



In Vitro Koşullarda Çoğaltılan *Bacopa monnieri* (L.) Pennell'nin Oksidatif Stres İnhibisyon Aktiviteleri

Oxidative Stress Inhibition Activities of In Vitro Propagated Bacopa monnieri (L.) Pennell

Buğrahan Emsen¹ , Mehmet Karataş² , Muhammet Doğan¹ 

¹Karamanoğlu Mehmetbey Üniversitesi, Kamil Özdağ Fen Fakültesi, Biyoloji Bölümü, Karaman, Türkiye

²Necmettin Erbakan Üniversitesi, Fen Fakültesi, Biyoteknoloji Bölümü, Konya, Türkiye

Öz

Mevcut çalışma, doku kültürü tekniği ile üretilen *Bacopa monnieri* (L.) Pennell'nin metanol ve su ekstraktlarının antioksidan bileşenlerini ve aktivitelerini sunmaktadır. Çoklu sürgün rejenerasyonu için *B. monnieri*'nin sürgün ucu eksplantları 0,05, 0,25, 0,50, 1,00 ve 2,00 mg/L 6-Benzilaminopurine (BAP) ve 0,25 mg/L Kinetin (KIN) kombinasyonlarını içeren Murashige ve Skoog (MS) besin ortamında sekiz hafta boyunca kültüre alınmıştır. Ayrıca eksplantlar kontrol amaçlı içerisinde bitki büyüme düzenleyici içermeyen MS besin ortamında da kültüre alınmıştır. Maksimum eksplant başına sürgün sayısı (24,39 adet) 1,00 mg/L BAP + 0,25 mg/L KIN içeren MS ortamında elde edilmiştir. En yüksek sürgün uzunluğu (2,91 cm) 0,50 mg/L BAP + 0,25 mg/L KIN içeren besin ortamında kaydedilmiştir. *B. monnieri*'nin antioksidan içerikleri bitkinin toplam fenol, flavonoid, β-karoten ve likopen oranları ölçülerek belirlenmiştir. Denemeler, su ekstraktının antioksidan yönden zengin olduğunu göstermiştir. *B. monnieri*'nin 2,2-difenil-1-pikrilhidrazil (DPPH) ve metal şelatlama aktiviteleri incelendiğinde, en yüksek aktivitelerin 4,31 ve 5,12 mg/mL medyan inhibitör konsantrasyonu (IC₅₀) değerleri ile su ekstraktına ait olduğu ortaya çıkarılmıştır. Elde edilen veriler, *B. monnieri*'nin yüksek antioksidan kapasiteye sahip olduğundan dolayı oksidatif stres kaynaklı hastalıkların tedavisinde önemli bir rol oynayabileceğini göstermektedir.

Anahtar Kelimeler: Antioksidan, Ekstrakt, Sürgün rejenerasyonu, Sürgün ucu

Abstract

Present study presents antioxidant components and activities of methanol and water extracts of *Bacopa monnieri* (L.) Pennell propagated by the tissue culture technique. For multiple shoot regeneration, shoot tip explants of *B. monnieri* (L.) Pennell were cultured on Murashige and Skoog (MS) medium containing 0,05, 0,25, 0,50, 1,00 and 2,00 mg/L 6-Benzylaminopurine (BAP) and 0,25 mg/L Kinetin (KIN) combinations for eight weeks. The explants were also cultured on plant growth regulator-free MS medium with the purpose of controlling. Maximum number of shoots per explant (24,39) was obtained on MS medium supplemented with 1,00 mg/L BAP + 0,25 mg/L KIN. The highest shoot length (2,91 cm) was recorded on MS medium containing 0,50 mg/L BAP + 0,25 mg/L KIN. Antioxidant components of *B. monnieri* were determined by measuring total phenol, flavonoid, β-carotene and lycopene rates of methanol and the water extracts of the plant. The treatments showed that the water extract is rich in antioxidant compounds. When 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) and metal chelating activities of *B. monnieri* were investigated, it was revealed that the highest activity belonged to the water extract with 4,31 and 5,12 mg/mL median inhibitory concentration (IC₅₀) value, respectively. Obtained data indicated that since *B. monnieri* had high antioxidant capacity, it may play a critical role in the treatment of oxidative stress-induced diseases.

Keywords: Antioxidant, Extract, Shoot regeneration, Shoot tip

1. Giriş


İnsan vücudunda metabolik faaliyetleri bozan, hücreleri yaralanmalara ve hatta ölüme kadar götürebilen faktörlerin

başında oksidan maddeler gelmektedir. Oksidanlar olarak adlandırılan maddelerin temelinde serbest radikaller yer almaktadır. Serbest radikaller, çevrelerindeki her materyal ile reaksiyona girebilen ve yapılarında eşlenmemiş elektron bulunduran moleküllerdir. Ayrıca bu moleküllerdeki negatif elektron ve çekirdekdeki pozitif proton sayıları eşit değildir (Fang vd. 2002). Bu sebeplerden dolayı serbest radikaller insan vücudundaki genetik materyaller ve proteinler gibi

*Sorumlu yazarın e-posta adresi: mkaratas@konya.edu.tr

Buğrahan Emsen  orcid.org/0000-0002-9636-2596

Mehmet Karataş  orcid.org/0000-0001-8803-0017

Muhammet Doğan  orcid.org/0000-0003-3138-5903

önemli moleküllere hasar verebilirler. Aynı zamanda bu moleküller hücre zarının seçici-geçirgenlik özelliğinin artmasına, hücre zarının yıkımına ve en nihayetinde hücrelerin ölümüne yol açabilirler. Bu hücre ölümleri genellikle proteinler, karbonhidratlar, nükleik asitler ve lipidler üzerindeki olumsuz etkilerden kaynaklanmaktadır (Wassmann vd. 2004, Niki vd. 2005).

Serbest radikallerin ortaya çıkardığı oksidatif stres gibi olumsuz faaliyetleri engellemek için vücudumuzda bazı savunma mekanizmaları gelişmiştir (Wu vd. 2013). Reaktif oksijen türleri tarafından meydana gelen hasarları ortadan kaldırmak için vücudumuzda oluşan savunma sistemi antioksidan savunma mekanizması olarak adlandırılmaktadır. Antioksidanlar ilaçların, kanserojen maddelerin ve toksik radikal reaksiyonlarının yüksek orandaki yan etkilerine karşı hücreleri direkt veya dolaylı olarak koruyan savunma maddeleridir (Xiang vd. 2013).

Birçok alanda özellikle gıda endüstrisinde, BHA (Butillenmiş hidroksianisol), BHT (Butillenmiş hidroksitolüen), PGE (propilgallat) ve TBHQ (üçüncül-butilhidrokinon) gibi birçok sentetik antioksidandan faydalanılmaktadır (Lorenzo vd. 2013). Bu antioksidanların etkili, kalıcı ve ucuz oldukları bilinmesine rağmen birçok potansiyel yan etkileri tespit edilmiştir (Risch ve Ho 1997). Bu yan etkilerin aşırı boyutta olması ve eski çağlardan beri insanoğlunun tedavi amaçlı sayısız aromatik bitkiden yararlanmış olması birçok araştırmacıyı doğal antioksidanlar üzerinde çalışmaya yönlendirmiştir (Emsen vd. 2017). Son yıllarda farklı bitki ekstraktları ve onların aktif bileşenlerinin tedavi amaçlı kullanımları araştırılmaktadır. Tıbbi ve aromatik bitkiler doğal antioksidan madde içeren bitkilerin başında gelmektedir (Karatas vd. 2015).

Bacopa monnieri (L). Pennell Hindistan, Nepal, Sri Lanka, Çin, Florida, Hawaii ve ABD'nin güney eyaletlerinde sulak alanlarda yetişen çok yıllık bir bitkidir. *B. Monnieri* kalın yapraklara sahiptir ve yaprakları gövde üzerinde zıt düzenlenmiştir. Çiçekleri dört ya da beş petalli küçük ve beyaz renklidir (Sandeep vd. 2013). *B. monnieri* içerdikleri alkaloidler (brahmin ve herpestine), saponinler (d-mannitol ve hersaponin, asit A ve monnieren), flavonoidler, betulinik asit, stigmastrol, beta-sitosterol ve Bacopa saponinler gibi aktif bileşiklerden dolayı geleneksel tıp sisteminde büyük öneme sahiptir (Chatterji vd. 1965). Ayrıca, *B. monnieri* kendine has olan bacopasaponin F, bacopasaponin E, bacopaside N1, bacopaside III, bacopaside IV ve bacopaside V gibi diğer önemli bileşikler içermektedir (Anbarsi vd. 2006). *B. monnieri* Hindistan ve Pakistan'da bir beyin ve kalp

toniği olarak kullanılmakta olan tıbbi bitkidir (Vijaykumar vd. 2010). Yine bitkinin, astım ve epilepsi hastalığının tedavisinde kullanıldığı bildirilmiştir (Rajani vd. 2004).

Genelde Brahmi olarak bilinen tıbbi bitki bir bitki olan *B. monnieri*, anti-depresan (Sairam vd. 2002), antiinflamatuar ve anti-mikrobiyal etkiler göstermekte (Channa vd. 2006), en polüler nörotonik ve hafıza güçlendirici etkileye de sahiptir (Vollala vd. 2010). Ayrıca, rahatlama ile ilgili fiziksel süreçlere ve zihinsel algılamının artmasına yardımcı olduğu ve bu bitkinin ekstraktları hayvanlarda bilişsel etkiyi artırdığı bildirilmiştir (Uabundit vd. 2010). Bu bitkinin etanolik ekstraktlarının farelerin farklı beyin bölgelerinde anti-oksidan enzim aktivitesini artırdığı tespit edilmiştir (Bhattacharya 2000).

Tıbbi bir bitki olan *B. monnieri* bitkisinin insan sağlığı açısından önemi birçok araştırma sonucuna yansımıştır. Bu bitki üzerinde gerçekleştirilen çalışmalar genellikle bitkinin doğal ortamından toplanması suretiyle gerçekleştirilmiştir. Bu durum ekolojik dengenin bozulmasına yol açabilmektedir. Mevcut çalışmada *B. monnieri* bitkisinin laboratuvar koşullarında üretimi gerçekleştirilmiş ve bu sayede doğanın mevcut dengesinin korunmasına katkı sağlanmıştır. *In vitro* koşullarda üretimin gerçekleştirilmesinin bir diğer avantajı ise istenilen miktarda bitkinin elde edilebilmesidir. Bitki miktarının artması ile birlikte bitki bünyesinde bulunan sayısız bileşen istenilen oranlarda elde edilebilmiştir. Tıbbi bitki *B. monnieri*, yapısında barındırdığı antioksidan bileşenler aracılığı ile farmakoloji alanında söz sahibidir. Mevcut çalışmada, doku kültürü teknikleri ile istenilen oranda çoğaltımı gerçekleştirilen *B. monnieri* bitkisinin antioksidan bileşenleri tespit edilmiş ve bu bileşenlerin insan vücudu üzerinde antioksidan kapasiteyi ne derecede etkilediği belirlenmiştir. Bu sayede, birçok hastalığın tedavi sürecinde oksidatif stresi azaltacak ilaç geliştirme sürecine katkı sağlanacağı ümit edilmektedir.

2. Gereç ve Yöntem

2.1. Bitki Materyali

Mevcut çalışmada, bitki materyali olan *B. monnieri* Karamanoğlu Mehmetbey Üniversitesi, Biyoloji Bölümü, Biyoteknoloji Laboratuvarı'ndan temin edilmiştir.

2.2. Besin Ortamı ve Doku Kültürü Koşulları

In vitro çoğaltım çalışması için kullanılan *B. monnieri*'nin yüzey sterilizasyonu daha önce Karatas vd. (2013a)'nin uyguladığı prosedür ile steril edilmiştir. Denemelerde temel besin ortamı olarak MS (Murashige ve Skoog 1962) mineral,

tuz ve vitaminleri içeren besin ortamı kullanılmıştır ve besin ortamına bitki büyüme düzenleyici olarak 0,05-2,00 mg/L 6-Benzilaminopurin (BAP) ve 0,25 mg/L Kinetin (KIN) ilave edilmiştir. Ayrıca explantlar bitki büyüme düzenleyici içermeyen ortamda da kültüre alınmıştır. Besin ortamının pH'sı 1 N NaOH/KOH ya da 1 N HCl kullanılarak ayarlandıktan sonra 1.2 atmosfer basınç altında ve 121°C'de 20 dakika tutularak steril edilmiştir. Sürgün rejenerasyonu için steril bitkilerden izole edilen sürgün ucu mersitem eksplantları, bitki büyüme düzenleyici içeren MS besin ortamlarına yerleştirilmiş ve kültürler beyaz LED (Light Emitting Diodes) ışığı altında ve uygun fotoperiyotta $24 \pm 1^\circ\text{C}$ 'de tutulmuştur.

2.3. Ekstraktların Hazırlanması

Çalışmada, *in vitro* ortamda çoğaltılacak olan *B. monnieri* bitkisi oda şartlarında 7 gün süre ile kurumaya bırakılmıştır. Kuruyan bitkilerin 10 g'ı havan ile toz haline getirilmiş ve 250 ml metanol ve su çözücülerini ile Soxhlet ekstraksiyon düzeneği ile ekstraksiyonları elde edilmiştir. Elde edilen ekstraktlardaki çözücüler döner buharlaştırıcı ile uçurulmuş ve etken maddeler %5'lik dimetil sülfoksit (DMSO) içerisinde çözülerek stok çözeltiler oluşturulmuştur. Denemelerde kullanılacak stok çözeltilerden konsantrasyon miktarına göre ilgili seyreltmeler %5'lik DMSO ile yapılmış ve son konsantrasyonlar 2, 4, 6, 8 ve 10 mg/mL olarak hazırlanmıştır.

2.4. Toplam Fenolik İçeriğinin Belirlenmesi

B. monnieri ekstraktlarında bulunan toplam fenolik madde içeriği belirlenmesi çalışmasında standart olarak gallik asit kullanılmıştır. Bu yöntemde farklı tür ve solvent sistemlerinden elde edilecek maksimum konsantrasyondaki ekstrakt ve standartlardan (0,1-5 mM) 20 µl mikro plaka kuyucuklarına koyulmuştur. Üzerlerine 20 µl folin reaktifi (2N) eklenmiş ve pipetajlama ile karıştırılan örnekler karanlıkta 3 dk inkübe edilmiştir. Ardından üzerlerine 20 µl %35'lik (w/v) sodyum karbonat ve 140 µl dH₂O eklenerek 10 dk karanlık ortamda bekletilmiştir. 725 nm'de kör tüpüne karşı absorbans değerleri okunmuş, gallik asit ile oluşturulmuş standart kalibrasyon eğrisi kullanılarak her 1 mg ekstrakt içinde bulunan toplam fenolik içerik miktarları hesaplanmıştır.

2.5. Toplam Flavonoid İçeriğinin Belirlenmesi

Maksimum konsantrasyonda olan *B. monnieri* ekstraktlarından 50 µl mikropłaka kuyucuklarına koyulmuştur. Üzerlerine sırasıyla 215 µl %80'lik (v/v), 5 µl AlNO₃ (%10

w/v) ve 5 µl potasyum asetat (1 M) eklenecektir. 40 dakika oda sıcaklığında bekletildikten sonra spektrofotometrede 415 nm dalga boyunda absorbans değerleri kör tüpüne karşı okunmuş ve toplam flavanoid içeriği 1 mg ekstrakt içerisindeki flavanoid miktarı olarak aşağıdaki formüle göre hesaplanmıştır.

$$\text{Toplam Flavonoid İçeriği } (\mu\text{g/mg ekstrakt}) = (A_{415} + 0,01089) / 0,002108$$

2.6. β Karoten ve Likopen İçeriğinin Belirlenmesi

B. monnieri'nin metanol ve su ekstraktları içerisindeki β karoten ve likopen miktarları belirlenmiştir. 100 mg ekstrakt, 10 ml aseton:hekzan (4:6) ile karıştırılıp vortekslenildikten sonra filtre kağıdında süzölmüştür. Ardından 453, 505 ve 663 nm dalga boylarındaki absorbans değerleri kullanılarak β karoten ve likopen miktarları aşağıdaki formüle göre hesaplanmıştır.

$$\beta \text{ karoten içeriği (mg/100 mg)} = 0.216 A_{663} - 0.304 A_{505} + 0.452 A_{453}$$

$$\text{Likopen içeriği (mg/100 mg)} = -0.0458 A_{663} + 0.372 A_{505} - 0.0806 A_{453}$$

2.7. Metal Şelatlama Aktivitesinin Belirlenmesi

B. monnieri'nin metal şelatlama aktivitesi ölçümünde standart olarak EDTA kullanılmıştır. Yönteme göre değişik konsantrasyonlardaki *B. monnieri* ekstraktları ve standartlardan 50 µl mikropłaka kuyucuklarına koyulmuştur. Üzerlerine sırasıyla 10 µl ferrozin (5 mM), 5 µl FeCl₂ (2 mM) ve 185 µl metanol eklenmiş ve 10 dakika oda sıcaklığında bekletilmiştir. Kör için toplam hacim kadar su koyulmuş ve spektrofotometrik ölçümler 562 nm'de yapılmıştır.

2.8. 2,2-difenil-1-pikrilhidrazil (DPPH) Üzerinden Serbest Radikal Yakalama Aktivitelerinin Belirlenmesi

B. monnieri ekstraktlarının serbest radikal giderme aktivitesinin ölçümünde standart olarak gallik asit ve farklı konsantrasyonlarda *B. monnieri* ekstraktları (2, 4, 6, 8, 10 mg/mL) hazırlanmıştır. Yönteme göre *B. monnieri* ekstraktları ve standartlardan, her bir mikro plaka kuyucukuna 20 µl koyulmuş ve üzerlerine 180 µl DPPH (metanol içerisinde 0,06 mM) eklenmiştir. Karanlık ortamda 60 dk bekletildikten sonra 517 nm de absorbans değerleri ölçülerek DPPH serbest radikalinin indirgenmesi belirlenmiştir. Serbest radikal yakalama aktiviteleri yüzde olarak aşağıdaki formülle göre hesaplanmış ve DPPH radikal yakalama aktivitesi her bir örnek için medyan inhibitör konsantrasyonu (IC₅₀) değerleri hesaplanarak karşılaştırılmıştır.

2.9. Verilerin Analizi

Verilerin istatistiksel analizleri SPSS 21.0 istatistik veri paketi aracılığı ile gerçekleştirilmiştir. Veriler arasındaki istatistiksel farklılıkların belirlenmesinde post-hoc Duncan çoklu karşılaştırma testinden, değişkenler arasındaki ilişki seviyelerinin tespit edilmesinde ikili korelasyon analizinden ve IC₅₀ değerlerinin hesaplanması amacıyla probit analizinden yararlanılmıştır.

3. Bulgular ve Tartışma

In vitro sürgün rejenerasyonu için *B. monnieri*'nin sürgün ucu ve boğum eksplantları 0,05 - 2,00 mg/L BAP ve 0,25 mg/L KIN kombinasyonlarını içeren MS besin ortamında sekiz hafta boyunca kültüre alınmıştır. İki hafta sonra ortamlarda çoklu sürgün oluşumları gözlenmeye başlanmıştır. Ayrıca dördüncü haftada kültür ortamlarında kök oluşumları kaydedilmiştir. Sekiz hafta sonunda deneme sonlandırılmış (Şekil 1) ve sürgün rejenerasyon yüzdesi (%), eksplant başına sürgün sayısı (adet) ve sürgün uzunluğu (cm) verileri alınarak varyans analizi uygulanmıştır (Çizelge 1). Benzer şekilde *Mentha viridis* L. (Raja ve Arockiasamy 2008), *Cryptocoryne wendtii* ve *Cryptocoryne beckettii* (Stanly vd. 2011), *Hygrophila polysperma* (Roxb.) T. Anderson (Karatas vd. 2013b), *Ceratophyllum demersum* L. (Karatas vd.

2014; Dogan vd. 2015), *Pogostemon erectus* (Dalzell) Kuntze (Dogan vd. 2016) gibi bazı su bitkilerinin doku kültürü teknikleri ile üretimi daha önce bildirilmiştir.

Çizelge 1'de görüldüğü gibi sürgün rejenerasyon oranı bakımından ortamlar arasındaki istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık bulunmazken, eksplant başına sürgün sayısı ve sürgün uzunluğu bakımından ise istatistiksel olarak $p < 0,01$ düzeyinde anlamlı bulunmuştur. Bu farklılığın önem düzeyini belirlemek amacıyla Duncan testi (Çizelge 2) yapılmıştır.

Sürgün rejenerasyon yüzdeleri tüm ortamlarda %77,77 ile %100,00 arasında tespit edilmiştir. Yüksek oranda kullanılan hormon kombinasyonunda sürgün rejenerasyon oranında azalma kaydedilmiştir. Genel olarak ise tüm ortamlarda yüksek oranda sürgün rejenerasyonu elde edilmiştir (Çizelge 2). Öztürk vd. (2004) *Ludwigia repens* ile yaptığı çalışmada sürgün rejenerasyon oranını BAP ve NAA içeren ortamda, sürgün ucu meristeminde %37,50-%68,75, 1. koltukaltı meristeminde %56,25-%100,00 ve 2. koltukaltı meristeminde %14,00-%21,50 olarak bildirmiştir. Yine Doğan (2013) *C. demersum* ile yaptığı çalışmada sürgün rejenerasyon oranı sürgün ucu eksplantında %83,33-%91,67, 1. koltukaltı meristem eksplantında %58,33-%91,67 ve 2. koltukaltı meristem eksplantında %50,00-%100,00 arasında

Çizelge 1. Farklı BAP ve 0,25 mg/L KIN dozlarının *B. monnieri*'nin sürgün ucu eksplantlarından sürgün rejenerasyonuna ait varyans analizi.

VK	SD	Sürgün Rejenerasyon Oranı (%)		Eksplant Başına Sürgün Sayısı (adet)		Sürgün Uzunluğu (cm)	
		KO	F	KO	F	KO	F
Ortam	5	287,15	2,33 ^{ös}	175,23	36,51**	0,98	107,74**
Hata	12	123,51	-	4,80	-	0,01	-
Genel toplam	17	-	-	-	-	-	-

** $p < 0,01$ düzeyinde önemli. ^{ös} Önemsiz.

Çizelge 2. Farklı BAP ve 0,25 mg/L KIN dozlarının *B. monnieri*'nin sürgün ucu eksplantlarından sürgün rejenerasyonuna etkisi.

Büyüme Düzenleyici (mg/L)		Sürgün Rejenerasyon Oranı (%) ^{ös}	Eksplant Başına Sürgün Sayısı (adet)**	Sürgün Uzunluğu (cm)**
BAP	KIN			
0	0	77,77	2,72 ^c	1,26 ^e
0,05	0,25	100,00	17,16 ^b	2,18 ^d
0,25	0,25	100,00	19,30 ^{ab}	2,48 ^{bc}
0,50	0,25	100,00	22,29 ^{ab}	2,91 ^a
1,00	0,25	88,89	24,39 ^a	2,66 ^b
2,00	0,25	83,33	16,45 ^b	2,36 ^{cd}

**Aynı sütunda farklı üstel harflerle gösterilen ortalamalar arasında fark $p < 0,01$ düzeyinde önemlidir. ^{ös} Önemsiz.

kaydettiğini bildirmiştir. Vijayakumar vd. (2010) *B. monnieri* ile yaptığı çoğaltım çalışmasında, BAP içeren ortamda %30-95 oranında, TDZ içeren ortamda ise %50-95 oranında sürgün rejenerasyonu elde etmiştir.

Eksplant başına sürgün sayısı ile ortam arasında $p < 0,01$ düzeyinde anlamlı bir farklılık tespit edilmiş olup, MS besin ortamlarında sürgün sayıları 2,72-24,39 adet arasında değişmiştir (Çizelge 2). En fazla sürgün sayısı (24,39 adet) 1,00 mg/L BAP + 0,25 mg/L KIN kombinasyonlarını içeren MS besin ortamında, ardından 22,29 adet ile 0,50 mg/L BAP + 0,25 mg/L KIN içeren MS besin ortamında belirlenmiştir. En az sürgün sayısı (2,72 adet) hormon içermeyen kontrol grubu bitkilerinde, ardından ise 16,45 adet ile 2,00 mg/L BAP + 0,25 mg/L KIN içeren MS besin ortamında belirlenmiştir. Sürgün sayısı BAP'ın 1,00 mg/L kullanıldığı orana kadar artış gösterirken, BAP oranının daha fazla kullanılması ile önemli oranda sürgün sayısı azalmıştır. Benzer şekilde, Banerjee ve Shrivastava (2008) *B. monnieri*'nin etkili üretimi için BAP (0,5-2 mg/L) ve KIN (0,5-2 mg/L) oranlarını hem tek olarak hem de her ikisinin kombinasyonlarını içeren MS veya ½ MS besin ortamlarında kültüre almışlardır. Üç hafta sonra en fazla sürgün rejenerasyonu ve sürgün sayısı 1,0 mg/L BAP - 0,5 mg/L KIN besin ortamında kaydetmişlerdir. Sharma vd. (2010) *B. monnieri* bitkisinin *in vitro* çoğaltımı için nodal eksplantlarını 0,01-0,30 mg/L BAP içeren ortamda kültüre almış ve en yüksek sürgün sayısını 41.2 ± 2.54 adet olarak 0,10 mg/L BAP içeren MS ortamında elde edilmiştir.

Kültür ortamlarındaki eksplantların sürgün uzunlukları 1,26-2,91 cm arasında değişmiş olup, en uzun sürgünler 2,91 cm ile 0,50 mg/L BAP + 0,25 mg/L KIN içeren MS besin ortamında ardından 2,66 cm ile 1,00 mg/L BAP + 0,25 mg/L KIN içeren MS besin ortamında tespit edilmiştir. En kısa sürgünler ise 1,26 cm ile hormonsuz kültür ortamındaki eksplantlarda, ardından 2,18 cm ile BAP hormonunun en düşük oranda kullanıldığı (0,05 mg/L) kültür ortamlarındaki eksplantlarda belirlenmiştir. Genel olarak BAP hormonunun ortamda düşük veya yüksek olması sürgün uzunluğunu olumsuz etkilemiştir. Buna karşın Gnanaraj vd. (2011) *Alternanthera sessilis* (L.)'in *in vitro* çoğaltımı için yürüttükleri çalışmada en uzun sürgünleri (6,3 cm) olarak 2,00 mg/L BAP içeren MS ortamında elde etmiştir.

Maddelerin oksidasyonunu inhibe eden veya geciktiren maddelere antioksidanlar denir ve son yıllarda bitkisel kökenli doğal antioksidanların keşfedilmesine yönelik çalışmalar giderek artmaktadır. Farklı bitki türleri taşıdıkları an-

tioksidan bileşenler aracılığı ile anti-inflamatuar, antialerjik, antiviral ve antikanserijen gibi özellikler gösterebilmektedir (Emsen vd. 2016). Antioksidan maddeler arasında fenolik bileşikler, flavonoidler, β -karoten ve likopen içeriği bitkilerin antioksidan potansiyeli ile ilişkilidir (Fidrianny vd. 2014) which were 2,2-diphenyl-1 picrylhydrazyl (DPPH).

Mevcut çalışmada, *B. monnieri*'den elde edilen metanol ve su ekstraktlarının antioksidan içeriklerinin incelenmesi amacıyla β -karoten, flavonoid, likopen ve toplam fenol içerikleri değerlendirilmiştir. Elde edilen sonuçlar incelendiğinde su ekstraktının tüm antioksidan içeriklerinin metanol ekstraktına kıyasla yüksek oranda olduğu tespit edilmiştir. Bileşenlerin oranları kıyaslandığında en yüksek seviyenin toplam fenole ait olduğu görülmüştür. Metanol ekstraktının toplam fenol içeriği 70,84 $\mu\text{g}/\text{mg}$ iken, su ekstraktı 80,53 $\mu\text{g}/\text{mg}$ oranında toplam fenol içeriğine sahip olmuştur. Fenol içeriğinin ardından yüksek oran gösteren içerik β -karoten olmuş ve bu değerler metanol ve su ekstraktında sırasıyla 14,12 ve 21,28 $\mu\text{g}/\text{mg}$ olarak ölçülmüştür (Çizelge 3).

DPPH radikalini yakalama modeli, antioksidanların serbest radikal süpürme aktivitelerini değerlendirmek için yaygın olarak kullanılan bir yöntemdir. DPPH dengeli bir serbest radikaldir ve antioksidanlar DPPH ile reaksiyona girdiğinde, eşleşmeyen elektron eşlenir ve DPPH çözeltisi renksizleştirilir. Bu nedenle renk giderme derecesi, antioksidan içeren materyallerin radikal süpürme aktivitesini gösterir (Sharma ve Bhat 2009).

Test edilen *B. monnieri* ekstraktlarının farklı konsantrasyonlarının serbest radikal olan DPPH'i yakalama aktivitelerine bakıldığında her ekstrakt için konsantrasyon oranı arttıkça aktivite oranının da yükseldiği gözlemlenmiştir.

Test edilen ekstraktların DPPH yakalama aktiviteleri kıyaslandığında en yüksek oran (%72,76) su ekstraktının 10 mg/mL'lik konsantrasyonlu uygulamasında görülmüştür. Aynı zamanda su ekstraktının 8 mg/mL'lik konsantrasyonlu denemesinde ortaya çıkan DPPH yakalama aktivitesi (%71,77) en yüksek veriden istatistiksel olarak ($p > 0,05$) farksız bulunmuştur. Denemelerdeki en düşük DPPH aktivitesi (%12,67) ise metanol ekstraktının 2 mg/mL'lik uygulamasında belirlenmiş ve ilgili değer diğer tüm uygulamalardan önemli derecede ($p < 0,05$) farklı olduğu belirlenmiştir (Şekil 2).

B. monnieri'nin farklı ekstraktlarının denemelerde kullanılan tüm konsantrasyonlarının ortaya çıkardığı DPPH radikallerini inhibisyon etkileri hesaba katılarak IC_{50} değerleri hesaplanmıştır (Çizelge 4). Bu değerler baz alındığında

Çizelge 3. Farklı ekstraktların antioksidan bileşenleri.

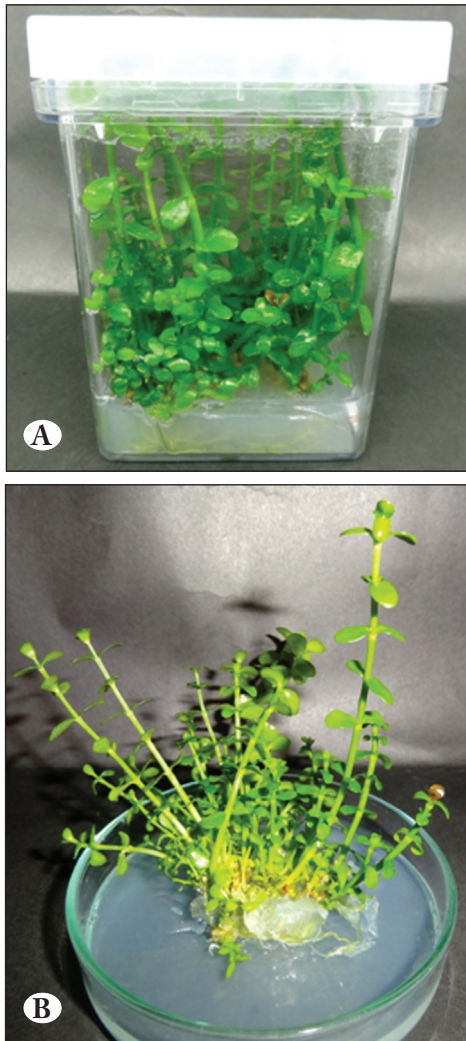
Ekstrakt	Bileşen ($\mu\text{g}/\text{m}^3$) ^a			Toplam fenol
	β -Karoten	Flavonoid	Likopen	
Metanol	14,12 \pm 1,23	4,68 \pm 0,38	4,16 \pm 0,28	70,84 \pm 1,85
Su	21,28 \pm 1,27	6,47 \pm 0,31	9,57 \pm 0,54	80,53 \pm 1,68

^aHer değer ortalama \pm standart sapma olarak ifade edilmiştir ($n = 3$).

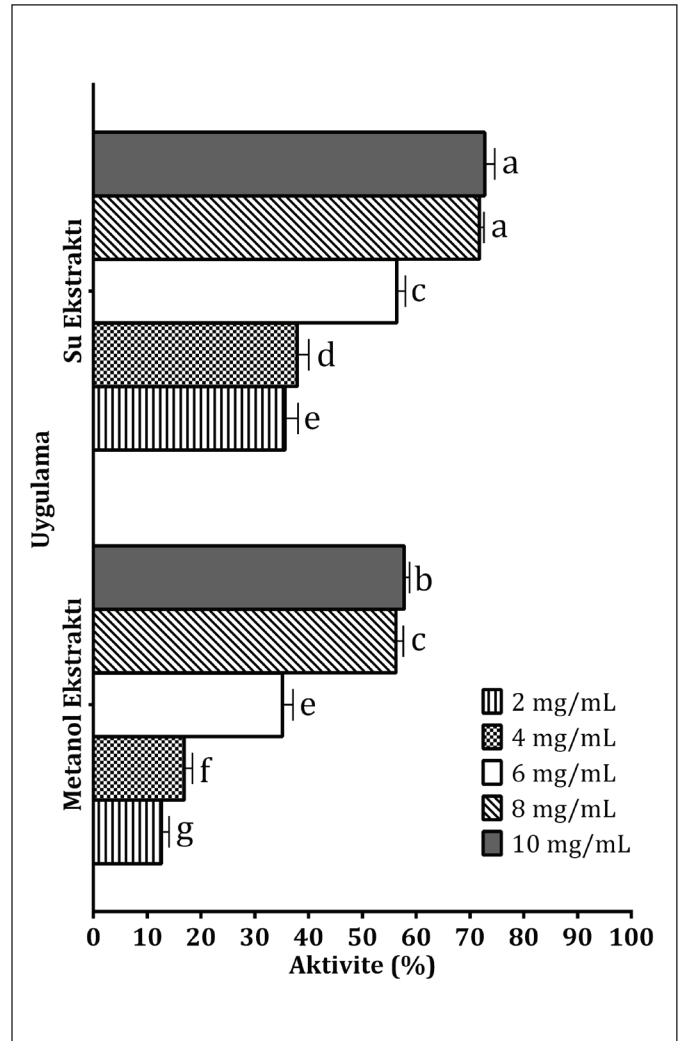
Çizelge 4. Farklı ekstraktların ve standardın (gallik asit) DPPH aktiviteleri için IC_{50} değerleri (mg/mL).

Deneme	IC_{50} (sınırlar)	Eğim \pm Standart hata (sınırlar)
Metanol ekstraktı	8,14 ^c (7,52-8,93)	2,22 \pm 0,16 (1,91-2,53)
Su ekstraktı	4,31 ^b (3,87-4,75)	1,56 \pm 0,14 (1,30-1,83)
Gallik asit	0,03 ^a (0,02-0,04)	0,64 \pm 0,06 (0,53-0,75)

Aynı sütunda farklı üstel harfler ile gösterilen değerler $p < 0,05$ düzeyinde birbirinden farklıdır.



Şekil 1. 1,00 mg/L BAP + 0,25 mg/L KIN içeren MS besin ortamında *B. monnieri*'nin sürgün ucu eksplantlarından sürgün rejenerasyonu.



Şekil 2. *B. monnieri*'nin farklı ekstraktlarının DPPH yakalama aktiviteleri (Ortalama \pm Standart Sapma, $n = 3$) (Farklı harfler ile gösterilen değerler $p < 0,05$ düzeyinde birbirinden farklıdır).

Çizelge 5. Farklı ekstraktların ve standardın (EDTA) metal şelatlama aktiviteleri için IC₅₀ değerleri (mg/mL).

Deneme	IC ₅₀ (sınırlar)	Eğim ± Standart hata (sınırlar)
Metanol ekstraktı	7,42 ^c (6,63-8,51)	1,41 ± 1,14 (1,14-1,69)
Su ekstraktı	5,12 ^b (4,61-5,68)	1,46 ± 0,14 (1,19-1,73)
EDTA	0,15 ^a (0,13-0,17)	1,24 ± 0,07 (1,11-1,37)

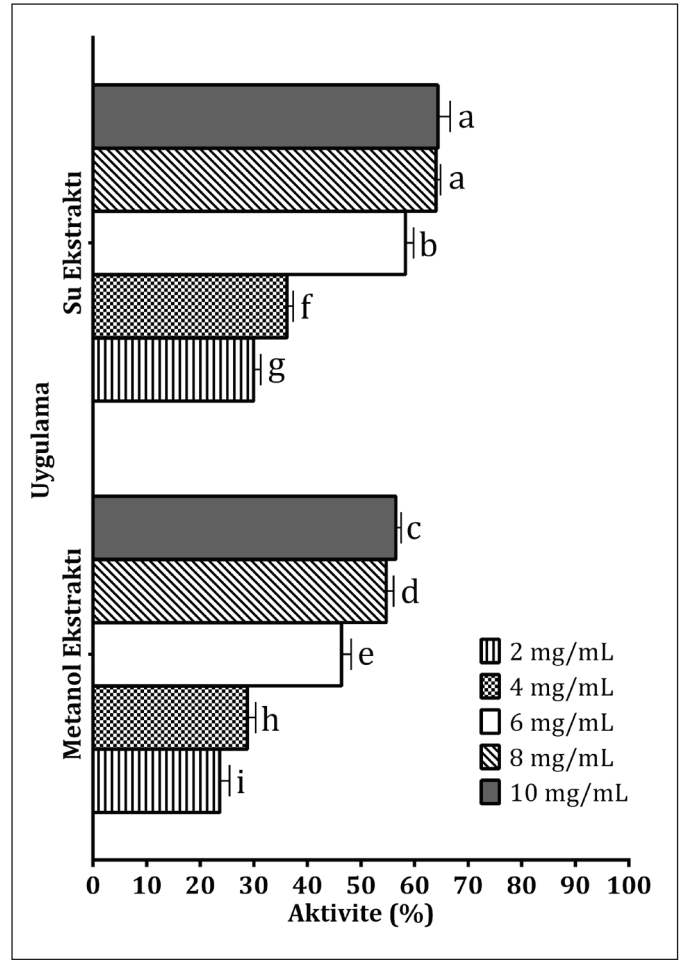
Aynı sütunda farklı üstel harfler ile gösterilen değerler $p < 0,05$ düzeyinde birbirinden farklıdır.

DPPH yakalama aktivitesi en yüksek olan deneme su ekstraktı (IC₅₀: 4,31 mg/mL) olarak tespit edilmiştir.

Metal iyonlarının özellikle Fe⁺²'nin varlığı, biyolojik sistemler ve hücreler içerisindeki hidroksil radikalleri ve metal-oksijen kompleksleri gibi reaktif türlerin üretimine öncülük etmektedir (Soltaninejad vd. 2003). Metal iyonlarının sebep olduğu oksidatif stresten korunmak için metal şelatlama kapasitesine sahip bitkilerden yararlanılabilmektedir. *B. monnieri*'nin metanol ve su ekstraktlarının metal şelatlama aktivitelerinin belirlenmesi süreci, sistemdeki demir komplekslerinin üretiminden önce demir iyonlarının yakalanması ve şelatlanması aşamalarını içermektedir. Birçok araştırmacı da farklı bitki türlerinin kimyasal içeriklerini de belirlemek suretiyle metal şelatlama aktivitelerini ortaya koymuşlardır (Liu vd. 2014) dried mycelia broth, and mycelia-free broth of *Laetiporus sulphureus* submerged cultures were extracted with ethanol and hot water under optimal culture conditions and investigated for their antioxidant properties. Ethanol extracts from dried mycelia broth (EEM).

B. monnieri'den elde edilen metanol ve su ekstraktlarının metal şelatlama aktivitelerine bakıldığında her ekstrakt için konsantrasyon oranı arttıkça aktivite oranının da yükseldiği gözlenmiştir. En yüksek metal şelatlama aktivitesi %64,38 ile su ekstraktının 10 mg/mL'lik çözeltisinde görülmüştür. Metanol ekstraktının farklı konsantrasyonları incelendiğinde su ekstraktında olduğu gibi en yüksek aktivite (%56,52) maksimum konsantrasyonda tespit edilmiştir. İstatistiksel analizler incelendiğinde, su ekstraktının 8 ve 10 mg/mL'lik konsantrasyonlarının ortaya çıkardıkları metal şelatlama aktivitelerinin $p > 0,05$ düzeyinde farksız olduğu belirlenmiştir (Şekil 3).

Metal şelatlama aktiviteleri baz alındığında, ekstraktların etkili konsantrasyonları IC₅₀ değerleri hesaplanarak tespit edilmiştir. Ayrıca bu değerler hangi ekstraktın daha etkili olduğunu ortaya çıkarmıştır. En düşük IC₅₀ değerinin 0,15 mg/mL ile EDTA'ya ait olduğu saptanmıştır. Metanol ekstraktına (7,42 mg/mL) kıyasla çok düşük seviyede IC₅₀ değerine sahip olan su ekstraktının (5,12 mg/mL) daha etkili metal şelatlama düzeyine sahip olduğu görülmüştür.



Şekil 3. *B. monnieri*'nin farklı ekstraktlarının metal şelatlama aktiviteleri (Ortalama ± Standart Sapma, $n = 3$) (Farklı harfler ile gösterilen değerler $p < 0,05$ düzeyinde birbirinden farklıdır).

Standart olarak kullanılan EDTA ve ekstraktların sahip olduğu IC₅₀ değerlerinin istatistiksel olarak ($p < 0,05$) birbirinden farklı olduğu çalışma sonuçlarına yansımıştır (Çizelge 5).

Doku kültürü teknikleri ile üretimi gerçekleştirilen *B. monnieri* bitkisinden elde edilen metanol ve su ekstraktlarının antioksidan bileşen yönünden zengin olduğu çalışma sonuçlarına yansımıştır. Önemli antioksidan moleküllerden olan β -karoten, flavonoid, likopen ve toplam fenol içerikleri

Çizelge 6. Antioksidan aktiviteler için farklı değişkenler arasındaki korelasyon seviyeleri.

	Konsantrasyon	DPPH aktivite	Şelatlama aktivite
Konsantrasyon	1		
DPPH aktivite	0.84*	1	
Şelatlama aktivite	0.91*	0.95*	1

*Korelasyon 0,01 seviyesinde önemlidir.

baz alındığında yüksek oranda toplam fenole rastlanan *B. monnieri*'nin antioksidan kapasitesinin olduğu saptanmıştır. Mevcut bu kapasitenin antioksidan aktiviteler ile ne derece ilişkili olduğu da araştırma içerisinde yer almıştır. *B. monnieri*'nin antioksidan aktivitelerin belirlenmesi amacıyla metal şelatlama ve indirgeme gücü kapasiteleri değerlendirilmiştir. Her iki aktivite için de konsantrasyona bağlı bir artış göze çarpmıştır. Gerçekleştirilen ikili korelasyon analizi bu ilişkiyi gözler önüne sermiştir. *DPPH aktivite-konsantrasyon* ve *şelatlama aktivitesi-konsantrasyon* ikili değişkenleri arasındaki Pearson korelasyon katsayılarının sırasıyla 0,84 ve 0,91 olduğu ve bu değerlerin $p < 0,01$ düzeyinde anlamlı gözüktüğü tespit edilmiştir (Çizelge 6).

4. Sonuçlar

Sonuç olarak, mevcut çalışma kapsamında gerçekleştirilen tüm denemeler göstermiştir ki doku kültürü teknikleri ile üretimi gerçekleştirilen *B. monnieri* bitkisinden elde edilen metanol ve su ekstraktları, yapısında barındırdıkları yüksek orandaki antioksidan bileşenler sayesinde farklı antioksidan aktiviteler gösterebilmektedir. Elde edilen sonuçlar, yüksek oranda antioksidatif kapasiteye sahip olan *B. monnieri*'nin oksidatif stres kaynaklı hastalık türlerinin kombine tedavi metotları içerisinde kullanılabilir bir bitki olduğunu ortaya çıkarmıştır.

5. Teşekkür

Mevcut çalışmanın gerçekleşmesinde maddi destek Necmettin Erbakan Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri 161215006 numaralı projeden karşılanmıştır.

6. Kaynaklar

- Anbari, K., Vani, G., Balakrishna, K., Devi, CS. 2006. Effect of bacoside a on brain antioxidant status in cigarette smoke exposed rats. *Life Sci.*, 78: 1378-1384.
- Banerjee, M., Shrivastava, S. 2008. An improved protocol for *in vitro* multiplication of *Bacopa monnieri* (L.). *World J. Microbiol. Biotechnol.*, 24: 1355-1359.

- Bhattacharya, SK., Bhattacharya, A., Kumar A., Ghosal S. 2000. Antioxidant activity of *Bacopa monniera* in rat frontal cortex, striatum and hippocampus. *Phytother. Res.*, 14: 174-179.
- Channa, S., Dar, A., Anjum, S., Yaqoob M., Atta Ur, R. 2006. Anti-inflammatory activity of *Bacopa monniera* in rodents. *J. Ethnopharmacol.*, 104: 286-289.
- Chatterji, N., Rastogi, RP., Dhar, ML. 1965. Chemical examination of *Bacopa monnieri* Westtst.: Part II-the constitution of bacoside A. *Indian J. Chem.*, 3: 24-29.
- Doğan, M. 2013. *In Vitro* koşullarda tilki kuyruğu (*Ceratophyllum demersum* L.)'nun çoğaltımı. *Yüksek Lisans Tezi*, Karamanoğlu Mehmetbey Üniversitesi, Karaman.
- Dogan, M., Karatas, M., Aasim, M. 2015. An efficient *in vitro* plantlet regeneration of *Ceratophyllum demersum* L., an important medicinal aquatic plant. *Fresenius Envir. Bull.*, 24: 3499-3504.
- Dogan, M., Karatas, M., Aasim M. 2016. *In vitro* shoot regeneration from shoot tip and nodal segment explants of *Pogostemon erectus* (Dalzell) Kuntze, a multipurpose ornamental aquatic plant. *Fresenius Envir. Bull.*, 25: 4777-4782.
- Emsen, B., Aslan, A., Togar, B., Turkez, H. 2016. *In vitro* antitumor activities of the lichen compounds olivetoric, physodic and psoromic acid in rat neuron and glioblastoma cells. *Pharm. Biol.*, 54: 1748-1762.
- Emsen, B., Turkez, H., Togar, B., Aslan, A. 2017. Evaluation of antioxidant and cytotoxic effects of olivetoric and physodic acid in cultured human amnion fibroblasts. *Hum. Exp. Toxicol.*, 36: 376-385.
- Fang, Y.Z., Yang, S., Guoyao Wu, G. 2002. Free radicals, antioxidants, and nutrition. *Nutrition*, 18: 872-879.
- Fidrianny, I., Puspitasari, N., Marlia Singgih, W. 2014. Antioxidant activities, total flavonoid, phenolic, carotenoid of various shells extracts from four species of legumes. *Asian J. Pharm. Clin. Res.*, 7: 42-46.
- Gnanaraj, WE., Marimuthu, J., Subramanian, K.M., Nallyan, S. 2011. Micropropagation of *Alternanthera sessilis* (L.) using shoot tip and nodal segments. *Iran. J. Biotechnol.*, 9: 206-212.
- Karatas, M., Aasim, M., Dogan, M., Khawar KM. 2013a. Adventitious shoot regeneration of the medicinal aquatic plant water hyssop (*Bacopa monnieri* L. Pennell) using different internodes. *Arch. Biol. Sci.*, 65: 297-303.

- Karatas, M., Aasim, M., Çınar, A., Dogan, M. 2013b. Adventitious shoot regeneration from leaf explant of dwarf hygro (*Hygrophila polysperma* (Roxb.) T. Anderson). *Sci. World J.*, DOI:http://dx.doi.org/10.1155/2013/680425.
- Karatas, M., Aasim, M., Dogan, M. 2014. Multiple shoot regeneration of *Ceratophyllum demersum* L. on agar solidified and liquid mediums. *Fresenius Envir. Bull.*, 23: 3-9.
- Karatas, M., Dogan, M., Emsen, B., Aasim, M. 2015. Determination of *in vitro* free radical scavenging activities of various extracts from *in vitro* propagated *Ceratophyllum demersum* L. *Fresenius Envir. Bull.*, 24: 2946-2952.
- Liu, Y., Du, Y., Wang, J., Zha, X., Zhang, J. 2014. Structural analysis and antioxidant activities of polysaccharide isolated from Jinqian mushroom. *Int. J. Biol. Macromol.*, 64: 63-68.
- Lorenzo, JM., González-Rodríguez, RM., Sánchez, M., Amado, I.R., Franco, D. 2013. Effects of natural (grape seed and chestnut extract) and synthetic antioxidants (butylatedhydroxytoluene, BHT) on the physical, chemical, microbiological and sensory characteristics of dry cured sausage "chorizo". *Food Res. Int.*, 54: 611-620.
- Murashige, T., Skoog, F. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol Plant.*, 15: 473-497.
- Niki, E., Yoshida, Y., Saito, Y., Noguchi, N. 2005. Lipid peroxidation: mechanisms, inhibition, and biological effects. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 338: 668-676.
- Öztürk, M., Khawar, KM., Atar, HH., Sancak, C., Özcan, S. 2004. *In vitro* micropropagation of the aquarium plant *Ludwigia repens*. *Asia Pac. J. Mol. Biol. Biotechnol.*, 12: 20-24.
- Raja, HD., Arockiasamy, DI. 2008. *In vitro* propagation of *Mentha viridis* L. from nodal and shoot tip explants. *Plant Tissue Cult. Biotechnol.*, 18: 1-6.
- Rajani, M., Shrivastava N., Ravishankara, MN. 2004. Brahmi (*Bacopa monnieri* (L.) Pennell) - a medhya rasaayana drug of ayurveda. biotechnology of medicinal plants: vitalizer and therapeutic enfield, New Hampshire: Science Publishers, Inc. pp. 89-110.
- Risch, SJ., Ho, CT. 1997. Spices, *American Chemical Society*, USA, 206 p.
- Sairam, K., Dorababu, M., Goel, RK., Bhattacharya, SK. 2002. Antidepressant activity of standardized extract of *Bacopa monniera* in experimental models of depression in rats. *Phytomedicine*, 9: 207-211.
- Sandeep, K., Singh, BB., Balwinder, K., Kuldeep, S., Dinesh, N. 2013. Herbal plants as potential anticancer agents: a review. *Res. J. Pharm. Biol. Chem. Sci.*, 4: 233-251.
- Sharma, OP., Bhat, TK. 2009. DPPH antioxidant assay revisited. *Food Chem.*, 113: 1202-1205.
- Sharma, S., Kamal, B., Rathi, N., Chauhan, S., Jadon, V., Vats, N., Gehlot, A., Arya, S. 2010. *In vitro* rapid and mass multiplication of highly valuable medicinal plant *Bacopa monnieri* (L.) Wettst. *Afr. J. Biotechnol.*, 9: 8318-8322.
- Soltaninejad, K., Kebriaeezadeh, A., Minaiee, B., Ostad, SN., Hosseini, R., Azizi, E., Abdollahi, M. 2003. Biochemical and ultrastructural evidences for toxicity of lead through free radicals in rat brain. *Hum. Exp. Toxicol.*, 22: 417-23.
- Stanly, C., Bhatt, A., Keng, CL. 2011. An efficient *in vitro* plantlet regeneration of *Cryptocoryne wendtii* and *Cryptocoryne beckettii* through shoot tip culture. *Acta Physiol. Plant.*, 33: 619-624.
- Uabundit, N., Wattanathorn, J., Mucimapura, S., Ingkaninan, K. 2010. Cognitive enhancement and neuroprotective effects of *Bacopa monnieri* in Alzheimer's disease model. *J. Ethnopharmacol.*, 127: 26-31.
- Vijayakumar, M., Vijayakumar R., Stephen, R. 2010. *In vitro* propagation of *Bacopa monnieri* L.-a multipurpose plant. *Indian J. Sci. Technol.*, 3: 781-786.
- Vollala, V.R., Upadhya, S., Nayak, S. 2010. Effect of *Bacopa monniera* Linn. (brahmi) extract on learning and memory in rats - a behavioral study. *J. Vet. Behav.*, 5: 69-74.
- Wassmann, S., Wassmann, K., Nickenig, G. 2004. Modulation of oxidant and antioxidant enzyme expression and function in vascular cells. *Hypertension*, 44: 381-386.
- Wu, JQ., Kosten, TR., Zhang, XY. 2013. Free radicals, antioxidant defense systems, and schizophrenia. *Prog. Neuropsychopharmacol. Biol. Psychiatry.*, 46: 200-206.
- Xiang, Q., Liu, Q., Xu, L., Qiao, Y., Wang, Y., Liu, X. 2013. Carnosic acid protects biomolecules from free radical-mediated oxidative damage *in vitro*. *Food Sci. Biotechnol.*, 22: 1-8.