

Araştırma Makalesi

***Catalpa bignonioides* Metanolik Çiçek Ekstraktının Biyolojik ve Kimyasal Aktivitesi**

Dilek İNCEÇAYIR, Alican Bahadır SEMERCİ, Nilay MUSTAFA, Kenan TUNÇ

Sakarya Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü Serdivan, Sakarya

Sorumlu yazar: alicannn5434@gmail.com

Geliş Tarihi: 26.10.2018

Düzeltilme Geliş Tarihi: 20.02.2019

Kabul Tarihi: 26.02.2019

Özet

Bu çalışmada *Catalpa bignonioides* çiçeklerinden elde edilen metanolik ekstraktın antimikrobiyal, antioksidan aktiviteleri ve yağ asit kompozisyonlarının belirlenmesi amaçlanmıştır. Antioksidan kapasitesi DPPH radikali süpürücü aktivite tayini, antimikrobiyal aktiviteleri disk difüzyon yöntemi kullanılarak araştırılmıştır. Metil esterlenmiş ekstraktın yağ kompozisyonu gaz kromatografisi ile belirlenmiştir. Ekstraktın *Staphylococcus aureus* ATCC 29213 suşu üzerinde antibakteriyel etki gösterdiği ve yağ içeriğinde yüksek miktarda linoleik asit, trikononik asit, arachidonik asit olduğu gözlemlenmiştir. Metanolik ekstraktın antioksidan aktivitesi askorbik asitle karşılaştırıldığında DPPH radikallerini önemli derecede azalttığı tespit edilmiştir. Elde edilen sonuçlar neticesinde *Catalpa bignonioides* çiçeklerinin çok çeşitli sayıda yağ asidi içerdiği ve önemli derecede antioksidan aktiviteye sahip olduğu belirlenmiştir.

Anahtar kelimeler: Antimikrobiyal aktivite, antioksidan aktivite, *Catalpa bignonioides*, yağ asitleri.

Biological and Chemical Activity of *Catalpa bignonioides* Methanolic of Flower Extract

Abstract

The aim of this study was to determine the antimicrobial and antioxidant activity and fatty acid composition of the methanolic extract obtained from *Catalpa bignonioides* flowers. Antioxidant capacity DPPH radical lacking activity determination and antibacterial activities were investigated by using disk diffusion method. The oil composition of the methyl esterified extract was determined by gas chromatography. The extract was shown antimicrobial effect on *Staphylococcus aureus* ATCC 29213 and high amount of linoleic acid, tricosononic acid and arachidonic acid were found in fat content. The antioxidant activity of the methanolic extract significantly decreases the DPPH radicals when compared to ascorbic acid. As a result, it was determined that the flowers of *Catalpa bignonioides* contain a large number of fatty acids and have a significant antioxidant activity.

Key words: Antimicrobial activity, antioxidant activity, *Catalpa bignonioides*, fatty acids.

Giriş

Bignoniaceae Juss, ağaç ve çalılardan oluşan 800'den fazla türe sahip tropikal bir ailedir (Usama, 2014). Bu aileden olan *Catalpa* cinsinin *Catalpa bignonioides* türü kalp şeklindeki büyük yaprakları ve gösterişli beyaz, pembe, sarı petalli çiçeklerinden dolayı birçok ülkede süs bitkisi olarak yetiştirilmektedir. Güney Amerika yerlileri bu familyadaki türleri antienflamatuar, antiromatizmal, antisifilitik ve uyuşturucu

özellikleri bakımından birçok hastalığın tedavisinde kullanılmaktadır (Wysokinsak ve Swiatek, 1995).

Catalpa bignonioides kabukları şurup olarak boğmaca, astım, spazmodik öksürüğün tedavisinde rahatlatıcı ve yatıştırıcı olarak, Çin tıbbında kanser tedavisinde kullanılmaktadır. Yaprakları iltihaplı ülserlerin, bakka ve tohumları ise solunum yolu hastalıklarının tedavisinde kullanılmaktadır (Munoz-Mingaro ve ark., 2003; Dvorska ve ark., 2007; Bruzual ve ark., 2014).

Bitki ekstrelerinin içerdiği alkaloidler, tanenler, flavonoidler, fenolik bileşikler ve yağ asitlerden dolayı antimikrobiyal ve antioksidan özellik gösterdiği bilinmektedir. Ayrıca içerdikleri yağ asitlerinden dolayı kozmetik, gıda, tekstil ve sağlık sektörlerinde çokça kullanılmaktadır (Karakas, 2003; Jaberian ve ark., 2013). Bignoniaceae familya üyelerinden elde edilen ekstraktların tanen, flavonoid, kinon gibi sekonder metabolitler içerdiği bilinmektedir (Rahmatullah ve ark., 2010). Halk arasında hastalıkların tedavisinde çokça kullanılan *Catalpa bignonioides* türünün daha geniş kapsamda biyolojik ve kimyasal olarak araştırılması gerekmektedir.

Bu çalışmada daha önce literatürde bulunmayan *Catalpa bignonioides* çiçek metanolik ekstraktlarının antimikrobiyal, antioksidan aktiviteleri ve yağ asidi içeriği belirlenmesi amaçlanmıştır.

Materyal ve Yöntem

Bitki materyali

Çalışmada kullanılan *Catalpa bignonioides* çiçekleri haziran ayında Sakarya Üniversitesi Esentepe Kampüsünden toplanmıştır. Toplanan çiçekler temizlenerek 7 gün boyunca gölgede kurutulmuştur.

Kullanılan kimyasallar

Çalışmada kullanılan Folin-Ciocalteu, gallik asit, 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH), metanol, Müeller Hinton Agar, Tryptic Soy Broth, Potato Dextrose Agar, sodyum karbonat, askorbik asit, BF₃ metanol kompleksi hazır olarak MERCK firmasından temin edilmiştir.

Metanolik ekstraktın hazırlanması

Kurutulan *Catalpa bignonioides* çiçek örnekleri elektrikli öğütücüde toz haline getirilmiştir. Öğütülmüş çiçekten 10 gr tartılarak Sokslet kartuşuna yerleştirilmiştir. 200 mL metanol ile 12 saat boyunca Sokslet cihazında ekstraktlar hazırlanmıştır. Hazırlanan ekstraktın çözücüsü rotary evaporatörde 50°C'de 10 dakikada uzaklaştırılmıştır. Ekstraktlardan antimikrobiyal aktivite için 6400 µg mL⁻¹, antioksidan aktivite için 1000 µg mL⁻¹ konsantrasyonda stok hazırlanmıştır.

Antimikrobiyal aktivite belirlenmesi

Suşların temini ve aktifleştirilmesi

Sakarya Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölüm Mikrobiyoloji Araştırma Laboratuvarı koleksiyonunda bulunan *Bacillus subtilis* ATCC 6633, *Staphylococcus aureus* ATCC 29213, *Enterococcus faecalis* ATCC 29212, *Salmonella typhimurium* ATCC 14028, *Escherichia coli* ATCC

25922 ve *Staphylococcus epidermidis* ATCC 12228, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 ve *Candida albicans* ATCC 1029 suşları kullanılmıştır. Kullanılan bakteriler Kanlı Agar besiyerinde, *Candida albicans* ise Potato Dextrose Agarda 24 saat 37°C inkübe edilmiştir.

Disk difüzyon metodu

Ekstraktın antibakteriyal aktivitesi disk difüzyon yöntemi kullanılarak belirlenmiştir. Aktifleştirilen taze kültürlerin konsantrasyonu ortalama 0.5 McFarland (1x10⁸ CFU mL⁻¹) olacak şekilde ayarlanmış ve steril eküvyon çubuk ile Müeller Hinton Agara ekimi yapılmıştır. 6400-3200 µg µL⁻¹ konsantrasyondaki bitki ekstraktından 15 µL alınmış ve 6mm çapındaki steril boş disklere emdirilmiştir. Emdirilen diskler 4 saat kuruduktan sonra mikroorganizma ekimi gerçekleştirilmiş petrilere yerleştirilmiştir. Pozitif kontrol olarak Gentamicin, Flukonazol, negatif kontrol olarak metanol kullanılmıştır.

Petriler 37°C'de 24 saat inkübe edilmiş ve süre sonunda disk etrafında oluşan inhibiyon zon çapları ölçülmüştür. Çalışma 3 tekrar olarak yapılmıştır.

Antioksidan aktivitenin belirlenmesi

Örneğin antioksidan aktivitesi DPPH serbest radikali süpürme yöntemi ile araştırılmıştır. Antioksidan aktivitenin tayini Blois Metodundan modifiye edilerek çalışmıştır (Blois, 1958). Farklı konsantrasyonda hazırlanan ekstraktlardan (10-100 µg mL⁻¹) ve standart çözeltilerden (1-100 µg mL⁻¹) 1 mL alınarak, 1 mL %0.04'lük DPPH çözeltisi ilave edilmiştir. Vortekslendikten sonra oda koşullarında karanlıkta 30 dk bekletilmiş ve 517nm'de absorbanları okunmuştur. Sonuçlar % DPPH radikali giderme aktivitesi ve IC₅₀ değerinin hesaplanmasıyla değerlendirilmiştir.

$$\%DPPH \text{ radikali Giderme Aktivitesi;} = \frac{(\text{Kontrolün Absorbansı} - \text{Örnek Absorbansı})}{\text{Kontrol Absorbansı}} \times 100$$

Kontrol olarak DPPH ve metanol, standart olarak askorbik asit kullanılmıştır.

Toplam fenolik maddenin belirlenmesi

Toplam fenolik madde tayini Folin-Ciocalteu yöntemi kullanılarak belirlenmiştir. Hazırlanan ekstraktan 100µL alınarak, 200 µL %50'lik Folin-Ciocalteu reaktifi ilave edilmiş ve 2 dakika bekletilmiştir. Üzerine 1 mL %2'lik Na₂CO₃ çözeltisi eklenerek 1 saat karanlıkta tutulmuş ve 760 nm'de absorbanları okunmuştur. Örneğin toplam fenolik

madde içeriği gallik asit standartı kullanılarak mg 100g⁻¹ cinsinden hesaplanmıştır.

GC analizi

Metil esterlerin hazırlanması

Metanolik ekstraktın yağ asidi bileşenlerinin GC ile tanımlanabilmesi için metil esterleri hazırlanmıştır. 0.5 gr tartılan ekstrakt balon jöjeye alınmış üzerine 7 mL BF₃ metanol kompleksi eklenmiştir. Balon jöje geri soğutucu altında su banyosunda 2 dk kaynatılmış ve üzerine 5 mL hekzan ilave edilerek bekletilmiştir. Faz ayrımı gerçekleştikten sonra üst faz bir şişeye alınarak üzerine susuz Na₂SO₄ eklenmiştir.

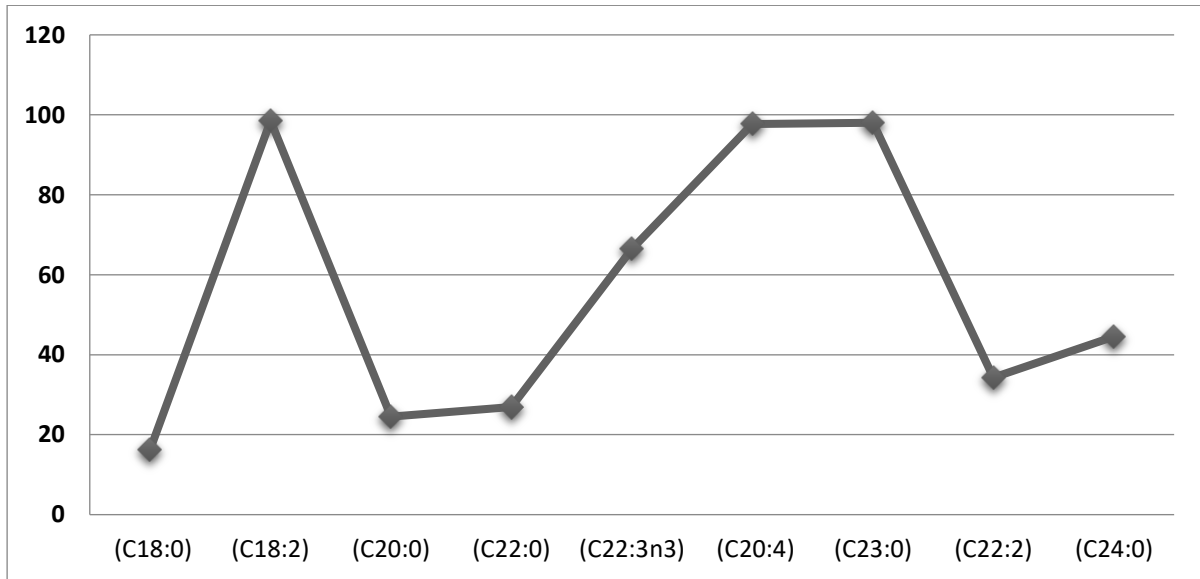
GC ölçümü

Gaz kromatografisinde 25 m x 0.32mm x 0.52 µm ve %5 Ph-Me- Silikon özelliğindeki Ultra2 kapiler kolonu kullanılmıştır. Metil esteri hazırlanan ekstrakt GC'nin enjeksiyon bölümüne enjekte edilmiştir. İnlet sıcaklığı 300 °C'ye ayarlanmıştır. Taşıyıcı gaz olarak N₂ kullanılmış, akış hızı 36,45 mL/dk olarak belirlenmiştir. Fırın sıcaklık programı 170°C den başlayarak 300°C'ye 10°C/dk hızla

çıkarılmış ve 5 dakika bekletilmiştir. Alınan sonuçlara göre yağ asitlerinin tanımlanması yapılmıştır. Gaz kromatografisi sonucunda elde edilen pikler standartlarla karşılaştırılarak her bir ekstraktın yağ asidi bileşimi belirlenmiştir (Karakas, 2003).

Bulgular ve Tartışma

Bitkilerde bulunan en yaygın yağ asitleri: palmitik (C16:0), stearik (C18:0), oleik (C18:1), linoleik (C18:2), linolenik (C18:3) asitleridir (Wei ve ark., 2017). Çalışmamızda kullanılan bitki ekstraktının yağ asidi içerikleri incelendiğinde en yüksek değerin linoleik asit (C18:2) olduğu görülmektedir (Şekil 1). Linoleik asidi sırasıyla; trikosonoik asit, araşidonik asit, cis-11,14,17,-eicosatrienoik asit takip etmektedir. *Catalpa bignonioides* ve Bignoniaceae familya üyelerine üzerine yapılan bir çalışmada tohum yağları incelenmiştir. Çalışmamızla paralel olarak *Catalpa bignonioides* tohum yağlarının yüksek oranda linoleik asit içerdiği belirlenmiştir (Chisholm ve Hopkins, 1965).



Şekil 1. *Catalpa bignonioides* çiçek ekstraktının yağ asidi metil esterleri (ppm).

C18:0Stearik Asit Metil Esteri, C18:2 Linoleik Asit Metil Esteri, C20:0Araşidik Asit Metil Esteri, C22:0 Behenik Asit Metil Esteri, C22:3n3 cis-11,14,17,-eicosatrienoik Asit Metil Esteri, C20:4 Araşidonik Asit Metil Esteri, C23:0 Trikosonoik Asit Metil Esteri, C22:2 cis 13,16 –dokosadienoik Asit Metil Ester, C24:0 Lignocerik Asit Metil Ester.

Xu ve ark. (2015) yapmış oldukları çalışmada *Catalpa ovata* tohumlarının gaz kromatografi yöntemiyle yapılan çalışmada yağ içeriğinin linoleik asit (C18:2), linolenik asit (C18:3) palmitik (C16:0) ve stearik asit (C18:0) olduğu belirtilmiştir.

Dünyadaki bitkilerin üçte ikisi tıbbi özelliklere sahiptir, bu tıbbi bitkilerin büyük bir kısmı güçlü antioksidan kaynağı olarak kullanılmaktadır. Birçok araştırma fenolik

bileşiklerin, tıbbi bitkilerin antioksidan kapasitesine önemli ölçüde katkıda bulunduğunu göstermektedir. Bu bileşik grupları, hem etkili radikal toplayıcılar hem de metal şelatlayıcı olarak hareket etmeleri bakımından potansiyel doğal antioksidan olarak dikkat çekmişlerdir (Djeridane ve ark., 2006; Sreelatha ve Padma, 2009).

Antioksidanlar, hücrelerdeki oksidatif stresi azaltmakta ve kanser, kardiyovasküler,

enflamatuvar hastalıklar dahil olmak üzere birçok hastalığının tedavisinde kullanılmaktadır (Gerber ve ark., 2002; Krishnaiah ve ark., 2011).

Çalışmamızda kullandığımız metanolik ekstraktın toplam fenolik madde analizinin gallik asit eş değeri 96.58 mg 100g⁻¹ olarak belirlenmiştir. DPPH radikal temizleme aktivitesi testinden elde edilen IC₅₀ değerleri Çizelge 1.'de gösterilmiştir. DPPH radikal temizleme aktivite sonucu incelendiğinde *Catalpa bignonioides*'in çiçeklerinden elde edilen metanolik ekstraktın IC₅₀ konsantrasyonunun 43.4 µg mL⁻¹, standart olarak kullanılan askorbik asidin IC₅₀ konsantrasyonu 5.65 µg mL⁻¹ olduğu tespit edilmiştir. Ekstrakt askorbik asitle karşılaştırıldığında DPPH radikallerini önemli derecede azalttığı görülmektedir.

Çizelge 1. Antioksidan aktivite ve toplam fenolik sonuçları

Metanolik ekstrakt	Antioksidan aktivite		Toplam fenolik	
	IC ₅₀ (µg mL ⁻¹)	R ²	mg 100g ⁻¹	R ²
<i>Catalpa bignonioides</i> çiçek	43.4	0.98	96.58	0.98
Askorbik Asit	5.65	0.98	-	-

Catalpa ovata tohumlarından elde edilen 1000µg mL⁻¹ yoğunluktaki ekstraktın ortalama DPPH tutma oranı %45 olarak bildirilmiştir (Xu ve ark., 2015). Çalışmamızdaki antioksidan değerinin yüksek çıkması tür ve bitki kısmının farklılığından olduğu düşünülmektedir.

Anti-enfektif ajanların yaygın kullanımı ilaca dirençli bakterilerin, mantarların ve virüslerin ortaya çıkmasına neden olmuştur. Patojenik mikropların artan direncini ortadan kaldırmak için, çeşitli tıbbi bitkiler antimikrobiyal özellikleri açısından dünya çapında araştırılmıştır. Aromatik şifalı bitkilerden elde edilen uçucu yağların, bakterilere, mayalara, filamentöz mantarlara ve virüslere karşı son derece iyi antimikrobiyal etkiler sergiledikleri birçok çalışmada bildirilmiştir (Reichling ve ark., 2009; Ulaş-Çolak ve ark., 2018; Nurcahyanti ve ark., 2018).

Catalpa bignonioides çiçekten elde edilen metanolik ekstraktın kullanılan test mikroorganizmalarından *S. aureus* ve *S. typhimurium* üzerinde antimikrobiyal etki gösterdiği tespit edilmiştir. Ekstraktın antimikrobiyal aktivitesi pozitif kontrol olan Gentamicinle kıyaslandığında kullanılan ekstraktın *S. aureus* bakterisi üzerinde orta derecede antibakteriyel etki gösterdiği belirlenmiştir (Çizelge 2).

Çizelge 2. *Catalpa bignonioides* çiçekten elde edilen metanolik ekstraktın antimikrobiyal etkisi

Test suşları	Metanol ekstrakt (µg mL ⁻¹)			Antibiyotik	
	6400	3200	N.K	GC	FL
<i>B. subtilis</i>	0	0	0	17	-
<i>C. albicans</i>	0	0	0	-	17
<i>E. coli</i>	0	0	0	19	-
<i>E. faecalis</i>	0	0	0	20	-
<i>P. aeruginosa</i>	0	0	0	22	-
<i>S. aureus</i>	11.5	9.8	8	20	-
<i>S. epidermidis</i>	0	0	0	21	-
<i>S. typhimurium</i>	7.5	0	0	21	-

GC: Gentamicin, FL: Flukonazol, NK: Negatif kontrol, - : Çalışılmamıştır.

Mingaro ve ark. (2003) *Catalpa bignonioides* ile yapmış oldukları çalışmada kabuk, yaprak ve tohumdan elde ettikleri ham ekstraktların Minimum İnhibisyon Konsantrasyonu (MİK) değerlerini incelenmiş ve çalışmamızla benzer şekilde en yüksek antibakteriyel etkinin *S. aureus* ve *S. typhimurium* suşları üzerinde olduğunu tespit etmişlerdir.

Bu çalışma park ve bahçelerde süs bitkisi olarak yetiştirilen *Catalpa bignonioides* çiçeklerinin antimikrobiyal, antioksidan ve yağ içeriklerinin incelendiği ilk çalışmadır. *Catalpa bignonioides* çiçeklerinin potansiyel bir antioksidan kaynağı olduğunu belirlenmiştir. Gıda ve gıda dışı sistemlerde doğal bir antioksidan ve koruyucu olarak kullanılabilirliği düşünülmektedir. *Catalpa bignonioides* çiçek ekstraktlarının karakterizasyonu ve bu biyoaktiviteden sorumlu molekülleri tanımlamak için ileri çalışmalar yapılabilir.

Kaynakça

- Usama, K., Abdel-Hameed, 2014. Morphological phylogenetics of Bignoniaceae Juss. *Beni-Suef University Journal of Basic and Applied Sciences*, 3: 172-177.
- Blois, M.S. 1958. Antioxidant determinations by the use of a stable free. *Radical Nature*, 181: 1199-1200.
- Bruzual de Abreu, M., Temraz, A., Vassallo, A., Braca, A., Tommasi, N.D. 2014. Phenolic glycosides from *tabebuia argentea* and *Catalpa bignonioides*. *Phytochemistry Letters*, 7: 85-88.
- Chisholm, M.J., Hopkins, C.Y. 1965. Fatty acids of *Catalpa bignonioides* and other Bignoniaceae seed oils. *Canada Journal of Chemistry*. Vol 43.
- Djeridane, A., Yousfi, M., Nadjemi, B., Boutassouna, D., Stocker, P., Vidal, N. 2006.

- Antioxidant activity of some Algerian medicinal plants extracts containing phenolic compounds. *Food Chemistry*, 97: 654-660.
- Dvorská, M., Žemlička, M., Muselík, J., Karafiátová, J., Suchý, V. 2017. Antioxidant activity of *Catalpa bignonioides*. *Fitoterapia*, 78: 437-439.
- Gerber, M., Boutron-Ruault, M.C., Hercberg, S., Riboli, E., Scalbert, A., Siess, M.H. 2002. Food and cancer: State of the art about the protective effect of fruits and vegetables. *Bull Cancer*, 89: 293-312.
- Jaberian, H., Piri, K., Nazari, J. 2013. Phytochemical composition and in vitro antimicrobial and antioxidant activities of some medicinal plants. *Food Chemistry*, 136: 237-244.
- Karakaş S. 2003. Isırgan Otu Toprak Altı Ve Toprak Üstü Kısımlarından Isırgan Otu Ekstraktının Eldesi ve Özelliklerinin İncelenmesi. İTÜ, Fen Bilimleri Enstitüsü Yüksek Lisans Tezi.
- Krishnaiah, D., Sarbatly, R., Nithyanandam, R.A. 2011. Review of the antioxidant potential of medicinal plant species. *Food and Bioproducts Processing*, 8(9): 217-233.
- Muñoz-Mingarro, D., Acero, N., Llinares, F., Pozuelo, J.M., Galán de Mera, A., Vicenten, J.A., Morales, L., Alguacil, L.F., Pérez, C. 2003. Biological activity of extracts from *Catalpa bignonioides*. *Journal of Ethnopharmacology*, 87: 163-167.
- Nurcahyanti, A.D.R., Nasser, I.J., Sporer, F., Wetterauer, B., Kadarso, I.D., Reichling, J., Wink, M. 2018. Essential oil composition, in vivo antioxidant, and antimicrobial activities of *Pimpinella pruatjan* from West Java, Indonesia. *The Natural Products Journal*, 8(1): 61-69.
- Rahmatullah, M., Samarrai, R., Jahan, R., Rahman, S., Sharmin, N., Emdad Ullah Miajee, Z.U.M., Chowdhury, M.H., Bari, S., Jamal, F., Anwarul Bashar, A.B.M., Azad, A.K., Ahsan, S. 2010. An ethnomedicinal, pharmacological and phytochemical review of some Bignoniaceae family plants and a description of Bignoniaceae plants in folk medicinal uses in Bangladesh. *Advances in Natural and Applied Sciences*, 4(3): 236-253.
- Reichling, J., Schnitzler, P., Suschke, U., Saller, R. 2009. Essential oils of aromatic plants with antibacterial, antifungal, antiviral, and cytotoxic properties – an overview. *Complementary Medicine Research*, 16(2): 79-90.
- Sreelatha, S., Padma, P.R. 2009. Antioxidant activity and total phenolic content of *Moringa oleifera* leaves in two stages of maturity. *Plant Foods Hum Nutr.*, 64: 303-311.
- Ulaş-Çolak, N., Yıldırım, S., Bozdeveci, A., Yayli, N., Çoşkunçelebi, K., Fandaklı, S., Yaşar, A. 2018. Essential oil composition, antimicrobial and antioxidant activities of *Salvia staminea*. *Rec. Nat. Prod.*, 12(1): 86-94.
- Wei, L., Agarwal, U.P., Hirth, K.C., Matuana, L.M., Sabo, R.C., Stark, N.M. 2017. Chemical Modification of nanocellulose with canola oil fatty acid methyl ester. *Carbohydrate Polymers*, 169: 108-116.
- Wysokinska, H., Swiatek, L. 1995. VII. *Catalpa bignonioides* Walt. in vitro culture, regeneration of plants and the formation of iridoids and phenolic acids. *Biotechnology in Agriculture and Forestry*, Vol: 33.
- Xu, H., Zhu, L., Dong, J., Wei, Q., Lei, M. 2015. Composition of *Catalpa ovata* Seed oil and flavonoids in seed meal as well as their antioxidant activities. *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 92 :361-369.