

**T.C.
SAKARYA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**BAZI BİTKİLERİN FENOLİK MADDE EKSTRAKSİYONUNUN
TAGUCHI YÖNTEMİYLE OPTİMİZASYONU; ANTİOKSİDAN VE
ANTİBAKTERİYEL KAPASİTELERİNİN İNCELENMESİ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Merve ÇALIŞ

Kimya Anabilim Dalı

Biyokimya Bilim Dalı

TEMMUZ 2023

**T.C.
SAKARYA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**BAZI BİTKİLERİN FENOLİK MADDE EKSTRAKSİYONUNUN
TAGUCHI YÖNTEMİYLE OPTİMİZASYONU; ANTİOKSİDAN VE
ANTİBAKTERİYEL KAPASİTELERİNİN İNCELENMESİ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Merve ÇALIŞ

Kimya Anabilim Dalı

Biyokimya Bilim Dalı

Tez Danışmanı: Prof. Dr. Gülnur ARABACI

TEMMUZ 2023

Merve ÇALIŞ tarafından hazırlanan “Bazı Bitkilerin Fenolik Madde Ekstraksiyonunun Taguchi Yöntemiyle Optimizasyonu; Antioksidan ve Antibakteriyel Kapasitelerinin İncelenmesi” adlı tez çalışması 14.07.2023 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından oy birliği ile Sakarya Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Kimya Anabilim Dalı Biyokimya Bilim Dalı’nda Yüksek Lisans tezi olarak kabul edilmiştir.

Tez Jürisi

Jüri Başkanı: **Prof. Dr. Gülnur ARABACI**(Danışman)
Sakarya Üniversitesi

Jüri Üyesi: **Prof. Dr. Kudret YILDIRIM**
Sakarya Üniversitesi

Jüri Üyesi: **Doç. Dr. Hilal GÜNSEL**
Sakarya Uygulamalı Bilimler Üniversitesi

ETİK İLKE VE KURALLARA UYGUNLUK BEYANNAMESİ

Sakarya Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Lisansüstü Eğitim-Öğretim Yönetmeliğine ve Yükseköğretim Kurumları Bilimsel Araştırma ve Yayın Etiği Yönergesine uygun olarak hazırlamış olduğum “BAZI BİTKİLERİN FENOLİK MADDE EKSTRAKSİYONUNUN TAGUCHI YÖNTEMİYLE OPTİMİZASYONU; ANTİOKSİDAN VE ANTİBAKTERİYEL KAPASİTELERİNİN İNCELENMESİ” başlıklı tezin bana ait, özgün bir çalışma olduğunu; çalışmamın tüm aşamalarında yukarıda belirtilen yönetmelik ve yönergeye uygun davrandığımı, tezin içerdiği yenilik ve sonuçları başka bir yerden almadığımı, tezde kullandığım eserleri usulüne göre kaynak olarak gösterdiğimi, bu tezi başka bir bilim kuruluna akademik amaç ve unvan almak amacıyla vermediğimi ve 20.04.2016 tarihli Resmi Gazete 'de yayımlanan Lisansüstü Eğitim ve Öğretim Yönetmeliğinin 9/2 ve 22/2 maddeleri gereğince Sakarya Üniversitesi'nin abonesi olduğu intihal yazılım programı kullanılarak Enstitü tarafından belirlenmiş ölçütlere uygun rapor alındığımı, çalışmamla ilgili yaptığım bu beyana aykırı bir durumun ortaya çıkması halinde doğabilecek her türlü hukuki sorumluluğu kabul ettiğimi beyan ederim.

(14/07/2023).

Merve ÇALIŞ

Aileme.

TEŐEKKÖR

Çalışmamın her aşamasında fikirlerime bilgi ve tecrübeleriyle yön veren ve destekleyen sevgili danışman hocam Prof. Dr. Gülnur ARABACI'ya teőekkürlerimi sunarım.

Yüksek lisans eğitimim süresince beraber çalıőmaktan memnun olduğum, desteğini benden esirgemeyen Duygu YAMAN'a teşekkür ederim.

Eğitim hayatım boyunca her zaman başarılı olacağıma inanan ve beni inandıran canım aileme ve eőime sonsuz teőekkürler.

Merve ÇALIŞ

İÇİNDEKİLER

Sayfa

ETİK İLKE VE KURALLARA UYGUNLUK BEYANNAMESİ	v
TEŞEKKÜR.	ix
İÇİNDEKİLER	xi
KISALTMALAR	xiii
TABLO LİSTESİ	xv
ŞEKİL LİSTESİ.....	xvii
ÖZET.....	xix
SUMMARY.....	xxiii
1. GİRİŞ.....	1
2. GENEL BİLGİLER.....	3
2.1. Fenolik Bileşikler	3
2.2. Antioksidan Kapasite	4
2.3. Antibakteriyel Etkinlik	5
2.4. Kullanılan Bitkiler	5
2.4.1. Hibisküs	5
2.4.2. Hatmi Çiçeği	6
2.4.3. Aynısefa	7
2.4.4. Aspir	7
3. TAGUCHI DENEY TASARIMI	9
3.1. Taguchi Yöntemi	9
3.2. Taguchi Yönteminin Uygulama Adımları.....	9
3.2.1. Problemin durumu ve tanıtımı	10
3.2.2. Faktörlerin ve seviyelerinin seçimi	10
3.2.3. Ortogonal dizi ve seçimleri	10
3.2.4. Deneylerin gerçekleştirilmesi ve verilerin toplanması.....	11
3.2.5. Verilerin analizi.....	11
3.2.6. Doğrulama deneylerinin yapılması	12
4. DENEYSEL ÇALIŞMALAR.....	13
4.1. Kullanılan Cihazlar	13
4.2. Kimyasal Maddeler	13
4.2.1. Toplam fenolik madde miktarı tayini için kullanılan çözeltiler.....	13
4.2.2. Antioksidan kapasite (DPPH) tayini için çözeltiler	13
4.3. Toplam Fenolik Madde Miktarı	13
4.4. DPPH Serbest Radikal Giderme Aktivitesi Tayini	14
4.5. Antibakteriyel Aktivite Tayini	14
4.6. İstatistiksel Analiz	15
4.7. Uygulama	15
4.7.1. Problemin belirlenmesi	15
4.7.2. Faktör ve seviyelerin belirlenmesi	15
4.7.3. Ortogonal dizi ve seçimleri	16
4.7.4. Deneylerin gerçekleştirilmesi ve verilerin toplanması.....	17
4.7.5. Verilerin analizi.....	17

4.7.6. Varyans analizi (ANOVA).....	18
4.7.7. Doğrulama deneyleri.....	19
5. BULGULAR VE TARTIŞMA	21
5.1. Toplam Fenolik Madde Miktarı Tayini Bulguları.....	21
5.2. Taguchi Optimizasyonu.....	24
5.2.1. Faktörlerin, fenolik madde ekstraktı verimi üzerindeki etkisi	24
5.2.1.1. Hibiskus.....	24
5.2.1.2. Aspir	27
5.2.1.3. Hatmi	29
5.2.1.4. Aynısefa	30
5.2.2. Varyans analizi	32
5.2.2.1. Hibiskus.....	32
5.2.2.2. Aspir	32
5.2.2.3. Aynısefa	33
5.2.2.4. Hatmi	33
5.2.3. Doğrulama deney sonuçları.....	34
5.3. DPPH Sonuç	35
5.4. Antibakteriyel Aktivite Sonuçları.....	36
6. SONUÇ VE ÖNERİLER	39
KAYNAKLAR.....	41
ÖZGEÇMİŞ.....	46

KISALTMALAR

S/N	: Sinyal-Gürültü oranı
BHT	: Bütillendirilmiş hidroksi toluen
DPPH	: 1,1-Difenil-2-pikrilhidrazil
GAE	: Gallik asit eşdeğeri
TFM	: Toplam fenolik madde
DF	: Serbestlik derecesi
AYN	: Aynısefa
HTM	: Hatmi
ASP	: Aspir
HBS	: Hibiskus

TABLO LİSTESİ

Sayfa

Tablo 4.1. Deney tasarımında kullanılacak faktör ve seviyeler	16
Tablo 4.2. Taguchi modellemesi ile elde edilen deney setleri	17
Tablo 5.1. Tüm deney setleri için TFM miktarı sonuçları	22
Tablo 5.2. Deney setleri için hesaplanan S/N değerleri	24
Tablo 5.3. Hibiskus bitkisi için seviyelerin toplam fenolik madde ekstraktına etkisi	25
Tablo 5.4. Aspir bitkisi için seviyelerin toplam fenolik madde ekstraktına etkisi	27
Tablo 5.5. Hatmi çiçeği bitkisi için seviyelerin toplam fenolik madde ekstraktına etkisi	29
Tablo 5.6. Aynisefa bitkisi için seviyelerin toplam fenolik madde ekstraktına etkisi	31
Tablo 5.7. Varyans analizi sonuçları (hibiskus)	32
Tablo 5.8. Varyans analizi sonuçları (aspir).....	33
Tablo 5.9. Varyans analizi sonuçları (aynisefa)	33
Tablo 5.10. Varyans analizi sonuçları (hatmi çiçeği).....	33
Tablo 5.11. Doğrulma deneylerinde kullanılacak seviyeler	34
Tablo 5.12. Doğrulama deneyleri sonuçları	34
Tablo 5.13. Bitkilerin EC50 değerleri	35
Tablo 5.14. Antibakteriyel analiz sonuçları	37

ŞEKİL LİSTESİ

Sayfa

Şekil 4.1. Program üzerinde Taguchi modelleme aşamaları.....	16
Şekil 4.2. Program üzerinde faktörlerin ve seviyelerin kolonlara aktarılması.....	17
Şekil 4.3. Program üzerinde deney modellemesinin analizi	18
Şekil 4.4. Program üzerinde modellemenin varyans analizi.....	18
Şekil 4.5. Doğrulama deneyleri için seviye belirleme	19
Şekil 5.1. Toplam fenolik madde miktarı tayini için standart grafik.....	21
Şekil 5.2. Toplam fenolik madde miktarı grafikleri	23
Şekil 5.3. Optimizasyon analizi S/N ve ana etki grafikleri (hibiskus).....	26
Şekil 5.4. Optimizasyon analizi S/N ve ana etki grafikleri(aspir)	28
Şekil 5.5. Optimizasyon analizi S/N ve ana etki grafikleri (hatmi)	30
Şekil 5.6. Optimizasyon analizi S/N ve ana etki grafikleri (aynısefa).....	31
Şekil 5.6. (Devamı)	31
Şekil 5.7. Bitkilerin ve BHT standardının % inhibisyon grafiği	35
Şekil 5.8. Antibakteriyel test sonucunda inhibisyon zonları	36

BAZI BİTKİLERİN FENOLİK MADDE EKSTRAKSİYONUNUN TAGUCHI YÖNTEMİYLE OPTİMİZASYONU; ANTİOKSİDAN VE ANTİBAKTERİYEL KAPASİTELERİNİN İNCELENMESİ

ÖZET

Deney tasarımı; bir veya daha fazla sayıda olan değişkenin sistem üzerindeki etkisini inceleyen analiz tekniğidir. Bu sayede bir sistem tasarlanırken, sisteme ait faktör ve yanıtları arasındaki ilişkiyi açıklamayı sağlar. Sistemi etkileyen faktörlerin artması klasik deney tasarımının uygulanmasını zorlaştırır. Bu gibi durumlarda daha fazla bilgi edinebilmek ve test sayısını azaltmayı hedefleyen Genichi Taguchi, kendi anıyla anılan yeni bir yaklaşım geliştirilmiştir. Taguchi metodu ürün ya da sistemlerde kaliteyi artırma ve maliyet düşürmeyi amaçlayan deney tasarım yöntemlerinden biridir. Bu tasarımda esas amaç; değişkenlerin azaltılmasıyla hedef değere en hızlı şekilde ulaşmaktır. Bu metot ayrıca tasarımı etkileyen faktörlerin birbirinden bağımsız olarak değerlendirilmesini sağlamaktadır.

Fenolik bileşikler, sekonder metabolit olarak da bilinen ve tüm bitkilerde bulunan doğal maddelerdir. Farklı nitelikte ve miktarda olan fenolik bileşikler bitkiler için karakteristiktir. Savunma mekanizması olarak bitkilerde görev alırlar. Bu bileşiklerin, koroner kalp, katarakt, diyabet vb. hastalık risklerini azaltan olumlu etkilerinin varlığı bilinmektedir. Bu sebeple tıp ve eczacılık alanlarında kullanılmaktadır. Fenolik bileşiklerin eldesinde ekstraksiyon teknikleri ve koşulları önemlidir. Çözgen tercihi, ekstraksiyon süre ve sıcaklığının kontrolü gibi etkenler fenolik madde kayıplarının azaltılması için optimum şekilde düzenlenmelidir.

Hibiskus (*Hibiscus sabdariffa L*) bitkisi hem zengin içeriği hem de yoğun çanak yaprak renginden dolayı birçok ensüstriyel gıda ürününde kullanılmaktadır. Kerkede olarak da bilinen hibiskus bitkisi ile yapılan çalışmalarda antioksidan kapasitesinin yüksek olduğu, antibakteriyel özelliklere sahip, ateş düşürücü ve tansiyon düşürücü gibi etkileri olduğu gözlemlenmiştir. Aspir (*Carthamus tinctorius*), analjezik ve ateş düşürücü etkilerinin yanı sıra kumarinler, tanenler, polifenoller ve flavonoidler gibi farklı biyoaktif bileşiklerin potansiyel kaynağı olarak bilinmektedir. Hatmi çiçeği olarak bilinen *Althaea officinalis* iltihap, mide ülseri, öksürük, nezle gibi bazı hastalıkların tedavisinde kullanıldığı farmakolojik araştırmalarda rapor edilmiştir. Aynısefa (*Calendula officinalis L.*) bitkisi papatyagiller familyasında bulunan otsu bir bitkidir. Tahriş olmuş iltihaplı derilerde, egzamada, ülser tedavisinde uzun zamandır kullanıldığı bilinmektedir. Çay olarak tüketilebilen ve tıbbi amaç için kullanıldığı bilenen bu bitkiler fenolik madde elde etmek için kullanılacaktır. Ekstraksiyon işlemini etkileyen birçok faktör bulunmaktadır. Katı-sıvı oranı, katı-çözücü temas yüzeyi, sıcaklık, ekstraksiyon işlem süresi, çözücü çeşidi gibi faktörler ekstraksiyon işleminin kalitesini ve verimini etkileyebilir. Bu çalışmada ekstraksiyon işlemlerini etkileyen parametrelerin optimizasyonu için Taguchi deney tasarımı metodu kullanılmıştır. Taguchi modellemesi için ekstraksiyon işlemini etkileyen

parametrelerden ekstraksiyon yöntemi, çözücü, sıcaklık ve süre olmak üzere 4 farklı faktör seçilmiştir. Bu faktörlere ait 3 seviye belirlenmiştir. Ekstraksiyon yöntemi için ultrasonik, klasik ve karıştırmalı yöntemler seçilmiştir. Ultrasonik ekstraksiyon için 45 kHz frekansta ısıtmalı bir ultrases banyosu kullanılmıştır. Klasik ekstraksiyon yöntemi olarak su banyosunda belirlenen sıcaklık ve sürede işlem gerçekleştirilmiştir. Karıştırmalı ekstraksiyon yönteminde ise 300 rpm hızda dönen manyetik çubuktan yararlanılmıştır. Fenolik maddelerin tıp ve eczacılık gibi insan sağlığını ilgilendiren alanlarda kullanılmasından dolayı grass olarak kabul edilen çözücüler seçilmelidir. Bu sebeple etanol, metanol ve distile su ekstraksiyon işlemi sırasında çözücü olarak kullanılmak üzere seçilmiştir.

Sıcaklık (25°C, 40°C, 55°C) ve süre (30 dk., 60 dk., 90 dk.) fenolik maddelerin artan sıcaklık ve ekstraksiyon süresine bağlı termal bozunmaya uğradığı bilindiğinden yüksek sıcaklık ve uzun süreler tercih edilmemiştir. Seçilen 4 faktör ve faktörlere ait 3 seviye bulunmakatadır. Belirlenen faktör ve seviyeler için serbestlik derecesi 8'dir. Belirlenen faktörler ve serbestlik derecesi Minitab19 paket programı kullanılarak deney tasarımı L9 ortogonol dizi seçilerek modellenmiştir. Modelleme sonucunda programda belirlenmiş 9 farklı deney seti ve 3 tekrarlı olacak şekilde ekstraksiyon işlemi gerçekleştirilmiştir. Toplam fenolik madde miktarı (TFM) analizi en çok tercih edilen yöntem olan Folin-Ciocalteau yöntemine göre analiz edilmiştir ve sonuçlar gallik asit cinsinden rapor edilmiştir. Hibiskus için en yüksek değer 24,8±1,01 mg GAE/g, Aspir için 3,08±0,21 mg GAE/g, hatmi çiçeği ve aynusefa için ise sırayla 3,50±0,05 mgGAE/g, 39,47±2,06 mgGAE/g olarak hesaplanmıştır. 9 deney seti için tüm TFM miktarı değerleri deney tasarımıda sistem çıktısı olarak programa yanıt şeklinde işlenir. Programda bu yanıtlara göre Taguchi analizinin gerçekleştirilmesiyle tüm faktör ve seviyelere ait sinyal gürültü oranları hesaplanmıştır. Bu oranlara ve ortalamaya ait etki grafikleri program çıktısı olarak elde edilmiştir. Bu hesaplamalar sonucunda hibiskus, hatmi çiçeği, aynisefa bitkisinin optimum parametreleri karıştırmalı ekstraksiyon, distile su 55°C ve 60 dk. olarak bulunmuştur. Aspir bitkisinde ise farklı olarak bu sıcaklık 40°C olarak saptanmıştır. Modellemenin daha iyi anlaşılabilmesi ve yorum yapmayı kolaylaştırması amacıyla faktör ve parametrelerin fenolik madde miktarını etkileme yüzdeleri araştırılmıştır. Bu sebeple varyans analizi kullanılmıştır. Tüm bitkiler için etki yüzeyleri incelendiğinde çözücü faktörünün etkisi yüzdesel olarak diğer faktörlere göre daha yüksektir. Hibiskus, aspir, hatmi çiçeği ve aynisefa bitkileri için çözücü faktörünün ekstraksiyon işlemine yüzdesel katkıları sırasıyla; %59,09, %81,82, %60,70 ve %58,50'dir. Varyans analizi aynı zamanda sonuçların belirlenen güven aralıklarında anlamlı olup olmadığını test etmektedir. Hibiskus ve aynisefa bitkisine ait tüm faktörlerin değişiminin ekstraksiyon işlemine katkısı anlamlı iken aspir ve hatmi çiçeği için sıcaklık ve süre faktörlerindeki değişim ekstraksiyon işlemi için anlamsız bulunmuştur (p<0.05). Modellemenin doğruluğunu araştırmak için optimum koşulları belirlenen bu bitkiler ile üç paralelli olacak şekilde ekstraksiyon işlemi gerçekleştirilmiş ve programda beklenen değerler ile karşılaştırılmıştır. Aspir ve aynisefa bitkisi için sonuçlar %95 güven aralığında anlamsız bulunmuştur. Hibiskus ve hatmi çiçeği için ise sonuçlar anlamlıdır. Optimum parametreler ile gerçekleştirilen ekstraksiyon işlemi sonucunda antioksidan aktivite kapasite tayini ve antibakteriyel kapasite tayini gerçekleştirilmiştir.

Antioksidan kapasite tayini, DPPH radikali yakalama yöntemine göre yapılmıştır. Hibiskus, aspir, hatmi çiçeği ve aynisefa bitkileri % inhibisyon değerleri sırasıyla %60,03, %43,85, %53,98, %35,02 olarak hesaplanmıştır. Sonuçlar BHT (bütillenmiş hidroksitoluen) antioksidan standardı ile karşılaştırılmıştır.

Bitkilerin antibakteriyel özelliklerini incelemek için kuyucuk difüzyon yöntemi kullanılmıştır. Analiz aşamasında *Escherichia coli* (gram negatif), *Bacillus cereus* (gram pozitif) ve *Staphylococcus aureus* kullanılmıştır.

Aynısefa bitkisi *Bacillus cereus* (SBT-8) suşu üzerinde en yüksek inhibisyon sağlayan bitkidir (Hibiskus;10 mm, aspir; 9 mm Hatmi; etki yok). *Staphylococcus aureus* (29213) bakterisi için ise hibiskus, aspir ve aynısefa bitkilerinin inhibisyon çapları sırasıyla; 12 mm, 9 mm, 10 mm olarak ölçülmüştür. Sonuçlar incelendiğinde hatmi çiçeğinin hiçbir bakteri suşu üzerinde inhibe edici etkisinin varlığı saptanmamıştır. Ayrıca *E. coli*, bakterisi üzerinde de bitkilere ait bir etki saptanmamıştır.

OPTIMIZATION OF PHENOLIC SUBSTANCE EXTRACTION OF SOME PLANTS BY TAGUCHI METHOD; EXAMINATION OF THEIR ANTIOXIDANT AND ANTIBACTERIAL CAPACITIES

SUMMARY

Each step of the process interacts with the others in order to produce a specific result. An activity is defined as the activities of a number of factors, including machines, tools, processes, and people. By contrast, input variables are parameters that have an impact on test results, which can be improved in order to provide measurable or unmeasurable results as a result of changes made. Whenever there is a need to improve or increase the quality performance of a product or process, the term 'experimental design' refers to the process of observing the differences between the selected quality characteristics, as a result of adjusting the various factors and levels that influence the product/process, and interpreting those differences with a variety of techniques. To reach the target value as quickly as possible, experimental design minimizes the number of variables while simultaneously allowing factors that affect the design to be evaluated independently. It is common for this method to be used when trying to analyze the effects of phenolic compounds found naturally in plants, which are secondary metabolites which have biological effects. Understanding how these compounds interact with the external environment is crucial to understanding how they function in plant biology. Reduce the number of variables in the design so that the key factors influencing the performance of the phenolic compounds can be identified. Therefore, in addition to solving the above problems in the design, this can also bring about more opportunities for increasing the target value in the shortest possible time. Phenolic compounds of different nature and quantity are characteristic for plants. They take part in plants as a defense mechanism.

A number of heart-related conditions can be reduced by using these compounds, such as coronary heart disease, cataracts, diabetes and many others. Thus, it is used in many areas of medicine and pharmacology, particularly as a treatment for various diseases. Extraction techniques and conditions are important in obtaining phenolic compounds. To reduce the amount of phenolic substance lost during extraction, factors such as solvent preferences, control over extraction time and temperature should be optimally regulated as well.

The Hibiscus (*Hibiscus sabdariffa L*) plant is used in many industrial food products (jam, confectionery, ice cream, chocolate, sweeteners, etc.) due to its rich content and intense dish leaf color. A number of antioxidant, antibacterial, antipyretic and blood pressure lowering effects have been found in studies conducted with the hibiscus plant.

Safflower petals contain gallic acid, chlorogenic acid, syringic acid, quercetin, and epicatechin. It is believed that both phenolic compounds and flavonoids glycosyl-quinochalcones are colors. This flower's color pigments are largely derived from safflower. Safflower flowers Since this substance determines the majority of its therapeutic effects, it is included in pharmacological studies. Flowers of safflower contain rich amounts of phenols that are antioxidants, and in addition, because they

contain a number of other substances, they are cardiovascular protective, liver cleaners, anticancers, as well as protecting the nervous system and the lungs. It has found wide use in the treatment of phenolic found in safflower color pigments in the structure; irrigation, fertilization, sowing frequency, sowing time, harvest It is affected by many parameters such as time, type, environmental stress and It has been determined by studies that it can vary. Harvest from plants secondary metabolites of flowers obtained after temperature, UV rays, pH, various It changes depending on different factors such as gases, metal ions and chemicals. Reported. *Althaea officinalis*, known as marshmallow flower, has been reported in pharmacological researches to be used in the procedure of some diseases like inflammation, stomach ulcers, cough and cold.

Calendula (*Calendula officinalis* L.) is a herbaceous plant belonging to the Asteraceae family that can grow as a single or biennial plant. Various fields, such as medicine and pharmacy, as well as the food and cosmetic industries, utilize the calendula's rich chemical content. Calendula consists of a variety of chemical components that are biologically active. These include terpenoids, flavonoids, coumarins, quinine, essential oils, carotenoids, and amino acids. In addition, calendula, vanillic acid, chlorogenic acid, caffeic acid, oleanolic acid, β -amirin acetate, β -amirin, rutin, narcissin, isoquercitrin, isorhamnetin 3-glucoside, quercetin, protocatechin acid, syringic acid, p-coumaric acid; In addition, high levels of antioxidants such as calendoflacid, quercetin-3-Orutinoside, isoramnetin, calendoflavositol, isorhamnetin-3-O-neohesperidoside, isoramnetin 3-O-2G-ramnosyl routineositol, quercetin-3-O-glucoside, isoramnetin-3-Orutinoside, and calendoflavobioside detect the presence of many components with properties

Due to its rich pharmacological properties, it occupies an important position in the group of alternative medicinal aromatic plants. A number of ailments, such as eczema, ulcers, and irritated skin have been treated with it since time immemorial. To obtain phenolic substances, these plants, which are used as tea and for medicinal purposes, will be used. Factors such as temperature, pressure, and humidity affect the extraction process. In an extraction process, the quality and yield can be affected by factors such as the solid-liquid ratio, the solid-solvent contact surface, the temperature, the extraction processing time, or the solvent type.

An experimental design based on Taguchi was used in this study to optimize parameters related to extraction processes. For Taguchi modeling, 4 different factors were selected from the parameters affecting the extraction process: extraction method, solvent, temperature and duration. 3 levels of these factors have been determined. For the extraction method, ultrasonic, classical and mixing methods were chosen. For the ultrasonic extraction, a heated ultrasound bath at a frequency of 45 kHz was used. As a classical extraction method, the process was carried out in the water bath at the specified temperature and time. In the mixed extraction method, a magnetic rod rotating at a speed of 300 rpm was used. Solvents that are considered grass should be selected because of the use of phenolic substances in areas of human health concern, such as medicine and pharmacy. For this reason, 3 solvents were used: ethanol, methanol and distilled water. Since it is known that temperature (25°C, 40°C, 55°C) and duration (30 min., 60 min., 90 min.) phenolic substances undergo thermal degradation due to increased temperature and extraction time, high temperatures and long periods of time were not preferred. There are 4 factors chosen and 3 levels of factors. The degree of freedom for the determined factors and levels is 8. The determined factors and the degree of freedom were modeled by selecting the L9

orthogonal array in the experimental design using the Minitab19 package program. As a result of the modeling, 9 different experimental sets and 3 repetitions were extracted in the program.

An analysis of total phenolic matter (TFM) from extraction processes was conducted according to Folin-Ciocalteu method, and the results were reported in gallic acid.

The highest value for hibiscus was $24,8 \pm 1,01$ mg GAE/g, for safflower $3,08 \pm 0,21$ mg GAE/g, for marshmallow flower and aynuprifa, respectively, $3,50 \pm 0,05$ mgGAE/g and $39,47 \pm 2,06$ mgGAE/g. All TFM quantity values for 9 experimental sets are processed in the experimental design as a response to the program as a system output. According to these responses, Taguchi analysis was performed in the program and signal-to-noise ratios for all factors and levels were calculated. Impact graphs of these ratios and the average were obtained as program output. As a result of these calculations, the optimum parameters of hibiscus, marshmallow flower, calendula plant were found as mixed extraction, distilled water 55°C and 60 min.

The temperature for this plant was determined to be 40°C at sunflower, unlike the other plants. The percentages at which factors and parameters affect the amount of phenolic substance was investigated so that more knowledge about the modeling could be gained and comments would be easier to make. For this reason, analysis of variance was used. When the effect surfaces for all plants are examined, the effect of the solvent factor is higher than other factors in percentage. For the hibiscus, the safflower, and the marshmallow flower, together with the calendula plant, the percentage contributions of the solvent factor were as follows: 59,09%, 81,82%, 60,70%, and 58,50%, respectively.

Analysis of variance also tests whether the results are significant at the specified confidence intervals. Research was conducted on hibiscus, calendula, safflower, and marshmallow flower extraction processes based on various factors.

The study found that while the changes in all factors of hibiscus and calendula plant had a major efficacy on the extraction process, the changes in temperature and duration factors for safflower and marshmallow flower were found to be insignificant ($p < 0.05$). The extraction process was conducted parallel with these plants in order to maintain the accuracy of the modeling, and the results were compared with those expected by the program. To maintain the correctness of the modeling, the extraction process was conducted in three parallels with these plants, and the results were compared with the expected values in the program. The accuracy of the model was evaluated by analyzing the difference between observed and expected values. Calendula and safflower results were meaningless at 95% confidence intervals.

For hibiscus and marshmallow flowers, the results are significant. Following the extraction process performed with optimal parameters, the activity capacity and antibacterial capacity of the antioxidant were determined as a result of the extraction process.

Antioxidant capacity determination was performed according to DPPH radical capture method. The % inhibition values of hibiscus, safflower, marshmallow flower and calendula plants were calculated as 60,03%, 43,85%, 53,98% and 35,02%, respectively. In order to verify the results, they were compared to the BHT (butylated hydroxytoluene) antioxidant standard as a benchmark.

This study was conducted using the well diffusion method in order to study the antibacterial properties of plants. The gram-negative bacteria *Escherichia coli* (gram-

positive bacteria *Bacillus cereus* (SBT-8) and *Staphylococcus aureus* (29213) were used for this procedure. Calendula plant provides the highest inhibition on the *Bacillus cereus* (SBT-8) strain (Hibiscus;10 mm, safflower; 9 mm Marshmallow; no effect). For the bacterium *Staphylococcus aureus* (29213), the inhibition diameters of hibiscus, safflower and calendula plants were as follows; It measured 12 mm, 9 mm, 10 mm. In the examination of the results, marshmallow flower was not found to exhibit an inhibitory effect on any strain of bacteria. In addition, no plant effect has been found on *E. coli* bacteria.

1. GİRİŞ

Günümüzde işletmeler üretim sırasında yüksek kaliteli ürünlerin maliyetini azaltmak ve daha hızlı üretmek amacıyla rekabet halindedir. Buna bağlı olarak üretim süreçlerini iyileştirmek ve daha optimum koşulları sağlamak zorunlu bir hal almıştır. Bir ürün için sistemin ve parametrelerin iyileştirilmesi, ürünün özelliğini veya o proses ya da sistemin bir parçasının detaylarının araştırılması için yapılan gözlemler deney olarak adlandırılır. Deneyler, iki veya daha fazla değişkenin etkilerini inceler. Deney yapmada amaç ürün veya süre. İçin performans karakteristiğine ait değeri optimum düzeye getirmek ve ürüne veya sürece eşdeğer olacak daha az maliyetli tasarım, yöntem veya malzemenin bulunmasıdır [1-4].

Deney tasarımını basitleştiren yöntemlerin endüstri alanında kullanımı karmaşık durumlarda verimli olamamaktadır. Prosesi etkileyen faktörlerin artması yapılması gereken deney sayısını da artırmaktadır. Buna bağlı olarak maliyet, kaynak ve zaman kayıpları oluşmaktadır. Taguchi yönteminin temel felsefesi, tasarım aşamasında niteliği arttırmayı amaçlar. Kullanılan ortogonal diziler, sonuca ulaşabilmek test sayısını minimuma düşürür. Bu yöntemin bir diğer avantajı ise kontrol edilemeyen değişkenlerin etkilerini azaltır [5-6].

Taguchi sinyal/gürültü (S/N) olarak bilinen bir istatistik tanımlamıştır. Sinyal değeri sistemin yanıt olarak verdiği ve ölçülebilen gerçek değeri, gürültü faktörü istenmeyen faktörleri tanımlamak için kullanılır. S/N oranları kullanılarak anova analizi gerçekleştirilir bu sayede faktör ve seviyelerin son ürünlerdeki etkileri incelenir [7].

Bu tezde aspir (*Carthamus tinctorius*), hibiskus (*Hibiscus sabdariffa L*), aynısafa (*Calendula officinalis*) ve hatmi çiçeği (*Althaea officinalis*) olmak üzere yenilebilir olan dört farklı bitkiden fenolik bileşik ekstraksiyonu gerçekleştirilmiştir. Ekstraksiyon verimini optimize etmek amacıyla 4 faktör (Sıcaklık, süre, Çözücü, Ekstraksiyon yöntemi), 3 seviye olacak şekilde taguchi deney tasarımı L9 ortogonal dizi seçimi yapılarak analiz edilmiştir. Optimum parametrelerle oluşturulan ekstraksiyon koşulları doğrulama deneyleri ile test edilmiş ayrıca antioksidan ve antibakteriyel analizler de gerçekleştirilmiştir.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Fenolik Bileşikler

Fenolik Bileşikler bitkilerin metabolizmasında, sekonder metabolit olarak mevcuttur. Bu bileşikler bitkilerin kendilerini koruma mekanizması olarak oluşturduğu düşünülen sayısı oldukça yüksek ve farklı fenolik bileşikler bulundurlar [8]. Bitkilerde Amino ve nükleik asitler, vitamin, şekerler ve yağ asitleri gibi primer maddeler dışında çeşitli yapıda ve işlevde sekonder metabolitler de üretilmektedir. Sekonder metabolitlerin başlıca grupları arasından fenolik bileşikler örnek verilebilir. Sekonder metabolitlerin ve primer maddelerin yapısal ve kimyasal yapıları kıyaslandığında birincil metabolitler belirli formülasyona ve sayıda olduğu bilinirken; sekonder metabolitler özelleşmiş farklı görevdeki hücrelerde ve özel amaçlı olarak bulunmaktadır. İkincil metabolitler doğrudan bitkilerin metabolizmasını etkilemese de çevreye adaptasyonu, fotosentez ve solunum basamaklarında yardımcı olmaktadır [9-11]

Fenolik bileşikler yapısal olarak hidroksil grubu barındıran benzen halkaları olarak tanımlanabilir. Fizyolojik çeşitliliğe bağlı olarak, coğrafi değişimlere, genetik faktörlere bitkinin olgunluğuna ve çevreye göre farklılık göstermektedir. Fenolik asitler bitkilere karakteristik özellikler sağlamaktadır (renk, tat, koku vb.). Bu sayede tozlaşma, renk(pigment) oluşumu, büyüme, fotosentez gibi bitkinin yaşamını etkileyen faaliyetlerde kilit rollere sahiptir. Aynı zamanda fenolik asitler bitki savunma mekanizmasında önemlidir. [9-12].

Gıdaların kalitesini ve besinsel değerini etkileyen oksidatif yıkım gıda endüstrisi için bazı durumlarda olumsuz bir süreçtir. Yenilebilir bitki materyallerinden elde edilen fenolik bileşikler, lipitlerdeki oksidasyonu geciktirmek için kullanılmaktadır. Aynı zamanda fenolik bileşikler gıdalarda mikrobiyal üremeyi inhibe ederek, mikrobiyal bozulmanın önüne geçmektedir [12-13].

Fenolik bileşiklerin olumlu etkilerinin yanında, proses aşamasındaki değişken parametrelere karşı stabil kalamazlar. Bu bileşikler ısı, ışık, sıcaklık ve diğer maddelerin varlığına karşı hassas bileşenlerdir. Bu sebeple ekstraksiyon işleminde

sıcaklık, süre gibi parametreler fenolik bileşik elde edilmesinde oldukça önemlidir. Fenolik bileşenlerin ekstraksiyonunda kullanılan çözücü de önemli bir parametredir. Çözücü toksisiteye sahip olmayan, ucuz, yanmaz ve uçucu olmayan özelliklere sahip olmalıdır [12-14].

Bitkilerden fenolik bileşiklerin elde edilmesi sırasında birçok farklı ekstraksiyon yöntemleri de tercih edilmektedir. Son dönemlerde klasik ekstraksiyon yöntemine alternatif olarak Ultrason destekli, mikrodalga destekli, ohmik ısıtmanın kullanıldığı birçok çalışma mevcuttur [15].

2.2. Antioksidan Kapasite

Aerobik canlıların vücudunda gerçekleşen birçok metabolik faaliyetin sonucunda ve çevresel bazı faktörlerden (radyasyon, ağır metaller, tarım ilaçları vb kirleticiler) dolayı Reaktif oksijen adı verilen bileşikler oluşmaktadır. Bu radikaller dış kabuklarında eşlenmemiş elektronlar bulundurlar. Reaktif değildir fakat reaktif oluşturma potansiyelindedir. Küçük moleküler yapıda olan serbest radikaller hücre membranlarından geçebilmektedir. Bu sebeple birçok organ ve metabolizma işlevinde aksamalar ve tahribata neden olabilmektedir. Aşırı miktarda oluşması durumunda hücre fonksiyonlarında kayıp, erken yaşlanma, biyokimyasal yapıda bozulmalar ve daha ciddi hatta ölümcül olabilecek hastalıkların riskini arttırmaktadır [9,12, 16]. Antioksidan maddeler serbest radikallerin sebep olduğu bu oksidasyon reaksiyonunu önleyebilmektedir. Antioksidan maddeler iki grupta incelenebilir. İlk grup radikaller ile tepkimeye girerek etkilerini azaltır serbest radikal oluşumunu önler. İkincil grup (polifenolik bileşikler) ise serbest oksijen radikalini yakalayarak başka gruplarla etkileşim tepkimelerini engeller [10-12]

Gıdalarda da ortam ıslığı, nem miktarı metal varlığı gibi etmenlere bağlı olarak oksidasyon tepkimeleri gerçekleşebilir. Buna bağlı olarak istenmeyen koku ve tat bileşikleri reaksiyon sonucu oluşabilmektedir. Yağların parçalanmasına bağlı oluşan acı tat besin değerinde kayıplar bu duruma örnek verilebilir. Bu gibi durumlarda da antioksidan maddelerin (baharat, uçucu yağlar vb. bitkisel katkıları) gıdalara uygun şekilde eklenmesiyle bu tepkimelerin önüne geçilebilir [10, 12, 16].

2.3. Antibakteriyel Etkinlik

Gıda ürünlerinde ve hastalıklarda mikrobiyal üremelerin inhibe edilmesi için antibakteriyel., antifungal, antiparaziter gibi kimyasal ürünler kullanılmaktadır (ilaçlar, katkı maddeleri vb.) son zamanlarda ise kullanılan bu sentetik ürünlerin yan etkileri ve bitkisel ürünlere artan taleple doğru orantılı olarak doğal kaynaklı antioksidan ve antibakteriyel bileşikler önem kazanmaktadır [13,17].

Tıbbi aromatik bitkiler eski çağlardan itibaren şifa kaynağı olarak görülmektedir. Fenolik bileşiklerin ve karboksilik asitlerin mikrobiyal çoğalmayı inhibe edici özelliği olduğu birçok çalışmada raporlanmıştır. Bu sayede sentetik kimyasallara alternatif olarak aranmakta ve çalışmalara devam edilmektedir. Antibakteriyel etkinlik bitkinin türüne başta olmak üzere, bitkinin yetiştiği çevreye bağlı olarak değişmektedir [13,17].

2.4. Kullanılan Bitkiler

2.4.1. Hibisküs

Afrika' ya özgü olan Malvaceae familyasındaki Hibiscus bitkisi, tropikal ve subtropikal iklimlere sahip alanlarda bulunmaktadır [18]. Hibiskusun bilinen 300' den fazla türü vardır. *Hibiscus sabdariffa L.*, taç yaprakları antosiyanin içeriği bakımından zengindir. Çiçeğin rengini de oluşturan bu fenolik metabolitler başta olmak üzere içerdiği fenolik bileşiklerin varlığı bitkinin biyolojik öneme sahip olduğunun kanıtıdır. Hibiskusun içerdiği antosiyaninlerin tıbbi aromatik özellikleri oldukça önemlidir. Delphinidin-3-sambubioside ve siyanidin-3-sambubioside'in gibi bileşikler yüksek tansiyon, deride iltihaplanma, karaciğer rahatsızlıkları, şeker ve bazı metabolik problemlere karşı olumlu etkileri saptanmıştır. Uzun yıllar boyunca halk arasında çeşitli hastalıkların tedavisinde kullanılmıştır. Biyoaktif bileşikler içeren hibiskus bitkisi yüksek antioksidan kapasite ve antibakteriyel özellikler taşımaktadır. Bunun sonucunda bitkinin tüketimi ve değeri artmaktadır [19-21].

Chumsri, ve diğerlerinin yaptığı çalışmada sıcaklık ve süre parametrelerini değiştirerek farklı ekstraksiyon koşulları oluşturarak *Hibiscus sabdariffa L.* Bitkisinin toplam fenolik madde içeriği ve DPPH serbest radikal giderim aktivitesini belirlemişlerdir. Bu çalışmada fenolik madde içeriği $29,22 \pm 0,33$ mg/g - $43,06 \pm 0,53$

mg/g arasında değişmektedir. Burada sıcaklığın artması ve sürenin uzaması toplam fenolik madde içeriğini azaltmaktadır [22].

Zhen ve diğerlerinin *Hibiscus sabdariffa* türüne ait 22 farklı popülasyondan %70(v/v) metanol-distile su karışımı ile hazırlanan ekstraktlarda bulunan fenolik maddeler ise 20,4±2,5 mg/g-29,9±0,5 mg/g arasında bulunmuştur [9].

2.4.2. Hatmi Çiçeği

Althaea officinalis (hatmi) tomurcuk ve çiçeklerinin ekstraktları influenza tedavisinde kullanıldığı rapor edilmiştir [23].

Lin ve arkadaşlarının yaptıkları bir çalışmada *A. officinalis* bitki ekstraktlarını bakteriz inhibisyonu çalışmalarında kullanmıştır. Çalışma sonucunda bitki ekstraktının 52 farklı bakteri türünün 17 tanesinde inhibisyon meydana getirdiği gözlenmiştir [24].

Bonjar tıbbi aromatik olduğu bilinen bazı bitkilerin antimikrobiyal etkinliğini araştırdığı bir çalışmada, *A. officinalis* çiçek ekstraktların patojen mikroorganizmalardan bazıları üzerinde antimikrobiyal aktivite gösterirken, bazıları üzerinde hiçbir inhibisyon gözlemlenmemiştir [25].

Xet yaptığı çalışmada ise hatmi çiçeğinin 1,8 mg/g- 178,8 mg/g değerleri arasında olan fenolik madde içerikleri analiz edilmiştir. Farklı koşullarda yetşen ya da farklı parametreler ile ekstrakte edilen bitkilerde anlamlı değişikliklerin görüldüğü açıktır [26].

Hatmi çiçeğinin su kullanılarak 60 °C 10 dk parametreleri ile oluşturulan ekstraksiyon koşullarında toplam fenolik madde içeriği 16,56 ± 0,58 mgGAE/g olduğu belirtilmiştir. Burada sürenin kısa olması fenolik maddelerin bozunmasına engel olduğu düşünülebilir [27].

Ewals ve arkadaşlarının pembe ve beyaz hatmi çiçeklerine biotin ve amino asit içeren çözümlerle bekletilmesi sonucunda fenolik madde içeriğini analiz etmişlerdir. Beyaz çiçeklerde 1,43+0,09 mg/100 g ipembe çiçeklerde 1,877+0,06 mg/100g fenolik madde içerirken biotin ve amino asit ilavesiyle bu değerler 4,57+0,5 mg/100g 3,53+0,04mg/100g değerlerine yükselmiştir [28].

2.4.3. Aynısefa

Aynısefa, Zengin kimyasal içeriği, aynısefa bitkisinin başta tıp ve eczacılık alanlarında olmak üzere gıda ve kozmetik sanayi gibi çeşitli alanlarda kullanımına olanak sağlamaktadır. Aynısefa bitkisinin iltihaplı deriler üzerinde, deri yaralanmalarında ve yüzeysel yanıkların tedavisi için ticari olarak kullanıldığı bilinmektedir [29-30].

Aynısefa bitkisi fenolik bileşiklerce zengin antibakteriyel, antioksidan özelliklerin yanında kanser önleyici olarak kullanıldığı birçok çalışma mevcuttur. Yapılan bir çalışmada da aynısefa bitkisi kullanılarak bu özelliklerin artırılması hedeflenmiştir. Aynısefa bitkisi yetiştirilirken nikel gübresi ile beslenmiş ve fizikokimyasal ve fizyolojik özellikler takip edilmiştir. Nikel konsantrasyonunun artmasıyla toplam fenolik madde içeriği 37,49 mgGAE/g değerinde 47,483 mgGAE/g değerine yükseldiği belirtilmiştir [31].

İrem Ayhan'ın yaptığı çalışmada ise farklı ekim zamanlarında yetiştirilen 4 farklı aynısefa örneğinde uçucu yağ elde edilmiştir. Toplam fenolik madde içeriği 513,2540±0,008 mgGAE/L 555,0000±0,006 mgGAE/L değerleri arasında olduğu tespit edilmiştir [32].

2.4.4. Aspir

Ortadoğu ülkelerinde çay olarak tüketilmekte olan aspir çiçekleri bazı vitamin ve mineraller, aminoasit ve fenolik bileşikler bakımından zengindi [33].

Yu ve arkadaşlarının aspir tohumlarıyla yapmış olduğu çalışmada osteoporoz, romatoid artrit ve aterosjenik riskini azaltmaya yönelik etkilerinin varlığı rapor edilmiştir [34].

Farklı çözücülerin kullanılmasıyla ekstrakt edilen aspir bitkisinin fenolik madde içerikleri Yolci ve ark. yaptığı çalışmada belirtilmiştir. Bu çalışmada da saf su ile hazırlanan ekstraktın metanol, etanol ve aseton ile hazırlanan ekstraktlara kıyasla yaklaşık 2 kat fazla olduğu rapor edilmiştir. Etanol ise en düşük sonucu vermiştir. Saf suyun aspir için iyi bir fenolik madde ekstraktı sağladığı etanolün ise en etkisiz çözücü olduğu sonucu bu çalışmada da paralellik göstermektedir [35].

Esra Kuşoğlu'nun aspir çiçeği için yaptığı DPPH tayininde 1mg/ml hazırlanan çiçek ekstraktında %inhibisyon değeri yaklaşık %55 olarak belirlenmiştir. Bu çalışmada ise aynı konsantrasyonda hazırlanan ekstrakt için %43,85 inhibisyon sağlamıştır [36].

3. TAGUCHI DENEY TASARIMI

3.1. Taguchi Yöntemi

Taguchi yöntemi, kaliteyi arttırmak ve maliyeti azaltmak gerektiği düşüncesine dayanarak oluşturulmuştur. Bu sayede, ürün ya da süreçlerin kalite düzeylerinin artırılması ve bunu sağlarken maliyetin düşürülmesi mümkün olur. Bu yöntem, Dr. Genichi Taguchi tarafından 1940'lı yıllarda geliştirilmiştir [7].

Taguchi metodu, sistem tasarımı ve parametre tasarımını içermektedir. Parametre tasarımı, belirlenen parametreler için farklı seviyelerdeki ön araştırmalara dayanarak ve mali açıdan en uygununu seçmeyi amaçlamaktadır. Öncelikle sistem tasarımı belirlenmektedir Bu aşamada, faktörlerin sayısına ve seviyelere bağlı olarak matematiksel bir dizi seçilir. Taguchi metodu sayesinde, yüksek performanslı ve düşük olan kombinasyon belirlenir [1-7].

3.2. Taguchi Yönteminin Uygulama Adımları

Taguchi yöntemimde deneylerin parametreleri ortogonal dizilerin kullanılmasıyla elde edilir.

Optimum koşulların belirlenmesi için ise her bir faktörün yanıt değere etkisi araştırılır. Her bir değişkenin bir süreç için bireysel olarak etkilerinin ortaya konması o sürecin kontrol altına alınabilmesinde oldukça önemlidir.

Taguchi yöntemi kullanılarak gerçekleştirilecek bir tasarımın basamakları şu şekilde verilebilir:

1. Problemin belirlenmesi,
2. Faktörlerin ve seviyelerinin sınıflandırılması,
3. Uygun bir ortogonal dizilişin belirlenmesi,
4. Deneylerin gerçekleştirilmesi ve verilerin toplanması,
5. Verilerin analizi ve optimum seviyelerin belirlenmesi
6. Doğrulama deneylerinin gerçekleştirilmesi.

3.2.1. Problemin durumu ve tanıtımı

Sistem modellemesi belirlenen probleme uygun tasarlanacağından dolayı öncelikle neyin araştırılması gerektiği belirlenmelidir. Araştırılacak olan hipoteze bağlı olarak kontrol edilebilir ve edilemeyen parametreler belirlenir ve kritik süreç faktörleri seçilir. Problemin çözümüne ilişkin amaç ortaya koyulduktan sonra, beyin fırtınası, sebep-sonuç şeması ve süreç akış diyagramları kullanılarak sistem parametreleri belirlenebilir [37].

3.2.2. Faktörlerin ve seviyelerinin seçimi

Amacı net bir şekilde ortaya konulan problem üzerinde etkisi olan tüm parametreler belirlenir. Bu aşamada sürecin tüm girdi ve çıktıları bu iki aşamadaki tüm etkileşimlerin çok iyi bilinmesi gerekir. Faktörler ve seviyeleri belirlendikten sonra Taguchi yöntemi ile sürece ait tüm bağımsız faktörlerin seviyeleri incelenir ve istatistiksel bir yaklaşımla faktörlerin bazıları elenmektedir. Değerlendirme yapılması uygun olan faktörler seçilir. Faktörler kontrol edilebilen ve kontrol edilemeyen (gürültü faktörü) faktörler olarak ikiye ayrılmaktadır. Kontrol edilebilen faktörler belirlenmeli ve faktörlerin uygun seviyeler seçilmelidir [37].

3.2.3. Ortogonal dizi ve seçimleri

Taguchi metodu kontrol edilen parametrelerden oluşan ortogonal dizilişle yanıt değişkenlerinin hassasiyetini test etmeye dayalı bir yöntemdir. Ortogonal diziler matematiksel bir araç olarak geliştirilmiştir [6]. Sistemi etkileyen parametrelerin ve seviyelerinin çok fazla olduğu durumlarda kullanılır. Ortogonal dizilerin oluşturulmasındaki amaç, tüm faktörlerin eşit deneme sayıları ile modellemeye katılmalarını sağlamaktır. Ortogonal dizinin çok kullanılmasının en önemli nedeni birçok etkenin asgari ölçekte test edilmesidir [37].

Ortogonal diziliş deney sayısının en aza düşürülmesine olanak sağlamaktadır. Bu diziliş, sürecin toplam serbestlik derecesine bağlı olarak belirlenmektedir.

Dizilerin seçimi sırasında belirlenen faktör ve seviyelerin serbest derecesine bakılır. Serbestlik derecesi, tüm faktörlerin ve etkileşimlerin serbestlik derecelerinin toplamıyla bulunur. Seviye sayısının artması gözlem sayısını arttırmaktadır. Bu durum da deneydeki rastgele hataların oluşması belirsizliğin artmasına sebep olmaktadır. Bu sebeple maliyet, zaman ve kaynakların en verimli şekilde kullanılmasıyla en doğru sonuca ulaştırabilecek faktör ve seviyeler seçilmelidir [38-40].

3.2.4. Deneilerin gerçekleştirilmesi ve verilerin toplanması

Ortogonal dizi oluşturulma işleminden sonra deneysel aşmaya geçilir. Deneysel ortogonal dizi ile modellenmiş deney setlerine uygun yapılır. Deney setleri birden çok tekrar edilirse deneyin istatistiksel olarak güvenilirliği artmaktadır [41].

3.2.5. Verilerin analizi

Deneysel verilerden belirlenecek optimum çalışma şartları belirlenirken her ortamda ve zamanda istatistiksel olarak aynı veya benzer performans değerine ulaşılmalıdır. Bu nedenle performans istatistiğinin seçilen probleme uygun olarak belirlenmesi deney tasarımı için önemli bir adımdır. Taguchi tasarımlarında en çok kullanılan performans istatistiği S/N oranıdır.

Parametrelerin optimum şartlarının bulunmasında aşağıdaki performans istatistiği hesaplamaları kullanılmaktadır [42-43].

Daha büyük daha iyi;

$$\frac{S}{N}: -10 \log \left(\frac{1}{n} \sum_{i=1}^n \frac{1}{y_i^2} \right)$$

“En büyük, en iyi” durumu için sinyal/gürültü oranını ifade eder. Örneğin verim gibi artması istenen durumlarda kullanılabilir.

Daha küçük daha iyi;

$$\frac{S}{N}: -10 \log \left(\frac{1}{n} \sum_{i=1}^n y_i^2 \right)$$

Bu tür problemlerde, Y'nin hedef değeri sıfırdır. En küçük değer en iyi durumu için sinyal/gürültü oranını ifade eder. Örneğin son üründe hata sayısı gibi istenmeyen değerler için kullanılabilir.

Burada;

n: deney tekrar (paralel çalışma) sayısı,

y: faktörlerin deneysel olarak hesaplanan değeridir [43].

Varyans analizi faktörlerin, deneyler sonucu elde edilen yanıtları ne ölçüde etkilediğini araştırmak için kullanılır. Bunun yanı sıra elde edilen sonuçların istatistiksel olarak belirlenen güven aralığında anlamlı olup olmadığı da test edilir. Deneilerin amacı

sistem veya üründe etkili parametrelerin değişimini kontrol etmek ve birbirileri ile etkileşimlerini incelemektir. Bu etkileşimleri anlamak sonuç üzerinde karar vermeyi kolaylaştırır. Varyans analizi test edilen grupların birbirileri ile arasındaki farklılığın anlaşılması için kullanılır. Varyans analizinin bir diğer adı F testidir. F-Testinde karelerin toplam değeri ve karelerin ortalaması değeri belirlenir. Kareler ortalamasının hata kareler ortalamasına bölünmesi ile F değeri elde edilir. P değerleri ise istatistiksel olarak sonucun anlamlı olup olmadığı incelenir. Belirlenen güven aralığında örneğin %95 güven seviyesinde test edilen hipotez için $p < 0,05$ ise H_0 hipotezi kabul edilir ve sonuç anlamlı olmuş olur [44-45].

3.2.6. Doğrulama deneylerinin yapılması

Analizlerin sonucunda faktörlerin en iyi sonucu veren seviyeleri belirlenir. Bu parametrelerle oluşturulan deney düzeneği kurularak sistem tekrarlanır ve analizler yapılır. Deney sonucunda bulunan faktör ve seviye için belirlenen kombinasyon en iyi performans karakteristiği değeri ile istatistiksel olarak farksız bulunursa modelleme amacına uygun olarak kullanılmış olur [45].

4. DENEYSEL ÇALIŞMALAR

4.1. Kullanılan Cihazlar

Vortex(Heidolp Reaxtop), Derin Dondurucu(Uğur UD 100BK), ultrasonik banyo (Bandelin Sonorex), Hassas Terazı(ATX 220 SHIMADZU), otomatik pipet (BIOHIT PROLINE ve BRAND TRANSFERPETTE S100- 1000MİCROLT), Spektrofotometre(SHIMADZU UV-2600), Su Banyosu(Nüve Nb20)

4.2. Kimyasal Maddeler

Çalışma süresince kullanılan tüm kimyasal maddeler analitik kalitededir. Gallik asit (GA) ve DPPH (2,2-difenil-1-pikrilhidrazil) Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Germany), etanol, metanol Folin reaktifi Merck (Darmstadt, Germany) firmasından temin edilmiştir.

4.2.1. Toplam fenolik madde miktarı tayini için kullanılan çözeltiler

Na₂CO₃ (%20) çözeltisinin hazırlanması: 20 g Na₂CO₃ (Sodyum Karbonat) 100 ml'ye saf su ile tamamlanarak çözüldü.

Folin-Ciocalteu (%10) reaktifinin hazırlanması: 10 ml FCR reaktifi ve 100 ml distile su kullanılarak hazırlanmıştır.

4.2.2. Antioksidan kapasite (DPPH) tayini için çözeltiler

DPPH serbest radikali giderim aktivitesi tayini için (0,1 mM DPPH) 4 mg DPPH ve 100 ml etanolde kullanılmıştır.

4.3. Toplam Fenolik Madde Miktarı

Folin-Ciocaltaeu yöntemi kullanılarak hazırlanan 9 farklı ekstrakt için fenolik madde miktarı analizi yapılmıştır. Gallik asit standart grafiğın oluşturulması için 5 farklı konsantrasyonda hazırlanmıştır (0,1-0,5 mg/ml). Bitki ekstraktlarının ve gallik asidin fenolik madde miktarını bulmak amacıyla 37 0,5 ml örnek, 2,5 ml Folin Ciocaltaeu reaktifi ve 7,5 ml sodyum karbonat çözeltisi karıştırılmış ve 2 saat 30 dakika bekletilmiştir. Örneklerin ve standardın absorbans değerleri 750 nm'de okutulmuştur.

Analizler üç tekrarlı olacak şekilde uygulanmıştır. Standart çalışma grafiğinin doğru denklemi $y = 4,277x + 0,0295$ olarak hesaplanmıştır [46].

4.4. DPPH Serbest Radikal Giderme Aktivitesi Tayini

Hazırlanan örneklerin antioksidan kapasitesi DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl) serbest radikal giderme aktivitesi yöntemi ile belirlenmiştir [47]. Serbest radikal çözeltisi olarak 1 Mm'lık etanol ile hazırlanmış 100 µl DPPH kullanılmıştır. Kontrol okuması için örnek yerine etanol kullanılmıştır. Tüpler vertekslenerek karanlık ortamda 30 dk bekletilmiş ve 517 nm'de absorbans okuması kaydedilmiştir. Analizler 3 tekrarlı gerçekleştirilmiştir.

$$\text{DPPH Giderim Aktivitesi} = \frac{A_{\text{Kontrol}} - A_{\text{Örnek}}}{A_{\text{Kontrol}}} \times 100$$

A_{Kontrol} kontrolün absorbansı, $A_{\text{Örnek}}$ örneğin absorbansıdır.

4.5. Antibakteriyel Aktivite Tayini

Besiyeri hazırlanmasında Müller-Hinton agar kullanılmıştır. 34 gram MHA, toplam hacim 1 L olacak şekilde saf suda çözülür. Sterilizasyon işlemi 1 atm basınçta 121°C'de 30 dk programında otoklav içerisinde gerçekleştirilir. Hazırlanan besiyeri 20 ml olacak şekilde petri kaplarına dökülür. Antibakteriyel çalışma aşamasına kadar +4 °C'de bekletilir. Antibakteriyel aktivite agar kuyucuk difüzyon metodu kullanılarak tayin edilmiştir. Besiyeri dökülmüş petri kaplarında sterilize olacak şekilde kuyucuklar açılmıştır. 0,5 McFarland olarak hazırlanan bakteri süspansiyonları kuyucuklara ilave edilmiştir. Her petride kontrol amaçlı bakteri içermeyen bir kuyucuk bulunmaktadır.

Tez kapsamında kullanılan kullanılan mikroorganizmalar;

Staphylococcus aureus (S. Aureus) (ATCC 25923), (Gram pozitif bakteri)

Bacillus cereus (B. Cereus) (ATCC SBT8), (Gram pozitif bakteri)

Escherichia coli (E. Coli) (ATCC 25922), (Gram negatif bakteri)

4.6. İstatistiksel Analiz

Tüm istatistiksel hesaplamalar ve Taguchi modellemesi Minitab19 paket programı ile yapıldı.

Tüm deneylerde üç paralel olarak gerçekleştirildi. İstatistikler aritmetik ortalama ve standart sapma değerleri ortalama \pm ss şeklinde verildi.

Verilerin istatistiksel olarak anlamlılığı t testi ile belirlendi($p<0.05$).

4.7. Uygulama

4.7.1. Problemin belirlenmesi

Ekstraksiyon işleminde, ekstraksiyon sıcaklığı, ekstraksiyon süresi, parçacık boyutu, katı/sıvı oranı, pH başlıca prosesi etkileyen parametrelerdir. Buna bağlı olarak ekstraksiyon işleminde elde edilmek istenen sonuçlara göre bir çıktı belirlenir. Bu tezde fenolik madde içeriğinin yüksek olması beklenmektedir. Fenolik maddeler hassas bilşenlerdir ve ekstraaksiyon işlemi sırasında kayu-ıp yaşanabilmektedir. Bu sebeple fenolik maddelerin en iyi şekilde ekstrakte edilmesi, termal bozunmaya uğramaması ve doğrudan tüketim maddesi olması bekledndiğinde toksik olmayan çözücüler tercih edilmelidir.

4.7.2. Faktör ve seviyelerin belirlenmesi

Fenolik bileşiklerin işleme koşullarına karşı stabil olmadığı bilinmektedir. Sıcaklık, ışık, enzim ve diğer bileşenlerin varlığı bu bileşiklerin bozulmasına sebep olmaktadır. Fenolik maddeler aynı zamanda pH değişimlerinden de etkilenmektedir. Fenolik madde ekstraktında kullanılan çözücünün de seçimi oldukça önemlidir [12].

Birçok çözen çeşidi bulunmasına karşın fenolik maddelerin daha sonra hangi amaçla kullanılacağı da çözen seçimi için dikkat edilmesi gereken bir husustur. Fenolik bileşiklerin kullanımı sağlık alanında yaygın olduğundan, çözücülerin de grass olarak kabul edilen çözen olması tercih edilmelidir. Sıcaklık-Süre kombinasyonları oldukça önemlidir. Yüksek sıcaklık ve uzun süreler bileşik yapılarını bozarken, düşük sıcaklık ve kısa süreler ekstraksiyonun verimini azaltmaktadır. Bu çalışma kapsamında; çözücü, ekstraksiyon yöntemi, sıcaklık ve süre kombinasyonları üzerinde

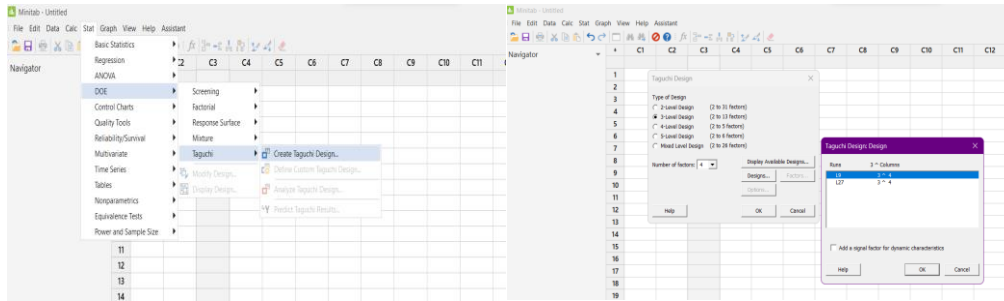
yoğunlaşmıştır. Yapılacak deneylerde incelenmesi düşünülen faktörler ve seviyeleri Tablo 4.1’ de gösterilmiştir.

Tablo 4.1. Deney tasarımında kullanılacak faktör ve seviyeler

Faktörler	1. Seviye	2. Seviye	3. Seviye
Ekstraksiyon Yöntemi	Ultrasonik	Klasik	Karıştırmalı
Çözücü	Etanol	Metanol	Distile Su
Sıcaklık	25°C	40°C	55°C
Süre	30 dk	60 dk	90 dk

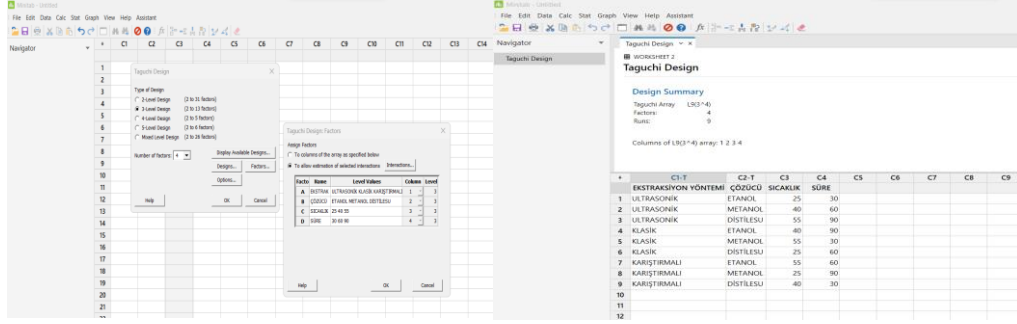
4.7.3. Ortogonal dizi ve seçimleri

3 farklı çözen, sıcaklık seviyesi, süre ve karıştırma seviyesi belirlenmiştir. Bu faktörlerin her birinin serbestlik derecesi 2’dir. Bu durumda toplam serbestlik derecesi 8 olmaktadır. Toplam yapılacak deney sayısı ise faktör grubunun toplam serbestlik derecesine 1 eklenerek bulunur. Bu durumda L9 ortogonal dizi seçilmiştir. Minitab 19 programı kullanılarak uygun ortogonal dizi için tasarım parametreleri şekil 3.1.’de gösterildiği sırasıyla Stat-DOE-Taguchi-Create Taguchi Design basamakları izlenerek hazırlanmıştır



Şekil 4.1. Program üzerinde Taguchi modelleme aşamaları

Ortogonal Diziler, deney tasarımı oluştururken deneme sayısını büyük ölçüde azaltır. Örneğin tam faktöriyel deney tasarımında 4 faktör 3 seviye için 3^4 adet deney yapılmalıdır. Bu durumda gerçekleştirilmesi gereken deney sayısı 81 olur. Ortogonal dizilerde ise faktör ve seviyelere uygun seçildiğinde deney sayısı 9’ düşmektedir. Serbestlik derecesine göre belirlenen L9 ortogonal dizisi Minitab 19 programında Şekil 4.2.’de gösterildiği şekilde tasarlanmıştır.



Şekil 4.2. Program üzerinde faktörlerin ve seviyelerin kolonlara aktarılması

Minitab19 programında faktör ve seviyeleri isimlendirdikten sonra ortogonal diziye göre deney sıralaması ve ekstraksiyon parametreleri şekil 4.2’de verildiği gibi program ekranında verilmiştir. Programın seçilen faktör ve seviyeler ile oluşturduğu deney setleri ise tablo 4.2.’de görüldüğü gibidir.

Tablo 4.2. Taguchi modellemesi ile elde edilen deney setleri

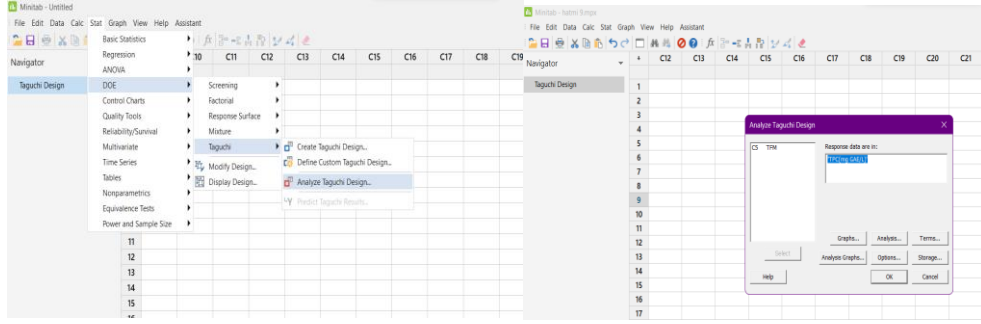
DENEY	EKSTRAKSİYON YÖNTEMİ	ÇÖZÜCÜ	SICAKLIK	SÜRE
1	Ultrasonik	Etanol	25	30
2	Ultrasonik	Metanol	40	60
3	Ultrasonik	Distilesu	55	90
4	Klasik	Etanol	40	90
5	Klasik	Metanol	55	30
6	Klasik	Distilesu	25	60
7	Karıştırmalı	Etanol	55	60
8	Karıştırmalı	Metanol	25	90
9	Karıştırmalı	Distilesu	40	30

4.7.4. Deneylerin gerçekleştirilmesi ve verilerin toplanması

Oluşturulan deney sıralamasına göre ekstraksiyon işlemleri 3 tekrarlı olacak şekilde gerçekleştirilmiştir. Yanıt olarak toplam fenolik madde içeriği programa verilmiştir.

4.7.5. Verilerin analizi

Sinyal/gürültü grafikleri ile parametrelerin hangi seviyeler optimum olduğu belirlenebilecektir. Deney tasarımında sinyal/gürültü oranlarının hesaplanabilmesi için TFM miktarları yanıt olarak her bitki için ayrı ayrı yanıt olarak programa yanıt olarak işlenmiştir. Stat-DOE-Taguchi-Analyze Taguchi Desing şekil 4.3.’de gösterildiği gibi seçilerek toplam fenolik madde miktarı çıktıları “Response data are in” kutucuğuna seçilir.



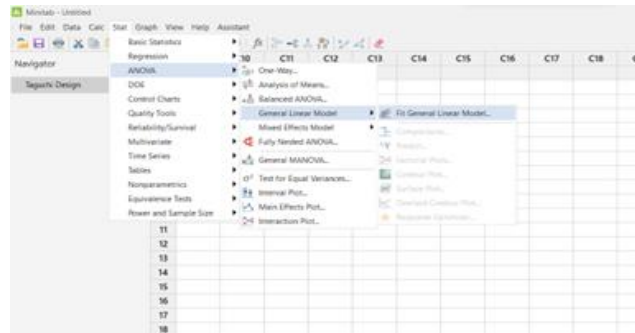
Şekil 4.3. Program üzerinde deney modellemesinin analizi

Ekstraksiyon optimizasyonunda en yüksek fenolik madde içeriğine sahip ekstraktı elde etmek amaçlanmıştır. Bu sebeple Analyze Taguchi Desing penceresinde “optins” sekmesinde “Daha büyük, daha iyi” anlamına gelen “larger is better” seçilerek modelleme tamamlanır. Program çıktısı olarak Sinyal/Gürültü (S/N) değerleri hesaplanır ve program ekranında verilir.

4.7.6. Varyans analizi (ANOVA)

Çalışmamızda her bir değişkenin toplam fenolik madde ekstraktına etkisini değerlendirmek amacıyla gerçekleştirilen ANOVA analizi yapılmıştır.

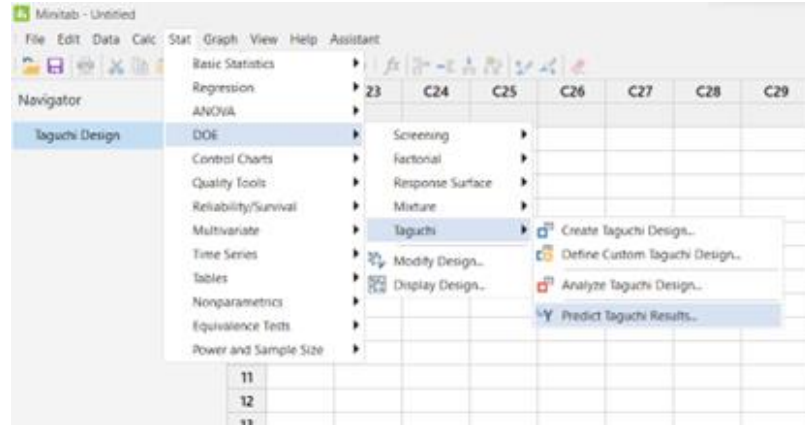
Varyans analizinde S/N değerleri kullanılarak faktörlerin ve seviyelerinin sonuç üzerinde nasıl bir anlam ifade ettiği araştırılır. Değişken parametrelerin F değerlerinin 1’den büyük olması, bu parametrelerin hata varyansından daha büyük farklılıklara sahip olduğu anlamına gelmektedir. P değerleri ise 0,05’ten(%95 güven aralığında) küçük olduğu durumlar ekstraksiyon üzerinde etkisinin anlamlı olduğu düşünülür. Deney tasarımında ANOVA analizi şekil 4.4.’de gösterilen adımlarla modellenmiştir.



Şekil 4.4. Program üzerinde modellemenin varyans analizi

4.7.7. Doğrulama deneyleri

Verilerin analiz edilmesinde sonraki adım doğrulama deneylerinin yapılmasıdır. Minitab proramında optimum değerler ile beklenen sonuç hesaplanır. Bu işlem basamakları Tablo 4.5 üzerinde gösterilmiştir. Belirlenen optimum faktör seviyeleri ile deney tasarımı oluşturulur ve paralelli olacak şekilde analiz gerçekleştirilir. Doğrulama deney sonuçlarının programda hesaplanan sonuçlar ile uyumlu olup kontrol edilir ve aralarındaki fark istatistiksel olarak da analiz edilir.

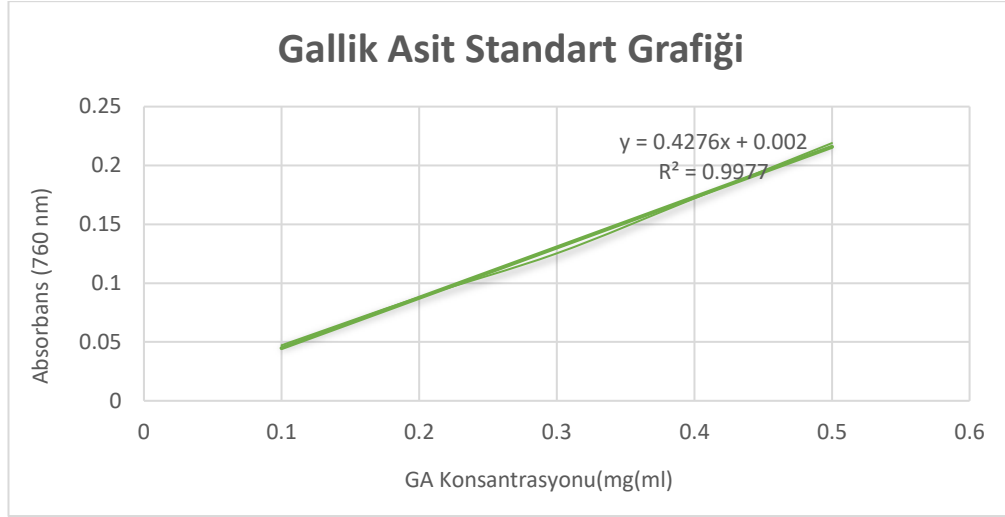


Şekil 4.5. Doğrulama deneyleri için seviye belirleme

5. BULGULAR VE TARTIŞMA

5.1. Toplam Fenolik Madde Miktarı Tayini Bulguları

Toplam fenolik madde tayini Folin – Ciocalteu yönteminin kullanılmasıyla tespit edilmiştir. Folin-Ciocalteu yöntemi kullanılarak yapılan analizde standart olarak gallik asit kullanılmıştır [48]. Gallik asit standart çalışma grafiği şekil 5.1.'de verildiği gibidir. Her bir çözelti için 75 nm'de 3 tekrarlı olacak şekilde absorbans değerlerinin ölçümü yapılmıştır kalibrasyon eğrisi oluşturulmuştur. Kalibrasyon eğrisinin doğru denklemi $y = 0.4276x + 0.002$ olarak bulunmuştur.



Şekil 5.1. Toplam fenolik madde miktarı tayini için standart grafik

Taguchi ortogonal dizilerine göre programda belirlenen 9 farklı deney seti her bir bitki için 3 tekrarlı olacak şekilde gerçekleştirilmiş ve toplam fenolik madde miktarı analiz edilmiştir. Ekstraksiyon koşulları ve sonuçlar Tablo 5.1.'de verilmiştir. Deneylerin sonuçları mgGAE/g olarak verilmiştir.

Tablo 5.1. Tüm deney setleri için TFM miktarı sonuçları

	HBS (mgGAE/g)	ASP (mgGAE/100g)	HTM (mgGAE/g)	AYN (mgGAE/g)
1	6,43±0,21	1,19±0,13	1,33±0,19	13,32±0,91
2	23,48±1,14	2,95±0,65	3,95±0,05	39,47±2,06
3	26,45±1,01	2,47±0,32	3,69±0,82	36,91±2,54
4	13,84±0,31	1,24±0,08	1,40±0,08	14,05±1,06
5	23,93±0,28	2,11±0,12	3,21±0,52	32,08±0,11
6	21,95±1,03	3,08±0,21	3,34±0,17	33,44±2,56
7	21,03±0,06	1,78±0,41	3,25±0,08	32,51±1,47
8	24,11±2,16	2,66±0,47	3,65±0,35	36,53±0,37
9	24,80±3,21	2,94±0,13	3,90±0,42	39,02±2,85

*Değerler ortalama±standart sapma olarak verilmiştir (n=3)

Hibiskus bitkisinin toplam fenolik madde miktarı incelendiğinde 6,43 mgGAE/g ve 26,45mgGAE/g arasında değişen değerler bulunmuştur.

Zhen ve diğerlerinin 22 farklı *Hibiscus sabdariffa* türü ile yapmış olduğu çalışmada hibiskus bitkisinin fenolik madde içeriklerini 20,4±2,5 mgGAE/g-29,9±0,5 mgGAE/g değerleri arasında olduğu sonucuna varmıştır [9].

Aspir çiçeği kullanılarak yapılan fenolik madde ekstraktında değişen sıcaklık ve süre parametreleri incelendiğinde 6,50±1,38mg/100g-12,13±1,16 /100g arasında değişen değerler rapor edilmiştir. En yüksek Sıcaklık(60°C) ve en uzun süre (120 dk) parametreleri kullanılarak optimum elde edilen TFM miktarı 13,18±0,080 mg/100g olarak bulunmuştur [49].

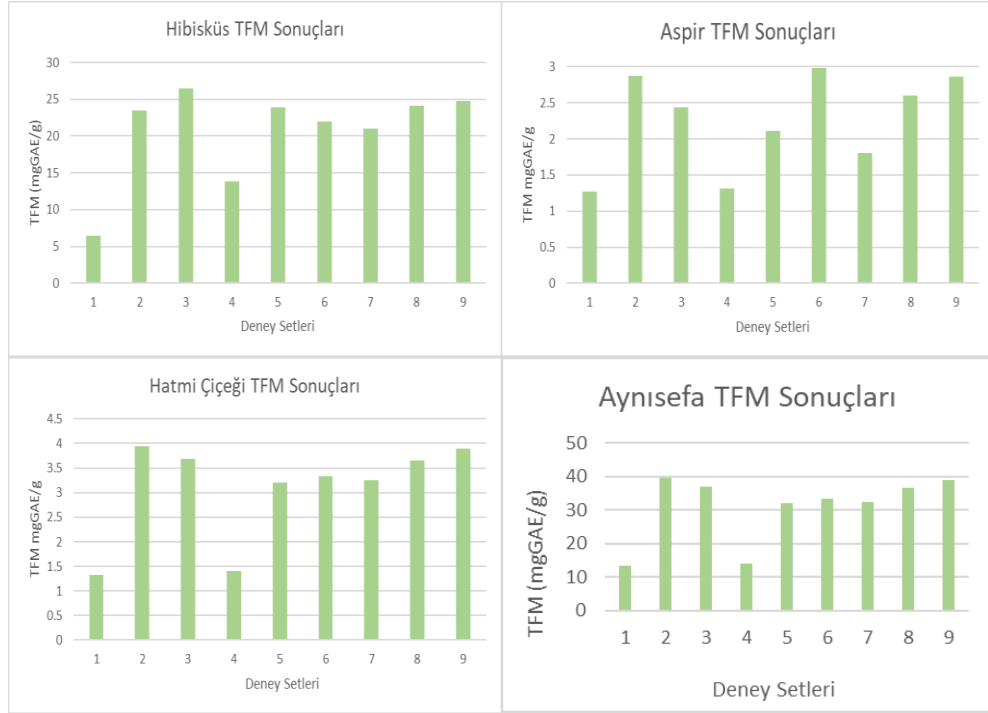
Golkar ve Taghizadeh çalışmasında aspir çiçeklerinin fenolik madde miktarı 51,33 mg/100g olarak saptanmıştır [50].

Ewals ve arkadaşlarının pembe ve beyaz hatmi çiçeklerine biotin ve amino asit içeren çözümlerle bekletilmesi sonucunda fenolik madde içeriğini analiz etmişlerdir. Beyaz çiçeklerde 1.43±0.09 mg/100 g pembe çiçeklerde 1,877±0.06 mg/100g fenolik madde içerirken biotin ve amino asit ilavesiyle bu değerler 4,57±0,5 mg/100g 3,53±0,04mg/100g değerlerine yükselmiştir [24].

Xue ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada ise hatmi çiçeğinin 1,8 mg/g- 178,8 mg/g değerleri arasında olan fenolik madde içerikleri analiz edilmiştir. Farklı koşullarda yetişen ya da farklı parametreler ile ekstrakt edilen bitkilerde anlamlı değişikliklerin görüldüğü açıktır [26].

Filipovi' ve arkadaşlarının farklı zamanlarda farklı ortamlarda yetişen *Calendula officinalis* L. Bitkileri için yaptığı çalışmada metanol ekstraktı ile hazırlanmış örneklerinde en yüksek TFM içeriği $64,765 \pm 7,092$ mgGAE/g'dır [51].

Farklı hasat zamanları toplanan aynısefa bitkisinin $12,80 - 30,31$ mgGAE/g olarak teyin edilmiştir.



Şekil 5.2. Toplam fenolik madde miktarı grafikleri

Her bir bitki için hesaplanan toplam fenolik madde miktarı grafiği ise şekil 5.2 üzerinde gösterilen grafiklerde verilmiştir.

TFM miktarları incelendiğinde deney setlerinin istatistiksel olarak etkili olduğu görülmektedir ($p < 0,05$).

Yapılan çalışmada 9 deney seti için sonuçlar incelendiğinde en yüksek ve en düşük TFM değerleri verilen grafiklerde görülmektedir (şekil 5.2.). Her bitki tek tek incelendiğinde hibiskus için 3 numaralı, aspir için 6, hatmi çiçeği 9 ve aynısefa için ise 2 numaralı deney setinde en yüksek değerler elde edilmiştir. Fakat bu sonuçlara bakarak hangi parametrenin fenolik madde ekstraktı için daha etkili olduğu sonucuna varılamaz.

Faktörlerin ve seviyelerinin TFM miktarı üzerine etkisini incelemek için program yanıtları verilerek Taguchi dizi analizi yapılmıştır. Her bir bitki için sonuçlar analiz edilmiştir.

5.2. Taguchi Optimizasyonu

5.2.1. Faktörlerin, fenolik madde ekstraktı verimi üzerindeki etkisi

Dört bitki için programda fenolik madde miktarı yanıtı verilerek “En Büyük, En İyi” ilkesiyle taguchi analizi gerçekleştirilmiştir. Analiz sonucunda her bitki için sinyal/gürültü oranı elde edilmiştir. Sonuçlar Tablo 5.2. verildiği gibidir.

Tablo 5.2. Deney setleri için hesaplanan S/N değerleri

	HBS	ASP	HTM	AYN
1	16,1595	1,4822	2,4896	22,4896
2	27,4156	9,3981	11,9246	31,9246
3	28,4474	7,8634	11,3417	31,3417
4	22,8198	1,8428	2,9529	22,9529
5	27,5773	6,4930	10,1258	30,1258
6	26,8288	9,7577	10,4849	30,4849
7	26,4583	4,9840	10,2390	30,2390
8	27,6433	8,4829	11,2521	31,2521
9	27,8891	9,3763	11,8252	31,8252

S/N değerleri ekstraksiyon verimi üzerine etkisi olan parametrelerin etkilerini araştırmak amacıyla kullanılmıştır. S/N değerleri kullanılarak parametre ve seviyelerin etki grafikleri ve Ana etki grafikleri oluşturulmuştur. Bu sayede her bir parametrenin birbirileri ile olan etkileşimlerini görsel olarak sunar. Bu etkileşimler sonuç üzerinde yorum yapmayı kolaylaştırmaktadır.

5.2.1.1. Hibiskus

En büyük en iyi ilkesiyle hesaplanan sinyal gürültü oranlarını için cevap analizleri Tablo 5.3.’de verildiği gibidir.

Tablo 5.3. Hibiskus bitkisi için seviyelerin toplam fenolik madde ekstraktına etkisi

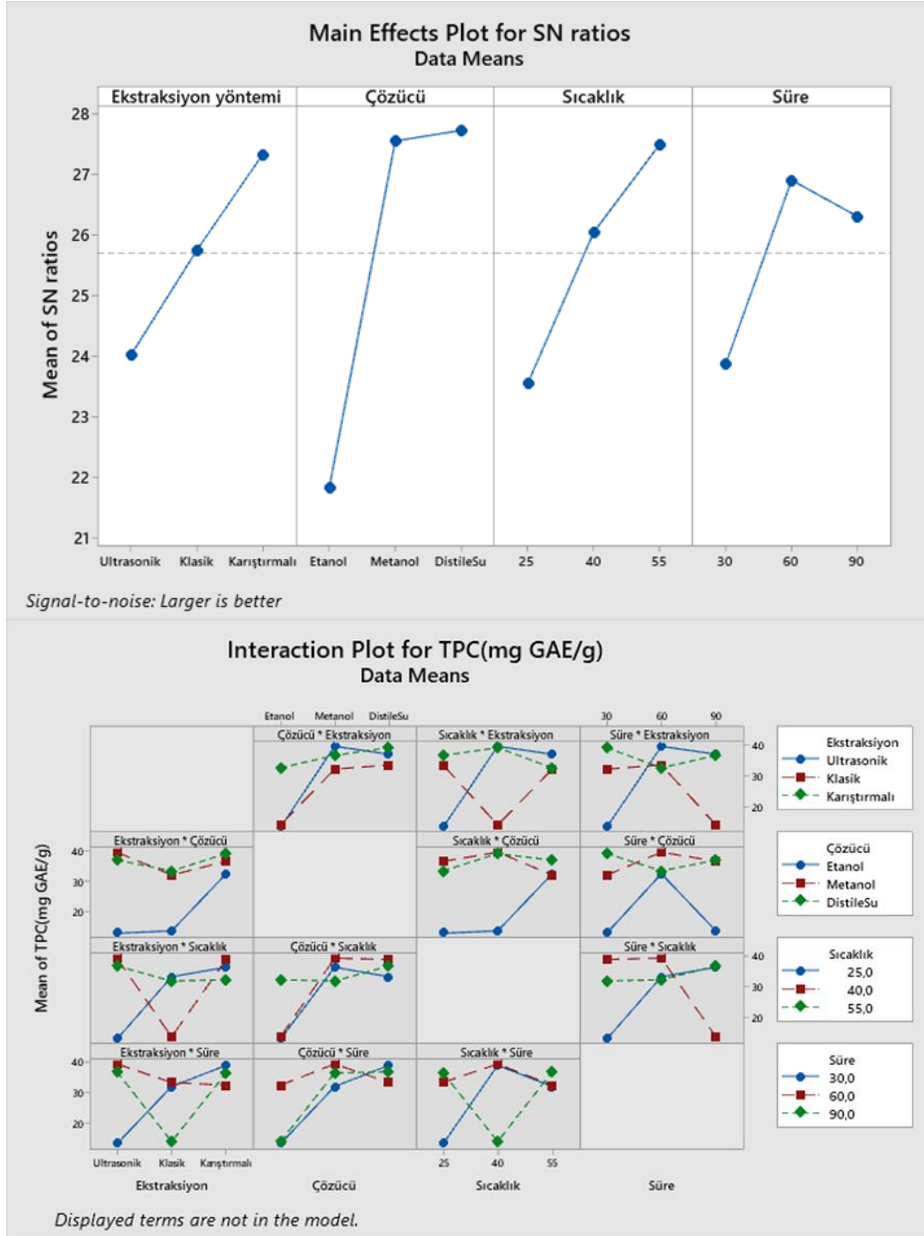
Seviye	Ekstraksiyon Yöntemi	Çözücü	Sıcaklık	Süre
1	24,01	21,81	23,54	23,88
2	25,74	27,55	26,04	26,90
3	27,33	27,72	27,49	26,30
Etki	3,32	5,91	3,95	3,03
Derece	3	1	2	4

(Ekstraksiyon yöntemi seviye: *Ultasonik, Klasik, Karıştırılmalı*; Çözücü Seviye: *Etanol, Metanol, Distile Su*; Sıcaklık Seviye: *25°C, 40°C, 55°C*; Süre Seviye: *30 dk, 60 dk, 90 dk.*)

Hibiskus bitkisi için fenolik madde ekstraktında en etkili parametrenin çözücü olduğu bulunmuştur. Faktör ve seviyelerin etkileri programın verdiği grafikte görülmektedir (Şekil 5.3.). Etki grafikleri incelendiğinde sürenin uzaması sonucu fenolik madde miktarında azalmaya sebep olmuştur.

Çalışma sıcaklık ve süre parametrelerinin değiştirilerek hibiskus bitkisinden toplam fenolik madde ekstraksiyonu gerçekleştirilmiştir. Sürenin artması TFM miktarında azalmaya sebep olmuştur [22].

Optimum koşulları genel olarak incelediğimizde ise en yüksek fenolik madde miktarı ekstraksiyonu koşullarının distile su kullanılarak 55 °C 60 dk süre karıştırılmalı ekstraksiyon olduğu görülmektedir.



Şekil 5.3. Optimizasyon analizi S/N ve ana etki grafikleri (hibiskus)

5.2.1.2. Aspir

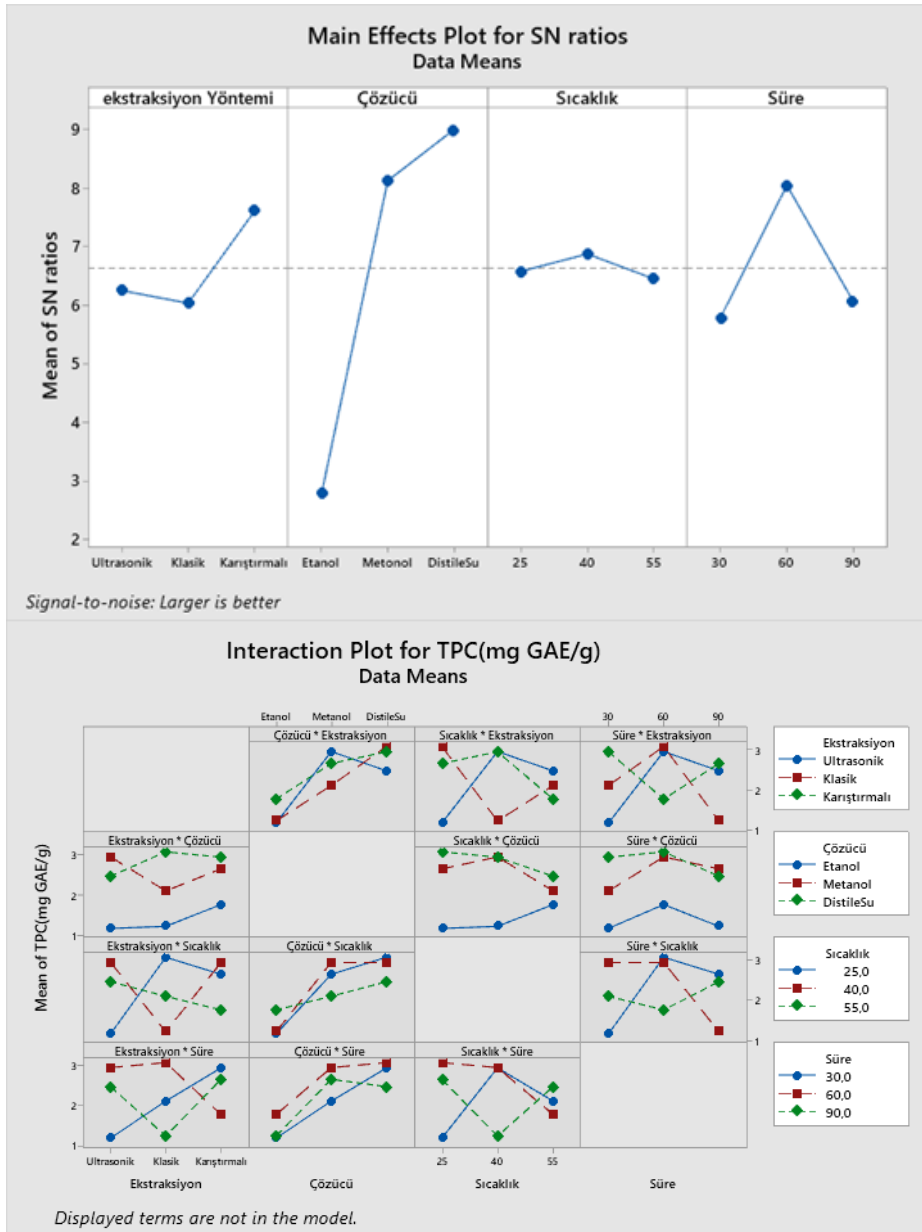
Aspir bitkisi için S/N değerleri ve etki sıralaması Tablo 5.4.'te gösterildiği gibidir.

Tablo 5.4. Aspir bitkisi için seviyelerin toplam fenolik madde ekstraktına etkisi

Seviye	Ekstraksiyon Yöntemi	Çözücü	Sıcaklık	Süre
1	6,248	2,770	6,574	5,784
2	6,031	8,125	6,872	8,047
3	7,614	8,999	6,447	6,063
Etki	1,583	6,229	0,426	2,263
Derece	3	1	4	2

(Ekstraksiyon yöntemi seviye: *Ultasonik, Klasik, Karıştırmalı*; Çözücü Seviye: *Etanol, Metanol, Distile Su*; Sıcaklık Seviye: *25°C, 40°C, 55°C*; Süre Seviye: *30 dk, 60 dk, 90 dk*)

Sinyal gürültü oranlarının etki grafiklerine bakıldığında optimum parametreler karıştırmalı ekstraksiyon, Distile su, 40°C ve 60 dk olarak belirtilmiştir. Sıcaklık grafiği incelendiğinde 40°C'den 50°C'ye geçişte fenolik madde miktarında azalma görülmektedir. Bunun sebebi aspir bitkisinde buluna fenolik maddelerin sıcaklıkla birlikte termal bozunmaya uğradığı yorumu yapılabilir. Sürenin uzaması da fenolik maddelerde azalmaya sebep olan bir parametredir. Bu sebeple Sıcaklık süre parametreleri için optimum değerler 40°C ve 60 dk'dır.



Şekil 5.4. Optimizasyon analizi S/N ve ana etki grafikleri(aspir)

Çözücü faktörü incelendiğinde distile su ve metanol ile hazırlanan ekstraktın fenolik madde etkisi etanol ile hazırlanana kıyasla oldukça düşüktür. Farklı çözücülerin kullanılmasıyla ekstrakte edilen aspir bitkisinin fenolik madde içerikleri Yolci ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada belirtilmiştir. Bu çalışmada da saf su ile hazırlanan ekstraktlar metanol, etanol ve aseton ile hazırlanan ekstraktlar ile karşılaştırıldığında yaklaşık 2 kat fazla fenolik madde içerdiği saptanmıştır [35]. Etanol ise en düşük sonucu vermiştir. Saf suyun aspir için iyi bir fenolik madde ekstraktı sağladığı etanolün ise en etkisiz çözücü olduğu sonucu bu çalışmada da paralellik göstermektedir.

5.2.1.3. Hatmi

Hatmi çiçeğine ait S/N değerleri ve etki sıralaması tablo 5.5. üzerinde verilmiştir. Etki sıralaması çözücü, ekstraksiyon yöntemi, süre ve sıcaklıktır.

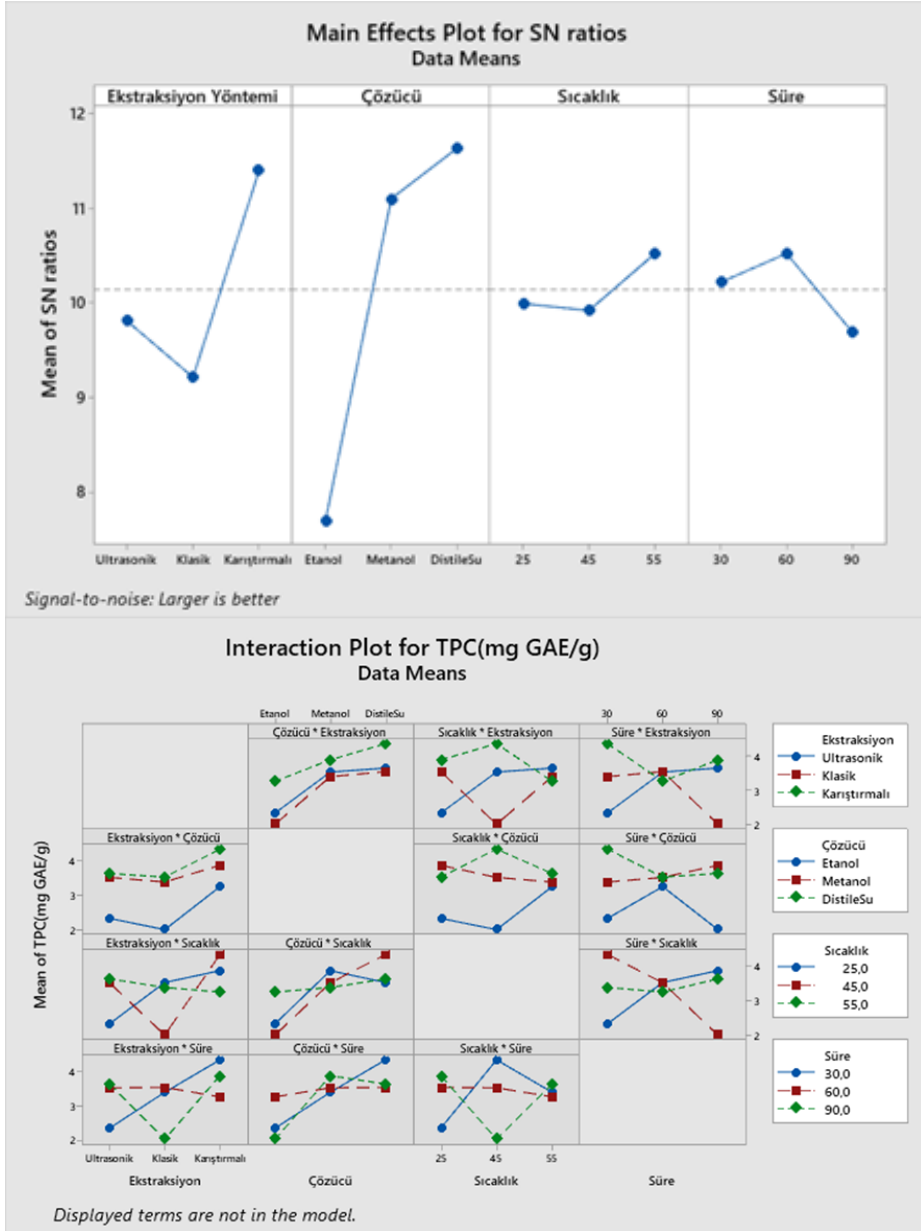
Tablo 5.5. Hatmi çiçeği için seviyelerin toplam fenolik madde ekstraktına etkisi

Seviye	Ekstraksiyon	Çözücü	Sıcaklık	Süre
1	3,176	2,545	3,259	3,368
2	2,988	3,607	3,303	3,448
3	3,836	3,849	3,438	3,185
Etki	0,848	1,304	0,179	0,263
Derece	2	1	4	3

(Ekstraksiyon yöntemi seviye: *Ultasonik, Klasik, Karıştırılmalı*; Çözücü Seviye: *Etanol, Metanol, Distile Su*; Sıcaklık Seviye: *25°C, 40°C, 55°C*; Süre Seviye: *30 dk, 60 dk, 90 dk*)

Etki grafikleri (Şekil 5.5.) Sıcaklıktaki artışın fenolik madde miktarını arttırdığını fakat süresinin uzaması buna ters bir etki oluşturduğunu göstermektedir. Bu sebeple optimum süre-sıcaklık değerleri 55°C 60 dk olarak bulunmuştur.

Hatmi çiçeğin kullanıldığı bir başka çalışmada distile su kullanılarak 60 °C 10 dk parametreleri ile oluşturulan ekstraksiyon koşullarında toplam fenolik madde içeriği diğer parametrelere kıyasla optimum değerlerdir [27]. Sürenin uzun olmaması fenolik maddelerin bozulmasına engel olduğu düşünülebilir.



Şekil 5.5. Optimizasyon analizi S/N ve ana etki grafikleri (hatmi)

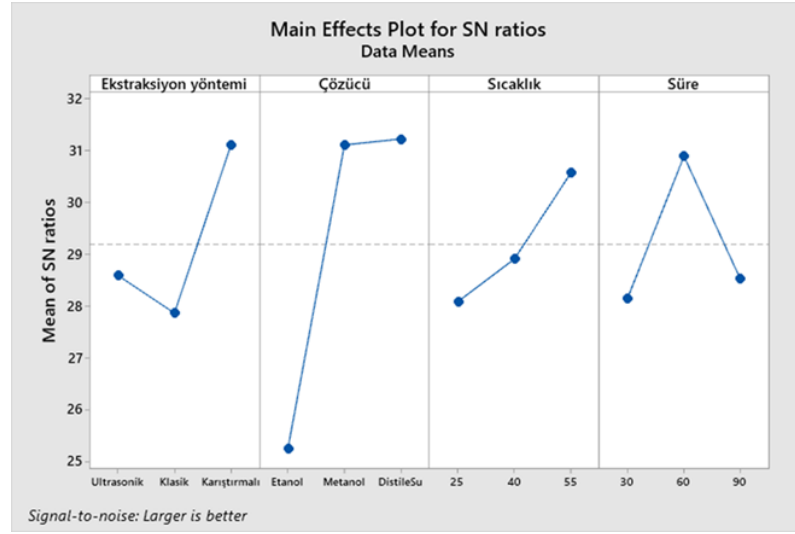
5.2.1.4. Aynısefa

Aynısefa bitkisinin ekstraksiyonuna ait etki ve S/N değerleri Tablo 5.6.'da görüldüğü gibidir. En etkili parametre diğer tüm bitkilerde olduğu aynısefa bitkisi için de çözücüdür. Optimum sıcaklık süre parametreleri ise 55°C ve 60 dk'dır.

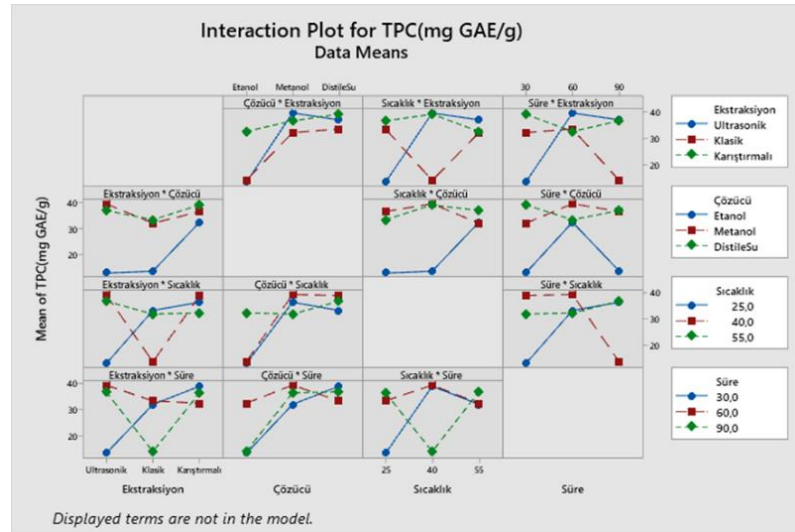
Tablo 5.6. Aynısefa bitkisi için seviyelerin toplam fenolik madde ekstraktına etkisi

Seviye	Ekstraksiyon	Çözücü	Sıcaklık	Süre
1	29,90	19,96	27,76	28,14
2	26,52	36,03	30,84	35,14
3	36,02	36,45	33,83	29,16
Etki	9,49	16,50	6,07	7,00
Derece	2	1	4	3

Ekstraksiyon yöntemi seviye: Ultrasonik, Klasik, Karıştırılmalı; Çözücü Seviye: Etanol, Metanol, Distile Su; Sıcaklık Seviye: 25°C, 40°C, 55°C; Süre Seviye: 30 dk, 60 dk, 90 dk



Şekil 5.6. Optimizasyon analizi S/N ve ana etki grafikleri (aynısefa)



Şekil 5.6. (Devamı) Optimizasyon analizi S/N ve ana etki grafikleri (aynısefa)

Cetkovic ve arkadaşları aynısefa bitkisinin (*Calendula officinalis*) su ve metanol ile 25° C’de hazırlanan ekstraktlarını incelemiştir. Su ekstraktının fenolik madde içeriği

bulunurken metanol ekstraktında bulunan miktardan daha fazladır. Su ekstraktının çözücü olarak daha etkili olması bu çalışma ile örtüşmektedir [53].

5.2.2. Varyans analizi

Her bitki için S/N ve ortalama değerler hesaplanmıştır. Bu değerlerin analizleri ile faktörlerin etkileri incelenebilmektedir. Faktörlerin sonuç üzerindeki değişime katkısının belirleyerek modelleme için daha doğru yorumlamalar yapılabilir. ANOVA analizleri kullanılarak sonuçlar istatistiksel olarak değerlendirilmiştir. Her bitki için varyans analizi sonuçları aşağıda sunulmuştur.

5.2.2.1. Hibiskus

Hibiskus bitkisi için çözücü seçiminin en önemli faktör olduğu etki grafiklerinde de saptanmıştır. Tablo 5.7.'de de görüldüğü üzere çözücü seçimi %59,09 bir etki değerine sahipken süre faktörü en az değişkenlik gösteren parametredir. Varyans analizinde p değerleri incelendiğinde tüm değişkenlerin bu modelleme için anlamlı olduğu sonucuna varılır.

Tablo 5.7. Varyans analizi sonuçları (hibiskus)

	DF	Yüzde Katkı	F Değeri	P Değeri
Ekstraksiyon Yöntemi	2	13,02%	32,16	0,0000
Çözücü	2	59,09%	145,93	0,0000
Sıcaklık	2	18,59%	45,90	0,0000
Süre	2	5,65%	13,95	0,0002
Hata	18	3,64%		
Toplam	26	100,00%		

5.2.2.2. Aspir

Aspir bitkisine ait varyans analizi incelendiğinde çözücü faktörünün etkisi diğer parametrelere kıyasla oldukça yüksek bir etki değerine sahiptir. Sıcaklık, süre ve ekstraksiyon yöntemi faktörleri incelendiğinde yüzdesel katkılarının düşük olmasının yanı sıra deneysel modelleme için anlamsız değişkenler olduğu görülmektedir (p<0,05)

Tablo 5.8. Varyans analizi sonuçları (aspir)

	DF	Yüzde Katkı	F Değeri	P Değeri
Ekstraksiyon Yöntemi	2	3,96%	0,31	0,7662
Çözücü	2	81,82%	6,32	0,0131
Sıcaklık	2	1,21%	0,19	0,7073
Süre	2	0,06%	0,01	0,9327
Hata	18	12,95%		
Toplam	26	100,00%		

5.2.2.3. Aynısefa

Varyans analizi tablosu (Tablo 5.9.) incelendiğinde aspir bitkisi için tüm faktörlerin bu modelleme için anlamlı olduğu görülmektedir ($<0,05$). Tüm faktörlerin seviyelerinin değişmesi yanıt üzerinde önemli etkilere sebep olsa da ekstraksiyon yöntemi ve çözücü değişimi diğer parametrelere kıyasla daha yüksek farklılık oluşturmaktadır.

Tablo 5.9. Varyans analizi sonuçları (aynısefa)

	DF	Yüzde Katkı	F Değeri	P Değeri
Ekstraksiyon Yöntemi	2	15,71%	19,73	0,0000
Çözücü	2	60,70%	76,24	0,0000
Sıcaklık	2	6,50%	8,16	0,0029
Süre	2	9,93%	12,47	0,0003
Hata	18	7,17%		
Toplam	26	100,00%		

5.2.2.4. Hatmi

Hatmi çiçeğinin faktör etkileri incelendiğinde çözücü ve ekstraksiyon yönteminin yanıt üzerindeki etkisinin sıcaklık ve süreye göre daha fazla olduğu görülmektedir. Sıcaklık ve süredeki değişim yanıtı yüzdesel olarak daha az etkilemektedir. Ayrıca bu iki faktörün modelleme üzerinde etkisi de anlamsızdır ($p<0,05$)

Tablo 5.10. Varyans analizi sonuçları (hatmi çiçeği)

	DF	Yüzde katkı	F değeri	P Değeri
Ekstraksiyon Yöntemi	2	24,10%	15,34	0,0001291
Çözücü	2	58,50%	37,25	0,0000004
Sıcaklık	2	1,06%	0,67	0,5229163
Süre	2	2,21%	1,41	0,2704828
Hata	18	14,14%		
Toplam	26	100,00%		

5.2.3. Doğrulama deney sonuçları

Taguchi metodunda elde edilen sonuçlara göre performans karakteristiği üzerinde faktörlerin etkisi incelenmiş ve en etkili seviyeler tablo 5.11.'de sunulmuştur. Bu parametreler kullanılarak doğrulama deneyleri yapılır ve optimizasyon işleminin uygunluğu test edilmiş olur.

Tablo 5.11. Doğrulama deneylerinde kullanılacak seviyeler

	Ekstraksiyon Yöntemi	Çözücü	Sıcaklık	Süre
Hibiskus	Karıştırmalı	Distile Su	55°C	60 Dk
Aspir	Karıştırmalı	Distile Su	40°C	60 Dk
Hatmi Çiçeği	Karıştırmalı	Distile Su	55°C	60 Dk
Aynısefa	Karıştırmalı	Distile Su	55°C	60 Dk

Minitab 19 programında model tasarımı için stat-doe-taguchi-predict taguchi design bölümünden beklenen optimum toplam fenolik madde sonuçları için hesaplama yaptırılmıştır (Tablo 5.12). Bu hesaplamaların sonucunda elde edilen Sinyal gürültü oranları ve ortalama TFM değeri verilmiştir. Aynı parametreler kullanılarak deney düzeneği oluşturulmuş ve 3 tekrarlı olacak şekilde gözlem yapılmıştır

Tablo 5.12 Doğrulama deneyleri sonuçları

	S/N	Hesaplanan Değer (mgGAE/g)	Gözlem Sonuçları (mg/g)	P değeri
Hibiskus	32,3676	31,67	29,22±3,11	0,306
Aspir	11,63	3,46	3,32±0,05	0,040
Hatmi Çiçeği	16,2375	4,9	4,36±3,61	0,820
Aynısefa	36,2292	49	44±1,96	0,048

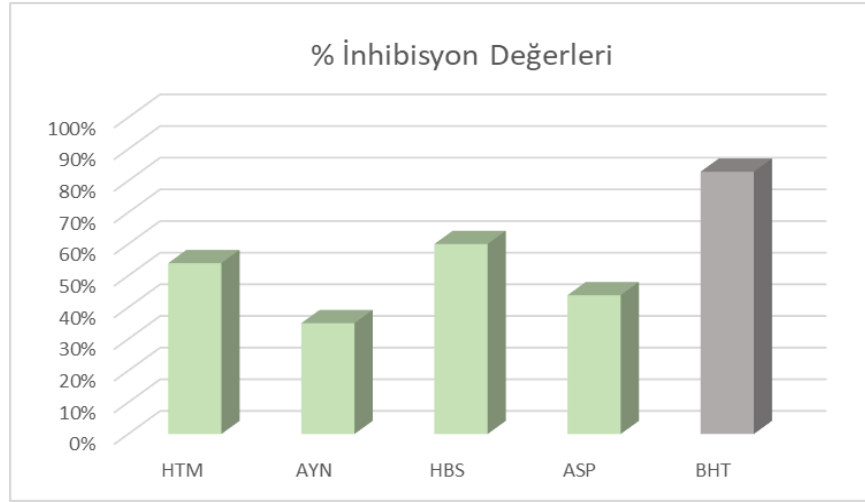
(Değerler ortalama±standart sapma olarak verilmiştir (n=3))

Gözlem sonuçları ve beklenen optimum değerler %95 güven aralığında istatistiksel olarak analiz edilmiş ve tablo 5.12'de sunulmuştur. P değerleri incelendiğinde hibiskus ve hatmi çiçeği beklenen değerlere yakın sonuçlar vermiş ve istatistiksel olarak farklılık anlamsızdır. Aspir ve aynısefa bitkisi için programın hesaplamış olduğu değerler ve gözlem sonuçları arasında anlamlı farklılıklar olduğu sonucuna

varılmıştır. Bu durumda bizim belirlediğimiz faktörlerin dışında ekstraksiyon parametrelerinin etkisi var olduğu söylenebilir.

5.3. DPPH Sonuç

Optimum parametrelerle hazırlanan ekstraktların % inhibisyon değerleri ve EC₅₀ değerleri aşağıda verildiği gibidir.



Şekil 5.7. Bitkilerin ve BHT standardının % inhibisyon grafiği

EC₅₀ değeri ne kadar düşükdpph radikalini süpürme aktivitesi o kadar yüksek olmaktadır. Hem grafik hem de tablo değerlerine bakıldığında DPPH giderim aktivitesi sıralaması hibiskus>hatmi>aspir>aynısefa şeklindedir. Standart antioksidan maddeye kıyasla ise bitki ekstraktlarının inhibisyon değerleri daha düşüktür.

Tablo 5.13 Bitkilerin EC₅₀ değerleri

BİTKİ	EC ₅₀ (µg/ml)
Hatmi	38,53±0,21
Aynısefa	49,62±3,44
Hibiskus	30,69±5,23
Aspir	59,76±1,06
BHT	13,63±0,83

Permana ve ark. çalışmasında aspir çiçeği için $48.75 \pm 3.42 \mu\text{g/mL}$ ve Golkar ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada ise $51,33 \mu\text{g/ml}$ EC50 değerleri bulunmuştur [60]. Çalışmamızda bulduğumuz $59,76 \pm 1,06 \mu\text{g/ml}$ değeri bu değer ile paralellik göstermiş olsa da antioksidan kapasitesi daha düşüktür.

Ebrahimzadeh ve arkadaşlarının hibiskus bitkisi ile yaptığı çalışmada EC50 $13.49 \pm 1.04 \mu\text{g/ml}$ olarak rapor edilmiştir. Bizim çalışmamızda bulunan antioksidan kapasitesine göre yüksek bir değerdir [54].

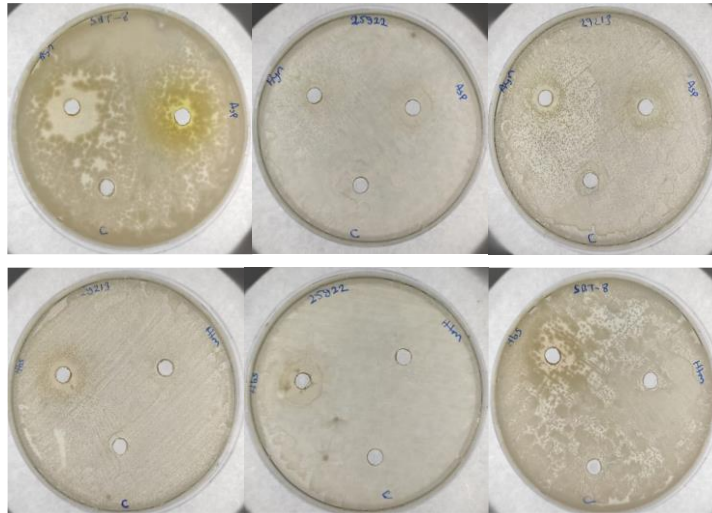
Hatmi çiçeği için yapılan çalışmada $35.67 \pm 0.11 - 38.11 \pm 0.15 \mu\text{g/ml}$ arasında değişen DPPH aktivite değerleri bizim çalışmamızda bulunan $38.53 \pm 0,21 \mu\text{g/ml}$ EC₅₀ değeri ile uyumludur [55].

Rigana G. Tarafından yapılan çalışmada aynısefa bitkisinin çiçekleri için antioksidan aktivite (DPPH) $35 \pm 0.02 \mu\text{g/ml}$ olarak raporlanmıştır [56].

Erçetin'nin çalışmasında da aynısefa bitkisi çiçeklerinin ve yapraklarının Su ile hazırlanan ekstraktın metanol ve diğer çözücülere kıyasla daha düşük inhibisyon sağladığı sonucuna varılmıştır [57]. Bu durumda distile su toplam fenolik madde miktarı için optimum değeri verem bir parametre olsa da antioksidan aktivite için daha az etkili bir parametre olduğu düşünülebilir.

5.4. Antibakteriyel Aktivite Sonuçları

Her bitki için 3 farklı bakteri suşunda antibakteriyel analiz gerçekleştirilmiş ve sonuçlar şekil 5.8.'de sunulmuştur.



Şekil 5.8. Antibakteriyel test sonucunda inhibisyon zonları

Bakteri suşlarına ait inhibisyon zon çapları Tablo 5.14.'de verildiği gibidir.

Tablo 5.14. Antibakteriyel analiz sonuçları

Bakteri Suşu	Aynısefa (AYN)	Aspir (ASP)	Hibiskus(HBS)	Hatmi (HTM)
<i>Bacillus cereus</i> (SBT8)	20 mm	9 mm	10 mm	-
<i>Staphylococcus aureus</i> (29213)	10 mm	9 mm	12 mm	-
<i>Escherichia coli</i> (25922)	-	-	-	-

Aynısefa bitkisinin *S. aureus* bakterisine inhibisyon çapı 9 mm olarak bulunmuştur.

Aynısefa bitkisinin su, etanol, kloroform çözücülerıyla hazırlanan ekstraktları hazırlanıp Chakraborty tarafından yapılan çalışmada antibakteriyel çalışmada kullanılmıştır. Bu çalışmada sulu ekstraktın zon çapı 12 mm iken, etanol ile hazırlanan ekstraktın zon çapı 13 mm olarak rapor edilmiştir.

Değişen konsantrasyonlarda (50-100 mg/ml) aynısefa bitkisi ile hazırlanan etanol ekstraktları *S. aureus* için 6-14 mm inhibisyon zonu oluştururken *E. Coli* için ise 12-15 mm arasında zon çapı oluşturmuştur [58].

Etanolün çözücü olarak kullanıldığı bir başka çalışmada ise *B.cereus* için 28 mm zon çapı rapor edilmiştir [59].

Aspir çiçeğinin antibakteriyel etkisini araştırmak için 10 mg/ml olarak hazırlanan ekstraktlarda *B.cereus* için $10\text{mm}\pm 5\text{ mm}$ ve *S.aureus* için $9,8\pm 0.0\text{ mm}$ zon çapı rapor edilmiştir [60].

Hibiskus için yapılan antibakteriyel çalışmalarda metanol ve su kullanılmış ve inhibisyon çapları sulu ekstrakt için *S. aureus* 40 mm, *E. Coli* 40 mm; metanol içeren ekstrakt için *S. aureus* 20 mm, *E. Coli* 46 mm olarak bulunmuştur [61].

Şekil 5.8. ve Tablo 5.14.'te görüldüğü gibi hatmi çiçeği hiçbir bakteri için inhibisyon sağlayamamıştır.

Al-snafi'nin yaptığı çalışmada metanol ile hazırlanan bitki ekstraktlarının bakteriler üzerinde inhibe edici etkilerinin daha yüksek olduğunu rapor etmiştir [62]. Bu çalışmada hatmi çiçeğinin çözücüsünün su olması ve diğer çalışmalara kıyasla daha düşük konsantrasyona sahip olması etki göstermemesine neden olduğu düşünülebilir.

Daha önceki çalışmalar ile kıyaslandığında kısmen uyumlu olsa da bu tezde bulunan inhibisyon değerleri daha düşük olarak saptanmıştır.

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Günümüzde rekabetin artmasıyla, maliyet ve zaman kaynakları daha önemli hale gelmiştir. Kaliteli ürünlerin işlenmesi proseslerdeki iyileştirme ve optimizasyon işlemleri ile mümkündür. İyileştirme işlemleri sırasında proseslerdeki ölçülebilen ya da ölçülemeyen çok sayıda girdi faktörü bulunmaktadır. Bu sebeple faktörlerin etkilerinin sonuçlarını öngörebilmek amacıyla deney tasarımı yöntemleri tercih edilir.

Temel felsefesi proses tasarlama sırasında iyileştirme sağlayan Taguchi metodu istatistiksel deney tasarımı yöntemlerinden biridir. Bu metot için sinyal gürültü oranı adı verilen istatistik tanımlanmıştır. S/N oranları sayesinde her faktörün sonuç üzerindeki etkilerini açıklamak kolaylaşır.

Bu tezde deney tasarımı 4 faktör ve 3 seviye olacak şekilde L₉ ortogonal dizi kullanılarak modellenmiştir. Dört farklı bitki kullanılmış ve fenolik madde ekstraktı için parametrelerin etkisi incelenmiştir. Tüm bitkiler için çözücü faktörünün ekstraksiyon işlemi üzerine etkisi diğer parametrelere göre yüzdesel olarak fazladır. Çözücüdeki değişimin etkisinin fazla olması diğer parametrelerin etkilerini istatistiksel olarak anlamsız bulunmasına neden olmuş olabilir. Bu sebeple işlem için çözücü faktörü çıkarılarak ya da bu faktörün ekstraksiyon işlemi için etkili başka bir faktör ile değiştirilmesiyle modelleme tekrarlanabilir.

Taguchi metodu parametre etkilerinin anlaşılmasını kısa sürede sağlamış olsa da yalnızca seçilen seviyeler ile kısıtlı bilgi edinilmektedir. Çalışmada elde ettiğimiz sonuçlar Sıcaklık ve süre parametrelerindeki artışın ekstraksiyon işlemi için negatif etki yarattığını göstermiştir. Enerji ve zaman iyileştirilmesi açısından optimum değerlere yakın ve daha dar bir aralıkta seviyeler yeniden belirlenebilir. Bu sayede optimum değer daha kesin bir şekilde elde edilebilir.

Antioksidan ve antibakteriyel kapasite analiz sonuçları, literatür tarama sonucu elde edilen bilgilere bakılarak yetersiz olduğu bulunmuştur. Modellenen işlemde fenolik madde için optimum değeri bulma hedeflenmiştir. Fenolik madde miktarının optimum

düzeyde olması antioksidan ve antibakteriyel kapasite için aynı etkiyi sağlamamaktadır. Bu sebeple her modelleme beklenen sonuca göre oluşturulmalıdır.

KAYNAKLAR

- [1] Özel M.B., 2021, Taguchi Yöntemi ile Harnuptan Şeker Ekstraksiyonunun Deneysel İncelenmesi, Yüksek Lisans Tezi, T.C. Sakarya Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, SAKARYA.
- [2] Antony, J., Perry, D., Wang, C., Kumar, M., 2006, An Application of Taguchi Method of Experimental Design for New Product Design and Development Process, Assembly Automation, 18-24
- [3] Yıldız Ü.G., 2021, Çok Yanıtlı Taguchi Optimizasyonunda Roc-Codas Yaklaşımı Yüksek Lisans Tezi, Karadeniz Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, TRABZON.
- [4] Peace, G.S., 1992. Taguchi Methods, A Hands-On Approach, Addison-Wesley Publishing Company, inc.ISBN 0-201-56311-8.
- [5] Bryne, D. M. Ve Taguchi, S. 1986. The Taguchi Approach to Parameter Design, ASQC Quality Congress Transactions, Anaheim.
- [6] Ataş B., 2021, Atık Demir Tozu İlaveli Harçların Taguchi Metoduyla İstatistiksel Analizinin Yapılması, Yüksek Lisans Tezi, Fırat Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, ELAZIĞ.
- [7] Antony, J., 2014, Design of Experiments for Engineers and Scientists: Elsevier Science & Technology Books.
- [8] Shahidi, F., Naczki, M., 1995. Food Phenolics, Chemistry, Effects, Applications. Technomic, USA.
- [9] Zhen J., Villani T.S., Guo Y., 2015, Phytochemistry, Antioxidant Capacity, Total Phenolic Content And Anti-Inflammatory Activity Of *Hibiscus sabdariffa* Leaves, Food Chemistry 190, 673-680.
- [10] Yücelen S.D., Nar Kabuğundan Fenolik Bileşiklerin Farklı Ekstraksiyon Yöntemleri ile Eldesi, Yüksek Lisans Tezi, T.C. Ankara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, ANKARA.
- [11] Lattanzio, V., 2013 Phenolic Compounds: Introduction, Natural Products: Phytochemistry, Botany and Metabolism of Alkaloids, Phenolics and Terpenes, 1543-1580.
- [12] Tartıcı R., 2020, Brokoliden (*Brassica oleracea* L. var. *italica*) Fenolik Madde Ekstraksiyonu Yöntem Ve Koşullarının Optimizasyonu
- [13] Günter Ü., 2018, Çeşitli Bitki Ekstrelerinin Antibakteriyel Aktivitelerinin Araştırılması, T.C Selçuk Üniversitesi Sağlık Bilimleri, Yüksek Lisans Tezi, KONYA.
- [14] Carrera C., Ruiz-Rodríguez A., Palma M., Barroso C.G., "Ultrasound assisted extraction of phenolic compounds from grapes", Anal Chim Acta 732, 100-104, 2012.

- [15] Şengül M. ve Topdaş E.F., “Katı-Sıvı Ekstraksiyonunda Kullanılan Modern Teknikler ve Bu Teknikler Arasında Ultrason Yardımlı Ekstraksiyonun Yeri”, Atatürk Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi 50 (2), 201-216, 2019.
- [16] Nabavi S.M., Silva A.S., 2022, Antioxidants Effects in Health, Elsevier, <https://doi.org/10.1016/C2018-0-04484-9>
- [17] Dahi S., 2020, Farklı Ekstraksiyon Yöntemleri Kullanarak Kırmızı Pancardan Sıvı ve Toz Renk Maddesi Elde Edilmesinin Optimizasyonu, Doktora Tezi, T.C. Erciyes Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, KAYSERİ.
- [18] Moser, C., Jaqueline, P., Barboza, G., Amanda, J., Mizuta, G., 2021, Comparative Studies On Chemical Stability , Antioxidant And Antimicrobial Activity From Hot And Cold Hibiscus (Hibiscus sabdariffa L .) Calyces Tea Infusions. Journal of Food Measurement and Characterization, 15(4), 3531–3538.
- [19] Dinçer C., Çınar A., 2021, Farklı Mikrodalga Güç Seviyelerinde ve Farklı Fırın Sıcaklıklarında Kurutulan Hibiskus Çanak Yapraklarının Kuruma Karakteristiklerinin ve Bazı Fizikokimyasal Özelliklerinin Belirlenmesi, The Journal of Food 46(3), 647-659.
- [20] Haji A., Berktaş S., 2021, Hibiskus (Hibiscus sabdariffa L.) Ekstraktı Tozu ile Soğuk Çay Üretimi: Antioksidan Aktivite ve Duyusal Özellikler, Avrupa Bilim ve Teknoloji Dergisi 31, 831-836.
- [21] Eyiz V., Tontul İ., Farklı Demleme Yöntemlerinin Soğuk Hibiskus Çayının Bazı Fiziksel ve Biyoaktif Özellikleri Üzerine Etkisi, Journal of Science and Technology 13(2), 779-787.
- [22] Chumsri P., Sirichote A., Itharat A., 2008, Studies On The Optimum Conditions For The Extraction And Concentration Of Roselle (*Hibiscus sabdariffa* Linn.) Extract, Songklanakarın Journal of Science and Technology 30(1), 133-139.
- [23] Demirci-Kayıran SD, 2019. A research on the present uses of the medicinal plants in De Materia Medica written by Dioscorides in eastern mediterranean region. Lokman Hekim Dergisi, 9 (2): 189-202.
- [24] Lin J, Opoku AR, Geheeb-Keller M, Hutchings AD, Terblanche SE, Jager AK, Van Staden J., 1999, Preliminary screening of some traditional zulu medicinal plants for antiinflammatory and anti-microbial activities. Journal of Ethnopharmacol 68, 267–27
- [25] Bonjar Sb., 2004, Evaluation of antibacterial properties of some medicinal plants used. Iran Journal of Ethnopharmacol 94, 301-305.
- [26] Xue T., Yang Y., 2022, Evaluation Of Antioxidant, Enzyme İnhibition, Nitric Oxide Production İnhibitory Activities And Chemical Profiles Of The Active Extracts From The Medicinal And Edible Plant: Althaea Officinalis Food Resarch International 156.
- [27] Farhat C., Younes H., 2022, Chemical characterization and in vitro biological evaluation of aqueous extract of *Althaea officinalis* L. flower grown in Lebanon, Journal of Herbal Medicine 34.

- [28] Ewals E.A., In Vitro Antioxidant Activity And Some Biochemicals Aspects of The Developing Flowers (Pink And White) of Marshmallow (*Althaea Officinalis L.*) In Response To Biotin And Set of Amino Acids, Egypt. J. Biotechnol 57, 176-191.
- [29] Biçen G., 2020, Çukurova Koşullarında Farklı Dikim Zamanlarının Aynısefa (*Calendula officinalis L.*)' nın Çiçek ve Tohum Verimlerine Etkisi, Yüksek Lisans Tezi, Çukurova Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, ADANA.
- [30] Kerwanchi Z.N.L, 2021, Tuz Stresi Koşullarında Aynısefa (*Calendula officinalis L.*) Bitkisinde Morfolojik ve Fizyolojik Özellikler ve İlişkileri, Yüksek Lisans Tezi, Çukurova Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, ADANA
- [31] Sobati-Nasab Z., Alirezalu A., Noruzi P., 2021, Effect of Foliar Application of Nickel On Physiological And Phytochemical Characteristics of Pot Marigold (*Calendula officinalis*), Journal of Agriculture and Food Resarch.
- [32] Ayran İ. 2017, Konya Ekolojik Şartlarında Kültürü Yapılan Aynısefa (*Calendula officinalis L.*) Bitkisinin Farklı Ekim Zamanlarının Agronomik Özellikleri Üzerine Etkisinin Belirlenmesi, Yüksek Lisans Tezi, T.C. Selçuk Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, KONYA
- [33] Özdemir F., Aymelek F., Karataş F., 2015, Aspir Bitkisinde Redükte, Okside Glutasyon ile A, C, E Vitamini ve β -karoten Miktarlarının Araştırılması. Fırat Üniversitesi Fen Bilimleri Dergisi 23, .65-71.
- [34] Yu S.Y., Lee Y.J., Kim J.D., Phenolic Composition, Antioxidant Activity and Anti-Adipogenic Effect of Hot Water Extract from Safflower (*Carthamus tinctorius L.*) Seed. Nutrients 12, 4894-4907.
- [35] Yolci M.S., Tunçtürk R., Tunçtürk M., 2022, Farklı Ekstraksiyon Çözücülerini Kullanılarak Aspir (*Carthamus tinctorius L.*) Çiçeklerinin Toplam Fenol, Flavonoid Miktarları ve Antioksidan Aktivitesinin Belirlenmesi, International of Life Sciences and Biotechnology 5(1), 97-109.
- [36] Kuşoğlu E., 2015, Aspir (*Carthamus tinctorius L.*) Bileşiklerinin ve Antioksidan Aktivitesinin Tayini, T.C. İstanbul Aydın Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, İSTANBUL.
- [37] Özdemir İ., 2018, Enstitüsü Kesirli Faktöriyel Tasarım ve Taguchi Yönteminin Kompozit Malzeme Üretimi Üzerine Uygulanması, Doktora Tezi, T.C. Ondokuz Mayıs Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, SAMSUN.
- [38] Ataş B., 2021, Atık Demir Tozu İlaveli Harçların Taguchi Metoduyla İstatistiksel Analizinin Yapılması, Yüksek Lisans Tezi, Fırat Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, ELAZIĞ.
- [39] Atar E.Ş., 2021, Taguchi Yönteminin Sağlık Araştırmalarında Uygulanabilirliği, Yüksek Lisans Tezi, Süleyman Demirel Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Biyoistatistik ve Tıbbi Bilişim Anabilim Dalı, ISPARTA
- [40] Yalçındağ Y., 2021, Gıda İşletmelerinde Taguchi Yöntemi ile Süreç İyileştirme ve Bir Uygulama, Yüksek Lisans Tezi, T.C. Pamukkale Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, DENİZLİ.

- [41] Baynal K., Gencel İ., 2015, Taguchi Yönteminin Gıda Sektöründe Çok Yanıtlı Problemin En İyilemesinde Uygulanması, SAÜ Fen Bilimleri Dergisi Vol: 19, s. 107-121.
- [42] Küçük, Ö., Kocakerim, M.M., Çopur, M. & Yartaşı, A. (2005). Optimization Of Dissolution Of Ulexite In (NH₄)₂SO₄ Solutions. Canadian Metallurgical Quarterly, 44(1), 53- 58.
- [43] Montgomery, D. C. (1991). Design and Analysis of Experiments, ABD: John Wiley & Sons Inc.
- [44] İç, Y. T. ve Yıldırım, S. 2012. Çok Kriterli Karar Verme Yöntemleriyle Birlikte Taguchi Yöntemini Kullanarak Bir Ürünün Tasarımının Geliştirilmesi. Gazi Üniversitesi Mühendislik ve Mimarlık Fakültesi Dergisi, 27: 2, 447-458
- [45] Kasman, Ş. (2009). Lazer Mikro İşleme Parametrelerinin Yüzey Kalitesine Etkisinin Deney Tasarım Yöntemiyle Belirlenmesi. 5. Uluslararası İleri Teknoloji Sempozyumu (IATS'09), 13-15 Mayıs, Bildiri Özetleri Kitabı, 1389-1393, Karabük, Türkiye.
- [46] Blois M. S., Antioxidant determinations by the use of a stable free radical, Nature, 1958; 181: 1199–1200.
- [47] Kandemir C., 2019, Bazı Sentetik Bileşiklerin Antioksidan ve Antibakteriyal Özelliklerin İncelenmesi, T.C. Sakarya Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi, SAKARYA
- [48] Singleton, V.L., Orthofer, R. And Lamuela-Raventos, R.M., 1999, Analysis Of Total Phenols And Other Oxidation Substrates And Antioxidants By Means Of Folin-Ciocalteu Reagent, Oxidants And Antioxidants 299, 152-178.
- [49] Özpeynirci A., 2022, Aspir (*Carthamus Tinctorius L.*) Bitki Çiçeklerinden Elde Edilen Doğal Sarı Renk Pigmentinin Adsorbsiyon Kromatografisi İle Saflaştırılması Ve Bazı Gıdalarda Renklendirici Olarak Kullanım Olanaklarının Araştırılması, Karamanoğlu Mehmetbey Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, KARAMAN.
- [50] Golkar P., Taghizadeh M., 2018, In Vitro Evaluation Of Phenolic And Osmolite Compounds, Ionic Content, And Antioxidant Activity İn Safflower (*Carthamus Tinctorius L.*) Under Salinity Stress, Plant Cell, Tissue And Organ Culture (PCTOC) 134, pages357–368.
- [51] Filipovic V., Ugrenovic V., 2023, Productivity And Flower Quality Of Different Pot Marigold (*Calendula Officinalis L.*) Varieties On The Compost Produced From Medicinal Plant Waste, Industrial Crops & Products 192.
- [52] Ćetković G.S., 2004, Antioxidant properties of marigold extracts, Food Resarch International 37(7), 643-650.
- [53] Permana D., Sam A., 2023, Solid Lipid Nanoparticles Cyclodextrin-Decorated Incorporated Into Gellan Gum-Based Dry Floating İn Situ Delivery Systems For Controlled Release Of Bioactive Compounds Of Safflower (*Carthamus Tinctorius. L.*): A Proof Of Concept Study İn Biorelevant Media, International Journal Of Biological Macromolecules 237.

- [54] Ebrahimzadeh M.A., Nabavi S.F., 2010, Antihypoxic and antioxidant activity of *Hibiscus esculentus* seeds, *Grasas Y Aceities* 61(1), 30-36.
- [55] Topdaş E.F., 2022, Bazı Bitkilerden Elde Edilen Liyofilize İnfüzyonlarda Demleme Süresi Faktörünün Antioksidan Özellikler ve Ağır Metal Kompozisyonu Üzerine Etkisi, *Iğdır Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi*, 12(2): 769-790.
- [56] Rigane G., Younes S., Investigation into the biological activities and chemical composition of *Calendula officinalis* L. growing in Tunisia, *International Food Resarch Journal* 20(6), 3001-3007.
- [57] Erçetin T., Senol F.S., 2012 Comparative assessment of antioxidant and cholinesterase inhibitory properties of the marigold extracts from *Calendula arvensis* L. and *Calendula officinalis* L., *Industrial Crops and Products* 36, 203-208.
- [58] Hamad M.N., Mohammed H.J., 2010, Antibacterial Activity of *Calendula Officinalis* Flowers In Vitro, Department of Clinical Laboratory Sciences, College of Pharmacy, University Of Baghdad.
- [59] Çetin B., Kurtuluş B., 2017, Antibacterial activities of *Calendula officinalis* callus extract, *International Journal of Secondary metabolite* 4(3), 257-263.
- [60] Salem N., Msaada K., 2014, Effect of salinity on plant growth and biological activities of *Carthamus tinctorius* L. extracts at two flowering stages, *Acta Physiol plant* 36, 433-445.
- [61] Al-Hashimi A.G., 2012, Antioxidant and antibacterial activities of *Hibiscus sabdariffa* L. extracts, *African Journal of Food Science* 6(21), 506-511.
- [62] Al-Snafi A.E., 2015, Therapeutic Properties of Medicinal Plants: A Review Of Their Antibacterial Activity, *International Journal of Pharmacy & Therapeutics* 6(3), 137-158

ÖZGEÇMİŞ

Ad-Soyad :Merve ÇALIŞ

ÖĞRENİM DURUMU:

- **Lisans** : Ege Üniversitesi, Gıda Mühendisliği
- **Yükseklisans** : Sakarya Üniversitesi, Kalite Yönetimi(Tezsiz)
- **Yükseklisans** : Sakarya Üniversitesi, Biyokimya