g QE/g)</i>	26
Tablo 7. <i>Maserasyon Yöntemi ile Elde Edilen Ekstraktların Toplam Fenolik Madde Miktarı (g GAE/g)</i>	28
Tablo 8. <i>Mikrodalga Destekli Ekstraksiyon Yöntemi ile Elde Edilen Ekstraktların Toplam Fenolik Madde Miktarı (g GAE/g)</i>	29
Tablo 9. <i>Ultrasonik Destekli Ekstraksiyon Yöntemi Sonucu Elde Edilen Ekstraktların Toplam Fenolik Madde Miktarı (g GAE/g)</i>	31
Tablo 10. <i>Maserasyon Sonucu Elde Edilen Ekstraktların CERAC Değerleri (g TE/g)</i>	33
Tablo 11. <i>Mikrodalga Destekli Ekstraksiyonu Sonucu Elde Edilen Ekstraktların CERAC Değerleri (g TE/g)</i>	34
Tablo 12. <i>Farklı Ultrasonik Parametreler Uygulanması Sonucu Elde Edilen Ekstraktların CERAC Değerleri (g TE/g)</i>	35
Tablo 13. <i>Maserasyon ile Elde Edilen Ekstraktların CUPRAC Değerleri (g TE/g)</i>	36
Tablo 14. <i>Mikrodalga Destekli Ekstraksiyon ile Elde Edilen Ekstraktların CUPRAC Değerleri (g TE/g)</i>	37
Tablo 15. <i>Ultrasonik Destekli Ekstraksiyon ile Elde Edilen Ekstraktların CUPRAC Değerleri (g TE/g)</i>	38
Tablo 16. <i>Maserasyon ile Elde Edilen Ekstraktların DPPH Değerleri (g TE/g)</i>	39
Tablo 17. <i>Mikrodalga Destekli Ekstraksiyon ile Elde Edilen Ekstraktların DPPH Değerleri (g TE/g)</i>	40
Tablo 18. <i>Ultrasonik Destekli Ekstraksiyon Sonucu Elde Edilen Ekstraktların DPPH Değerleri (g TE/g)</i>	41

KISALTMALAR VE SİMGELER DİZİNİ

Simgeler

°C	:Santigrat Derece
dk	:Dakika
g	:Gram
L	:Litre
M	:Molar
ml	:Mililitre
µl	:Mikrolitre
s	:Saniye
V	:Volt

Kısaltmalar

Cu_2SO_4	:Bakır iki sülfat
KOH	:Potasyum hidroksit
$NaNO_2$:Sodyum Nitrit
2,4 DNP	:2,4 Dinitrofenol
$AlCl_3$:Alüminyum klorür
NaOH	:Sodyum hidroksit
$CuCl_2$:Bakır (II) klorür
CH_3COONH_4	:Amonyum asetat
$C_{14}H_{12}N_2$:Neocuproine
dH ₂ O	:Distile su

BİRİNCİ BÖLÜM

Giriş

Arıcılık yüzyıllardır insanoğlu tarafından gerçekleştirilen önemli tarımsal faaliyetlerden birisidir. Türkiye sahip olduğu bitkisel çeşitlilik nedeniyle arıcılığın yaygın olarak gerçekleştirildiği ülkeler arasında yer almaktadır. Arıcılığın tüm Dünya’da ilgi görmesinin temel nedenlerinden birisi üretilen ürünlerin çeşitliliği ve bu ürünlerin sahip olduğu fonksiyonel özelliklerden kaynaklanmaktadır. Fonksiyonel gıdalar sentetiklerin aksine doğal olarak oluşan bileşiklerden meydana gelen, besleyici etkisi olan, yaşam kalitesini geliştirici özelliklere sahip olan ve hastalık oluşma riskini azaltarak insan sağlığına faydalı olan gıdalar olarak tanımlanmaktadır (Roberfroid, 2000). Yaşam kalitesini artırmak ve hastalıkları önlemek amacıyla besin takviyesi olarak kullanılan fonksiyonel gıdaların önemi son yıllarda gittikçe artmıştır. Bu açıdan değerlendirildiğinde, arı ürünleri besleyici değerini artırmak için diğer gıda ürünlerine eklenerek veya doğal besin içeriği/biyoaktif bileşenleri sayesinde tek başına kullanılan fonksiyonel gıdalar olarak kabul edilir (Yücel, Topal, & Kösoğlu, 2017). Bu ürünlerden birisi olan propolis, bal arıları tarafından bitkilerden toplanan ve kimyasal içerik bakımından oldukça karmaşık yapıya sahip olan bir arı ürünüdür. Çeşitli bitki salgıları kullanılarak arılar tarafından üretilen reçine benzeri yapışkan bir madde olan propolis arılar tarafından kovan savunmasının yanı sıra kovandaki delik ve çatlakların kapatılması için kullanılmaktadır (Sharaf, & El-Naggar, 2018). Ek olarak, arılar kovan içerisine girip ölen ve dışarıya çıkarılamayan canlıların mumyalanıp etkisiz hale getirilerek kovanda bir enfeksiyon kaynağı oluşmasının engellenmesinde de propolisten faydalanmaktadır. Propolisin bitkisel kaynağı genellikle bölgelere göre farklılık göstermekle birlikte karaağaç, huş ağacı, çam, diş budak, meşe, kestane, kavak ve okaliptüs gibi ağaçlardır (Markham, 1996; Kartal, 2002; Albayrak, & Albayrak, 2008). Türkiye’de ise *Populus nigra*, *P. tremuloides*, *P.alba*, *P.euphratica*, *Eucalyptus* spp., *Salix* spp. ve *Castanea sativa* propolis kaynağı bitkilerdir (Silici, 2010). Propolisin botanik kaynaklarının tespit edilmesi standardizasyon oluşturması açısından büyük önem taşımaktadır (Crane, 1990; Doğan, & Hayoğlu, 2012). Benzer şekilde propolisin kimyasal içeriği de bölgenin bitkisel kaynaklarına, coğrafik özelliklerine, iklim şartlarına, mevsime ve ayrıca propolisin diğer bileşenlerine (bal mumu, polen ve organik bileşikler) bağlı olarak değişkenlik göstermektedir (Sharaf, & El-Naggar, 2018; Lagouri, Prasianaki, & Krysta, 2014; Ecem Bayram, Sorkun, Cevahir Öz, Salih, & Topçu, 2018; Ecem Bayram, & Gerçek,

2019). Kimyasal içeriğini çoğunlukla flavonoidlerin oluşturduğu fenolik bileşiklerle birlikte, aldehitler, ketonlar, hidrokarbonlar, alifatik asit ve esterleri, yağ asitleri, alkoller ve bazı inorganik bileşikler oluşturmaktadır ki bu bileşiklerin birçoğu fonksiyonel gıdalarında yapısında bulunmaktadır (de Aguiar, Zeoula, do Prado, Arcuri, & Forano, 2014). Yapısındaki bu biyoaktif bileşenler sayesinde propolis antibakteriyel, antifungal, antioksidan, antikanserojen, antidiyabetik, antipretik, antitümör ve antiinflamatuvar gibi birçok fonksiyonel özelliğe sahiptir (Ecem Bayram *vd.*, 2018). Sağlığa fayda sağlayabilecek bu özellikleri nedeniyle, propolis işlevsel bir bileşen olarak kabul edilir ve sağlığı geliştirmek ve hastalıkları önlemek için gıda, içecek, kozmetik ve tıp gibi birçok alanda kullanılmaktadır (Paviani, Sacoda, Saito, & Cabral, 2010). Fakat yüzyıllardır insanlar tarafından kullanılan bu arı ürünü, biyoaktif bileşenlerden yararlanma oranının kısıtlı olması ve bazı alerjik özelliklerin ortaya çıkma olasılığından dolayı ham olarak kullanılamaz ve bu nedenle çözücülerle ekstraksiyon işlemine tabi tutulduktan sonra tüketime sunulur. Fakat bu işlem sırasında aktif bileşenler (fenoller ve flavonoidler) korunurken inert bileşenlerin (balmumu, kül, biyoaktif bileşikler ve polenler) kaldırılması gerekmektedir (de Lima *vd.*, 2016). Bu nedenle uygulanacak ekstraksiyon yöntemi ve çözücüsü oldukça önem arz etmektedir. Propolis bileşenlerinin spesifik kısımlarının ekstraksiyonunda en yaygın olarak kullanılan çözücü bal mumu ve organik atıkları iyi derecede uzaklaştırdığı için etanol olmakla birlikte etil eter, su, metanol ve kloroform gibi çözücülerden de faydalanılmaktadır (Devequi-Nunes *vd.*, 2018). En yaygın olarak kullanılan ekstraksiyon metodu ise geleneksel yöntem olarak bilinen maserasyon yöntemidir. Fakat günümüz teknolojisindeki gelişme imkânına paralel olarak örnek hazırlama süreçlerinde özellikle ekstraksiyon aşamasında kullanılan solventin miktarını minimuma indirmek ve verimi artırmak için yeni yönelimler ortaya çıkmıştır. Geleneksel (maserasyon) olarak kullanılan ekstraksiyon tekniğinin yerini mikrodalga destekli ekstraksiyon, ultrasonik destekli ekstraksiyon, süperkritik sıvı ekstraksiyon ve sonikasyon-destekli sıvı ekstraksiyonu gibi teknikler almıştır (Büyüktuncel, 2012). Gıda, ilaç ve kozmetik gibi birçok alanda kullanılan propolis ekstraktlarının kimyasal kompozisyonu ve buna bağlı olarak kalitesi uygulanan ekstraksiyon prosedürüne göre farklılık göstermektedir (Biscaia, & Ferreira, 2009). Bununla birlikte birçok biyoaktif özelliğe sahip olan bileşikleri barındıran propolisli ürünlerin kompozisyonuna ve ekstraksiyon prosedürüne ilişkin bir standart bulunmamaktadır (Cunha *vd.*, 2004).

Günümüzde artan insan nüfusuna, gelişen teknolojinin sağlık üzerine getirmiş olduğu olumsuz etkiler ve hazır gıda tüketiminin artması gibi nedenlerden dolayı insanların beslenme alışkanlıklarında değişiklikler meydana gelmiş ve insanlar doğal ürünlere yönelmiştir. Bu açıdan değerlendirildiğinde propolisin biyoaktif bileşenlerinin birçoğunun gıda ve/veya gıda

katkı maddelerinde mevcut olması gerçeği onu yeni gıda uygulamalarında doğal bir koruyucu olarak çekici bir aday haline getirmiştir (Paviani *vd.*, 2010). Bu nedenle son yıllarda umut verici bir ürün olan propolisin biyoaktif içeriğinin daha yüksek oranda çıkarılabilmesi ve standardizasyon çalışmalarına katkı sağlamak amacı ile yeni ekstraksiyon metotları arayışına girilmiş ve farklı araştırma grupları tarafından yürütülen çalışmalarda propolis ekstraktı hazırlarken farklı teknikleri uygulanmıştır (Alencar *vd.*, 2007; Popova, Reyes, Conte, & Bankova, 2014; Silici, & Kutluca, 2005; Bayram, Ecem Bayram, Gerçek, & Sorkun, 2016).

Ülkemizde 2010 yılında “Türkiye Apiterapi Derneği” kurulmuş ve sonrasında ise 27 Ekim 2014’de Sağlık Bakanlığı tarafından yayınlanan “Geleneksel ve Tamamlayıcı Tıp Uygulamaları Yönetmeliği’nde apiterapi terimi ve bu konudaki ilgili mevzuat ilk kez tanımlanmıştır. Bu yönetmeliği takiben İstanbul Medipol Üniversitesi Hastanesi’nde Sağlık Bakanlığı onaylı ilk Apiterapi Merkezi kurulmuştur. Tüm bu gelişmeler insan tedavisinde kullanılmaya başlanan arı ürünlerinin standardizasyonunun yapılmasını ülkemizde elzem hale getirmiştir. Bu amaçla, Tarım ve Orman Bakanlığı tarafından bütün arı ürünlerinin standardizasyon çalışmaları da başlatılmıştır. Propolis de bu ürünler içerisinde karmaşık kimyasal yapısı nedeniyle gerçekliğinin tespit edilmesi ve standardizasyonunun yapılması en zor üründür ki bu konuda ülkemizde yapılan araştırmalar henüz yeterli derecelere ulaşmamıştır. Ham madde türünün etkili olduğu ve standardizasyon çalışmalarının önemi düşünüldüğünde Türkiye propolisleri için bu tez çalışmasında elde edilen sonuçların önemli olacağı düşünülmektedir. Bu nedenle, özellikle Türkiye propolislerindeki fenolik bileşiklerin maksimum verimle ekstrakte edilmesini sağlayacak olan yeni ekstraksiyon yöntemlerin geliştirilmesi ve optimize edilmesi bu konuda bir standart oluşturması için oldukça önem arz etmektedir. Bu nedenle biz bu çalışmada farklı ekstraksiyon yöntemleri ve çözücü olarak etanol kullanarak elde edilen propolis ekstraktlarının toplam fenolik içerik, toplam flavonoid içerik ve üç farklı yöntem ile antioksidan aktivitelerini değerlendirerek yapılan çalışmalara katkı sağlamayı amaçladık.

İKİNCİ BÖLÜM

Literatür Özeti

Propolis

Propolis bal arılarının farklı bitki organlarından topladıkları reçinelerden ürettikleri ve bal mumu ile karıştırdıkları bitki kaynaklı bir arı ürünüdür (Bankova *vd.*, 2019). Propolis kovandaki delik ve çatlakların kapatılmasında, peteklerin birbirlerine yapıştırılarak tamir edilmesinde, kovan girişini daraltmak ve savunma gibi amaçlar doğrultusunda arılar tarafından kullanılmaktadır. Ayrıca, kovan içerisine girip ölen ve arılar tarafından dışarıya çıkarılması gerçekleştirilemeyen canlıların üzerlerinin mumyalayarak kovanda bir enfeksiyon kaynağı oluşmasının engellenmesinde de propolisten faydalanılmaktadır. Ek olarak, güçlü dezenfektan etkisinden dolayı kovan ve petek gözlerinin dezenfeksiyonunda da kullanılmaktadır (Basim, E., Basim, H., & Özcan, 2006; Albayrak, & Albayrak, 2008).

Ilıman bölgelerde *Populus alba*, *Populus nigra* ve *Populus tremula*'nın tomurcuk reçineleri propolis için ilk olarak arılar tarafından tercih edilmekle birlikte *Acacia* sp., *Betula pendula* L., *Alnus glutinosa*, *Aesculus hippocastanum* L., *Salix alba* L. ve *Pinus* sp. bitki türleri de sekonder olarak tercih edilmektedir (Ristivojevic, Trifkovic, Andric, & Milojkovic-Opsenica, 2015). Ancak propolis kaynağı olarak kullanılan bitki tipleri bölgesel olarak farklılık gösterebilmektedir. Arıların propolis oluşturmak için ziyaret ettiği bitki türleri polen analizi yapılarak kolaylıkla tespit edilebilmekte ve bu sayede propolisin içeriğine katkı sağlayan bitki türü/türleri saptanabilmektedir (Ecem Bayram *vd.*, 2018). Propolisin toplandığı bitki kaynaklarının bilinmesi, bölgelere göre kimyasal içeriği oldukça farklılık gösteren propolisin standardizasyonun oluşturulması açısından büyük önem taşımaktadır (Salatino, A., & Salatino, M. L. F., 2018).

Propolis antibakteriyel, lokal anestezi, antiviral, antiinflamatuvar, antifungal, antiprotozoal ve bağışıklığı uyarıcı gibi birçok farklı farmakolojik ve biyolojik özelliklere sahiptir (Azza, & Abd-El-Rhman, 2009). Bu özellikleri nedeniyle insanların ilgisini tıp alanında eski çağlardan beri çekmiş ve Mısır, Kuzey Afrika ve Avrupa' da, Roma ve Yunanistan'da çeşitli hastalıkların etkisinin azaltılabilmesi ve tedavisi için kullanılmıştır (Castolda, & Capasso, 2002; Albayrak, & Albayrak, 2008). Propolis doğal bir antibiyotik olarak ilk kez Yunanlılar tarafından kullanılmıştır (Kutluca, Genç, & Korkmaz, 2006; Albayrak & Albayrak, 2008). Günümüzde de doğal ürünlere olan ilginin artmasına bağlı olarak de propolis birçok farklı ülke de farklı amaçlar doğrultusunda kullanılmaktadır.

Arılar Tarafından Propolis Üretimi ve Kovandan Hasat Edilmesi

Propolis genellikle ağaçların üst kısımlarından toplandığı için arıların propolis toplama davranışlarını gözlemlemek zordur. Arılar çeşitli bitkilerin koruyucu reçinelerini, ön bacaklarının da yardımıyla alt çeneleriyle kazıyarak toplayıp ağızda nemlendirip yumuşatarak burada salgıladıkları aktif enzimlerle pelet halini getirirler daha sonra bu peleti ön bacaklarının yardımıyla arka bacadaki polen sepetine propolis olarak iletirler (Ghisalberti, 1979; Krell, 1996; Doğan, & Hayoğlu, 2012). Arının taşıyabileceği propolis yükünü depolaması 15-16 dakika sürmektedir. Polen sepetini yeteri kadar propolis ile dolduran tarlacı arı bunu kovana taşır. Genç işçi arılarda propolisi taşıyıcı arının polen sepetinden parça parça alır ve kullanacakları yerlere bastırarak yapıştırır (Genc, & Dodoloğlu, 2011; Pehlivan, Şahinler, & Gül, 2012).

Arılar taşıdıkları propolisi, kovanda bulunan gerekli yerleri kapatmak amacıyla biraz bal mumu ekleyerek harmanlarlar. Propolisin yükünün boşaltılması propolis getiren işçi arının sayısına göre değişiklik gösterir. Bu boşaltma işlemi bir ile birkaç saat arasında değişiklik göstermektedir (Kumova, Korkmaz, Avcı, & Ceyran, 2002).

Arılar en çok yazın son günleri ve sonbahar aylarında kovana propolis getirir (Genc, & Dodoloğlu, 2011; Pehlivan *vd.*, 2012). Arılar propolis toplama işleminde sıcaklık derecesine dikkat eder ve genellikle toplama işlemi sıcak günlerde veya günün sıcak saatlerinde gerçekleştirilir (Hepburn, & Kurstjens, 1984; Pehlivan *vd.*, 2012). Genel olarak öğlene doğru toplama işine başlayıp saatin ilerlemesi ve sıcaklığın artmasıyla propolis toplama çalışmalarını hızlandırır (Kaal, 1992; Pehlivan *vd.*, 2012). Nektar akımının yoğun olduğu zamanlarda arıların propolis toplama eğilimleri azalma göstermektedir. Bununla birlikte propolis toplamak için en uygun mevsim bölgeden bölgeye göre değişiklik göstermektedir. Batı ve Doğu Avrupa'da sonbahar ve yaz ortasında, İtalya'da yaz ve bahar aylarında, Amerika Birleşik Devletlerinde yaz ve yaz sonunda gerçekleştirilmektedir. Ülkemizde ise Orta ve Doğu Anadolu'da ağustos ve eylül aylarında, Ege bölgesinde mart ayında arılar tarafından propolisin toplanmakta olduğu tespit edilmiştir (Kumova *vd.*, 2002).

Arılar tarafından kovana getirilen propolis, kovan duvarlarının bir spatül yardımıyla kazınması veya kovanların üstüne yerleştirilen plastik/ahşap/paslanmaz çelik gibi tuzaklar yardımıyla toplanmaktadır (Waykar, & Alqadhi, 2016). Propolisin ortalama üretimi, yıllık olarak koloni başına 10-300 g kadar değişim göstermektedir. Fakat bu üretim arı ırkına,

bölgenin iklime, bitkisel çeşitliliğine ve propolis toplama şekline (tuzaklama, kazıma vs.) göre değişiklik göstermektedir (Pehlivan *vd.*, 2012).

Arılar tarafından üretilen ve kovandan toplanan propolis derin dondurucuya kaldırılarak dondurulur. Propolis sert ve kuru durumdayken ufalanarak ezilir, ezilen propolis cam kavanoza alınarak üzerine ılık su eklenir ve karıştırılır. Propolisin içinde bulunan yabancı maddeler kavanozun içine çökerek propolis temizlenmiş olur. Bu temizlenmiş şekli ile kuru ortamda plastik bir torba içerisinde bir yılı aşkın bir süre muhafaza edilebilir (Kumova *vd.*, 2002).

Propolisin saflığının ve doğallığının sağlanması için muhafaza edilmesi aşamaları oldukça önemlidir. Hasat edilmesinden ekstrakte edilmesi aşamasına kadar maksimum biyolojik yararlılığı sağlayacak biçimde işlem görmesine dikkat edilmedilir. Ürüne dönüşen propolisin muhafaza şartlarına uyulmakla birlikte ışıktan ve yüksek sıcaklıktan korunmalıdır. Propolisin bir yan etkisi bilinmemekle birlikte, çok nadirde olsa alerjik bir reaksiyona neden olabilir. Bu durumlarda tüketilmemeli ve tüketilmeden önce de mutlaka hekime danışılmalıdır. Propolis ağız, anüs, burun ve deri yoluyla kullanılabilir (Ghisalberti, 1979; Hartwich, Legutko, & Wszolek, 2000; Yücel, Topal, Akçiçek, & Kösoğlu, 2014).

Propolisin Fiziksel Özellikleri

Propolis, 30 °C'nin üzeri sıcaklıklarda, esnek, yumuşak ve oldukça fazla yapışkan bir materyaldir ve erime derecesi 80-105 °C arasında değişmektedir (Jong-Sung, & Kun-Suk, 1997). 15 °C'den daha düşük sıcaklıklarda donmaya yakın, kırılabilir ve sert bir hal almaktadır (Bankova, Popova, Bogdanov, & Sabatini, 2002). Hoş ve aromatik bir kokusu olup acı/yakan bir tada sahiptir sarıdan kahverengiye, kahverengiden yeşile, kahverengiden koyu kırmızıya değişen bir renge sahiptir. Propolisin kokusu ve rengi büyük ölçüde kovanın etrafında bulunan bitkilerin botaniksel kaynağına, bulunduğu coğrafi konuma ve iklim koşullarına göre değişiklik göstermektedir (Stock, Finger, & Schmidt, 2014; Çerçiler, 2016).

Propolisin Kimyasal İçeriği ve Özellikleri

Propolis, sağlık için vücut yoluyla alınması gereken 22 besini kimyasal yapıda barındırması bakımından bulunduğumuz yüzyılda keşfedilen doğal ilaç özelliği ile önem kazanan bir üründür (Kumazawa, 1994; Doğan, & Hayoğlu, 2012). Propolisin kimyasal bileşimi oldukça kompleks ve değişken olup toplandığı bitki kaynağı, arı türü, arı ırkı ve mevsime göre değişiklik göstermektedir (Moreno, Isla, Sampietro, & Vattuone, 2000; Öztürk, 2006; Yücel *vd.*, 2014). Propolisin kimyasal bileşimi son derece karmaşık olup 300'den fazla bileşik içermektedir (Waykar, & Alqadhi, 2016; Bankova, Castro, & Marcucci, 2000). Ana bileşenleri reçine (%50 -%70), yağ ve balmumu (% 30 -% 50), polen (% 5 -% 10) ve

aminoasitler, mineraller, şekerler, B, C ve E vitaminleri, flavonoidler, fenol ve aromatik bileşiklerdir (Ahangari, Naseri, & Vatandoost, 2018). Propolisin içeriğinde yaklaşık olarak %60.2 oranında lipidler yer almaktadır. Bu %60.2 'nin %49.09'nu yağ asitleri %50.91'ini hidrokarbonlar, uzun zincirli alkoller ve steroller oluşturmaktadır. Palmitik asit ve steraik asit doymuş yağ asitlerine örneklerdir. Doymamış yağ asitlerinden eikosapentaenoik, nervolik, lineoleik, oleik ve linolenik asitler propolis de bulunmaktadır (Dığrak, Yılmaz, Çelik, & Yıldız, 1995; Greenaway, Scaysbrook, & Whatley, 1987; Hepşen, Tilgen, & Er, 1996). Propolisin yapısında aynı zamanda glukoz, fruktoz ve sükroz gibi şekerler de bulunmaktadır (Bankova *vd.*, 1992; Hepşen *vd.*, 1996; Garcia- Vugiera, Ferreres, & Tomas-Barberan, 1993). Ayrıca Krell (1996) yaptığı çalışmada propolisin kimyasal yapısında Ca, Mg, I, Na, Mn K, Zn, Cu ve Fe vb. elementlere ilave olarak B1, B2, B6, C ve E vitaminleri ile birçok yağ asitini barındırdığı tanımlamıştır. Aynı zamanda propolisin glukoz-6-fosfataz, süksinik dehidrogenaz, adenzin trifosfataz ve asit fosfataz gibi enzimler içerdiğini de tespit etmiştir (Krell, 1996; Pehlivan *vd.*, 2012). Scheller (1990) yaptığı bir çalışma sonucunda propolisin majör bileşenlerinin fenolik bileşikler olduğu ve bunların içinde en fazla tespit edilen grubun flavonoidler olduğunu göstermiştir (Pehlivan *vd.*, 2012). Bu bileşikler propolisin antioksidant, antikarsinojenik, antimutajenik ve antiinflamatuvar gibi biyolojik aktivitelerinden sorumludur (Huang, Zhang, Wang, & Hu, 2014).

Ekstraksiyon Yöntemleri

Propolisin kimyasal bileşimi biyolojik aktivitesinde çok önemli bir yere sahiptir. Bu nedenle ekstraksiyon yöntemleri başta flavonoidler ve fenolik bileşikler olmak üzere diğer biyoaktif bileşiklerde hasara sebep olmayacak şekilde geliştirilmiştir. Çeşitli konsantrasyonlarda en sık kullanılan çözücü, sulu bir alkol çözeltisidir (etanol veya metanol) (Park, & Ikegaki, 1998; Margeretha, Suniarti, Herda, & Alim, 2012) (Cunha *vd.*, 2004; Margeretha *vd.*, 2012). Yapılan araştırmalarda %70 etanol kullanılması durumunda %20-30 oranında balmumu kalıntısında rastlandığı için (Margeretha *vd.*, 2012) propolisin mumlar hariç aktif bileşenlerinin çoğunun %70 etanol de çözüldüğü bildirilmiştir (Bankova, Christov, Stoev, & Popov, 1992; Margeretha *vd.*, 2012). Çözücü olarak etanolün kullanıldığı durumda balmumu miktarına bağlı olarak propolisin %50-70'lik bir bölümü ve suyun kullanıldığı durumlarda ise propolisin %10'luk bir kısmı çözünmektedir (Margeretha *vd.*, 2012).

Propolis ekstraksiyonunda en yaygın olarak kullanılan yöntem geleneksel ekstraksiyon yöntemi olarak bilinen maserasyon yöntemidir. Bu yöntem diğer yöntemlere kıyasla daha fazla vakit almaktadır. Son zamanlarda, organik bileşiklerin katı matrislerden hızlı ve verimli bir

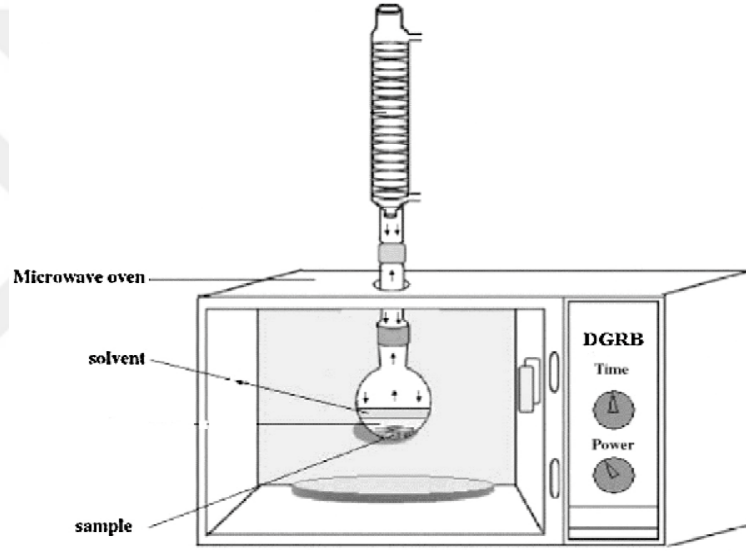
şekilde çıkarılması için mikrodalga ve ultrasonik destekli ekstraksiyon gibi modern ekstraksiyon yöntemleri geliştirilmiştir (Trusheva, Trunkova, & Bankova, 2007).

Ekstraksiyon, ham maddeden hedeflenen doğal ürünleri ayırmanın ilk basamağıdır. Ekstraksiyon yöntemleri arasında ekstraksiyon prensibine göre solvent ekstraksiyonu, damıtma metodu, presleme ve süblimasyon bulunmaktadır fakat bu yöntemler arasında solvent ekstraksiyonu en yaygın kullanılan yöntemdir. Doğal ürünlerin ekstraksiyonu; sırasıyla çözücünün katı matrise girmesi, çözünen maddelerin çözücü içinde çözünmesi, çözünen maddenin katı matristen ayrılması ve ekstrakte olmuş olan çözünen maddelerin toplanması aşamalarından oluşur. Bu aşamalarda ekstraksiyon çözücüsünün özellikleri, ham maddenin partikül büyüklüğü, ekstraksiyon sıcaklığı ve ekstraksiyon süresi gibi faktörler ekstraksiyon verimliliğini etkilemektedir (Zhang *vd.*, 2018). Yeni teknolojilerin gelişmesiyle, ekstraksiyon işleminin anlayış biçimi ilerlemiştir. Mikrodalga destekli ekstraksiyon, basınçlı ekstraksiyon (veya hızlandırılmış solvent ekstraksiyonu), süperkritik ekstraksiyonu, ultrasonik destekli ekstraksiyon gibi bazı modern veya yeşil ekstraksiyon metotları da doğal ürünlere uygulanmıştır ve kısa ekstraksiyon süresi, düşük organik solvent tüketimi ve daha yüksek seçicilik gibi bazı avantajlar sunmaktadır (Pawliszyn, 2003; Büyüktuncel, 2012).

Geleneksel bir yöntem olan maserasyon, kullanılacak numunenin uygun miktarlarda boyut küçültme işlemlerinden sonra ilgili solvent içerisinde çoğunlukla oda sıcaklığında kapalı bir kaptaki belirli bir süre bekletilerek ve karıştırılarak ekstrakte edilmesine dayanan kolay bir işlem olmasına rağmen verimi düşüktür (Silici, & Kutluca, 2005). Bu yöntem, bitki özlü olan ham maddelerin solvent ekstraksiyonu işlemi için kullanılan en yaygın ve en eski yöntemdir (İlbay, 2016).

Doğal ürünlerin ekstraksiyonu aşamasında son yıllarda yaygın olarak kullanılan diğer bir yöntem ise mikrodalga destekli solvent ekstraksiyonudur. Bu yöntem, klasik tekniklerinkine benzer ekstraksiyon verimi ile çözücünün katı matrislerden hızlı bir şekilde çıkarılmasını sağlamaktadır fakat çözücü miktarının, çözücü atığının ve çevreye çözücü salınmasının azaltılması gibi avantajlara sahiptir. Mikrodalgalar yüksek frekanslı elektromanyetik dalgalardır. Mikrodalga enerji kullanılarak ısıtmanın prensibi, iyonların iletimi ve dipol rotasyonu (dönme) aracılığıyla molekül üzerine mikrodalganın direkt olarak etki etmesi temeline dayanmaktadır. Gerçekleşen çoğu uygulamalarda bu iki mekanizma eş zamanlı olarak işlemektedir. Çözeltinin bu iyon akışına karşı göstermiş olduğu direnç sürtünme ile sonuçlanır ve bunun neticesinde mevcut çözeltinin ısısı artmış olur (Camel, 2001; Büyüktuncel, 2012). Bu ekstraksiyon yönteminde mikrodalga ışınması, ekstraksiyon için kullanılan çözücü ve sonuç olarak örneği ısıtmak için kullanılmaktadır. Başarılı bir ekstraksiyon gerçekleştirmek için

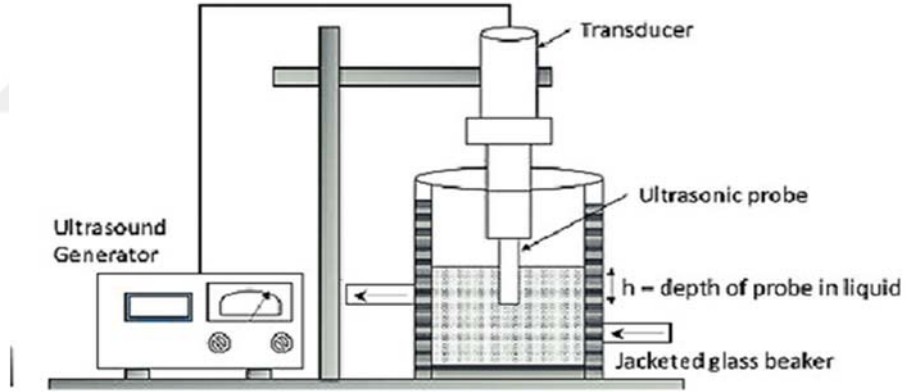
uygun çözücü seçimi oldukça önemlidir eğer ki seçilen çözücü çok kuvvetli bir ısınmaya sebebiyet verirse ekstrakttaki bileşiklerin parçalanması gerçekleşir (Büyüktuncel, 2012). Geleneksel temas yoluyla ısı iletimi metotlarının tersine, mikrodalgalar mevcut numunenin bütün hepsini bir anda ısıtmaktadır. Mikrodalga destekli ekstraksiyon farklı iki sistemle gerçekleştirilmektedir. Bu sistemlerin en yaygını basınç ve sıcaklığı kontrol edilebilen kapalı bir kaptaki kapalı sistem ekstraksiyonudur. İkinci sistem ise atmosferik basınç altında açık bir kap içerisinde yürütülmektedir. Kullanılan çözücü miktarının ve ekstraksiyon süresinin daha düşük olması bu sistemin avantajıdır. Mikrodalga destekli ekstraksiyon metodu sayesinde bitkilerde mevcut olan polifenoller ve lignanlar ayrıştırılabilmektedir (Kaufmann, & Christen 2002; Kaufmann, Rudaz, Cherkaoui, Veuthey, & Christen, 2007; Beejmohun *vd.*, 2007; Kılıç, 2010).



Şekil 1. Mikrodalga şematik diyagramı.

Son olarak yaygın olarak kullanılmaya başlanılan ses dalgaları-destekli sıvı ekstraksiyonu diğer adı ile ultrasonik destekli ekstraksiyon yönteminde kullanılan örneğe 20 kHz'dan daha yüksek frekanslarla titreşimler uygulanır. Bu titreşimler sıvının içinden geçerken kavitasyon (boşluk) meydana gelir. Ultrasonik enerjinin neden olduğu bu kavitasyon etkisi sıvı olan ortamda çok fazla sayıda küçük kabarcıklar meydana getirir ve katıların mekanik olarak sarsılmasına sebebiyet vererek partiküllerin kopmasını sağlar. Ses dalgaları genellikle analitin iyi geri başarısıyla meydana gelen katı ve solvent arasında etkin bir temas sağlar (Capelo, & Mota, 2005; Büyüktuncel, 2012). Ses dalgaları katı ekstraksiyon için kullanılırken çamur oluşumunu sağlarken, sıvılar için ise homojenizasyon veya emülsiyon işlevinde kullanılmaktadır (Vinatoru, 2001; Tadeo, Sanchez-Brunete, Albero, & Garcia-Valcarcel, 2010;

Büyüktünel, 2012). Katı örneklerden analitlerin ekstraksiyon işlemi, su banyosuna ultrasonik radyasyon verilmesiyle veya prob (ultrasonik aygıtların ucunda bir alıcı bulunan hareketli kısmı) gibi cihazlarla gerçekleştirilir (Santos, & Capelo, 2007; Büyüktünel, 2012). Yaygın olarak kullanılan ve bununla birlikte en ucuz maliyeti olan ultrasonik radyasyon kaynakları ultrasonik banyolardır (Huertas-Perez, 2006; Büyüktünel, 2012). Bununla birlikte gelişen teknoloji ile birlikte numunelerin sonikasyonu için güçlü-silindirik bir prob kullanan daha etkili bir sistem de geliştirilmiştir (Lesueur, Gartner, Mentler, & Fuerhacker, 2008; Büyüktünel, 2012). Ultrasonik banyo ve ultrasonik prob arasındaki seçim analizin amacına göre değişkenlik gösterir. Amaç toplam katı-sıvı ekstraksiyonu ise ihtiyaç duyulan zaman daha az olduğu için prob kullanımı daha iyi sonuç verebilir. Bununla birlikte numune sayısının fazla olması durumunda ultrasonik banyo kullanılması uygun bir seçenek olabilir. Sonikasyon problemlerinin ultrasonik banyoya karşı kullanımı, enerji dağılımında homojeniteyi daha iyi sağlar. Fakat ultrasonik uçlar (problar) maliyet açısından daha pahalı, ömrü daha kısa ve daha az miktarda örnek işlenmesine olanak sağlar (Tadeo *vd.*, 2010; Büyüktünel, 2012).



Şekil 2. Ultrasonik şematik diyagramı.

Propolis ile İlgili Yapılan Çalışmalar

Antioksidan, antibakteriyel, antifungal, antiinflamatuvar, antikarsinojenik, antiviral gibi biyoaktif özellikleri sayesinde propolis üzerine olan araştırmaların sayısı artmaya başlamıştır. Propolisin düzenli ve sürekli kullanımı durumunda tüm vücuttaki patojenlere karşı etkili bir savunma oluşur ve sentetik antibiyotiklerin tersine uzun süre kullanımında zararlı bakterilere karşı direnç oluşturmamakta, yararlı bakterileri de olumsuz olarak etkilememektedir. Propolisin bağışıklık sistemini önemli derecede arttırdığı ve antikor salgılanmasını arttırarak ilaçların

etkilerini arttırdığı gösterilmiştir (Kutluca *vd.*, 2006). Propolisin antimikrobiyal aktivitesiyle ilgili bazı çalışmalar yapılmıştır. Bu çalışmalar doğrultusunda propolisin yalnızca gram pozitif bakteriler ile bazı funguslara karşı aktif olduğu (Marcucci, 1995; Nieva, Isla, Cudmani, Vattuone, & Sampietro, 1999; Albayrak ve Albayrak, 2008), gram negatif bakterilere karşı ise zayıf bir aktivite sahip olduğu gösterilmiştir (Sforcin, Fernandes, Lopes, Bankova, & Funari, 2000; Grange, & Davey, 1990; Dobrowolski *vd.*, 1991; Çerçiler, 2016). Genellikle gram pozitif bakterilerin, gram negatif bakterilere göre propolise karşı daha hassas olduğu rapor edilmiştir (Mirzoeva, Grishanin, & Calder, 1997; Hepşen, 1996).

Farklı araştırmacılar tarafından Türkiye'nin farklı bölgelerinden elde edilen propolis örnekleri incelenmiş ve antimikrobiyal etkisi üzerine çalışmalar yapılmıştır. Bayram *vd.* (2017), yaptığı bir çalışmada test edilen tüm mikroorganizmaların (*Staphylococcus aureus* NCTC 10788, *Staphylococcus epidermidis*, *Corynebacterium diphtheria*, *Enterococcus faecalis* NCTC 12697, *Bacillus cereus* ATCC 10876, *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli* NCTC 9001, *Klebsiella pneumonia*, *Pseudomonas aeruginosa* NCTC12924, *Candida albicans* ATCC), *Klebsiella pneumoniae* dışında propolis ekstraktına karşı hassas olduğunu ve antimikrobiyal duyarlılık testi sonuçlarına göre propolis örneğinin inhibitör etkisinin ampisilinden biraz daha zayıf ancak daha geniş bir spektruma sahip olduğunu bildirmişlerdir.

Anadolu'dan topladığı çeşitli propolis numunelerinde propolisin etil alkol ekstraktının *Enterococcus faecalis*, *Streptococcus sobrinus*, *Micrococcus luteus*, *Candida albicans*, *C. krusei*, *Staphylococcus epidermidis*, *Streptococcus mutans*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Enterobacter aerogenes* ve *C.tropicalis* (MIC = 16 µg/mL), *Pseudomonas aeruginosa* ve *Salmonella typhimurium* 'ya karşı etki gösterdiği belirtilmiştir (Uzel *vd.*, 2005). Benzer olarak, Türkiye'nin değişik bölgelerinden orijinlenen propolislerin etanol ekstraktı ile yapılan bir çalışmada ise, propolis ekstraktının *Morganella morganii* (klinik izolat) ve *Klebsiella pneumoniae* ATCC 27736'ye karşı etki göstermediği fakat gram negatif bakteriler arasında *E. coli* ATCC 35218'nin gelişiminde güçlü inhibitör etki oluşturduğu bildirilmiştir (Katircioğlu, & Mercan, 2006). Basim *vd.* (2006) tarafından Hatay'dan toplanan propolisin metanollü ekstraktlarının 13 farklı bitkinin bakteriyel patojenlerine karşı antibakteriyel aktiviteye sahip olduğu raporlarla gösterilmiştir. Muğla bölgesinden toplanan 45 adet propolis numunesinin dimetil sülfoksit ve aseton ekstraktlarının antimikrobiyal aktivitelerinin farklılık gösterdiği belirlenmiş ve bu değişikliğin propolis numunesinin orijinine, kullanılan doza ve ekstraksiyon çözücüsüne bağlı olduğu bildirilmiştir (Uğur, & Aslan, 2004; Albayrak ve Albayrak, 2008). Marmaris ve Kazan coğrafik orijinli propolis örnekleri ile yapılan bir çalışmada, antimikrobiyal özelliğin propolisin etken maddelerinden olan kafeik asit ve

esterlerden kaynaklandığı belirtilmiştir (Kartal, Yıldız, Kaya, Kurucu, & Topçu, 2003). Propolisin etanol ekstraktının gram pozitif koklara karşı yüksek antibakteriyel aktivite sergilerken gram negatif bakteri ve mayalara karşı düşük etki gösterdiği rapor edilmiştir (Silici, & Kutluca, 2005; Çerçiler, 2016).

Benzer şekilde Türkiye dışında farklı ülkelerde de çeşitli propolislerin antimikrobiyal aktivitesi üzerine çalışmalar yürütülmüştür. Brezilya propolisi ile yapılan bir araştırmada propolis ekstraktlarının *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* bakterilerine karşı etkinliği olduğu rapor edilmiştir (Neto *vd.*, 2017). Bununla birlikte, 10 Bolivya propolisinin gram negatif ve gram pozitif bakterilere karşı etkisinin araştırıldığı çalışmada, bazı fenolikler açısından zengin propolis örneklerinin en iyi antibakteriyel etkiye sahip olduğu bildirilmiştir (Nina *vd.*, 2016). Ek olarak Kalogeropoulos, Konteles, Troullidou, Mourtzinou ve Karathanos (2009) propolisin inhibitör spektrumunun daha geniş olduğunu ve aktivitesinin nisin ile karşılaştırıldığında çok düşük konsantrasyonlarda bile daha güçlü olduğunu belirlemiştir.

Chang, Yang, Wen ve Chern (2002) de yaptıkları çalışmada Tayvan, Brezilya ve Çin'den topladıkları propolis örneklerini maserasyon yöntemi kullanarak %95'lik etanol ile ekstrakte edip toplam flavonoid içeriği belirlemek için alüminyum klorür ve 2,4-dinitrofenilhidrazin yöntemlerini kullanmışlardır. Çalışmada kullanılan propolis örneklerinin toplam flavonoid içeriğinin 10.38 ± 0.14 ile 24.91 ± 0.53 arasında değiştiğini belirtmişlerdir.

Cunha *vd.* (2004) maserasyon süresinin propolisin ekstraktları üzerine verimini inceledikleri çalışmada 10, 20 ve 30 günlük maserasyon sürecinde propolisin kompozisyonun nitel olarak aynı görüldüğünü fakat veriminde hafif bir artış olduğunu bildirmişlerdir.

Cunha *vd.* (2006), yaptıkları çalışmada 20 gün, 30 gün, 6 ay ve 1 yıla kadar uygulanan maserasyon süresinin Brezilya propolisinin kimyasal kompozisyonu üzerine etkisini incelemişlerdir. Bu araştırmacılar ham propolis için uygulanan maserasyon süresinin verimi etkilediğini ve elde edilen bileşenlerin veriminin 20 günlük maserasyondan sonra % 60.1 (m/m)'den 1 yılsonunda % 67.0 (m/m)'ya yükseldiğini rapor etmişlerdir. Aynı araştırmacılar maserasyon ekstraksiyonuna kıyasla mikrodalga destekli ekstraksiyon ve ultrasonik destekli ekstraksiyon yöntemlerinin daha az zamanda daha yüksek ekstraksiyon verimi ortaya çıkardığını bildirerek en etkili yöntemin ultrasonik destekli ekstraksiyon yöntemi olduğunu bildirmişlerdir.

Trusheva *vd.* (2007) yaptıkları çalışma da kavak tipi propolisin biyolojik olarak aktif bileşenlerinin ekstraksiyonu için maserasyon, ultrasonik ve mikrodalga destekli ekstraksiyon

teknikerinin verimlerini karşılaştırmışlardır. Yapılan çalışmada üç yöntem ile de fenolikler ve flavonoidlerin toplam miktarları belirlenmiş ve yöntemlerin etkinliği karşılaştırılmıştır. Mikrodalga destekli ekstraksiyonun çok hızlı olmasına rağmen büyük miktarda fenolik ve flavonoid olmayan maddelerinde ekstrakte edilmesine yol açtığını, bununla birlikte ultrasonik destekli ekstraksiyon ile fenoliklerin en yüksek miktarının ekstrakte edildiğini belirtmişlerdir. Sonuç olarak bu araştırmacılar maserasyon ekstraksiyonu ile karşılaştırıldığında, mikrodalga ve ultrasonik ekstraksiyon metotlarının kısa zaman dilimleri ve daha az emek gerektirdiğini ve yüksek ekstraksiyon verimi sağladığını bildirmişlerdir. Ultrasonik ekstraksiyonun verim, ekstraksiyon süresi ve seçiciliği noktasında en etkili yöntem olduğu araştırmacılar tarafından ifade edilmiştir.

Margeretha vd. (2012) *Trigona* spp.'den elde edilen Endonezya propolisinin biyolojik olarak aktif bileşenleri olan polifenolik bileşikler ekstrakte etmek için üç farklı yöntemi (geri akış, maserasyon, mikrodalga) denemişlerdir. Çalışmalarında ekstraksiyon süresi, çözücü (etanol) konsantrasyonu ve mikrodalga gücü gibi ekstraksiyon parametrelerini optimize etmeyi amaçlamışlardır. Optimum koşullar altında, maserasyon ve geri akış yönteminin sonuçlarının benzer olduğunu ve flavonoid-total fenolik veriminin sırasıyla %0.2 ve %4 olduğunu saptamışlardır. Mikrodalga ekstraksiyonunda flavonoidler ve toplam fenolik içeriğinin %0.4 ve %5.8 olduğunu ve verimin arttığını tespit etmişlerdir. Sonuç olarak bu araştırmacılar verim, ekstraksiyon süresi ve çözücü tüketimi göz önüne alındığında, mikrodalga ekstraksiyon yönteminin flavonoid ve toplam fenolik madde özütlenmesinde diğer iki yönteme göre daha etkili ve seçici olduğunu bildirmişlerdir.

Jug, Koncic ve Kosalec (2014) Zagreb yakınlarındaki arı kovanlarından elde ettikleri ham kavak propolislerini maserasyon ve ultrasonik destekli yöntemi kullanarak ekstrakte etmişlerdir. Araştırmacılar ekstraksiyon verimi, antioksidan potansiyel ve antimikrobiyal aktivitenin ekstraksiyon prosedürüne bağlı olarak oldukça değişkenlik gösterdiğini tespit etmişlerdir. Ayrıca maserasyona kıyasla, ultrasonik destekli ekstraksiyonun propolisteki biyoaktif bileşiklerin ekstraksiyonu için çok daha verimli bir ekstraksiyon metodu olduğu rapor etmişlerdir.

Devequi-Nunes vd. (2018) yaptıkları çalışmada Brezilya'daki farklı bölgelerden toplanan kırmızı, yeşil ve kahverengi propolis örneklerini geleneksel yöntem (maserasyon) ve süperkritik ekstraksiyon yöntemi ile ekstrakte etmişlerdir. Araştırmacılar ekstraksiyon yönteminin ve propolisin botanik kökeninin çalışılan parametreler üzerine etkili olduğunu rapor etmişlerdir. Süperkritik akışkan ile ekstraksiyonun etanolik ekstraktlarla karşılaştırıldığında, en yüksek antioksidan bileşikler içeren ekstraktları elde etmek için verimli olmadığını

saptamışlardır. Araştırcılar, geleneksel ekstraksiyon metodunun (etanolik) antioksidan bileşiklerinin ekstraksiyonu için daha iyi sonuç verdiğini ve daha yüksek bir seçicilik gösterdiği belirtmişlerdir. Ek olarak kırmızı propolis tipinin antioksidan bileşikleri daha yüksek oranda içeriğini ve biyolojik potansiyelinin daha fazla olduğu bildirmişlerdir.

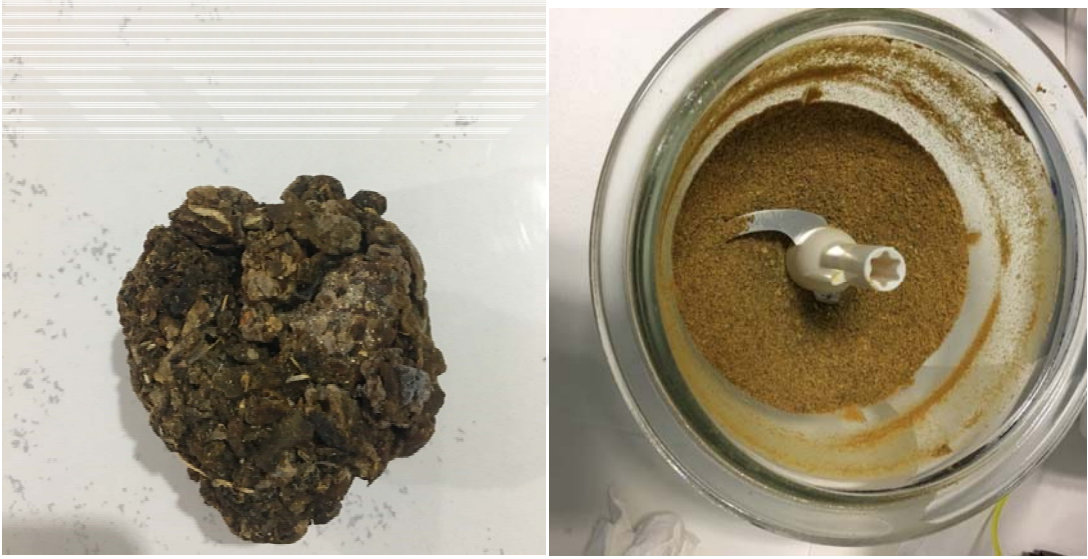


ÜÇÜNCÜ BÖLÜM

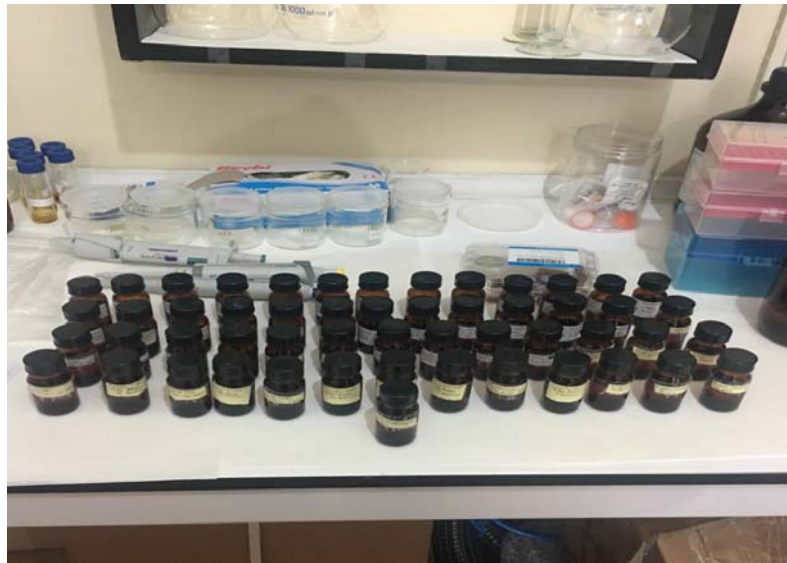
Materyal ve Yöntem

Propolisin Elde Edilmesi

Propolis örnekleri Kütahya'nın Gediz ilçesindeki bir arı kovanından kazıma yöntemi kullanılarak temin edilmiştir. Toplanan propolis örneği kapalı bir kaptaki -80°C'de 24 saat muhafaza edildikten sonra bir öğütücü yardımıyla toz haline getirilerek ekstraksiyon işlemine hazır hale getirilmiştir. Kovandan toplanan ham propolis ile toz haline getirilmiş propolis örneği Şekil 3'de gösterilmiştir. Ayrıca elde edilen ekstraktlar Şekil 4'de sunulmuştur.



Şekil 3. Kovandan toplanan ham propolis ile toz haline getirilen propolis örneği.



Şekil 4. Farklı ekstraksiyon teknikleri kullanılarak hazırlanan propolis ekstraktları.

Kullanılan Kimyasallar

Seryum(IV) sülfat tetrahidrat ($Ce(SO_4)_2 \cdot 4H_2O$), Folin-Ciocalteu fenol reaktifi, bakır(II) klorür dihidrat, neokuproin (2,9-dimetil-1,10-fenantrolin) (Nc), ($CuCl_2 \cdot 2H_2O$), TE (6-hidroksi-2,5,7,8-tetrametilkroman-2-karboksilik asit) (TR), kuersetin dihidrat (QR), kateşin (CAT), gallik asit (GA), cyanidin-3-sophoroside, sülfürik asit (H_2SO_4), hidroklorik asit (HCl), etil alkol (EtOH), amonyum asetat (NH_4AC), sodyum nitrit ($NaNO_2$), alüminyum klorid ($AlCl_3$), potasyum klorür (KCl), sodyum asetat (NaAc), sodyum hidroksit (NaOH), metil akol, isobutil alkol, whatman no:1, polipropilen filtre (0,45 μm). Kullanılan kimyasallar analitik saflıktadır.

Kullanılan Cihazlar

Çalışmalar esnasında kullanılan cihazların listesi Tablo 1’de sunulmuştur.

Tablo 1. *Kullanılan Cihazların Özellikleri*

Cihaz Adı	Cihaz Markası
Saf Su cihazı	Elga
Etüv	Heraeus
Buzdolabı	Thermo Scientific
Parçalayıcı	Wisetis
Ultrasonik Homojenizatör	Sonics Material
Mikrodalga Ekstraktörü	Milestone
Microplate Reader	Epoch
UV-vis spektrometre	Varian
Mini karıştırıcı	Heidolph
Ultrasonik su banyosu	Bandelin
Makro ve mikropipetler	Eppendorf
Hassas Terazi	Gec avery

Maserasyon ile Propolis Ekstraktlarının Elde Edilmesi

Maserasyon yöntemi kullanılarak örnek hazırlama işlemi Ecem Bayram *vd.* (2018)’in önerdiği metot modifiye edilerek uygulanmıştır. Toz haline getirilmiş olan 2 gr propolis örneği üzerine 100 mL %70’lik etil alkol eklenerek 30 °C’de 200 devirde bir karıştırıcıya (hot-plate) yerleştirilmiştir (Şekil 3.3). Deney planına uygun olarak 1,2,5,10,15,20,25,30. günlerin sonunda propolis örneği sırasıyla Whatman 4 ve Whatman 1 filtre kağıtları kullanılarak cam şişelere filtre edilmiştir. Süzme işleminden sonra elde edilen bu karışım 15 dakika 4000-5000 rpm’de santrifüj edilmiştir. Santrifüj işlemi bitince süpernatant kısmı amber bir şişeye alınarak +4°C de analiz zamanına kadar bekletilmiştir.



Şekil 5. Ekstraksiyon aşaması.

Mikrodalga Destekli Ekstraksiyon

Toz haline getirilmiş propolis örneğinden 2 gram cam şişelere tartılmış ve üzerine %70'lik etil alkol eklenmiştir. Ekstraksiyon işlemi için Tablo 2'de belirtilen parametrelere göre uygulamalar gerçekleştirilmiş ve ekstraktlar elde edilmiştir. Karışımlar sırasıyla Whatman 4 ve Whatman 1 filtre kâğıtlarından süzülerek cam şişelere aktarılmış ve 15 dakika 4000-5000 rpm'de santrifüj edilmiştir. Santrifüjden sonra elde edilen süpernatantlar amber şişelere transfer edilerek analizlere kadar +4 °C'de bekletilmiştir.

Tablo 2. Mikrodalga Ekstraksiyon Yönteminde Uygulanan Parametreler

Ekstraksiyon Parametresi	Güç (watt)	Zaman (dakika)
A1	50	2
A2	50	4
A3	50	6
A4	50	8
A5	50	10
B1	100	2
B2	100	4
B3	100	6
B4	100	8
B5	100	10
C1	200	2
C2	200	4
C3	200	6
C4	200	8
C5	200	10
D1	400	2
D2	400	4
D3	400	6
D4	400	8
D5	400	10
E1	500	2
E2	500	4
E3	500	6
E4	500	8
E5	500	10

Ultrasonik Destekli Ekstraksiyon

Toz haline getirilmiş propolis örneğinden 4 gr tartılarak 200 mL hacimli cam behere koyulmuştur. Tartılan propolis örnekleri üzerine %70'lik etil alkolden 200 mL ilave edilmiştir. Daha sonra propolis örnekleri 20 kHz frekans ve maksimum 750 watt gücünde ultrasonik homojenizatör ile belirlenmiş sinyal gücünde ve işlem süresinde ekstrakte edilmiştir. Ekstrakte işlemi biten örnekler sırasıyla Whatman 4 ve Whatman 1 nolu filtre kâğıtlarından cam şişelere süzölmüştür. Süzme işleminden sonra karışım 15 dakika 4000-5000 rpm'de santrifüj edilmiştir. Santrifüj işlemi bitince süpernatantlar amber şişelere aktarılmış ve analizlere kadar +4°C'de bekletilmiştir. Ultrasonik ekstraksiyon yönteminde uygulanan parametreler Tablo 3'de sunulmuştur.

Tablo 3. *Ultrasonik Ekstraksiyon Yönteminde Uygulanan Parametreler*

Ekstraksiyon Parametresi	Genlik-Amplitude (%)	Zaman (dakika)
F1	%20	5
F2	%20	10
F3	%20	20
F4	%20	30
F5	%20	60
G1	%40	5
G2	%40	10
G3	%40	20
G4	%40	30
G5	%40	60
H1	%60	5
H2	%60	10
H3	%60	20
H4	%60	30
H5	%60	60
K1	%80	5
K2	%80	10
K3	%80	20
K4	%80	30
K5	%80	60

Toplam Flavonoid Madde İçeriğinin Belirlenmesi

%5 sodyum nitrit (NaNO_2) hazırlanması için 12.5 gr alınmış 100 mL saf suda çözülerek 250 mL'lik cam balon jøjeye aktarılmış ve toplam hacim saf su ile 250 mL'e tamamlanmıştır. %10 Alüminyum klorür ($\text{AlCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$) çözeltisi için 25 gr tartılarak 150 mL saf suda çözülmüş ve balon jøjede 250 mL'e tamamlanmıştır. 1 M sodyum hidroksit (NaOH) hazırlanması için ise 40 gr tartılmış ve belli bir miktar suda çözülerek 1000 mL'lik balon jøjeye aktararak saf su ile tamamlanmıştır. x mL antioksidant çözeltisi + (4-x) mL ultra saf su + 0.3 mL % 5'lik NaNO_2 karışımı 5 dakika oda sıcaklığında bekletilerek 0.6 mL %10'luk AlCl_3 çözeltisi eklenmiş ve 6 dk oda sıcaklığında bekletilmiştir. Daha sonra 1 mL 1 M NaOH çözeltisi eklendikten sonra saf su ile toplam hacim 10 mL'ye ayarlanarak 10 dk sonra 510 nm de kör çözeltiye (antiosidan veya örnek çözelti hariç diğer reaktifleri içeren çözelti) karşı absorbansları ölçülmüştür (Chang *vd.*, 2002). Toplam flavonoid madde miktarı, kuersetin (QE) ile hazırlanan standart eğrinin denkleminde hesaplanmış ve sonuçlar g QE (kuersetin eş değeri)/g olarak ifade edilmiştir.

Toplam Fenolik Madde İçeriğinin Belirlenmesi

Folin-Ciocalteu reaktifi 1:3 (v/v) oranında 1-propanol ile seyreltilerek hazırlanmıştır. 0.1 M Sodyum hidroksit (NaOH) 'den 40 gr tartılarak bir miktar suda ultrasonik su banyosu yardımı ile çözülmüş ve 1000 mL 'lik cam balon jøjeye aktarılarak saf su ile toplam hacim 1000 mL 'ye tamamlanmıştır. 0.3 ml folin reaktifi + x ml antioksidant çözeltisi + 3 ml 0.1 M NaOH çözeltisi (6.7-x) ml H₂O olacak şekilde toplam hacim 10 mL olan çözeltiler elde edilip oda sıcaklığında 30 dk muhafa edildikten sonra 665 nm de kör çözeltiliye (antiosidan veya örnek çözelti hariç diğer reaktifleri içeren çözelti) karşı absorbansları ölçülmüştür (Berker, Olgun Özdemir, Özyurt, Demirata, & Apak, 2013). Toplam fenolik madde miktarı, gallik asit (GA) ile hazırlanan standart eğrinin denkleminde hesaplanmış ve sonuçlar g GAE (gallik asit eş değeri)/g olarak ifade edilmiştir.

Antioksidan Aktivite Tayini

Bakır(II) iyonu indirgeme antioksidan kapasite (CUPRAC) testi.

1.0×10^{-2} M Cu(II) klorür çözeltisi oluşturmak için 0.4262 g CuCl₂.2H₂O tartılıp üzerine 250 mL saf su eklenmiştir. 7.5×10^{-3} M neocuproin (Nc) çözeltisi hazırlamak için 0.156 g tartılıp etil alkolde çözünmesi sağlanıp toplam hacim 100 mL 'e etil alkol ile tamamlanmıştır. 1.0 M NH₄Ac (amonyum asetat) hazırlamak için ise 19.27 g tartıldıktan sonra bir miktar saf suda çözdürülüp toplam hacim saf su ile 250 mL 'ye tamamlanmıştır. 1.0 mL 1.0×10^{-2} M CuCl₂ çözeltisi + 1.0 mL 7.5×10^{-3} M Nc çözeltisi + 1.0 mL 1.0 M NH₄ Ac çözeltisi + x mL antioksidant çözeltisi + (1.1-x) mL H₂O reaksiyon tüpünde karıştırılarak toplam hacmi 4.1 mL olan çözeltiler elde edilmiştir. Elde edilen çözeltiler oda sıcaklığında 30 dk muhafaza edildikten sonra 450 nm absorbansları kaydedildi (Apak, Güçlü, Özyürek, & Karademir, 2004). Toplam antioksidan kapasite troluks ile hazırlanan standart eğrinin denkleminde hesaplanmış ve sonuçlar g TE (troluks eş değeri)/g olarak ifade edilmiştir.

Ce(IV) iyonu indirgeyici antioksidan kapasite (CERAC) tayini.

1.0×10^{-3} M Ce(IV) sülfat çözeltisi hazırlamak için 0.0404 g Ce(SO₄)₂.4 H₂O tartılıp üzerine bir miktar saf su eklendikten sonra 100 mL 'lik balon jøjeye aktarılmıştır. Daha sonra üzerine 17.0 mL %98'lik H₂SO₄ eklenmiş ve 100 mL 'ye saf su ile tamamlanmıştır. 1.0 mL 2.0×10^{-3} M Ce(SO₄)₂ + x mL antioksidant çözeltisi + (9-x) mL H₂O olacak şekilde toplam hacimi 10 mL olan çözeltiler hazırlanıp oda sıcaklığında 30 dk bekletildikten sonra 320 nm de kör çözeltiliye (saf suya) karşı absorbansları ölçülmüştür (Ozyurt vd., 2007). Toplam antioksidan kapasite troluks ile hazırlanan standart eğrinin denkleminde hesaplanmış ve sonuçlar g TE (troluks eş değeri)/g olarak ifade edilmiştir.

2,2-Difenil-1-pikrihidrazil (DPPH) radikal söndürücü kapasite tayini.

6 mg 2,2-Di(4-tert-octylphenyl)-1-picrylhydrazyl (DPPH) tartılarak, 25 mL HPLC saflığında metil alkol içerisinde çözülerek 5 kat seyreltme yapılarak absorbansı $0.700 \pm 0,50$ ayarlanarak ölçümlere geçilmiştir. 10 μL örneğe 190 μL DPPH çözeltisi eklenerek vorteks işlemi yapıp 45 dk bekletildikten sonra 517 nm 'de absorbans ölçülmüştür (Szabo, Iditoiu, Chambre, & Lupea, 2007). Toplam antioksidan kapasite troloks ile hazırlanan standart eğrinin denkleminde hesaplanmış ve sonuçlar g TE (troloks eş değeri)/g olarak ifade edilmiştir.

İstatiksel Analizler

Tek yönlü varyans analizi (ANOVA), iki veya daha fazla bağımsız (ilişkisiz) grup arasında istatistiksel olarak anlamlı fark olup olmadığını belirlemek için kullanılır. İstatistiksel olarak kullanılan bir diğer ifade ise "p" değeri yani olasılık (probability) terimidir. Deneyle %95 güven aralığında yapılır yani, %5 hatayı kabul ederek karşılaştırma yapıldığında, $p < 0.05$ faktörlerin istatistiksel olarak anlamlı fark olduğunu göstermektedir.

Çalışma tasarımıımızda gruplamalar yapılarak post hoc test olarak Brown-Forsythe testi uygulanmıştır. Her biri ekstraksiyon yöntemi için 5 grup uygulanmıştır (CUPRAC, CERAC, DPPH, toplam fenolik, toplam antioksidan). Brown ve Forsythe (1974) tarafından önerilen Brown-Forsythe testi klasik F testinin uyarlanmış bir biçimidir.

$$B = \frac{\sum_{i=1}^k n_i (\bar{X}_i - \bar{X})}{\sum_{i=1}^k \left(1 - \frac{n_i}{n}\right) S_i^2}$$

Şekil 6. Test istatistik formülü.

DÖRDÜNCÜ BÖLÜM

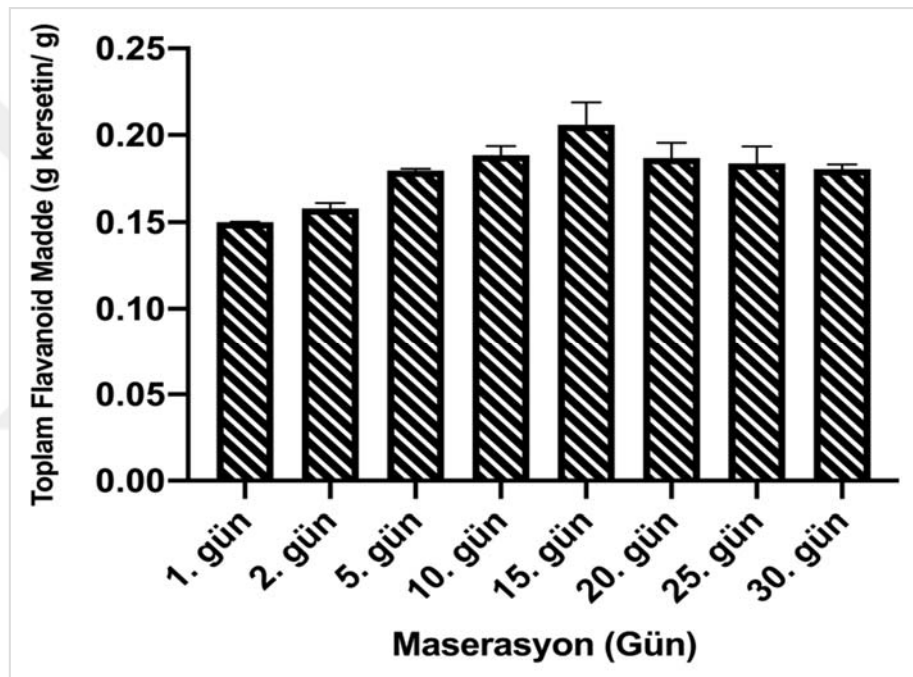
Bulgular ve Yorum

Toplam Flavonoid Madde Miktarı

Propolisin yapısındaki flavonoidler, serbest radikalleri temizleyen ve böylece hücreyi aşırı lipid peroksidasyonuna karşı koruyan güçlü antioksidanlardır. Bu çalışmada propolis ekstraktlarının toplam flavonoid madde miktarı maserasyon süresine göre anlamlı farklılıklar göstermiştir ($p<0.05$.) Buna göre toplam flavonoid madde miktarı 0.1502 ± 0.0001 - 0.206 ± 0.0128 g QE/g arasında tespit edilmiş olup en düşük değer 1 günlük; en yüksek değer ise 15 günlük süresi maserasyon sonunda elde edilmiştir (Tablo 4). 15 günlük maserasyondan sonra örneklerin toplam flavonoid madde miktarında anlamlı bir azalma gözlemlenmiştir (Şekil 7). Benzer şekilde Narimane, Demircan, Salah, A. ve Salah, R. (2017) yaptıkları çalışmada maserasyon yöntemi (24 saat) kullanarak farklı çözücülerde elde ettikleri Cezayir propolis ekstraktlarının toplam flavonoid madde içeriğinin 0.57 ± 0.01 - 3.53 ± 0.84 g QE/g arasında değiştiğini bildirmişlerdir. Bu araştırmacıların elde ettiği sonuçlar çözücü faktörüne göre toplam flavonoid madde miktarının değişiklik gösterdiğini sunmuştur. Benzer şekilde Mello, Petrus ve Hubinger (2010) propolisin %70'lik etanol ile 1 günlük maserasyon süresi sonunda ekstraktın toplam flavonoid madde içeriğini 0.23 QE mg/g olduğunu rapor etmişlerdir ki bu sonuçlar bizim 1 günlük maserasyon sonucu elde ettiğimiz flavonoid madde miktarından daha düşüktür. Ek olarak propolisin 7 günlük süre ile %70'lik etil alkol ile maserasyonu sonucunda total fenolik madde miktarının %0.33 olduğu belirlenmiştir (Pujirahayu, Ritonga, & Uslina-Waty, 2014). Farklı bir araştırmada da Graça Miguel, Doughmi, Aazza, Antunes ve Lyoussi (2014) Fas'ın sekiz farklı bölgesinden topladıkları on dört propolis örneğinin flavonoid içeriğini 0.20 ile 34.27 mg QE/g arasında oldukça değişken miktarlarda tespit etmişlerdir. Literatür sonuçlarıyla karşılaştırıldığında elde edilen değerlerdeki farklılıkların, propolis örneklerinin ekstraksiyon prosedürleri (maserasyon süresi, çözücü oranı vb.) ile birlikte içeriğine katkı sağlayan bitkisel çeşitliliğin farklılığına dayandığı düşünülmektedir.

Tablo 4. Maserasyon ile Elde Edilen Ekstraktların Toplam Flavonoid Madde Miktarı (g QE/g)

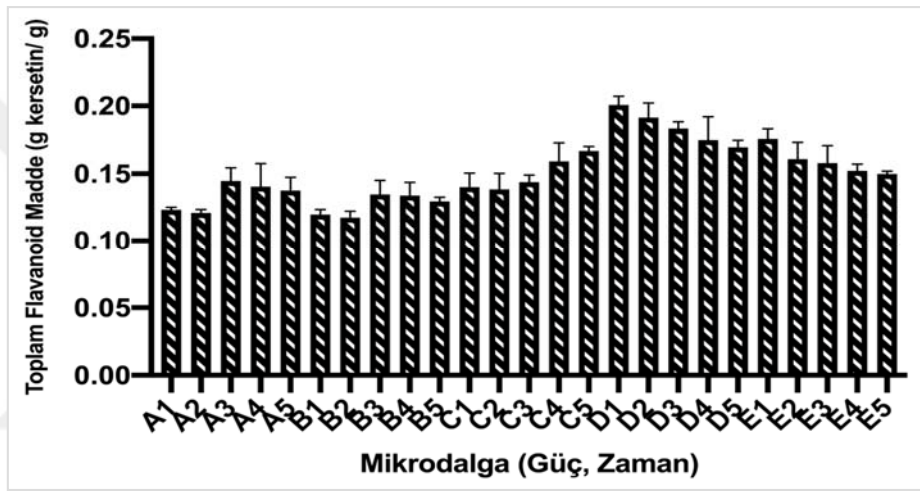
Ekstraksiyon Parametreleri	Toplam Flavonoid Madde (g QE/g)
1. gün	0.1502±0.0001
2. gün	0.1581±0.0031
5. gün	0.1795±0.001
10. gün	0.1885±0.0051
15. gün	0.2060±0.0128
20. gün	0.1867±0.0088
25. gün	0.1837±0.0097
30.gün	0.1804±0.0027



Şekil 7. Farklı maserasyona sürelerinin toplam flavonoid madde miktarına etkisi

Mikrodalga destekli ekstraksiyon sonucunda toplam flavonoid madde miktarı 0.1174 ± 0.0047 - 0.2007 ± 0.0065 g QE/g arasında tespit edilmiş olup en düşük flavonoid madde miktarı 100W-4 dk'lık işlem sonucunda en yüksek değer ise 400W-2 dk'lık işlem sonucunda elde edilmiştir. Genel olarak 400W uygulamasında flavonoid madde miktarı daha yüksek tespit edilmiş olup 2, 4, 6, 8 ve 10 dk'lık işlemler sonucunda sırasıyla 0.2007 ± 0.0065 , 0.1914 ± 0.0108 , 0.1832 ± 0.0050 , 0.1752 ± 0.0167 ve 0.1696 ± 0.0052 g QE/g olarak ölçülmüştür (Tablo 5). Mikrodalga gücünün daha da artırılması tıpkı maserasyon yönteminde olduğu gibi flavonoid madde ekstraksiyonunu olumsuz yönde etkilemiştir (Şekil 8). Benzer şekilde 800W-10 dk uygulamasıyla Endoznezya propolis örneklerinin toplam fenolik madde içeriği 16.90 ± 0.537 -

46.60±0.78 µg/mL olarak rapor edilmiştir (Hasan, Mangunwidjaja, Sunarti, Suparno, & Setiyono, 2014). Ayrıca Pellati, Prencipe, Bertelli ve Benvenuti (2013) İtalya orijinli propolis örneklerinde uyguladıkları mikrodalga destekli ekstraksiyon yöntemi ile propolisten toplam flavonoidlerin geleneksel yöntemlere göre daha hızlı olarak ekstrakte edildiğini, ekstraksiyon süresi için harcanan sürenin daha az olduğunu ve daha az çözücü kullanıldığı için avantajlı olduğunu bildirmişlerdir. Bizim çalışmamızda da mikrodalga yöntemi ve maserasyon yöntemi ile ekstrakte edilen toplam flavonoid madde miktarlarının benzerlik göstermesi neticesinde mikrodalga destekli ekstraksiyon yöntemin maserasyona kıyasla daha hızlı uygulanabilir olması nedeniyle avantajlı olduğu söylenebilir.



Şekil 8. Farklı mikrodalga destekli ekstraksiyon parametrelerinin toplam flavonoid madde miktarına etkisi

Tablo 5. Mikrodalga Destekli Ekstraksiyon ile Elde Edilen Ekstraktların Toplam Flavonoid Madde Miktarı (g QE/g)

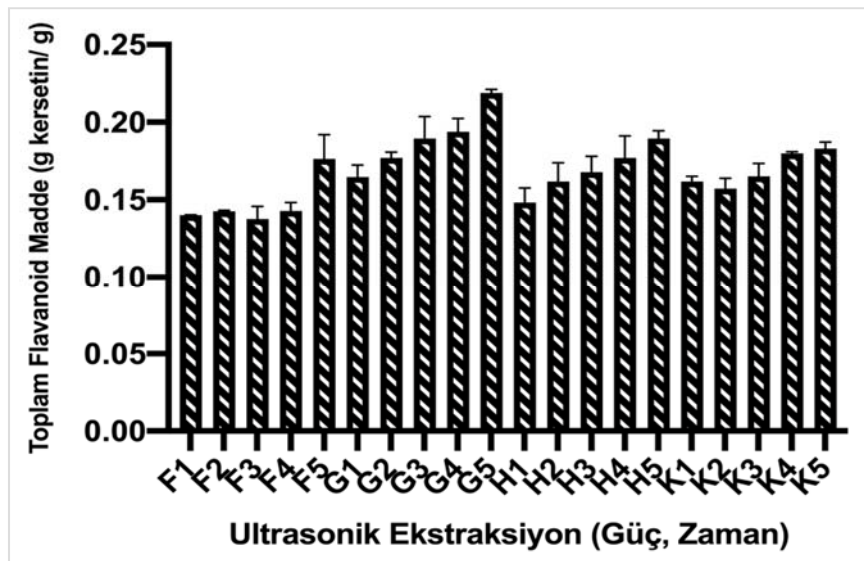
Ekstraksiyon Parametreleri	Toplam Flavonoid Madde (g QE/g)
A1	0.1233±0.0019
A2	0.1210±0.0024
A3	0.1447±0.0097
A4	0.1406±0.0171
A5	0.1375±0.0099
B1	0.1197±0.0038
B2	0.1174±0.0047
B3	0.1347±0.0104
B4	0.1339±0.0098
B5	0.1294±0.0032
C1	0.1401±0.0104
C2	0.1385±0.0119
C3	0.1438±0.0052
C4	0.1592±0.0139
C5	0.1670±0.0033
D1	0.2007±0.0065
D2	0.1914±0.0108
D3	0.1832±0.005
D4	0.1752±0.0167
D5	0.1696±0.0052
E1	0.1759±0.0072
E2	0.1610±0.0124
E3	0.158±0.0129
E4	0.1522±0.0049
E5	0.1500±0.002

Diğer geleneksel metotlara kıyasla ekstraksiyon aşamasında oluşan mekanik etkiden dolayı çözücünün ürüne daha iyi nüfuz etmesi (Toma, Vinatoru, Paniwnyk, & Mason, 2001) ve aynı zamanda düşük sıcaklıklarda uygulanabilir olması nedeniyle özellikle termal olarak kararsız bileşiklerin ekstraksiyonu için ultrasonik destekli yöntem oldukça avantajlıdır (Wu, Hulbert, & Mount, 2001). Propolis örneğinin ultrasonik destekli ekstraksiyonu sonucu toplam flavonoid madde miktarı sırasıyla G5 (0.2188±0.0024 g QE/g), G4 (0.1939±0.0084 g QE/g), G3 (0.1895±0.0141 g QE/g) ve H5 (0.1895±0.005 g QE/g), K5 (0.1830±0.0041 g QE/g) uygulamalarında en yüksek olarak tespit edilmiştir (Tablo 6). Elde edilen sonuçlara göre en düşük değer F3 (0.1375±0.0083 g QE/g) uygulamasında belirlenmiştir (Şekil 9). En yüksek flavonoid madde içeriği %40 genlik uygulamasında elde edilmiş ve burada ekstraksiyon süresinin artmasına bağlı olarak flavonoid madde miktarının da artış gösterdiği görülmüştür (Tablo 6). Benzer şekilde farklı orijinlerden ultrasonik banyo kullanılarak hazırlanan propolisin etanol ekstraktlarının flavonoid madde içeriği 0.0420-0.10802 g QE/g olarak rapor edilmiştir

(Reis *vd.*, 2019). Ayrıca bu yöntem kullanılarak hazırlanan Türkiye orijinli propolis örneğinin toplam flavonoid madde miktarı 0.5227 g QE/g (Özdal, Sarı-Kaplan, Mutlu-Altundag, Boyacioglu, & Capanoglu, 2018) olarak bizim test ettiğimiz değerlerden daha yüksek olarak belirlenmiştir. Farklı coğrafik bölgelerden propolislerin farklı kimyasal içeriğe sahip olduğu göz önüne alındığında değerler arasındaki farklılıkları beklemekteydik.

Tablo 6. *Ultrasonik Destekli Ekstraksiyon ile Elde Edilen Ekstraktların Toplam Flavonoid Madde Miktarı (g QE/g)*

Ekstraksiyon Parametreleri	Toplam Flavonoid Madde (g QE/g)
F1	0.1401±0.0003
F2	0.1426±0.0007
F3	0.1375±0.0083
F4	0.1429±0.0054
F5	0.1763±0.0156
G1	0.1647±0.0077
G2	0.177±0.0037
G3	0.1895±0.0141
G4	0.1939±0.0084
G5	0.2188±0.0024
H1	0.1483±0.0094
H2	0.1618±0.012
H3	0.1679±0.0101
H4	0.1769±0.0142
H5	0.1895±0.005
K1	0.1617±0.0034
K2	0.1572±0.0066
K3	0.1652±0.0083
K4	0.1800±0.001
K5	0.183±0.0041



Şekil 9. Farklı ultrasonik destekli ekstraksiyon parametrelerinin toplam flavonoid madde miktarına etkisi

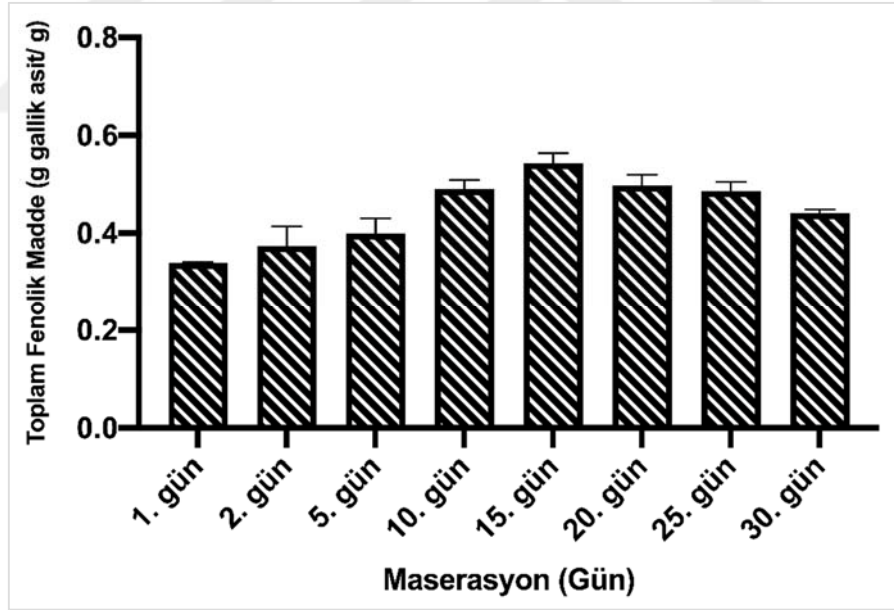
Toplam Fenolik Madde Miktarı

Bitkisel kaynaklı sekonder metabolitler olan ve birçok doğal üründe bulunan fenolik bileşikler ürünün antioksidan kapasitesinden sorumlu olan ajanlardır (do Nascimento *vd.*, 2016; Zhang *vd.*, 2018). Bu nedenle ekstraktlardaki toplam fenolik madde miktarının tespit edilmesi ürünün antioksidan aktivitesi hakkında bilgi sunacaktır. Bu çalışmada toplam fenolik madde miktarı, maserasyon süresine göre farklılık göstermiş olup 1,2,5,10,15,20,25 ve 30 günlük ekstraksiyon süresi sonucunda sırasıyla 0.3390 ± 0.0022 , 0.3732 ± 0.0409 , 0.3991 ± 0.0314 , 0.4897 ± 0.0196 , 0.5430 ± 0.0209 , 0.4973 ± 0.0222 , 0.4860 ± 0.0181 ve 0.4403 ± 0.0079 g GAE/g olarak elde edilmiştir (Tablo 7). Yapmış olduğumuz çalışma sonuçları toplam flavonoid madde miktarındaki verilerle paralellik göstermiş ve maserasyon yönteminde en yüksek toplam fenolik madde miktarına 15 günlük ekstraksiyon sonucunda ulaşılmış olup daha fazla uygulanan ekstraksiyon sürelerinde elde edilen değerlerde azalma görülmüştür (Şekil 10). Narimane *vd.* (2017) yaptıkları çalışmada maserasyon yöntemi kullanarak elde ettikleri farklı Cezayir propolis ekstraktlarının toplam fenolik madde içeriğinin 24 saatlik süre sonucunda 0.81 ± 0.16 ile 8.97 ± 0.25 GAE mg/g arasında değiştiğini tespit etmişlerdir. Maserasyon yöntemi kullanarak (24 saat) elde edilen Zonguldak kestane propolis ekstraktının toplam fenolik madde içeriği $0.313-0.476$ g/g GAE (Sarıkaya, Ulusoy, Öztürk, Tuncel, & Kolayli, 2009) olarak belirlenmiş ve bu değerler bizim 1 günlük maserasyon sonucu tespit etmiş olduğumuz sonuçlarla benzerlik göstermektedir. Bunla birlikte Hindistan propolislerinin etanol ekstraktlarının toplam fenolik madde içeriği ise 0.1591 g GAE/g olarak rapor edilmiştir (Laskar, Sk, Roy, & Begum, 2010) ki bu değerler bizim elde ettiğimiz sonuçlara kıyasla düşüktür. Cunha *vd.* (2006) yaptıkları çalışmada 20 gün, 30 gün, 6 ay ve 1 yıla kadar uygulanan maserasyon süresinin Breziya propolisinin kimyasal kompozisyonu üzerine etkisini incelemişlerdir. Bu araştırmacılar ham propolis için uygulanan maserasyon süresinin verimi etkilediğini ve elde edilen bileşenlerin veriminin ekstraksiyon süresinin artmasına bağlı olarak yükseldiğini bildirmişlerdir. Aynı araştırmacılar maserasyon ekstraksiyonuna kıyasla mikrodalga destekli ekstraksiyon ve ultrasonik destekli ekstraksiyon yöntemlerinin daha az zamanda daha yüksek ekstraksiyon verimi ortaya çıkardığını bildirerek en etkili yöntemin ultrasonik destekli ekstraksiyon yöntemi olduğunu rapor etmişlerdir. Maserasyon süresinin propolisin ekstraktları üzerine veriminin incelediği farklı bir araştırma da 10, 20 ve 30 günlük ekstraksiyon süresi sonunda propolisin fenolik kompozisyonunun sırasıyla % 8.53, % 8.00 ve %8.49 olduğu ve ekstraksiyon süresine bağlı olarak fenolik kompozisyonda anlamlı bir değişiklik olmadığını bildirmişlerdir (Cunha *vd.*,

2004). Farklı olarak, bizim çalışmamızda maserasyon ekstraksiyonu ile örneklerin 10, 20 ve 30 günlük ekstraksiyonları sonucu elde edilen değerler arasında istatistiki olarak anlamlı farklılıklar olduğu ($P<0.05$) görülmüştür. Elde edilen bu farklı sonuçların sadece ekstraksiyon süresine değil aynı zamanda oldukça kompleks bir karışım olan propolis toplamak için arıların ziyaret ettiği bitki çeşitlerine, propolisin toplanma sezonuna, ekstraksiyon aşamasında uygulanan sıcaklık, ısı vb. farklı parametrelere göre değişkenlik göstermiş olabileceği düşünülmektedir.

Tablo 7. Maserasyon Yöntemi ile Elde Edilen Ekstraktların Toplam Fenolik Madde Miktarı (g GAE/g)

Ekstraksiyon Parametreleri	Toplam Fenolik Madde (g GAE/g)
1.gün	0.3390±0.0022
2.gün	0.3732±0.0409
5.gün	0.3991±0.0314
10.gün	0.4897±0.0196
15.gün	0.5430±0.0209
20.gün	0.4973±0.0222
25.gün	0.486±0.0181
30.gün	0.4403±0.0079



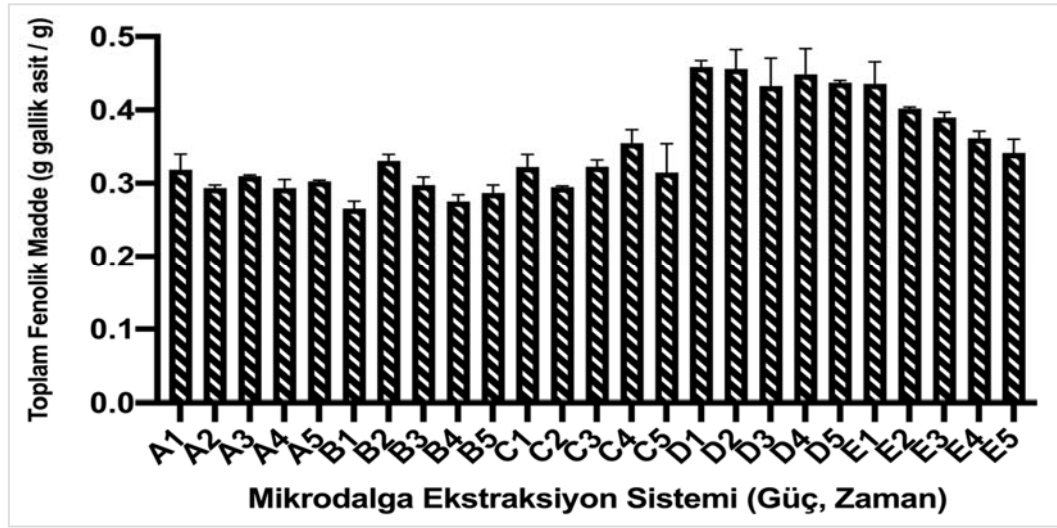
Şekil 10. Farklı maserasyon parametrelerinin toplam fenolik madde miktarına etkisi.

Mikrodalga ekstraksiyonunda toplam fenolik madde miktarı 50W gücünde 2 dk'lık işlem sonucu 0.3187±0.0211 g GAE/g olarak tespit edilirken bu miktar 4,6,8 ve 10 dk için sırasıyla 0.2936±0.0041, 0.3099±0.0016, 0.2936±0.0117 ve 0.3029±0.0016 g GAE/g olarak tespit edilmiştir (Tablo 8). 100W gücünde ise farklı ekstraksiyon süreleri sonucunda bu değerler sırasıyla 0.2657±0.0098-0.3307±0.0087 g GAE/g; 200W için 0.2950±0.0014-0.3549±0.0173 g

GAE/g; 400W için $0.4329 \pm 0.0376 - 0.4587 \pm 0.0084$ g GAE/g arasında; 500W için $0.3413 \pm 0.019 - 0.4358 \pm 0.0299$ g GAE/g arasında değişkenlik göstermiştir. Elde edilen sonuçlara göre en fazla fenolik madde miktarı flavonoid madde miktarındakine paralellik gösterir şekilde 400W uygulaması ile elde edilmiştir (Şekil 11).

Tablo 8. Mikrodalga Destekli Ekstraksiyon Yöntemi ile Elde Edilen Ekstraktların Toplam Fenolik Madde Miktarı (g GAE/g)

Ekstraksiyon Parametreleri	Toplam Fenolik Madde (g GAE/g)
A1	0.3187±0.0211
A2	0.2936±0.0041
A3	0.3099±0.0016
A4	0.2936±0.0117
A5	0.3029±0.0016
B1	0.2657±0.0098
B2	0.3307±0.0087
B3	0.2979±0.0108
B4	0.2754±0.0089
B5	0.2868±0.0109
C1	0.3222±0.0173
C2	0.295±0.0014
C3	0.3229±0.009
C4	0.3549±0.0181
C5	0.3148±0.0391
D1	0.4587±0.0084
D2	0.4559±0.0264
D3	0.4329±0.0376
D4	0.4486±0.0349
D5	0.4373±0.0027
E1	0.4358±0.0299
E2	0.4019±0.0019
E3	0.3896±0.0074
E4	0.3613±0.0097
E5	0.3413±0.019



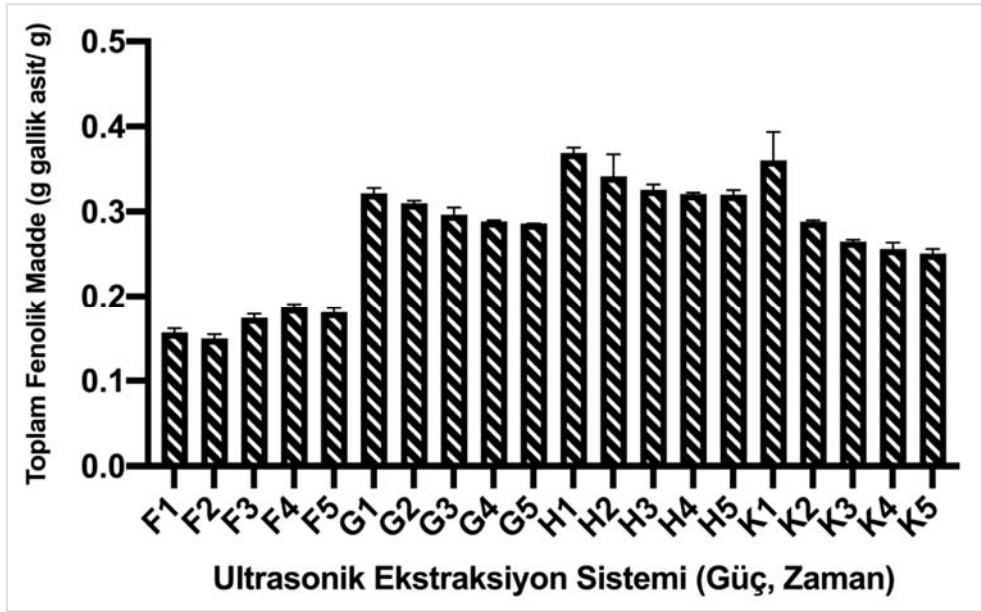
Şekil 11. Farklı mikrodalga destekli ekstraksiyon parametrelerinin toplam fenolik madde miktarına etkisi.

Son yıllarda ultrasonik destekli ekstraksiyon yöntemi, sağlamış olduğu avantajlar nedeniyle farklı bitkisel ürünlerden fenoliklerin ekstraksiyonunda yaygın olarak kullanılmaktadır (Rostagno, Palma, & Barroso, 2007; Tiwari, Patras, Brunton, Cullen, & O'Donnell, 2010). Ultrasonik destekli ekstraksiyonda toplam fenolik madde içeriği en yüksek %60 genlik 5 dk'lık ekstraksiyon sonucu 0.3688 ± 0.0063 g GAE/g olarak belirlenmiştir (Tablo 9, Şekil 12). %20 genlik uygulaması için en yüksek değer 30 dk'lık ekstraksiyon sonucunda elde edilmesine rağmen diğer genlik uygulamalarında en yüksek değer 5 dk olarak uygulanan ekstraksiyon süresi sonucunda ölçülmüştür. Ultrasonik su banyosu kullanılarak (35°C , 60 dk) hazırlanan Brezilya orijinli kahverengi, yeşil ve kırmızı propolis numunelerinin toplam fenolik içeriği ise 55.74 mg GAE/g, 90.55 mg GAE/g ve 91.32 mg GAE/g olarak saptanmıştır (Andrade, Denadai, Oliveira, Nunes, & Narain, 2017). Elde edilen bu sonuçlar karşılaştırıldığında bizim propolis örneğimizin fenolik madde içeriğinin daha yüksek olduğu söylenebilir. Ek olarak Türkiye orijinli propolis örneğinin ultrasonik su banyosu kullanılarak hazırlanan ekstraktının toplam fenolik madde içeriği ise 0.3143 g GAE/g (Özdal *vd.*, 2018) olarak bizim tespit ettiğimiz değerlere benzer bir aralıkta bulunmuştur. Bununla birlikte farklı ekstraksiyon yöntemlerini araştıran Trusheva *vd.* (2007) mikrodalga ekstraksiyon yönteminde farklı parametreler uygulayarak elde ettikleri ekstraktlarda toplam fenolik madde içeriğinin %24.4-%40.4 arasında; maserasyonda %43-%44 arasında ultrasonik ekstraksiyonda ise bu değerlerin %35.9-52 arasında değişkenlik gösterdiğini tespit etmişlerdir. Bu araştırmacılar zamana bağlı olarak ultrasonik destekli ekstraksiyonda elde edilen total fenolik madde miktarının arttığını kaydetmişlerdir. Farklı olarak biz ise zamana bağlı olarak total fenolik madde içeriğinde düzenli bir artış gözlemedik. Bunun sebebi uygulanan ekstraksiyon sürelerinin farklılık

göstermesi olabilir. Ek olarak, Trusheva *vd.* (2007) maserasyon ekstraktına kıyasla mikrodalga ve ultrasonik destekli ekstralardan daha yüksek verim alındığını ve bu metotlarda daha az iş yükü ve zamana ihtiyaç olduğunu bildirmişlerdir. Bu araştırmacılar verim, ekstraksiyon süresi ve seçicilik bakımından ultrasonik destekli yöntemin daha etkili olduğunu bildirmişlerdir. Benzer şekilde bizim yapmış olduğumuz çalışmada bu varılan sonuçları destekler niteliktedir.

Tablo 9. *Ultrasonik Destekli Ekstraksiyon Yöntemi Sonucu Elde Edilen Ekstraktların Toplam Fenolik Madde Miktarı (g GAE/g)*

Ekstraksiyon Parametreleri	Toplam Fenolik Madde Miktarı (g GAE/g)
F1	0.1567±0.0051
F2	0.1497±0.0051
F3	0.1742±0.0047
F4	0.1864±0.0043
F5	0.1810±0.0049
G1	0.3214±0.0063
G2	0.3099±0.0027
G3	0.2964±0.0082
G4	0.2884±0.0014
G5	0.286±0.0002
H1	0.3688±0.0063
H2	0.3415±0.0258
H3	0.3257±0.0063
H4	0.3206±0.0016
H5	0.3198±0.0055
K1	0.3601±0.0336
K2	0.288±0.0017
K3	0.2446±0.0024
K4	0.256±0.0076
K5	0.2505±0.0055



Şekil 12. Farklı ultrasonik destekli ekstraksiyon parametrelerinin toplam fenolik madde miktarına etkisi

Propolis Ekstraktlarının Antioksidan Aktivite Test Sonuçları

CERAC testi sonuçları.

Propolis örneğine 8 farklı zaman parametresi uygulanarak maserasyon yöntemiyle kazanılan ekstraktların CERAC testi sonucu ölçülen antioksidan madde miktarları Tablo 10'de g TE/g olarak sunulmuştur. Elde edilen sonuçlara göre antioksidan madde miktarı 1 günlük maserasyon süresi sonunda 0.5440 ± 0.0777 g TE/g, 2 günlük maserasyon süresi sonunda 0.5581 ± 0.0249 g TE/g, 5 günlük maserasyon süresi sonunda 0.5901 ± 0.0740 g TE/g, 10 günlük maserasyon süresi sonunda 0.6354 ± 0.0443 g TE/g, 15 günlük maserasyon süresi sonunda 0.7000 ± 0.0686 g TE/g, 20 günlük maserasyon süresi sonunda 0.6777 ± 0.0437 g TE/g, 25 günlük maserasyon süresi sonunda 0.6571 ± 0.0649 g TE/g ve 30 günlük maserasyon süresi sonunda 0.6352 ± 0.0910 g TE/g olarak belirlenmiştir. Bu sonuçların aynı yöntemler ile elde edilen total fenolik ve flavonoid madde miktarı ile paralellik gösterdiği görülmüş ve en yüksek antioksidan aktivite değerleri 15 günlük maserasyon süresi sonunda kaydedilmiştir.

Tablo 10. Maserasyon Sonucu Elde Edilen Ekstraktların CERAC Değerleri (g TE/g)

Ekstraksiyon Parametreleri	CERAC (g TE/g)
1.gün	0.5440 ±0.0777
2.gün	0.5581±0.0249
5.gün	0.5901±0.074
10.gün	0.6354±0.0443
15.gün	0.7000±0.0686
20.gün	0.6777±0.0437
25.gün	0.6571 ±0.0649
30.gün	0.6352±0.091

Propolis örneğine mikrodalga yönteminde farklı parametreler uygulanarak elde edilen ekstraktların CERAC analiz sonuçları Tablo 11’de sunulmuştur. En düşük değer 0.5856±0.0243-0.6518±0.0922 g TE/g 50W güç seviyesinde tespit edilmiştir. Mikrodalgada 100W güç seviyesinde 2, 4, 6, 8, 10’ar dk’lık süreler sonucunda ise CERAC değeri sırasıyla 0.6837±0.0097, 0.8001±0.1207, 0.8125±0.1329, 0.6988±0.0164 ve 0.8035±0.1347g TE/g olarak ölçülmüştür. 200W güç seviyesinde 2 dk’lık işlem sonucunda antioksidan madde miktarı 0.8384±0.1347 g TE/g iken bu değer 4 dk’lık işlem sonucunda 0.8502±0.1092 g TE/g, 6 dk’lık işlem sonucunda 0.8301±0.1086 g TE/g, 8 dk’lık işlem sonucunda 0.7744±0.074 g TE/g ve 10 dk’lık işlem sonucunda 0.7604±0.0995 g TE/g olarak kaydedilmiştir. 400W güç seviyesinde ise ekstraksiyon süresindeki farklılığa göre minimum değer 2 dk’lık ekstraksiyon süresi sonucunda 0.7764±0.0001 g TE/g olarak elde edilirken maksimum değer 6 dk’lık işlem sonucunda 0.8981±0.1025 g TE/g olarak belirlenmiştir. Son olarak mikrodalgada 500W güç seviyesinde farklı ekstraksiyon sürelerinde elde edilen antioksidan madde miktarı 0.7156±0.0613-0.8576±0.108 g TE/g arasında değişkenlik göstermiştir. Elde ettiğimiz sonuçlar total flavonoid ve fenolik madde içerikleri ile paralellik göstermemiş olmakla birlikte bu durumun antioksidan madde miktarını belirlemek için uygulanan yöntemden kaynaklı olabileceği düşünülmektedir.

Tablo 11. Mikrodalga Destekli Ekstraksiyonu Sonucu Elde Edilen Ekstraktların CERAC Değerleri (g TE/g)

Ekstraksiyon Parametleri	CERAC (g TE /g)
A1	0.6518±0.0922
A2	0.6213±0.068
A3	0.4734±0.034
A4	0.5856±0.0243
A5	0.5923±0.0334
B1	0.6837±0.0097
B2	0.8001±0.1207
B3	0.8125±0.1329
B4	0.6988±0.0164
B5	0.8035±0.1347
C1	0.8384±0.1347
C2	0.8502±0.1092
C3	0.8301±0.1086
C4	0.7744±0.074
C5	0.7604±0.0995
D1	0.7764±0.0001
D2	0.856±0.0989
D3	0.8981±0.1025
D4	0.8825±0.091
D5	0.8711 ±0.091
E1	0.845±0.0843
E2	0.7156±0.0613
E3	0.7959±0.0807
E4	0.8576±0.108
E5	0.8323±0.0752

Ultrasonik destekli ekstraksiyonda propolis örneğine 4 farklı genlik seviyesi (%20, 40, 60, 80) ve 5 farklı zaman (5, 10, 20, 30, 60) parametresi uygulanmış ve elde edilen farklı ekstraktların CERAC değerleri ölçülmüştür. Buna göre farklı genlik seviyeleri ve ekstraksiyon süreleri sonucunda en yüksek değer 0.8397±0.1396 olarak K3 uygulaması; en düşük değer ise 0.5722±0.0297 olarak H3 uygulaması için ölçülmüştür (Tablo 12). Genel olarak değerlendirildiğinde ise en yüksek CERAC değerleri %80 genlik seviyesinde belirlenmiştir. Genel olarak elde edilen sonuçlara göre genlik seviyesinin artışına bağlı olarak antioksidan madde ekstraksiyonun daha iyi olduğu söylenebilir. Fakat ekstraksiyon süresinin artışına bağlı olarak uygulamalar arasında paralel bir artış/azalma durumu gözlemlenmemiştir. Literatürde propolisin antioksidan aktivitesini CERAC testine dayanarak açıklayan herhangi bir araştırmaya rastlanmamakla birlikte farklı antioksidan aktivite yöntemleri kullanılarak

propolisin antioksidan aktivitesi çalışılmıştır (Sarıkaya vd., 2009; Andrade vd., 2017). Bu çalışmanın CERAC testi kullanılarak propolisin antioksidan kapasitesini belirlemeye yönelik olarak yapılacak farklı çalışmalara kaynak oluşturacağı düşünülmektedir.

Tablo 12. *Farklı Ultrasonik Parametreler Uygulanması Sonucu Elde Edilen Ekstraktların CERAC Değerleri (g TE/g)*

Ekstraksiyon Parametreleri	CERAC (g TE /g)
F1	0.5975±0.0655
F2	0.6534±0.0698
F3	0.6934±0.0698
F4	0.6815±0.0892
F5	0.6755±0.094
G1	0.6348±0.0218
G2	0.6384±0.037
G3	0.709±0.0376
G4	0.6488±0.0674
G5	0.6703±0.1007
H1	0.7013±0.1268
H2	0.6908±0.088
H3	0.5722±0.0297
H4	0.5907±0.0121
H5	0.6234±0.0364
K1	0.6908±0.054
K2	0.7164±0.0316
K3	0.8397±0.1396
K4	0.7841±0.057
K5	0.7726±0.0491

CUPRAC testi sonuçları.

Bu çalışmada propolis örneklerinin toplam antioksidan kapasitesinin değerlendirilmesi için kullanılan yöntemlerde birisi olan CUPRAC yöntemi, Apak *vd.* (2004) tarafından geliştirilen ve Cu(II)-neokuproin (Nc) reaktifi kullanılarak, plazma antioksidanları, gıda polifenoller, flavonoidler, C vitamini ve E vitamini için basit, geniş alanda uygulanabilen bir yöntemdir. Farklı maserasyon parametreleri uygulanarak hazırlanan propolis ekstraktlarının CUPRAC değerleri Tablo 13’de sunulmuştur. Elde edilen sonuçlara göre 1-30 gün arasında değişkenlik gösteren maserasyon süresi sonucu ekstraktların CUPRAC testi ile antioksidan madde miktarları 0.3254±0.0018-0.4254±0.0153 g TE/g arasında tespit edilmiştir ki, diğer tüm testlere (total fenolik, flavonoid, CERAC) uyumlu bir şekilde en yüksek CUPRAC aktivitesi maserasyonun 15. gününde ölçülmüştür. CUPRAC testi sonuçları CERAC testi sonuçlarını destekler nitelikte olup, 15. günde antioksidan madde miktarı maksimum seviye ulaşmış olup 15. günden sonra azalma göstermiştir. Benzer şekilde Sarıkaya *vd.* (2009) yaptıkları çalışmada

maserasyon yöntemi kullanarak (1 gün) hazırladıkları Türkiye orijinli monofloral propolis örneğinin antioksidan kapasitesini CUPRAC testi ile 0.692-1.410 1,000 µmol TE/ g olarak saptamışlardır. Kaydedilen sonuçlar arasındaki farklılıkların örneklerin floral kaynakları ile birlikte işleme metotları arasındaki farklılıklardan kaynaklandığı düşünülmektedir.

Tablo 13. *Maserasyon ile Elde Edilen Ekstraktların CUPRAC Değerleri (g TE/g)*

Ekstraksiyon Parametreleri	CUPRAC (g TE/g)
1.gün	0.3442±0.0034
2.gün	0.3598±0.0083
5.gün	0.3671±0.0071
10.gün	0.3749±0.0007
15.gün	0.4254±0.0153
20.gün	0.3796±0.0137
25.gün	0.3667±0.0019
30.gün	0.3254±0.0018

Mirodalga ekstraksiyonunda 50W, 100W, 200W, 400W ve 500W güç seviyesi için 2, 4, 6, 8, 10 dk 'lık süreler sonucunda CUPRAC testi ile ekstraktların antioksidan madde miktarı için en yüksek değer 0.5562±0.0256 g TE/g ile D5 uygulaması için ölçülmüş olup bu parametrede uygulanan güç seviyesi için (400W) ekstraksiyon süresinin artmasına bağlı olarak antioksidan madde miktarında artış olduğu gözlemlenmiştir. Bu sonuçlar mikrodalga ekstraksiyonu kullanılarak elde edilen ekstraktlarda uygulanan diğer test sonuçlarıyla yakın benzerlik göstermektedir. Bu ekstraksiyon yöntemi için en düşük CUPRAC değeri ise B4 uygulaması için elde edilmiştir.

Tablo 14. Mikrodalga Destekli Ekstraksiyon ile Elde Edilen Ekstraktların CUPRAC Değerleri (g TE/g)

Ekstraksiyon Parametleri	CUPRAC (g TE/ g)
A1	0.4695±0.013
A2	0.4000±0.0216
A3	0.4508±0.0151
A4	0.4344±0.0326
A5	0.4398±0.0293
B1	0.4771±0.0003
B2	0.4827±0.0319
B3	0.4907±0.0193
B4	0.3892±0.0258
B5	0.4145±0.0319
C1	0.4956±0.0439
C2	0.4559 ±0.0361
C3	0.4393±0.0346
C4	0.479±0.0213
C5	0.4733±0.0053
D1	0.5014±0.0469
D2	0.5407±0.0161
D3	0.5513±0.0218
D4	0.5521±0.0130
D5	0.5562±0.0256
E1	0.5122±0.0283
E2	0.4318±0.0193
E3	0.4498±0.0221
E4	0.5134±0.0334
E5	0.4522±0.006

Ultrasonik destekli ekstraksiyon yönteminde %20, %40, %60, %80 genlik seviyeleri için 5 dk'lık süre sonucunda ekstraktların CUPRAC değerleri sırasıyla 0.4427 ±0.0028, 0.4526±0.0078, 0.5014±0.0050, 0.5355±0.0394 g TE/g; 10 dk süre sonucunda 0.4510±0.0241, 0.4703±0.0497, 0.4928±0.0201, 0.5576±0.0299 g TE/g; 20 dk'lık süre sonucunda 0.4876±0.0203, 0.5023±0.0233, 0.4224±0.0231, 0.6058±0.0484 g TE /g; 30 dk'lık süre sonucunda 0.4960±0.0266, 0.4320±0.0336, 0.4427±0.0138, 0.5871 ±0.0604 g TE/g; 60 dk'lık süre sonucunda 0.5463±0.0065, 0.4885±0.0336, 0.5260±0.0371, 0.5635±0.0105 g TE/g olarak belirlenmiştir. Bu sonuçlar en yüksek genlik seviyesi uygulandığında yüksek antioksidan madde miktarının elde edildiğini göstermiştir. Çalışmamızdan farklı olarak Özdal vd. (2018) Türkiye'nin farklı noktalarından toplanarak karışım haline getirilen propolisi ultrasonik su banyosu kullanarak 30 dk ekstraksiyon sonucunda elde edilen ekstraktın CUPRAC değerini 1.1849 g TE/g olarak bizim sonuçlarımıza göre daha yüksek olarak ölçmüşlerdir. Bu

araştırıcılar uyguladıkları diğer antioksidan aktivite testlerine (DDPH, ABTS) göre CUPRAC testinden daha yüksek sonuçlar aldıklarını belirtmişlerdir.

Tablo 15. *Ultrasonik Destekli Ekstraksiyon ile Elde Edilen Ekstraktların CUPRAC Değerleri (g TE/g)*

Ekstraksiyon Parametleri	CUPRAC (g TE/g)
F1	0.4427 ±0.0028
F2	0.4510±0.0241
F3	0.4876±0.0203
F4	0.496±0.0266
F5	0.5463±0.0065
G1	0.4526±0.0078
G2	0.4703±0.0497
G3	0.5023±0.0233
G4	0.4320±0.0336
G5	0.4885±0.0336
H1	0.5014±0.0050
H2	0.4928±0.0201
H3	0.4224±0.0231
H4	0.4427±0.0138
H5	0.5260±0.0371
K1	0.5355±0.0394
K2	0.5576±0.0299
K3	0.6058±0.0484
K4	0.5871 ±0.0604
K5	0.5635±0.0105

DPPH testi sonuçları.

DPPH (2,2-difenil-1-pikrilhidrazil) ticari olarak elde edilebilen organik nitrojen radiklidir (Huang, Ou, & Prior, 2005). Bu yöntem doğal olarak elde edilen ekstraktlarla birlikte propolis ekstraktlarının antioksidan kapasitesini belirlemede çok sık olarak kullanılan yöntemlerden birisidir (Jug *vd.*, 2014; Mot, Dumitrescu, & Sarbu, 2011). Bu çalışmada farklı yöntem ve parametreler kullanılarak hazırlanan propolis ekstraktlarının DPPH testi ile elde edilen antioksidan madde miktarı anlamlı şekilde ($p<0.05$) farklılıklar göstermiştir. Maserasyon yöntemi ile elde edilen 8 farklı propolis ekstraktının antioksidan madde miktarları değerlendirildiğinde 1, 2, 5, 10, 15, 20, 25 ve 30 günlük maserasyon süresi sonucunda ekstraktların DPPH değerleri sırasıyla 0.5415±0.0157, 0.5547±0.0007, 0.5908±0.0062, 0.6061±0.0022, 0.6437±0.0066, 0.5845±0.0076, 0.5739±0.0095 ve 0.5610±0.0036 g TE/g olarak tespit edilmiştir (Tablo 16). Transylvanian propolis örneğinin DPPH değerleri 0.29-1.24 mmol TE/g ve Yunanistan'dan elde edilen propolislerin DPPH değerleri ise 0.33 ile 1.11 mmol

TE/g propolis arasında değişmiştir (Andrade *vd.*, 2017). Farklı bir araştırmada 6 günlük maserasyon uygulaması sonucunda elde edilen 4 farklı propolis ekstraktının DPPH metodu ile antioksidan aktivite testleri sonucu bizim elde ettiğimiz değerlerden daha düşük bir şekilde 0.151-0.450 g TE/g arasında llmştır (Yeşiltaş *vd.*, 2014). Birbirine yakın maserasyon süresi uygulanmasına rağmen sonuçlar arasında elde edilen bu farklılık propolisten ekstrakte edilen madde miktarının sadece propolisin ekstraksiyon prosedürüne değil aynı zamanda bölgesel orijinine bağlı olduğunu işaret etmektedir.

Tablo 16. *Maserasyon ile Elde Edilen Ekstraktların DPPH Değerleri (g TE/g)*

Ekstraksiyon Parametleri	DPPH (g TE/g)
1.gün	0.5415 ±0.0157
2.gün	0.5547 ±0.0007
5.gün	0.5908 ±0.0062
10.gün	0.6061 ±0.0022
15.gün	0.6437 ±0.0066
20.gün	0.5845 ±0.0076
25.gün	0.5739 ±0.0095
30.gün	0.5610 ±0.0036

Mikrodalga yöntemi kullanılarak hazırlanan ekstraktların DPPH yöntemi ile elde edilen antioksidan madde miktarları ise farklı zaman parametrelerinde 50W güç seviyesinde 0.6287±0.0226- 0.4893±0.0291 g TE/g arasında tespit edilmiş olup en yüksek değer 10 dk'lık işlem sonucunda; en düşük değer ise 6 dk'lık işlem sonucunda kaydedilmiştir. 100W güç seviyesinde en yüksek değer 0.6323±0.0204 g TE/g olarak 2 dk'lık süre sonucunda, en düşük değer ise 8 dk'lık işlem sonucunda 0.5010±0.0113 g TE/g olarak belirlenmiştir. 200W güç seviyesinde ise en yüksek değer 8 dk'lık süre sonucunda 0.5957 ±0.0211 g TE/g olarak tespit edilmiştir. 400W ve 500W güç seviyelerinin uygulandığı durumda ise en yüksek değer sırasıyla 10 (0.6870 ±0,0058 g TE/g) ve 2 (0.6612 ±0.0047 g TE/g) dk'lık ekstraksiyon sonucunda elde edilmiştir (Tablo 17). Benzer şekilde Hasan *vd.* (2014) Endonezya'nın beş farklı bölgesinden toplanarak 800 W gc kullanılarak 10 dk'lık ekstraksiyon süresine maruz bırakılarak hazırlanan propolis ekstraktlarının DDPH testi ile hesaplanan IC50 değerlerini 308.88±12-4162.61±845.9 µg/mL olarak rapor etmişlerdir.

Tablo 17. Mikrodalga Destekli Ekstraksiyon ile Elde Edilen Ekstraktların DPPH Değerleri (g TE/g)

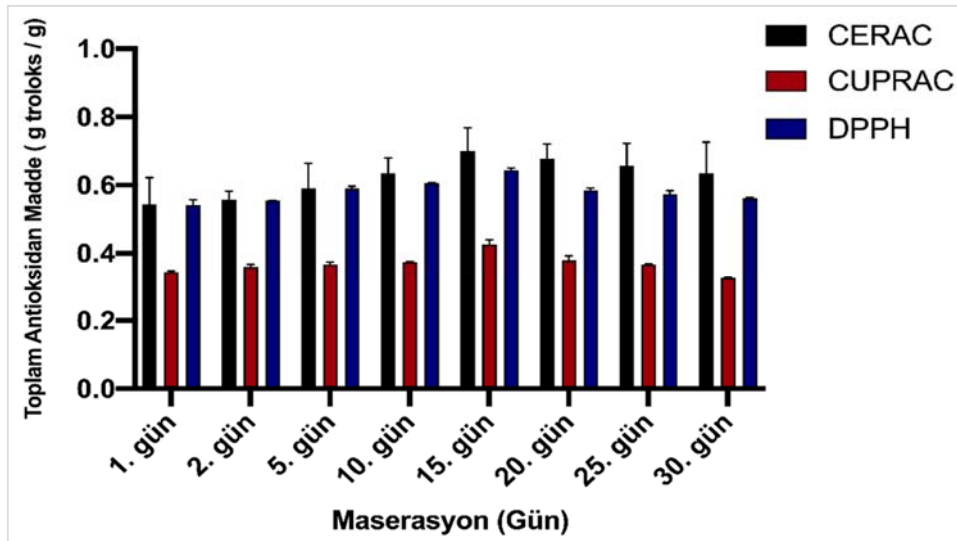
Ekstraksiyon Parametleri	DPPH (g TE/g)
A1	0.5163 ±0.0138
A2	0.5052 ±0.0091
A3	0.4893 ±0.0291
A4	0.5948 ±0.0058
A5	0.6287 ±0.0226
B1	0.6323 ±0.0204
B2	0.6229 ±0.0244
B3	0.5908 ±0.0178
B4	0.501 ±0.0113
B5	0.5600±0.0371
C1	0.5903 ±0.0095
C2	0.5801±0.0106
C3	0.5685 ±0.0069
C4	0.5957 ±0.0211
C5	0.5747 ±0.0055
D1	0.6034 ±0.0065
D2	0.6798 ±0.0076
D3	0.6608 ±0.0015
D4	0.6621 ±0.0240
D5	0.6870±0.0058
E1	0.6612 ±0.0047
E2	0.6590±0.0058
E3	0.6398 ±0.0164
E4	0.6238 ±0.0237
E5	0.6242 ±0.0015

Ultrasonik yöntem kullanılarak elde edilen örneklerin DPPH değerleri 0.5435 ± 0.0142 ile 0.6209 ± 0.0036 g TE/ g arasında tespit edilmiş olup minimum değer F1 uygulaması için maksimum değer ise K3 uygulaması için saptanmıştır (Tablo 18). Diğer antioksidan aktivite testlerine bezer şekilde uygulanan genlik seviyesinin artırılmasına bağlı olarak antioksidan madde miktarının arttığı gözlemlenmiştir.

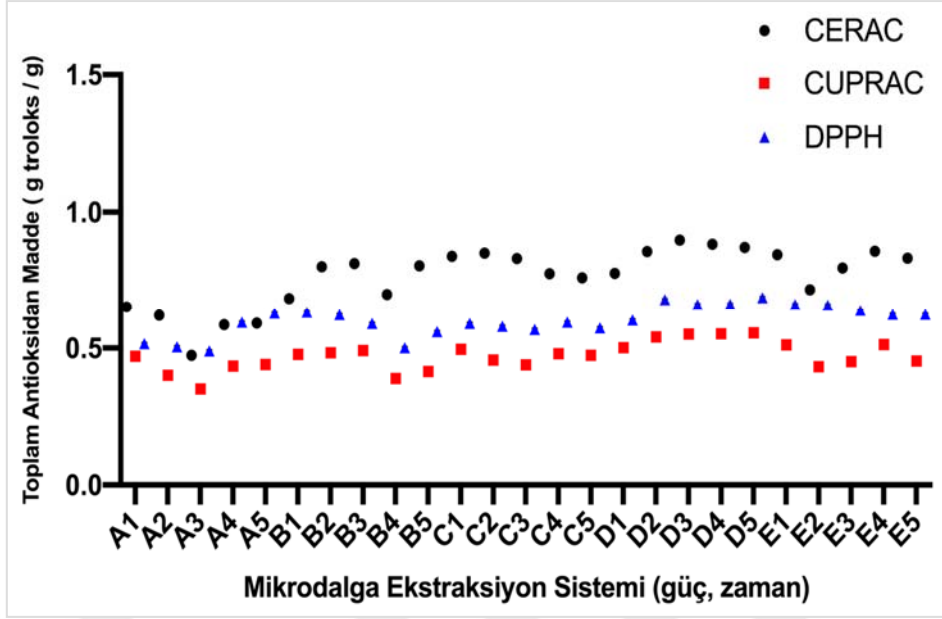
Tablo 18. Ultrasonik Destekli Ekstraksiyon Sonucu Elde Edilen Ekstraktların DPPH Değerleri (g TE/g)

Ekstraksiyon Parametleri	DPPH (g TE/g)
F1	0.5435 ±0.0142
F2	0.5680 ±0.0015
F3	0.5881 ±0.0011
F4	0.5841 ±0.0146
F5	0.5841 ±0.0065
G1	0.5877 ±0.0015
G2	0.5881 ±0.0047
G3	0.6163 ±0.0120
G4	0.5868 ±0.0007
G5	0.5828±0.0127
H1	0.5565 ±0.0036
H2	0.5565 ±0.0124
H3	0.5542 ±0.0062
H4	0.5582 ±0.0095
H5	0.5654±0.0116
K1	0.5824 ±0.0033
K2	0.5966 ±0.0102
K3	0.6209 ±0.0036
K4	0.6033 ±0.0055
K5	0.5826±0.0058

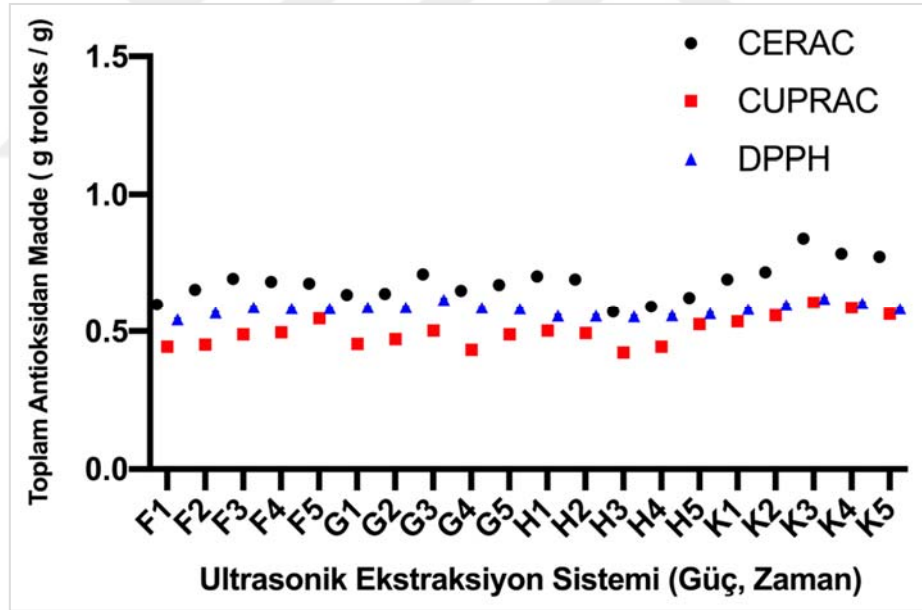
Genel olarak test edilen yöntemler değerlendirildiğinde ise maserasyon, mikrodalga ve ultrasonik destekli ekstraksiyon yöntemlerinin tamamı için en yüksek madde miktarları CERAC yöntemi ile elde edilirken en düşük antioksidan madde miktarı CUPRAC yönteminin kullanılmasıyla elde edilmiştir (Şekil 13, 14, 15).



Şekil 13. Maserasyon süresinin toplam antioksidan kapasiteye etkisi.



Şekil 14. Mikrodalga destekli ekstraksiyonunun toplam antioksidan kapasiteye etkisi.



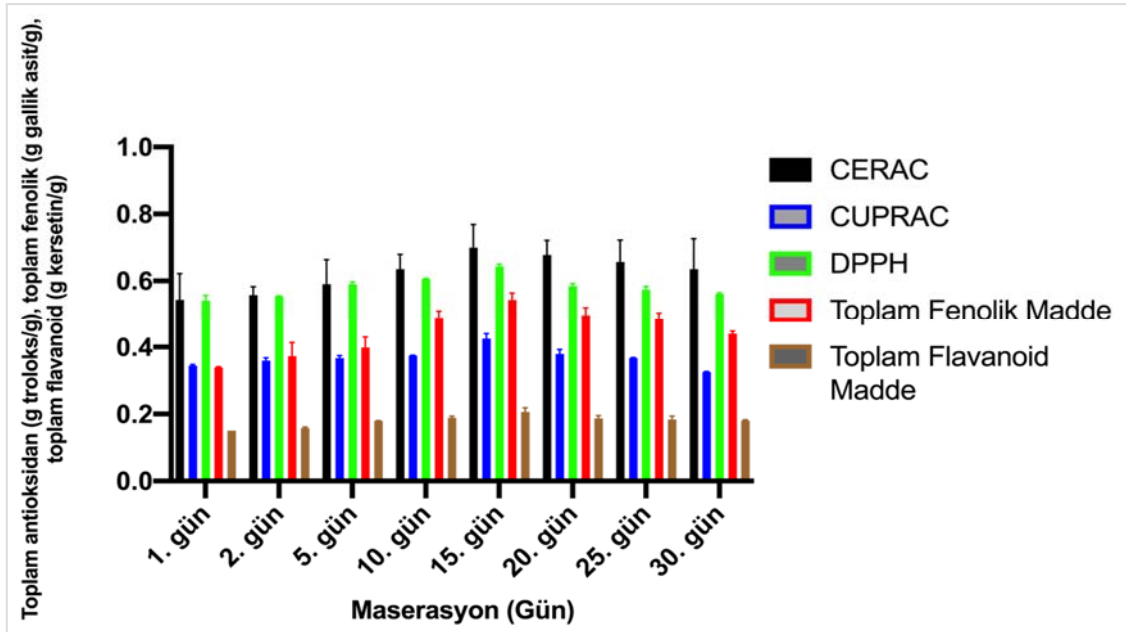
Şekil 15. Ultrasonik destekli ekstraksiyonunun toplam antioksidan kapasiteye etkisi.

BEŞİNCİ BÖLÜM

Sonuç, Tartışma ve Öneriler

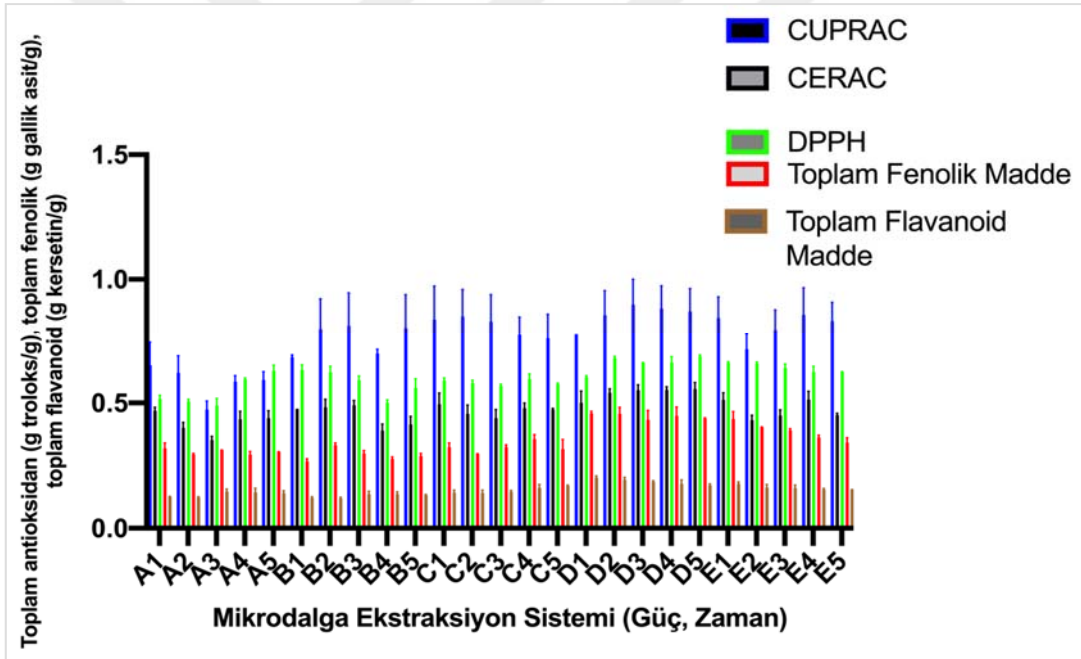
Bu tez çalışması kapsamında Kütahya ilinden elde edilen propolis örneğinin, maserasyon, ultrasonik destekli ve mikrodalga destekli ekstraksiyon yöntemleri uygulanarak farklı ekstraktları elde edilmiştir. Elde edilen ekstraktların toplam fenolik ve flavonoid madde içeriklerine ek olarak üç farklı yöntem (CERAC, CUPRAC, DPPH) ile antioksidan aktiviteleri değerlendirilmiştir.

Geleneksel ekstraksiyon yöntem olan maserasyon kullanılarak elde edilen ekstraktların toplam flavonoid madde miktarları 0.1502-0.2060 g QE/g; toplam fenolik madde miktarları 0.3390-0.5430 g GAE/g; toplam antioksidan kapasiteleri ise CERAC testi için 0.5440-0.7000 g TE/g, CUPRAC testi için 0.3254-0.4254 g TE/g, DPPH testi için ise 0.5415-0.6437 g TE/g olarak belirlenmiştir. Bu sonuçlara göre maserasyon yöntemi için en yüksek toplam fenolik, flavonoid ve antioksidan madde ekstraksiyonu için en uygun sürenin 15 gün olduğu gözlemlenmiştir (Şekil 16). Ek olarak diğer yöntemlerle kıyaslandığında çalışılan örnekler içerisinde en yüksek fenolik madde içeriğine sahip olan ekstrakt maserasyon yöntemi ile elde edilmiştir. Genel olarak maserasyonun 15. gününden sonra bu sürede ekstrakte edilen biyoaktif madde miktarına kıyasla anlamlı ($P < 0.05$) bir düşüş olduğu saptanmıştır.



Şekil 16. Maserasyon yönteminin toplam fenolik, toplam flavonoid, cuprac, cerac, dpph madde miktarı üzerine etkisi.

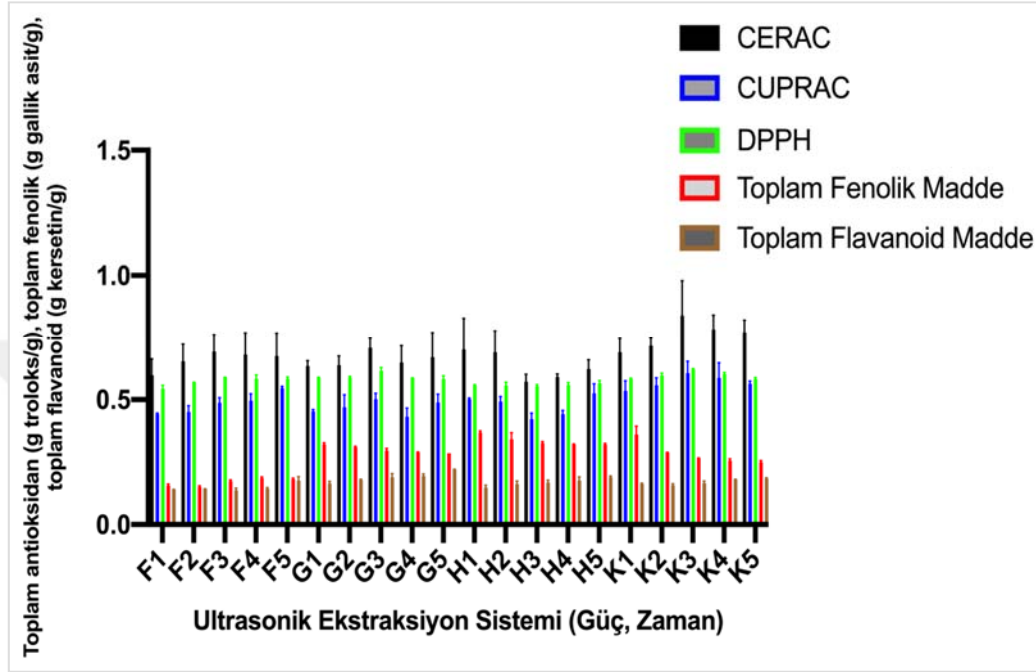
Mikrodalga destekli ekstraksiyon yöntemi sonucu ekstraktların toplam flavonoid madde içerikleri 0.1174-0.2007 g QE/g, toplam fenolik madde miktarları 0.2657-0.4587 g GAE/g; toplam antioksidan kapasiteleri ise CERAC testi için 0.4734-0.8981 g TE/g, CUPRAC testi için 0.4000-0.5562 g TE/g ve DPPH testi için 0.4893-0.6870 g TE/g olarak belirlendi. Bu sonuçlara göre toplam flavonoid ve fenolik madde içeriği 400 W mikrodalga gücünde en yüksek 2 dk'lık ekstraksiyon süresi sonucu ölçülmüştür. Antioksidan madde miktarı ise CERAC testi için 400W mikrodalga gücünde 6 dk'lık ekstraksiyon süresi ile; CUPRAC ve DPPH 'da ise 400W gücünde 10 dk'lık ekstraksiyon sonucunda maksimum olarak elde edilmiştir (Şekil 17). Bununla birlikte mikrodalga ekstraksiyon yöntemi kullanılarak elde edilen ekstraktlarda maserasyon ve ultrasonik destekli yöntemle göre daha yüksek CERAC ve DPPH değerine sahip olan ekstraktlar bulunduğu gözlemlenmiştir. Elde edilen bu sonuçlar ekstraksiyon parametrelerinin ekstrakte edilmek istenen biyoaktif madde içeriği üzerinde etkili bir faktör olduğu gerçeğini desteklemektedir.



Şekil 17. Mikrodalga yönteminin toplam fenolik, toplam flavonoid, cuprac, cerac, dpph madde miktarı üzerine etkisi.

Ultrasonik destekli yöntem kullanılarak hazırlanan propolis ekstraktlarının toplam flavonoid içerikleri 0.1375-0.2188 g QE/g; toplam fenolik içerikleri 0.1497-0.3688 g GAE/g olarak kaydedilirken CERAC, CUPRAC ve DPPH değerleri sırasıyla 0.5722- 0.8397 g TE/g, 0.4224-0.6058 g TE/g, 0.5435-0.6209 g TE/g arasında kaydedilmiştir. Ölçülen bu değerlere göre en yüksek toplam flavonoid ve fenolik madde miktarı sırasıyla %40 genlik-60 dk ve %60 genlik-5 dk'lık ekstraksiyon parametreleri sonucunda gözlemlenmiştir. Bununla birlikte tüm

antioksidan aktivite testlerinde maksimum değerler aynı uygulama parametresinde (%80 genlik-20 dk) ölçülmüş olup sonuçlar birbiriyle uyum göstermiştir. Ayrıca maserasyon ve mikrodalga destekli yöntemle kıyaslandığında en yüksek flavonoid madde içeriğine sahip olan ekstrakt ultrasonik destekli ekstraksiyon yöntemiyle elde edilmiştir.



Şekil 18. Ultrasonik ekstraksiyon yönteminin toplam fenolik, toplam flavonoid, cuprac, cerac, dpph madde miktarı üzerine etkisi.

Sonuç olarak, yaşam kalitesini artırmak ve hastalıkları önlemek amacıyla besin takviyesi olarak kullanılan doğal ürünlerin önemi son yıllarda gittikçe artmıştır. Bu ürünlerden birisi olan propolis, bal arıları tarafından bitkilerden toplanan ve kimyasal içerik bakımından oldukça karmaşık yapıya sahip olan bir arı ürünüdür. Propolis kül, mum, biyoaktif bileşikler ve polen karışımından dolayı alerjik reaksiyonlara neden olabileceği için ham olarak doğrudan tüketilemez. Bu nedenle, propolisin biyoaktif bileşenlerini ortaya çıkarmak için birçok farklı ekstraksiyon prosedürü kullanılmaktadır. Propolis ekstraksiyonunda en önemli amaçlardan birisi özellikle propolisin birçok biyoaktif özelliğinden sorumlu olduğu bilinen fenolik bileşikleri en iyi oranda ekstrakte edebilmektir. Bu noktada ekstraksiyon yöntemi oldukça önem arz etmektedir.

Yapmış olduğumuz bu tez çalışması neticesinde geleneksel yöntem olarak bilinen maserasyon yöntemine kıyasla diğer iki yöntemin daha sofistike ve pahalı aletler gerektirdiğini fakat daha kısa zamanda ekstraksiyon işlemini gerçekleştirildiğini

gözlemledik. Bununla birlikte propolisten ekstrakte edilmek istenen biyoaktif madde türüne bağlı olarak da yöntem verimlerinde farklılıklar olduğu belirlenmiştir. Bu çalışmanın propolisin ekstraksiyonu için yürütülen standardizasyon çalışmalarına katkı sağlaması beklenmektedir. Bununla birlikte kimyasal içeriği (bağlantılı olarak biyoaktif özellikleri) birçok faktöre bağlı olarak oldukça değişkenlik gösteren propolisin ekstraksiyon yönteminin standardize edilebilmesi için farklı bölgelerden daha fazla numune ve değişkenle çalışmaya gereksinim duyulmaktadır. Böylelikle ulusal ve uluslararası propolis standartlarının oluşturulması sağlanabilir.



KAYNAKLAR

- Ahangari, Z., Naseri, M., & Vatandoost, F. (2018). Propolis: Chemical composition and its applications in endodontics. *Iranian Endodontic Journal*, 13(3), 285.
- Albayrak, S., & Albayrak, S. (2008). Propolis: Doğal antimikrobiyal madde. *Ankara Eczacılık Fakültesi Dergisi*, 37, 201-215.
- Alencar, S. M., Oldoni, T. L. C., Castro, M. L., Cabral, I. S. R., Costa-Neto, C. M., Cury, J. A., ... & Ikegaki, M. (2007). Chemical composition and biological activity of a new type of Brazilian propolis: Red propolis. *Journal of Ethnopharmacology*, 113(2), 278-283.
- Andrade, J. K. S., Denadai, M., de Oliveira, C. S., Nunes, M. L., & Narain, N. (2017). Evaluation of bioactive compounds potential and antioxidant activity of brown, green and red propolis from Brazilian northeast region. *Food Research International*, 101, 129-138.
- Apak, R., Güçlü, K., Özyürek, M., & Karademir, S. E. (2004). Novel total antioxidant capacity index for dietary polyphenols and vitamins C and E, using their cupric ion reducing capability in the presence of neocuproine: CUPRAC method. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52(26), 7970-7981.
- Azza M. M., & Abd-El-Rhman, A. (2009). Antagonism of aeromonas hydrophila by propolis and its effect on the performance of Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*. *Fish & Shellfish Immunol*, 27, 454-459.
- Bankova, V., Christov, R., Stoev, G., & Popov, S., (1992). Determination of phenolics from propolis by capillary gas chromatography. *J. of Chromatography*, 607, 150-153.
- Bankova, V., Dyulgerov, A., Popov, S., Evstatieva, L., Kuleva, L., Pureb, O., & Zamjansan, Z. (1992). Propolis produced in Bulgaria and Mongolia: phenolic compounds and plant origin. *Apidologie*, 23, 79-85.
- Bankova, V., Christov, R., Kujumgiev, A., Marcucci, M. C., & Popov, S. (1995). Chemical composition and antibacterial activity of Brazilian propolis. *Z Naturforsch [C]*, 50, 167-72.
- Bankova, V. S., Castro, S. L., & Marcucci, M. C. (2000). Propolis: recent advances in chemistry and plant origin. *Apidologie*, 31, 3-15.
- Bankova, V., Popova M., Bogdanov S., & Sabatini A. G. (2002). Chemical composition of European propolis: expected and unexpected results. *Zeitschrift für Naturforschung C- A Journal of Biosciences*, 57 (5-6), 530-533.
- Bankova, V., Bertelli, D., Borba, R., Conti, B. J., da Silva Cunha, I. B., Danert, C., ... & Papotti, G. (2019). Standard methods for *Apis mellifera* propolis research. *Journal of Apicultural Research*, 58(2), 1-49.
- Basim, E., Basim, H., & Özcan, M. (2006). Antibacterial activities of Turkish pollen and propolis extracts against plant bacterial pathogens. *Journal of Food Engineering*, 77, 992-996.
- Bayram, S., Bayram, N. E., Gerçek, Y. C., & Sorkun, K. (2016). Anticytotoxic and antimutagenic effects of propolis on human lymphocytes in vitro. *Mellifera*, 16(2), 38-46.
- Bayram, S., Bayram, N. E., Gerçek, Y. C., Aydoğan, M. N., & Öz, G. C. (2017). Chemical analysis and antimicrobial effect of propolis from Hakkari province of Turkey against some pathogenic microorganisms. *European Journal of Biology*, 76(2), 74-78.

- Beejmohun, V., Fliniaux, O., Grand, E., Lamblin, F., Bensaddek, L., Christen, P., Kovensky, J., Fliniaux, M., & Mesnard, F. (2007). Microwave-assisted extraction of the main phenolic compounds in flaxseed. *Phytochemical Analysis*, 18, 275-282.
- Berker, K. I., Olgun Özdemir, F. A., Özyurt, D., Demirata, B., & Apak. R. (2013). Lipofilik antioksidanların ölçülmesinde modifiye Folin-ciocalteu antioksidan kapasite testi. *J. Agric. Besin Kimyası*, 61(20), 4783-4791. <https://doi.org/10.1021/jf400249k> adresinden edinilmiştir.
- Biscaia, D., & Ferreira, S. R. (2009). Propolis extracts obtained by low pressure methods and supercritical fluid extraction. *The Journal of Supercritical Fluids*, 51(1), 17-23.
- Büyüktuncel, E. (2012). Gelişmiş ekstraksiyon teknikleri 1, *Hacettepe Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Dergisi*, cilt 32, sayı 2, ss. 209-242.
- Camel, V. (2001). Recent extraction techniques for solid matrices-supercritical fluid extraction, pressurized fluid extraction and microwave-assisted extraction: their potential and pitfalls. *Analyst*, 126, 1182-1193.
- Capelo, J. L., & Mota, A. M. (2005). Ultrasonication for analytical chemistry. *Current Analytical Chemistry*, 1, 193-201.
- Castolda, S., & Capasso, F. (2002). Propolis an old remedy used in modern medicine. *Fitoterapia*, 73, 51-56.
- Chang, C. C., Yang, M. H., Wen, H. M., & Chern, J. C. (2002). Estimation of total flavonoid content in propolis by two complementary colorimetric methods. *Journal of Food and Drug Analysis*, 10(3).
- Crane, E. (1990). Bees and beekeeping. science, practice and world resources. *New York: Cornell University Pres*, 593 p.
- Cunha, I. B. S., Sawaya, A. C. H. F., Caetano, F. B., Shimizu, M. T., Marcucci, M. C., Drezza, F. T., Povia, G., & Carvalho, P.O. (2004). Factors that influence the yield and composition of Brazilian propolis extract. *Journal Brazilian Chemistry Society*, 15, 964-970.
- Cunha, I. B., Rodrigues, M. L., Meurer, E. C., Bankova, V. S., Marcucci, M. C., & Eberlin M. N., (2006). Effect of the maceration time on chemical composition of extracts of Brazilian propolis. *Journal of Apicultural Research*, 45(3), 137-144.
- Çerçiler, S. (2016). *Türk propolisinin sulu ekstraktının insanLlaringeal epidermoid karsinoma (Hep-2) hücre serilerinde mitokondriyal membran potansiyeline etkisi*, (Yayınlanmamış yüksek lisans tezi). Karadeniz Teknik Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü.
- da Graça Miguel, M., Doughmi, O., Aazza, S., Antunes, D., & Lyoussi, B. (2014). Antioxidant, anti-inflammatory and acetylcholinesterase inhibitory activities of propolis from different regions of Morocco. *Food Science and Biotechnology*, 23(1), 313-322.
- de Aguiar, S. C., Zeoula, L. M., do Prado, O. P. P., Arcuri, P. B., & Forano, E. (2014). Characterization of rumen bacterial strains isolated from enrichments of rumen content in the presence of propolis. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 30, 2917-2926.
- de Lima, G. G., de Souza, R. O., Bozzi, A. D., Poplawska, M. A. , Devine, D. M., & Nugent, M. J. (2016). Extraction method plays critical role in antibacterial activity of propolis-loaded hydrogels. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 105, 1248-1257.

- Devequi-Nunes, D., Machado, B. A. S., de Abreu Barreto, G., Silva, J. R., da Silva, D. F., da Rocha, J. L. C., ... & Umsza-Guez, M. A. (2018). Chemical characterization and biological activity of six different extracts of propolis through conventional methods and supercritical extraction. *PLoS one*, 13(12), e0207676.
- Dığrak, M., Yılmaz, Ö., Çelik, S., & Yıldız, S. (1995). Propolisdeki yağ asitleri ve antimikrobiyal etkisi üzerine in vitro araştırmalar. *Sci Eng J Firat Univ* 20, 249-255.
- do Nascimento, T. G., da Silva, P. F., Azevedo, L. F., da Rocha, L. G., de Moraes Porto, I. C. C., Lima e Moura, T. F. A., vd., (2016). Polymeric nanoparticles of Brazilian red propolis extract: preparation, characterization, antioxidant and leishmanicidal activity. *Nanoscale Res Lett.* 11, 301.
- Dobrowolski, J. W., Vohora, S. B., Sharma, K., Shah, S. A., Naqvi, S. A. H., & Dandiya, P. C. (1991). Antibacterial, antifungal, antiamebic, antiinflammatory and antipyretic studies on propolis bee products. *J. Ethnopharmacol*, 35, 77–82.
- Doğan, N., & Hayoğlu, İ. (2012). Propolis ve kullanım alanları. *Harran Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi*, 16, 39-48.
- Ecem Bayram N., Sorkun K., Cevahir Öz G., Salih B., & Topçu G. (2018). Chemical characterization of 64 propolis samples from Hakkari, Turkey. *ACG Publications. Records of Natural Products*: 12(6), 569-581.
- Ecem Bayram N., & Gerçek, Y. C. (2019). Appropriate maceration duration for the extraction of propolis. *Feb-Fresenius Environmental Bulletin*. Syf:188.
- Garcia-Viguera, C., Ferreres, F., & Tomas-Barberan, F. A. (1993). Study of Canadian propolis by GC-MS and HPLC. *Z. Naturforsch*, 48, 731-35.
- Genc, F., & Dodoloğlu, A. (2011). Arıcılığın temel esasları. *Ataturk Üniversitesi Yayınları* No: 931. Ziraat Fakültesi Yayın No: 341.Erzurum.
- Ghisalberti, E. L., (1979). Propolis: A review. *Bee World*, 60, 59-84.
- Grange, J. M., & Davey, R. W. (1990). Antibacterial properties of propolis (Bee Glue). *J. Roy. Soc. Medicine*, 83, 159–161.
- Greenaway, W., Scaysbrook, T., & Whatley, F. R. (1987). The analysis of bud exudate of *Populus xeuramericana* and of propolis. By gas chromatography -mass spectrometry. *Proc Royal Soc.*, 232, 249-272.
- Hartwich, A., Legutko, J., & Wszolek, J. (2000). Propolis: its properties and administration to patients treated for some surgical diseases. *Przegląd Lekarski*, 57(4), 191-194.
- Hasan, A. E. Z., Mangunwidjaja, D., Sunarti, T. C., Suparno, O., & Setiyono, A. (2014). Investigating the antioxidant and anticytotoxic activities of propolis collected from five regions of Indonesia and their abilities to induce apoptosis. *Emirates Journal of Food and Agriculture*, 390-398.
- Hepburn, H. R., & Kurstjens, M. (1984). On the strength of propolis (Bee Glue). *Naturwissenschaften*. 71, 591–592.
- Hepşen, İ. F. Tilgen, F., & Er, H. (1996). Propolis: tıbbi özellikleri ve oftalmolojik kullanımı. *Turgut Özal Tıp Merkezi Dergisi*, 3, 386-391, Malatya.
- Huang, D., Ou, B., & Prior, R. L. (2005). The chemistry behind antioxidant capacity assays. *Journal of Agriculture Food Chemistry*, 53, 4303- 4310.
- Huang, S., Zhang, C. P., Wang, K., Li, G., & Hu, F. L. (2014). Recent advances in the chemical composition of propolis. *Molecules*, 19(12), 19610-19632.

- Huertas-Perez, J. F., Iruela, M. D., Garcia-Campana, A. M., Gonzalez-Casado, A., & Sanchez-Navarro, A. (2006). Determination of the herbicide metribuzin and its major conversion products in soil by micellar electrokinetic chromatography. *Journal of Chromatography A*, 1102, 280-286.
- İlbay, Z. (2016). *Turunçgil meyve ve yapraklarının farklı ekstraksiyon yöntemleriyle ekstraksiyonu ve matematik modellemesi* (Yayınlanmamış doktora tezi). İstanbul Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü.
- Jong-Sung, P., & Kun-Suk, W. (1997). The usage and composition of propolis added cosmetics in korea. In bee products (pp. 121-124). *Springer, Boston, MA*.
- Jug, M., Končić, M. Z., & Kosalec, I. (2014). Modulation of antioxidant, chelating and antimicrobial activity of poplar chemo-type propolis by extraction procures. *LWT-Food Science and Technology*, 57(2), 530-537.
- Kaal, J. (1992). Propolis. *Honey and Bess.*;9-43.
- Kalogeropoulos, N., Konteles, S.J., Troullidou, E., Mourtzinis, I., & Karathanos, V.T. (2009). Chemical composition, antioxidant activity and antimicrobial properties of propolis extracts from greece and cyprus. *Food Chem.* 116, 452-61.
- Kartal, M., Kaya, S., & Kurucu, S., (2002). GC-MS analysis of propolis samples from two different regions of Turkey, *zeitschrift fur naturforschung C-Journal of biosciences*, 57(9-10), 905-909.
- Kartal, M., Yıldız, S., Kaya, S., Kurucu, S., & Topçu, G. (2003). Antimicrobial activity of propolis samples from two different regions of anatolia. *Journal of Ethnopharmacology*, 86, 69-73.
- Katircioğlu, H., & Mercan, N. (2006). Antimicrobial activity and chemical compositions of Turkish propolis from different rregions". *African Journal of Biotechnology*, 5, 1151-1153.
- Kaufmann, B., & Christen, P. (2002). Recent extraction techniques for natural products: microwave-assisted extraction and pressurised solvent extraction. phytochemical analysis: *An International Journal of Plant Chemical and Biochemical Techniques*, 13(2), 105-113.
- Kaufmann, B., Rudaz, S., Cherkaoui, S., Veuthey, J. L., & Chisten, P. (2007). Influence of plant matrix on microwave-assisted extraction process. the case of diosgenin extracted from fenugreek. *Phytochemical Analysis*. 18, 70-76.
- Kılıç, Ö. (2010). Defected ground structure and its applications to microwave devices and antenna feed networks, master of science in electrical and electronics engineering department, *Middle East Technical University*.
- Krell, R. (1996). Value-Added products from beekeeping, fao agricultural services bulletin no. 124, chapter 3, pollen, <http://www.fao.org/docrep>.
- Kumazawa, S. (1994). Studies of the constituents of uruguay propolis, *Agricultural and Food Chemistry*, 50, 4777- 4782.
- Kumova, U., Korkmaz, A., Avcı, B. C., & Ceyran, G. (2002). Önemli bir arı ürünü: propolis. *Uludağ Arıcılık Dergisi Mayıs*.
- Kutluca, S., Genç, F., & Korkmaz, A. (2006). Propolis. *Samsun Tarım İl Müdürlüğü Çiftçi Eğitimi ve Yayım Şubesi*, Samsun, p. 57.
- Lagouri, V., Prasianaki, D., & Krysta, F. (2014). Antioxidant properties and phenolic composition of greek propolis extracts. *Int J Food Prop*, 17, 511-522.

- Laskar, R. A., Sk, I., Roy, N., & Begum, N. A. (2010). Antioxidant activity of indian propolis and its chemical constituents. *Food Chemistry*, 122, 233-237.
- Lesueur, C. , Gartner, M., Mentler, A., & Fuerhacker, M. (2008). Comparison of four extraction methods for the analysis of 24 pesticides in soil samples with gas chromatography-mass spectrometry and liquid chromatography-ion trap-mass Spectrometry. *Talanta*, 75, 284-293.
- Marcucci, M. C. (1995). Propolis: chemical composition, biological properties and therapeutic activity. *Apidologie*, 26, 83–89.
- Margeretha, I., Suniarti, D. F., Herda, E. M., & Alim, Z. (2012). Optimization and comparative study of different extraction methods of biologically active components of Indonesian propolis trigona spp, *Doğal Ürünler Dergisi*, 5, 233- 242.
- Markham, K. R., Mitchell, K. A., Wilkins, A. L., Daldy, J. A., & Lu, Y. (1996). HPLC and gc-ms identification of the major organic constituents in new zealand propolis. *Phytochemistry*, 42, 205–211.
- Mello, B. C. B. S., Petrus, J. C. C., & Hubinger, M. D. (2010). Concentration of flavonoids and phenolic compounds in aqueous and ethanolic propolis extracts through nanofiltration. *Journal of Food Engineering*, 96, 533-539.
- Mirzoeva, O. K., Grishanin, R. N., & Calder, P. C. (1997). Antimicrobial action of propolis and some of its components: the effects on growth, membrane potential and motility of bacteria. *Microbiol. Res*, 152, 239–246.
- Moreno, M. I. N., M. I. Isla, A. R. Sampietro, & M. A. Vattuone, (2000). Comparison of the freeradicalscavenging activity of propolis from several regions of argentina. *J. Ethnopharmacol* 71: 109 -114.
- Mot, C. A., Dumitrescu, S. R., & Sarbu, C. (2011). Rapid and effective evaluation of the antioxidant capacity of propolis extracts using dpph bleaching kinetic profiles, ft-ir and uv-vis spectroscopic data, *Journal of Food Composite and Analysis*, 24, 516-522.
- Narimane, S., Demircan, E., Salah, A., & Salah, R. (2017). Correlation between antioxidant activity and phenolic acids profile and content of algerian propolis: influence of solvent. *Pakistan Journal of Pharmaceutical Sciences*, 30.
- Neto, M. R., Tintino, S. R., da Silva, A. R. P., do Socorro Costa, M., Boligon, A. A., Matias, E. F., & Coutinho, H. D. M. (2017). Seasonal variation of Brazilian red propolis: antibacterial activity, synergistic effect and phytochemical screening. *Food and Chemical Toxicology*, 107, 572-580.
- Nieva, M. M. I., Isla, M. I., Cudmani, N. G., Vattuone, M. A., & Sampietro, A. R. (1999). Screening of antibacterial activity of amaicha del valle (tucuman, argentina) propolis. *J. Ethnopharmacol.* 68, 97–102.
- Nina, N., Lima, B., Feresin, G. E., Giménez, A., Salamanca Capusiri, E., & Schmeda Hirschmann, G. (2016). Antibacterial and leishmanicidal activity of bolivian propolis. *Letters in Applied Microbiology*, 62, 290-296.
- Özdal, T., Sari-Kaplan, G., Mutlu-Altundag, E., Boyacioglu, D., & Capanoglu, E. (2018). Evaluation of Turkish propolis for its chemical composition, antioxidant capacity, anti-proliferative effect on several human breast cancer cell lines and proliferative effect on fibroblasts and mouse mesenchymal stem cell line. *Journal of Apicultural Research*, 57(5), 627-638.
- Öztürk, A. İ. (2006). Propolis. *Beekeeper's World*, 2(1), 31-33.

- Özyurt, H., Özyurt, B., Söğüt, S., Şahin, Ş., Temel, İ., & Akyol, Ö. (2007). Bleomisin ile oluşturulan akciğer fibrozisinde pürin katabolizması enzim aktiviteleri üzerine cape nin etkisi. *Fırat Tıp Dergisi*, 12(3), 168-172.
- Park, Y.K., & Ikegaki, M. (1998): Preparation of water and ethanolic extracts of propolis and evaluation of the preparations. *Biosi. Biotech. Biochem.* 62, 2230-2232.
- Paviani, L., Sacoda, P., Saito, E., & Cabral, F. (2010). Extraction techniques of red and green propolis: extraction yield of phenolic compounds. *State University of Campinas*.
- Pawliszyn, J. (2003). Sample preparation: quo vadis? *Analytical Chemistry*, 75, 2543-2558.
- Pehlivan, T., Şahinler, N., & Gül, A. (2012). Doğal bir ürün propolis; yapısı ve kullanım alanları. *Arıcılık Araştırma Dergisi*, 4(7), 9-13.
- Pellati, F., Prencipe, F. P., Bertelli, D., & Benvenuti, S. (2013). An efficient chemical analysis of phenolic acids and flavonoids in raw propolis by microwave-assisted extraction combined with high-performance liquid chromatography using the fused-core technology. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 81, 126-132.
- Popova, M., Reyes, M., Le Conte, Y., & Bankova, V. (2014). Propolis chemical composition and honeybee resistance against varroa destructor. *Natural Product Research*, 28(11), 788-794.
- Pujirahayu, N., Ritonga, H., & UslinaWaty, Z. (2014). Properties and flavonoids content in propolis of some extraction method of raw propolis. *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Science*, 6, 338-340.
- Reis JHdO, Barreto GdA, Cerqueira J.C., Anjos JPd, Andrade L.N., Padilha F.F., Druzian J. I., & Machado B. A. S. (2019). Evaluation of the antioxidant profile and cytotoxic activity of red propolis extracts from different regions of northeastern brazil obtained by conventional and ultrasound-assisted extraction. *PLoS ONE* 14(7): e0219063.
- Ristivojević, P., Trifković, J., Andrić, F., & Milojković-Opsenica, D. (2015). Poplar-type propolis: chemical composition, botanical origin and biological activity. *natural Product Communications*, 10(11), 1934578X1501001117.
- Roberfroid, M.B. (2000). A european consensus of scientific concepts of functional foods. *Nutrition*, 7, 689-691.
- Rostagno, M. A. , Palma, M., & Barroso, C. G. (2007). Ultrasound-assisted extraction of isoflavones from soy beverages blended with fruit Juices *Anal. Chim. Acta*, 597, pp. 265-272.
- Salatino, A., & Salatino, M. L. F. (2018). Brazilian red propolis: legitimate name of the plant resin source. *MOJ Food Processing & Technology*, 6(1).
- Santos, H. M., & Capelo, J. L. (2007). Trends in ultrasonic-based equipment for analytical sample treatment. *Talanta*, 73, 795-802.
- Sarikaya, A. O., Ulusoy, E., Öztürk, N., Tuncel, M., & Kolayli, S. (2009). Antioxidant activity and phenolic acid constituents of chestnut (*castania sativa mill.*) honey and propolis. *Journal of Food Biochemistry*, 33, 470-481.
- Scheller, (1990). Plantorigins of propolis: a report of work at oxford. *Bee World*. P:30.
- Sforcin, J. M., Fernandes, Jr., A., Lopes, C. A. M., Bankova, V., & Funari, S. R. C. (2000). Seasonal effect on Brazilian propolis antibacterial activity. *J. Ethnopharmacol.* 73, 243–249.

- Sharaf, S. & El-Naggar, M. E. (2018). Eco-friendly technology for preparation, characterization and promotion of honey bee propolis extract loaded cellulose acetate nanofibers in medical domains. *Cellulose*, 25, 5195-5204.
- Silici, S., & Kutluca, S. (2005). Chemical composition and antibacterial activity of propolis collected by three different races of honeybees in the same region. *J.Ethnopharmacol.* 99, 69–73.
- Silici, S. (2010). Turkish Propolis: Chemical constituents, *Mellifera*, 10(19), 24-33.
- Stock D., Finger D., & Schmidt E.M. (2014). A comparison between characterization and biological properties of Brazilian fresh and aged propolis. *Hindawi Publishing Corporation*, 257617, 1-10.
- Szabo, M. R., Iditoiu, C., Chambre, D., Lupea, A. X. (2007). Improved DPPH determination for antioxidant activity spectrophotometric assay. Institute of Chemistry, Slovak Academy of Sciences. *Chemical Papers*, 61(3), 214-216.
- Tadeo, J. L., Sanchez-Brunete, C., Albero, B., & Garcia-Valcarcel, A. I. (2010). Application of ultrasound-assisted extraction to the determination of contaminants in food and soil samples. *Journal of Chromatography A*, 1217, 2415-2440.
- Tiwari, B. K., Patras, A., Brunton, N., Cullen, P. J., & O'Donnell C. P. (2010). Effect of ultrasound processing on anthocyanins and color of red grape juice ultrason. *Sonochem.*, 17, pp. 598-604
- Toma, M., Vinatoru, M., Paniwnyk, L., & Mason, T. J. (2001). Investigation of the effects of ultrasound on vegetal tissues during solvent extraction ultrason. *Sonochem.*, 8, pp. 137-142.
- Trusheva, B., Trunkova, D., & Bankova, V. (2007). Different extraction methods of biologically active components from propolis: a preliminary study. *Chemistry Central Journal*, 1:13, doi:10.1186/1752-153X-1-13.
- Uğur, A., & Aslan, T. (2004). An in vitro study on antimicrobial activity of propolis from Mugla province of turkey. *Journal of Medicinal Food*, 7, 90-94.
- Uzel, A., Sorkun, K., Önçağ, Ö., Çoğulu, D., Gençay, Ö., & Salih, B. (2005). Chemical compositions and antimicrobial activities of four different anatolian propolis samples. *Microbiological Research*. 160, 189-195.
- Vinatoru, M. (2001). An overview of the ultrasonically assisted extraction of bioactive principles from herbs. *Ultrasonics Sonochemistry*, 8, 303-313.
- Waykar, B., & Alqadhi, Y. A. (2016). Beekeeping and bee products; boon for human health and wealth. *Indian Journal of Pharmaceutical and Biological Research*, 4(3), 20.
- Wu, H. , Hulbert, G.J., & Mount J.R. (2001). Effects of ultrasound on milk homogenization and fermentation with yoghurt starterinnov. *Food Sci. Emerg. Technol.*, 1, pp. 211-218
- Yesiltas, B., Capanoglu, E., Firatligil-Durmus, E., Sunay, A. E., Samanci, T., & Boyacioglu, D. (2014). Investigating the in-vitro bioaccessibility of propolis and pollen using a simulated gastrointestinal digestion system. *Journal of Apicultural Research*, 53(1), 101-108.
- Yücel B., Topal, E., Akçiçek, E., & Kösoğlu, M. (2014). Propolisin insan sağlığına etkileri. *Anadolu Ege Tarımsal Araştırma Enstitüsü Dergisi*, 24, 41-49, İzmir.

Yucel, B., Topal, E., & Kosoglu, M. (2017). Bee products as functional food. *superfood and functional food: An overview of their processing and utilization*, 15.1-344.

Zhang, H., Fu, Y., Niu, F., Li, Z., Ba, C., & Jin, B. (2018). Enhanced antioxidant heat-denatured zein and carboxymethyl chitosan. *Food Hydrocoll.*, 81, 104–112.



ÖZGEÇMİŞ



Sabiha KAYABAŞI

26 Mart 1992 yılında Karahallı/Uşak'da doğdu. 2010 yılında Bayburt Üniversitesi Mühendislik Fakültesi Gıda Mühendisliği Bölümüne başladı ve 2014 yılında mezun oldu. Aynı yıl Bayburt Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Gıda Mühendisliği Anabilim Dalında yüksek lisans eğitimine başladı.