

T.C  
FIRAT ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ



FARKLI BİTKİ BÜYÜME DÜZENLEYİCİLERİYLE  
STİMULE EDİLEN  
OĞUL OTU (*Melissa officinalis* subsp. *officinalis* L.)  
KALLUS KÜLTÜRLERİNİN ANTİOKSİDAN  
KAPASİTESİNİN BELİRLENMESİ

Zümre DEMİR

Yüksek Lisans Tezi  
Biyomühendislik Anabilim Dalı  
Danışman: Dr. Öğr. Üyesi Aykut TOPDEMİR

ELAZIĞ-2018

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

**FARKLI BİTKİ BÜYÜME DÜZENLEYİCİLERİYLE STİMULE EDİLEN OĞUL OTU**  
**(*Melissa officinalis* subsp. *officinalis* L.)**  
**KALLUS KÜLTÜRLERİNİN ANTİOKSİDAN KAPASİTESİNİN BELİRLENMESİ**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**Zümre DEMİR**  
**141132113**

**Tezin Enstitüye Verildiği Tarih : 15 Mayıs 2018**  
**Tezin Savunulduğu Tarih : 4 Haziran 2018**

**Tez Danışmanı : Dr.Öğr. Üyesi Aykut TOPDEMİR (F.Ü)**  
**Diğer Jüri Üyeleri : Prof. Dr. Muhammet Şaban TANYILDIZI (F.Ü)**  
**Doç. Dr. Şükrü HAYTA (B.E.Ü)**



**HAZİRAN-2018**

## ÖNSÖZ

Yüksek lisans tezimin seçilmesi, yürütülmesi aşamasında her türlü yardımını ve desteğini eksik etmeyen değerli danışman hocam Dr. Öğr. Üyesi Aykut TOPDEMİR'e teşekkürlerimi sunarım.

Çalışmalarım sırasında bilgi birikimi, tecrübesi ve yardımlarını esirgemeyen değerli hocam Doç. Dr. Nazmi GÜR'e teşekkürlerimi sunarım.

Çalışmalarımın yürütülmesinde laboratuvar araç gereç ve teçhizatlarının kullanılmasında her türlü imkanı sağlayan Biyomühendislik Bölümü' ne teşekkür ederim.

Tez çalışmam boyunca her türlü yardım ve desteklerini eksik etmeyen değerli arkadaşım Yük. Müh. Ayça ŞAHİNALP'e ve diğer laboratuvar arkadaşlarıma çok teşekkür ederim.

Her zaman yanımda olup, her türlü desteklerini ve sevgilerini gösteren değerli aileme sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Zümre DEMİR  
Elazığ-2018

## İÇİNDEKİLER

|                                                                 | Sayfa No |
|-----------------------------------------------------------------|----------|
| ÖNSÖZ .....                                                     | i        |
| İÇİNDEKİLER.....                                                | ii       |
| ŞEKİLLER LİSTESİ .....                                          | vi       |
| TABLolar LİSTESİ .....                                          | vii      |
| SEMBOLLER LİSTESİ .....                                         | viii     |
| 1. GİRİŞ.....                                                   | 1        |
| 1.1. Sekonder Metabolitler.....                                 | 7        |
| 1.2. Antioksidanlar.....                                        | 9        |
| 1.2.1. Doğal antioksidanlar .....                               | 12       |
| 1.2.2. Sentetik antioksidanlar .....                            | 14       |
| 1.3. Fenolik Bileşikler.....                                    | 14       |
| 1.4. Flavonoidler .....                                         | 15       |
| 2. MATERYAL VE METOT .....                                      | 18       |
| 2.1. Materyal .....                                             | 18       |
| 2.1.1. Bitki Materyali .....                                    | 18       |
| 2.1.2. Kullanılan Cihaz ve Malzemeler.....                      | 18       |
| 2.1.3. Kullanılan Çözeltiler .....                              | 19       |
| 2.2. Metot.....                                                 | 20       |
| 2.2.1. Bitkilerin Sterilizasyonu.....                           | 20       |
| 2.2.2. Ortam ve Malzeme Sterilizasyonu .....                    | 20       |
| 2.2.3. Besi Ortamının Hazırlanması ve Bitkilerin Aktarımı ..... | 20       |
| 2.2.4. Kallus Gelişimi.....                                     | 22       |
| 2.2.5. Kallus Ekstraksiyonu.....                                | 22       |
| 2.2.6. Toplam Fenolik Madde Analizi .....                       | 23       |
| 2.2.7. Toplam Flavonoid Analizi .....                           | 23       |

|                                          |           |
|------------------------------------------|-----------|
| 2.2.8. Antioksidan Kapasite Analizi..... | 24        |
| 2.2.9. İstatiksel Veriler .....          | 25        |
| <b>3. BULGULAR .....</b>                 | <b>26</b> |
| 3.1. Toplam Fenolik Madde Analizi .....  | 26        |
| 3.2. Toplam Flavonoid Analizi .....      | 29        |
| 3.3. Antioksidan Kapasite Analizi .....  | 32        |
| 3.4. Ana Bitkiye Ait Bulgular .....      | 35        |
| <b>4. SONUÇLAR ve TARTIŞMA .....</b>     | <b>37</b> |
| <b>KAYNAKLAR.....</b>                    | <b>42</b> |
| <b>EKLER .....</b>                       | <b>51</b> |
| <b>ÖZGEÇMİŞ .....</b>                    | <b>53</b> |

## ÖZET

Bu çalışmanın amacı, in vitro kültürde farklı bitki büyüme düzenleyici kombinasyonlarının takviyesinde yetiştirilen *Melissa officinalis* subsp. *officinalis* L. kalluslarının fenolik ve antioksidan özelliklerini belirlemektir. Eksplant kaynağı olarak *Melissa officinalis* subsp. *officinalis* L. nodları kullanılmıştır. Nodlar Murashige Skoog besiyerinde kallus oluşumu için farklı bitki büyüme düzenleyici kombinasyonları ile teşvik edilmiştir. Sonuçta oluşan kalluslarda en yüksek fenolik madde miktarı etanol ekstralarında  $1.523 \pm 0.117$  mg GAE/g ile 1.5 mg/L 2,4-D + 0.5 mg/L BAP ile teşvik edilen kallusta tespit edilmiştir.  $1.178 \pm 0.064$  mg GAE/g ile en düşük fenolik madde ise 2 mg/L 2,4-D + 0.5 mg/L BAP içeren kültür ortamındaki kallus etanol ekstralarında görülmüştür. Kallus su ekstralarında ise en yüksek toplam fenolik madde içeriği  $1.288 \pm 0.075$  mg GAE/g olarak 1.5 mg/L PIC + 0.5 mg/L BAP içeren ortamda elde edilmiştir. En düşük toplam fenolik içeriği ise,  $0.699 \pm 0.035$  mg GAE/g olarak 1.5 mg/L 2,4-D + 1 mg/L PIC + 0.5 mg/L KIN ortamındaki kallus su ekstresinden elde edilmiştir. Flavonoid miktarı, en yüksek  $4.392 \pm 0.368$  mg kuersetin/g olarak 2 mg/L PIC + 0.5 mg/L BAP ortamında yetiştirilen kallus etanol ekstralarında tespit edilmiştir. Flavonoid miktarı en düşük  $2.709 \pm 0.157$  mg kuersetin/g olarak 1.5 mg/L 2,4-D + 1 mg/L PIC + 0.5 mg/L KIN ortamındaki kallus etanol ekstralarında görülmüştür. Kallus su ekstralarında toplam flavonoid içeriği en yüksek  $1.387 \pm 0.095$  mg kuersetin/g olarak 1 mg/L 2,4-D + 0.5 mg/L BAP kombinasyonunda, en düşük  $0.930 \pm 0.047$  mg kuersetin/g olarak 1.5 mg/L 2,4-D + 0.5 mg/L BAP kombinasyonunda tespit edilmiştir. Son olarak kallusların antioksidan kapasitesi, ABTS yöntemi ile belirlenmiş ve sonuçlar “TEAC (troloks eşdeğer antioksidan kapasite) eşdeğeri” olarak verilmiştir. En yüksek antioksidan kapasite etanol ekstralarında  $14.61 \pm 1.14$  mmol/g olarak, 1.5 mg/L 2,4-D + 1 mg/L PIC + 0.5 mg/L KIN ile indüklenmiş kalluslarda, en düşük ise  $7.66 \pm 0.51$  mmol/g olarak, 1.5 mg/L 2,4-D + 0.5 mg/L BAP ile indüklenmiş kalluslardan elde edilmiştir. Antioksidan kapasite su ekstralarında en yüksek  $9.15 \pm 0.74$  mmol/g olarak 1 mg/L 2,4-D + 1 mg/L PIC + 0.5 mg/L KIN BBD kombinasyonunda, en düşük  $2.42 \pm 0.14$  mmol/g olarak 2 mg/L PIC + 0.5 mg/L BAP BBD kombinasyonunda tespit edilmiştir.

**Anahtar kelimeler:** *Melissa officinalis* subsp. *officinalis* L., kallus, fenolik madde, flavonoid, antioksidan

## SUMMARY

### **Determination of Antioxidant Capacity of Bee Balm (*Melissa officinalis* subsp. *officinalis* L.) Kallus Cultures Stimulated with Different Plant Growth Organizations**

The aim of this study is to determine the phenolic and antioxidant properties of *Melissa officinalis* subsp. *officinalis* L. calli cultured in combination with different plant growth regulator combinations in vitro. *Melissa officinalis* subsp. *officinalis* L. nodules were used as explant source. Nodules were promoted with different plant growth regulator combinations for callus formation in Murashige Skoog medium. In the resulting callus, the highest amount of phenolic substance was found in ethanol extracts with  $1.523 \pm 0.117$  mg GAE/g and 1.5 mg/L 2,4-D + 0.5 mg/L BAP induced callus.  $1.178 \pm 0.064$  mg GAE/g and the lowest phenolic substance in callus ethanol extracts in culture medium containing 2 mg/L 2,4-D + 0.5 mg/L BAP. The highest total phenolic content in callus water extracts was obtained in the medium containing 1.5 mg/L PIC + 0.5 mg/L BAP as  $1.288 \pm 0.075$  mg GAE/g. The lowest total phenolic content was  $0.699 \pm 0.035$  mg GAE/g in callus water extract at 1.5 mg/L 2,4-D + 1 mg/L PIC + 0.5 mg/L KIN medium. The amount of flavonoid was detected in callus ethanol extracts grown at 2 mg/L PIC + 0.5 mg/L BAP medium as the highest  $4.392 \pm 0.368$  mg quercetin/g. The amount of flavonoids was found in callus ethanol extracts at KIN of 1.5 mg/L 2,4-D + 1 mg/L PIC + 0.5 mg/L as the lowest  $2.709 \pm 0.157$  mg quercetin/g. The highest total flavonoid content in callus water extracts was  $1.387 \pm 0.095$  mg quercetin/g in combination with 1 mg/L 2,4-D + 0.5 mg/L BAP, the lowest  $0.930 \pm 0.047$  mg quercetin/g in 1.5 mg/L 2,4-D + 0.5 mg/L BAP combination. Finally, the antioxidant capacity of callus was determined by the ABTS method and the results were given as "TEAC (troboxy equivalent antioxidant capacity) equivalent". The highest antioxidant capacity was  $14.61 \pm 1.14$  mmol/g in ethanol extracts, 1.5 mg/L in 2,4-D + 1 mg/L PIC + 0.5 mg/L KIN induced callus and lowest as  $7.66 \pm 0.51$  mmol/g in 1.5 mg/L 2,4-D + 0.5 mg/L BAP induced calli. The highest antioxidant capacity in water extracts was found to be the highest in the BBD combination of 1 mg/L 2,4-D + 1 mg/L PIC + 0.5 mg/L KIN as  $9.15 \pm 0.74$  mmol/g, the lowest as  $2.42 \pm 0.14$  mmol/g in 2 PIC + 0.5 mg/L BAP BBD combination.

**Key Words:** *Melissa officinalis* subsp. *officinalis* L., callus, phenolic substance, flavonoid, antioxidant

## ŞEKİLLER LİSTESİ

|                                                                                                             | <u>Sayfa No</u> |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------|
| Şekil 1.1. Rosmarinik asitin kimyasal yapısı .....                                                          | 3               |
| Şekil 1.2. Karotenoidlerin yapısı.....                                                                      | 12              |
| Şekil 1.3. $\alpha$ -Tokoferolun yapısı.....                                                                | 13              |
| Şekil 1.4. Askorbik asidin yapısı.....                                                                      | 13              |
| Şekil 3.1. Kallus etanol ekstrelerindeki fenolik maddelerin BBD'lere göre karşılaştırma grafiği .....       | 27              |
| Şekil 3.2. Kallus su ekstrelerindeki fenolik maddelerin BBD'lere göre karşılaştırma grafiği .....           | 29              |
| Şekil 3.3. Kallus etanol ekstrelerindeki toplam flavonoid içeriğın BBD'lere göre karşılaştırma grafiği..... | 30              |
| Şekil 3.4. Kallus su ekstrelerindeki toplam flavonoid içeriğın BBD'lere göre karşılaştırma grafiği .....    | 32              |
| Şekil 3.5. Kallus etanol ekstrelerindeki antioksidan kapasitenin BBD'lere göre karşılaştırma grafiği.....   | 33              |
| Şekil 3.6. Kallus su ekstrelerindeki antioksidan kapasitenin BBD'lere göre karşılaştırma grafiği .....      | 35              |
| Şekil 5.1. Gallik asit kalibrasyon eğrisi.....                                                              | 51              |
| Şekil 5.2. Kuersetin kalibrasyon eğrisi.....                                                                | 51              |
| Şekil 5.3. Troloks kalibrasyon eğrisi.....                                                                  | 52              |

## TABLÖLAR LİSTESİ

### Sayfa No

|                                                                                     |    |
|-------------------------------------------------------------------------------------|----|
| <b>Tablo 1.1.</b> Fenolik asitlerin yapıları.....                                   | 15 |
| <b>Tablo 2.1.</b> MS kimyasalları ve miktarları (Murashige ve Skoog, 1962). ....    | 21 |
| <b>Tablo 2.2.</b> Bitki büyüme düzenleyicilerin kombinasyonları.....                | 21 |
| <b>Tablo 3.1.</b> Kallus etanol ekstralarının toplam fenolik madde içerikleri ..... | 27 |
| <b>Tablo 3.2.</b> Kallus su ekstralarının toplam fenolik madde içerikleri.....      | 28 |
| <b>Tablo 3.3.</b> Kallus etanol ekstralarının toplam flavonoid içerikleri .....     | 30 |
| <b>Tablo 3.4.</b> Kallus su ekstralarının toplam flavonoid içerikleri .....         | 31 |
| <b>Tablo 3.5.</b> Kallus etanol ekstralarının antioksidan kapasiteleri .....        | 33 |
| <b>Tablo 3.6.</b> Kallus su ekstralarının antioksidan kapasiteleri .....            | 34 |
| <b>Tablo 3.7.</b> Bitkinin topraktan alınan kısımlarına ait bulgular .....          | 35 |

## SEMBOLLER LİSTESİ

### KISALTMALAR

|                       |                                                          |
|-----------------------|----------------------------------------------------------|
| <b>RA</b>             | : Rosmarinic acid                                        |
| <b>HSV-2</b>          | : Herpes simpleks virüs tip-2                            |
| <b>HSV-1</b>          | : Herpes simpleks virüs tip-1                            |
| <b>BHA</b>            | : Butilhidroksianisol                                    |
| <b>BHT</b>            | : Butilhidroksitoluen                                    |
| <b>PG</b>             | : Propil galat                                           |
| <b>TBHQ</b>           | : <i>tert</i> -Butilhidrokinon                           |
| <b>FDA</b>            | : Food and Drug Administtrain                            |
| <b>ROS</b>            | : Reactive oxygen species                                |
| <b>EDTA</b>           | : Etilendiamin tetra asetik asit                         |
| <b>LDL</b>            | : Low density lipoprotein                                |
| <b>CVD</b>            | : Cardiovascular disease                                 |
| <b>MS</b>             | : Murashige and Skoog                                    |
| <b>2,4-D</b>          | : 2,4-Dichlorophenoxyacetic acid                         |
| <b>IAA</b>            | : Indole acetic acid                                     |
| <b>BAP</b>            | : Benzil amino purin                                     |
| <b>KIN</b>            | : Kinetin                                                |
| <b>PIC</b>            | : Picloram                                               |
| <b>BBD</b>            | : Bitki büyüme düzenleyicileri                           |
| <b>GAE</b>            | : Gallic acid equivalent                                 |
| <b>ABTS</b>           | : 2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) |
| <b>TEAC</b>           | : Trolox equivalent antioxidant capacity                 |
| <b>MeJA</b>           | : Methyl jasmonete                                       |
| <b>BA</b>             | : Benzil adenin                                          |
| <b>IBA</b>            | : Indole butyric acid                                    |
| <b>RE</b>             | : Rutin equivalent                                       |
| <b>WPM</b>            | : Woody plant medium                                     |
| <b>AAE</b>            | : Ascorbic acid equivalent                               |
| <b>GA<sub>3</sub></b> | : Gibberellic acid                                       |

### SEMBOLLER

|              |                      |
|--------------|----------------------|
| <b>cm</b>    | : santimetre         |
| <b>dk</b>    | : dakika             |
| <b>g</b>     | : gram               |
| <b>g/L</b>   | : gram/litre         |
| <b>N</b>     | : Normal             |
| <b>nm</b>    | : nanometre          |
| <b>m</b>     | : metre              |
| <b>mg</b>    | : miligram           |
| <b>mg/g</b>  | : miligram/gram      |
| <b>mg/L</b>  | : miligram/litre     |
| <b>mg/ml</b> | : miligram/mililitre |
| <b>ml</b>    | : mililitre          |
| <b>mm</b>    | : milimetre          |

|                   |                    |
|-------------------|--------------------|
| <b>mmol/g</b>     | : milimol/gram     |
| <b>mmol/L(mM)</b> | : milimol/litre    |
| <b>μl</b>         | : mikrolitre       |
| <b>μM</b>         | : mikromol/litre   |
| <b>α</b>          | : alfa             |
| <b>β</b>          | : beta             |
| <b>δ</b>          | : delta            |
| <b>γ</b>          | : gama             |
| <b>ρ</b>          | : para             |
| <b>°C</b>         | : santigrat derece |



## 1. GİRİŞ

*Melissa officinalis* subsp. *officinalis* L. Lamiaceae familyasına mensup, çok yıllık limon kokulu bir bitkidir. Lamiaceae(eski adıyla Labiatae) ailesinin üyelerinden *Melissa officinalis* subsp. *officinalis* Akdeniz bölgesinde yetişen yenilebilir bir bitkidir. Bitki, dünyanın çeşitli bölgelerinde özellikle de Batı Asya, güney batı Sırbistan ve Kuzey Afrika'da yetiştirilmektedir (Simon vd., 1984). Ancak yetiştirilen bitkinin çoğu Orta Avrupa ve İspanya'dan gelmektedir. *M.officinalis*' in subsp. *officinalis* ve subsp. *inodora* olmak üzere iki alt türü bulunur. Ancak yalnızca subsp. *officinalis*' in ticari değeri ve karakteristik limon kokusu vardır. Bu bitkinin yeni veya kurutulmuş yaprakları ilaç olarak kullanılır. Yapraklar, çiçek açmadan önce veya dallanmadan önce hasat edilmektedir (Turhan, 2006).

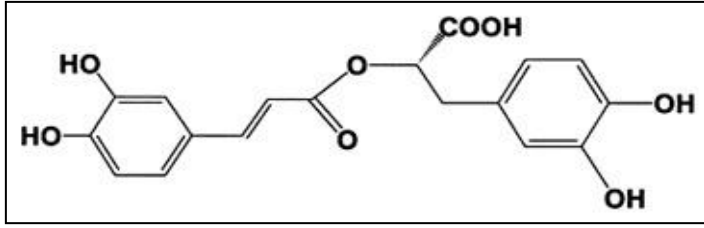
*Melissa officinalis* subsp. *officinalis*' in etimolojik kökü, ismini yunancada bal arısı anlamına gelen "Melitto"dan aldığından dolayı balın ya da arının anlamını taşır. Bitkinin çiçekleri arılar için çok caziptir ve kaliteli ballar büyük ölçüde *M. officinalis* subsp. *officinalis* çiçeklerinden beslenen arılardan yapılır. *M. officinalis* subsp. *officinalis*, limon otu, oğul otu ve melisa olarakta adlandırılabilir. Bitkinin karakteristik kokusunu veren uçucu yağlarıdır. bitkisinin uçucu yağı antiviral, antibakteriyel ve antispazmodik bir etkiye sahiptir (Farahani vd., 2009). Bitkinin uçucu yağı iyi bilinen bir antifungal ajandır ve hafif antidepresif ve antispazmolitik özellikleri de bildirilmiştir (Basta vd., 2005).

*M. officinalis* subsp. *officinalis* bitki boyu, gövde ve yaprak boyutu gibi morfolojik özellikleri esas olarak genotip, çevre veya kültürel uygulamalara bağlı olarak değişim göstermektedir (Sarı ve Ceylan, 2002). Genel olarak 1.5 m yüksekliğe kadar büyüyebilir ve 0.5-1.0 m boyunca yayılabilir. Bitki kare sapları, limon kokulu ve sarmaşık kenar yaprakları, beyaz veya sarıdan soluk mora kadar olgunlaşan çiçeklerle karakterizedir. Bitkinin yeşil yaprakları yumurta veya kalp şeklinde 2-8 cm uzunluğundadır ve saplar üzerinde karşıt çiftler halinde düzenlenmiştir. Üst yaprak genellikle alt yapraklardan daha büyüktür. Yapraklardaki damarlar kolayca görülebilir. Küçük çiçekler (0.5-1.5 cm boyutunda) bütün yaz boyu üretilmektedir. Sapların üzerinde yapraklarda aksillerden küçük dallar seyrek halde büyümektedir.

*M. officinalis* subsp. *officinalis* bitkisi çapraz tozlaşma türüdür ve çok kısa sürgülü epidermal bezleri çiçeklerle tamamlanmıştır. Çiçekler beş kaynaşık çanak yaprak (sepal), beş taç yaprak (petal), iki veya dört erkek organ (stamen) ve dört loblu yumurtalıktan oluşur. Tohumlar 1-1.5 mm uzunluğunda oval, koyu kahverengi veya siyah renktedir. 1000 tohumun ağırlığı yaklaşık olarak 0.5-0.7 gramdır. Uzun süre depolanan tohumların çimlenmelerinde azalma olacağı gibi beş yıl boyunca depolanan tohumlarda çimlenme görülmeyebilir. Farklı çevre koşullarına daha kolay adapte olabilen bitki, birçok yan kökleri olan bir saçak kök sistemine sahiptir. Bitkinin yapraklı üst kısımları kış mevsiminin başında ölür, ancak bahar mevsiminin başında köklerden yeni filizler çıkar (Turhan, 2006).

*M. officinalis* subsp. *officinalis*' in hem uçucu yağı hem de farklı bölümlerinin kimyasal kompozisyonu üzerine çok sayıda çalışma yapılmıştır. Tıbbi bitkideki uçucu yağ oranı, %0.02 - %0.30 arasında değişmekte olup bu oran Lamiaceae ailesinin diğer üyeleriyle karşılaştırıldığında oldukça düşüktür. Bu sebeple, uçucu yağın üretim maliyeti ve fiyatı piyasada çok yüksektir. Uçucu yağın temel bileşenleri, yağ içeriğinin yaklaşık %96' sını oluşturan sitral (geranial ve neral), sitronelal, linalool, geraniol,  $\beta$ -pinen,  $\alpha$ -pinen,  $\beta$ -karyofilen ve  $\beta$ -karyofilen oksittir (Sarı ve Ceylan, 2002; Sağlam vd., 2004). *M. officinalis* subsp. *officinalis* üzerindeki fitokimyasal araştırmalar, terpenler (monoterpenler, seskiterpenler ve triterpenler) ve fenolik bileşikler (fenolik asitler, flavonoidler ve tanenler) gibi çeşitli fitokimyasal maddelerin varlığını ortaya çıkarmıştır (Allahverdiyev vd., 2004; Moradkhani vd., 2010). *M. officinalis* subsp. *officinalis*' in ana aktif bileşenleri uçucu bileşikler (örneğin geranial, neral, sitronelal ve geraniol), triterpenler (örneğin ursolik asit ve oleanolik asit) ve fenoliklerdir (örneğin cis ve trans-rosmarinik asit izomerleri, kafeik asit türevleri, luteolin, naringin ve hesperidin) (Argyropoulos ve Müller, 2014; Ibragic vd., 2014).

*M. officinalis* subsp. *officinalis* kimyasal bileşimindeki uçucu yağlar, polifenolik bileşikler, rosmarinik asit (RA) da dahil olmak üzere büyük miktarlarda kafeik asit türevleri, trimerik bileşikler ve luteolin-7-O-glukozid gibi bazı flavonoidleri içerir (Encalada vd., 2011). Uçucu yağlar, spazmolitik, antimikrobik, antioksidan ve antitümör aktivitelerin başlıca terapötik kaynağı olarak kabul edilir, ancak özellikle bitki fenoliklerinden RA bu özelliklere sahiptir (Sousa vd., 2004). Şekil 1.1' de *M. officinalis* subsp. *officinalis* ekstraktında bulunan ana bileşen olan RA' nın kimyasal yapısı verilmiştir.



Şekil 1.1. Rosmarinik asitin kimyasal yapısı

Uçucu yağlar karmaşık yapılar gösterdiğinden yağ oranı veya kimyasal bileşimi, ışık şiddeti, besin maddesi, sıcaklık, kültürel uygulamalar, genotip, bitki parçası, tazelik, hasat zamanı vb. çeşitli faktörlerden oldukça etkilenmektedir. Örneğin, uçucu yağ oranı ve tanin içeriği 1000-1500 lux arasında ışık şiddeti arttıkça artmaktadır (Manukyan, 2004). Benzer şekilde, *M. officinalis* subsp. *officinalis* bitkisine uygulanan besin miktarı da ortalama esansiyel yağ oranı üzerinde önemli bir etkiye sahiptir. Ozturk ve ark., yaptıkları bir araştırmada, tuzlu koşullardaki melisanın esansiyel yağ oranını düşürme eğiliminde olduğunu, kuraklık koşullarında ise bu oranın arttığını göstermişlerdir (Ozturk vd., 2004). Bununla birlikte hem uçucu yağ içeriği hem de bileşenleri, büyük ölçüde bitkinin hasat edilmeden önceki yüksekliğine bağlıdır (Mrlianova vd., 2002).

Gıda işlemede *M. officinalis* subsp. *officinalis* çay, bitki, aroma verme gibi geniş bir kullanım alanına sahiptir. Sıcak çay karışımlarında, Avrupa ve Akdeniz ülkelerinde taze ve kuru bir bitki olarak kullanılmaktadır. Bitkinin yaprakları soğuk çayda veya diğer soğuk içeceklerde de kullanılmaktadır. Taze veya kurutulmuş *M. officinalis* subsp. *officinalis*, yeşil salata, sandviç, makarna, turşu, sos, çorba, yumurta yemekleri, et yemekleri, kızartma tavuk, reçel, sirke vb. için gıda maddesi olarak sıklıkla kullanılabilir. Bitkinin tatlı, bisküvi gibi yemeklerde, likör ve şarap gibi bazı alkollü içeceklerde de kullanılabileceği bildirilmektedir (Turhan,2006). Ayrıca ayçiçeği, kolza tohumu vb. bitkisel yağlara *M. officinalis* subsp. *officinalis* veya esansiyel yağının eklenmesi yağ kalitesi bileşenlerine katkıda bulunabilir. Örneğin bu bitkinin etanol ekstraktının, ayçiçeği yağının oksidasyon kararlılığını geliştirdiği ve salatalara %1.5 oranında ilave edildiğinde antioksidan kapasitesini %150 arttırdığı bulunmuştur (Marinova ve Yanishlieva, 1997; Ninfali vd., 2005).

Akdeniz bölgesinde insanlar yeni yapılmış kovanlarda arıların toplanması için ovuşturulmuş *M. officinalis* subsp. *officinalis* yapraklarını kullanmışlardır (Bremness,

1994; Square, 1998). Çiçekleri ve kokusu bal arılarını çekmesine rağmen, içerdiği citronella yağından ötürü bazı böceklerde itici bir etki oluşturur. Bazı araştırmalar, *M. officinalis* subsp. *officinalis*' in hayvan yeminde çeşitli amaçlarla kullanılabilceğini ortaya koymuştur. Örneğin bu bitkiyi içeren şifalı ot karışımlarının, yemlik antibiyotikleri yerine hayvansal yemlerde kullanılması önerilmektedir (Urbanczyk vd., 2002). Bombik ve ark. buzağların ısırgan otu, tutsan, melisa, papatya, kadife çiçeği ve küçük sinir otu karışımı ile beslenmesinin buzağların kan serumundaki kolesterol içeriğini düşürdüğünü, glikozu ve toplam protein içeriğini ise arttırdığı bulmuşlardır (Bombik vd., 2002). *M. officinalis* subsp. *officinalis* türleri, özellikle bahçelerde kenar bitkileri olarak, süs amaçlı kullanımlar için de uygundur. Çiçekli yaprakları ve sapları kurutularak kokulu karışımlar veya oda spreyi olarak kullanılabilir. Yaprakları ise, içeriğindeki esansiyel yağın hoş kokusu nedeniyle parfüm veya kozmetik endüstrisi tarafından kullanılmaktadır (Turhan, 2006).

*M. officinalis* subsp. *officinalis* bitkisinin geleneksel olarak halk hekimliğinde kullanılması en az 2000 yıl öncesine dayanmaktadır. Uykusuzluk, ateş, migren, baş ağrısı, mide rahatsızlıkları, gastrik, histeri, kronik bronşiyal katar, sinirsel yetmezlik, diş ağrısı, kulak ağrısı, yüksek tansiyon ve hazımsızlık için melisa çayı kullanılmaktadır (Herodez vd., 2003; Uzun vd., 2004). Bitkinin uçucu yağı aroma terapide rahatlatma, depresyon, melankoli ve sinir gerginliği için kullanılmaktadır (Horriggan, 2005). Romatizma, sinir ağrıları, yaralar, akne, böcek ısırıkları ve sokmaları gibi ağrılı şişkinlik semptomlarını hafiflettiği düşünülmektedir. Deneysel olarak *M. officinalis* subsp. *officinalis*' in domuzlarda yanık yara iyileşmesi üzerine etkisini araştıran Dzik ve ark., bu bitkinin yanık tedavisinde ağrının hafifletilmesi, düşük hipertrofik skar insidansı ve yanık sonrası kasılmada düşük maliyetli ve kolay bulunabilir bir pansuman olduğunu göstermiştir (Dzik vd.,2004).

*M. officinalis* subsp. *officinalis* tıbbi antioksidan amaçlı ve fonksiyonel bir bitki olarak geniş bir kullanım alanına sahiptir. Antiviral, antibakteriyel, antimikrobiyal, antifungal, antitümör ve sedatif etkileri gibi tıbbi etkilerini belirlemek için bitkide çeşitli araştırmalar yapılmıştır. Örneğin Sousa ve ark. (2004), antitümoral bir ajan olarak *M. officinalis* subsp. *officinalis* uçucu yağının kanser tedavileri veya önlenmesi için bir potansiyele sahip olduğunu göstermişlerdir. Bitkinin uçucu yağı bir anti virüs ajanı olarak kullanılabilir ve anti Herpes simpleks virüs tip-2 (HSV-2) maddesi içermektedir (Allahverdiyev vd., 2004).

Mimica-Dukic ve ark. yaptıkları bir araştırmada, *M. officinalis* subsp. *officinalis* antimikrobiyal aktivite testlerinde monoterpen aldehytler, ketonlar (neral/geranial, sitronelal, izomenton ve menton), monoterpen ve seskiterpen hidrokarbonları ( $\beta$ -karyofilen) en güçlü radikal süpürücü bileşikler olarak göstermişlerdir (Mimica-Dukic vd., 2004). Labiatae ailesinin tüm üyeleri arasında *M. officinalis* subsp. *officinalis*, gıda bozulma mayalarına karşı en etkili olan bitkidir. 500 mg/ml oranında bitkinin esansiyel yağı tüm bu maya türlerini tamamen engeller ve fungitoksik etki, yağın ana bileşenini oluşturan sitrat (%58.3) ile ilişkilendirilir. Tıbbi bitki, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella choleraesuis* ve *Klebsiella pneumoniae* gibi bazı antibiyotik dirençli bakterilerin büyümesini de engeller (Araujo vd., 2003; Nascimento vd., 2000).

Çalışmalar *M. officinalis* subsp. *officinalis*' in antibakteriyal, sedatif, spazmolitik, hafıza geliştirici ve kaygı, stres, gastrointestinal bozukluklar, uyku bozukluklarını azaltabilme gibi pek çok faydalı etkisinin olduğunu belirtmişlerdir (Kim vd., 2010; Aprotosoie vd., 2013). *M. officinalis* subsp. *officinalis*' in esansiyel yağı, iltihaplanma ve ağrı ile ilişkili çeşitli hastalıkların tedavisinde bu bitkinin geleneksel uygulamasını destekleyen potansiyel bir antienflamatuar aktiviteye sahiptir (Bounihi vd., 2013). Bitkinin sulu ekstraktı, in vitro Herpes simpleks virüs tip-1'e (HSV-1) karşı yüksek bir antiviral aktivite göstermiştir (Astani vd., 2012). Ayrıca bitkinin uçucu yağları, HSV-1'e ve HSV-2'ye karşı bir inhibisyon aktivitesi göstermiş ve topikal herpetik enfeksiyonların tedavisinde de uygun olabilmıştır (Schnitzler vd., 2008). Hasanein ve Riahi, *M. officinalis* subsp. *officinalis* uçucu yağının kronik olarak verilmesinin diyabetik hiperaljezinin deneysel modelinde etkinlik gösterdiğini ve bu nedenle ağrılı diyabetik nöropatinin umut verici bir tedavisi olabileceğini göstermiştir (Hasanein ve Riahi, 2015). Bitkinin yaprakları mide kuvvetlendirici, karminatif, yatıştırıcı, analjezik, sinir sistemi gerginlik düzenleyicisi ve geleneksel tıpta kalp rahatsızlığının tedavisinde kullanılmaktadır. *M. officinalis* subsp. *officinalis* yaprağı, yüksek asetilkolinesteraz önleyici aktivite gösterdiğinden Alzheimer hastalığının tedavisinde önerilmektedir (Kacar vd., 2010; Chaiyana ve Okonogi, 2012).

Stresle ilgili rahatsızlıkların potansiyel ilaçlarından biri, bitkisel ekstraktlar içeren fonksiyonel gıdaların tüketimidir (Hamer vd., 2005). *M. officinalis* subsp. *officinalis* orta çağdan itibaren hafif sakinleştirici olarak bilinmektedir. Ayrıca, akut psikolojik stres sırasında ruhsal değişiklikleri etkilemektedir. Bu davranışsal sonuçlar, kuru herbanın veya uçucu yağının bazı aktif bileşenleriyle ilişkilendirilebilir, ancak insan deneklerinde

etkinliğini doğrulamak için daha fazla çalışma gereklidir. Topikal melisanın rapor edilen bir yan etkisi yoktur, ancak alerjik reaksiyonlar daima dikkate alınmalıdır. Bitkinin çay, taze herba veya kapsül olarak tüketimi uyanıklığı azaltabilir ve zihinsel fonksiyonları zayıflatılabilir (Kennedy vd., 2002).

Sentetik antioksidanlar, gıda ürünlerinin raf ömrünü uzatan oksidasyon sürecini yavaşlatmak için yağlara ekleyerek gıda ürünlerinde yaygın şekilde kullanılmaktadır. Bununla birlikte, bazı sentetik antioksidanların kullanımı insan sağlığına olumsuz etkileri konusunda endişeler olduğu için çeşitli ülkelerde yasaklanmıştır (Herodez vd., 2003). Sentetik antioksidanların emniyet ve toksikliği konusundaki bazı endişeler yüzünden son zamanlarda gıda endüstrisi doğal antioksidanları araştırmıştır. Birçok şifalı bitki doğal antioksidanların mükemmel kaynaklarıdır ve diyetteki tüketimleri günlük antioksidan alımına katkıda bulunmaktadır. *M. officinalis* subsp. *officinalis*, rosmarinik ve kafeik asit gibi fenolik antioksidanlara sahip olduğu için dikkat çekici bir antioksidatif aktiviteye sahiptir (Labuda vd., 2002). Dragland ve ark. yaptıkları bir çalışmada, bitkinin çok yüksek antioksidan konsantrasyonu sayesinde antioksidanlarının toplam alımına katkıda bulunabileceğini, meyve, tahıl ve sebze gibi diğer gıdalardan daha iyi bir antioksidan kaynağı olduğunu öne sürmüşlerdir (Dragland vd, 2003). Bolkent ve ark., *M. officinalis* subsp. *officinalis* ekstraktının hiperlipidemik hayvanlarda serum kolesterol ve lipid düzeylerini düşürdüğünü göstermişlerdir. Bu durum, önleyici bir ajan olarak bitki ekstraktının hiperlipidemi hastalığı için kullanılabileceğini düşündürmektedir (Bolkent vd., 2005).

*M. officinalis* subsp. *officinalis* bitkisi, alelopatik etki ve alelokimyasal içeriği ile tarımda da potansiyel bir kullanıma sahiptir. Bu bitki tozunun *Amaranthus caudatus*, *Digitaria sanguinalis* ve *Lactuca sativa* gibi bazı yabancı ot tohumlarının çimlenmesini ve büyümesini engellediği ifade edilmiştir (Kato-Noguchi, 2003). Ticari kullanımda önemli bir yeri olan bitkinin bu alelopatik doğası, tarım sistemlerinde yalnızca organik maddelere izin verilen bir yabancı ot kontrolü potansiyeline sahiptir. *M. officinalis* subsp. *officinalis* ekstraktı böcek öldürücü bir etkiye de sahiptir ve pamuk kurtçuğu (*Spodoptera littoralis*) larva popülasyonunun büyümesinde belirgin bir azalmaya neden olmaktadır (Pavela, 2004).

### 1.1. Sekonder Metabolitler

Bitki hücre kültürleri, otuz yıldan fazla bir süredir tüm bitki materyaline dayalı olarak ekstraksiyon yöntemlerine karşı potansiyel bir sekonder metabolit kaynağı olarak araştırılmaktadır. Ancak, hücre kültürlerinde daha fazla üretkenlik, basitleştirilme ve geliştirilmiş işlem teknolojisi için bir gereksinim olduğundan başarı sınırlıdır. Bitki sekonder metabolitleri, bunları sentezleyen bitkilerde temel yaşam süreçlerinin korunmasında etkili olmayıp, başta ilaç sanayi olmak üzere, kimya, besin, kozmetik ve zirai mücadele sektörlerinde ekonomik açıdan çok önemli bileşiklerdir. Bu bileşikler potansiyel otobur hayvanları veya patojenleri engellemek, rakip bitki türlerini engellemek, polenleri çekmek ya da bitkinin başka yollarla daha fazla ilgisini çekmek için görev yapabilir. Tanımlanmış gelişim aşamalarında bitkilerin belirli kısımlarında üretilirler. Miktarlar genellikle düşüktür (kuru ağırlığın %1' inden az) ve oldukça değişkendir. Ayrıca farmasötik bileşikler içeren birçok bitkinin, aşırı hasat sonucunda büyümesi güçtür ya da nesli tükenmektedir. Kimyasal sentez çoğu zaman karmaşık yapıları nedeniyle ekonomik olarak uygun olmadığından, hücre kültürlerindeki bitki bileşiklerinin üretimi cazip bir alternatif olmaya devam etmektedir.

Sekonder metabolitler, belirli bitki türleri için spesifik olan geniş ve çeşitli kimyasal grupları içerir. Bunlar genellikle hücre vaküollerinde depolanır. Biyosentetik kökenlerine dayanarak, bitki metabolitleri terpenoidler, alkaloidler ve fenilpropanoidler olmak üzere üç ana gruba ayrılabilir. Bitki için birçok sekonder metabolit (aynı zamanda fitokimyasallar olarak da adlandırılır) ticari olarak değerlidir ve farmasötik olarak kullanılmaktadır. Bununla birlikte, ticari kullanım için bitki hücre kültürleri tarafından sekonder metabolitlerin üretimi ekonomik olarak uygun ve ölçek büyütme için kolay olmalıdır (Davey, 2017).

Sekonder metabolitlerinin in vitro teknolojisindeki gelişme, bitki hücrelerinin ve dokularının hücresel mekanizmasına daha kolay erişilmesini sağlar ve bitki hücrelerinin, doğal veya rekombinant ticari bileşiklerin üretimi için uygun şekilde kullanılmasına yardımcı olur. Tüm biyokütle ve yüksek miktarlarda sekonder metabolit, bitki hücreleri ve dokuları eksplant, aseptik koşullar altındaki hücre süspansiyonu, kallus, dokular ve somatik embriyo şeklindeki yapılardan üretilmektedir. Sekonder metabolitler, bitkilerin savunma mekanizmasını kontrol eder ve ayrıca bitkilerin çevresel koşullara göre adaptasyonundan sorumludur. Primer metabolizma çok az formda son ürün verirken,

sekonder metabolizma birçok formda ürün vermektedir. Bitki hücresinde sekonder metabolit üretiminin çevresel koşullara bağımlılığı, metabolitleri ilaç olarak kullanma konusunda kısıtlamaktadır. Bu koşullar, terapötik bileşiklerin üretimi için bitki hücrelerinin kullanımına büyük ilgi oluşturan in vitro bitki biliminin geliştirilmesini gerektirir.

Bitki hücresi ve doku kültürü teknolojisi, yararlı sekonder metabolitler için alternatif bir kaynak sağlamıştır. Doku kültürü uygulamasında, optimum doğal ortam koşullarında yetiştirilenden daha kısa sürede sekonder metabolit üretimini teşvik eden ve sonuçta istenen ürün miktarı kültürlenmiş hücrelerden ekstrakte edilen hücre, doku veya organ optimum in vitro koşullar altında yetiştirilir. Bitki doku kültürü ile terapötik sekonder bileşik üretimi, aşağıdaki gibi çeşitli avantajlar sunar:

- Ürünün tedarik kontrolü bağımsızdır.
- Hücre veya dokunun büyümesi için kontrollü ve optimize edilmiş koşullar sunulmaktadır.
- Herbisitler ve böcek ilacı gerekli değildir.
- Doğal substratlara analogların takviyesi, doğada bulunmayan yeni sentetik bileşiklerin üretim şansını artırır.
- Bitki doku kültürü iklim, coğrafi konum, vb bağlı değildir.
- Hızlı üretim, ucuz öncülerden yeni bileşiklerin üretimini sağlar.
- Değişmez kalite ve verim ile ürünlerin sürekli tedarikini sağlayan bir üretim sistemini temsil eder.
- İklimsel değişikliklerden ve çeşitli çevresel faktörlerden bağımsızdır.

Sekonder metabolit üretimini arttırmak için suş iyileştirme, elit veya yüksek üretimli hücre hatlarının seçimi ve ortam optimizasyonları gibi uygulamalar benimsenmiştir. Bununla birlikte, doku kültürü uygulamalarının çoğunda bitki hücre kültürleri istenen ürünlerin yapımında başarısızdır. Bitki doku kültürü bazlı endüstriler, hücre hatlarının kararsızlığından kaynaklanan hücre kültürleri tarafından metabolitlerin üretiminde problemlerle karşı karşıyadır. Metabolit üretimi için geliştirilen tekniklerde karşılaşılan genel sorun, biyosentetik yollar, enzimler, ara maddeler ve bitki sekonder metabolit üretiminden sorumlu mekanizmalarla ilgili temel bilgilerin eksikliğidir. Metabolitlerin üretkenliği, belirli öncüler, biyotransformasyon, genetik manipülasyon ve metabolik mühendislik ile ilgili yanlış bilgilerin eksikliğinden de etkilenir. Bitki

hücrelerinin biyokütle üretimi için çeşitli ölçeklendirme teknikleri, istenilen miktarda sekonder metabolitlerin önemli ölçüde daha kısa sürede elde edilmesi için tercih edilir.

Kültürleme hücrelerinin totipotent doğası, genetik bilgisini korur ve böylece ana bitkide bulunan çok sayıda biyokimyasal üretebilir. Bitki hücre kültürünün aracılık ettiği metabolit üretiminin yanı sıra, bitki miktarına eşit veya hatta daha yüksek miktarlarda bileşikler üretebilen hücre hatlarını tanımlama fırsatı da vardır. Bitki doku kültüründen üretilen ürünlerin kalite kontrolü, iklimsel varyasyonlara bağlı kalmaksızın düzenli üretimleri için gereklidir. Yüksek üretimli bir hücre hattının taranması, seçilmesi, stabilizasyonu ve izolasyonu, kültürleme koşulları, ölçeklendirme tekniği, biyoreaktörlerde kütle yetiştirme, işlem sonrası bileşiklerin ekstraksiyonu ve saflaştırılması, son ürün ve bitki hücre kültürünün aşamaları veya gelişmelerin ardından kazanılan verimi etkiler (Bhatia vd., 2015) .

## **1.2. Antioksidanlar**

Antioksidanlar, gıdada veya vücutta çok düşük konsantrasyonlarda bulunduklarında, vücutta dejeneratif hastalıkların başlatılması ve çoğaltılması veya gıda kalitesinin bozulmasına neden olan oksidatif süreçleri geciktiren, kontrol eden veya önleyen maddelerdir. Antioksidanlar sağlıklı bölgelerde, vücudu oksidatif hasara karşı koruyabilme yetenekleri sayesinde hastalık riskini azaltma ve sağlık desteklerinde kullanılırlar. Bu tanıma uyan antioksidanlar, serbest radikal süpürücüler, singlet (tekli) oksijen sönmüleyiciler, peroksit inaktivatörleri, metal iyonu kenetleme maddeleri, sekonder oksidasyon ürünlerinin sönmüleyicileri ve prooksidatif enzimlerin önleyicileridir (Shahidi ve Zhong, 2007).

Antioksidanlar doğal olarak farklı kaynaklardan üretilir veya farklı yollarla sentezlenebilir. Yüksek bitkiler ve bileşenleri, tokoferoller ve fenoller/polifenoller (baharatlar, otlar, meyveler, sebzeler, hububatlar, tahıllar, tohumlar, çaylar ve yağlarda bol bulunur) zengin bir doğal antioksidan kaynağı sağlar. Yosun, balık/kabuklu deniz hayvanları ve deniz bakterileri gibi deniz kaynaklı antioksidanlar da düşünülmüştür (Amarowicz, vd., 1999; Athukorala vd., 2003; Shahidi ve Amarowicz, 1996).

Genellikle butilhidroksianisol (BHA), butilhidroksitoluen (BHT), propil galat (PG) ve *tert*-butilhidrokinon (TBHQ) gibi sentetik antioksidanlar yıllardır gıda muhafazasında kullanılmıştır. Bununla birlikte tüketicilerin tüm doğal maddelerde temiz etiket talebi

nedeniyle bu antioksidanlar gözden düşmüştür. Sentetik antioksidanların güvenliği sorgulanmış, kullanımı sınırlandırılmış ve etkili doğal antioksidanların araştırılması Gıda ve İlaç Dairesi (FDA) tarafından düzenlenmiştir (Sherwin, 1990; Wattenberg, 1986).

Antioksidanların etkinliği genellikle yapısal özellikleri, konsantrasyonu, sıcaklığı, oksidasyon substratının türü, sistemin fiziksel durumu, prooksidanlar ve sinerjistlerden etkilenir (Yanishlieva-Maslarova, 2001). Bir antioksidanın kimyasal yapısı, serbest radikallere ve reaktif oksijen türlerine (ROS) dolayısıyla antioksidan aktiviteye karşı esas reaktivitesini belirler. Antioksidanların etkinliği, konsantrasyonlarına ve sistemdeki konumlarına (örn., arayüzeydeki dağılım) da bağlıdır (Shahidi ve Zhong, 2011; Zhong ve Shahidi, 2012). Reaksiyon kinetiği, antioksidanların oksidasyona karşı kısa süreli veya uzun süreli korunmalarında önemli bir rol oynar. Bir antioksidanın spesifik bir oksidan ile reaksiyona girme hızı, reaksiyonun termodinamiği ve antioksidanın tepki verme derecesini içermektedir (Antolovich vd., 2002).

Antioksidanlar oksidanlar üzerinde dört yolla etki ederler (Gökpınar vd., 2006).

a.Süpürücü etki (Scavenging): oksidanları zayıf bir moleküle çevirir ve böylece onların etkilerini kaybetmelerini sağlar. Antioksidan enzimler ve moleküller bu şekildedir.

b.Sönümleyici etki (Quenching): oksidanlara bir hidrojen vererek etkisiz hale gelmesini sağlayan bu etki flavonoidler ve vitaminlerde görülmektedir.

c.Onarıcı etki (Repair): hasar görmüş molekülün tamiri ve yenilenmesini sağlar.

d.Zincir kırma etkisi (Chain breaking): oksidanları kendileri bağlayarak aktivelerini engelleyen hemoglobin, seruloplazmin ve mineraller bu şekilde etki ederler.

Birçok bileşik antioksidan olarak görev yapabilir ve bunları sınıflandırmanın tek bir yolu yoktur. Antioksidanlar kaynaklarına, işlevlerine, etki mekanizmalarına ve kimyasal yapılarına göre sınıflandırılmaktadır.

Antioksidanların kaynaklarına bağlı olarak, doğal antioksidanlar ve sentetik antioksidanlar olarak ikiye ayrılırlar. Doğal antioksidanlar çoğunlukla bitkilerde bulunan bileşiklerdir. Doğal antioksidanlara uygun örnekler polifenoller ve karotenoidler, askorbik asit ve tokoferollerdir. Sentetik antioksidanlar kimyasal olarak sentezlenir ve toksikolojik olarak insan diyetinde güvenli kullanımı incelenirler. BHA ve BHT gibi bileşikler bu

kategorideki yaygın antioksidanlardır. Doğala özdeş formda antioksidanlar, bitkilerden izole edilen doğal maddelerle aynı moleküler formda sentetik olarak üretilen doğal maddelerdir. Örneğin, resmi adıyla L-askorbik asit veya onun tuzu (askorbat), sentetik C vitaminin doğala özdeş formda antioksidanlarıdır (Topliss vd., 2002).

Antioksidanlar fonksiyonlarına veya etki biçimlerine göre aşağıdaki gibi sınıflandırılırlar:

a.Başlatma evresinde serbest radikal oluşumunun inhibitörleri olan serbest radikal süpürücüleri (veya sonlandırıcılar) ve çoğalma evresini kesen zincirleme kırıcılar.

b.Elektron transferinde kullanılamayan kararlı formları metal iyonlarına dönüştürebilen metal kenetleyicileri

c.Singlet oksijeni triplet haline getiren singlet oksijen sönmüleyiciler (karotenler)

d.Bir karışım içinde aktiviteyi arttıran veya diğer antioksidanları yenileyen sinerjistler (sitrik asit, askorbik asit).

e.Diğer oksitlenebilir bileşiklere bir elektron bağışlayan indirgeme ajanları.

f.Oksidatif enzimleri inaktive eden enzim inhibitörleri (Pokorny, 2007).

Mekanizmalarına göre antioksidanlar birincil veya ikincil antioksidanlar olarak sınıflandırılırlar. Birincil antioksidanlar, çoğalma veya başlatma evresine müdahale ederek lipid oksidasyonunu inhibe eden zincir kırıcı antioksidanlardır veya kararlı serbest radikalleri oluşturmak için serbest radikalleri alan  $\beta$ -parçalama tepkimeleridir. İkincil antioksidanlar, oksidasyonu geciktirmek için hava oksijeni veya katalitik metal iyonlarını bağlayarak zincirin oksidasyon başlatma oranını geciktiren koruyucu antioksidanlar olarak kabul edilir. İkincil antioksidanlar, birincil antioksidanlardan farklı olarak daha kararlı nonreaktif ürünleri serbest radikallere dönüştüremezler (Chaiyasit vd., 2007; Frankel, 2005). Rice ve ark., hem birincil hem de ikincil antioksidan olarak görev yapabilen karışık fonksiyonlu antioksidanların da bulunduğuna dikkat çekmiştir (Rice-Evans vd., 1997).

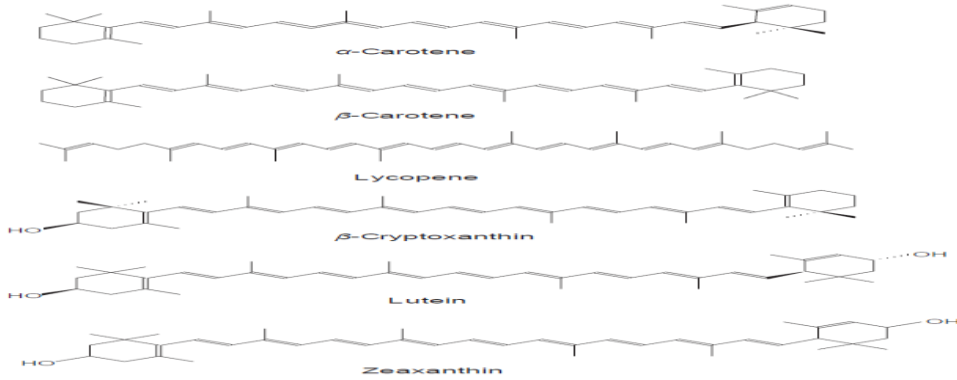
Antioksidanlar kimyasal yapılarına göre de sınıflandırılırlar. Farklı kimyasal yapılara sahip olan birçok madde, farklı etki veya mekanizma modlarına sahip antioksidanlar gibi davranabilir. Tokoferoller, sinnamatlar ve flavonoidler doğal yapılar, BHA ve BHT gibi sentetik yapılar fenolik antioksidanlardır (Tsao, 2010). Karotenoidler

esas olarak başka bir kimyasal antioksidan sınıfı oluştururlar. Hem fenolikler hem de karotenoidler, büyük ölçüde rezonans boyunca radikalleşmiş molekülleri stabilize eden eşlenik çift bağ sistemlerine sahiptir. Sitrik asit ve etilendiamin tetraasetik asit (EDTA) gibi çoklu karboksilik fonksiyonel gruplu zayıf organik asitler, geçiş metallerini kenetleyen ikincil antioksidanlardır (Banner vd., 1986; Fahey vd., 2001; Flora, 2009).

### 1.2.1. Doğal antioksidanlar

#### 1.2.1.1. Karotenoidler

Karotenoidler sarı, turuncu ve kırmızı renklere sahip yağda çözünebilen pigmentlerdir ve provitamin A aktivitesi sayesinde antioksidan olarak görev yaparlar. Karotenoidler bitkilerde sentezlenerek besin yoluyla mikroorganizmalar ve hayvanlara aktarılır. Karotenoidler, 8 izopren birimi olan 40 karbon atomlu iskeletine sahip hidrokarbonlardır (Şekil 1.2). Karotenoidler, karotenler ve oksijen içeren ksantofiller olmak üzere ikiye ayrılmaktadır. Karotenler arasında  $\beta$ -karoten,  $\alpha$ -karoten ve likopen insanlarda yaygın olarak bulunur. Ksantofiller grubunda ise lutein, zeaksantin ve kriptoksantin bulunmaktadır.

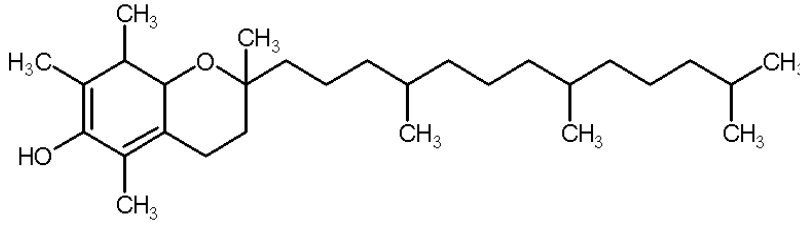


Şekil 1.2. Karotenoidlerin yapısı

Karotenoidlerin bitkilerdeki rolü, fotosentez için depolama ve klorofilin oksidatif hasara karşı korunmasıdır. Epidemiyolojik çalışmalar, karotenoid açısından zengin meyve ve sebzelerin alınması ile çeşitli kanser türleri, kardiovasküler hastalıklar ve yaşla ilişkili maküler dejenerasyon riskinin azalması arasında pozitif bir ilişki olduğunu göstermiştir (Adom vd., 2003).

#### 1.2.1.2. Tokoferoller

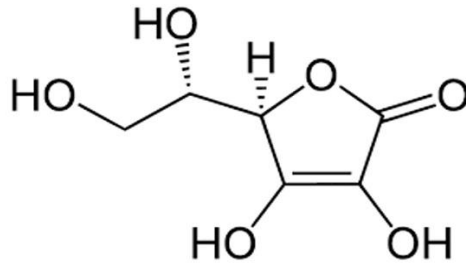
Tokoferoller, fotosentetik organizmalar tarafından özel olarak sentezlenen, yağda çözünebilen amfipatik molekül ( $\alpha$ -,  $\beta$ -,  $\gamma$ -,  $\delta$ -) grubudur (Şekil 1.3). Peroksil radikalleri ve mutajenik nitrojen oksit türlerinden hücre membranlarını koruyan en etkili doğal antioksidan olduğu bilinen E vitamini bileşenidir (Gliszczynka-Swiglo ve Sikorska, 2004). Bitkiler tarafından sentezlenen doğal E vitamininin  $\alpha$ -,  $\beta$ -,  $\gamma$ - ve  $\delta$ - tokoferol ve  $\alpha$ -,  $\beta$ -,  $\gamma$ - ve  $\delta$ - tokotrienol olmak üzere sekiz farklı formu bulunmaktadır. Özellikle bitkisel yağlarda, baklagillerde, yeşil yapraklı sebzelerde, fındık, ceviz, süt ve yumurtada bol miktarda bulunur (Keskin ve Erkmen, 1987).



Şekil 1.3.  $\alpha$ -Tokoferolun yapısı

#### 1.2.1.3. Askorbik asit

Askorbik asit diğer ismiyle C vitamini, organizmanın en fazla ihtiyacı olan bir vitamindir (Şekil 1.4). Serbest radikalleri doğrudan temizleyebilen askorbik asit suda çözünür ve birçok meyve ve sebzede bulunur (Wheeler vd., 1998). En zengin kaynakları limon, portakal, mandalina, yeşil sebzeler, domates ve diğer meyvelerdir. C vitamini vücudun bağışıklık sistemini kuvvetlendirir ve korur. Demir ve folik asitin kana geçmesini sağlayarak kansızlığı önler. Ayrıca çeşitli besin maddelerinde ekşime ve acılaşmayı, meyvelerde renk değişimini engellemektedir (Cadenas ve Packer, 2002).



Şekil 1.4. Askorbik asidin yapısı

## **1.2.2. Sentetik antioksidanlar**

### **1.2.2.1. BHA (Bütillenmiş hidroksianisol)**

BHA [2,6-bis(1,1-dimetiletil)-4-metilfenol], 2-tertiyer-bütıl-4-hidroksianisol ve 3-tertiyer-butıl-4-hidroksianisol izomerlerinin karışımı şeklindedir. Beyaz, mumsu bir yapıya sahip olan antioksidan yağlarda çözünebilirken, suda çözünmemektedir (Fennema, 1996). Yapısından dolayı gıdalarda taşınması BHT antioksidanına göre daha fazladır. Genellikle tahıl ve şeker içeren gıda ürünlerinde kullanılmaktadır (Özyürek, 2005).

### **1.2.2.2. BHT (Bütillenmiş hidroksitoluen)**

BHT [2,6-ditertiyer bütıl-4-metil fenol] beyaz kristal yapıda olup, sadece yağlarda çözünebilir. Gıda maddelerinde yağların stabilizasyonunu, gıda kokusunu, rengini ve lezzetini korumak için kullanılmaktadır (Pokorny vd., 2001).

### **1.2.2.3. PG (Propil gallat)**

Propil galat [propil 3,4,5-trihidroksibenzoat] beyaz renkli kristal yapıda olup, bitkisel ve hayvansal gıdalarda en fazla bulunan sentetik antioksidandır. Gallik asit esteri bu antioksidan, etanolde çözünürlüğü fazladır. Gıdaların, yağların tazeliğini, besin değerini ve rengini korumak için kullanılmaktadır (Zurita vd., 2007).

### **1.2.2.4. TBHQ (Tertiyer bütılhidrokinon)**

TBHQ, beyaz ile kahverengi arası renkte kristal yapıdadır. Bitkisel yağlarda çok etkili olan bu antioksidan, tek başına veya BHA, BHT ile birlikte kullanılabilir. PG ile kullanımı ise, etkiyi azaltma yönünde etki eder (Pokorny vd., 2001; Özyürek, 2005).

## **1.3. Fenolik Bileşikler**

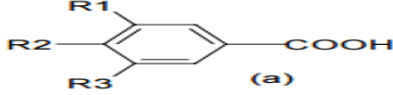
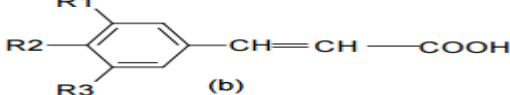
Bitki fenolikleri, yapısında bir fenol grubu taşıyan, yani aromatik halkalarından bir hidroksil bulunan sekonder metabolitlerdir. Bitkilerde fenolik bileşiklerin sentezinde yer alan iki amino asit çeşidi fenilalanin ve bir miktarda tiroindir (Shahidi ve Nacz, 2003). Tahıllarda en çok bulunan fenolik bileşikler arasında fenolik asitler, kumarinler, flavonoidler, stilbenler, taninler, lignanlar ve ligninler bulunmaktadır (Nacz ve Shahidi, 2006).

Polifenolik bileşikler, temel maddeleri fenol olan, güneş ışığından faydalanarak bitkilerin yaprak, dal, meyve ve çiçeklerinde oluşan organik bileşiklerdir. Organik

çözücülerde daha iyi çözünmekle birlikte, suda bir miktar çözünmektedirler. Polifenollerin antioksidan özellikleri, indirgeyici ve hidrojen verici olmalarıyla ilgilidir (Bursal, 2009). Fenolik bileşikler birçok bitki organında bulunur ve bu nedenle insan beslenmesinin ayrılmaz bir parçasıdır. Çeşitli çalışmalar, fenoliklerin antioksidatif etkiler ortaya koyduğunu, in vitro sistemlerde DNA oksidasyon inhibisyonu ve düşük yoğunluklu lipoprotein (LDL) kolesterolden sorumlu olduğunu göstermiştir (Adom ve Liu, 2002; Chandrasekara ve Shahidi, 2010; Liyana-Pathirana vd., 2006; Madhujith ve Shahidi, 2007).

Fenolik asitlerin iki türü olan hidroksibenzoik asit ve hidroksisinnamik asitler bitkilerde bulunur. Hidroksibenzoik asitler gallik, *p*-hidroksibenzoik, vanilik, şiringik ve protokateşik asitlerdir. Hidroksisinnamik asitler, kumarik, kafeik, ferulik ve sinapik asitlerdir (Shahidi ve Naczki, 2003). Bir fenil halkası (C6) ve bir C3 yan zincirine bileşik hidroksisinnamik asitler, diğer fenolik bileşiklerin sentezi için öncü olarak görev yapmaktadırlar (Tablo 1.1).

**Tablo 1.1.** Fenolik asitlerin yapıları

| Benzoik asit türevleri                                                                     |                  |                |                  | Sinnamik asit türevleri                                                                     |                  |                |                  |
|--------------------------------------------------------------------------------------------|------------------|----------------|------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------|------------------|----------------|------------------|
| <br>(a) |                  |                |                  | <br>(b) |                  |                |                  |
|                                                                                            | R <sub>1</sub>   | R <sub>2</sub> | R <sub>3</sub>   |                                                                                             | R <sub>1</sub>   | R <sub>2</sub> | R <sub>3</sub>   |
| <i>p</i> -Hidroksibenzoik asit                                                             | H                | OH             | H                | <i>p</i> -Kumarik asit                                                                      | H                | OH             | H                |
| Vanilik asit                                                                               | OCH <sub>3</sub> | OH             | H                | Kafeik asit                                                                                 | H                | OH             | OH               |
| Siringik asit                                                                              | OCH <sub>3</sub> | OH             | OCH <sub>3</sub> | Sinapik asit                                                                                | OCH <sub>3</sub> | OH             | OCH <sub>3</sub> |
| Protokatekuik asit                                                                         | H                | OH             | H                | Ferulik asit                                                                                | OCH <sub>3</sub> | OH             | H                |
| Gallik asit                                                                                | OH               | OH             | OH               |                                                                                             |                  |                |                  |

#### 1.4. Flavonoidler

Sarı renkli olmaları sebebiyle Latince ‘sarı’ anlamına gelen ‘flavus’ kelimesinden türetilerek flavonoid ismini almışlardır. 15 C atomlu 2-fenil benzopiran (difenilpropan) yapısına (C6-C3-C6) sahiptirler. Flavonoidlerin iskelet yapıları farklı olmasına rağmen flavonler, flavonoller, flavanonlar, flavanoller, izoflavonlar, antosiyanidinler ve kalkon

olarak adlandırılan farklı alt sınıfları vardır (Bors vd., 1990; Ptittin, 1987; Formica ve Regelson, 1995). Flavonler ve flavonoller gıdalarda aglikon olarak bulunur. İki veya üç konumda çift bağ ile benzer bir C halkası yapısına sahiptirler. Flavonların üçüncü konumunda bir hidroksil grubu yoktur. Flavonoller (kuersetin, kaempferol, rutin ve mirisetin), flavonler (luteolin, apigenin ve chrysin), flavanoller (kateşin, epikateşin, epigallokateşin, epikateşingallat ve epigallokateşingallat), flavanonlar (narigenin, hesperitin ve eriodictyol), antosiyanidinler (siyanidin, malvidin, peonidin, petunidin, pelargonidin ve delfinidin) ve izoflavonlar (jenistein, daidzein ve glycitein) yaygın flavonoidlerdir (Shahidi ve Nacz, 2003). Ayrıca, çeşitli epidemiyolojik çalışmalar flavonoidlerinin alımı ile kardiyovasküler hastalıkların (CVD) ve çeşitli kanser türlerinin görülmesi arasında ters bir ilişki olduğunu göstermiştir (Hertog vd., 1995; Willet vd., 1995).

Aterojenez, tromboz ve karsinogenezde yer alan lipid peroksidasyonunu modüle edebildikleri için flavonoidler günlük gıda tüketimin önemli bir parçasıdır. Meyveler ve sebzeler açısından zengin diyetler, koroner kalp hastalığı ve kanser riskini azaltmaktadır (Kinsella vd., 1993; Block vd., 1992). Meyve ve sebzeler diyet antioksidanlarının başlıca kaynağı olarak kabul edilmektedir. E vitamini, C vitamini ve karotenoidler antikanserojen olarak ve yaşlanmanın dejeneratif hastalıklarına karşı savunmalarıyla beraber, meyve ve sebzelerde flavonoid antioksidanların besleyici rolleri de bulunmaktadır. Bu flavonoidler birçok meyve ve sebze de çok çeşitli yapı ve özelliklerde bulunur. Aktif antioksidanlar olarak flavonoidler, hastalıklarına karşı koruma açısından önemli olabilmektedir (Ames vd., 1993).

Flavonoidler antioksidan özelliklerini gösterebilmek için serbest radikallerle tepkimeye girerek onları etkisiz hale getirirler. Flavonoidlerin etki mekanizması şöyledir;

1. Serbest radikali ( $O_2^-$ ), hidroksil radikalini ( $\cdot OH$ ) ve singlet oksijeni ( $^1O_2$ ) temizler.
2. Peroksil radikalini ( $ROO\cdot$ ) ve alkoksil radikalını ( $RO\cdot$ ) yakalar, lipid peroksil ( $LOO\cdot$ ) zincirini kırar.
3. Demir ve bakır gibi geçiş metallerini şelatlar (Morel vd., 1993; Moreney vd., 1988).
4. Protein kinaz enzimini inhibe eder.

##### 5. Laktat transportunu engeller (Formica ve Regelson, 1995).

Flavonoidlerin bilinen özellikleri, serbest radikal süpürme, LDL oksidasyonunu önlemede güçlü antioksidan aktiviteleri, hidrolitik ve oksidatif enzimlerin (fosfolipaz A2, siklooksijenaz, lipooksijenaz) inhibisyonu ve antienflamatuar etkileridir. Çoğu bitki flavonoidleri, enzimatik reaksiyonları özellikle oksitlenmiş lipidleri üreten ve tepkimeye giren ürünleri inhibe eder. Bu enzimler, oksidanların ve antioksidanların varlığına son derece duyarlıdır. Fenolik antioksidanlar, çoklu doymamış lipidlerin ve LDL' nin peroksidasyonunu azaltabilir ve makrofaj köpük hücre oluşumunu azaltabilir (Steinberg vd., 1989; Esterbauer vd., 1992).

Çalışmamızın amacı *M. officinalis* subsp. *officinalis* bitkisinin farklı bitki büyüme düzenleyicileriyle yetiştirilen kallusların toplam fenolik, toplam flavonoid ve antioksidan kapasitesini belirlemektir. *M. officinalis* subsp. *officinalis* kallusların yetiştirilmesinde beş farklı bitki büyüme düzenleyicilerin kombinasyonları kullanılmıştır. Bu kapsamda, *M. officinalis* subsp. *officinalis* kallusları konsantrasyonları ve çözücülerini aynı tutularak bitki bitki büyüme düzenleyicilerin etkisiyle oluşacak farklar karşılaştırılmıştır. Kallus oluşumu gözlenen bitki örneklerinin her biri için toplam fenolik, toplam flavonoid ve antioksidan kapasite belirleme işlemi gerçekleştirilmiştir. Böylece bitkinin kallusların antioksidan özellikleri tespit edilip, ileri dönemlerde ilaç, tarım, gıda, kozmetik gibi alanlara sunulması sağlanacaktır. Ayrıca, yapılan literatür taramalarında daha önce böyle bir çalışmanın yapılmamış olması akademik önemini ve bitkinin literatür kaynağına katkısını arttıracaktır.

## 2. MATERYAL VE METOT

### 2.1. Materyal

#### 2.1.1. Bitki Materyali

Bu çalışmada, *Melissa officinalis* subsp. *officinalis* L. bitkisinin saksıda yetiştirilen fideleri kullanılmıştır. Fidelerin kurumaması için kültüre alınacakları gün yıpratılmadan toplanmıştır.

#### 2.1.2. Kullanılan Cihaz ve Malzemeler

UV-VIS Spektrofotometre: Shimadzu, UV-1800

Hassas terazi: Shimadzu TXB622L

pHmetre: Thermo Scientific Orion Star A111

Otoklav: JeioTech ST-85G

Sterilizatör: Jeo tech., ON-21E

Laminar kabin (Laminarflow): Thermo Scientific S2020 1.2

Blender: Spice&Herb Grinder, IC-10B

Otomatik pipetler: Brand Transferpette S,100-1000 µl

Manyetik karıştırıcı: Isolab MS-010

Buzdolabı: Hotpoint, Ariston, A+ Class

Murashige ve Skoog (MS): Caisson Biochemie

Sükroz: Carlo Erba

Agar: Lab M

Etil alkol %96: Merck

2,4-Diklorofenoksi asit (2,4-D): Duchefa

Indol Asetik Asit (IAA): Merck

Benzil Amino Pürin (BAP): Carl Roth

Kinetin (KIN): Caisson Biochemie

Picloram (PIC): Alfa Aesar

ABTS %98-HPLC: AFG Scientific

Potasyum peroksidisülfat: Merck

Trolox %97: Acros Organics

Dipotasyumhidrojenfosfat ( $K_2HPO_4$ ): Merck

Potasyumdihidrojenfosfat ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ): Merck

Gallik asit: Merck

Folin-Ciocalteu's phenol reagent: Merck

Sodyum karbonat: Sigma-Aldrich

Alüminyum klorür: Merck

Glasiyel asetik asit: Carlo Erba

Metanol: Sigma-Aldrich

Kuersetin: Merck

### 2.1.3. Kullanılan Çözeltiler

2 N' lik Folin-Ciocalteu reaktifi: 10 kat seyreltilerek kullanılmıştır.

%7.5' lik sodyum karbonat çözeltisi: 7.5 g  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  katısı tartılarak 100 ml saf suda çözünmüştür.

1 ml %2' lik  $\text{AlCl}_3$  (metanol/ glasiyel asetik asit (v/v)) çözeltisi: koruyucu maske takılarak 2 g  $\text{AlCl}_3$  katısı tartılmış, 100 ml' lik eşit oranda karıştırılmış metanol/glasiyel asetik asit (50/50 ml) karışımında çözünmüştür.

Fosfat tampon çözeltisi (50 mmol/L): 3.57 g dipotasyumhidrojenfosfat ( $\text{K}_2\text{HPO}_4$ ) ve 0.615 g potasyumdihidrojenfosfat ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ) 500 ml' lik balon jojelerde saf suyla hazırlanmıştır. Tampon çözeltinin pH değeri 7.2-7.4 arası olana kadar karıştırılmıştır.

7 mM ABTS stok çözeltisi: 77 mg ABTS üzerine 20 ml fosfat tampon çözeltisi eklenmiş çözüne kadar karıştırılmıştır. Farklı bir behere 13 mg potasyum persülfat ve 20 ml fosfat çözeltisi eklenmiş ve karıştırıcı yardımıyla çözünmüştür. Bu iki çözelti karıştırılmış, ışık geçirmeyecek şekilde etrafı folyo kaplı erlene koyulmuştur. Karışım daha sonra oda sıcaklığında 16 saat koyu mavi renk oluşana kadar bekletilmiştir.

Gallik asit çözeltisi: 50 mg gallik asit tartılıp bir behere konularak çözünmesi için üzerine bir iki damla etil alkol eklenmiştir. Çözeltinin konsantrasyonun ayarlanması için bu çözelti 100 ml' lik balon jojeye aktarılmış ve üzeri saf suyla tamamlanmıştır.

Kuersetin çözeltisi: 50 mg kuersetin tartılarak 100 ml' lik ölçülü bir balona aktarılmış ve balon çizgisine kadar suyla tamamlanmıştır.

Troloks stok çözeltisi (2.5 mmol/L): 32 mg troloks tartılarak bir beherde çözünmesi için üzerine birkaç damla etil alkol eklenmiştir. Çözünen bu çözelti 50 ml' lik ölçülü balona aktarılmış ve fosfat tamponu ile çizgisine kadar tamamlanmıştır.

## **2.2. Metot**

### **2.2.1. Bitkilerin Sterilizasyonu**

Çalışmada kullanılan *M. officinalis* subsp. *officinalis* fideleri musluk suyuyla yıkandıktan sonra ekilecek olan nod kısımları bisturiyle alınmıştır. Bitki kısımları 30 saniye %70' lik etil alkolde yavaşça karıştırılarak bekletilmiştir. Etil alkolden süzülen eksplantlar alkollenip steril kabin içine alınarak 5 dakika da %50 oranda saf suyla seyreltilmiş sodyum hipokloritte (NaClO) bekletilmiştir. Sodyum hipoklorit olarak %5' lik ticari çamaşır suyu kullanılmıştır. Sodyum hipokloritin bitkilere yüzey temasını artırmak için bekletilmeleri sırasında 1-2 damla tween 80 maddesi ilave edilmiştir. Eksplantların yüzey sterilizasyonu bittikten sonra çamaşır suyunun uzaklaştırılması için 3-4 kez saf sudan geçirilmiştir.

### **2.2.2. Ortam ve Malzeme Sterilizasyonu**

Kültür işleminin gerçekleşeceği laminar kabin çalışmadan önce etanol ve UV ışığı ile dezenfekte edilerek hazır hale getirilmiştir. Ekim aşamasında kullanılacak beher, pens, petri vb. malzemeler folyoyla kaplanarak 200 °C sterilizatörde steril edilmiştir. Sterilizasyonda kullanılacak steril sular ve besiyerleri de otoklavda 121 °C, 1 atm basınçta, 15 dakika dezenfekte edilmiştir.

### **2.2.3. Besi Ortamının Hazırlanması ve Bitkilerin Aktarımı**

Bu çalışmada bitki doku kültürü için temel gereksinimleri karşılayan ve sıklıkla kullanılan MS ortamı kullanılmıştır (Murashige ve Skoog, 1962). MS ortamı bitkilerin ihtiyacı olan su, makro ve mikro besin elementleri ve vitaminleri içermektedir (Tablo 2.1).

**Tablo 2.1.** MS kimyasalları ve miktarları (Murashige ve Skoog, 1962).

| <b>Kimyasallar</b>                                 | <b>Konsatrasyon (mg/L)</b> |
|----------------------------------------------------|----------------------------|
| KNO <sub>3</sub>                                   | 1900                       |
| (NH <sub>4</sub> )NO <sub>3</sub>                  | 1650                       |
| MgSO <sub>4</sub> 7H <sub>2</sub> O                | 370                        |
| CaCl <sub>2</sub> 2H <sub>2</sub> O                | 440                        |
| KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>                    | 170                        |
| Na <sub>2</sub> EDTA                               | 33.6                       |
| FeSO <sub>4</sub> 7H <sub>2</sub> O                | 27.8                       |
| MnSO <sub>4</sub> 4H <sub>2</sub> O                | 22.3                       |
| ZnSO <sub>4</sub> 7H <sub>2</sub> O                | 8.6                        |
| H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>                     | 6.2                        |
| <b>KI</b>                                          | <b>0.83</b>                |
| Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> 2H <sub>2</sub> O | 0.25                       |
| CoCl <sub>2</sub> 6H <sub>2</sub> O                | 0.025                      |
| CuSO <sub>4</sub> 5H <sub>2</sub> O                | 0.025                      |
| Myo-inositol                                       | 100                        |
| Pyridoxin -HCl                                     | 0.5                        |
| Nicotinicacid                                      | 0.5                        |
| Thamin -HCl                                        | 0.1                        |
| Glisin                                             | 2                          |
| Sakkaroz                                           | 30000                      |
| pH                                                 | 5.7                        |

Çalışmada, MS ortamında 2,4-Diklorofenoksi asit (2,4-D), Indol Asetik Asit (IAA) Benzil Amino pürin (BAP), Kinetin (KIN) ve Picloram (PIC) bitki büyüme düzenleyicilerinin kombinasyonları kullanılmıştır. Büyüme düzenleyicilerin kombinasyonları Tablo 2.2' de verilmiştir.

**Tablo 2.2.** Bitki büyüme düzenleyicilerin kombinasyonları

| <b>Besi yeri ortamı</b> | <b>2,4-D(mg/L)</b> | <b>IAA(mg/L)</b> | <b>BAP(mg/L)</b> | <b>PIC(mg/L)</b> | <b>KIN(mg/L)</b> |
|-------------------------|--------------------|------------------|------------------|------------------|------------------|
| 1                       | 1                  | 1                | 0.5              | -                | -                |
| 2                       | 1.5                | 1                | 0.5              | -                | -                |
| 3                       | 2                  | 1                | 0.5              | -                | -                |
| 4                       | 1                  | -                | -                | 1                | 0.5              |
| 5                       | 1.5                | -                | -                | 1                | 0.5              |
| 6                       | 2                  | -                | -                | 1                | 0.5              |
| 7                       | 1                  | -                | 0.5              | -                | -                |
| 8                       | 1.5                | -                | 0.5              | -                | -                |
| 9                       | 2                  | -                | 0.5              | -                | -                |
| 10                      | -                  | -                | 0.5              | 1                | -                |
| 11                      | -                  | -                | 0.5              | 1.5              | -                |
| 12                      | -                  | -                | 0.5              | 2                | -                |

Besiyerleri hazırlamasında 4.4 g/L MS, 30 g/L sakkaroz olacak şekilde tartılıp, çalkalayıcı yardımıyla çözünmesi sağlanmıştır. Çözünen besiyerleri pH değeri 5.7-5.8 şekilde ayarlanmış ve katılaşması için 8 g/L katılaştırıcı jel (Agar) eklenmiştir. Farklı bitki büyüme düzenleyicileri kombinasyonlarının ekleneceği besiyerleri ayırt edilebilmeleri için kodlama işlemi yapılmıştır. Tablo 2.2' de görüldüğü gibi 12 farklı kombinasyonda hazırlanan besiyerleri her bir kombinasyondan 5 tekrarlı olacak şekilde (12×5= 60 petri) hazırlanmıştır. Hazırlanan besiyerleri sterilizasyon işlemi yapıldıktan sonra, steril kabinde ekim yapılacak her bir petriye 30 ml eklenmiştir. Besiyerleri, katılaşması ve kontaminasyon riskini azaltmak için 24 saat laminar kabinde bekletilmiştir. Ekimin gerçekleşeceği gün, *M. officinalis* subsp. *officinalis* eksplantları gerekli sterilizasyon işleminden sonra her bir petriye 5 nod kısmı gelecek şekilde karşılıklı olarak ekilmişlerdir.

#### **2.2.4. Kallus Gelişimi**

Ekimi gerçekleşen bitkiler  $\pm 22$  °C de, 2500 lux floresan ışık altında, 16 saat aydınlık/8 saat karanlık fotoperiyot şartlarda iklim odalarında bekletilerek, günlük olarak kallus gelişimi gözlenmiştir. Bu arada kontamine olan kültür kapları (24 petri) kültür ortamından uzaklaştırılıp, otoklavda steril edilmiştir. Takip edilen kültürlerin 2-3 haftada kallus gelişimi başlamış ve 6 haftada gelişimini tamamlayan kalluslar analiz aşamasına gelmiştir.

#### **2.2.5. Kallus Ekstraksiyonu**

Besiyerinde yetiştirilen *M. officinalis* subsp. *officinalis* kallusları pens yardımıyla dikkatli bir şekilde petriden alınmıştır. Bitki büyüme düzenleyicilerine göre ayrılan kalluslar saf sudan geçirilerek 50 °C etüvde kurumaya bırakılmıştır. Kuruyan kalluslar hassas teraziyle 0.1 gram olacak şekilde tartılmış ve bitki büyüme düzenleyicilerine göre kodlanan falkonlara aktarılmıştır. Kallus ekstraksiyonu için etanol ve su olmak üzere iki çözücü kullanılmıştır. Her bir kallus üzerine ayrı olarak 4 ml %96' lık etanol sıvısı veya 4 ml saf su pipetle eklenmiş ve falkonların etrafı streç filmle sarılmıştır. Çözeltiler etkisini gösterebilmesi için 72 saat buzdolabında saklanmıştır. Zamanı dolan çözeltiler blender yardımıyla 1-2 dk kadar parçalanmıştır. Daha sonra bu çözeltiler huniye yerleştirilen Whatman filtre kağıtıyla süzölmüş ve tekrar hava almayacak şekilde kapatılmıştır. Bu çözeltiler daha sonra analizlerde kullanmak amacıyla buzdolabında saklanmıştır.

### 2.2.6. Toplam Fenolik Madde Analizi

Deneyde Singleton ve Rossi (1965)'nin uyguladığı Folin-Ciocalteu metoduna göre fenolik madde analizi yapılmıştır. Bu yöntemde göre, 300 µl *M. officinalis* subsp. *officinalis* kallus ekstresi ve 1.5 ml 2 N'lik Folin-Ciocalteu reaktifi cam tüplerde karıştırılmıştır. Bu karışım 1-2 dakika bekletildikten sonra %7.5'lik sodyum karbonat çözeltisinden 1.2 ml eklenip, vortekste karıştırılmış ve 25 °C'de karanlıkta 90 dk bekletildikten sonra UV-VIS spektrofotometrede 765 nm'de absorbans köre (su) karşı ölçülmüştür. Toplam fenol içeriği gallik asit kalibrasyon eğrisinden yararlanılarak gallik asit eşdeğeri (GAE) olarak verilmiştir. Kalibrasyon eğrisi gallik asidin 5 farklı konsantrasyonlarına (0.1;0.2;0.3;0.4;0.5 mg/ml) karşı hesaplanan absorbans değerleriyle okunmuştur.

Kalibrasyon eğrisi için; kalibrasyon için belirlenen beş farklı konsantrasyon için önceden hazırlanan 0.5 mg/ml'lik gallik asit çözeltisi seyreltilerek geriye kalan dört konsantrasyonun eldesi sağlanmıştır. Hazırlanan çözeltilerin her birinden ayrı olarak fenolik madde analizi yapılarak absorbans değerleri okunmuştur. Konsantrasyon değerlerine karşı okunan absorbans değerleri Excel'e taşınarak  $y=ax+b$  regresyon grafiği ve  $R^2$  değeri verilmiştir.

### 2.2.7. Toplam Flavonoid Analizi

Flavonoid içeriğinin saptanmasında metanolik form kullanılmıştır (Lamaison vd., 1990). Bu analiz için bitki kallus ekstresinden 1 ml ve 1 ml %2'lik  $AlCl_3$  çözeltisi karıştırılmıştır. Daha sonra tepkime karışımı 10 dakika oda sıcaklığında bekletilmiştir. Örneklerin absorbansları 394 nm dalga boyunda UV-VIS spektrofotometrede, kontrol örnek %2'lik  $AlCl_3$ 'e karşı okunmuştur. Flavonoid derişimi kuersetinin kalibrasyon eğrisi ile karşılaştırılarak hesaplanmıştır. Kalibrasyon eğrisi kuersetinin 5 farklı konsantrasyonlarına (0.1;0.2;0.3;0.4;0.5 mg/ml) karşı hesaplanan absorbans değerleriyle okunmuştur.

Kalibrasyon eğrisi için; kalibrasyon için belirlenen beş farklı konsantrasyon için önceden hazırlanan 0.5 mg/ml'lik kuersetin çözeltisi seyreltilerek geriye kalan dört konsantrasyonun eldesi sağlanmıştır. Hazırlanan çözeltilerin her birinden ayrı olarak flavonoid analizi yapılarak absorbans değerleri okunmuştur. Konsantrasyon değerlerine

karşı okunan absorbans değerleri Excel' e taşınarak  $y=ax+b$  regresyon grafiği ve  $R^2$  değeri verilmiştir.

### 2.2.8. Antioksidan Kapasite Analizi

Ekstrelerin antioksidan kapasitesi, ABTS [2,2'-azonobis(3-etilbenzothiazoline-6-sulfonat)] radikal katyon yakalama kabiliyetine dayanılarak ölçülmüştür. Bu metoda göre ABTS, peroksil veya diğer oksidanlara okside olmakta ve  $ABTS^{•+}$  radikali oluşmaktadır.  $ABTS^{•+}$  radikal katyonu, ABTS çözeltisinin persülfat ile oksidasyonu sonucunda oluşturulmaktadır. Öncesinde hazırlanan koyu mavi renkli bu çözeltide antioksidanın etkisiyle  $ABTS^{•+}$  katyonu parçalanmış ve koyu mavi renkli çözeltinin rengi açılmıştır. Örnek çözeltisindeki rengin azalması antioksidan kapasitenin bir göstergesidir (Miller vd., 1995). Antioksidan kapasite analizi için, ABTS stok çözeltisi fosfat tampon çözelti ile absorbans 734 nm de 0.7-0.8 olana kadar seyreltilmiştir. Seyreltilmiş çözelti her zaman deneyden önce hazırlanmış ve ışıktan korunmuştur. Daha sonra cam tüplere 1900 µl seyreltilmiş ABTS çözeltisi ve 100 µl *M. officinalis* subsp. *officinalis* kallus ekstresi eklenerek karıştırılmıştır. Örneklerin absorbansları 6 dakika sonunda 734 nm UV-VIS spektrofotometrede köre (fosfat tamponu) karşı okunmuştur. Antioksidan kapasitenin belirlenmesi için kullanılan bu yöntem TEAC (Troloks eşdeğer antioksidan kapasite) olarak adlandırılmakta ve sonuçlar troloks standart olarak kabul edilerek verilmektedir. Troloks [6-hidroksi-2-Hidroksi-2,5,7,8-tetrametilkroman-2-karboksilik asit], E vitamininin suda çözünür eşdeğeridir. Troloks canlı sistemlerde doğal olarak bulunan bir bileşik olmamakla birlikte pek çok antioksidan kapasite tayin yönteminde standart olarak kullanılmaktadır (Re vd., 1999). Troloks antioksidan kullanılarak bir kalibrasyon grafiği hazırlanmış ve bilinmeyen antioksidanın kapasitesi bu grafikten TEAC olarak verilmiştir (Damar, 2010).

Kalibrasyon eğrisi için; troloks stok çözeltisi 50 ml' lik balonlara sırasıyla 1;2;4;6;8 ml pipetlenmiştir, daha sonra balonlar çizgisine kadar fosfat tamponuyla tamamlanmıştır (0.05-0.4 mmol/L). Seyreltilerek hazırlanan beş farklı konsantrasyondaki troloksun antioksidan kapasitesi için biri tanık 1900 µl seyreltilmiş ABTS + 100 µl fosfat tamponu, diğeri örnek 1900 µl seyreltilmiş ABTS + 100 µl troloks çözeltisi olarak ayrılan küvetlerdeki çözeltilerin 6 dakika sonunda absorbansları spektrofotometrede ölçülmüştür. Troloks örnekleri ile tanık arasındaki absorbans farkı alınarak değerler Excel' e taşınmış ve regresyon denklemi  $y= ax + b$  ve  $R^2$  değeri belirlenmiştir.

### **2.2.9. İstatiksel Veriler**

Yapılan üç analiz için her bir kallus ektresinde 5 tekrarlı okuma yapılarak konsantrasyon değerleri hesaplanmış ve bu değerlerin standart sapmaları Excel’ de hesaplanarak verilmiştir.



### 3. BULGULAR

Bu çalışmada *M. officinalis* subsp. *officinalis* bitkisinden elde edilen kallusların antioksidan özellikleri belirlenmiştir. Kallus ekstraktları farklı bitki büyüme düzenleyici kombinasyonları içeren besiyerinde yetiştirilmiştir. Ekstraksiyon yöntem ve konsantrasyonları aynı olan kallus ekstraktları analizleri farklı ölçümlerle araştırılmıştır. Ekstrelerin toplam fenolik madde, toplam flavonoid ve antioksidan kapasite verileri hesaplanmıştır.

#### 3.1. Toplam Fenolik Madde Analizi

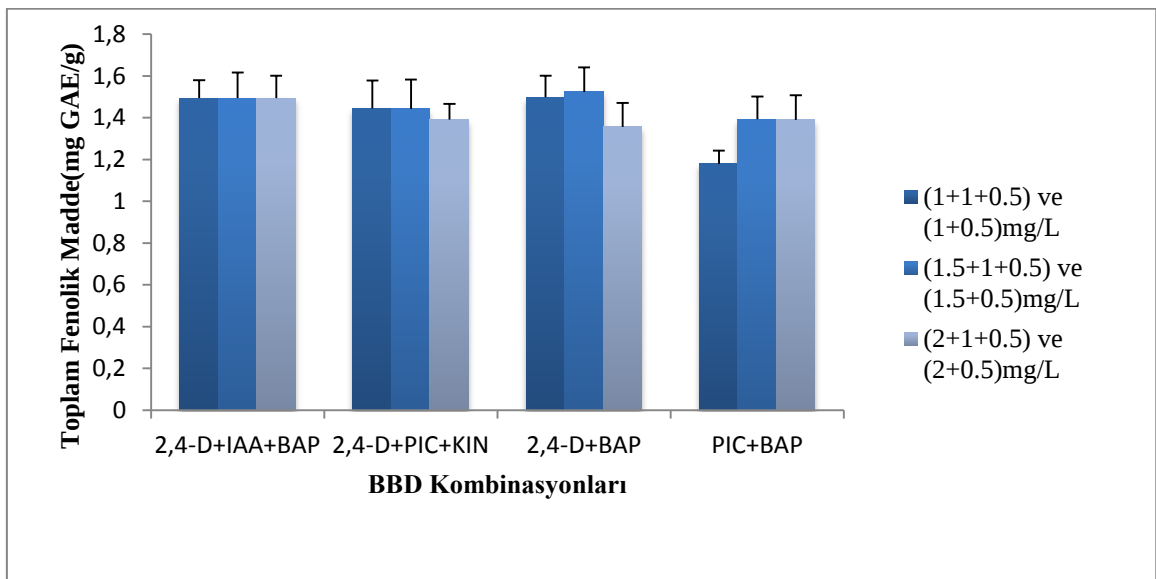
*M. officinalis* subsp. *officinalis* bitkisinden elde edilen kallus ekstraktlarının toplam fenolik madde içeriği analiz edilmiştir. Sonuçlar gallik asit kalibrasyon eğrisine göre mg gallik asit eşdeğer/g şeklinde ifade edilmiştir. Gallik asit kalibrasyon eğrisinden elde edilen  $y = 2.092x + 0.080$  formülüne göre sonuçlar hesaplanmıştır.

*M. officinalis* subsp. *officinalis* kallus etanol ekstraktlarının farklı bitki büyüme düzenleyicilerine göre toplam fenolik madde içerikleri tablo 3.1’ de gösterilmiştir. Gallik asit kalibrasyon eğrisine göre kallus etanol ekstraktlarının toplam fenolik madde içerikleri  $1.178 \pm 0.064 - 1.523 \pm 0.117$  mg GAE/g arasında olduğu belirlenmiştir. On iki farklı büyüme düzenleyicisi kombinasyonlarıyla elde edilen kallusların her birinin toplam fenolik madde içeriği, çok yüksek değerler olmamakla beraber birbirlerinden farklı olarak tespit edilmiştir. Bu sonuçlara bağlı olarak, en yüksek toplam fenolik madde içeriği  $1.523 \pm 0.117$  mg GAE/g olarak 1.5 mg/L 2,4-D + 0.5 mg/L BAP bitki büyüme düzenleyici kombinasyonundaki kallus etanol ekstresinden elde edilmiştir. En düşük toplam fenolik içeriği ise,  $1.178 \pm 0.064$  mg GAE/g olarak 1 mg/L PIC + 0.5 mg/L BAP bitki büyüme düzenleyici kombinasyonundaki kallus etanol ekstresinden elde edilmiştir. Fenolik madde bakımından etanol ekstraktlarındaki BBD’ lerini 2,4-D+IAA+BAP, 2,4-D+PIC+KIN, 2,4-D+BAP ve PIC+BAP kombinasyonları şeklinde kendi içinde karşılaştırdığımızda, en yüksek toplam fenolik madde içeriği sırasıyla 1.5 mg/L 2,4-D + 1 mg/L IAA + 0.5 mg/L BAP, 1 mg/L 2,4-D + 1 mg/L PIC + 0.5 mg/L KIN, 1.5 mg/L 2,4-D + 0.5 mg/L BAP ve 1.5 mg/L PIC + 0.5 mg/L BAP BBD kombinasyonlarında tespit edilmiştir (Şekil 3.1). Etanol ekstraktları için BBD kombinasyonlarında toplam fenolik madde içeriğinin değişimi incelendiğinde 2,4-D+IAA+BAP, 2,4-D+PIC+KIN, 2,4-D+BAP kombinasyonlarında 2,4-D BBD’ si miktarının 1.5 mg/L üzerindeki değerlerde toplam fenolik içeriğinin düştüğü

gözlenmiştir. Buna paralel olarak PIC+BAP BBD kombinasyonunda PIC BBD'si miktarının 1.5 mg/L üzerindeki değerlerde toplam fenolik madde içeriğinin düştüğü belirlenmiştir (Şekil 3.1).

**Tablo 3.1.** Kallus etanol ekstratlarının toplam fenolik madde içerikleri

| Büyüme düzenleyici kombinasyonları | Toplam fenolik madde (mg GAE/g) |
|------------------------------------|---------------------------------|
| 1                                  | 1.493±0.086                     |
| 2                                  | 1.496±0.124                     |
| 3                                  | 1.395±0.108                     |
| 4                                  | 1.445±0.133                     |
| 5                                  | 1.442±0.141                     |
| 6                                  | 1.391±0.075                     |
| 7                                  | 1.498±0.103                     |
| 8                                  | 1.523±0.117                     |
| 9                                  | 1.356±0.115                     |
| 10                                 | 1.178±0.064                     |
| 11                                 | 1.392±0.109                     |
| 12                                 | 1.389±0.119                     |



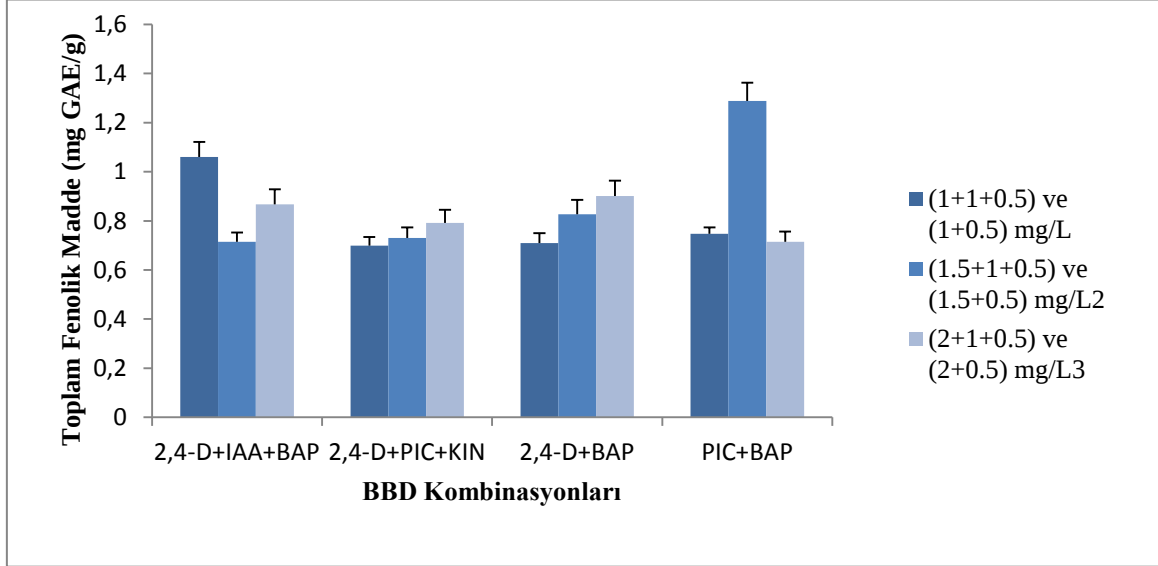
**Şekil 3.1.** Kallus etanol ekstratlarındaki fenolik maddelerin BBD'lere göre karşılaştırma grafiği

**Tablo 3.2.** Kallus su ekstrelerinin toplam fenolik madde içerikleri

| Büyüme düzenleyici kombinasyonları | Toplam fenolik madde (mg GAE/g) |
|------------------------------------|---------------------------------|
| 1                                  | 1.060±0.062                     |
| 2                                  | 0.715±0.037                     |
| 3                                  | 0.867±0.061                     |
| 4                                  | 0.699±0.035                     |
| 5                                  | 0.731±0.042                     |
| 6                                  | 0.792±0.053                     |
| 7                                  | 0.710±0.040                     |
| 8                                  | 0.827±0.058                     |
| 9                                  | 0.901±0.063                     |
| 10                                 | 0.747±0.026                     |
| 11                                 | 1.288±0.075                     |
| 12                                 | 0.715±0.042                     |

*M. officinalis* subsp. *officinalis* kallus su ekstrelerinin farklı bitki büyüme düzenleyicilerine göre toplam fenolik madde içerikleri tablo 3.2’ de gösterilmiştir. Gallik asit kalibrasyon eğrisine göre kallus su ekstrelerinin toplam fenolik madde içerikleri 0.699±0.035 – 1.288±0.075 mg GAE/g arasında olduğu belirlenmiştir. Buna göre, en yüksek toplam fenolik madde içeriği 1.288±0.075 mg GAE/g olarak 1.5 mg/L PIC + 0.5 mg/L BAP bitki büyüme düzenleyici kombinasyonunda kallus su ekstresinden elde edilmiştir. En düşük toplam fenolik içeriği ise, 0.699±0.035 mg GAE/g olarak 1 mg/L 2,4-D + 1 mg/L PIC + 0.5 mg/L KIN bitki büyüme düzenleyici kombinasyonunda kallus su ekstresinden elde edilmiştir. Fenolik madde bakımından su ekstrelerindeki BBD’ lerini kendi içinde karşılaştırdığımızda, 2,4-D+IAA+BAP, 2,4-D+PIC+KIN, 2,4-D+BAP ve PIC+BAP kombinasyonlarında en yüksek toplam fenolik madde içeriği sırasıyla 1 mg/L 2,4-D + 1 mg/L IAA + 0.5 mg/L BAP, 2 mg/L 2,4-D + 1 mg/L PIC + 0.5 mg/L KIN, 2 mg/L 2,4-D + 0.5 mg/L BAP ve 1.5 mg/L PIC + 0.5 mg/L BAP BBD kombinasyonlarında tespit edilmiştir (Şekil 3.2). Su ekstreleri için toplam fenolik madde içeriğinin değişimi incelendiğinde 2,4-D+PIC+KIN, 2,4-D+BAP BBD kombinasyonlarında 2,4-D BBD’ si miktarının arttırıldığı ortamlarda toplam fenolik içeriğinin arttığı, buna rağmen PIC+BAP

BBD kombinasyonunda ise PIC BBD'si miktarının 1.5 mg/L üzerindeki değerlerde toplam fenolik madde içeriğinin düştüğü belirlenmiştir.



Şekil 3.2. Kallus su ekstrelerindeki fenolik maddelerin BBD'lere göre karşılaştırma grafiği

### 3.2. Toplam Flavonoid Analizi

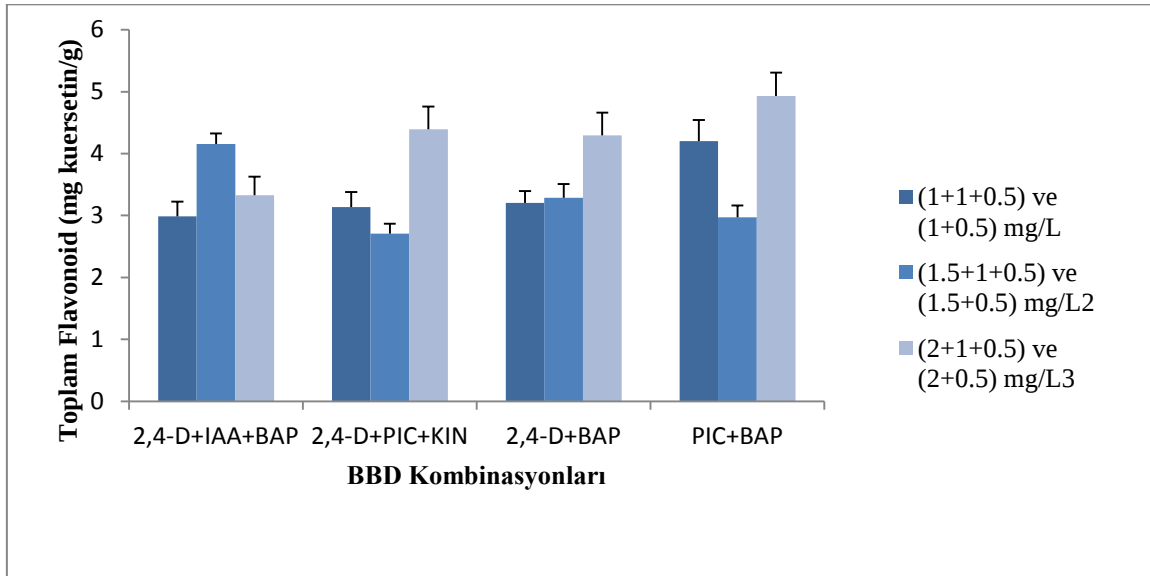
*M. officinalis* subsp. *officinalis* kallus ekstrelerinde bulunan toplam flavonoid bileşiklerin konsantrasyonları analiz edilmiştir. Kuersetinin kalibrasyon eğrisinden elde edilen sonuçlar mg kuersetin/g şeklinde ifade edilmiştir. Elde edilen grafik denklemi  $y = 0.340x - 0.037$  olarak bulunmuştur.

*M. officinalis* subsp. *officinalis* kallus etanol ekstrelerinin farklı bitki büyüme düzenleyicilerine göre toplam flavonoid içerikleri tablo 3.3' de gösterilmiştir. Kuersetin kalibrasyon eğrisine göre kallus etanol ekstrelerinin toplam flavonoid içerikleri  $2.709 \pm 0.157$  –  $4.930 \pm 0.379$  mg kuersetin/g arasında olduğu belirlenmiştir. Tablo 3.3' deki verilere göre toplam flavonoid içeriği karşılaştırıldığında, en yüksek  $4.930 \pm 0.379$  mg kuersetin/g olarak 2 mg/L PIC + 0.5 mg/L BAP bitki büyüme düzenleyici kombinasyonu uygulamasında, en düşük  $2.709 \pm 0.157$  mg kuersetin/g olarak 1.5 mg/L 2,4-D + 1 mg/L PIC + 0.5 mg/L KIN bitki büyüme düzenleyici kombinasyonu uygulamasında tespit edilmiştir. Flavonoid içeriği bakımından etanol ekstrelerindeki BBD' lerini kendi içinde karşılaştırdığımızda 2,4-D+IAA+BAP, 2,4-D+PIC+KIN, 2,4-D+BAP ve PIC+BAP kombinasyonlarında en yüksek toplam flavonoid içeriği sırasıyla 1.5 mg/L 2,4-D + 1 mg/L IAA + 0.5 mg/L BAP, 2 mg/L 2,4-D + 1 mg/L PIC + 0.5 mg/L KIN, 2 mg/L 2,4-D + 0.5

mg/L BAP, 2 mg/L PIC + 0.5 mg/L BAP BBD kombinasyonlarında tespit edilmiştir (Şekil 3.3). Etanol ekstraktları için toplam flavonoid içeriğinin değişimi incelendiğinde 2,4-D+PIC+KIN, 2,4-D+BAP BBD kombinasyonlarında 2,4-D BBD' si miktarının 1 mg/L üzerindeki değerlerde toplam flavonoid içeriğinin düştüğü gözlenmiştir. Buna rağmen PIC+BAP BBD kombinasyonunda ise PIC BBD'si miktarının 1.5 mg/L üzerindeki değerlerde toplam flavonoid içeriğinin arttığı belirlenmiştir.

**Tablo 3.3.** Kallus etanol ekstraktlarının toplam flavonoid içerikleri

| Büyüme düzenleyici kombinasyonları | Toplam flavonoid (mg kuersetin/g) |
|------------------------------------|-----------------------------------|
| 1                                  | 2.985±0.238                       |
| 2                                  | 4.157±0.166                       |
| 3                                  | 3.330±0.299                       |
| 4                                  | 3.137±0.244                       |
| 5                                  | 2.709±0.157                       |
| 6                                  | 4.392±0.368                       |
| 7                                  | 3.206±0.189                       |
| 8                                  | 3.288±0.223                       |
| 9                                  | 4.295±0.365                       |
| 10                                 | 4.199±0.344                       |
| 11                                 | 2.971±0.190                       |
| 12                                 | 4.930±0.379                       |



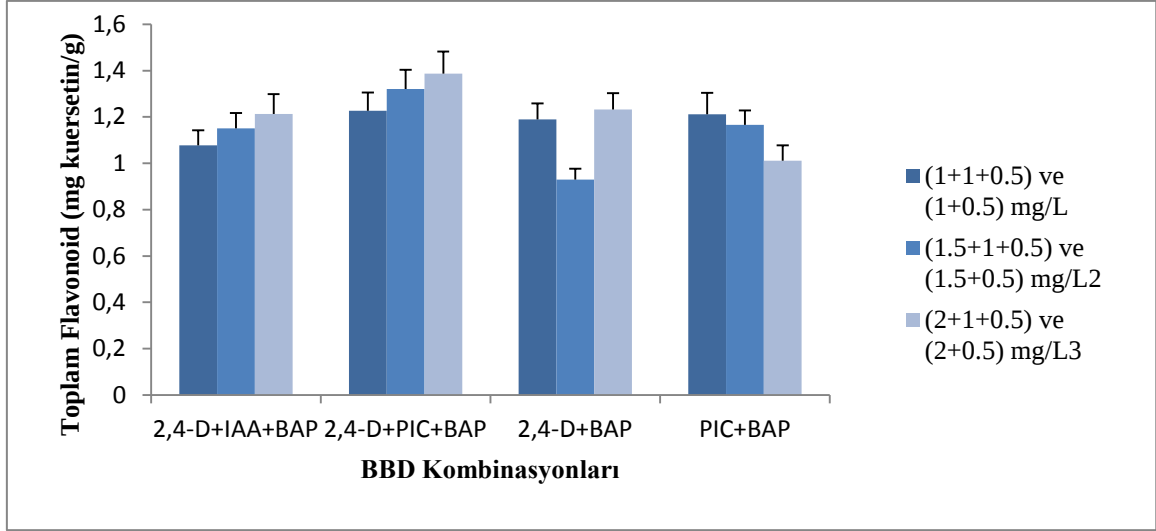
**Şekil 3.3.** Kallus etanol ekstraktlarındaki toplam flavonoid içeriğinin BBD'lere göre karşılaştırma grafiği

*M. officinalis* subsp. *officinalis* kallus su ekstraktlarının farklı bitki büyüme düzenleyicilerine göre toplam flavonoid içerikleri tablo 3.4' de gösterilmiştir. Kuersetin

kalibrasyon eğrisine göre kallus su ekstrelerinin toplam flavonoid içerikleri  $0.930 \pm 0.047 - 1.387 \pm 0.095$  mg kuersetin/g arasında olduğu belirlenmiştir. Tablo 3.4’ deki verilere göre toplam flavonoid içeriği, en yüksek  $1.387 \pm 0.095$  mg kuersetin/g olarak 2 mg/L 2,4-D + 1 mg/L PIC + 0.5 mg/L KIN bitki büyüme düzenleyici kombinasyonunda, en düşük  $0.930 \pm 0.047$  mg kuersetin/g olarak 1.5 mg/L 2,4-D + 0.5 mg/L BAP bitki büyüme düzenleyici kombinasyonunda tespit edilmiştir. Flavonoid içeriği bakımından su ekstrelerindeki BBD’ lerini kendi içinde karşılaştırdığımızda, 2,4-D+IAA+BAP, 2,4-D+PIC+KIN, 2,4-D+BAP ve PIC+BAP kombinasyonlarında en yüksek toplam flavonoid içeriği sırasıyla 2 mg/L 2,4-D + 1 mg/L IAA + 0.5 mg/L BAP, 2 mg/L 2,4-D + 1 mg/L PIC + 0.5 mg/L KIN, 2 mg/L 2,4-D + 0.5 mg/L BAP ve 1 mg/L PIC + 0.5 mg/L BAP BBD kombinasyonlarında tespit edilmiştir (Şekil 3.4). Su ekstrelerinde toplam flavonoid içeriğinin değişimi incelendiğinde 2,4-D+IAA+BAP, 2,4-D+PIC+KIN BBD kombinasyonlarında 2,4-D BBD’ si miktarının artırıldığı kombinasyonlarda toplam flavonoid içeriğinin arttığı gözlenmiştir. Buna rağmen PIC+BAP BBD kombinasyonunda ise PIC BBD’si miktarının artırıldığı kombinasyonlarda toplam flavonoid içeriğinin düştüğü belirlenmiştir.

**Tablo 3.4.** Kallus su ekstrelerinin toplam flavonoid içerikleri

| Büyüme düzenleyici kombinasyonları | Toplam flavonoid madde (mg kuersetin/g) |
|------------------------------------|-----------------------------------------|
| 1                                  | $1.077 \pm 0.065$                       |
| 2                                  | $1.151 \pm 0.066$                       |
| 3                                  | $1.213 \pm 0.086$                       |
| 4                                  | $1.227 \pm 0.079$                       |
| 5                                  | $1.321 \pm 0.083$                       |
| 6                                  | $1.387 \pm 0.095$                       |
| 7                                  | $1.190 \pm 0.069$                       |
| 8                                  | $0.930 \pm 0.047$                       |
| 9                                  | $1.232 \pm 0.071$                       |
| 10                                 | $1.211 \pm 0.093$                       |
| 11                                 | $1.166 \pm 0.062$                       |
| 12                                 | $1.011 \pm 0.066$                       |



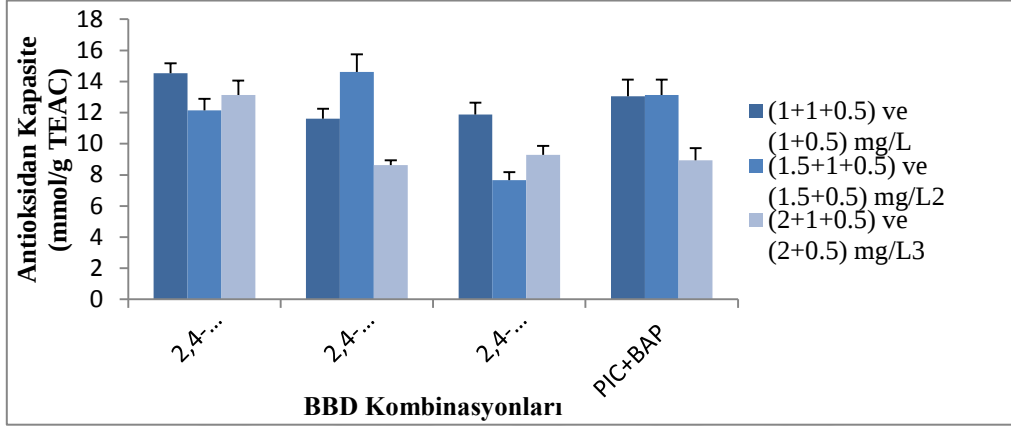
Şekil 3.4. Kallus su ekstrelerindeki toplam flavonoid içeriğin BBD'lere göre karşılaştırma grafiği

### 3.3. Antioksidan Kapasite Analizi

Antioksidan kapasiteyi belirleyebilmek için troloks eşdeğer antioksidan kapasite testi yapılmıştır. Bunun için troloks standart olarak seçilmiş ve bir kalibrasyon eğrisi oluşturulmuştur. *M. officinalis* subsp. *officinalis* bitkisinden elde edilen kallus etanol ve su ekstrelerinin antioksidan kapasitesi, mmol/g TEAC olarak tespit edilmiştir. Sonuçlar troloks kalibrasyon eğrisinden elde edilen  $y = 0.680x - 0.003$  formülüne göre hesaplanmıştır.

*M. officinalis* subsp. *officinalis* kallus etanol ekstrelerinin farklı bitki büyüme düzenleyicilerine göre antioksidan kapasitesi Tablo 3.5' de verilmiştir. Bu sonuçlara göre kallus etanol ekstrelerinin antioksidan kapasitesinde  $7.66 \pm 0.51 - 14.61 \pm 1.14$  mmol/g TEAC arası değerler elde edilmiştir. *M. officinalis* subsp. *officinalis* kallus etanol ekstrelerinin antioksidan kapasitesi en yüksek  $14.61 \pm 1.14$  mmol/g TEAC olarak 1.5 mg/L 2,4-D + 1 mg/L PIC + 0.5 mg/L KIN bitki büyüme düzenleyici kombinasyonunda, en düşük  $7.66 \pm 0.51$  mmol/g TEAC olarak 1.5 mg/L 2,4-D + 0.5 mg/L BAP bitki büyüme düzenleyici kombinasyonunda tespit edilmiştir. Antioksidan kapasite bakımından etanol ekstrelerindeki BBD' lerini kendi içinde karşılaştırdığımızda 2,4-D+IAA+BAP, 2,4-D+PIC+KIN, 2,4-D+BAP ve PIC+BAP kombinasyonlarında en yüksek antioksidan kapasitesi sırasıyla 1 mg/L 2,4-D + 1 mg/L IAA + 0.5 mg/L BAP, 1.5 mg/L 2,4-D + 1 mg/L PIC + 0.5 mg/L KIN, 1 mg/L 2,4-D + 0.5 mg/L BAP, 1.5 mg/L PIC + 0.5 mg/L BAP BBD kombinasyonlarında tespit edilmiştir (Şekil 3.5). Etanol ekstrelerinde antioksidan

kapasite değişimine bakıldığında 2,4-D+IAA+BAP, 2,4-D+BAP BBD kombinasyonlarında 2,4-D BBD' si miktarının 1 mg/L üzerindeki değerlerde antioksidan kapasite miktarının düştüğü gözlenmektedir. Buna paralel olarak PIC+BAP BBD kombinasyonunda PIC BBD' si miktarının 1.5 mg/L üzerindeki değerlerde antioksidan kapasite miktarının düştüğü belirlenmiştir.



Şekil 3.5. Kallus etanol ekstraktlarındaki antioksidan kapasitenin BBD'lere göre karşılaştırma grafiği

Tablo 3.5. Kallus etanol ekstraktlarının antioksidan kapasiteleri

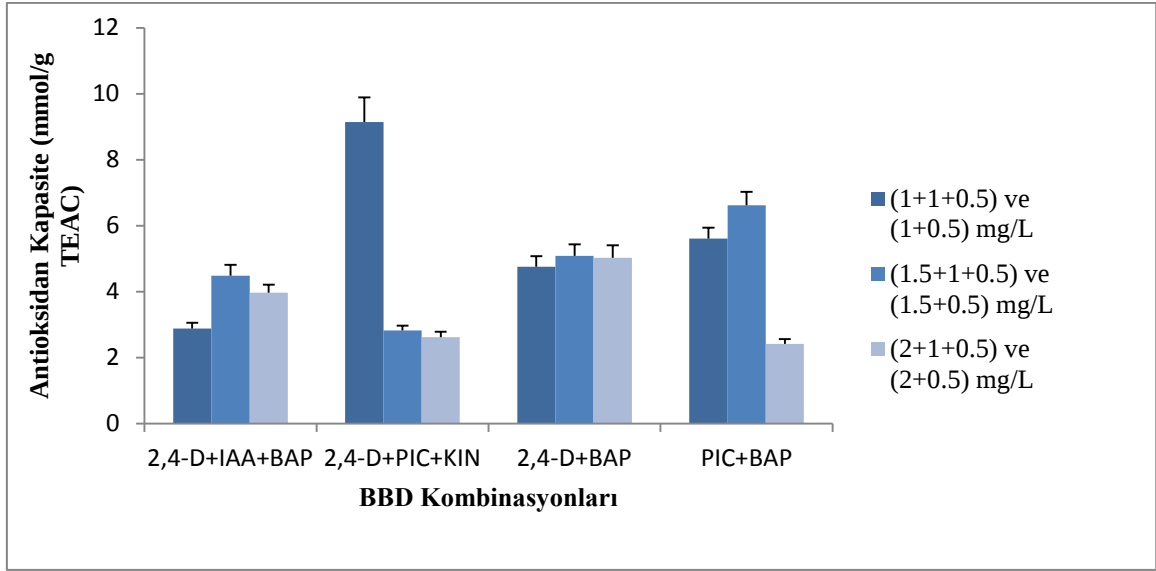
| Büyüme düzenleyici kombinasyonları | Antioksidan kapasite (mmol/g TEAC) |
|------------------------------------|------------------------------------|
| 1                                  | 14.53±0.63                         |
| 2                                  | 12.14±0.75                         |
| 3                                  | 13.14±0.91                         |
| 4                                  | 11.62±0.62                         |
| 5                                  | 14.61±1.14                         |
| 6                                  | 8.63±0.31                          |
| 7                                  | 11.87±0.76                         |
| 8                                  | 7.66±0.51                          |
| 9                                  | 9.29±0.57                          |
| 10                                 | 13.06±1.05                         |
| 11                                 | 13.14±0.98                         |
| 12                                 | 8.93±0.79                          |

*M. officinalis* subsp. *officinalis* kallus su ekstraktlarının farklı bitki büyüme düzenleyicilerine göre antioksidan kapasitesi Tablo 3.6' de verilmiştir. Bu sonuçlara göre

kallus su ekstralarının antioksidan kapasitesinde  $2.42 \pm 0.14$  –  $9.15 \pm 0.74$  mmol/g TEAC değerler elde edilmiştir. *M. officinalis* subsp. *officinalis* kallus su ekstralarının antioksidan kapasitesi en yüksek  $9.15 \pm 0.74$  mmol/g TEAC olarak 1 mg/L 2,4-D + 1 mg/L PIC + 0.5 mg/L KIN bitki büyüme düzenleyici kombinasyonunda, en düşük  $2.42 \pm 0.14$  mmol/g TEAC olarak 2 mg/L PIC + 0.5 mg/L BAP bitki büyüme düzenleyici kombinasyonunda tespit edilmiştir. Antioksidan kapasite bakımından su ekstralarında BBD'lerini kendi içinde karşılaştırdığımızda 2,4-D+IAA+BAP, 2,4-D+PIC+KIN, 2,4-D+BAP ve PIC+BAP kombinasyonlarında en yüksek antioksidan kapasitesi sırasıyla 1.5 mg/L 2,4-D + 1 mg/L IAA + 0.5 mg/L BAP, 1mg/L 2,4-D + 1 mg/L PIC + 0.5 mg/L KIN, 1.5 mg/L 2,4-D + 0.5 mg/L BAP ve 1.5 mg/L PIC + 0.5 mg/L BAP BBD kombinasyonlarında tespit edilmiştir (Şekil 3.6). Su ekstralarında antioksidan kapasite değişimine bakıldığında 2,4-D+IAA+BAP, 2,4-D+BAP BBD kombinasyonlarında 2,4-D BBD' si miktarının 1.5 mg/L üzerindeki değerlerde antioksidan kapasite miktarının düştüğü gözlenmektedir. Buna paralel olarak PIC+BAP BBD kombinasyonunda PIC BBD'si miktarının 1.5 mg/L üzerindeki değerlerde antioksidan kapasite miktarının düştüğü belirlenmiştir.

**Tablo 3.6.** Kallus su ekstralarının antioksidan kapasiteleri

| Büyüme düzenleyici kombinasyonları | Antioksidan kapasite (mmol/g TEAC) |
|------------------------------------|------------------------------------|
| 1                                  | $2.88 \pm 0.18$                    |
| 2                                  | $4.48 \pm 0.33$                    |
| 3                                  | $3.97 \pm 0.24$                    |
| 4                                  | $9.15 \pm 0.74$                    |
| 5                                  | $2.82 \pm 0.15$                    |
| 6                                  | $2.62 \pm 0.16$                    |
| 7                                  | $4.76 \pm 0.32$                    |
| 8                                  | $5.09 \pm 0.35$                    |
| 9                                  | $5.03 \pm 0.38$                    |
| 10                                 | $5.61 \pm 0.33$                    |
| 11                                 | $6.62 \pm 0.41$                    |
| 12                                 | $2.42 \pm 0.14$                    |



Şekil 3.6. Kallus su ekstrelerindeki antioksidan kapasitenin BBD'lere göre karşılaştırma grafiği

### 3.4. Ana Bitkiye Ait Bulgular

*M. officinalis* subsp. *officinalis* bitkisinin kalluslarının üzerine yapılan antioksidan kapasite, toplam fenolik madde ve toplam flavonoid analizlerinin bitkinin topraktan alınan parçalarında da aynı analizler uygulanarak karşılaştırılmaları sağlanmıştır. Alınan sonuçlara bakılacak olursa, etanol ve su ekstrelerinde yapılan üç analiz için de etanol ekstrelerinden alınan değerlerin daha yüksek olduğu görülmektedir. Bunun nedeni ise etanol çözücüsünün bitkinin çeperlerine daha fazla nüfuz ederek daha fazla çözünmesini sağlamasıdır. Bu amaçla ana bitkideki karşılaştırma için sadece etanol ekstrelerini kullanılmıştır. Analizler için *M. officinalis* subsp. *officinalis*' in yaprak, yaprak sapı, internod ve hipokotil kısımları kullanılmıştır. *M. officinalis* subsp. *officinalis* kısımları bitkinin kallusları için yapılan ekstraksiyon yönteminin aynı şekli uygulanarak analizlerde kullanılan ekstreler elde edilmiştir. Bulunan sonuçlar tablo 3.7' de verilmiştir.

Tablo 3.7. Bitkinin topraktan alınan kısımlarına ait bulgular

| Bitki kısmı | Toplam fenolik madde (mg GAE/g) | Toplam flavonoid (mg kuersetin/g) | Antioksidan kapasite (mmol/g TEAC) |
|-------------|---------------------------------|-----------------------------------|------------------------------------|
| Yaprak      | 20.16±1.14                      | 7.10±0.38                         | 16.30±1.10                         |
| Yaprak sapı | 9.35±0.57                       | 6.54±0.42                         | 16.85±1.19                         |
| İnternod    | 16.71±0.93                      | 6.13±0.38                         | 15.70±0.91                         |
| Hipokotil   | 15.63±1.01                      | 5.17±0.32                         | 15.00±0.94                         |

Tablo 3.7’ deki bulgulara bakılacak olursa topraktan alınan ana bitki kısımlarının, toplam fenolik madde, toplam flavonoid ve antioksidan verilerinin kültüre edilen bitki kallus değerlerinden yüksek bulunduğu görülmüştür. Ana bitkide en yüksek toplam fenolik madde içeriği yapraktan alınan örneklerde,  $20.16 \pm 1.14$  mg GAE/g olarak, en düşük ise yaprak sapından alınan örneklerde  $9.35 \pm 0.57$  mg GAE/g olarak tespit edilmiştir. Toplam flavonoid içeriği ana bitkide en yüksek  $7.10 \pm 0.38$  mg kuersetin/g olarak yaprakta, en düşük ise  $5.17 \pm 0.32$  mg kuersetin/g olarak hipokotil kısmında belirlenmiştir. Antioksidan kapasite miktarı ana bitkide en yüksek  $16.85 \pm 1.19$  mmol/g TEAC olarak yaprak sapı kısmında, en düşük  $15.00 \pm 0.94$  mmol/g TEAC olarak hipokotil kısmında tespit edilmiştir.



#### 4. SONUÇLAR ve TARTIŞMA

Yapılan literatür araştırmalarında, *M. officinalis* subsp. *officinalis* ile yapılan çalışmaların çoğunun ana bitki (yaprak, yaprak sapı vb.) üzerine yapıldığı, ana eksplantlarından in vitro kültür ortamında farklı bitki büyüme düzenleyicileri kullanılarak elde edilen kallusların bazı kimyasal özelliklerinin belirlenmesi üzerine yapılan çalışmaların ise yetersiz olduğu gözlenmiştir. Bitki büyüme düzenleyicilerin etkisiyle yetişen bitki kalluslarının kimyasal özellikleri farklı olduğundan, çalışmada yapılan toplam fenolik, toplam flavonoid ve antioksidan kapasitesi özellikleri elde edilen her bir kallus için de farklı olmuştur.

Bu çalışmada da tıbbi ve aromatik bitki olan *M. officinalis* subsp. *officinalis* bitkisinin in vitro koşullarda çeşitli bitki büyüme düzenleyicileriyle kallus üretimi sağlanmış ve antioksidan özellikleri belirlenmiştir. Farklı BBD kombinasyonlarında yetiştirilen *M. officinalis* subsp. *officinalis* kallusların toplam fenolik madde, toplam flavonoid ve antioksidan kapasite verilerinde en yüksek ve en düşük değerler belirlenmiştir. Sonuçlar genel olarak incelendiğinde toplam fenolik madde, toplam flavonoid ve antioksidan kapasite verilerinin topraktan alınan ana bitki kısımlarına göre düşük, farklı literatür kaynaklarında yapılan kallus kültür analiz verilerine göre ise yüksek olduğu görülmektedir. Bitki çeşidi, bitkiden alınan miktar, ekstraksiyon seçimi, çözücü ve çözünen polaritesi gibi seçeneklerin farklılığı bu sonucun nedenleri olarak sayılabilir.

Hücre kültürü ve kallus oluşumunda yapılan literatür araştırmasında, bitkinin gelişimini uyaran bitki büyüme düzenleyicileri, ışık etkisi, sıcaklık gibi faktörlerin etkisiyle fenolik ve antioksidan özelliklerinin değiştiği gözlenmiştir. Giri vd. (2012) yapmış oldukları çalışmada, MS ortamında benzil adenin (BA) ve metil jasmonat (MeJA) bitki büyüme düzenleyicilerin farklı konsantrasyonlarında *Habenaria edgeworthii* bitkisinin kallusları üretmiş ve toplam fenolik içeriğinin BA bitki büyüme düzenleyicinin konsantrasyon artışıyla yükseldiğini, MeJA bitki büyüme düzenleyicinin konsantrasyon artışıyla ise düştüğünü tespit etmişlerdir. Toplam fenolik içeriğini en yüksek 14.70 mg GAE/g olarak, 10 µM MeJA büyüme düzenleyicisi takviyesindeki *H.edgeworthii* kallusunda elde etmişlerdir (Giri vd., 2012). *M. officinalis* subsp. *officinalis* kallus etanol ve su ekstraktlarının toplam fenolik madde içerikleri bu değere göre düşük bulunmuştur. Bitki çeşidinin farklı olması, bitkilerin analiz edilmesi için kullanılan ekstraksiyon

yöntemlerin farklılığı alınan sonuçlarda etkili olmuştur. Asteraceae familyasına ait şeker otu (*Stevia rebaudiana*) bitkisi kallusları farklı renklerde ışıkların etkisiyle üretilip, bitkide toplam fenolik ve toplam flavonoid içeriği incelenmiştir. Çalışma sonucunda, toplam fenolik içeriğin maksimum değeri mavi ışık altında yetiştirilen kalluslarda 0.102 mg GAE/g olarak belirlenmiştir (Ahmad vd., 2016). Lamiaceae familyasına ait biberiye (*Rosmarinus officinalis*) kallus kültürleri üzerine yapılan bir çalışmada, radyasyona maruz bırakılan kallusların toplam fenolik madde içeriği önemli miktarda artış göstermiştir. Bu çalışmaya göre, ışınlama yapılmayan biberiye kalluslarının (kontrol grup) toplam fenolik içeriği 0.89 mg GAE/g olurken, ışınlama dozu (Gy) maksimum 20 Gy’de bu değerin 4.38 mg GAE/g ulaştığı tespit edilmiştir (El-Beltagi vd., 2011). *M. officinalis* subsp. *officinalis* kallus etanol ve bazı su ekstratlarının toplam fenolik madde miktarı şeker otu ve biberiye (kontrol grup) bitkilerinin kalluslarındaki miktardan yüksek bulunmuştur. Flavonoid ve diğer fenolik maddelerin içerikleri, kanser ve kalp hastalığının gelişiminde önleyici bir rol oynamaktadır (Kahkönen vd., 1999). Bu açıdan bakıldığında *M. officinalis* subsp. *officinalis* bitkisinin kalluslarının önemli miktarda fenolik madde içerdiği görülmektedir. *M. officinalis* subsp. *officinalis*, Lamiaceae familyasının önemli bitkilerinden biri olup, birçok araştırmada materyal olarak kullanılmıştır. Çeşitli araştırmalar, *M. officinalis* subsp. *officinalis*’ in fenolik bileşiklerin zenginliği ile çok belirgin bir antioksidan potansiyeline sahip olduğunu göstermiştir. Mabrouki vd., *M. officinalis* subsp. *officinalis* bitkisinin farklı çözücülerdeki ekstraktlarının toplam fenolik içeriğini incelemiştir. Raporlarına göre toplam fenolik içeriği, en yüksek 63.00 mg GAE/g etanolik ekstraktında, en düşük 1.01 mg GAE/g hekzan ekstraktında tespit etmişlerdir (Mabrouki vd., 2017). Capecka vd., taze *M. officinalis* subsp. *officinalis* bitkisinde, toplam fenolik maddeyi 22.53 mg/100 mg, L-askorbik asiti 53.2 mg/100 mg ve karotenoidi 46.3 mg/100 mg şeklinde bulmuşlardır (Capecka vd., 2005). Bu çalışmada ana bitkide yapılan toplam fenolik madde analizi sonucunda en yüksek değer 20.16±1.14 mg GAE/g olarak belirlenmiş olup, ana bitki kısımlarından alınan değerlerin bitkinin kalluslarından alınan değerlerden yüksek olduğu belirlenmiştir.

Ahmad ve ark. yukarıda belirtilen çalışmasında, toplam flavonoid içeriği mavi ışık altında yetişen kalluslarda maksimum 0.022 mg rutin eşdeğer (RE)/g olarak tespit etmiştir (Ahmad vd., 2016). Lamiaceae familyasına ait türlerden yara otu (*Prunella vulgaris*) bitkisi üzerine yapılan bir çalışmada, bitkiye farklı renklerde ışık verilerek yetiştirilen

kallusların bazı kimyasal özellikleri tanımlanmıştır. Fazal vd., yaptıkları bu çalışmada, maksimum toplam flavonoid içeriği 1.65 mg RE/g olarak mavi ışık altında yetiştirilen *P.vulgaris* kallus kültürlerinde gözlenmiştir (Fazal vd., 2016). Kim vd., *Stevia rebaudiana* bitkisinin kallus ve yapraklarında toplam flavonoid içeriğini incelemiş ve bitkinin kallusunda 1.57 mg kuersetin/g değerini elde etmişlerdir. Bitkinin yapraklarında toplam flavonoid içeriği, 15.64 mg kuersetin/g olarak kallus değerinden yüksek bulmuşlardır (Kim vd., 2011). Aynı bitkiye ait farklı bir çalışmada ise, *S. rebaudiana* kalluslarında toplam flavonoid içeriğin bitkinin yapraklarından daha yüksek olduğu tespit edilmiştir (Tadhani vd., 2007). *M. officinalis* subsp. *officinalis* kalus etanol ve su ekstratlarındaki toplam flavonoid içeriği verilen tüm bitki kalluslarında elde edilen miktarlara göre çok daha yüksek olduğu tespit edilmiştir. Flavonoidlerin vücudun bağışıklık sisteminde etkili olduğu ve çeşitli hastalıklara karşı korunma sağladığı göz önüne alındığında bu bitkinin flavonoid miktarının önemli olduğu görülmektedir. *M. officinalis* subsp. *officinalis* ana bitkisine ait yapılan toplam flavonoid çalışmalarına bakılacak olursa, Mabrouki vd. yukarıda belirtilen çalışmasında en yüksek değeri 3.61 mg kuersetin/g olarak etanolik ekstraktlarda belirlemişlerdir (Mabrouki vd., 2017). Lin vd., yaptıkları bir çalışmada, *M. officinalis* subsp. *officinalis* bitkisinin kurutulmuş örneklerinde toplam flavonoid içeriği 48.45 mg kateşin eşdeğer/g olarak belirlemişlerdir (Lin vd., 2012). Ana bitki üzerine yaptığımız analiz sonucunda toplam flavonoid içeriği en yüksek  $7.10 \pm 0.38$  mg kuersetin/g olarak belirlemiş olup, ana bitkide alınan toplam flavonoid değerlerinin bitkinin kallus kültürlerinden alınan değerlerden yüksek olduğu belirlenmiştir.

Doğal antioksidan kaynağı için daha fazla araştırılabilen in vivo materyallere göre, kallus ekstraktlarının önemli antioksidan potansiyeli sağladığı bazı çalışmalarda bildirilmiştir. *Salvia officinalis* (*S. officinalis*) ve *Rosmarinus officinalis*' in (*R. officinalis*) in vitro kültürlerinde, toprakta yetiştirilen bitki materyallerine göre daha yüksek antioksidan aktivite gözlenmiştir (Grzegorzcyk vd., 2007, Yesil-Celiktas vd., 2007). Yesil-Celiktas vd., *Rosmarinus officinalis* bitkisinin kalluslarını, MS ve odunsu bitki ortamında (WPM) 1 mg/L NAA (MS1 ve WPM1) ve 3 mg/L NAA (MS3 ve WPM3) bitki büyüme düzenleyicileriyle destekleyerek yetiştirip, kalluslarda TEAC analizi yapmışlardır. Raporlarına göre *R. officinalis* kalluslarında TEAC değerini, WPM3' te 0.0018 mmol/g ve MS3' te 0.0016 mmol/g olarak belirlemişlerdir (Yesil-Celiktas vd., 2007). Giri vd. yukarıda belirtilen çalışmasında, *Habenaria edgeworthii* kalluslarının metanolik

ekstraktlarında ABTS testinde en yüksek antioksidan kapasite değeri 0.0671 mM askorbik asit eşdeğeri (AAE)/g olarak, BA 3 µM konsantrasyonunda tespit etmişlerdir (Giri vd., 2012). Bahri-Sahloul vd., *Crataegus azarolus* var. *aronia* (kırmızı meyveli alıç) bitkisinin kallus kültürlerinin antioksidan kapasitesinin belirlenmesinde ABTS metotuna göre TEAC değerini 0.0674 mmol/g olarak belirlemişlerdir (Bahri-Sahloul vd., 2014). *M. officinalis* subsp. *officinalis* kallus etanol ve su ekstraktlarındaki antioksidan kapasitenin *R. officinalis*, *H. edgeworthii* ve kırmızı meyveli alıç bitkilerinin kallus antioksidan değerinden çok daha yüksek olduğu belirlenmiştir. Kousalya ve Bai tarafından yapılan bir çalışmada, *Canscora decussata* bitkisinin kallus kültürleri farklı bitki büyüme düzenleyicileriyle desteklenen ortamlarda üretilmiştir. Çalışma verilerine göre antioksidan kapasitesi en yüksek 12.234 mmol/g TEAC olarak 1/2 MS + 0.5 NAA ortamındaki kalluslarda, en düşük 1.191 mmol/g TEAC olarak 0.5 BAP + 2 KIN + 3 gibberellik asit (GA<sub>3</sub>) ortamındaki kalluslarda elde etmişlerdir (Kousalya ve Bai, 2016). *M. officinalis* subsp. *officinalis* kallus etanol ve su ekstraktlarındaki bazı ortamlarda, *Canscora decussata* bitkisinin kalluslarında en yüksek antioksidan miktara göre daha düşüktür. Ivanova vd., *M.officinalis* subsp. *officinalis* ekstraktının 4.06 mM TEAC bir antioksidan kapasitesine sahip olduğunu bulmuşlardır (Ivanova vd., 2005). Miron vd., ise aynı bitkinin etanolik ekstraktlarında antioksidan kapasiteyi 2.527 mmol/g TEAC olarak belirlemişlerdir (Miron vd.,). Ana bitki üzerine yaptığımız analiz sonucunda antioksidan kapasiteyi en yüksek 16.85±1.19 mmol/g TEAC olarak belirlemiş olup, yapılan diğer analizlere paralel olarak ana bitkiden alınan antioksidan kapasite değerlerinin bitkinin kallus kültürlerinden alınan değerlerden yüksek olduğu belirlenmiştir.

Tıbbi bitkilerin hastalıklara karşı mücadele etme özellikleri antioksidan potansiyellerine bağlanmaktadır. Antioksidan kapasiteye sahip kimyasallar, zararlı potansiyel reaktif oksijen türlerinden kaynaklanan oksidatif strese karşı koruyucu etkiler gösterebilirler. Doku kültür teknolojisi, farmasötik ve nutrasötik endüstrilerdeki uygulamalar ile değerli tıbbi bileşikler için alternatif bir kaynak sunmaktadır (Cao vd., 1996; Jacomini vd., 2015). Dünya'nın çeşitli bölgelerinde birçok tıbbi ve aromatik bitki floradan elde edilmektedir. Bu türlerin yetiştirilmesi yabani popülasyon üzerindeki baskıyı hafifletmeli ve korunmasını sağlamalıdır. İn vitro kültür çalışmaları ile değerli bitki türlerinin çevresel ve fizyolojik şartlara bağlı kalınmadan üretilmesi sağlamaktadır. Bitki esaslı ilaçlar, sağlık ürünleri, gıda maddeleri ve kozmetiklerin doğal fenolik özellikleri ve güçlü

antioksidan etkileri nedeniyle insanların ilgisini çekmektedir. Özellikler ilaç ve gıda sektöründe halen kullanılmakta olan sentetik antioksidanlar ise toksikliği ve vücuda verdiği çeşitli zararlar nedeniyle endişe oluşturmaktadır.

Sekonder metabolitlerin önemli gruplarından biri olan bitki polifenoller, bitkinin savunma mekanizmalarına katılan güçlü antioksidan özelliklere sahiptir. Polifenoller bakımından zengin olan bitkiler, hidrojen bağışlama ve metal kenetleme özellikleri sayesinde yüksek antioksidan kapasiteye sahiptirler. Çalışmalar, oksidatif stresin yol açtığı DNA hasarının, fenol bakımından zengin ürünlerin tüketilmesiyle azaltılabileceğini göstermiştir (Kim vd., 2003). Vücuda dışarıdan gelebilecek herhangi bir patolojiye karşı savunulması ve reaktif oksijen türlerin temizlenmesi için yüksek fenolik içerikli bitkilerin rolleri son derece önemlidir.

*M. officinalis* subsp. *officinalis* bitkisinin farklı BBD kombinasyonlarında yetiştirilen kalluslarında yapılan toplam fenolik madde, toplam flavonoid ve antioksidan kapasite analizleri sonucunda, birçok çalışmaya göre yüksek bulunan değerler görülmektedir. Buna rağmen bu analiz değerlerinin ana bitkideki kısımlarında, bitkinin kalluslarından alınan değerlerden yüksek olduğu görülmektedir. Bitkinin yetiştirildiği ortam kombinasyonlarını geliştirerek, daha verimli kallus üretimi sağlamak amacıyla farklı ekstraksiyon seçenekleri denenip daha yüksek fenolik ve antioksidan değerleri elde edilebilecek bitki doku kültürü çalışmaları yapılmalıdır.

## KAYNAKLAR

- Adom, K.K. and Liu, R.H.**, 2002. Antioxidant activity of grains, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **50(21)**, 6182-6187.
- Adom, K.K., Sorrells, M.E. and Liu, R.H.**, 2003. Phytochemical profiles and antioxidant activity of wheat varieties, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **51(26)**, 7825-7834.
- Ahmad, N., Rab, A. and Ahmad, N.**, 2016. Light-induced biochemical variations in secondary metabolite production and antioxidant activity in callus cultures of *Stevia rebaudiana* (Bert), *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, **154**, 51-56.
- Allahverdiyev, A., Duran, N., Ozguven, M. and Koltas, S.**, 2004. Antiviral activity of the volatile oils of *Melissa officinalis* L. against Herpes simplex virus type-2, *Phytomedicine*, **11(7-8)**, 657-661.
- Amarowicz, R., Karamac, M. and Shahidi, F.**, 1999. Synergistic activity of capelin protein hydrolysates with synthetic antioxidants in a model system, *Journal of Food Lipids*, **6(4)**, 271-275.
- Ames, B.N., Shigenaga, M.K. and Hagen, T.M.**, 1993. Oxidants, antioxidants, and the degenerative diseases of aging, *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **90(17)**, 7915-7922.
- Antolovich, M., Prenzler, P.D., Patsalides, E., McDonald, S. and Robards, K.**, 2002. Methods for testing antioxidant activity, *Analyst*, **127(1)**, 183-198.
- Aprotosoiaie, A.C., Raileanu, E., Trifan, A. and Cioanca, O.**, 2013. The polyphenolic content of common Lamiaceae species available as herbal tea products in Romanian pharmacies, *Rev. Med. Chir. Soc. Med. Nat.*, **117(1)**, 233-237.
- Araujo, C., Sousa, M.J., Ferreira, M.F. and Leao, C.**, 2003. Activity of essential oils from Mediterranean Lamiaceae species against food spoilage yeasts, *Journal of Food Protection*, **66(4)**, 625-632.
- Argyropoulos, D. and Müller, J.**, 2014. Changes of essential oil content and composition during convective drying of lemon balm (*Melissa officinalis* L.), *Industrial Crops and Products*, **52**, 118-124.
- Astani, A., Reichling, J. and Schnitzler, P.**, 2012. *Melissa officinalis* extract inhibits attachment of Herpes simplex virus in vitro, *Chemotherapy*, **58(1)**, 70-77.
- Athukorala, Y., Lee, K. W., Song, C., Ahn, C.B., Shin, T.S., Cha, Y.J. and Jeon, Y.J.**, 2003. Potential antioxidant activity of marine red alga *Grateloupia filicina* extracts, *Journal of Food Lipids*, **10(3)**, 251-265.
- Bahri-Sahloul, R., Ben Fredj, R., Boughalleb, N., Shriaa, J., Saguem, S., Hilbert, J. L., ... and Harzallah-Skhiri, F.**, 2014. Phenolic composition and antioxidant and antimicrobial activities of extracts obtained from *Crataegus azarolus* L. var. *aronia* (Willd.) Batt. ovaries cali, *Journal of Botany*, **2014**, 4-6.

- Banner, W., Koch, M., Capin, D.M., Hopf, S.B., Chang, S. and Tong, T.G.,** 1986. Experimental chelation therapy in chromium, lead and boron intoxication with N-acetylcysteine and other compounds, *Toxicology and Applied Pharmacology*, **83(1)**, 142-147.
- Basta, A., Tzakou, O. and Couladis, M.,** 2005. Composition of the leaves essential oil of *Melissa officinalis* sl from Greece, *Flavour and Fragrance Journal*, **20(6)**, 642-644.
- Bhatia, S., Sharma, K. and Dahiya, R.,** 2015. Classical and nonclassical techniques for secondary metabolite production in plant cell cultures, in *Modern Applications of Plant Biotechnology in Pharmaceutical Sciences*, pp. 231-291, Eds. Jones K., Academy Press, UK.
- Block, G., Patterson, B. and Subar, A.,** 1992. Fruit, vegetables, and cancer prevention: a review of the epidemiological evidence, *Nutrition and Cancer*, **18(1)**, 1-29.
- Bolkent, S., Yanardag, R., Karabulut-Bulan, O. and Yesilyaprak, B.,** 2005. Protective role of *Melissa officinalis* L. extract on liver of hyperlipidemic rats: a morphological and biochemical study, *Journal of Ethnopharmacology*, **99(3)**, 391-398.
- Bombik, T., Bombik, A. and Saba, L.,** 2002. Effects of a herb extract on the level of selected biochemical indicators in the blood of calves, *Medycyna Weterynaryjna*, **58(6)**, 464-466.
- Bors, W., Heller, W., Michel, C. and Saran, M.,** 1990. Flavonoids as antioxidants: Determination of radical-scavenging efficiencies, in *Methods in Enzymology*, pp. 343-355, Eds. Lorsch J., Academic Press, USA.
- Bounihi, A., Hajjaj, G., Alnamer, R., Cherrah, Y. and Zellou, A.,** 2013. In vivo potential anti-inflammatory activity of *Melissa officinalis* L. essential oil, *Advances in Pharmacological Sciences*, **2013**, 1-8.
- Bremness, L.,** 1994. Herbs. Dorling Kindersley, New York.
- Bursal, E.,** 2009. Kivi meyvesinin (*Actinidia deliciosa*) antioksidan ve antiradikal aktivitelerinin belirlenmesi, karbonik anhidraz enziminin saflaştırılması ve karakterizasyonu, *Doktora tezi*, Atatürk Ü. Fen Bilimleri Enstitüsü, Erzurum.
- Cadenas, E. and Packer, L.,** 2002. Handbook Of Antioxidants. Marcel Dekker, New York and Basel.
- Cao, G., Sofic, E. and Prior, R.L.,** 1996. Antioxidant capacity of tea and common vegetables, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **44(11)**, 3426-3431.
- Capecka, E., Mareczek, A. and Leja, M.,** 2005. Antioxidant activity of fresh and dry herbs of some Lamiaceae species, *Food chemistry*, **93(2)**, 223-226.
- Carnat, A.P., Carnat, A., Fraisse, D. and Lamaison, J.L.,** 1998. The aromatic and polyphenolic composition of lemon balm (*Melissa officinalis* L. subsp. *officinalis*) tea, *Pharmaceutica Acta Helvetiae*, **72(5)**, 301-305.

- Chaiyana, W. and Okonogi, S.**, 2012. Inhibition of cholinesterase by essential oil from food plant, *Phytomedicine*, **19(8-9)**, 836-839.
- Chaiyasit, W., Elias, R.J., McClements, D.J. and Decker, E.A.**, 2007. Role of physical structures in bulk oils on lipid oxidation, *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, **47(3)**, 299-317.
- Chandrasekara, A. and Shahidi, F.**, 2010. Inhibitory activities of soluble and bound millet seed phenolics on free radicals and reactive oxygen species, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **59(1)**, 428-436.
- Charles, D.J.**, 2012. Limon Balm, in *Antioxidant Properties of Spices, Herbs and Other Sources*, pp.372-375, Eds. Charles, D.J., Springer, London.
- Damar, İ.**, 2010. Vişne suyunun antosiyanin profili ve antioksidan kapasitesi, *Yüksek lisans tezi*, Ankara Ü. Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara.
- Davey, M.**, 2017. Secondary Metabolism in Plant Cell Cultures, in *Encyclopedia of Applied Plant Sciences (Second Edition)*, pp.462-467, Eds. Thomas, B., Murray B.G. & Murphy D.J., Academic Press, Bratain.
- Dragland, S., Senoo, H., Wake, K., Holte, K. and Blomhoff, R.**, 2003. Several culinary and medicinal herbs are important sources of dietary antioxidants, *The Journal of Nutrition*, **133(5)**, 1286-1290.
- Dzik, A.K, Stojko, R., Stojko, E.S, Adamek, I.W, Stojko, A., Stojko, J. and Pieta, B.S.**, 2004. Influence of honey-balm on the rate of scare formation during experimental burn wound healing in pigs, *Bulletin-Veterinary Institute in Pulawy*, **48(3)**, 311-316.
- Encalada, M.A., Hoyos, K.M., Rehecho, S., Berasategi, I., de Ciriano, M.G.Í., Ansorena, D., ... and Calvo, M.I.**, 2011. Anti-proliferative effect of *Melissa officinalis* on human colon cancer cell line, *Plant Foods for Human Nutrition*, **66(4)**, 328-334.
- El-Beltagi, H.S., Ahmed, O.K. and El-Desouky, W.**, 2011. Effect of low doses  $\gamma$ -irradiation on oxidative stress and secondary metabolites production of rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.) callus culture, *Radiation Physics and Chemistry*, **80(9)**, 968-976.
- Esterbauer, H., Gebicki, J., Puhl, H. and Jürgens, G.**, 1992. The role of lipid peroxidation and antioxidants in oxidative modification of LDL, *Free Radical Biology and Medicine*, **13(4)**, 341-390.
- Fahey, J.W., Zalcman, A.T. and Talalay, P.**, 2001. The chemical diversity and distribution of glucosinolates and isothiocyanates among plants, *Phytochemistry*, **56(1)**, 5-51.
- Farahani, H.A., Valadabadi, S.A., Daneshian, J. and Khalvati, M.A.**, 2009. Evaluation changing of essential oil of balm (*Melissa officinalis* L.) under water deficit stress conditions, *Journal of Medicinal Plants Research*, **3(5)**, 329-333.

- Fazal, H., Abbasi, B.H., Ahmad, N., Ali, S.S., Akbar, F. and Kanwal, F., 2016.** Correlation of different spectral lights with biomass accumulation and production of antioxidant secondary metabolites in callus cultures of medicinally important *Prunella vulgaris* L., *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, **159**, 1-7.
- Fennema O.R., 1996.** Food Chemistry 4th Ed. Taylor & Francis, Britain.
- Flora, S.J., 2009.** Structural, chemical and biological aspects of antioxidants for strategies against metal and metalloid exposure, *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, **2(4)**, 191-206.
- Formica, J.V. and Regelson, W., 1995.** Review of the biology of quercetin and related bioflavonoids, *Food and Chemical Toxicology*, **33(12)**, 1061-1080.
- Frankel, E.N., 2005.** Antioxidants, in *Lipid Oxidation Second Edition*, Eds. Frankel, E.N., pp. 209-253, Woodhead Publishing, Cambridge.
- Giri, L., Dhyani, P., Rawat, S., Bhatt, I.D., Nandi, S.K., Rawal, R.S. and Pande, V., 2012.** In vitro production of phenolic compounds and antioxidant activity in callus suspension cultures of *Habenaria edgeworthii*: a rare Himalayan medicinal orchid, *Industrial Crops and Products*, **39**, 1-6.
- Gliszczynska-Swiglo, A. and Sikorska, E., 2004.** Simple reversed-phase liquid chromatography method for determination of tocopherols in edible plant oils, *Journal of Chromatography A*, **1048(2)**, 195-198.
- Gökpınar, Ş., Koray, T., Akçiçek, E., Göksan, T. ve Durmaz, Y., 2006.** Algal Antioksidanlar, *Su Ürünleri Dergisi*, **23**, 85-89.
- Grzegorzczuk, I., Matkowski, A. and Wysokinska, H., 2007.** Antioxidant activity of extracts from in vitro cultures of *Salvia officinalis* L., *Food Chemistry*, **104(2)**, 536-541.
- Hamer, M., Owen, G. and Kloek, J., 2005.** The role of functional foods in the psychobiology of health and disease, *Nutrition Research Reviews*, **18(1)**, 77-88.
- Hasanein, P. and Riahi, H., 2015.** Antinociceptive and antihyperglycemic effects of *Melissa officinalis* essential oil in an experimental model of diabetes, *Medical Principles and Practice*, **24(1)**, 47-52.
- Herodez, S.S., Hadolin, M., Skerget, M. and Knez, Z., 2003.** Solvent extraction study of antioxidants from Balm (*Melissa officinalis* L.) leaves, *Food Chemistry*, **80(2)**, 275-282.
- Hertog, M.G., Kromhout, D., Aravanis, C., Blackburn, H., Buzina, R., Fidanza, F., ... and Pekkarinen, M., 1995.** Flavonoid intake and long-term risk of coronary heart disease and cancer in the seven countries study, *Archives of Internal Medicine*, **155(4)**, 381-386.
- Horrigan, C., 2005.** Aromatherapy in the management and treatment of rheumatoid and musculoskeletal autoimmune disorders: Part III, *International Journal of Aromatherapy*, **15(1)**, 15-23.

- Ibragic, S., Salihovic, M., Tahirovic, I. and Toromanovic, J.**, 2014. Quantification of some phenolic acids in the leaves of *Melissa officinalis* L. from Turkey and Bosnia, *Bull. Chem. Tech. Bosnia Herzegovina*, **42**, 47-50.
- Ivanova, D., Geroval, D., Chervenkov, T. and Yankova, T.**, 2005. Polyphenols and antioxidant capacity of Bulgarian medicinal plants, *Journal of Ethnopharmacology*, **96**(1-2), 145-150.
- Jacomini, D., Sinzker, R.C., Mangolin, C.A., Grande, P.A., Nocchi, S.R., Nakamura, C.V., ... and Gonçalves, R.A.C.**, 2015. Lipid profile and antiproliferative activity of callus cultures of *Cereus peruvianus* Mill, *Industrial Crops and Products*, **69**, 408-414.
- Kacar, O., Goksu, E. and Azkan, N.**, 2010. The effect of different plant densities on some agronomic characteristics at lemon balm (*Melissa officinalis* L.) cultivation, *Ziraat Fakültesi Dergisi*, **24**(2), 59-71.
- Kahkönen, M.P., Hopia, A.I., Vuorela, H.J., Rauha, J.P., Pihlaja, K., Kujala, T.S. and Heinonen, M.**, 1999. Antioxidant activity of plant extracts containing phenolic compounds, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **47**(10), 3954-3962.
- Kato-Noguchi, H.**, 2003. Assessment of allelopathic potential of shoot powder of lemon balm, *Scientia horticulturae*, **97**(3-4), 419-423.
- Kennedy, D.O., Scholey, A.B., Tildesley, N.T.J., Perry, E.K. and Wesnes, K.A.**, 2002. Modulation of mood and cognitive performance following acute administration of *Melissa officinalis* (lemon balm), *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, **72**(4), 953-964.
- Keskin, H. ve Erkmén G.**, 1987. Besin Kimyası, Güryay Matbaacılık, Beşinci basım, İstanbul.
- Kim, H.Y., Kim, O.H. and Sung, M.K.**, 2003. Effects of phenol-depleted and phenol-rich diets on blood markers of oxidative stress, and urinary excretion of quercetin and kaempferol in healthy volunteers, *Journal of the American College of Nutrition*, **22**(3), 217-223.
- Kim, I.S., Yang, M., Lee, O.H. and Kang, S.N.**, 2011. The antioxidant activity and the bioactive compound content of *Stevia rebaudiana* water extracts, *LWT-Food Science and Technology*, **44**(5), 1328-1332.
- Kim, S., Yun, E.J., Bak, J.S., Lee, H., Lee, S.J., Kim, C.T., ... and Kim, K.H.**, 2010. Response surface optimised extraction and chromatographic purification of rosmarinic acid from *Melissa officinalis* leaves, *Food Chemistry*, **121**(2), 521-526.
- Kinsella, J.E., Frankel, E., German, B. and Kanner, J.**, 1993. Possible mechanisms for the protective role of antioxidants in wine and plant foods, *Food Technology*, **47**, 85-89.
- Kousalya, L. and Bai, V.N.**, 2016. Effect of growth regulators on rapid micropropagation and antioxidant activity of *Canscora decussata* (Roxb.) Roem. & Schult.—A threatened medicinal plant, *Asian Pacific Journal of Reproduction*, **5**(2), 161-170.

- Labuda, J., Buckova, M., Heilerova, L., Caniova-Ziakova, A., Brandsteterova, E., Mattusch, J. and Wennrich, R.,** 2002. Detection of antioxidative activity of plant extracts at the DNA-modified screen-printed electrode, *Sensors*, **2(1)**, 1-10.
- Lamaison, J.L., Carnat, A. and Petitjean-Freytet, C.,** 1990. Tannin content and inhibiting activity of elastase in Rosaceae, *Annales Pharmaceutiques Francaises*, **48(6)**, 335-340.
- Lin, J.T., Chen, Y.C., Lee, Y.C., Hou, C.W.R., Chen, F.L. and Yang, D.J.,** 2012. Antioxidant, anti-proliferative and cyclooxygenase-2 inhibitory activities of ethanolic extracts from lemon balm (*Melissa officinalis* L.) leaves, *LWT-Food Science and Technology*, **49(1)**, 1-7.
- Liyana-Pathirana, C., Dexter, J. and Shahidi, F.,** 2006. Antioxidant properties of wheat as affected by pearling, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **54(17)**, 6177-6184.
- Mabrouki, H., Duarte, C.M.M. and Akretche, D.E.,** 2017. Estimation of total phenolic contents and in vitro antioxidant and antimicrobial activities of various solvent extracts of *Melissa officinalis* L., *Arabian Journal for Science and Engineering*, **2017**, 1-9.
- Madhujith, T. and Shahidi, F.,** 2007. Antioxidative and antiproliferative properties of selected barley (*Hordeum vulgare* L.) cultivars and their potential for inhibition of low-density lipoprotein (LDL) cholesterol oxidation, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **55(13)**, 5018-5024.
- Manukyan, A.E.,** 2004. The productivity and quality of some herbs under controlled environmental conditions: II. Medicinal and aromatic plants, *Journal of Applied Botany and Food Quality*, **78**, 104-111.
- Marinova, E.M. and Yanishlieva, N.V.,** 1997. Antioxidative activity of extracts from selected species of the family Lamiaceae in sunflower oil, *Food Chemistry*, **58(3)**, 245-248.
- Miller, N.J., Diplock, A.T. and Rice-Evans, C.A.,** 1995. Evaluation of the total antioxidant activity as a marker of the deterioration of apple juice on storage, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **43(7)**, 1794-1801.
- Mimica-Dukic, N., Bozin, B., Sokovic, M. and Simin, N.,** 2004. Antimicrobial and antioxidant activities of *Melissa officinalis* L.(Lamiaceae) essential oil, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **52(9)**, 2485-2489.
- Miron, T. L., Herrero, M. and Ibanez, E.,** 2013. Enrichment of antioxidant compounds from lemon balm (*Melissa officinalis*) by pressurized liquid extraction and enzyme-assisted extraction, *Journal of Chromatography A*, **1288**, 1-9.
- Moradkhani, H., Sargsyan, E., Bibak, H., Naseri, B., Sadat-Hosseini, M., Fayazi-Barjin, A. and Meftahizade, H.,** 2010. *Melissa officinalis* L., a valuable medicine plant: A review, *Journal of Medicinal Plants Research*, **4(25)**, 2753-2759.
- Morel, I., Lescoat, G., Cogrel, P., Sergent, O., Padeloup, N., Brissot, P., ... and Cillard, J.,** 1993. Antioxidant and iron-chelating activities of the flavonoids

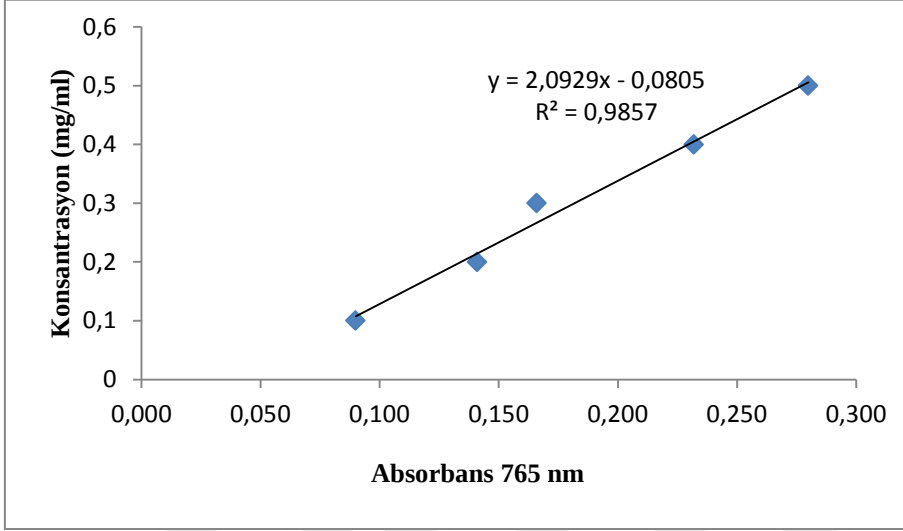
catechin, quercetin and diosmetin on iron-loaded rat hepatocyte cultures, *Biochemical Pharmacology*, **45(1)**, 13-19.

- Moroney, M.A., Alcaraz, M.J., Forder, R.A., Carey, F. and Hoult, J.R.S.**, 1988. Selectivity of neutrophil 5-lipoxygenase and cyclo-oxygenase inhibition by an antiinflammatory flavonoid glycoside and related aglycone flavonoids, *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, **40(11)**, 787-792.
- Mrlianova, M., Tekelova, D., Felklova, M., Reinöhl, V. and Toth, J.**, 2002. The influence of the harvest cut height on the quality of the herbal drugs *Melissae folium* and *Melissae herba*, *Planta Medica*, **68(02)**, 178-180.
- Murashige, T. and Skoog, F.**, 1962. A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures, *Physiologia Plantarum*, **15(3)**, 473-497.
- Nacz, M. and Shahidi, F.**, 2006. Phenolics in cereals, fruits and vegetables: Occurrence, extraction and analysis, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, **41(5)**, 1523-1542.
- Nascimento, G.G., Locatelli, J., Freitas, P.C. and Silva, G.L.**, 2000. Antibacterial activity of plant extracts and phytochemicals on antibiotic-resistant bacteria, *Brazilian Journal of Microbiology*, **31(4)**, 247-256.
- Ninfali, P., Mea, G., Giorgini, S., Rocchi, M. and Bacchiocca, M.**, 2005. Antioxidant capacity of vegetables, spices and dressings relevant to nutrition, *British Journal of Nutrition*, **93(2)**, 257-266.
- Ozturk, A., Unlukara, A., Ipek, A. and Gurbuz, B.**, 2004. Effects of salt stress and water deficit on plant growth and essential oil content of lemon balm (*Melissa officinalis* L.), *Pak. J. Bot.*, **36(4)**, 787-792.
- Özyürek, M.**, 2005. Bazı İçeceklerin Antioksidan Aktivitelerinin Tayininde Yeni Bir Yöntem Geliştirilmesi, *Yüksek Lisans Tezi*, İstanbul Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, İstanbul.
- Pavela, R.**, 2004. Insecticidal activity of certain medicinal plants, *Fitoterapia*, **75(7-8)**, 745-749.
- Pokorny, J.**, 2007. Are natural antioxidants better and safer than synthetic antioxidants?, *European Journal of Lipid Science and Technology*, **109(6)**, 629-642.
- Pokorny, J., Yanishlieva, N., Gordon, M.**, 2001. Antioxidants in Food. CRC Press, USA.
- Ptittin, E.A.**, 1987. *Centaurea thracica* (Janka) Hayek ve *Centaurea pichleri* boiss. subsp. *pichleri* flavonoidleri, *Doktora tezi*, T.C. Anadolu Ü., Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Eskişehir.
- Re, R., Pellegrini, N., Proteggente, A., Pannala, A., Yang, M. and Rice-Evans, C.**, 1999. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay, *Free Radical Biology and Medicine*, **26(9)**, 1231-1237.
- Rice-Evans, C., Miller, N. and Paganga, G.**, 1997. Antioxidant properties of phenolic compounds, *Trends in Plant Science*, **2(4)**, 152-159.

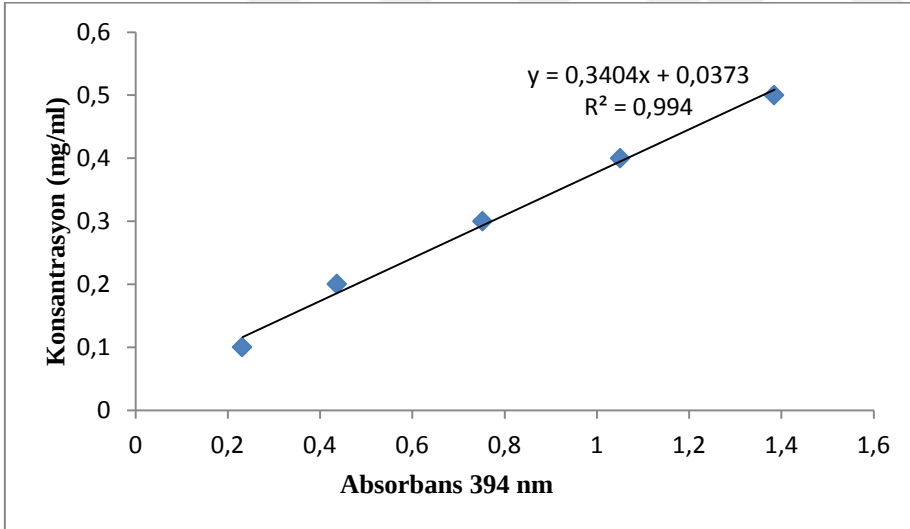
- Saglam, C., Atakisi, I., Turhan, H., Kaba, S., Arslanoglu, F. and Onemli, F., 2004.** Effect of propagation method, plant density, and age on lemon balm (*Melissa officinalis*) herb and oil yield, *New Zealand Journal of Crop and Horticultural science*, **32**, 419-423.
- Sarı, A.O. and Ceylan, A., 2002.** Yield characteristics and essential oil composition of lemon balm (*Melissa officinalis* L.) grown in the Aegean region of Turkey, *Turkish Journal of Agriculture and Forestry*, **26(4)**, 217-224.
- Schnitzler, P., Schuhmacher, A., Astani, A. and Reichling, J., 2008.** *Melissa officinalis* oil affects infectivity of enveloped herpes viruses, *Phytomedicine*, **15(9)**, 734-740.
- Shahidi, F. and Amarowicz, R., 1996.** Antioxidant activity of protein hydrolyzates from aquatic species, *Journal of the American Oil Chemists' Society*, **73(9)**, 1197-1199.
- Shahidi, F. and Naczek, M., 2003.** Biosynthesis, classification and nomenclature of phenolics in food and nutraceuticals, in *Phenolics in Food and Nutraceuticals*, pp.1-9, Eds. Taylor & Francis Group, CRC Press, ABD.
- Shahidi, F. and Zhong, Y., 2007.** Measurement of antioxidant activity in food and biological systems, *Antioxidant Measurement and Applications*, **956**, 36-66.
- Shahidi, F. and Zhong, Y., 2011.** Revisiting the polar paradox theory: a critical overview, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **59(8)**, 3499-3504.
- Sherwin, E.R., 1990.** Antioxidants, in *Food additives*, pp. 139–193, Eds. Branen, L., Davidson, P.C. & Salminen, S., Marcel Dekker, New York.
- Simon, J.E., Chadwick, A.F. and Craker, L.E., 1984.** Herbs, an indexed bibliography, Elsevier, New York.
- Singleton, V.L. and Rossi, J.A., 1965.** Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents, *American Journal of Enology and Viticulture*, **16(3)**, 144-158.
- Sousa, A.C., Gattass, C.R., Alviano, D.S., Alviano, C.S., Blank, A.F. and Alves, P.B., 2004.** *Melissa officinalis* L. essential oil: antitumoral and antioxidant activities, *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, **56(5)**, 677-681.
- Square, D., 1998.** Sage advice from my garden, *CMAJ: Canadian Medical Association Journal*, **159(12)**, 1495.
- Steinberg, D., Parthasarathy, S., Carew, T.E., Khoo, J.C. and Witztum, J.L., 1989.** Beyond cholesterol. Modifications of low-density lipoprotein that increase its atherogenicity, *N. Engl. J. Med.*, **320(14)**, 915-24.
- Tadhani, M.B., Patel, V.H. and Subhash, R., 2007.** In vitro antioxidant activities of *Stevia rebaudiana* leaves and callus, *Journal of Food Composition and Analysis*, **20(3-4)**, 323-329.
- Topliss, J.G., Clark, A.M., Ernst, E., Hufford, C.D., Johnston, G.A.R., Rimoldi, J.M. and Weimann, B.J., 2002.** Natural and synthetic substances related to human

- health (IUPAC Technical Report), *Pure and Applied Chemistry*, **74(10)**, 1957-1985.
- Tsao, R.**, 2010. Chemistry and biochemistry of dietary polyphenols, *Nutrients*, **2(12)**, 1231-1246.
- Turhan, H.**, 2006. Lemon balm, in *Handbook of Herbs and Spices*, pp. 390-399, Eds. Peter K.V., Woodhead Publishing, USA.
- Urbanczyk, J., Hanczakowska, E. and Świątkiewicz, M.**, 2002. Herb mixture as an antibiotic substitute in pig feeding, *Medycyna Weterynaryjna*, **58(11)**, 887-889.
- Uzun, E., Sariyar, G., Adersen, A., Karakoc, B., Ötük, G., Oktayoglu, E. and Pirildar, S.**, 2004. Traditional medicine in Sakarya province (Turkey) and antimicrobial activities of selected species, *Journal of Ethnopharmacology*, **95(2-3)**, 287-296.
- Wattenberg, L.W.**, 1986. Protective effects of 2(3)-tert-butyl-4-hydroxyanisole on chemical carcinogenesis, *Food and Chemical Toxicology*, **24(10-11)**, 1099-1102.
- Wheeler, G.L., Jones, M.A. and Smirnoff, N.**, 1998. The biosynthetic pathway of vitamin C in higher plants, *Nature*, **393(6683)**, 365-369.
- Willett, W.C., Sacks, F., Trichopoulou, A., Drescher, G., Ferro-Luzzi, A., Helsing, E. and Trichopoulos, D.**, 1995. Mediterranean diet pyramid: a cultural model for healthy eating, *The American Journal of Clinical Nutrition*, **61(6)**, 1402-1406.
- Yanishlieva-Maslarova, N.V.**, 2001. Inhibiting oxidation, in *Antioxidants in Food: Practical Applications*, pp. 22-70, Eds. Pokorny, J., Yanishlieva, N. & Gordon, M., Woodhead Publishing, UK.
- Yesil-Celiktas, O., Nartop, P., Gurel, A., Bedir, E. and Vardar-Sukan, F.**, 2007. Determination of phenolic content and antioxidant activity of extracts obtained from *Rosmarinus officinalis* cali, *Journal of Plant Physiology*, **164(11)**, 1536-1542.
- Zhong, Y. and Shahidi, F.**, 2011. Antioxidant behavior in bulk oil: limitations of polar paradox theory, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **60(1)**, 4-6.
- Zurita, J. L., Jos, A., del Peso, A., Salguero, M., Lopez-Artiguez, M. and Repetto, G.**, 2007. Ecotoxicological effects of the antioxidant additive propyl gallate in five aquatic systems, *Water research*, **41(12)**, 2599-2611.

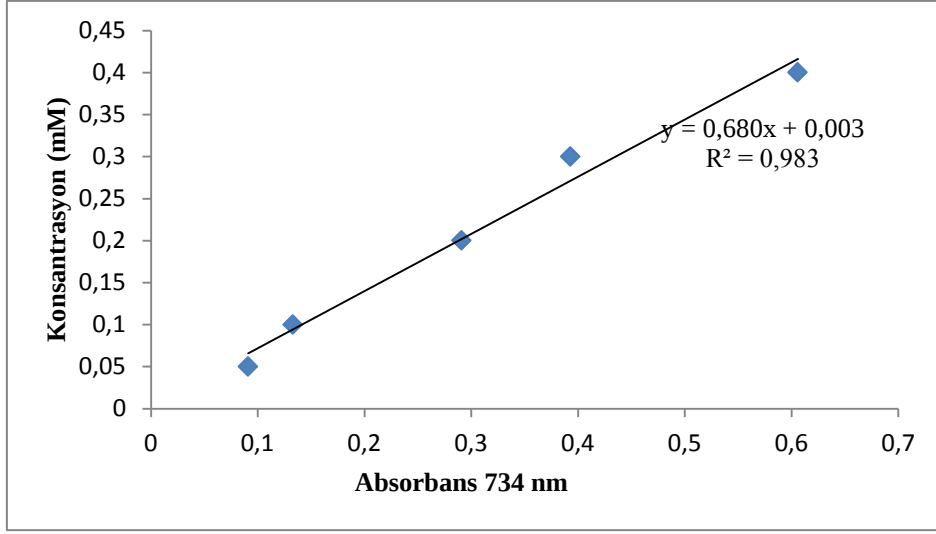
## EKLER



Şekil 5.1. Gallik asit kalibrasyon eğrisi



Şekil 5.2. Kuersetin kalibrasyon eğrisi



Şekil 5.3. Troloks kalibrasyon eğrisi

## ÖZGEÇMİŞ

1992 yılında Elazığ' da doğdum. İlk, orta ve lise öğrenimini sırasıyla Yücel İlkokulu, Mehmet Akif Ersoy Lisesi' sinde tamamladıktan sonra öğrenimine 2010-2014 yılları arasında Fırat Üniversitesi Mühendislik Fakültesi Biyomühendislik Bölümü' nde devam ettim. 2014 yılında Fırat Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyomühendislik Bölümü yüksek lisans eğitimine başladım ve halen devam etmekteyim.

