

Araştırma Makalesi

Mersin Üniv Sağlık Bilim Derg 2019;12(2);220-229

doi: 10.26559/mersinsbd.505082

Tilia tomentosa moench çiçeklerinin uçucu bileşenlerinin ve çeşitli *in vitro* biyolojik aktivitelerinin incelenmesi

Nihal Karakaş^{1,2}, Mehmet Evren Okur³, Nurşah Öztunç², Ayşe Esra Karadağ⁴, Şükran Kültür⁵, Betül Demirci⁶

¹ İstanbul Medipol Ü., Tıp Fakültesi, Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı, Beykoz, İstanbul, Türkiye

² İstanbul Medipol Ü., Rejeneratif ve Restoratif Tıp Araştırma Merkezi, İstanbul, Türkiye

³ Sağlık Bilimleri Ü. Eczacılık Fakültesi, Farmakoloji Anabilim Dalı, Üsküdar, İstanbul, Türkiye

⁴ İstanbul Medipol Ü., Eczacılık Fakültesi, Farmakognozi Anabilim Dalı, Beykoz, İstanbul, Türkiye

⁵ İstanbul Ü., Eczacılık Fakültesi, Farmasötik Botanik Anabilim Dalı, Beyazıt, İstanbul, Türkiye

⁶ Anadolu Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi, Farmakognozi Anabilim Dalı, Tepebaşı, Eskişehir

Öz

Amaç: *Tilia tomentosa* Moench. (Malvaceae) bitkisinin çiçeklerinden elde edilen *n*-hekzan ekstresinin uçucu bileşenleri, toplam fenolik madde miktarı, *in vitro* antioksidan, antimikrobiyal ve hücre canlılığı aktivitelerinin araştırılması amaçlanmıştır. **Yöntem:** Kurutulan bitki materyali toz edildikten sonra, *n*-hekzan kullanılarak maserasyon yöntemi ile ekstre hazırlanmıştır. Uçucu bileşenleri Gaz Kromatografisi/Kütle Spektroskopisi (GC/MS) ile araştırılmış, toplam fenolik madde miktarı Folin-Ciocalteu yöntemi kullanılarak belirlenmiştir. Antioksidan kapasitesi DPPH ve ABTS radikal süpürücü yöntemleri ile *in vitro* olarak test edilmiştir. Antimikrobiyal aktivitesi *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 10145, *Escherichia coli* NRLL B-3008, *Staphylococcus aureus* ATCC 6538, *Helicobacter pylori* ATCC 43504 ve *Mycobacterium smegmatis* ATCC 25291 mikroorganizmalarına karşı mikrodilüsyon yöntemi kullanılarak araştırılmıştır. *In vitro* hücre canlılığı üzerine etkisi hücrelerin metabolik olarak aktif olma durumlarının ölçümü ile belirlenmiştir. **Bulgular:** *T. tomentosa* *n*-hekzan ekstresinin ABTS ve DPPH radikal süpürücü etkisi sırasıyla 1.94 ve 1.03 olarak bulunmuştur. Ek olarak, ekstrenin *in vitro* hücre canlılığı üzerinde azalan dozlarda artan aktivitesi tespit edilerek en yüksek aktivite 1 mg/mL dozunda gözlemlenmiştir. Ekstrenin denenen suşlardan yalnızca *Staphylococcus aureus* mikroorganizmasına karşı 125 µg/mL dozda etkili olduğu görülmüştür. Ayrıca major uçucu bileşeni %17.7 oranında kafur olarak tespit edilmiştir. **Sonuç:** *T. tomentosa* *n*-hekzan ekstresinin, hücre canlılığı üzerinde olumlu etkiye sahip olduğu ve orta düzeyde antioksidan etkinliğe sahip olduğundan dolayı hücre yenileyici olarak kullanılabilmesi düşünülmektedir.

Anahtar Kelimeler: Hücre kültürü, *Tilia tomentosa*, antimikrobiyal, hücre yenileyici, GC/MS

Yazının Geliş Tarihi:29.12.2018 **Yazının Kabul Tarihi:**22.02.2019

Sorumlu yazar: Mehmet Evren Okur, Sağlık Bilimleri Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi, Farmakoloji Anabilim Dalı, Üsküdar, İstanbul, Türkiye, evrenokurecz@gmail.com

Investigation of volatile components and various *in vitro* biological activities of *Tilia tomentosa* Moench flowers

Abstract

Aim: The aim of this study was to investigate the volatile components, total phenolic content, and *in vitro* antioxidant, antimicrobial and cell viability activities of *Tilia tomentosa* Moench. (Malvaceae) flower *n*-hexane extract. **Methods:** The dried plant material was powdered and extracted with *n*-hexane by maceration. The volatile components of the extract were investigated by Gas Chromatography / Mass Spectroscopy (GC/MS) and the total phenolic content was determined using the Folin-Ciocalteu method. The antioxidant capacity was tested *in vitro* DPPH and ABTS radical scavenging methods. Antimicrobial activity was investigated by microdilution method against microorganisms of *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 10145, *Escherichia coli* NRLL B-3008, *Staphylococcus aureus* ATCC 6538, *Helicobacter pylori* ATCC 43504 and *Mycobacterium smegmatis* ATCC 25291. The effect on cell viability *in vitro* was determined by measuring the metabolic activity of the cells. **Results:** The ABTS and DPPH radical scavenging activity of *T. tomentosa n*-hexane extract was found as 1.94 and 1.03, respectively. In addition, the increased activity of the extract on *in vitro* cell viability was determined. It was observed that the extract was effective only against *Staphylococcus aureus* at a dose of 125 µg/mL. The major volatile component of the extract was camphor (17.7%). **Conclusion:** *T. tomentosa n*-hexane extract has a positive effect on cell viability, and it has a moderate level of antioxidant activity. For these reasons, the extract may be used as a cell regenerator.

Keywords: Cell culture, *Tilia tomentosa*, antimicrobial, cell regenerator, GC/MS

Giriş

Tilia tomentosa Moench. Malvaceae familyasına ait bir türdür ve Türkiye'de "Gümüş İhlamur", dünyada "Silver Linden" olarak bilinmektedir. *Tilia* cinsi Türkiye'de dört tür, beş taksonla temsil edilmektedir.^{1,2} Bu tür, 35-40 metreye kadar boylanabilen bir ağaçtır. Sürgünleri ilk yılda yeşil ve tüylüdür. Tomurcukları iki - üç pula sahiptir, pulların dış kenarları yoğun kahverengi, olup, dış kenarında yıldız tüyleri bulunmaktadır. Bitkinin tomurcukları ve çiçekleri genellikle eczanelerde, pazarlarda ve aktarlarda paketler halinde satılmaktadır.³ *T. tomentosa* çiçeği, Türkiye'de halk arasında öksürük, grip, migren, gerginlik ve mide rahatsızlıklarının giderilmesi için kullanılır. Yapraklarının kullanımı, brakteli çiçeklerinin kullanımı kadar yaygın değildir.^{2,4,5,6,7} *T. tomentosa* sinonim olarak *Tilia argentea* Desf ex. DC. olarak da bilinmektedir. Bitkinin çiçekleri yüksek oranda müsilaj ve flavonoid içerir. İhlamur çiçekleri polifenollerce zengin olup (%1), özellikle flavonoidler içinde çoğunluğu kersetin ve türevleri (rutosit, hiperosit, kersitrin, izokersetin), kamferol (astragalın, tilirosit) ve katesin (kafeik asit

eldesinde öncü madde), klorojenik ve p-kumarik asitler içermektedir.⁸ Ayrıca çiçeklerde yüzde iki katesin ve gallokatesin türevleri, müsilaj ağırlıklı olarak arabinogalaktanlar⁹ ve çok az miktarda uçucu yağ bulunmaktadır.¹⁰ Metanol ekstresinde ana flavonoidler olarak kersetin-3,7-O- α -diramnosit ve kemferol-3,7-O- α -diramnosit bulunmaktadır.¹¹

İhlamur çiçeği ile ilgili *in vitro* hayvan deneylerinde onikiparmak bağırsağı üzerinde spazmojenik etkinin olduğu gözlemlenmiştir. Diyforetik ve antispazmodik özelliklere ihlamur çiçeğinin yapısındaki p-kumarik asit ve flavonoidlerin sahip olduğu düşünülmektedir. Ayrıca, ihlamur çiçeği uçucu yağı kullanımı ile pek çok etki gözlenmiş olup, bunlardan diüretik, sedatif, antispazmodik etkiler bilinmektedir. İhlamur çiçeğinin sınırlı bir aralıkta antifungal aktivite gösterdiği tespit edilmiştir.^{12,13} İhlamur çiçekleri ek olarak kanama durdurucu, sinirleri yatıştırıcı, sedatif özelliklere de sahiptir. Odunundan elde edilen kömürü ise hazımsızlıkta kullanılmaktadır.¹⁴ Ayrıca odunundan elde edilen ekstrenin antimikrobiyal etkinliği

bulunmaktadır.¹⁵ Bitkinin önemli bileşenlerinden olan tilirosit ve astragalin farelerde güçlü hepatoprotektif etki ortaya koymakla beraber TNF- α üretimi üzerinde güçlü inhibitör etki göstermiştir.^{16,17} Çiçeklerinin stres üzerindeki etkisi, yüzme performans testi kullanılarak farelerde çalışılmıştır.¹⁸ Ayrıca anti-inflamatuar ve antinöroseptif aktiviteleri ile ilgili başka çalışmalar da vardır.¹⁹

Birçok kronik bozukluğun ortaya çıkmasında oksidatif hasarın önemli bir rol oynadığını gösteren kanıtlar mevcuttur. Ayrıca, oksidatif stresin kanser, ateroskleroz, diyabet, romatoid artrit, kardiyovasküler hastalıklar, hipertansiyon, nörodejeneratif hastalıklar ve yaşlanma gibi yaklaşık 200 hastalık ile ilişkili olabileceği düşünülmektedir.²⁰ Bu çalışmanın esas amacı ise, *T. tomentosa* çiçeklerinin *n*-hekzan ekstresinin uçucu bileşenlerinin, toplam fenolik madde miktarının, antioksidan, antimikrobiyal etkinliğinin saptanması ve proliferatif etkinliğinin araştırılmasıdır.

Yöntem

Gereç

1,1-difenil-2-pikril-hidrazil (DPPH), bütillenmiş hidrokisianisol (BHA), bütillenmiş hidrokisitoluen (BHT), dimetil sülfoksit (DMSO), askorbik asit, 2, 2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolin-6-sülfonik asit (ABTS) ve troloks Sigma'dan (Sigma-Aldrich GmbH, Sternheim, Almanya) temin edilmiştir. *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 10145, *Escherichia coli* NRLL B-3008, *Staphylococcus aureus* ATCC 6538, *Helicobacter pylori* ATCC 43504 ve *Mycobacterium smegmatis* ATCC 25291 suşları ATCC firmasından satın alınmıştır. Primer insan dermal fibroblast hücreleri (ATCC® PCS-201-012™) ATCC (Amerika) temin edilmiştir. Kullanılan tüm kimyasallar analitik kalitede tercih edilmiştir.

Bitki materyali ve ekstraksiyon

T. tomentosa çiçekleri 2018 yılı Eylül ayında Çavuşbaşı Köyü, Beykoz, İstanbul'dan toplanmıştır. Bitki örnekleri teşhis edilerek İstanbul Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Herbaryumu'na kaldırılmıştır (ISTE 115

938). Bitki materyalleri ince toz haline getirildikten sonra, *n*-hekzan ile 24 saat süreyle üç kere masere edilmiştir. Süzüldükten ve çözücüsü yoğunlaştırıldıktan sonra ekstre, buzdolabında amber renkli bir şişede saklanmıştır.

Antioksidan aktivite

DPPH radikal süpürücü aktivite

Ekstre ve standart olarak kullanılan askorbik asitin üzerine 3.9 mL DPPH'nin metanoldeki çözeltisi ilave edilmiştir. Karışım 30 dakika karanlıkta bekletilmiş ve absorbanslar 517 nm'de spektrofotometrede metanole karşı okunmuştur. Pozitif ve negatif kontroller paralel olarak çalışılmıştır. Pozitif kontrolde ekstrenin yerine standart (askorbik asit), negatif kontrolde ise çözücü (metanol) kullanılmıştır. Deney üç kez tekrarlanıp ve ortalaması alınmıştır.²¹

ABTS radikal süpürücü aktivite

Ekstrenin antioksidan aktivitesi ikinci olarak ABTS radikal katyonu süpürücü deneyi ile Re ve arkadaşlarının 1999'da buldukları yöntem modifiye edilerek ölçülmüştür. ABTS, 7 mM ABTS sulu çözeltisinin, 2.45 mM potasyum persülfat (K₂S₂O₈) ile reaksiyona sokulması ile hazırlanmıştır. Elde edilen karışım kullanılmadan önce 12-16 saat boyunca karanlıkta ve oda sıcaklığında bekletilmiştir. Elde edilen yoğun renkli ABTS radikal katyonu, 734 nm'de 0.7000±0.02 absorbans değeri vermesi için etanol ile (pH 7.4) seyreltilmiştir. Test bileşiği, toplam hacmi 1 mL olacak şekilde ABTS çözeltisi ile (100x) seyreltilmiştir. Karışım hazırlandıktan 6 dakika sonra absorbans, spektrofotometrik olarak 734 nm'de ölçülmüş ve inhibisyon yüzdesi hesaplanmıştır. Tüm denemeler üç kez uygulanmıştır.^{22,23}

Toplam fenolik madde miktar tayini

Ekstrenin toplam fenolik bileşikleri Folin-Ciocalteu yöntemi kullanılarak tayin edilmiştir. 5, 2, 5, 1.25 ve 0.625 mg/mL derişimlerinde hazırlanan ekstreden 0.1'er mL tüplere alınmış ve hacimleri 4.6 mL olacak şekilde distile su ilave edilmiştir. 0.1 mL Folin-Ciocalteu ayırıcı ve 0.3 mL %2 sodyum karbonat çözeltisinden ilave edilerek, tüpler vorteks mikserde karıştırılıp ve iki saat bekletildikten sonra meydana

gelen mavi rengin absorbanası ekstrenin yerine 0.1 mL distile su içeren köre karşı 760 nm'de ölçülmüştür. Gallik asit ile standart eğri çizilmiş olup, sonuçlar mg gallik asit ekivalanı olarak ifade edilmiştir.^{24,25}

Antimikrobiyal aktivite

Ekstrenin mikroorganizmalara karşı CLSI (Clinical & Laboratory Standarts Institue) belirlediği standartlar doğrultusunda minimum inhibisyon derişimi (MİK) değerleri saptanmıştır. Standart antimikrobiyal olarak kloramfenikol, tetrasiklin, streptomisin, klaritromisin ve amikasin kullanılmıştır. Bu amaçla 96 kuyucuklu steril plaklar kullanılmıştır. Ekstre için plağın ilk sütunu kullanılmış ve bir sütun besiyeri kontrolü, diğer bir sütun ise üreme kontrolü olarak ayrılmıştır. Kullanılan bu kuyucukların hepsine Mueller Hinton Broth (MHB) besiyerinden 100'er µL eklenmiştir. İlk kuyucuğa ekstrenin başlangıç derişimini içeren çözeltisinden 100 µL eklenmiştir. Test edilecek en yüksek madde derişiminin eklendiği ilk kuyucuktan 100 µL alınıp maddenin çift kat seri dilüsyonları yapılmıştır.

Test edilecek bakteri kolonilerinden McFarland No: 0.5 türbidometrik olarak eşit olacak şekilde bakteri süspansiyonu hazırlanmıştır. Bu süspansiyon, 1/10 oranında yine MHB ile seyreltilerek, son bakteri inokulum derişimi 5×10^5 CFU/mL olacak şekilde üreme kontrol kuyucuğu da dahil olmak üzere her bir kuyucuğa 5 µL eklenmiştir. Daha sonra plakların üzeri steril kapaklar ile kapatılmış ve 35°C'de 24 saatlik inkübasyonun ardından MİK değerleri görsel olarak değerlendirilmiş ve üreme görülmeyen en düşük derişimi çalışılan mikroorganizma için MİK değeri olarak belirlenmiştir. Daha sonra üreme kontrol reaktifi olarak hazırlanan %0.01'lik resazurin reaktifi her kuyucuğa 20 µL olacak şekilde pipetlenmiş ve plağın üstü kapatılarak iki saat daha $35 \pm 2^\circ\text{C}$ 'de inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonrası plaklar tekrar değerlendirilmiş, indikatör olarak üreme olan kuyucuklar pembe, üreme olmayan kuyucuklar mavi renkte gözlenmiştir. Mavi renkte gözlenen en düşük derişim test edilen mikroorganizma

için o antimikrobiyal numunenin MİK değeri olarak belirlenmiştir.^{26,27}

Mikobakter aktivite için Middlebrook 7H11 agara ekilen suşlar aerobik koşullarda 37°C'de 4-5 gün inkübe edilerek gelişmeleri sağlanmıştır. Bir öze ucu kadar suş katyon katkılı Mueller Hinton Broth'a aktarılarak beş gün daha inkübe edilmiştir. Çoğalan kültürler vorteksenerek çökmeleri için 30 dakika hareket ettirilmeden bekletilmiştir. Tüpün üst kısmından bir miktar alınarak başka bir tüpte McFarland: 0.5 ayarı yapılmıştır. Yoğunluğu ayarlanmış suşlardan 1:100 (h/h) seyreltme yapıldıktan sonra kuyucuklara 100'er µL eklenmiştir. Beş gün 37°C'de inkübasyondan sonra üremenin olmadığı en düşük derişim MİK olarak değerlendirilmiştir.^{28,29,30}

GC ve GC/MS analizleri

Ekstrenin uçucu bileşenlerinin analizi GC ve GC/MS sistemlerinin eş zamanlı analizleri ile aydınlatılmıştır. GC analizi Agilent 6890N GC sistemi ile gerçekleştirilmiştir. Analizde Innowax FSC kolon (60 m x 0.25 mm, film kalınlığı 0.25 µm) ve taşıyıcı gaz olarak Helyum (0.8 mL/dak) kullanılmıştır. GC fırın sıcaklığı 10 dakika 60°C'de 4°C/dk artışla 220°C'ye artırılıp 10 dakika tutulmuştur ve sonra 1°C/dk artışla 240°C'ye çıkarılmıştır. FID dedektör sıcaklığı ise 300°C olarak ayarlanmıştır. Bileşiklerin rölatif oranları FID kromatogramdan bilgisayar yardımıyla hesaplanmıştır. GC kolonda ayrılan uçucu bileşikler daha sonra detektör görevi gören kütle spektrometrisinde her birinin tek tek kütle spektrumları alınarak tanımlanmıştır.

GC/MS analizi Agilent 5975 GC-MSD sistemi kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Bileşenlerin ayrımı için Innowax FSC kolon (60 m x 0.25 mm, film kalınlığı 0.25 µm), taşıyıcı gaz olarak Helyum (0.8 mL/dk) kullanılmıştır. GC fırın sıcaklığı 10 dakika 60°C'de 4°C/dk artışla 220°C'ye artırılıp 10 dakika tutulmuştur ve sonra 1°C/dk artışla 240°C'ye çıkarılmıştır. Split oranı 40:1 olarak uygulanmıştır. Kütle spektrumları 70 eV enerjisiyle alınmıştır. Kütle değerleri m/z 35 ile 450 arasında kaydedilmiştir. *n*-Alkanlar referans alınarak maddelerin kolondaki tutunma indeksleri (RRI) hesaplanmıştır. Bileşenlerin analizleri "Başer Uçucu Yağ

Bileşenleri Kütüphanesi", Wiley ve MassFinder 3.1 Kütüphane Tarama Yazılımları kullanılarak yapılmıştır.^{31,32}

Hücre canlılığı analizi

Hücre canlılığı ölçümü

Hücre canlılığı analizleri öncesinde ekstreler DMSO içerisinde çözülmüştür. Stok solüsyonu hücre kültürü besiyerinde (DMEM) hazırlanarak filtreden geçirilmiştir. İnsan primer dermal fibroblast hücreleri % 10 FBS ve %1 penisilin/steptomisin içeren besiyerinde, 37°C'deki %5'lik CO₂ inkübatöründe büyütülmüştür. Canlılık analizi için hücreler, 96 kuyulu siyah kültür kaplarına (Corning) kuyu başına 3x10³ hücre ekilerek 24 saat inkübe edilmiştir. Daha sonra besiyeri çekilerek stok solüsyondan büyüme besiyeri içinde hazırlanan seri dilüsyonlar (1, 2, 5, 10 mg/mL olacak şekilde) kuyulara aktarılmıştır. Her bir derişim için üçlü kuyularda çalışılmıştır. Ekstre muamelesinin 48 saat ardından, hücre canlılığını ölçmek üzere besiyeri kuyulardan çekilip Cell Titer Glo Reagent (Promega) eklenmiş ve lüminesan sinyali okutularak (SpectraMax i3x Multi-Mode Detection Platform) hücre canlılığı hesaplanmıştır. Kontrol kuyularına ekstre ile aynı derişimde DMSO içeriği uygulanmıştır. Tüm dozlarda DMSO eşik değeri % 0.5 olacak şekilde hücreler muamele edilmiştir.

İstatistik analiz

İstatiksel değerlendirme, Student's t testi uygulanarak yapılmıştır. Analiz sonuçları ortalama ± standart hata (S.H.) olarak ifade edilmiş ve istatistiksel anlamlılık düzeyi başlangıcı olarak p<0.005 kabul edilmiştir.

Bulgular

Ekstre hazırlanması

Bitki kaynaklı doğal ürünler, ilaç keşfi için son derece önemli bir kaynaktır. Bu çalışmada, *T. tomentosa* bitkisinin çiçeklerinin *n*-hekzan ekstresi hazırlanmıştır. 100 g kuru bitki materyalinden elde edilen ekstrenin verimi %3.3 olarak bulunmuştur.

Antioksidan aktivite deneyleri

Tablo 1, *T. tomentosa* çiçek *n*-hekzan ekstresinin DPPH• ve ABTS• süpürme aktivitelerini göstermektedir. *T. tomentosa* çiçeklerinin *n*-hekzan ekstresi DPPH ve ABTS radikallerinin temizlenmesine karşı orta dereceli antioksidan aktivite göstermiştir. Ekstrenin DPPH• ve ABTS'nin %50'sini süpürdüğü derişim değeri (IC₅₀) ise sırasıyla 1.94±0.04 ve 1.03±0.03 mg/mL olarak hesaplanmıştır.

Tablo 1. *T. tomentosa* çiçeklerinin *n*-hekzan ekstresinin ABTS ve DPPH radikal süpürücü etkisi (AA: Askorbik asit, Deneyler 3 tekrarlı olarak yapılmış ve ortalama değerleri yazılmıştır)

	IC ₅₀ ± S.H. (mg/mL)	
	Ekstre	Referans
ABTS	1.94±0.03	0.015±0.001(Trolox)
DPPH	1.01±0.04	0,002±0.001 (AA)

Toplam fenolik madde miktar tayini

T. tomentosa çiçeğinin *n*-hekzan ekstresinin toplam fenolik içeriği Folin-Ciocalteu tekniği kullanılarak ölçülmüştür. *T. tomentosa* *n*-hekzan ekstresinin fenolik içeriği gallik asit eşdeğeri olarak hesaplanmıştır. Tablo 2, *T. tomentosa* *n*-hekzan ekstresinin toplam fenolik içeriğini göstermektedir. İncelenen ekstredeki toplam fenolik içerik 12.33 mgGA/g'dır.

Antimikrobiyal aktivite

Antimikrobiyal aktivite çalışmaları kapsamında *Tilia* türlerinin gastrointestinal rahatsızlıklarda halk arasında kullanımı olduğu için gıda kaynaklı Gram pozitif (+) bakteri (*S. aureus*), gıda kaynaklı iki Gram negatif (-) bakteri (*E. coli* ve *P. aeruginosa*) ve mide ülseri patojeni *H. pylori* kullanılmıştır. Ayrıca üst solunum yolu rahatsızlıklarında tercih ediliyor olmasından dolayı da yine *S. aureus* ve *M. smegmatis* suşları antimikrobiyal aktivite çalışmaları için tercih edilmiştir. Sonuçlar Tablo 2'de gösterildiği gibidir.

Tablo 2. *T. tomentosa* n-hekzan ekstresinin antimikrobiyal aktivite sonuçları ($\mu\text{g/mL}$) (Deneyler 3 tekrarlı olarak yapılmış ve ortalama değerleri yazılmıştır)

	<i>E. coli</i>	<i>S. aureus</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>H. pylori</i>	<i>M. smegmatis</i>
n-hekzan ekstresi	-	125	-	-	-
Kloramfenikol	8	8	>32	16	-
Tetrasiklin	16	0.25	>16	0.025	-
Streptomisin					1
Klaritromisin					64
Amikasin					0.25

Antimikrobiyal aktivite deneyi sonuçlarına göre ekstrenin *S. aureus*'a karşı 125 $\mu\text{g/mL}$ bir etkinlik tespit edilmiştir. Etkinlik standart antimikrobiyaller olan kloramfenikol ve tetrasiklinle karşılaştırıldığında orta seviyelerde kalmakla beraber, ekstrenin çalışmada kullanılan diğer mikroorganizmalar üzerinde etkili olmadığı tespit edilmiştir.

GC/MS analizi

Ekstrenin fitokimyasal analizi eş zamanlı olarak GC ve GC/MS ile gerçekleştirilmiştir. Analiz sonuçlarına göre *T. tomentosa* n-hekzan ekstresinin altı bileşiğe karşılık gelen %58.3'ü aydınlatılmıştır. *T. tomentosa* n-hekzan ekstresinin ana bileşikler kafur (%17.7), 1,8-sineol (% 10.1), verbenon (%10.9), borneol (%10.9), α -pinen (%5.2) ve linalool (%5.5) olarak belirlenmiştir. Ekstrenin uçucu bileşenlerinin listesi Tablo 3'te verilmiştir.

Hücre canlılığı analizi

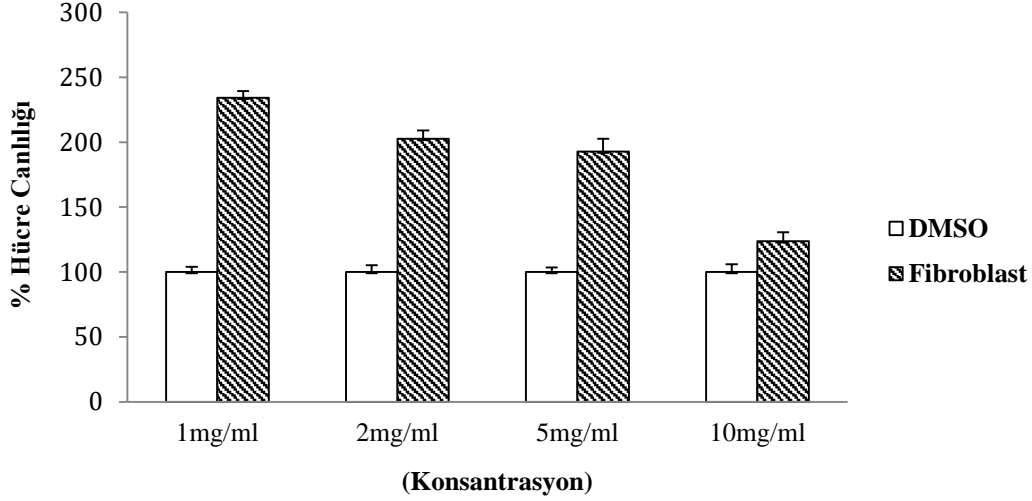
T. tomentosa çiçek n-hekzan ekstresinin hücreler üzerindeki sitotoksik etkisini incelemek üzere primer insan fibroblast hücrelerinde hücre canlılığı analizi yapılmıştır. Bulgularımıza göre, *T. tomentosa* çiçeklerinin n-hekzan ekstresi ile muamele

edilen insan fibroblast hücre canlılığının, doza bağımlı bir şekilde değişen derişimlerde (1 mg/mL, 2 mg/mL ve 5 mg/mL) bağılı olarak anlamlı bir biçimde arttığı gözlemlenmiştir.

Bu çalışma, n-hekzan ekstresinin 10 mg/mL'e kadar olan dozlarda, primer insan fibroblast hücreleri üzerinde sitotoksik etki göstermediğini ortaya koymuştur. Bununla birlikte, ekstrenin 1-5 mg/mL doz aralığında hücreler üzerinde istatistiksel olarak anlamlı proliferatif etkilere sahiptir (Şekil 1).

Tablo 3. *T. tomentosa* n-hekzan ekstresinin uçucu bileşenleri (RRI: Rölâtif tutunma zamanı indisi n-alkan serisine göre hesaplanmıştır; % FID (Alev iyonlaşma dedektörü) verilerine göre hesaplanmıştır.)

Bileşik	%
α -Pinen	5.2
Linalool	5.5
Kafur	17.7
Verbenon	10.9
Borneol	10.9
1,8-sineol	10.1



Şekil 1. 1-10 mg / mL *Tilia tomentosa* çiçeklerinin *n*-hekzan ekstresi ile muamele edilen primer insan fibroblast hücreleri üzerinde 48 saat sonunda gözlenen hücre canlılığı analizi. Kontrolle (DMSO) kıyasla ekstre ile muamele edilen (1-5mg/mL aralığında) hücrelerin canlılığında anlamlı artış görülmektedir ($p < 0.005$). Çalışma 3 tekrarlı olarak yapılmış ve ortalama değerleri yazılmıştır.

Tartışma

Günümüzde tıbbi bitkilerin değerlendirilmesi hem bilimsel hem de ekonomik açısından çok önemlidir. Tıbbi bitkiler ve tıbbi bitkilerden elde edilen ürünler, tüm dünyada olduğu gibi ülkemizde de çeşitli hastalıkların tedavisinde yaygın olarak kullanılmaktadır. Tıbbi bitkiler, özellikle antioksidan moleküller açısından zenginliği nedeniyle birçok çalışmanın odak noktası olmuş ve doğal antioksidanların araştırılmasına karşı gösterilen ilgi artmıştır. Ancak, tıbbi bitkilerden elde edilen ekstraların biyolojik etkileri ve etki mekanizmaları hakkındaki bilimsel veriler hala yetersizdir.

Bu çalışmada, *T. tomentosa* çiçeklerinin *n*-hekzan ekstresinin toplam fenolik içeriği, antioksidan, antimikrobiyal ve proliferatif aktiviteleri, iyi bilinen yöntemler kullanılarak araştırılmıştır. Hazırlanan ekstrede ilk olarak verim hesaplanmıştır. 100 g kuru bitki materyalden elde edilen ekstrenin verimi %3.3 olarak bulunmuştur. Verim ve biyolojik aktivite sonuçları açısından ekstre elde etmek önemli bir adımdır ve %3.3 verim bu açıdan uygundur.

Ekstredeki antioksidan etkinlik tayini kapsamında DPPH serbest radikal süpürme kapasitesi yöntemi kullanılmıştır. Referans madde olarak askorbik asit kullanılmıştır. Antioksidan aktivite deneyi olarak ikinci bir metot olarak ABTS serbest radikal süpürme kapasitesi yöntemi denenmiştir. Referans madde olarak da Trolox kullanılmıştır. Ekstrenin antioksidan ABTS ve DPPH radikal süpürücü etkisi sırasıyla 1.94 ve 1.03 olarak bulunmuştur. Bitki polifenoller, antioksidan aktivite ve bazı kronik hastalıkla ilişkili oksidatif strese bağlı doku hasarını hafifletmeleri nedeniyle insan diyetinin son derece önemli bileşenleridir. Serbest radikallerin çok çeşitli patolojik bulgularda önemli olduğu bilinmektedir. Fenolik maddeler, doğal antioksidan ajanlardır. Bu çalışmada yapılan deneylerden elde edilen verilere dayanarak, *T. tomentosa* çiçeğinin *n*-hekzan ekstresi için toplam fenolik içerik ve antioksidan aktivite arasında bir korelasyon bulunmuştur. Çalışmada *n*-hekzan ekstresinin toplam fenolik madde miktarı, galik asit eşdeğerliğine göre 12.33 ± 0.32 mg GAE/g ekstre olarak belirlenmiştir. Fenolik maddece zengin olduğu gözlemlenen ekstraların serbest radikalleri süpürme aktivitesi de yüksek olmaktadır. Fenolik madde ve flavonoid miktarları ile

antioksidan kapasitesi tayin yöntemleri arasında da bir ilişki mevcut olabileceği gibi, özellikle radikal süpürme temeline dayalı DPPH gibi metotların toplam fenolik madde ve flavonoid miktarları ile ilişkisi de önemlidir. Bu bulgular *T. tomentosa* çiçeğinin *n*-hekzan ekstresinin kabul edilebilir, doğal bir antioksidan kaynağı olduğunu düşündürmektedir. Sonuçlar diğer çalışmalarla kıyaslandığında apolar bir ekstre olan *n*-hekzan ekstresinin diğer çalışmalarda kullanılan polar metanol, su ve aseton ekstraktları ile paralel sonuçlar verdiği görülmektedir.^{18,33}

Hazırlanan ekstrenin antimikrobiyal aktivitesi *S. aureus*, *E. coli*, *P. aeruginosa*, *H. pylori* ve *M. smegmatis* suşları üzerinde test edilmiştir. Ekstrenin antimikrobiyal aktivitesi *S. aureus* suşuna karşı referanslara göre karşılaştırıldığında orta düzeyde (125 µg/mL) bir aktivitesinin olduğu tespit edilmiştir. Ekstrenin *S. aureus* mikroorganizmasına karşı bulunan etkinliğin *Tilia* türlerinin boğaz enfeksiyonlarında kullanımı ile ilişkilendirilebileceği düşünülmüştür. Günümüzde halk sağlığı açısından tüm dünyada sık görülen sağlık sorunlarının başında gelen boğaz enfeksiyonlarının tedavisine yardımcı olacak bir ekstre olarak kullanılabilirliği düşünülmektedir. Bu etkinliğini destekleyen etnobotanik çalışmaların mevcut olması da antimikrobiyal etkinlik sonuçlarını desteklemektedir.^{5,6,34} Ayrıca bitki üzerinde gerçekleştirilen diğer antimikrobiyal aktivite çalışmalarında da *S. aureus* mikroorganizması üzerinde uçucu yağın etkisi gözlemlenmişken, bu çalışmada *n*-hekzan ekstresinin etkinliği de uçucu yağa benzer bir şekilde bulunmuştur.³⁵

Fibroblast hücre hatları üzerinde sitotoksik etkisi araştırılan ekstrenin doza bağlı olarak hücre çoğalmasını pozitif yönde etkilediği gözlemlenmiştir. 1-5 mg/mL derişimlerde denenen *T. tomentosa* çiçeklerinin *n*-hekzan ekstraktları 1 mg/mL derişimlerde en yüksek oranda proliferatif etki göstermiştir. Bu sonuçlar, halk arasında sıklıkla kullanılan bir bitki olan Gümüş İhlamur çiçeklerinin bir hücre yenileyici ajan olarak kullanılabilirliğini ortaya koymuştur. Antioksidan etkinliği ve fenolik bileşenler

açısından da değerlendirildiğinde, ekstrenin hücre yenileyici etkinliği için oldukça umut vaat edici olduğu düşünülmektedir. Hücre hasarının onarılmasında iki önemli parametre olan serbest radikaller ve hücre proliferasyonu yönüyle incelendiği çalışmada *in vitro* yöntemlerle *T. tomentosa* *n*-hekzan ekstraktlarının etkinliği ispatlanmıştır. Sonuçlara göre sağlıklı hücreler üzerinde sitotoksikite göstermeyip aksine belirli dozlarda hücre proliferasyonu arttırdığı tespit edilmiştir. Buradan yola çıkarak *T. tomentosa* *n*-hekzan ekstresinin hem antioksidan aktivitesinden hem de fibroblast hücreleri üzerinde gösterdiği proliferatif etkisinden dolayı yara, yanık gibi deri bütünlüğünün bozulduğu, organ hasarı nedeniyle gerçekleşen organ yetmezliği yaşandığı durumlarda kullanılabilirliği öngörülmüştür.

Yazar katkıları : Makale hazırlanma sürecine katkıda bulunan ama yazarlık kriterlerini karşılamayan herhangi biri bulunmamaktadır.

Çıkar çatışması : Yapılan bu çalışma için herhangi bir çıkar çatışması ve anlaşmazlık bulunmamaktadır.

Kaynaklar

1. Davis PH. Flora of Turkey and the East Aegean Islands. Vol 2. Edinburgh, Edinburgh University Press, 1967:421-424.
2. Güner A, Aslan S, Ekim T, Vural M, Babaç MT (eds.). Türkiye Bitkileri Listesi (Damarlı Bitkiler). Nezahat Gökyiğit Botanik Bahçesi ve Flora Araştırmaları Derneği Yayını, İstanbul, 2012:254-258.
3. Oral, D. Türkiyenin Doğal-Egzotik Ağaç ve Çalıları 2, Angiospermler (H-Z). Ed. Prof. Dr. Ünal Akkemik (İstanbul Üniv. Orman Fak. Orman Botaniği A.B.D.), OGM Genel Müdürlüğü Yayınları, Ankara, 2014:119-125.
4. Baytop T. Türkçe Bitki Adları Sözlüğü. Türk Dil Kurumu Yayınları, Ankara, 1994:78-79.
5. Baytop T. Türkiye'de Bitkiler ile Tedavi. 2nci baskı. Nobel Tıp Kitabevleri, Ankara, 1999:98-99.

6. Baser KHC, Tümen G, Malyer H, Kirimer N. Plants used for common cold in Turkey. *Proc. ICEB* 2005;133-137.
7. Peev C, Dehelean C, Antal D, Feflea S, Olariu L, Toma C. *Tilia tomentosa* foliar bud extract: phytochemical analysis and dermatological testing. *Studia Universitatis Vasile Goldiş Seria Ştiinţele Vieţii* 2009;19:163-165.
8. Oniszczuk A and Podgórski R. Influence of different extraction methods on the quantification of selected flavonoids and phenolic acids from *Tilia cordata* inflorescence. *Ind Crop Prod* 2015;76:509-514.
9. Yakovlev AI. Polysaccharides of the inflorescences of *Tilia cordata*. *Chem Nat Comp* 1985;21 (1):114115.
10. Kosakowska OK, Bączek K, Przybyła JL, Ejdyś M, Kuźma P, Obiedziński M, Węglarza Z. Intraspecific variability in the content of phenolic compounds, essential oil and mucilage of small-leaved lime (*Tilia cordata* Mill.) from Poland. *Ind Crop Prod* 2015;78:58-65.
11. Toker G. Türkiyede yetişen *Tilia* L. Türleri üzerinde Farmakognozok Araştırmalar. Doktora Tezi, Mekin Tanker, Yayınlanmamış Tez, Ankara, 1982.
12. Newall CA, Anderson LA, Phillipson JD. Herbal Medicines: A Guide for Health-Care Professionals, 1st press, London, The Pharmaceutical Press, 1996: 181.
13. Toker G, Aslan M, Yesilada E, Memisoglu M, Ito S. Comparative evaluation of the flavonoid content in officinal *Tiliae flos* and Turkish lime species for quality assessment. *J Pharm Biomed Anal* 2001;26:111-121.
14. Duke JA, Godwin MJB, Ducellier J, Duke PAK. Handbook of Medicinal Herbs, Boca Raton: Fla. CRC pres, 2002: 485-486.
15. Gruenwald J, Brendler T, Jaenicke C. PDR for Herbal Medicine, Herbal Monographs, (4th addition), USA: Thomson Press, 2007:532-533.
16. Matsuda H, Ninomiya K, Shimoda H, Yoshikawa M. Hepatoprotective principles from the flowers of *Tilia argentea* (Linden): structure requirement of tiliroside and mechanism of action. *Bioorg Med Chem* 2002;10:707-712.
17. Yesilada E, Üstün O, Sezik E, Takaishi Y, Ono Y, Honda G. Inhibitory effects of Turkish folk remedies on inflammatory cytokines; interleukin-1 α , interleukin-1 β and tumor necrosis factor- α . *J Ethnopharmacol* 1997;58:59-73.
18. Yildirim A, Mavi A, Oktay M, Kara AA, Algur OF, Bilaloglu V. Comparison of antioxidant and antimicrobial activities of *tilia* (*Tilia argentea* Desf. ex DC), sage (*Salvia triloba* L.) and black tea (*Camellia sinensis*) extracts. *J Agric Food Chem* 2000;48:5030-5034.
19. Toker G, Kupeli E, Memisoglu M, Yesilada E. Flavonoids with antinociceptive and anti-inflammatory activities from leaves of *Tilia argentea* (silver linden). *J Ethnopharmacol* 2004;95:393-397.
20. Rop O, Mlcek J, Jurikova T, Neugebauerova J, Vabkova J. Edible Flowers-A New Promising Source of Mineral Elements in Human Nutrition. *Molecules* 2012;17(6):6672-6683.
21. Blois MS. Antioxidant determinations by the use of a stable free radical. *Nature* 1958; 181:1199-1200.
22. Re R, Pellegrini N, Proteggente A, Pannala A, Yang M, Rice-Evans C. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radic Biol Med* 1999; 26: 1231-1237.
23. Okur ME, Polat DC, Ozbek H, Yilmaz S, Yoltas A, Arslan R. Evaluation of the antidiabetic property of *Capparis ovata* Desf. Var. *Palaestina zoh.* Extracts using *in vivo* and *in vitro* approaches. *Endocrine Metab Immune Disord Drug Targets* 2018;18:489-501.
24. Spanos GA, Wrolstad RE. Influence of processing and storage on the phenolic composition of Thompson Seedless grape juice. *J Agric Food Chem* 1990;38:1565-1571.
25. Okur ME, Ayla Ş, Polat DÇ, Günal MY, Yoltas A, Biçeroğlu Ö. Novel insight into wound healing properties of methanol extract of *Capparis ovata* Desf. var. *palaestina* Zohary fruits. *J Pharm Pharmacol* 2018;70:1401-1413.
26. Amsterdam D. Susceptibility testing of antimicrobials in liquid media, In *Antibiotics in Laboratory Medicine*,

- Fourth Edition, V. Lorian (Ed.), Williams & Wilkins, Baltimore 1996:52-111.
27. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) (Formerly, NCCLS) Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria that Grow Aerobically, CLSI M7-A7, Clinical and Laboratory Standards Institute, 940 West Valley Road, Wayne, Pennsylvania, USA 2006.
 28. Clinical and Laboratory Standards Institute. Susceptibility testing of *Mycobacteria*, *Nocardiae*, and Other Aerobic Actinomycetes; Approved Standard. CLSI document M24-A. Wayne, Pa. USA: CLSI; 2003.
 29. Chung GA, Aktar Z, Jackson S, Duncan K, High-Throughput Screen for Detecting Antimycobacterial Agents. *Antimicrob Agents Chemother* 1995;39(10):2235-2238.
 30. Lee SM, Kim J, Jeong J, Park YK, Bai G, Lee EY, Lee MK, Chang CL. Evaluation of the Broth Microdilution Method Using 2,3-Diphenyl-5-thienyl-(2)-tetrazolium Chloride for Rapidly Growing *Mycobacteria* Susceptibility Testing, *J Korean Med Sci* 2007;22:784-790.
 31. McLafferty FW, Stauffer DB, The Wiley/NBS Registry of Mass Spectral Data, J Wiley and Sons, New York, 1989.
 32. Koenig WA, Joulain D, Hochmuth DH. Terpenoids and Related Constituents of Essential Oils, MassFinder 3, D. H. Hochmuth (ed.), Hamburg, Germany, 2004.
 33. Demiray S, Pintado ME, Castro PML. Evaluation of phenolic profiles and antioxidant activities of Turkish medicinal plants: *Tilia argentea*, *Crataegus* leaves and *Polygonum bistorta* roots, *World Acad Sci Eng Technol* 2009;54:312-317.
 34. Genç GE, Özhatay N. An ethnobotanical study in Çatalca (European part of İstanbul) II, *Turk J Pharm Sci* 2006;3(2):73-89.
 35. Fitsiou L, Tzakou O, Hancianu M, Poiata A. Volatile constituents and antimicrobial activity of *Tilia tomentosa* Moench and *Tilia cordata* Miller oils, *J Essent Oil Res* 2007;19(2):183-185.