



Eurasian Journal of Biological and Chemical Sciences

Journal homepage: www.dergipark.gov.tr/ejbc



Antioxidant properties of *Melissa officinalis* L. callus cultures

Aykut TOPDEMİR^{1*}, Zümre DEMİR¹, Nazmi GÜR¹

¹Fırat Üniversitesi, Mühendislik Fakültesi, Biyomühendislik Bölümü, Elazığ, Türkiye

*Corresponding author : atopdemir@gmail.com
Orcid No: 0000-0002-9112-4767

Abstract: *Melissa officinalis* L. is a Mediterranean plant from the family of the Labitae, and has lemon fragrance. Melissa is a perennial herbaceous plant that forms the plant size between 60-100 cm. It is a known and used plant for a long time, because of its pleasant smell. Because it is effective in beekeeping, this plant is called as the swarm plant. It is a medicinal and aromatic plant, since it contains essential oils containing citral, stranellal, linalool and pinemia and flavonoid and resin. The antioxidant activity of the in vitro produced calli was determined in this study, which was also determined by previous studies. *Melissa officinalis* L. nodals were used as an explant source. Nodules were promoted with different plant growth regulator combinations for callus formation in Murashige Skoog medium. The antioxidant activity of the resulting callus was determined by the ABTS method and the results were given as "TEAC (troloxyl equivalent antioxidant capacity) equivalent". The highest antioxidant capacity (0.365 mmol / L) was seen in 1.5 mg / L 2,4-D + 1 mg / L PIC + 0.5 mg / L KIN-induced callus. The lowest value (0.191 mmol / L) was obtained from calli promoted with 1.5 mg / L 2,4-D + 0.5 mg / L BAP.

Keywords: *Melissa officinalis* L, callus, antioxidant.

Melissa officinalis L. kallus kültürlerinin antoksidan özellikleri

Özet: *Melissa officinalis* L., Labitae familyasından, Akdeniz bitkisi olup limon kokuludur. Melisa 60-100 cm arasında bitki boyu oluşturan çok yıllık otsu bir bitkidir. Hoş kokusu nedeniyle uzun zamandır bilinen ve kullanılan bir bitkidir. Arıcılıkta oğul ekmeye etkili olduğu için, halk arasında bu bitkiye oğul otu da denilmektedir. Sitral, stranellal, linalol ve pinemi içeren uçucu yağlar ile flavonoid ve reçine içerdiğinden dolayı tıbbi ve aromatik bir bitkidir. Çalışmamızda antoksidan özelliği olduğu da daha önce yapılan çalışmalarla belirlenmiş olan bu bitkiden, in vitro olarak üretilen kallusların antoksidan aktivitesi belirlenmiştir. Explant kaynağı olarak *Melissa officinalis* L. nodları kullanılmıştır. Nodlar Murashige Skoog besiyerinde kallus oluşumu için farklı bitki büyüme düzenleyici kombinasyonları ile teşvik edilmiştir. Sonuçta oluşan kallusların antoksidan aktivitesi ABTS yöntemi ile belirlenmiş ve sonuçlar "TEAC (trolox eşdeğer antoksidan kapasite) eşdeğeri" olarak verilmiştir. En yüksek antoksidan kapasite (0.365 mmol/L), 1.5 mg/L 2,4-D + 1 mg/L PIC + 0.5 mg/L KIN ile indüklenmiş kalluslarda görülmüştür. En düşük değer ise (0.191 mmol/L), 1.5 mg/L 2,4-D + 0.5 mg/L BAP ile teşvik edilmiş kalluslardan elde edilmiştir.

Anahtar Kelimeler: *Melissa officinalis* L, kallus, antoksidan.

© EJBCS. All rights reserved.

1.Giriş

Melisa officinalis L. Lamiaceae familyasına mensup, çok yıllık limon kokulu bir bitkidir. Lamiaceae (eski adıyla Labiatae) ailesinin üyelerinden *Melisa officinalis* L. (*M. officinalis*) yurdumuzda Akdeniz bölgesinde yetişen yenilebilir bir bitkidir. Bitki, dünyanın çeşitli bölgelerinde özellikle de Batı Asya, güney batı Sırbistan ve Kuzey Afrika'da yetiştirilmektedir (Simon ve Chatwick, 1984). *M. officinalis*'in subsp. *officinalis*, subsp. *inodora* ve subsp. *altissima* olmak üzere üç alt türü bulunur. Bunlardan sadece subsp. *officinalis*'in ticari değeri ve karakteristik limon kokusu vardır. Bu bitkinin taze veya kurutulmuş yaprakları ilaç olarak kullanılır. Yapraklar, çiçek açmadan önce veya

dallanmadan önce hasat edilmektedir (Zeybek ve Haksel, 2010). *M. officinalis* bitki boyu, gövde ve yaprak boyutu gibi morfolojik özellikleri esas olarak genotip, çevre veya kültürel uygulamalara bağlı olarak değişim göstermektedir. Genel olarak 1.5 m yüksekliğe kadar büyüyebilir ve 0.5-1.0 m boyunca yayılabilir. Bitki kare sapsarı, 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 sapsarı 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. Sapsarın üzerinde yapraklarda aksillerden

küçük dallar seyrek halde büyümektedir (Sarı ve Ceylan, 2002).

M. officinalis bitkisinin uçucu yağı antiviral, antibakteriyel ve antispazmodik bir etkiye sahiptir (Farahani ark., 2009). Bitkinin uçucu yağı iyi bilinen bir antifungal ajandır ve hafif antidepresif ve antispazmolitik özellikleri de bildirilmiştir (Basta ark., 2005). *M. officinalis* üzerindeki fitokimyasal araştırmalarla, terpenler (monoterpenler, seskiterpenler ve triterpenler) ve fenolik bileşikler (fenolik asitler, flavonoidler ve tanenler) de dahil olmak üzere çeşitli fitokimyasal maddelerin varlığını ve miktarları belirlenmiştir (Allahverdiyev ark., 2004; Moradkhani ark., 2010). *M. 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-RA izomerleri, kafeik asit türevleri, luteolin, naringin ve hesperidin) (Argyropoulos ve Müller, 2014; Awad ark., 2009). Bu 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 sitral (geranial ve neral), sitronelal, linalool, geraniol, β -pinen, α -pinen, β -karyofilen ve β -karyofilen oksit oluşturmaktadır (Sarı ve Ceylan, 2002; Sağlam ark., 2004).

Çalışmamızın amacı *M. officinalis* bitkisinin farklı bitki büyüme düzenleyicileriyle (BBD) yetiştirilen kallusların toplam fenolik ve toplam flavonoid kapasitesini belirlemektir.

2. Materyal ve Metot

Bu çalışmada, eksplant kaynağı olarak *M. officinalis* bitkisinin saksıda yetiştirilen fideleri kullanılmıştır. Fidelerin kurumaması için kültüre alınacakları gün yıpratılmadan toplanmıştır. Çalışmada kullanılan *M. officinalis* fideleri musluk suyuyla yıkandıktan sonra, besiyerine ekilecek olan nod kısımları bisturiyle alınmış ve 30 saniye süreyle %70 lik etil alkolde yavaşça karıştırılarak bekletilmiştir. Etil alkolden çıkarılan eksplantlar 3 defa steril saf suda yıkandıktan sonra 5 dakika da %50 lik ticari sodyum hipoklorit (NaOCl) bekletilmiştir. Sodyum hipoklorit olarak ticari çamaşır suyu (Ace) kullanılmıştır. Eksplantların yüzey sterilizasyonu bittikten sonra çamaşır suyunun uzaklaştırılması için 3 kez steril saf sudan geçirilmiştir.

2.1. Kallus Oluşumu

Bu çalışmada bitki doku kültürü için temel gereksinimleri karşılayan ve sıklıkla kullanılan MS ortamı kullanılmıştır (Murashige ve Skoog, 1962). Besiyerleri hazırlanmasında 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 plant agar eklenmiştir. Tablo 2.1 'de görüldüğü gibi 12 farklı BBD kombinasyonu içeren besiyerleri her bir kombinasyonda 5 tekrarlı olacak şekilde (12×5= 60 petri besiyeri) hazırlanmıştır.

Çalışmada MS ortamında 2,4-Diklorofenoksiasetik asit (2,4-D), Indol Asetik Asit (IAA), Kinetin (KIN) ve Picloram (PIC), 6-Benzylaminopürin (BAP) BBD' lerinin çeşitli konsantrasyon ve kombinasyonları kullanılmıştır (Tablo 2.1.).

Tablo 2.1: Bitki büyüme düzenleyicilerin yoğunlukları.

Besiyeri ortamı	2,4-D (mg/L)	IAA (mg/L)	BAP (mg/L)	KIN (mg/L)	PIC (mg/L)
1	1	1	0.5	-	-
2	1.5	1	0.5	-	-
3	2	1	0.5	-	-
4	1	-	0.5	-	-
5	1.5	-	0.5	-	-
6	2	-	0.5	-	-
7	1	-	-	1	0.5
8	1.5	-	-	1	0.5
9	2	-	-	1	0.5
10	-	-	0.5	-	1
11	-	-	0.5	-	1.5
12	-	-	0.5	-	2

Ekimi gerçekleşen bitkiler ± 22 °C de, 2500 lux floresan ışık altında, 16 saat aydınlık/ 8 saat karanlık şartlarda iklim odalarında bekletilerek, günlük olarak kallus gelişimi gözlenmiştir. Bu arada kontamine olan kültür kapları kültür ortamından uzaklaştırılıp, otoklavda steril edilmiştir.

2.2. Kallus Ekstraksiyonu

Besiyerinde yetiştirilen *M. officinalis* kallusları pens yardımıyla dikkatli bir şekilde petriden alınmıştır. Uygulanan bitki büyüme düzenleyicilere göre ayrılan kalluslar saf sudan geçirilerek 50 °C etüvde kurumaya bırakılmıştır. Kuruyan kalluslar hassas teraziyile 0.1 gram olacak şekilde tartılmış ve falkonlara aktarılmıştır. Kallusların üzerine 4 ml % 99.9 luk etanol pipetle eklenmiş ve falkonların etrafı parafimle sarılmıştır. Çözeltinin özdeşleşebilmesi için 72 saat buzdolabında saklanmıştır. Zamanı dolan çözeltiler blender yardımıyla 1-2 dk kadar parçalanmıştır. Daha sonra bu çözeltiler huniye yerleştirilen Whatman filtre kağıtıyla süzülmesi ve madde tayininde kullanılacak ekstraktlar elde edilmiştir.

2.3. Antioksidan Kapasite Analizi

Ekstrelerin antioksidan kapasitesi, ABTS+[2,2'-azonobis(3-etilbenzothiazoline-6-sulfonat)] radikal katyon yakalama kabiliyetine dayanılarak ölçülmüştür. Antioksidan kapasite analizi için, ABTS stok çözeltisi fosfat tampon çözelti ile absorban 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 μ l seyreltilmiş ABTS çözeltisi ve 100 μ l *M. officinalis* kallus ektresi eklenerek karıştırılmıştır. Örneklerin absorbanları 6. dakikada 734 nm UV-VİS 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 ark., 1999). Troloks antioksidan kullanılarak bir kalibrasyon grafiği hazırlanmış ve antioksidan kapasitesi, bu grafikten elde edilen sonuçlar ile TEAC olarak verilmiştir (Damar, 2010). Troloks kalibrasyon eğrisinden elde edilen $y = 1,444x - 0,0004$ formülüne göre hesaplanmıştır.

3. Sonuçlar

Bu çalışmada *M. officinalis* bitkisinden elde edilen kallus ekstraktlarının antioksidan kapasite verileri hesaplanmıştır.

3.1. Antioksidan Kapasite Analizi

M. officinalis kallus etanol ekstraktlarının farklı bitki büyüme düzenleyicilerine göre antioksidan kapasitesi Tablo 3.1 de verilmiştir.

Tablo 3.1.3: Kallus etanol ekstraktlarının antioksidan kapasiteleri

Büyüme düzenleyici kombinasyonları	Antioksidan kapasite (mM TEAC)
1 mg/L 2,4-D + 1 mg/L IAA + 0.5 mg/L BAP	0.363
1.5 mg/L 2,4-D + 1 mg/L IAA + 0.5 mg/L BAP	0.304
2 mg/L 2,4-D + 1 mg/L IAA + 0.5 mg/L BAP	0.329
1 mg/L 2,4-D + 1 mg/L PIC + 0.5 mg/L KIN	0.290
1.5 mg/L 2,4-D + 1 mg/L PIC + 0.5 mg/L KIN	0.365
2 mg/L 2,4-D + 1 mg/L PIC + 0.5 mg/L KIN	0.216
1 mg/L 2,4-D + 0.5 mg/L BAP	0.297
1.5 mg/L 2,4-D + 0.5 mg/L BAP	0.191
2 mg/L 2,4-D + 0.5 mg/L BAP	0.232
1 mg/L PIC + 0.5 mg/L BAP	0.326
1.5 mg/L PIC + 0.5 mg/L BAP	0.329
2 mg/L PIC + 0.5 mg/L BAP	0.223

Bu sonuçlara göre kallus etanol ekstraktlarının antioksidan kapasitesinde 0.191 – 0.365 mM TEAC arası değerler elde edilmiştir. Sonuçlar karşılaştırıldığında, en yüksek 1.5 mg/L 2,4-D + 1 mg/L PIC + 0.5 mg/L KIN hormon kombinasyonunda, en düşük 1.5 mg/L 2,4-D + 0.5 mg/L BAP hormon konsantrasyonunda olan kallus etanol ekstraktları antioksidan kapasite göstermiştir.

4. Tartışma

Hormonların etkisiyle yetişen bitki kalluslarının kimyasal özellikleri farklı olduğundan, çalışmada yapılan antioksidan kapasitesi özellikleri elde edilen her bir kallus için de farklı olmuştur.

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 ark., 2007, Yesil-Celiktas ark., 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) ile 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 ark., 2007). Giri ve ark., yukarıda belirtilen çalışmasında, *H. edgeworthii* kalluslarının metanolik ekstraktlarında ABTS testinde en yüksek antioksidan kapasite değeri 0,0671 askorbik asit eşdeğeri (AAE)/ g kuru ağırlık (DW) olarak, BA 3 µM konsantrasyonunda tespit etmişlerdir (Giri ark., 2012). 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 1/2MS+0.5NAA ortamındaki kalluslarda, en düşük 1.191 mmol/g TEAC olarak 0.5BAP+2KIN+3 gibberellik asit (GA₃) ortamındaki kalluslarda elde etmişlerdir (Kousalya ve Bai, 2016). Bahri-Sahloul ark., *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 ark., 2014).

5. Sonuç

Yapılan bu çalışmada tıbbi ve aromatik bitki olan *M. officinalis* bitkisinin in vitro koşullarda çeşitli bitki büyüme düzenleyicileriyle kallus üretimi sağlanmış ve antioksidan özellikleri belirlenmiştir. Sonuçlar genel olarak incelendiğinde antioksidan verilerinin normal bir bitkiye göre sınır değerlerin bir miktar altında olduğu tespit edilmiştir. Ayrıca BBD' lerin kombinasyon ve konsantrasyon değişimlerinin antioksidan miktarını etkilediği görülmüştür. Bitki çeşidi, bitkiden alınan miktar, ekstraksiyon seçimi, çözücü ve çözünen polaritesi gibi seçeneklerin farklılığı bu sonucun nedenleri olarak sayılabilir.

Teşekkür

Bu çalışma Fırat Üniversitesi Bilimsel Araştırma Birimi'nin MF 15.39 nolu projesi ile desteklenmiştir.

Kaynaklar

- 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.
- Argyropoulos D, Müller J 2014. Changes of essential oil content and composition during convective drying of lemon balm (*Melissa officinalis* L.). *Industrial Crops and Products* 52:118-224.
- Awad R, Muhammad A, Durst T, Trudeau VT, Arnason JT 2009. Bioassay- guided fractionation of lemon balm (*Melissa officinalis* L.) using an in vitro measure of GABA transaminase activity. *Phytotherapy Research* Volume 23 Issue 8 1075-1081.
- Bahri-Sahloul R, Ben Fredj R, Boughalleb N, Shriaa J, Saguem S, Hilbert JL and Harzallah-Skhiri F 2014. Phenolic composition and antioxidant and antimicrobial activities of extracts obtained from *Crataegus azarolus* L. var. *aronia* (Willd.) Batt. ovaries calli. *Journal of Botany* 2014.
- 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.
- Farahani HA, Valadabadi SA, Daneshian J and Khalvati MA 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.
- Giri L, Dhyani P, Rawat S, Bhatt ID, Nandi SK, Rawal RS 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.
- Grzegorzczak 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.
- Kousalya L and Bai VN 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.
- 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. *Journal of Medicinal Plants Research* Vol 4:(25) 2753-2759.
- 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.
- 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.
- Sarı AO 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.
- Simon JE and Chadwick AF 1984. *Herbs an indexed bibliography 1971-1980: the scientific literature on selected herbs and aromatic and medicinal plants of the temperate zone*. Archon Books.
- 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* calli. *Journal of plant physiology* 164:(11) 1536-1542.
- Zeybek U and Haksel M 2010. *Important medicinal plants and their use in Turkey and around the world*. Argefar and Helvacıade Medical Publications. Izmir.