

Tek Diş Siyah Sarımsak Ekstrelerinin Antioksidan, Sitotoksik ve Antidiyabetik Etkilerinin Değerlendirilmesi

Selen İLGÜN*, Esra KÖNGÜL ŞAFAK**, Sena AKÇAKAYA MUTLU***, Gökçe ŞEKER KARATOPRAK****

Öz

Amaç: *Allium sativum* L. (Sarımsak) bitkisinin belli bir derecede nem ve sıcaklık ile işlem görmesi sonucu, elde edilen fermente ürün tek diş siyah sarımsağın biyoaktivitesinin tespit edilmesi amaçlandı.

Yöntem: Çalışmada, siyah sarımsak dişlerinin etanol ve su ekstresi hazırlandı, yine ayrılan kabuk kısımları da etanol ile ekstre edilerek, DPPH• ve ABTS•+ radikalini süpürücü etki tayin yöntemi ile antioksidan aktivitesi değerlendirildi. *In vitro* α -amilaz inhibisyon testi ile antidiyabetik aktivitesi belirlendi. MTT yöntemi kullanılarak ekstrelerin Colo-205 hücrelerinde sitotoksik etkisi tayin edildi.

Bulgular: Siyah sarımsak ekstrelerinden kabuk ekstresi (A.S.K EtOH) en yüksek toplam fenol ($61,40 \pm 0,48$ mg_{GA}/g_{ekstre}) ve toplam flavonoid ($26,08 \pm 0,37$ mg_{CA}/g_{ekstre}) içeriğine sahip ekstre olarak tespit edildi. Ayrıca, 4mg/mL konsantrasyonda A.S. SU ekstresi DPPH• radikalini süpürücü aktivitesi (% inhibisyonu $64,66 \pm 1,94$) en yüksek ekstre olarak tespit edilirken, A.S.K EtOH ekstresi 4mg/mL'de ABTS radikalini süpürücü aktivitesi en yüksek ekstre ($2,44 \pm 0,16$ mmol/L/Trolox) olarak bulundu. İnsan kolorektal kanser hücre hattı Colo-205'te sitotoksik etkisi değerlendirilen ekstrelerden, S.K EtOH ekstresinin 1000-250 μ g/mL konsantrasyon aralığında diğer ekstrelerle oranla en fazla sitotoksik etki gösteren ekstre olduğu belirlendi. Ekstrelerden hiçbiri akarbozun pozitif kontrol olarak kullanıldığı α -amilaz inhibisyon testine göre antidiyabetik aktivite gösteremedi.

Sonuç: Sonuçlar son yıllarda oldukça popüler olan siyah sarımsağın biyolojik aktivitelerine dair ön çalışma verileridir. Elde edilen verilere göre siyah sarımsağın aktif bileşenlerinin daha detaylı bir şekilde çalışılması ve siyah sarımsak elde etme ve saklama yöntemlerinin daha detaylı araştırılması gerekmektedir. Böylelikle

Özgün Araştırma Makalesi (Original Research Article)

Geliş / Received: 25.02.2022 & Kabul / Accepted: 09.08.2022

DOI: <https://doi.org/10.38079/igusabder.1079039>

* Dr. Öğr. Üyesi, Erciyes Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi, Farmasötik Botanik Anabilim Dalı, Kayseri, Türkiye.

E-posta: erturkselen@gmail.com ORCID <https://orcid.org/0000-0002-8544-0683>

** Arş. Gör., Eczacılık Fakültesi, Farmakognozi Anabilim Dalı, Kayseri, Türkiye. E-posta: esrakongul@erciyes.edu.tr

ORCID <https://orcid.org/0000-0003-4775-6860>

*** Arş. Gör., Erciyes Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi, Farmasötik Botanik Anabilim Dalı, Kayseri, Türkiye.

E-posta: senaakcakaya@erciyes.edu.tr ORCID <https://orcid.org/0000-0003-2288-8496>

**** Doç. Dr., Eczacılık Fakültesi, Farmakognozi Anabilim Dalı, Kayseri, Türkiye. E-posta: gskaratoprak@erciyes.edu.tr

ORCID <https://orcid.org/0000-0001-5829-6914>

tıbbi açıdan oldukça büyük öneme sahip bir bitkinin fermente halinin kullanımı ve faydaları ile ilgili umut vaat edici sonuçlar elde edilebilir.

Anahtar Sözcükler: Siyah sarımsak, maillard reaksiyonu, antioksidan, sitotoksiste.

Evaluation of Antioxidant, Cytotoxic and Antidiabetic Effects of Single Bulb Black Garlic Extracts

Abstract

Aim: It was aimed to determine the bioactivity of a single clove of black garlic, the fermented product obtained as a result of the treatment of *Allium sativum* L. (Garlic) plant with a certain degree of humidity and temperature.

Method: In the study, ethanol and water extract of black garlic bulb were prepared, and the separated husks were also extracted with ethanol, and their antioxidant activity was evaluated by scavenging DPPH• and ABTS•+ radicals. Its antidiabetic activity was determined by in vitro α -amylase inhibition test. The cytotoxic effect of the extracts on Colo-205 cells was determined using the MTT method.

Results: Among the black garlic extracts, the husk extract (A.S.K EtOH) was determined as the extract with the highest total phenol (61.40 ± 0.48 mg_{GA}/g_{extract}) and total flavonoid (26.08 ± 0.37 mg_{CA}/g_{extract}) content. In addition, at a concentration of 4mg/mL, A.S. SU had the highest DPPH• radical scavenging activity (% inhibition 64.66 ± 1.94), while A.S.K EtOH extract had the highest ABTS radical scavenging activity (2.44 ± 0.16 mmol/L). /Trolox) was found. Among the extracts whose cytotoxic effect was evaluated in the human colorectal cancer cell line Colo-205, it was determined that A.S.K EtOH extract showed the most cytotoxic effect compared to other extracts in the concentration range of 1000-250 μ g/mL. None of the extracts showed antidiabetic activity according to the α -amylase inhibition test, in which acarbose was used as a positive control.

Conclusion: The results are preliminary study on the biological activities of black garlic, which has been very popular in recent years. According to the data obtained, the active components of black garlic should be studied in more detail and the methods of obtaining and storing black garlic should be investigated in more detail. Thus, promising results can be obtained regarding the use and benefits of the fermented form of a medicinally important plant.

Keywords: Black garlic, maillard reaction, antioxidant, cytotoxicity.

Giriş

Allium sativum L. (Sarımsak) *Amaryllidaceae* familyasına ait, iki yıllık, keskin aromatik koku ve lezzette sahip bir bitki olup insanlar tarafından tüketilen popüler besinlerdendir. Yüzyıllardır yemeklerde aroma veren bir baharat olarak kullanılmasının yanında sağlık üzerine olan

potansiyel yararlarından dolayı da geleneksel tıpta kullanılmaktadır¹. Kültürü yapılan en eski bitkilerden biri olan sarımsak, mitolojide “ölüme meydan okuyan bitki” olarak bilinmekte ve yaklaşık 5000 yıllık geçmişi ile sağlık, ekonomi ve sosyal alanda önemini korumaktadır².

Günümüz yoğun yaşam temposu içerisinde insanlar daha sağlıklı bir yaşam sürdürmek adına takviye gıdalara yönelmekte, özellikle güçlü doğal antioksidan içeriğine sahip, polifenoliklerce zengin gıdalara başvurmaktadır. Bu sebeple de özellikle doğal ürünlere olan rağbet artmaktadır. Sarımsağın da antikanser, antiinflamatuvar, kardiyoprotektif gibi yararlı etkileri uzun yıllardır araştırılmakta tıbbi ve faydalı özellikleri üzerinde çalışmalar yapılmaya devam etmektedir³. Son zamanlarda ise siyah sarımsağın da bu çalışmalara ne denli katkı sağladığı merak edilen diğer önemli bir konu olarak karşımıza çıkmakta ve popüleritesi giderek artmaktadır.

Siyah sarımsak ise taze sarımsağın fermantasyon işleminin son ürününde oluşan siyah rengi ile karakterize fermente bir üründür. Kore’de ve Japonya’da sağlık üzerine olan etkileri sebebiyle geliştirilmekte olan bu ürün, bilinen taze sarımsağın belirli kademedeki sıcaklık ve nem ile birkaç günden birkaç aya kadar herhangi bir işlem görmeden ve bazı katkı maddeleri olmadan rengi siyaha dönene kadar saklanmasıyla yapılır. Genellikle yüksek nem (%60–90) ve sıcaklık (40–90 °C) altında 10 gün boyunca bekletilen taze sarımsağın saf beyaz rengi, yaşlanma sürecinde “Maillard reaksiyonu” adı verilen bu işlemle kahverengiye ve sonunda siyaha dönüşür⁴. Siyah sarımsak elde etme işleminin sonucu, sarımsakta bulunan bileşiklerin aktivitesini artırılması, sarımsağın kendine özgü tat ve aromasının ortadan kaldırılması ve siyah sarımsağa özgü bir tat üretilmesi amaçlanmaktadır⁵. Sarımsakta bulunan karbonhidratlar, uçucu kükürt bileşikleri, serbest amino asitler, polifenoller ve diğer antioksidan bileşiklerin modifikasyonu veya etkileşimleri de dahil olmak üzere siyah sarımsağın fizikokimyasal özelliklerinde birçok değişiklik gerçekleşmektedir⁶.

Siyah sarımsak, polifenoller, flavonoidler, tetrahidro- β -karbolin türevleri ve S-allil-sistein ve S-allil-merkaptosistein dahil olmak üzere organosülfür bileşikleri gibi bol miktarda antioksidan bileşiklere sahiptir. Yapılan araştırmalar siyah sarımsağın yüksek oranda bu bileşikleri içermesi sebebiyle, antioksidan, anti-alerjik, anti-diyabetik, antiinflamatuvar ve anti-kanserojen, nöroprotektif ve hepatoprotektif etkiler gösterdiğini vurgulamaktadır⁷. Özellikle S-allilsistein, yüksek antioksidan özellikleri ile bilinen suda çözünür biyoaktif bir bileşiktir ve γ -glutamilsistein katabolizması tarafından oluşturulur. Siyah sarımsakta bulunan tetrahidro- β -karbolin türevleri de antioksidan etkiler gösterir. Ancak, diğer taraftan yapılan bir çalışmada, Maillard reaksiyonu sırasındaki ısıtma işlemi etkileşimlerinin siyah sarımsakta, suda çözünür şekerlerin, polifenollerin, amino asitlerin ve flavonoidlerin miktarında artmanın yanı sıra azalmaya da neden olabileceği belirtilmiştir⁸.

Sarımsak Dünya’da yaklaşık 700 türü bulunan ve tarımı yapılan önemli bir bitkidir. Türkiye’nin de dâhil olduğu birçok ülkede yüzlerce çeşit sarımsak yetişmektedir².

Bu çalışmada ise Kastamonu’da yetişen ve “Mürdük” adı verilen tek diş sarımsağın fermente edilmiş siyah sarımsak formu, kabukları ve dişleri şeklinde ayrılarak farklı şekillerde ekstre edilmiş, elde edilen bu ekstreler toplam fenol ve flavonoit miktarı, antioksidan aktivitesi, antidiyabetik aktivitesi ve insan kolon adenokarsinoma (Colo-205) hücre hattında sitotoksik etkisi açısından değerlendirilmesi amaçlanmıştır.

Gereç ve Yöntem

Ekstrelerin Hazırlanması

Siyah sarımsaklar (*A. sativum*) kabuklarından ayrıldıktan sonra iki farklı ekstre elde etmek için su ve %95’lik etanol kullanılarak ekstre edildi. Üç gün boyunca süren işlem sonrasında süzme işlemi gerçekleştirildi ve süzüntüler birleştirildi. Süzüntüler 37°C’de vakum altında çözücüsünden uzaklaştırıldı ve etanol ve su ekstreleri elde edildi. (A.S.EtOH ve A.S. SU). Ayrılan kabuklarda yine aynı yöntem uygulanarak %95’lik etanol ile muamele edilerek ekstraksiyona tabi tutuldu. (A.S.K EtOH).

Toplam Fenol ve Flavonoit Miktar Tayini

Elde edilen ekstrelerin toplam fenolik madde miktarını belirlemek için Folin-Ciocalteu yöntemi kullanıldı⁹. Toplam fenolik madde miktarı gallik asite eş değer olarak (mg_{GA}/g_{ekstre}) hesaplandı.

Ekstrelerin toplam flavonoit miktarı ise, Zhishen ve ark (1999)’nın kullandıkları yöntem ile belirlendi¹⁰. Toplam flavonoit miktarı, kateşin kalibrasyon eğrisi kullanılarak, kateşine eşdeğer olarak (mg_{CA}/g_{ekstre}) hesaplandı.

1,1-difenil-2-pikrilhidrazil (DPPH•) ve 2,2’-azino-bis (3-etilbenzotiazolin-6- sulfonik asit) (ABTS +•) Radikallerini Süpürücü Etki Tayini

Ekstrelerin DPPH• radikalini süpürücü etkileri Gyamfi ve ark.’nın 1999 metoduna göre yapıldı¹¹. 0,5 mg/mL, 1 mg/mL, 2mg/mL ve 4 mg/mL konsantrasyonlarda hazırlanan ekstrelerden 50 µL alınarak, 450 µL Tris-HCl tamponu (50 mM, pH 7,4) ve 1 mL 1,1-difenil-2-pikrilhidrazil çözeltisi (DPPH•) ile karıştırıldı. Karanlık ortamda 30 dakika oda sıcaklığında bekletilen örneklerin absorbansları 517 nm’de okundu.

Ekstrenin ABTS+• radikalini süpürücü etkisi Re ve ark.’nın (1998) yöntemine göre yapıldı¹². ABTS+• radikali (7 mM) ile K₂S₂O₈ (2,45 mM) karanlıkta 12-16 saat bekletilerek hazırlandı ve absorbansı 734 nm’de 0,700 (±0,030) olacak şekilde ayarlandı. Örnekler 0,5 mg/mL, 1 mg/mL,

2mg/mL ve 4 mg/mL konsantrasyonlarda hazırlandı. Hazırlanan ABTS⁺ çözeltisi (990 µL) ile ekstre çözeltisi (10 µL) karıştırılarak ve 734 nm'de 1 dakikalık aralıklarla 30 dakika süresince reaksiyon kinetiği ölçüldü. Her iki deneyde de standart olarak butil hidroksitoluen (BHT) kullanıldı.

Sitotoksik Etkinin Tetrazolyum Tuzu (MTT) Kolorimetrik Gelişme İnhibisyonu Testi ile Belirlenmesi

Siyah sarımsaklardan hazırlanan ekstrelerin Colo-205 (ATCC CCL-222TM) hücre hattında sitotoksitesini değerlendirmek için hücreler RPMI-1640 besiyerinde çoğaltıldı ve bir yoğunluğa ulaştıktan sonra sayılarak 96 kuyucuklu mikroyuvarla kuyucuk başına 100 µL'de 10⁴ hücre olacak şekilde ekim yapıldı. 24 saatlik inkübasyon sonunda plağa yapışmış olan hücrelerin üstündeki besi yerleri atıldı ve 3,25-1000 µg/mL aralığında hazırlanan ekstreler plağa eklendi. 37 °C'de karbondioksitli etüvde 24 saat bekletilen plaklara MTT çalışma solüsyonu hazırlanıp ilave edildi. 3 saatlik inkübasyondan sonra plaktaki besi yeri boşaltılarak 100 µL DMSO (Dimetil sülfoksit) eklendi. Plakalardaki hücrelerin optik dansiteleri ELISA cihazında (Bio-Rad, ABD) 540 nm dalga boyunda okutuldu.

***In Vitro* α-amilaz İnhibiyon Testi**

Ekstrelerin α-amilaz enzimini inhibe edici etkileri modifiye Sigma-Aldrich metodu ile araştırıldı¹³. Deney tüpünde değişen konsantrasyonlarda 40 µL ekstre/akarboz, 160 µL 20 mM fosfat tamponu (pH 6,9; 6,7 mM sodyum klorür içeren) ve 200 µL α-amilaz enzim çözeltisi (EC3.2.1.1, type VI, Sigma; 20 unite/mL) karıştırıldı. 25°C' de 5 dakika bekletildikten sonra substrat olarak 400 µL nişasta çözeltisi (% 0,5 w/v) eklenip ve 25°C'de 3 dakika daha bekletildi. İnkübasyon süresi sonunda, 200 µL dinitrosalisilik asit reaktifi (96 mM 3,5-dinitrosalisilik asit, 2 M NaOH içinde 5,31 M sodyum potasyum tartarat) ilave edilen tüpler 85°C'lik su banyosunda 15 dakika bekletildi. Süre sonunda tüm tüpler su banyosundan çıkarıldı ve 4000 µL distile su eklendikten sonra spektrofotometre ile 540 nm dalga boyundaki absorbansları ölçüldü.

İstatistiksel Analiz

Bütün istatistiksel analizler SPSS 12 (Inc., Chicago, IL, USA) istatistik programı ile yapıldı. Varyansların analizi ANOVA prosedürüne göre uygulandı. Ortalamalar arasındaki belirgin farklılıklar Tukey's pairwise ve Games-Howell kıyaslama testine göre p<0.05 seviyesinde değerlendirildi.

Bulgular

Toplam Fenol ve Flavonoit Miktar Tayini

Ekstrelerin toplam fenol miktarı yaygın bir yöntem olan Folin-Ciocalteu metoduna göre ölçülmüştür ve gallik asite eşdeğer olarak hesaplandı. Elde edilen sonuçlara göre en yüksek fenolik madde miktarı kabuklardan hazırlanan etanol ekstresinde (A.S.K EtOH) $61,40 \pm 0,48$ $\text{mg}_{\text{GA}}/\text{g}_{\text{ekstre}}$ olarak bulunurken, en düşük fenolik madde miktarı ise siyah sarımsakların etanol ekstresinde (A.S.EtOH) $39,64 \pm 2,47$ $\text{mg}_{\text{GA}}/\text{g}_{\text{ekstre}}$ olarak hesaplandı (Tablo1).

Tablo 1. Siyah sarımsak ve kabuk ekstrlerinin toplam fenol ve flavonoit miktarı

Ekstreler	Toplam fenol [$\text{mg}_{\text{GA}}/\text{g}_{\text{ekstre}}$]	Toplam flavonoit [$\text{mg}_{\text{CA}}/\text{g}_{\text{ekstre}}$]
A.S. SU	$44,81 \pm 0,58$	$16,62 \pm 0,36$
A.S.EtOH	$39,64 \pm 2,47$	$13,94 \pm 0,97$
A.S.K EtOH	$61,40 \pm 0,48$	$26,08 \pm 0,37$

Veriler ortalama \pm standart hata (n=3) olarak ifade edilmiştir. A.S. su: *Allium sativum* su ekstresi, A.S. EtOH: *Allium sativum* etanol ekstresi, A.S.K. *Allium sativum* kabuk etanol ekstresi

Ekstrelerin toplam flavonoit miktarı ise kateşine eş değer olarak hesaplandı. Elde edilen sonuçlara göre toplam flavonoit miktarı en yüksekten en düşüğe doğru sırasıyla A.S.K EtOH, A.S. SU ve A.S.EtOH ekstrlerinde hesaplandı. En yüksek flavonoit miktarı $26,08 \pm 0,37$ $\text{mg}_{\text{CA}}/\text{g}_{\text{ekstre}}$ ile kabuk ekstresinde (A.S.K EtOH) tespit edildi (Tablo 1).

1,1-difenil-2-pikrilhidrazil (DPPH•) ve 2,2'-azino-bis (3-etilbenzotiazolin-6- sulfonik asit) (ABTS •+) Radikallerini Süpürücü Etki Tayini

Yaygın olarak antioksidan kapasitenin tayin edilmesinde kullanılan DPPH radikalini süpürücü etki tayin yöntemi ile siyah sarımsak ekstrlerinin antioksidan aktivitesi ölçüldü. Ekstrelerin farklı konsantrasyonlarda çözeltileri hazırlanarak % inhibisyonu hesaplandı ve elde edilen sonuçlar sentetik bir antioksidan olan BHT'nin antioksidan kapasitesi ile karşılaştırıldı.

A.S. SU ekstresi 4 mg/mL konsantrasyonda DPPH radikaline karşı en yüksek % inhibisyona ($64,66 \pm 1,94$) sahip ekstre olarak bulundu. Bunun yanı sıra A.S. ETOH ekstresi ise diğer ekstrlerle

kıyaslandığında tüm konsantrasyonlarda en düşük % inhibisyon değeri ile daha az etkili bulundu. Ayrıca ekstrelerin hiçbirinin pozitif kontrol olan BHT kadar etkili olmadığı saptanmıştır (Tablo 2).

Tablo 2. Siyah sarımsak ve kabuk ekstralarının DPPH• radikalini süpürücü aktiviteleri

%İnhibisyon				
Ekstreler	4 mg/mL	2 mg/mL	1 mg/mL	0,5 mg/mL
A.S. SU	64,66±1,94 ^b	45,85±2,59 ^d	37,33±2,47 ^{d,e}	30,64±2,70 ^e
A.S.EtOH	40,89±6,44 ^d	31,78±3,44 ^e	28,12±2,47 ^{e,g}	23,43±3,71 ^h
A.S.K EtOH	56,46±1,54 ^c	55,18±1,99 ^c	40,08±4,97 ^d	29,72±3,11 ^{e,g}
BHT	85,4±3,02 ^a	82,3±3,01 ^a	78,8±3,8 ^a	66,0±4,5 ^b

Ortalama ± SS olarak verilen değerler ±%95 güven aralığında belirtilmiştir. (a-h), arası farklı harflerle, belirtilmiş değerler arasındaki farklılık istatistiksel olarak anlamlıdır (p< 0.01). A.S. su: *Allium sativum* su ekstresi, A.S. EtOH: *Allium sativum* etanol ekstresi, A.S.K. *Allium sativum* kabuk etanol ekstresi

2,2'-azinobis (3-etilbenzotiyazolin-6-sülfonik asit) (ABTS)'in persülfatla oksidasyonu, ABTS^{•+} radikali oluşturur ve deneyin esnasında moleküllerin kararlı serbest radikali süpürme kabiliyeti, vitamin E'nin suda çözünebilen bir analogu olan Troloks (6-hidroksi-2,5,7,8-tetrametilkroman-2-karboksilik asit) ile karşılaştırılarak yapılır¹⁴.

Siyah sarımsak ekstralarının ABTS^{•+} radikalini süpürücü etkileri değerlendirildiğinde ise özellikle A.S.K EtOH ekstresinin 4 mg/mL konsantrasyonda 2,44±0,16mmol/L/Trolox değeri ile en yüksek aktiviteye sahip olduğu belirlendi. A.S.EtOH ve A.S. SU ekstraları ise tüm konsantrasyonlarda benzer aktiviteler gösterdi ve etkinliğin düşük olduğu kaydedildi. (Tablo 3). İstatistiksel olarak değerlendirildiğinde 4mg/mL konsantrasyonda A.S.K EtOH ekstresinin BHT ile aynı anlamlılıkta etkili olduğu bulundu.

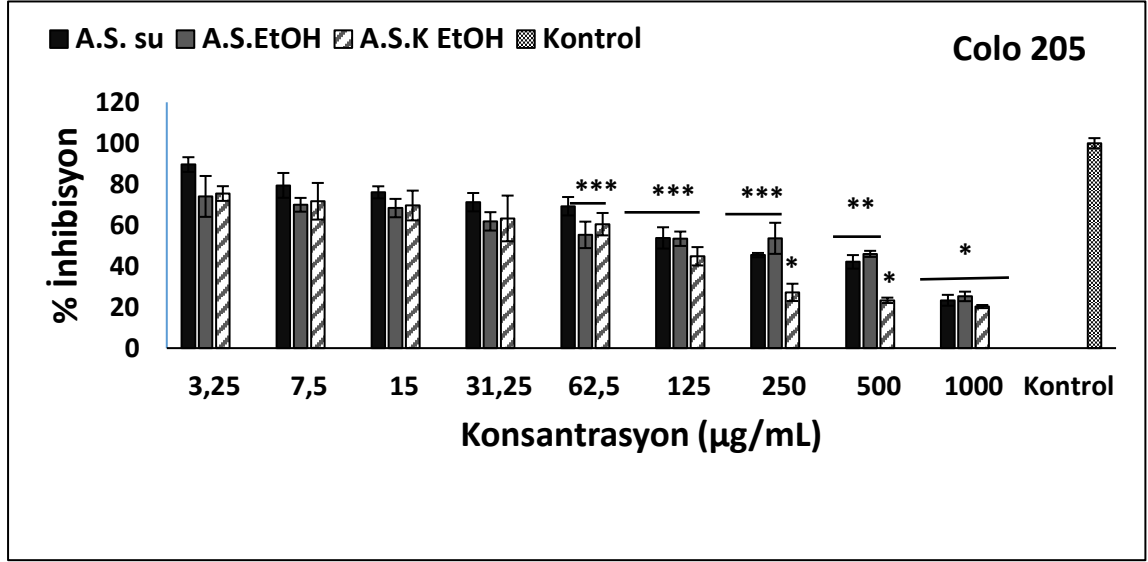
Tablo 3. Siyah sarımsak ve kabuk ekstralarının ABTS•+radikalini süpürücü etkileri

TEAC* (mmol/L/Trolox)				
Ekstreler	4 mg/mL	2mg/mL	1mg/mL	0,5mg/mL
A.S. SU	1,27±0,25 ^d	0,66±0,01 ^{e,f}	0,27±0,03 ^h	0,12±0,02 ⁱ
A.S.EtOH	1,58±0,20 ^{b,c}	0,87±0,15 ^e	0,41±0,01 ^g	0,17±0,01 ⁱ
A.S.K EtOH	2,44±0,16 ^a	1,79±0,2 ^b	0,90±0,02 ^e	0,45±0,03 ^f
BHT	2,93±0,2 ^a	2,57±0,8 ^a	2,55±0,9 ^a	2,50±0,1 ^a

Ortalama ± SS olarak verilen değerler ±%95 güven aralığında belirtilmiştir. (a-i), arası farklı harflerle, belirtilmiş değerler arasındaki farklılık istatistiksel olarak anlamlıdır (p < 0.01). A.S. su: *Allium sativum* su ekstresi, A.S. EtOH: *Allium sativum* etanol ekstresi, A.S.K. *Allium sativum* kabuk etanol ekstresi

Sitotoksik Etkinin Tetrazolyum Tuzu (MTT) Kolorimetrik Gelişme İnhibisyonu Testi ile Belirlenmesi

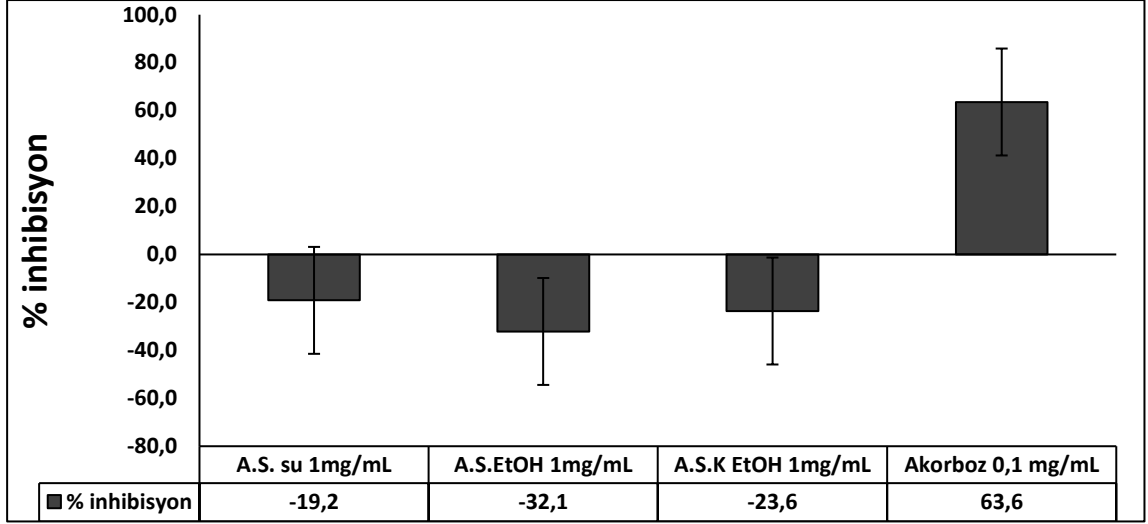
MTT (3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide) canlılık metodu; hücre canlılığını, proliferasyonu ya da sitotoksitesini ölçmede kullanılan basit, kolorimetrik ve bir yöntemdir. Bu çalışmada siyah sarımsak ekstralarının insan kolon adenokarsinoma hücre hattı Colo-205'te sitotoksik etkileri % canlılıkları hesaplanarak değerlendirildi. Farklı konsantrasyonlarda hücrelere uygulanan tüm ekstraların, 1000 µg/mL konsantrasyonda yüksek oranda toksik etkili olduğu tespit edildi. A.S.K EtOH ekstresinin 125 µg/mL'de hücre canlılığını %50'nin altına düşürdüğü (% 44,83±4,4) belirlendi. A.S. SU ekstresi 250 µg/mL'da % 45,40±1,05 ile, A.S.EtOH ekstresi ise 500 µg/mL'da % 46,00±1,47 ile, hücrelerin canlılığını %50'nin altına düşürdü (Şekil 1). Azalan konsantrasyonlarda (62,5 ve 3,25 µg/mL aralığında) ekstraların hücreler üzerinde toksik etkisi gözlenmedi. A.S.K EtOH ekstresi 1000-250 µg/mL konsantrasyon aralığında diğer ekstralara oranla en fazla toksik etki gösteren ekstre olarak belirlendi.

Şekil 1. Siyah sarımsak ekstralarının Colo-205 hücre hattında sitotoksik etkileri

Ortalama \pm SS olarak verilen değerler \pm %95 güven aralığında belirtilmiştir. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ *** $p < 0,001$. A.S. su: *Allium sativum* su ekstresi, A.S. EtOH: *Allium sativum* etanol ekstresi, A.S.K. *Allium sativum* kabuk etanol ekstresi

***In Vitro* α -amilaz İnhibisyon Testi**

Ekstrelerin hipoglisemik etkilerini belirlemek amacıyla sıklıkla kullanılan yöntemlerden biri olan *in vitro* α -amilaz inhibisyon testi ile ekstraların antidiyabetik etkisi değerlendirildi. Akarbozun pozitif kontrol olarak kullanıldığı çalışmada elde edilen sonuçlara göre akarboz 0,1 mg/mL konsantrasyonda % 63,6 inhibisyon yüzdesiyle antidiyabetik aktivite gösterirken, ekstraların 1 mg/mL konsantrasyonda etkili olmadığı belirlendi (Şekil 2).

Şekil 2. Ekstrelerin α -amilaz enzimini inhibisyonu

Ortalama \pm SS olarak verilen değerler \pm %95 güven aralığında belirtilmiştir. A.S. su: *Allium sativum* su ekstresi, A.S. EtOH: *Allium sativum* etanol ekstresi, A.S.K. *Allium sativum* kabuk etanol ekstresi

Tartışma ve Sonuç

Siyah sarımsak taze sarımsağın belli sıcaklık ve nem koşullarında keskin koku ve tadının değiştirilmesiyle elde edilen ve son zamanlarda popüler olan önemli bir fonksiyonel gıdadır¹⁵.

Çalışma kapsamında tek diş siyah sarımsakların su ve etanol ekstreleri ve yine sarımsakların kabuklarından etanol ekstreleri hazırlanarak, toplam fenol ve flavonoit miktarları ölçülmüş, antioksidan, sitotoksik ve antidiyabetik aktiviteleri çeşitli testler yapılarak değerlendirilmiştir.

Ekstrelerin toplam fenol ve flavonoit içerikleri değerlendirildiğinde siyah sarımsakların kabuklarından elde edilen A.S.K EtOH ekstresinin en yüksek toplam fenol ($61,40 \pm 0,48$ mg_{GAE}/g_{ekstre}) ve toplam flavonoit içeriğine ($26,08 \pm 0,37$ mg_{CA}/g_{ekstre}) sahip olduğu belirlenmiştir. Siyah sarımsakların kabuk kısımları ayrıldıktan sonraki kısımları ile hazırlanan etanol ekstresinde (A.S EtOH) ise en düşük toplam fenol ($39,64 \pm 2,47$ mg_{GAE}/g_{ekstre}) ve flavonoit ($13,94 \pm 0,97$ mg_{CA}/g_{ekstre}) içeriği tespit edilmiştir (Tablo 1). Kahyaoğlu ve ark (2021) tarafından Kastamonu sarımsakları kullanılarak yapılan bir çalışmada, sarımsak dişlerinin ve kabuklarının ayrı ayrı fenolik içeriğinin araştırılmış kabukların toplam fenol içeriği $14,01 \pm 0,97$ mg GAE g⁻¹, toplam flavonoit içeriği ise $4,76 \pm 0,44$ mg QUE g⁻¹ olarak hesaplanmıştır. Elde edilen sonuçlar karşılaştırıldığında siyah sarımsakların kabukları ile hazırlanan A.S.K EtOH ekstresinin, normal sarımsak kabuklarından hazırlanan ekstreye kıyasla daha yüksek toplam fenol ve flavonoit içeriğine sahip olduğu gzlemlenmiřtir¹⁶. Noda ve ark (2019) tarafından farklı hidrotermal

ekstraksiyon metodları uygulanarak ekstreleri hazırlanan sarımsak kabuklarının fenolik içeriği değerlendirilmiş ve normal sarımsak kabuklarına oranla fenolik içeriği daha yüksek olarak tespit edilmiştir¹⁷.

Siyah sarımsak, polifenoller, alkaloidler, flavonoidler, S-allil-sistein ve Maillard reaksiyonundan türetilmiş antioksidan ara ürünler de dâhil olmak üzere bol miktarda antioksidan bileşik içerir. Birkaç çalışma, siyah sarımsağın sadece *in vitro* serbest radikalleri temizlemediği, aynı zamanda antioksidan enzimleri de aktive ettiğini göstermiştir⁷. Çalışmada siyah sarımsak ekstrelerinin antioksidan kapasiteleri DPPH ve ABTS radikalini süpürücü etkileri tayin edilerek değerlendirilmiştir. A.S. SU ekstresi 4 mg/mL konsantrasyonda DPPH radikalini süpürücü aktivitesi en yüksek ekstre olarak belirlenirken (% inhibisyon:64,66±1,94), 4 mg/mL konsantrasyonda ABTS radikalini süpürücü aktivitesi en yüksek olan ekstre A.S.K. EtOH ekstresi (2,44±0,16 mmol/L/Trolox) olarak belirlenmiştir (Tablo 2 ve 3). Bu farklılığın, antioksidan aktivitenin belirlenmesinde kullanılan iki farklı yöntemin, farklı grupların radikal süpürücü etkilerini belirlemede kullanılan yöntemler olmasından kaynaklandığı düşünülmektedir⁸. Ayrıca siyah sarımsağın antioksidan aktivitesinin değerlendirildiği diğer çalışmalar incelendiğinde, Kim ve ark. (2012) tarafından taze ve siyah sarımsak ekstrelerinin antioksidan kapasiteleri karşılaştırılmış, siyah sarımsağın 2 mg/mL konsantrasyonda oldukça yüksek % inhibisyon gösterdiği (82.53±0.47) belirlenmiştir¹⁸. Marie ve Wijayanti'nin (2020) yaptığı bir çalışmada ise siyah sarımsağın sulu ekstrelerinin DPPH radikalini süpürücü etkisine bakılmış 1 mg/mL konsantrasyonda % inhibisyon 30,7 olarak bulunmuştur¹⁹. Bizim çalışmamızda ise su ekstresinin DPPH radikalini süpürücü aktivitesi (A.S. SU) 1 mg/mL konsantrasyonda % inhisiyon 37,33±2,47 olarak hesaplanmıştır. Elde edilen sonuçlardaki benzerlik ve farklılıklar deney prosedüründeki farklılıklardan kaynaklanabilmektedir. Ancak sarımsaklara uygulanan ısıl işlemin derecesi ve süresi, ekstrelerin içeriğini etkileyebilmektedir. Aynı zamanda siyah sarımsakların elde edildikten sonraki saklama koşulları da biyoaktif bileşenlerinin bozunmasına sebep olabileceği de yapılan çalışmalarda belirtilmiştir²⁰.

Siyah sarımsağın farklı kanser hastalıklarında antikanser etkileri, apoptozun indüklenmesi, hücre döngüsünün durdurulması ve tümör büyümesi ve istilasının inhibisyonu şeklindeki mekanizmalardır⁷. Yapılan çalışmada siyah sarımsak ekstrelerinin Colo-205 üzerindeki sitotoksik etkileri değerlendirilmiştir. A.S.K EtOH ekstresinin diğer ekstrelerle kıyaslandığında 125 µg/mL'de hücre canlılığını %50'nin altına düşüren (%44,83±4,4) en etkili ekstre olduğu belirlenmiştir. Sarımsağın antikanser etkilerinin yapıldığı diğer çalışmalara bakıldığında ise birçok hücre hattında sitotoksik etkinliğinin araştırıldığı, hatta etki mekanizmalarının aydınlatılmaya çalışıldığı görülmektedir. Özellikle sarımsakta bulunan bileşiklerden Se-metil-l-selenosistein, dialil sülfür, dialil disülfid ve dialil trisülfid bileşiklerinin Colo-205 hücre hattında

etkileri araştırılmış hücre proliferasyonunu inhibe ettiği raporlanmıştır²¹. Ayrıca siyah sarımsak etanol ekstresinin HT29 insan kolon kanseri hücre hattında sitotoksik etkisinin çalışıldığı bir araştırmada inhibisyon oranı 20, 50 ve 100 mg/mL konsantrasyonda sırasıyla % 24,6±4; 40,4±5 ve 46,7±4 olarak tespit edilmiştir²². Tek diş siyah sarımsakla hazırlanan hekzan, kloroform, etil asetat ekstrelerinin T47D meme kanseri hücre hattında sitotoksik etkilerinin araştırıldığı bir başka çalışmada ise etil asetat ekstresinin 551 µg/mL konsantrasyonda canlılığı % 50'nin altına düşürerek en toksik etkili ekstre olduğu kaydedilmiştir²³.

Tıbbi bitkilerin diyabet tedavisinde kullanımı ile ilgili yapılan *in vitro* çalışmalar karbonhidrat hidrolize edici enzimlerin inhibisyonu yoluyla antihiperglisemik aktivitenin ölçülmesi esasına dayanmaktadır. Yapılan çalışmalarda sarımsağın sahip olduğu aktif bileşenlerin antidiyabetik etkileri olduğu bildirilmiş, özellikle sarımsak yağının sahip olduğu sülfürlü bileşiklerin α-amilaz inhibisyon potansiyelinin yüksek olduğu kaydedilmiştir²⁴. Hazırlanan siyah sarımsak ekstrelerinin akarboza karşı α-amilaz inhibisyon potansiyelini değerlendirdiğimiz bu çalışmada ise herhangi bir etkinlik gözlenememiştir (Şekil 2).

Tek diş siyah sarımsak ekstrelerinin çeşitli biyoaktivite testlerinin değerlendirildiği bu çalışmada, potansiyel bir fonksiyonel gıda adayı olarak siyah sarımsağın, gördüğü ısl işlem sonrasında biyoaktif bileşiklerce daha zengin hale geldiği, elde edilen verilerle doğrulanmaktadır. Elde edilen sonuçlar ön çalışma niteliğinde olup siyah sarımsağın tedavide kullanılmak amacıyla çeşitli farmasötik formlara uyarlanması için içerik analizlerinin ve standardizasyon çalışmalarının titizlikle devam ettirilmesi gerektiği sonucuna varılmıştır.

KAYNAKLAR

1. Yang P, Song H, Wang L, Jing H. Characterization of key aroma-active compounds in black garlic by sensory-directed flavor analysis. *J. Agric. Food Chem.* 2019;67(28):7926-7934. doi.org/10.1021/acs.jafc.9b03269.
2. İbret B. Türkiye'deki sarımsak tarımı ve taşköprü sarımsağı üzerine coğrafi açıdan bir inceleme. *Marmara Coğrafya Dergisi.* 2013;12:17-50.
3. Çiçek İS. Siyah sarımsağın kardiyovasküler hastalıklar üzerine etkisi. *Fenerbahçe Üniversitesi Sağlık Bilimleri Dergisi.* 2022;2(1):299-311.
4. Ryu JH, Kang D. Physicochemical properties, biological activity, health benefits, and general limitations of aged black garlic: A review. *Molecules.* 2017;22(6):919. doi:10.3390/molecules22060919.

5. Halimah LS, Nawangsih EN, Hasan K. Analysis of antibacterial and antioxidant activities of a single bulb of garlic fermented into black garlic. In: Proceedings of the 12th Annual Scientific Meeting International Symposium on " Emergency Preparedness and Disaster Response during COVID 19 Pandemic"; 2021; Universitas Jenderal Achmad Yani, Indonesia. Volume 37.
6. Wu J, Jin Y, Zhang M. Evaluation on the physicochemical and digestive properties of melanoidin from black garlic and their antioxidant activities in vitro. *Food Chem.* 2021;340:127934. doi:10.1016/j.foodchem.2020.127934.
7. Tran GB, Pham TV, Trinh NN. Black garlic and its therapeutic benefits. In: Hassan B eds. Medicinal Plants-Use in Prevention and Treatment of Diseases. *IntechOpen.* 2019. doi: 10.5772/intechopen.85042.
8. Riwanti P, Ma'arif B, Jannah MZ. Potential Effect of Black Garlic (*Allium sativum* L.) as Antioxidant. In: 2nd International Conference on Education and Technology; Sep 6, 2021; Atlantis Press.
9. Singleton Vernon L, Rudolf O, Rosa ML. Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of folin-ciocalteu reagent. *Meth Enzymol.* 1999;14:152-178. doi.org/10.1016/S0076-6879(99)99017-1.
10. Zhishen J, Mengcheng T, Jianming W. The determination of flavonoid contents in mulberry and their scavenging effects on superoxide radicals. *Food Chem.* 1999;64(4): 555-559.
11. Gyamfi MA, Yonamine M, Aniya Y. Free-radical scavenging action of medicinal herbs from Ghana: *Thonningia sanguinea* on experimentally-induced liver injuries. *Vasc. Pharmacol.* 1999;32:661-67.
12. Re R, Nicoletta P, Anna P, Ananth P, Min Y, Catherine R. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radic Biol Med.* 1999;26:1231-37.
13. Ali H, Houghton P, Soumyanath A. α -Amylase inhibitory activity of some Malaysian plants used to treat diabetes; with particular reference to *Phyllanthus amarus*. *J Ethnopharmacol.* 2006;107(3):449-455. doi:10.1016/j.jep.2006.04.004.

14. Büyüktuncel E. Toplam fenolik içerik ve antioksidan kapasite tayininde kullanılan başlıca spektrofotometrik yöntemler. *Marmara Pharm J.* 2013;17(2):93-103. doi:10.12991/201317377.
15. Liu C, Lu L, Yang C, et al. Effects of thermal treatment on alliin and its related sulfides during black garlic processing. *LWT.* 2022;159.
16. Kahyaoglu DT. Comparison of the antioxidant activity of garlic cloves with garlic husk and stem: Determination of utilization potential of garlic agricultural wastes. *Türk Tarım ve Doğa Bilimleri Dergisi.* 2021;8(2):463-469.
17. Noda Y, Asada C, Sasaki C, Nakamura Y. Effects of hydrothermal methods such as steam explosion and microwave irradiation on extraction of water soluble antioxidant materials from garlic husk. *Waste and Biomass Valorization.* 2019;10(11):3397-3402. doi:10.1007/s12649-018-0353-3.
18. Kim J, H Nam SH, Rico CW, Kang MY. A comparative study on the antioxidative and anti-allergic activities of fresh and aged black garlic extracts. *Int J Food Sci.* 2012;47(6):1176-1182. doi:10.1111/j.1365-2621.2012.02957.x.
19. Marie AMA, Wijayanti N. The antioxidant properties of black garlic aqueous extract in Vero Cell line. In: Proceeding International Conference on Science and Engineering. April 4, 2020; Vol.3. <https://doi.org/10.14421/icse.v3.474>.
20. Barido FH, Jang A, Pak JI, Kim YJ, Lee SK. Combined effects of processing method and black garlic extract on quality characteristics, antioxidative and fatty acid profile of chicken breast: Scientific section: Processing and products. *Poultry Science.* 2022;101723. doi:10.1016/j.psj.2022.101723.
21. Mondal A, Banerjee S, Bose S, et al. Garlic constituents for cancer prevention and therapy: From phytochemistry to novel formulations. *Pharmacol Res.* 2022;175:105837. doi:10.1016/j.phrs.2021.105837.
22. Dong M, Yang G, Liu H, et al. Aged black garlic extract inhibits HT29 colon cancer cell growth via the PI3K/Akt signaling pathway. *Biomedical Reports.* 2014;2(2):250-254. doi:10.3892/br.2014.226.
23. Permatasari E, Farida, Widiyanto S. Cytotoxic effects and apoptosis of solo black garlic (*Allium sativum* L.) extract on T47D breast cancer cell line. In: Proceedings AIP Conference; 2020. <https://doi.org/10.1063/5.0015736>.

24. Ahmed MU, Ibrahim A, Dahiru NJ, Mohammed HUS. Alpha amylase inhibitory potential and mode of inhibition of oils from *Allium sativum* (garlic) and *Allium cepa* (onion). *Clin Med Insights Endocrinol Diabetes*. 2020;7(13):1179551420963106. doi:10.1177/1179551420963106. eCollection 2020.