

GİRESUN ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

BİYOLOJİ ANABİLİM DALI
YÜKSEK LİSANS TEZİ

GİRESUN İLİNDEN TOPLANAN *FLAVOPARMELIA CAPERATA* (L.) HALE
(PARMELIACEAE) VE *ROCCELLA PHYCOPSIS* ACH. (ROCCELLACEAE)
LİKENLERİNİN ANTİBAKTERİYAL VE ANTİOKSİDAN ÖZELLİKLERİNİN
ARAŞTIRILMASI

SİNEM AYDIN

MAYIS 2012

GİRESUN ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

BİYOLOJİ ANABİLİM DALI
YÜKSEK LİSANS TEZİ

GİRESUN İLİNDEN TOPLANAN *FLAVOPARMELIA CAPERATA* (L.) HALE
(PARMELIACEAE) VE *ROCCELLA PHYCOPSIS* ACH. (ROCCELLACEAE)
LİKENLERİNİN ANTİBAKTERİYAL VE ANTİOKSİDAN ÖZELLİKLERİNİN
ARAŞTIRILMASI

SİNEM AYDIN

MAYIS 2012

ÖZET

GİRESUN İLİNDEN TOPLANAN *FLAVOPARMELIA CAPERATA* (L.) HALE
(*PARMELIACEAE*) VE *ROCCELLA PHYCOPSIS* ACH. (*ROCCELLACEAE*)
LİKENLERİNİN ANTİBAKTERİYAL VE ANTİOKSİDAN ÖZELLİKLERİNİN
ARAŞTIRILMASI

AYDIN, Sinem

Giresun Üniversitesi

Fen Bilimleri Enstitüsü

Biyoloji Anabilim Dalı, Yüksek Lisans Tezi

Danışman: Doç. Dr. Kadir KINALIOĞLU

MAYIS 2012, 65 sayfa

Bu araştırmada, *Roccellaceae* familyasına ait *Roccella phycopsis* ve *Parmeliaceae* familyasına ait *Flavoparmelia caperata* likenlerinden elde edilen metanolik ve etanolik ekstraktların antibakteriyal aktiviteleri disk difüzyon yöntemi ve MİK yöntemleriyle test bakterilerine karşı denenmiştir.

Ayrıca, ekstraktların antioksidan aktiviteleri DPPH[•] radikali süpürme aktivitesi, indirgeme gücü, toplam fenolik içeriği, toplam flavonoid içeriği, ABTS^{•+} radikali süpürme aktivitesi, metal şelatlama aktivitesi, TBA testi yöntemleri kullanılarak belirlenmiştir.

Ekstraktlarda yapılan bütün testlerde antioksidan ve antibakteriyal aktivite gözlemlendiğinden çalışılan liken ekstraktlarının doğal bir antioksidan ve antibakteriyal kaynağı olabileceği sonucuna varılmıştır.

Anahtar Kelimeler: Liken, Antibakteriyal Aktivite, Antioksidan Aktivite

ABSTRACT

INVESTIGATION OF ANTIBACTERIAL AND ANTIOXIDANT ACTIVITIES OF
ROCCELLA PHYCOPSIS ACH. (ROCCELLACEAE) AND *FLAVOPARMELIA*
CAPERATA(L.) HALE LICHENS COLLECTED FROM GİRESUN PROVINCE

AYDIN, Sinem

GiresunUniversity

Graduate School Of Natural andAppliedSciences

Department of Biology, Master Thesis

Supervisor: Assoc. Prof. Dr. Kadir KINALIOĞLU

MAY 2012, 65 pages

In this study, the antibacterial activities of ethanolic and methanolic extracts of *Roccella phycopsis* which belong to *Roccellaceae* familia and *Flavoparmelia caperata* which belongs to *Parmeliaceae* familia were investigated against test bacteria by using disc diffusion method and MIC methods.

Antioxidant activities of extracts were determined by using DPPH[•] Radical scavenging activity, total fenolic content, total flavonoid content, ABTS^{•+} radical scavenging activity, metal chelating activity, TBA test methods.

It is concluded that extracts can be a fine natural antioxidant and antibacterial sources because they have high antioxidant and antibacterial activities.

KeyWords: Lichen, Antibacterial Activity, Antioxidant Activity

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans öğrenimim sırasında, tez konusunun planlanmasında ve değerlendirilmesi sırasında ilgi ve desteğini hiç esirgemeyen danışman Hocam Sayın Doç. Dr. Kadir KINALIOĞLU'na gönülden teşekkürlerimi sunarım.

Çalışmalarım sırasında mikrobiyoloji alanındaki bilgilerinden yararlandığım Sayın Hocam Doç. Dr. Hatice KATI'ya, antioksidan aktivite alanındaki bilgilerinden yararlandığım Sayın Hocam Yrd. Doç. Dr. Bahar BİLGİN SÖKMEN'e teşekkürlerimi sunarım.

FEN-BAP-140411-16 sayılı proje kapsamında, mevcut çalışmaya maddi destek sağlayan Giresun Üniversitesi Rektörlüğü Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimine de teşekkürlerimi sunarım.

Ayrıca, bu günlere gelmemde emekleri olan anne ve babama ve her konuda desteğini sürekli yanımda hissettiğim eşime de sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

İÇİNDEKİLER

ONAY SAYFASI.....	I
ÖZET	II
ABSTRACT	III
TEŞEKKÜR	IV
İÇİNDEKİLER	V
TABLOLAR DİZİNİ	VIII
ŞEKİLLER DİZİNİ	X
SİMGELER DİZİNİ	XII
KISALTMALAR DİZİNİ	XIII
1. GİRİŞ.....	1
1.1.Likenlerin Genel Özellikleri	5
1.2. Liken SekonderMetabolitleri ve Tıbbi Önemleri	5
1.3. Likenlerin Antibakteriyal Aktiviteleri	8
1.4. Likenlerin Antioksidan Aktiviteleri	10
1.5. Çalışmada Kullanılan Liken Türleri	11
1.5.1. <i>Rocella phycopsis</i>	11
1.5.2. <i>Flavoparmelia caperata</i>	12
1.6. Çalışmanın Amacı	13
2. MATERYALVE METOT.....	14
2.1. Kullanılan Kimyasal Maddeler	14
2.2. Kullanılan Cihazlar	14
2.3. <i>Rocella phycopsis</i> Ach. ve <i>Flavoparmelia caperata</i> (L.) Hale	
Likenlerinin Toplanması ve Teşhisi	15
2.4. Çalışmada Kullanılan Bakteriler	15

2.5. Liken Ekstraktlarının Hazırlanması.....	15
2.5.1. Etanolik Liken Ekstraktlarının Hazırlanması.....	15
2.5.2. Metanolik Liken Ekstraktlarının hazırlanması.	16
2.6. Ekstraktların Yüzde Verimlerinin Hesaplanması	16
2.7. Liken Ekstraktlarının Antibakteriyal Aktivitelerinin Belirlenmesi	16
2.7.1.Disk Difüzyon Yöntemiyle Antibakteriyal Aktivitenin Belirlenmesi.....	16
2.7.2.Minimal İnhibisyon Konsantrasyonu (MİK) Değerinin Belirlenmesi.....	17
2.8. Liken Ekstraktlarının Antioksidan Aktivitelerinin Belirlenmesi.....	17
2.8.1. DPPH [•] Radikali SüpürmeAktivitesi.....	17
2.8.2.İndirgeme Gücü	18
2.8.3.Toplam Fenolik İçeriği	18
2.8.4.Toplam Flavonoid İçeriği	19
2.8.5. Metal Şelatlama Aktivitesi	19
2.8.6. ABTS ^{•+} Radikali Süpürme Aktivitesi	20
2.8.7. TBA Testi	20
2.8.8. İstatistiksel Analiz	21
3. ARAŞTIRMA BULGULARI VE TARTIŞMA.....	22
3.1. Liken Ekstraktlarının Yüzde Verimleri	22
3.2. Liken Ekstraktlarının Antibakteriyal Aktivitesi	22
3.2.1. Disk Difüzyon Deneyi.....	22
3.2.2.MİK Deneyi	27
3.3.Antioksidan Aktivite	33
3.3.1. DPPH [•] Radikali Süpürme Aktivitesi	33

3.3.2. İndirgeme Gücü	36
3.3.3. Toplam Fenolik İçeriği	39
3.3.4. Toplam Flavonoid İçeriği	42
3.3.5. Metal Şelatlama Aktivitesi	45
3.3.6. ABTS ^{·+} Radikali Süpürme Aktivitesi	47
3.3.7. Tiyobarbitürik Asit Testi	50
4. SONUÇ	53
KAYNAKLAR.....	55
ÖZGEÇMİŞ	65

TABLÖLER DİZİNİ

TABLO

3.1. Liken ekstraktlarının yüzde verimleri ..	22
3.2. Liken ekstraktlarının antibakteriyal aktiviteleri ..	24
3.3. Liken ekstraktlarının MİK değerleri.	28
3.4. Liken ekstraktlarının mikroorganizmalar üzerine bakteriyosidal ve bakteriyoletal aktiviteleri.....	29
3.5.Çalışılan liken örnekleri ve standartların IC ₅₀ değerleri ..	35
3.6.Liken ekstraktları ve standart antioksidan maddelerin DPPH' radikali süpürme aktivitelerinin istatistiksel analizi (konsantrasyonlara göre) ..	35
3.7.Liken ekstraktlarının ve standart antioksidan maddelerinDPPH' radikali süpürme aktivitelerinin istatistiksel analizi (örneklere göre) ..	36
3.8.Liken ekstraktlarının ve standart maddeleri indirgeme gücü aktivitelerinin istatistiksel analizi (konsantrasyonlara göre) ..	38
3.9.Liken ekstraktlarınınve standart maddelerin indirgeme gücü aktivitelerinin istatistiksel analizi (örneklere göre) ..	39
3.10. Liken ekstraktları ve standart antioksidan maddelerin toplam fenolik İçerikleri ..	40
3.11. Liken ekstraktlarının toplam fenol içeriklerinin istatistiksel analizi (konsantrasyonlara göre) ..	41
3.12.Liken ekstraktlarının ve standartların toplam fenol içeriklerinin istatistiksel analizi (örneklere göre) ..	42
3.13.Liken ekstraktlarının ve standart antioksidan maddelerin toplam flavonoid içerikleri ..	43

3.14.Liken ekstraktlarının ve standartların toplam flavonoid içeriklerinin istatistiksel analizi (konsantrasyonlara göre) ..	44
3.15. Liken ekstraktlarının ve standartların toplam flavonoid içeriklerinin istatistiksel analizi (örneklere göre) ..	44
3.16.Liken ekstraktlarınınve standartların metal şelatlama aktivitelerinin istatistiksel analizi (konsantrasyonlara göre) ..	46
3.17.Liken ekstraktlarınınve standartların metal şelatlama aktivitelerinin istatistiksel analizi (örneklere göre) ..	47
3.18.Çalışılan liken örnekleri ve standart maddelerin IC ₅₀ değerleri (µg/mL).....	48
3.19.Liken ekstraktlarının ve standartların ABTS ^{·+} radikali süpürme aktivitelerinin istatistiksel analizi (konsantrasyonlara göre) ..	49
3.20.Liken ekstraktlarının ve standartların ABTS ^{·+} radikali süpürme aktivitelerinin istatistiksel analizi (örneklere göre) ..	49
3.21.Liken ekstraktlarının ve standartların TBA testi aktivitelerinin istatistiksel analizi (konsantrasyonlara göre) ..	51
3.22.Liken ekstraktlarınınve standartların TBA testi aktivitelerinin istatistiksel analizi (örneklere göre) ..	51

ŞEKİLLER DİZİNİ

ŞEKİL

1.1. <i>Roccella phycopsis</i> Ach. likeninin doğal ortamından çekilmiş fotoğraf.....	12
1.2. <i>Flavoparmelia caperata</i> L. (Hale) likeninin doğal ortamından çekilmiş Fotoğraf	13
3.1. Liken ekstraktlarının ve standart antibiyotiklerin <i>Acinetobacter baumannii</i> (a), <i>Bacillus megaterium</i> (b), <i>Erwinia amylovora</i> (c) ve <i>Escherichia coli</i> (d) üzerine antibakteriyal aktiviteleri	25
3.2. Liken ekstraktlarının ve standart antibiyotiklerin <i>Enterococcus faecium</i> (e), <i>Gordonia rubripertincta</i> (f), <i>Proteus mirabilis</i> (g) ve <i>Staphylococcus cohnii</i> (h) üzerine antibakteriyal aktiviteleri	25
3.3. Liken ekstraktlarının ve standart antibiyotiklerin <i>Salmonella enterica</i> serovar <i>typhimurium</i> (ı), <i>Yersinia pseudotuberculosis</i> (j), <i>Enterococcus faecalis</i> (k) ve <i>Bacillus cereus</i> (l) üzerine antibakteriyal aktiviteleri	26
3.4. Liken ekstraktlarının ve standart antibiyotiğin <i>Yersinia enterocolitica</i> (m), <i>Proteus vulgaris</i> (n), <i>Klebsiella pneumoniae</i> (o) ve <i>Staphylococcus aureus</i> (p) üzerine antibakteriyal aktiviteleri	26
3.5. Liken ekstraktları ve standart antioksidan maddelerin DPPH [•] radikali süpürme aktiviteleri.....	33
3.6. Liken ekstraktlarının ve standart antioksidan maddelerin indirgeme gücü aktiviteleri.....	37
3.7. Gallik asit standart grafiği	40
3.8. Kateşin standart grafiği	43
3.9. Liken ekstraktları ve standart antioksidan maddelerin metal-şelat	

aktiviteleri.....	.. 45
3.10. Liken ekstraktları ve standart antioksidan maddelerin ABTS ^{·+} radikali giderme aktiviteleri ..	47
3.11. Liken ekstraktları ve standart antioksidan maddelerin TBA testi inhibisyon yüzdeleri ..	50

SİMGELER DİZİNİ

°C	Santigrat derece
g	Gram
mg	Miligram
µg	Mikrogram
mL	Mililitre
µL	Mikrolitre
%	Yüzde

KISALTMALAR

ATCC	American Type Culture Collection
MHB	Müller Hinton Broth
MHA	Müller Hinton Agar
MIK	Minimal İnhibisyon Konsantrasyonu
ABTS	2,2'-Azino-bis (3-etilbenzenothiazoline-6-sülfonik asid)
DPPH	2,2-difenil-1-pikrilhidrazil
BHT	Bütillenmiş Hidroksitoluen
TCA	Trikloroasetik Asit
GAE	Gallik Asit Ekvivalenti
QE	Kateşin Ekvivalenti
DMSO	DimetilSülfoksit
EDTA	Etilen DiaminTetra Asetik Asit
IC ₅₀	%50 İnhibisyon Sağlayan Konsantrasyon
TBA	Tiyobarbitürik Asit
ROT	Reaktif Oksijen Türleri

1. GİRİŞ

Günümüzde bitkiler ve bitkisel ilaç hammaddeleri, reçete ile satılan ilaçların %25'ini oluşturmaktadır (1). Son yıllarda tıbbi bitkiler ve bunlardan elde edilen aktif maddeler üzerindeki çalışmalar ve bu doğal ürünlere karşı olan ilgi; tedavi alanına sokulan yeni sentetik bileşiklerin bazılarında görülen tehlikeli yan etkiler, bitkisel drogların birkaç etkiye sahip olmaları, kolay ve ucuz tedavi imkanı elde etme isteği gibi başlıca sebeplerden dolayı artmıştır. Bu amaçla birçok bitki mikrobiyolojik farmakolojik yönlerden hatta biyolojik savaşın gündemde olduğu son yıllarda bitki savunma mekanizması bakımından da çok yönlü araştırılmaktadır. Bitkilerin mikroorganizmaları öldürücü ve insan sağlığı için önemli özellikleri 1926 yılından bu yana laboratuvarlarda araştırılmaya başlanmıştır (2).

Likenler bir mantar, bir alg ya da bir mavi yeşil algden meydana gelen simbiyotik birliklerdir. Bu birliktelik sonucunda likenler, onu oluşturan organizmalara hiç benzemeyen, yepyeni anatomik, morfolojik ve fizyolojik özellikler gösterirler. Böylece likenleri oluşturan simbiyontlar, kısıtlı yaşam koşullarında var olmalarına neden olan karakterlerini kaybedip, üstün özelliklerini ön plana çıkarma şansı bulurlar. Likeni oluşturan bu mutual birlikteliğe, üretici canlı olan alg besini temin ederken mantar, havadan su buharı ve kendi üzerinde birikmiş mineralleri kazandırmaktadır (3).

Doğada önemli ekolojik özellikleri olan likenler insanlar tarafından yüzyıllardır boya, ilaç, zehir, parfüm, dekorasyon kaynağı gibi değişik amaçlarla kullanılmışlardır.

Likenlerin tıbbi kullanımları antik çağlara dayanmaktadır. Bu yıllarda likenin morfolojik yapısına uygun olarak tedavi yöntemleri uygulanmıştır. Örneğin; uzun ipliksi bir yapıda olan *Usnea barbata* ve diğer *Usnea* türleri saç dökülmesi ve saç çıkmasında, retikülat bir tallusa sahip *Lobaria pulmonaria* akciğer ve verem hastalığı tedavisinde kullanılmışlardır. Benzer şekilde sarı turuncu renkli bir liken olan *Xanthoria parietina* sarılık hastalığının tedavisinde kullanılmıştır. Yine bazı *Usnea* türleri ve *Pseudevernia furfuracea* basur tedavisinde kullanılmıştır. *Lecanora esculenta*'nın tonik ve hafif laksatif etkisi vardır. *Cetraria islandica* ve *Cladonia stellaris* öksürük ve solunum yolu hastalıklarının tedavisinde ayrıca göğüs

yumuşatıcı pastillerin yapımında kullanılır. *Usnea* ve *Pseudevernia furfuracea* kanamalarda doku ve damarları büzücü özelliklerinden dolayı kullanılmışlardır. *Peltigera aphthosa* bağırsak kurtlarının düşürülmesinde kullanılır (4).

İkinci Dünya Savaşı'ndan sonra ilkel funguslardan elde edilen antibiyotiklerin kıtlığı, likenler üzerinde benzer araştırmaların yapılmasına yol açmıştır. Bir mantardan penisilin antibiyotiğinin keşfedilmesi üzerine, 1940'larda ve 1950'lerde pek çok liken antibakteriyal aktiviteleri bakımından incelenmiştir (5). Likenlerin sahip olduğu antimikrobiyal etkilerin, yapısında bulunan çoğu asit karakterli olan metabolitlerden kaynaklandığı tespit edilmiştir. Araştırmalar sonucunda 300'den fazla liken maddesinin yapısı aydınlatılmış ve bunlardan özellikle protolikesterinik asit, pulvinik asit, fisodik asit, lobarik asit, fumarprotosetrarik asit ve usnik asitin en yüksek antimikrobiyal etki gösteren liken bileşenleri olduğu tespit edilmiştir (4).

Liken bileşenlerinden usnik asit 1844'de ilk izolasyonundan bu yana en yoğun çalışılan ve ticari olarak üretilen liken metaboliti olmuştur. Avustralya'da *Usnia-skin* adıyla yara tozu ve pudrası olarak satılırken, Almanya'da Evosin I (usnik asit ve evernik asit karışımı) ve Evosin II (usnik, fisodik ve fisodalik asit karışımı) adıyla, İsviçre'de ise Lichussin adıyla satılmaktadır. Finli bilim adamları usnik asitle ilgili pekçok çalışma yaparak bu maddeyi pek çok kimyasalla kombine edip yeni bir madde ortaya çıkarmışlardır ve bu maddeye USNO adını vermişlerdir. USNO deri hastalıklarında olumlu sonuçlar vermiştir. USNO'nun mayalara karşı antifungal etki gösterdiği de tespit edilmiştir (6).

Likenlerin antibakteriyal özellikleri ile ilgili son yıllarda pek çok çalışma yapılmıştır.

Kosanić ve arkadaşları (2012) tarafından yapılan bir çalışmada, *Parmelia caperata*, *Parmelia saxatilis* ve *Parmelia sulcata* likenlerinin aseton ekstraktlarının antimikrobiyal etkinlikleri araştırılmış ve likenlerin kullanılan tüm test bakterileri ve mantarları üzerine aktivite gösterdiği sonucuna varılmıştır (7).

Manojlovic ve arkadaşlarının (2012) *Umbilicaria cylindrica* likeninin etil asetat ve metanol ekstraktlarının *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Escherichia coli*, *Proteus vulgaris*, *Proteus mirabilis* ve *Bacillus subtilis* bakterileri üzerindeki antibakteriyal aktivitelerinin belirlenmesi amacıyla yaptıkları çalışmada,

bu liken türünden elde edilen ekstraktların, kullanılan tüm test bakterilerine karşı değişik oranlarda aktivite gösterdiğini belirlenmiştir (8).

Marijana ve arkadaşları (2010) tarafından yürütülen ve *Lecanora frustulosa* ve *Parmeliopsis hyperopta* likenlerinin aseton, metanol ve sulu ekstraktlarının *Bacillus mycoides*, *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus*, *Enterobacter cloaceae*, *Escherichia coli* ve *Klebsiella pneumoniae* bakterileri üzerine antibakteriyal aktivitesinin incelendiği diğer bir çalışmada, *L. frustulosa* ve *P. hyperopta* likenlerinin aseton ve metanol ekstraktlarının *E. coli*'ye karşı, sulu ekstraktlarının ise test bakterilerinin hiçbirine karşı aktivite göstermediği sonucuna varılmıştır (9).

Likenlerin antibakteriyal aktiviteleri ile ilgili ülkemizde de pekçok çalışma yapılmıştır.

Yücel ve arkadaşlarının (2007) *Cladonia rangiformis* likeninin kloroform, metanol ve sulu ekstraktlarının antibakteriyal aktivitelerini belirlemek amacıyla yaptıkları çalışmada, *Cladonia rangiformis* likeninin tüm ekstraktlarının *Bacillus subtilis* ve *Bacillus amyloliquefaciens* bakterilerine karşı zayıf antibakteriyal aktivite gösterdiği sonucuna varmışlardır (10).

Duman'ın (2009) yaptığı çalışmada *Parmelia saxatilis*, *Parmelia sulcata*, *Parmelina tiliaceae*, *Xanthoparmelia conspersa* ve *Flavoparmelia caperata* likenlerinin aseton ekstraktlarının *Escherichia coli*, *Enterococcus faecalis*, *Proteus mirabilis*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus megaterium*, *Pseudomonas aeruginosa* bakterilerine karşı aktivite gösterdiği belirlenmiştir (11).

Karagöz ve arkadaşları (2009) tarafından yürütülen çalışmada *Anaptychia ciliaris*, *Cetrelia olivetorum*, *Lecanora muralis*, *Peltigera polydactyla*, *Peltigera praetextata*, *Ramalina farinacea*, *Rhizoplaca melanohphthalma*, *Umbilicaria vellea*, *Xanthoria elegans*, *Xanthoria parietina*, *Xanthoparmelia tinctoria* likenlerinin su ve etanol ekstraktlarının *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus epidermidis*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Aeromonas* 1 (izolat), *Aeromonas* 2 (izolat) bakterileri üzerindeki antibakteriyal aktiviteleri incelenmiştir. Likenlerin su ekstraktlarının *B. subtilis*, *S. aureus*, *E. coli* bakterilerine karşı aktivite göstermesine rağmen, çalışılan diğer bakterilere karşı aktivite göstermediği belirlenmiştir. Ayrıca, bu likenlerin etanol ekstraktlarının *B. subtilis*, *S. aureus* ve *S. epidermidis* dışındaki test bakterilerine de aktivite göstermediği belirlenmiştir (12).

Serbest radikaller, vücudumuz oksijen kullanırken meydana gelen atık maddelerdir. Vücut dokularındaki bazı kimyasal reaksiyonlar, belirli koşullarda serbest radikal moleküllerinin üretilmesine neden olur (13).

Son zamanlarda reaktif oksijen türlerinin ve özellikle serbest radikallerin kanser ve arterosklerozis gibi hastalıkları da tetiklediği kabul edilmiştir. Ayrıca serbest radikallerin neden olduğu lipid peroksidasyonu, ROT'lara bağlı hücre harabiyetinin en önemli nedeni olarak tanımlanmaktadır (14). Antioksidan savunma sistemi yeterince iyi çalışmıyorsa ve antioksidan gıdalar yeterli oranda yenilmiyorsa veya antioksidan özellikli desteklerden faydalanılmıyorsa serbest radikaller hücrelere zarar vererek birçok önemli rahatsızlığın başlangıcına zemin hazırlar. Günümüzde besin endüstrisinde ticari olarak kullanılan çeşitli sentetik antioksidan maddeler mevcuttur. Ancak bu sentetik antioksidanların olumsuz sağlık sorunlarını tetikleyeceğine dair bilgiler bulunmaktadır. Örneğin, bu kimyasalların farelerde akciğer harabiyeti, karaciğerde nekroz ve kanamaya bağlı ölümlere neden olduğu bildirilmiştir (15). Sentetik antioksidanların kanser gibi çeşitli hastalıkları tetikleyebileceği şüphesinden dolayı, bitkiler alternatif antioksidan madde araştırmaları için önemli birer kaynaktır. Bitkilerden izole edilen fenoller (flavonoid, tokoferol), azotlu bileşikler (alkaloid, aminoasit ve aminler), karotenoidler ve askorbik asit doğal kökenli antioksidanlar olarak kullanılmaktadır (16).

Liken ekstraktlarının ve liken metabolitlerinin antioksidan etkilerinin incelendiği araştırmalar özellikle son yıllarda artmıştır.

Bugüne kadar likenlerin antioksidan aktiviteleri ile ilgili çok sayıda çalışma yapılmıştır. *Cladonia furcata*, *Hypogymnia physodes*, *Lasallia pustulata*, *Parmelia caperata* ve *Parmelia sulcata* likenleri ile yürütülen bir çalışmada likenlerin aseton, metanol ve sulu ekstraktlarının kuvvetli antioksidan aktivite gösterdiği tespit edilmiştir (17).

Cladonia furcata, *Lecanora atra* ve *Lecanora muralis* likenlerinin aseton ekstraktlarının antioksidan aktivitesini araştırdığı bir diğer çalışmada, çalışılan liken türlerinin tümünün değişik oranlarda antioksidan aktivite gösterdiği tespit edilmiştir (18).

Paudel ve arkadaşları (2008) tarafından *Stereocaulon alpinum*, *Ramalina terebrata*, *Caloplaca* sp., *Lecanora* sp., *Caloplaca regalis* liken türleriyle

gerçekleştirilen bir çalışmada çalışılan tüm liken türlerinin antioksidan aktivite gösterdiği bildirilmiştir (19).

Usnea ghattensis likeni ile yapılan diğer bir çalışmada ise bu likenin metanolik ekstraktlarının oldukça yüksek bir antioksidan aktivite gösterdiği tespit edilmiştir (20).

Benzer şekilde, Yunanistan'ın kuzeyinden toplanan *Hypotrachyna revoluta* likeninden elde edilen dokuz sekonder metabolitin ABTS^{•+} radikali süpürme aktivitesi gösterdiği yapılan çalışmalarla ortaya konmuştur (21).

Cladonia foliaceae, *Dermatocarpon miniatum*, *Evernia divaricata*, *Evernia prunastri*, *Neofuscella pulla* likenlerinin metanol ekstraktlarının antioksidan aktivitelerinin incelendiği bir diğer çalışmada, çalışılan liken türlerinden yalnızca *D. miniatum* likeninin antioksidan aktivite gösterdiği sonucuna varılmıştır (22).

Türkiye'den toplanan *Cladonia rangiformis* liken türünün kloroform, sulu ve metanol ekstraktlarının antioksidan aktivitelerinin incelendiği çalışmada likenin her üç ekstraktının da değişik oranlarda antioksidan aktivite gösterdiği belirlenmiştir (10).

1.1. Likenlerin Genel Özellikleri

Tabiatı, bazı kayaların, ağaç gövde ve dallarının üzerinde yosunlara benzeyen köksüz, gövdesiz ve yapraksız görünen organizmalara liken adı verilmektedir (23). Likenler genelde sporlu bitkiler adı altında yosunlar, ciğer otları, serbest yaşayan mantarlar ve alglerle birlikte gruplandırılırlar. Dünyada 20.000 civarında likenin yayılış gösterdiği bilinmektedir. Bu türler kutuplardan tropiklere, gel-git alanlarından dağ zirvelerine, toprak, kaya ve ağaç kabuklarından kemik, cam hatta böcek ve kaplumbağa gibi hayvanların sırtlarına kadar çok değişik habitatlarda gelişebilirler (24).

1.2. Liken Sekonder Bileşikleri ve Tıbbi Önemleri

Liken bileşikleri primer ve sekonder metabolitler olmak üzere iki gruba ayrılır. Bu ürünlerin bazıları mantarlar tarafından bazıları ise algler tarafından sentezlenir. Liken tallusu bileşik bir yapıya sahip olduğundan, özel bir bileşiğin nerede sentezlendiğine karar vermek her zaman mümkün değildir. Likenlerden izole edilen intraselüler maddelerin pek çoğu likenlere özgü olmayıp serbest yaşayan mantarlarda, alglerde ve yüksek yapılı bitkilerde de bulunur. Likenlerde bulunan

organik bileşiklerin çoğunluğu mantar hücrelerinin içlerinden ziyade mantar hiflerinin yüzeylerinde biriktirilen sekonder ürünlerdir.

Liken maddelerinin sınıflandırılması ilk olarak Zopf tarafından yapılmış olup, sonraları bu sınıflandırma Asahina ve Shibata tarafından modifiye edilmiştir. Temel olarak liken maddeleri alifatikler (yağ asitleri, polioller ve triterpenoidler) ve aromatikler (tetronik asit türevleri, depsidler, depsidonlar, kinonlar, dibenzofuranlar ve diketopiperazin türevleri) olmak üzere iki kısma ayrılmaktadır. Likenlerde 1968'den beri keşfedilen maddeler C. F. Culberson'un kataloğunda yer almaktadır (25).

Her ne kadar liken maddeleri ilk olarak XIX. yüzyılda keşfedilmiş olsalar, onların kapsamlı çalışılması Alman kimyacı Hesse ile 1861'de başlamıştır. Zopf çalıştığı liken maddelerini 1907'de Die Flechtenstoffe adlı yayınında yayınlamıştır. Zopf bu yayınında 150'den fazla liken maddesinin ampirik formülünü, özelliğini ve bu maddelerin meydana gelişini anlatmıştır. Bir liken depsidi olan lekanorik asitin ise ilk laboratuvar sentezi 1913'de Emil Fischer tarafından yapılmıştır. Bundan sonra Japonya'da Asahina, İrlanda'da Nolon, Hindistan'da Seshadri ve Neelakantan, İngiltere'de Robertson, İsveç'de Lindberg ve Wachtmeister, Amerika'da C. F. Culberson, Almanya'da Hunick ve diğer araştırmacılar pek çok liken maddesinin moleküler yapısını aydınlatmışlardır. Likenlerde yaygın olan major maddelerin çoğu keşfedilmiştir, fakat depsidler, depsidonlar ve triterpenoidler gibi yeni maddelerin birçoğu henüz keşfedilmektedir (25).

Shibata'nın sınıflandırması:

1.Şikimik asit kökenli

- a)Terfenilkinonlar (Örnek: teloforik asit, poliforik asit)
- b)Tetronik asit türevleri (Örnek: vulpinik asit, pinastrik asit, leprarinik asit)

2.Mevalonik asit kökenli

- a)Triterpenoidler (Örnek: zeorin, ursolik asit)

3.Asetat-malonat kökenli

- a)Yüksek yağ asitleri (Örnek: (+)-protolikesterinik asit, rosellik asit, kaperatik asit)
- b) Fenolkarboksilik asitler
 - b.1) Orsinol türevleri: depsidler (Örnek: evernik asit, divarikatik asit, eritrin), dibenzofuranlar (Örnek: didimik asit, pannarik asit, porfirillik asit), depsonlar

(Örnek: pikrolikenik asit), depsidonlar (Örnek: fisodik asit, alektoronik asit, lobarik asit), kromanonlar (Örnek: sifulin)

b.2) β -orsinol türevleri: depsidler (Örnek: barbatik asit, atranorin, tamnolik asit), depsidonlar (Örnek: salazinik asit, fumarprotosetrarik asit)

b.3) Piloroglusinol türevleri (Örnek: usnik asit)

b.4) Kinonlar (Örnek: piksiferin, parietin, parietik asit)

4. Aminoasit kökenli

a) Diketopiperazin türevleri (Örnek: pikrorosselin) (25).

Mutualizmin en güzel örneklerinden olan likenlerin yavaş büyüme özelliklerine karşın neden bu kadar çok metabolit ürettiklerini açıklamak için ileri sürülen bazı düşünceler şunlardır:

Likenler oldukça yavaş büyüyen organizmalar oldukları için basit yapılı ve yüksek organizasyonlu bitkilere karşı korunmaları gerekmektedir. Liken maddeleri aktif koruyucu ve antibiyotik özellikteki maddelerdir. Antibiyotik özellikteki maddeler toprak funguslarının gelişimini, hatta vasküler bitki tohumlarının çimlenmesini inhibe eder. Bu özellikler likenlere doğada diğer bitkilerle rekabet edebilme şansı kazandırır.

Aromatik liken maddeleri UV ışığını güçlü bir şekilde absorbe ederek çok yoğun ısıya karşı algleri korur.

Liken maddeleri, fikobiyontların hücre duvarının geçirgenliğini etkileyerek simbiyotik ilişkide önemli rol oynar.

Bazı liken maddeleri (Örnek: norstiktik, izo-usnik ve usnik asitler) metallerle (Örnek: K, Cu, Fe) kompleks oluşturur ve tallusun substrattan mineral sağlamasına yardım eder.

Liken maddeleri, böcekler, yılanlar ve nematodlar gibi bazı hayvanlar için zehirleyici özellik taşıdığından tallusun bu hayvanlar tarafından yenilmesini engeller.

Birçok liken ekolojik dağılımları nedeniyle sıcaklık, nem ve ışık faktörleri bakımından ekstrem şartlar altında büyümek zorundadır. Bu durumdaki likenlerde sentezlenen ve stres metabolitleri olarak adlandırılan bu maddeler ekstrem değişimlere karşı likenin adaptasyonunu sağlarlar.

Medulladan salgılanan liken maddeleri hidrofobik özellikte olup medullanın suya karşı doygunluğunu önler ve tallusun atmosfer ile devamlı gaz değişimine izin verir. Medulla hiflerinin suda çözünmeyen kristal materyalle çevrilmesi suyun

aktarımına ve liken tallusunda fotosentezde gerekli olan gaz değişimi için hava boşluklarının kalmasına yardım eder (26).

Liken metabolitleriyle yapılan araştırmalarda bu metabolitlerin tıbbi özelliğe sahip oldukları görülmüştür. Bu araştırmalarda liken metabolitlerinin antiviral, antibakteriyal, antifungal, antitümöral, alerjen, bitki büyüme inhibitörü, antiherbivor ve enzim inhibitörü şeklinde aktivite gösterdiği görülmüştür (27).

Liken metabolitlerinden biri olan usnik asitle yapılan çalışmada usnik asitin antitümör aktivite gösterdiği görülmüştür. Usnik asit akciğer karsinomasına karşı aktivite göstermiştir. Usnik asitten daha aktif olan antitümör liken maddeleri o-asetillenmiş homo- D- glukanlardır. Yapılan çalışmalar liken polisakkaritinin (GE-3) bağışıklık sistemini uyardığını ve böylece antitümör aktivite gösterdiğini ortaya koymuştur (28).

Usnik asitin antihistaminik, spazmolitik ve antiviral özelliğe sahip olduğu da bulunmuştur (29).

Shibuya ve arkadaşları (1983) liken metabolitlerinden 4-o-metilkriptoklorofaeik asitin prostaglandinin sentezini inhibe edebildiğinden bu molekülün anti-inflamatuar ilaç olarak kullanılabileceğini ortaya koymuştur (25).

Benzer şekilde, liken metabolitlerinden giroforik asitin sedef hastalığında insan keratinositlerinin büyümesini inhibe edici özellikte olduğu görülmüştür (25).

1.3. Likenlerin Antibakteriyal Aktiviteleri

Kemoterapotiklerin başarısızlığa uğraması ve antibiyotiğe dirençli patojenik mikroorganizma enfeksiyonlarının artması, antimikrobiyal aktiviteleri açısından pek çok bitki sekonder metabolitinin araştırılmasına neden olmuştur (30). Bitkiler sahip oldukları fitokimyasallardan dolayı önemli birer araştırma kaynağı haline gelmişlerdir. Özellikle günümüzde yaygın hale gelen ve ciddi bir tehdit oluşturan çoklu antibiyotik direncine karşı, hastalıkların tedavisinde kullanılabilecek antibiyotik sayısı giderek azalmaktadır. Yapılan çalışmalarda bitkilerden elde edilen kimyasalların dirençli bakteriler üzerinde antibakteriyal aktivite göstermesi, bitkilerin bakteriler üzerinde sentetik antibiyotiklerden farklı bir etki mekanizması ile inhibisyon gerçekleştirdiği fikrini desteklemektedir (31).

Çalışma konumuzu oluşturan likenler antibakteriyal aktivitelerinden dolayı alternatif antibiyotik kaynakları olarak pek çok araştırmacının ilgisini çekmiştir.

Likenlerin antibakteriyal aktiviteleri ile ilgili dünya çapında pek çok araştırma yapılmıştır. Pek çok liken bileşiğinin *Mycobacterium* türlerine ve Gram pozitif bakterilere karşı etkili olduğu bulunmuştur. Örneğin, usnik asit Gram pozitif bakterilere karşı aktivite göstermiştir (32, 33). Günümüzde de usnik asit topikal antibakteriyal ajan olarak Avrupa’da kullanılmaktadır. Protolikesterinik asit *Helicobacter pylori*’ye karşı aktivite göstermiştir (34). Fournet ve arkadaşları (1997) liken bileşiklerinden usnik asit, pannarin ve l-kloropannarin gibi maddelerin aktivitelerini araştırılmış ve bu bileşiklerin *Leishmania* spp.’nin üç suşunun promastigot formlarına karşı aktivite gösterdiğini bulmuşlardır (35).

Yukarıda belirtildiği gibi usnik asit 1844’de ilk izolasyonundan bu yana en yoğun çalışılan ve ticari olarak üretilen liken metaboliti olmuştur. Saf usnik asit krem, diş macunu ürünlerinde aktif bileşen veya koruyucu madde olarak ilaç, parfümeri ve kozmetik endüstrisinde kullanılmaktadır. Ayrıca, usnik asit Gram (+) coccuslara, *Mycobacterium tuberculosis* (verem basili) ve *Corynebacterium diptheria* (difteri basili)’ye karşı etkilidir. Usnik asitin sodyum tuzlarının da *Staphylococcus*, *Streptococcus* ve *Mycobacterium*’a karşı kuvvetli bir antibiyotik etkiye sahip olduğu çalışmalarla ortaya çıkarılmıştır (29).

Usnik asit, enfeksiyonlu deri hastalıklarında hala merhem olarak kullanılmaktadır. Dış yaraların ve yanıkların tedavisinde ve tuberkülozla savaşmada usnik asitin penisilinli merhemlerden daha etkili olduğu bulunmuştur. Usnik asitin antibiyotik etkisi dinitrofenole benzer bir etki olan oksidatif fosforilasyonu inhibe etmesinden kaynaklanmaktadır (25).

Yapılan araştırmalar sonucunda *Cetraria islandica* likeninin musilajlı bir madde ihtiva ettiği görülmüştür. Bu liken ayrıca, B vitaminini, folik asit, fumarprotosetratik asit ve protolikesterinik asit taşımaktadır. Bu likenden hazırlanmış olan “Cetrarin” (Merck) adlı preparat, antibiyotikler yaygın şekilde kullanılıncaya kadar tuberküloz, kronik bronşit, dizanteri tedavisinde uzun yıllar önemini korumuştur. *C. islandica* likeninin antibiyotik aktivitesi üzerinde yapılan çalışmalarda drogunun *Sarcina lutea*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pyogenes* ve *Proteus vulgaris*’e ve *Mycobacterium tuberculosis*’e karşı aktif olduğu saptanmıştır. *Cetraria islandica* likeninin terapötik önemi içerdığı likenin ve izolikenin maddelerinden kaynaklanmaktadır (36).

Kloromisetin antibiyotiğinin bulucusu Burkholder Kuzeydoğu Amerika’da 52 farklı liken türünden elde ettiği özütlerin çeşitli bakteri tiplerinin büyümesini inhibe ettiklerini keşfetmiştir. Bu keşif likenlerden antibiyotik bulma yarışına yol açmış ve 10 senelik bir periyotta yüzlerce saflaştırılmış liken maddesi tüm dünya laboratuvarlarında test edilmiştir (37).

1.4. Likenlerin Antioksidan Aktiviteleri

Serbest radikaller vücutta gerçekleşen her işlemde doğal olarak meydana gelmektedir. Normalde vücuttaki doğal antioksidan savunma sistemleriyle ve bazı enzimlerle bu kararsız elektron yüklü kimyasallar büyük oranda yok edilmekte ya da uzaklaştırılmaktadır. Antioksidan savunma sistemi yeterince iyi çalışmıyorsa ve antioksidan gıdalar yeterli oranda yenilmiyorsa veya antioksidan özellikli desteklerden faydalanılmıyorsa serbest radikaller hücrelere zarar vererek birçok önemli rahatsızlığın başlangıcına zemin hazırlar ve de erken yaşlanmaya sebebiyet verir.

Serbest radikaller aynı zamanda hücrelerin genetik kodunu içinde taşıyan, hücrenin üretimini ve büyümesini sağlayan nükleik asitlere de (DNA) etki eder. Hücreler, genetik kodları değiştiğinde ölebilirler. Aşırı hücre ölümü erken yaşlanmaya yol açar. Kanser ve bazı hastalıkları destekleyen hücre dizinleri oluşur. Örneğin; güneş etkinliği ile artan serbest radikaller ciltteki yağı parçalar. DNA faaliyetine zarar vererek ciltteki kolajeni ve vücuttaki proteinleri sömürmeye başlar. Sonuçta kırışıklık ve cilt yaşlanması kaçınılmaz hale gelir (13).

Antioksidanlar serbest radikaller olarak isimlendirilen maddelere karşı etki gösterir. Bu maddeler bir elektrona ihtiyaç duyarlar ve bu yüzden de yüksek derecede reaktiftirler. Serbest radikaller, organizmalarda hücre membranındaki lipidler gibi önemli yapılardan ve organellerden elektron çalabilirler ve böylece elektronunu kaybetmiş komponent serbest radikal olarak davranacak ve zincirleme bir reaksiyon başlayacaktır. Bunun devamında organizmada redoks dengesi bozulacaktır. ROT ve metal iyonları gibi serbest radikallerin üretimi organizmanın antioksidanları tarafından engellenmezse “oksidatif stres” olarak isimlendirilen anormal durum ortaya çıkacak. Oksidatif stresin, hastalıkların büyük bir çoğunluğu ile ilişkili olduğu kabul edilmektedir. Bu patolojik koşullarda yaygın olarak rastlanan bir mekanizma, polidoymamış lipid peroksidasyonudur (yağ asitlerinin oksidasyona uğraması). İşte

bu gibi patolojik durumların ortaya çıkmaması için radikal süpürücüler, singlet oksijen süpürücüler gibi antioksidanlar devreye girer ve organizmayı korur (27).

Antioksidanlar serbest radikallerle reaksiyona girerek, onların hücrelere zarar vermelerini önler. Bu özellikleriyle hücrelerin anormalleşme ve sonuç olarak tümör oluşturma risklerini ve hücre yıkımını azaltarak daha sağlıklı bir yaşam sunarlar (38).

Çalışma konumuzu oluşturan likenler antioksidan aktivitelerinden dolayı pek çok araştırmacının ilgisini çekmiştir.

Kinoshita ve arkadaşları (2010) tarafından gerçekleştirilen ve *Lethariella sernanderi*, *Lethariella cashmeriana* ve *Lethariella sinensis* likenlerinden izole edilen sarı ve kırmızı pigmentlerin antioksidan aktivitelerinin incelenmesini amaçlayan çalışmada bu likenlerden elde edilen pigmentlerin antioksidan aktivite gösterdiği belirlenmiştir (39).

Benzer çalışmaların, ülkemizde de yapıldığı görülmektedir. *Lobaria pulmonaria* ve *Usnea longissima* liken türlerinin aseton ekstraktlarından izole edilen bazı maddelerin antioksidan aktivitelerinin incelendiği bir çalışmada, bu likenlerden elde edilen usnik asit ve difraktaik asit dışındaki diğer maddelerin değişik oranlarda antioksidan aktivite gösterdiği tespit edilmiştir (40).

1.5.Çalışmada Kullanılan Liken Türleri

1.5.1. *Roccella phycopsis*

Genellikle deniz kenarlarında, sahillerde rastlanılmaktadır. Geçmiş yüzyıllarda *Roccella* sp. Avrupa’da boya kaynağı olarak kullanılıyordu, sentetik boya kaynaklarının ortaya çıkması ile bu likenlerin boya kaynağı olarak kullanımına son verilmiştir (41). Bu liken türlerinden elde edilen mavi boya İngiltere’de kullanılmıştır. *R. phycopsis* boyası alkolle beraber termometrelerde kullanılır (42). Ayrıca bu liken türlerinden litmus elde edilmektedir. Litmus kağıdı pH indikatörü olarak kullanılmaktadır. Mavi litmus kağıdı asidik ortamda kırmızıya dönüşürken, kırmızı litmus kağıdı ise bazik ortamda maviye dönüşür (43).



Şekil 1.1. *Roccella phycopsis* Ach. Likenin Doğal Ortamından Çekilmiş Fotoğrafi

1.5.2. *Flavoparmelia caperata*

Kabuksu bir liken türü olup yaprak döken ağaçların gövdelerinde ve dallarında yaygındır. *F. caperata* yeşil kalkan (Greenshield) olarak da adlandırılmaktadır.

Meksika’da bu liken türü kurutulup ufalanarak yanıklarda pudra olarak kullanılmaktadır. Ayrıca *F. caperata* likeni Man adasında yünlerin kahverengi, portakal rengi ve sarı renge boyanmasında kullanılmıştır (42).

F. caperata likeni atmosferik kirliliğin belirlenmesinde biyo-indikatör olarak kullanılmaktadır (44,45). Ayrıca bu liken ateşli hastalıkların ve ağrıların tedavisinde de kullanılmaktadır (46).



Şekil 1.2. *Flavoparmelia caperata* L. (Hale) Likeninin Doğal Ortamından Çekilmiş Fotoğrafı

1.6. Çalışmanın Amacı

Bu çalışma, Giresun ilinden toplanan *F. caperata* ve *R. phycopsis* likenlerinin etanol ve metanol ekstraktlarının antioksidan ve antibakteriyal aktivitelerini belirlemek üzere gerçekleştirilmiştir.

2. MATERYAL VE METOT

2.1. Kullanılan Kimyasal Maddeler

Deneysel çalışmalarda kullanılan kimyasal maddeler şunlardır:

Sigma Aldrich; 2,2-difenil-1-pikrilhidrazil (DPPH), Gallik asit, Kateşin, Alüminyum klorid hidrat, Bütillenmiş hidroksitoluen (BHT), Trolox, L- askorbik asit (C vitamini), Rutin hidrat, Ferrozin (3-(2-piridil)-5,6-bis(4-fenil-sülfonik asit)-1,2,4-triazin), Potasyum ferrisiyanid (III), 2,2'-Azino-bis(3-etilbenzenothiazoline-6-sülfonik asit (ABTS), Potasyum persülfat, Demir (II) klorür, 2-tiyobarbitürik asit (TBA), Etanol, Metanol, Demir (III) klorür, Etilen Diamin Tetra Asetik Asit (EDTA).

Merck; Trikloroasetik asit (TCA), Müller Hinton Agar (MHA), Müller Hinton Broth (MHB), Dimetil sülfoksit (DMSO), Hidrojen peroksit (d=1,1 g/ml, %35), Folin Ciocalteu reagent.

MP Biomedicals, LLC; Linoleik asit.

2.2. Kullanılan Cihazlar

Öğütücü	Sinbo
Buzdolabı	Beko
Destile Su Cihazı	GFL, 2001/4
Etüv	Nüve FN500
pH Metre	Hanna Instruments, HI 221
Santrifüj Cihazı	Hermle, Z206 A
UV-VIS Spektrofotometre	Shimadzu UV mini-1240
Çalkalayıcı Su Banyosu	Nüve ST 402
Vorteks	Velp Scientifica
Steril kabin	ESCO, Class II, Type A2
Otomatik pipetler	Gilson ve Dragon Med pipetleri
Magnetik karıştırıcı	Velp Scientifica
Sokslet cihazı	Velp Scientifica Ser 148- TETRA

2.3. *Roccella phycopsis* ve *Flavoparmelia caperata* Likenlerinin Toplanması ve Teşhisi

Bu çalışma kapsamında kullanılan *F. caperata* liken örnekleri 14-15 Ekim 2011 tarihleri arasında, Giresun ili, Bulancak ilçesi Ahmetli köyünden, *R. phycopsis* türleri ise 24-25 Eylül tarihinde Giresun merkez sınırlarında yer alan Gedikkaya tepesinden toplanmıştır. Toplanan örnekler çeşitli flora kitaplarına göre teşhis edilmiştir (47, 48, 49). Liken örneklerinin birer örneği Giresun Üniversitesi-Fen Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü Herbaryumunda depolanmıştır.

2.4. Çalışmada Kullanılan Bakteriler

Antibakteriyal aktivite çalışmasında kullanılan bakterilerden *Enterococcus faecium* (lab izolatu), *Staphylococcus calmii* (lab izolatu), *Proteus mirabilis* (lab izolatu), *Bacillus megaterium* (lab izolatu), *Acinetobacter baumannii* (lab izolatu), *Erwinia amylovora* (lab izolatu), *Gordonia rubripertincta* (lab izolatu), *Proteus vulgaris* ATCC 7829, *Yersinia enterocolitica* ATCC 27729 ve *Klebsiella pneumoniae* ATCC 13385 Yeditepe Üniversitesi Genetik ve Biyomühendislik Bölümünden, *Listeria monocytogenes* ATCC 7644, *Salmonella enterica* serovar *typhimurium* ATCC 14028 ve *Staphylococcus aureus* subsp. *aureus* ATCC 25923 Giresun İl Kontrol Laboratuvarından, *Escherichia coli* ATCC 35218 Giresun Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümünden ve *Yersinia pseudotuberculosis* ATCC 911, *Enterococcus faecalis* ATCC 29212 ve *Bacillus cereus* 702 ROMA Rize Üniversitesi Moleküler Biyoloji Anabilim Dalından temin edilmiştir.

2.5. Liken Ekstraktlarının Hazırlanması

2.5.1. Etanolik Liken Ekstraktlarının Hazırlanması

Toplanan liken örnekleri laboratuarda oda sıcaklığında 48 saat kurutulduktan sonra öğütücü yardımıyla toz haline getirildi. 48 g toz liken örneği 480 ml etanol içerisinde Soxhlet cihazına yerleştirilerek 7 saat ekstraksiyona tabi tutulmuştur. Ekstraktlar Whatman (No:1) filtre kağıdıyla filtre edildikten sonra 40 °C’de döner buharlaştırıcıda çözücüsü uçurulana dek bekletildi. Katı liken ekstraktı ileri testler için derin dondurucuda -20 °C’de bekletildi (50). Aynı işlem her iki liken türü için de ayrı ayrı uygulandı.

2.5.2. Metanolik Liken Ekstraktlarının Hazırlanması

Toplanan liken örnekleri yukarıda belirtildiği gibi yine laboratuarda oda sıcaklığında 48 saat kurutulduktan sonra öğütücü yardımıyla toz haline getirildi. 48 g toz liken örneği 480 ml metanol içerisinde Soxhlet cihazına yerleştirilerek 7 saat ekstraksiyona tabi tutulmuştur. Ekstraktlar Whatman (No:1) filtre kağıdıyla filtre edildikten sonra 40 °C’de döner buharlaştırıcıda çözücüsü uçurulana dek bekletildi. Katı liken ekstraktı sonraki testler için derin dondurucuda -20 °C’de bekletildi (50). Aynı işlem her iki liken türü için de ayrı ayrı uygulanmıştır.

2.6. Ekstraktların Yüzde Verimlerinin Hesaplanması

Evapore edilerek kurutulmuş ekstraktların verimi (kuru ağırlık bazında) aşağıdaki eşitlik kullanılarak hesaplanmıştır.

$$\% \text{ Verim} = (W_1 \times 100) / W_2$$

Formülde W_1 ekstraksiyonda kullanılan çözücü uçurulduktan sonra geriye kalan katı liken ekstraktının ağırlığı W_2 ise ekstraksiyonda kullanılacak likenin toz haldeki ağırlığını göstermektedir.

2.7. Liken Ekstraktlarının Antibakteriyal Aktivitelerinin Belirlenmesi

2.7.1. Disk Difüzyon Yöntemiyle Antibakteriyal Aktivitenin Belirlenmesi

R. phycopsis ve *F. caperata* likenlerinin etanol ve metanol ekstraktları, etanol ile 30 mg/mL konsantrasyonunda olacak şekilde çözüldükten sonra 0.45 µM çapındaki filtrelerden geçirilerek steril edildi (51). Disk difüzyon yöntemi ile liken ekstraktları çalışma bakterileri üzerinde denendi. MHB içerisinde test mikroorganizmalarının gece kültürleri hazırlandı. Gece kültüründen 10^8 CFU/mL bakteri içeren (10^8 CFU/mL bakteri yoğunluğu 0.5 McFarland standard konsantrasyonuna göre spektrometrede ölçüldü) 300 µL süspansiyon MHA üzerine yayıldı. MHA üzerine 5 mm çapındaki steril diskler bırakıldı. Petri üzerindeki disklerle sırayla 20’şer µL *R. phycopsis* etanol ekstraktı, *R. phycopsis* metanol ekstraktı, *F. caperata* etanol ekstraktı, *F. caperata* metanol ekstraktı, yalnızca etanol (negatif kontrol) ve standart antibiyotik diskleri (pozitif kontrol) ilave edildi. Petriler 2 saat buzdolabında bekletildikten sonra 37 °C’de 24 saat inkübe edildi. İnhibisyon zonları milimetrik olarak ölçüldü. Tüm testler iki tekrarlı olarak yürütüldü (52).

2.7.2. Minimal İnhibisyon Konsantrasyonu (MİK) Değerlerinin Belirlenmesi

Çalışmada likenlerin etanol ve metanol ekstraktlarının disk difüzyon yönteminde aktivite belirlenen suşlar üzerine MİK değerleri Yiğit ve arkadaşları (2009) tarafından uygulanan yöntemle göre belirlendi (53).

Etanol ve metanol ekstraktlarının 30000 µg/mL'lık konsantrasyonu steril bir şekilde hazırlandı. Steril tüplerin herbirine 950 µL MHB ve 50 µL bakteri süspansiyonu (10^8 CFU/mL) konuldu. 30000 µg/mL konsantrasyon içeren ekstraktlardan birinci tüpe 1000 µL eklenerek 13. tüpe kadar 1000'er µL aktararak seri dilüsyonlar elde edildi (7.3-30000 µg/mL). Diğer tüplere kontrol amaçlı sadece MHB kondu. Tüpler 37 °C'de 24 saat inkübe edildikten sonra MİK değerleri kaydedildi. MİK deneyi sonunda, MİK değerinin belirlendiği tüplerden alınan 200 µL MHA içeren bir petri üzerine yayılarak MİK değerinin bakteriyosidal ya da bakteriyostatik olduğu belirlendi.

2.8. Liken Ekstraktlarının Antioksidan Aktivitelerinin Belirlenmesi

Liken ekstraktlarının antioksidan aktivitelerinin belirlenebilmesi için çok sayıda yöntem bulunmaktadır. Bu yöntemlerden yalnızca birinin uygulanması ile bitki ekstraktının olası antioksidan aktivitesi belirlenememektedir. Çünkü sadece bir yöntem antioksidan aktivite gösteren bir maddenin tüm olası etki mekanizmalarını belirlemek için yeterli değildir. Bu doğrultuda *R. phycopsis* ve *F. caperata* likenlerinden elde edilen metanol ve etanol ekstraktlarının antioksidan aktivitesi DPPH[•] radikali süpürme aktivitesi, toplam fenolik içeriğinin belirlenmesi, toplam flavanoid içeriğinin belirlenmesi, indirgeyici güç, ABTS^{•+} radikali süpürme aktivitesi, metal şelatlama aktivitesi, TBA testi yöntemleri ile belirlendi (54).

2.8.1. DPPH[•] Radikali Süpürme Aktivitesi

Liken ekstraktlarının ve standard antioksidan maddelerin serbest radikal giderme aktivitesi Brand-Williams ve arkadaşlarının (2006) yöntemine göre belirlendi (55).

20 µg/mL DPPH çözeltisi metanolde çözülerek günlük hazırlandı. Bu çözeltiden 1.5 mL alınarak üzerine farklı konsantrasyonlarda (250-1000 µg/mL) hazırlanan bitki ekstraktlarından 0.75 mL ilave edildi. 30 dakika sonra absorbans değeri spektrofotometrede 517 nm'de ölçüldü. Kontrol olarak 0.75 mL metanol ve 1.5 mL DPPH çözeltisi kullanıldı. Standart antioksidan madde olarak BHT, Askorbik

asit ve Trolox çözeltileri (250-1000 µg/mL) kullanıldı. Testler üç tekrarlı yürütüldü. DPPH· radikal giderme aktivitesi aşağıdaki formül yardımı ile hesaplandı:

$$\text{DPPH}^\cdot \text{ Radikal Giderme Aktivitesi (\%)} = [(A_0 - A_1) / A_0] \times 100$$

A₀: Kontrolün absorbans değeri

A₁: Örnek veya standardın absorbans değeri

2.8.2. İndirgeme Gücü

Çalışmada kullanılacak liken ekstraktlarının ve standart antioksidan maddelerin DMSO ile 250-1000 µg/mL konsantrasyonlarında çözeltileri hazırlandı. Standart olarak askorbik asit ve BHT kullanıldı. Liken ekstraktlarının ve standart antioksidan maddelerin çözeltilerinden 2.5 mL alınarak üzerine sırasıyla fosfat tamponu (0.2 M, pH: 6.6, 2.5 mL) ve potasyum hegzasiyano ferrat (III) çözeltisi (%1, 2.5 mL) ilave edildikten sonra karışım su banyosunda 50 °C'da 20 dk inkübe edildi. Ardından tüplere TCA (%10, 2.5 mL) çözeltisi eklenerek karışım 3000 rpm'de 10 dk santrifüj edildi. Çözeltinin üst fazından 2.5 mL alındı ve bunun üzerine de 2.5 mL destile su ve %0.1'lik 0.5 mL FeCl₃ çözeltisi ilave edildikten sonra 10 dk bekletildi. Spektrofotometrede 700 nm'de okundu. Körün hazırlanmasında 5 mL destile su ve 2.5 mL FeCl₃ çözeltisi kullanıldı (56). Testler üç tekrarlı yürütüldü. Karışım absorbansının artışı; liken ekstraktlarının ve standart antioksidan maddelerin indirgeme gücünün yüksek olduğunun göstergesidir.

2.8.3. Toplam Fenolik İçeriği

Ekstraktlardaki toplam fenolik bileşik miktarı Folin-Ciocalteu ayırıcı ile Slinkard ve Singleton'un geliştirdiği metoda göre tayin edildi (57). Çalışmada standart olarak gallik asit kullanıldı. Standart eğri çizmek için 1000 µg/mL konsantrasyonunda gallik asitin stok çözeltisi hazırlandı. Bu stok çözeltilerden 20, 40, 60, 80 ve 100 µg/mL'lik çözeltiler hazırlandı. Tüplere 0.1 mL standart çözeltilerden ilave edildi. Daha sonra tüplere sıra ile 4.5 mL distile su ve 0.1 mL Folin-Ciocalteu (Folin C) reaktifi ilave edildi. 3 dakika sonra %2'lik Na₂CO₃ çözeltisinden 0.3 mL ilave edildi. Tüpler vortekste karıştırıldı ve karışım 2 saat boyunca karanlıkta oda sıcaklığında bekletildi. Standardın ve numunelerin absorbansı 760 nm'de köre karşı okundu. Numuneler ve kör benzer şekilde hazırlandı. Testler üç tekrarlı yürütüldü.

Toplam fenolik miktarı gallik asitin standart olarak kullanıldığı standart grafik denkleminde $\mu\text{g/mL}$ gallik asit ekivalenti olarak hesaplandı.

2.8.4. Toplam Flavonoid İçeriği

Liken ekstraktlarında bulunan toplam flavanoid içeriği Zhishen ve arkadaşlarının metoduna göre belirlendi (58). Çalışmada standart olarak kateşin kullanıldı. Standart eğri çizmek için 20, 40, 60, 80 ve 100 $\mu\text{g/mL}$ konsantrasyonunda kateşin çözeltileri hazırlandı. Standart antioksidan maddelerin ve liken ekstraktlarının (250-1000 $\mu\text{g/mL}$) hazırlanan çözeltilerinden (0.25 mL) alınarak üzerlerine destile su (1.25 mL) ve NaNO_2 (%5.0, 75 μL) ilave edilerek iyice karıştırıldı ve 6 dakika oda sıcaklığında bekletildi. 6 dk sonra tüplere $\text{AlCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (%10.0, 150 μL) çözeltisi ilave edilerek tekrar 5 dk bekletildi. 5 dakika sonra NaOH (1.0 M, 0.5 mL) eklendi. Karışıma 275 μL destile su ilave edilip iyice karıştırıldı ve karışım 510 nm’de spektrofotometrede ölçüldü. Testler üç tekrarlı yürütüldü. Toplam flavonoid miktarı kateşinin standart olarak kullanıldığı standart grafik denkleminde $\mu\text{g/mL}$ kateşin ekivalent olarak hesaplandı.

2.8.5. Metal Şelatlama Aktivitesi

Liken ekstraktlarının ve standart antioksidan maddelerin metal-şelat aktivitesi Dinis ve arkadaşlarının metoduna göre yapıldı (59). Çalışmada kullanılacak liken ekstraktlarının ve standart antioksidan maddelerin 1 mg/mL konsantrasyonunda DMSO ile stok çözeltileri hazırlandı. Bu stok çözeltilerden 250, 500, 750 ve 1000 $\mu\text{g/mL}$ ’lik çözeltiler hazırlandı. Liken ekstraktlarından ya da standart antioksidan maddelerden 5.0 mL alınarak üzerlerine 2 mM, 0.1 mL FeCl_2 ilave edilerek karışım 30 dk bekletildi. Sonrasında karışıma 5 mM, 0.2 mL ferrozin eklenip iyice karıştırıldı. 10 dk daha oda sıcaklığında bekletildikten sonra karışımın absorbansı köre karşı 562 nm’de ölçüldü. Standart antioksidan madde olarak EDTA kullanıldı. Testler üç tekrarlı yürütüldü. Absorbans değerindeki azalma; liken ekstraktının ya da standart antioksidan maddenin metal şelat aktivitesinin yüksekliğini gösterir.

Liken ekstraktlarının ya da standart antioksidan maddelerin metal-şelat aktivitesi aşağıdaki formülle hesaplandı.

% Aktivite: $[(A_0 - A_1) / A_0] \times 100$

A_0 : 562 nm’de kontrolün absorbansı

A_1 : 562 nm’de ekstraktın ya da standardın absorbansı

2.8.6. ABTS^{•+} Radikali Süpürme Aktivitesi

ABTS^{•+} radikali süpürme aktivitesi Arnao ve arkadaşlarının yöntemine göre belirlendi (60). 1 mL destile suda 7.4 mM ABTS çözüldü. Üzerine 2.6 mM K₂S₂O₈’den 1 mL ilave edilerek karıştırıldı ve 12-16 saat karanlıkta bekletildi. Daha sonra bu karışımın üzerine 60 mL metanol ilave edildi. Bu çözeltinin 734 nm’de spektrofotometrede absorbansı metanole karşı okundu. ABTS^{•+} radikal katyonunun 734 nm’deki absorbansı 0.700±0.02 dir (61). Her deney için bu karışım günlük olarak hazırlandı. Hazırlanan metanollü ABTS çözeltisinden 2.850 mL alındı. Üzerine 150 µL bitki ekstraktı (250-1000 µg/mL) konuldu. 2 saat karanlıkta bekletildi. Spektrofotometrede 734 nm’de absorbans değeri okundu. Standart olarak BHT, Rutin ve Askorbik asit (250-1000 µg/mL) kullanıldı. Kontrol olarak numune yerine metanol içeren reaksiyon karışımı kullanıldı. ABTS^{•+} radikal giderme aktivitesi (%) aşağıdaki formül yardımıyla hesaplandı.

ABTS^{•+} radikal giderme aktivitesi (%) = $[(A_0 - A_1) / A_0] \times 100$

A_0 : Kontrolün absorbans değeri

A_1 : Örnek ve standardın absorbans değeri

2.8.7. Tiyobarbitürik Asit Testi

Liken ekstraktları ve standart antioksidan maddeler kullanılarak hazırlanan çözeltilerden 0.5 mL alınarak üzerlerine linoleik asit emülsiyonu (% 99.5 etanolde hazırlanan) (%2.51, 4.1 mL), fosfat tamponu (HPO₄²⁻/H₂PO₄⁻) (0.02 M, pH=7.0, 2.5 mL) ve deiyonize su (3.9 mL) eklenerek 37 °C’de kapalı su banyosunda inkübasyon yapıldı (62). Liken ekstraktları ve standart antioksidan maddelerin TBA testi Kikuzaki & Nakatani yöntemine göre belirlendi (63). Yukarıda inkübe edilen örnek çözeltisinden 1 mL örnek alınarak üzerine 2 mL TCA ve 2 mL TBA çözeltileri eklendi. Karışım 100 °C su banyosunda 10 dk bekletildi. Soğuması beklendikten sonra, 3000 rpm’de 25 dk santrifüj edildi. Süpernatantın absorbansı 532 nm’de ölçüldü. Standart antioksidan madde olarak BHT ve Askorbik asit kullanıldı. Testler üç tekrarlı yürütüldü.

% inhibisyon: $[(A_0 - A_1 / A_0) \times 100]$

A₀: 532 nm’de kontrolün absorbansı

A₁: 532 nm’de ekstraktın absorbansı

2.8.8. İstatistiksel Analiz

Liken ekstraktlarının antioksidan aktivite araştırmaları üç tekrarlı yapılmış olup istatistiksel analizler SPSS 16.0 (SPSS Inc, Chicago, USA) istatistiksel analiz programı kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Elde edilen verilerin değerlendirilmesinde “Varyans analizi (ANOVA) ve Duncan testleri” kullanılmıştır. Örneklere ait verilerin karşılaştırılması sonucunda elde edilen P değerleri 0.05’ten küçük olduğunda (P<0.05) istatistiksel açıdan önemli olarak kabul edilmiştir.

3. ARAŞTIRMA BULGULARI VE TARTIŞMA

Liken ekstraktlarının antibakteriyal aktiviteleri disk difüzyon yöntemi ve MİK yöntemleriyle belirlendi. Liken ekstraktlarının antioksidan aktiviteleri ise DPPH[•] radikali süpürme aktivitesi, indirgeme gücü, toplam fenolik içeriği, toplam flavonoid içeriği, ABTS^{•+} radikali süpürme aktivitesi, metal şelatlama aktivitesi, TBA testi yöntemleri kullanılarak belirlenmiştir.

3.1. Liken Ekstraktlarının Yüzde Verimleri

Bitkilerden ekstrakte edilebilen bileşiklerin ekstraksiyon verimleri Tablo 3.1’de görülmektedir. Tabloda görüldüğü gibi en yüksek ekstraksiyon verimi metanol ekstraksiyonlarına aittir.

Tablo 3.1. Liken ekstraktlarının yüzde verimleri

Liken	Ekstrakt	Ekstrakt verimi (%)
<i>R. phycopsis</i>	Etanol	%16.28
<i>R. phycopsis</i>	Metanol	%19.38
<i>F. caperata</i>	Etanol	%12.34
<i>F. caperata</i>	Metanol	%14.65

3.2. Liken Ekstraktlarının Antibakteriyal Aktiviteleri

3.2.1. Disk Difüzyon Deneyi

Çalışmamızda *R. phycopsis* ve *F. caperata* likenlerinin etanol ve metanol ekstraktlarının antibakteriyal aktiviteleri, disk difüzyon yöntemi kullanılarak *Enterococcus faecium* (lab izolatu), *Bacillus megaterium* (lab izolatu), *S. aureus* subsp. *aureus* ATCC 25923, *Gordonia rubripertincta* (lab izolatu), *Staphylococcus cohnii* (lab izolatu), *Bacillus cereus* 702 ROMA, *Enterococcus faecalis* ATCC 29212, *Acinetobacter baumannii* (lab izolatu), *Proteus mirabilis* (lab izolatu), *Erwinia amylovora* (lab izolatu), *Escherichia coli* ATCC 35218, *Salmonella enterica* serovar *typhimurium* ATCC 14028, *Yersinia pseudotuberculosis* ATCC 911, *Proteus vulgaris* ATCC 7829, *Yersinia enterocolitica* ATCC 27729 ve *Klebsiella pneumoniae* ATCC 13385 bakterileri ile belirlendi. *F. caperata* ve *R. phycopsis* likenlerinin etanol ve metanol ekstraktlarının antibakteriyal aktivitelerini belirlemek amacıyla yaptığımız

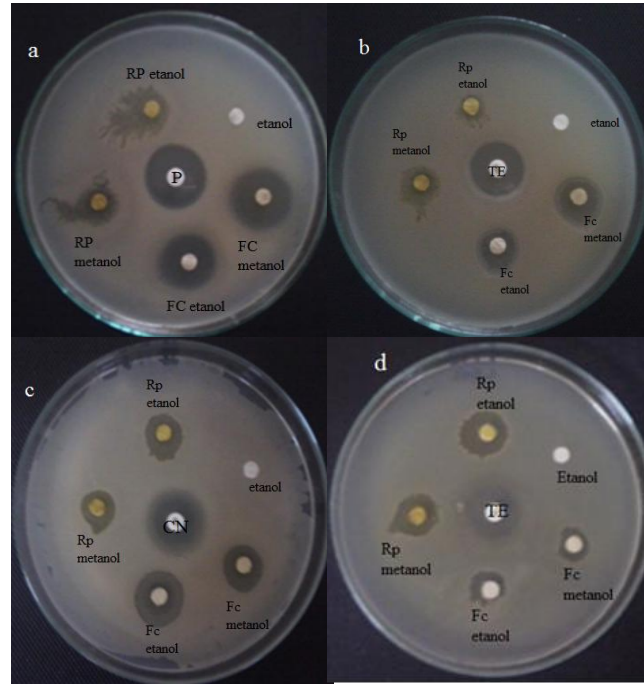
Çalışmanın sonuçları Tablo 3.2’de gösterilmiştir. Ayrıca, Şekil 3.1’de liken ekstraktlarının *Acinetobacter baumannii* (a), *Bacillus megaterium* (b), *Erwinia amylovora* (c) ve *Escherichia coli* (d) üzerine; Şekil 3.2’de liken ekstraktlarının *Enterococcus faecium* (e), *Gordonia rubripertincta* (f), *Proteus mirabilis* (g) ve *Staphylococcus cohnii* (h); Şekil 3.3’de liken ekstraktlarının *Salmonella enterica serovar typhimurium* (ı), *Yersinia pseudotuberculosis* (j), *Enterococcus faecalis* (k) ve *Bacillus cereus* (l) üzerine; Şekil 3.4’de liken ekstraktlarının *Yersinia enterocolitica* (m), *Proteus vulgaris* (n), *Klebsiella pneumoniae* (o) ve *Staphylococcus aureus* subsp. *aureus* (p) üzerine antibakteriyal aktiviteleri görölmektedir.

Ekstraktların oluşturdukları zon çapları 14 mm’den küçük ise mikroorganizma dirençli, 14-17 mm arasında ise az duyarlı, 17 mm’den büyük ise duyarlı olarak kabul edilmiştir (64).

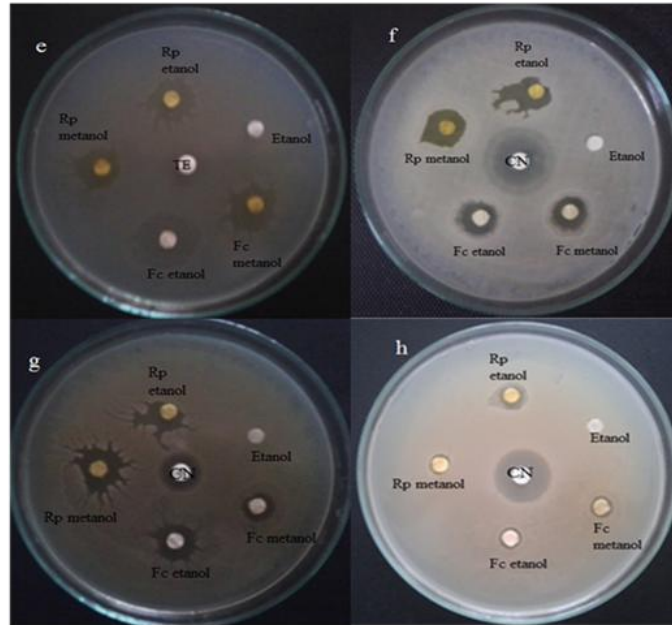
Tablo 3.2. Liken ekstraktlarının inhibisyon zonları (mm)

Mikroorganizmalar		İnhibisyon zonları *							
		<i>R. phycopsis</i> etanol	<i>R. phycopsis</i> metanol	<i>F. caperata</i> etanol	<i>F. caperata</i> metanol	Etanol	CN10	P10	TE30
Gram pozitif bakteriler	<i>E. faecium</i>	17.5	15	21.5	18	-	D	23	D
	<i>B. megaterium</i>	6	14.5	17	17.5	-	D	D	16
	<i>S. aureus</i> subsp. <i>aureus</i>	17	17	17	18	-	D	D	20
	<i>G. rubripertincta</i>	14	18	14	15	-	16	D	D
	<i>S. cohnii</i>	9.5	8	9	9	-	14	D	D
	<i>B. cereus</i>	13.5	17.5	22.5	24.5	-	16	D	D
	<i>E. faecalis</i>	10.5	17	14	17.5	-	D	D	20
Gram negatif bakteriler	<i>A. baumannii</i>	15	14.5	21.5	21.5	-	25	D	D
	<i>P. mirabilis</i>	14.5	17	14	11.5	-	21	D	D
	<i>E. amylovora</i>	17	13	18	17	-	18	D	D
	<i>E. coli</i>	17.5	18	13.5	12	-	19	D	D
	<i>S. enterica</i> serovar <i>typhimurium</i>	11.5	10	8	8.5	-	17	D	D
	<i>Y. pseudotuberculosis</i>	7.5	15	12	9.5	-	D	D	10
	<i>P. vulgaris</i>	26	18	11	13.5	-	22	D	D
	<i>Y. enterocolitica</i>	24	18	15	15	-	D	D	22
	<i>K. pneumoniae</i>	13	16	14	15	-	22	D	D

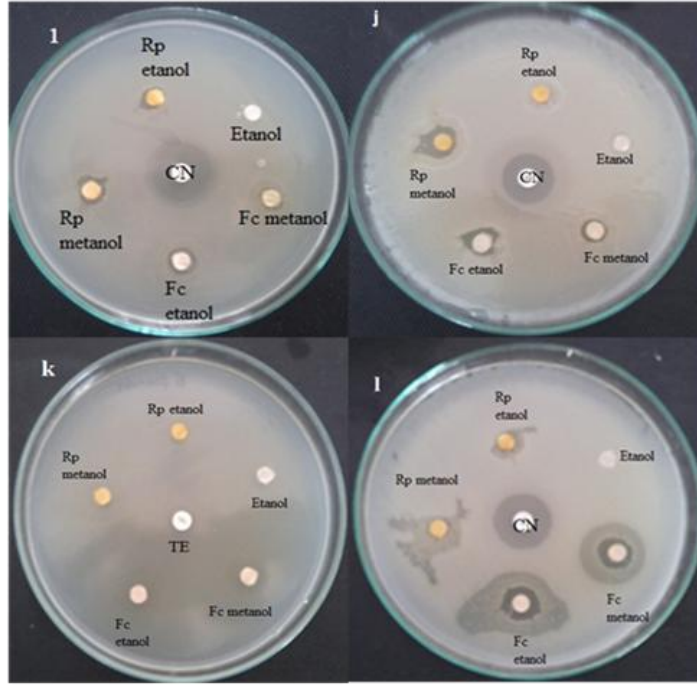
(-): Zon yok. D: Denenmedi, P10: Penisillin 10 µg/mL, TE30: Tetrasiklin 30 µg/mL, CN10: Gentamisin 10 µg/mL



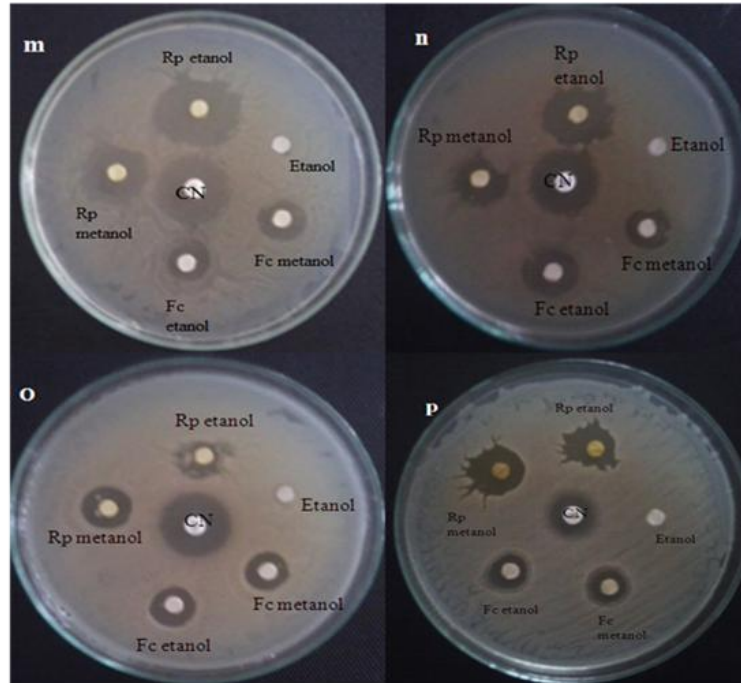
Şekil 3.1. Liken ekstraktlarının *Acinetobacter baumannii* (a), *Bacillus megaterium* (b), *Erwinia amylovora* (c) ve *Escherichia coli* (d) üzerine antimikrobiyal aktiviteleri.



Şekil 3.2. Liken ekstraktlarının *Enterococcus faecium* (e), *Gordonia rubripertincta* (f), *Proteus mirabilis* (g) ve *Staphylococcus cohnii* (h) üzerine antimikrobiyal aktiviteleri.



Şekil 3.3. Liken ekstraktlarının *Salmonella enterica* serovar *typhimurium* (i), *Yersinia pseudotuberculosis* (j), *Enterococcus faecalis* (k) ve *Bacillus cereus* (l) üzerine antimikrobiyal aktiviteleri.



Şekil 3.4. Liken ekstraktlarının *Yersinia enterocolitica* (m), *Proteus vulgaris* (n), *Klebsiella pneumoniae* (o) ve *Staphylococcus aureus* subsp. *aureus* (p) üzerine antimikrobiyal aktiviteleri.

3.2.2. MİK Deneyi

MİK değeri, mikroorganizmaların üremesini inhibe eden, minimum madde konsantrasyonudur. Minimum inhibe edici konsantrasyon değerleri değişik konsantrasyonlardaki (7.3-30000 µg/mL) ilave edilmiş sıvı besiyerinde bakteri çoğalmasının göstergesi olan bulanıklılığa bakılarak belirlenmiştir. *F. caperata* ve *R. phycopsis* likenlerinin metanol ve etanol ekstraktlarının her bir mikroorganizmaya karşı gösterdiği MİK değerleri Tablo 3.3’de verilmiştir.

MİK değeri belirlenen ekstraktlarda MİK değerinin çalışılan bakteri üzerinde bakteri büyümesini durduran (bakteriyostatik) ya da bakteri büyümesini inhibe eden (bakteriyosidal) etki gösterip göstermediği de incelenmiş, sonuçlar Tablo 3.4’de verilmiştir. Tablo 3.4 incelendiğinde liken ekstraktlarının çoğunun çalışılan organizmalar üzerinde bakteriyostatik etki gösterdiği görülmektedir.

Tablo 3.3. Liken ekstraktlarının MİK değerleri

Mikroorganizmalar		MİK değerleri (µg/mL)			
		<i>R. phycopsis</i> etanol	<i>R. phycopsis</i> metanol	<i>F. caperata</i> etanol	<i>F. caperata</i> metanol
Gram pozitif bakteriler	<i>E. faecium</i>	937	1875	117	234
	<i>B. megaterium</i>	7500	1875	234	234
	<i>S. aureus</i> subsp. <i>aureus</i>	1875	3750	937	937
	<i>G. rubripertincta</i>	3750	1875	468	937
	<i>S. cohnii</i>	---	---	---	---
	<i>B. cereus</i>	---	937	117	58
	<i>E. faecalis</i>	---	3750	937	234
Gram negatif bakteriler	<i>A. baumannii</i>	1875	937	234	234
	<i>P. mirabilis</i>	7500	3750	7500	1875
	<i>E. amylovora</i>	3750	---	117	234
	<i>E. coli</i>	3750	7500	7500	---
	<i>S. enterica</i> serovar <i>typhimurium</i>	---	---	---	---
	<i>Y. pseudotuberculosis</i>	---	117	---	---
	<i>P. vulgaris</i>	3750	---	---	---
	<i>Y. enterocolitica</i>	1875	7500	3750	3750
	<i>K. pneumoniae</i>	---	1875	7500	7500

Tablo 3.4. Liken ekstraktlarının mikroorganizmalar üzerine bakteriyostatik-bakteriyosidal aktivitesi

Mikroorganizmalar		<i>R. phycopsis</i> etanol	<i>R. phycopsis</i> metanol	<i>F. caperata</i> etanol	<i>F. caperata</i> metanol
Gram pozitif bakteriler	<i>E. faecium</i>	Bakteriyosidal	Bakteriyosidal	Bakteriyostatik	Bakteriyosidal
	<i>B. megaterium</i>	---	Bakteriyostatik	Bakteriyostatik	Bakteriyostatik
	<i>S. aureus</i> subsp. <i>aureus</i>	Bakteriyosidal	Bakteriyosidal	Bakteriyostatik	Bakteriyostatik
	<i>G. rubripertincta</i>	Bakteriyosidal	Bakteriyostatik	Bakteriyostatik	Bakteriyostatik
	<i>S. cohnii</i>	---	---	---	---
	<i>B. cereus</i>	---	Bakteriyostatik	Bakteriyostatik	Bakteriyostatik
	<i>E. faecalis</i>	---	Bakteriyostatik	Bakteriyostatik	Bakteriyostatik
Gram negatif bakteriler	<i>A. baumannii</i>	Bakteriyostatik	Bakteriyostatik	Bakteriyostatik	Bakteriyostatik
	<i>P. mirabilis</i>	Bakteriyostatik	Bakteriyostatik	Bakteriyostatik	Bakteriyostatik
	<i>E. amylovora</i>	Bakteriyostatik	---	Bakteriyosidal	Bakteriyosidal
	<i>E. coli</i>	Bakteriyostatik	Bakteriyosidal	Bakteriyostatik	---
	<i>S. enterica</i> serovar <i>typhimurium</i>	---	---	---	---
	<i>Y.pseudotuberculosis</i>	---	Bakteriyostatik	---	---
	<i>P. vulgaris</i>	Bakteriyostatik	---	---	---
	<i>Y. enterocolitica</i>	Bakteriyostatik	Bakteriyostatik	Bakteriyostatik	Bakteriyostatik
	<i>K. pneumoniae</i>	---	Bakteriyostatik	Bakteriyosidal	Bakteriyosidal

Antimikrobiyal aktivite araştırmalarında çok çeşitli test yöntemlerinin ve test mikroorganizmalarının kullanılmakta olduğu ve kullanılan bu yöntemler arasında en uygun ve güvenilir olanının disk difüzyon metodu olduğu bildirilmiştir (65).

F. caperata ve *R. phycopsis* likenlerinin etanol ve metanol ekstraktlarının test mikroorganizmalarına karşı 14-26 mm arasında değişen büyüklüklerde zon çapları oluşturduğu ve bazı ekstraktların kontrol grubu olarak kullanılan antibiyotiklere kıyasla daha büyük zonlar oluşturduğu gözlemlenmiştir. Bu durum, çalışılan bazı ekstraktların kontrol olarak kullanılan antibiyotiklerden daha etkili olduğu sonucunu göstermektedir.

Çalışmalarda kullanılan liken türlerinin antimikrobiyal spektrumuna bakıldığında hem Gram pozitif hem de Gram negatif bakterilere karşı potansiyel bir aktivite oluşturduğu gözlenmektedir. Dolayısı ile hücre zarf özelliğine göre likenlerin etkinliğinde bir fark görülmemektedir.

Çalışılan liken ekstraktlarına en dirençli bakteri *B. megaterium* iken, en duyarlı bakteri *P. vulgaris* olarak saptanmıştır.

R. phycopsis etanol ekstraktı *B. megaterium*, *S. cohnii*, *B. cereus*, *E. faecalis*, *S. enterica* serovar *typhimurium*, *Y. pseudotuberculosis* ve *K. pneumoniae* bakterileri üzerinde, *R. phycopsis* metanol ekstraktı *S. cohnii*, *E. amylovora*, *S. enterica* serovar *typhimurium* ve *P. vulgaris* bakterileri üzerinde, *F. caperata* etanol ekstraktı *S. cohnii*, *S. enterica* serovar *typhimurium*, *Y. pseudotuberculosis* ve *P. vulgaris* bakterileri üzerinde, *F. caperata* metanol ekstraktı *S. cohnii*, *E. coli*, *S. enterica* serovar *typhimurium*, *Y. pseudotuberculosis* ve *P. vulgaris* bakterileri üzerinde antibakteriyal aktivite göstermemiştir.

F. caperata likeninin etanol ve metanol ekstraktları *E. faecium*, *B. megaterium*, *B. cereus*, *E. faecalis*, *A. baumannii* ve *E. amylovora* bakterilerine karşı *R. phycopsis* likeni etanol ve metanol ekstraktlarından daha yüksek aktivite gösterirken, *R. phycopsis* etanol ve metanol ekstraktları *P. mirabilis*, *E. coli*, *P. vulgaris* ve *Y. enterocolitica* bakterilerine karşı *F. caperata* etanol ve metanol ekstraktlarından daha yüksek aktivite sergilemiştir.

Ayrıca, *R. phycopsis* likeninin etanol ekstraktı *P. vulgaris*'e karşı, *R. phycopsis* likeninin metanol ekstraktı *E. faecalis*'e karşı, *F. caperata* likeninin etanol ekstraktı *E. faecium*'a karşı, *F. caperata* likeninin metanol ekstraktı *B. cereus*'a ve *E.*

faecalis'e karşı mukayese antibiyotiklerine kıyasla çok daha büyük zonlar oluşturmuştur.

Çözücü olarak kullanılan etanolün test bakterileri üzerinde antimikrobiyal aktivitesi yoktur.

R. phycopsis ve *F. caperata* likenlerinin etanol ve metanol ekstraktları denenilen tüm bakteri suşlarında etkili olmuş, *R. phycopsis* için MİK değeri 117-15000 µg/mL arasında değişirken, *F. caperata* için MİK değeri 14-7500 µg/mL arasında değişmektedir.

Tablo 3.4'de *R. phycopsis* ve *F. caperata* likenlerinin etanol ve metanol ekstraktlarının genel olarak bakteriyostatik etkili antimikrobiyal aktivite gösterdiği görülmektedir.

Mitroviç ve arkadaşları (2011) tarafından yürütülen bir çalışmada *F. caperata* likeninin metanol ekstraktının antimikrobiyal aktivitesi incelenmiş ve metanol ekstraktının *E. faecalis*'e 78.1 µg/mL, *B. cereus*'a 39.1 µg/mL, *S. aureus*'a 156 µg/mL, *E. coli*'e 10000 µg/mL, *P. mirabilis*'e 2500 µg/mL ve *S. enterica*'ya karşı 10000 µg/mL konsantrasyonlarında MİK değeri sergilediği saptanmıştır (66). Çalışmamızda ise MİK değerleri *E. faecalis* için 234 µg/mL, *B. cereus* için 58 µg/mL, *S. aureus* subsp. *aureus* için 937 µg/mL, *E. coli* için 3750 µg/mL, *P. mirabilis* için 1875 µg/mL ve *S. enterica* serovar *typhimurium* 3750 µg/mL olarak belirlenmiştir.

Duman (2009)'ın tarafından yapılan bir çalışmada da, *F. caperata* likeninin aseton ekstraktlarının aktivitesi incelenmiş ve aseton ekstraktlarının *S. aureus* ve *B. megaterium* bakterilerine karşı aktivite gösterdiği gözlenirken, *E.coli*, *E. faecalis*, *P. mirabilis*, *P. vulgaris* bakterilerine karşı aktivite gözlenmemiştir (11).

Çalışmamızda ise *F. caperata* likeninin metanol ekstraktı *E. coli* ve *P. vulgaris*'e karşı aktivite göstermezken, *E. faecalis*, *P. mirabilis*, *S. aureus* subsp. *aureus* ve *B. megaterium*'a karşı aktivite göstermiştir. Buradan da anlaşılabileceği gibi, çalışılan aynı iki liken türünün farklı iki ekstraktının antimikrobiyal aktivitesi farklı olabilmektedir.

De Haan ve arkadaşlarının tarafından gerçekleştirilen ve *Flavoparmelia rutidola* likeninin antimikrobiyal aktivitesinin incelendiği bir çalışmada, *F. rutidola* likeni test mikroorganizmalarının tümüne karşı güçlü bir antimikrobiyal aktivite sergilemiştir (67).

Yapılan literatür incelemelerinde *R. phycopsis* likeninin antimikrobiyal ve antioksidan aktivitesi ile ilgili herhangi bir çalışmaya rastlanmamıştır. Oysa *Roccella* cinsinin diğer türlerine ait ekstraktların antimikrobiyal ve antioksidan aktivitesi ile ilgili çalışmalar bulunmaktadır.

Karthikaidevi ve arkadaşları (2009) *Roccella belangeriana* likeninin su, aseton, metanol, etil asetat, kloroform, etanol, dietil eter, petrol eteri ekstraktlarının antimikrobiyal aktivitesini incelemiş ve likenin etanol ekstraktının *E. coli*, *Staphylococcus* sp., *Proteus* sp. bakterilerine karşı; metanol ekstraktının ise *K. pneumoniae*, *Staphylococcus* sp., *Proteus* sp. ve *Salmonella* sp. bakterilerine karşı aktivite gösterdiğini belirlemişlerdir (68). Çalışmamızda ise *R. phycopsis* likeninin etanol ekstraktının *E. coli*'ye, *Staphylococcus aureus* subsp. *aureus*'a, *Proteus vulgaris*'e, *Proteus mirabilis*'e karşı inhibisyon zonları oluştururken, *R. phycopsis* likeninin metanol ekstraktının *K. pneumoniae*'ye, *S. aureus* subsp. *aureus*'a, *P. vulgaris*'e ve *P. mirabilis*'e karşı inhibisyon zonları oluşturduğu tespit edilmiştir. Bu iki liken türü arasındaki sonuçlar incelendiğinde *R. phycopsis* likeninin etanol ve metanol ekstraktlarının *R. belangeriana* likeninin etanol ve metanol ekstraktlarından daha aktif olduğu görülmektedir.

Balaji ve arkadaşları (2006)'nın yürüttüğü bir çalışmada ise, *Roccella montagnei* likeninin hekzan, etil asetat, aseton ve metanolik ekstraktlarının antimikrobiyal aktivitesi çalışılmış, likenin metanolik ekstraktlarının *K. pneumoniae*, *P. vulgaris*, *S. typhi* ve *C. albicans*'a karşı antimikrobiyal aktivite oluşturduğu gözlemlenmiştir (69). Çalışmamızda *R. phycopsis* likeninin metanol ekstraktının *K. pneumoniae*'e ve *P. vulgaris*'e karşı aktivite sergilediği görülmüştür.

Dahake ve arkadaşları (2010) tarafından gerçekleştirilen diğer bir çalışmada *R. belangeriana* likeninin aseton ve sulu ekstraktlarının antimikrobiyal aktivitesi incelenmiş ve özellikle *R. belangeriana* likeninin aseton ekstraktları kuvvetli antimikrobiyal aktivite sergilediği görülmüştür (70).

Logesh ve arkadaşları (2012)'nin yürüttüğü *R. montagnei* tallusundan izole edilen kitosan maddesinin antibakteriyal aktivitesinin incelendiği çalışmada, *R. montagnei*'den izole edilen kitosan maddesinin 100 µL'si *Vibrio cholerae*'e ve *E. coli*'e karşı antimikrobiyal aktivite oluşturmuştur (71).

Kullanılan liken ekstraktlarının test mikroorganizmaları üzerindeki antimikrobiyal etkilerinin farklı olmasının nedenleri şunlardır:

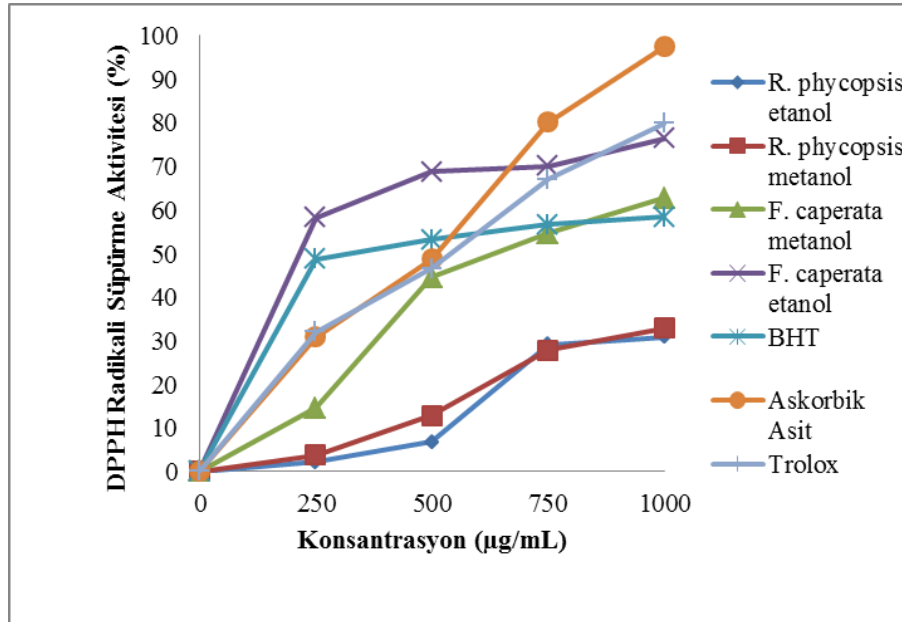
Ekstraksiyon sırasında farklı çözücülerin kullanılması, denenen çözücülerin çözebildiği ve bu mikroorganizmalar üzerine etkili olabilen liken ekstraktlarının değişik karakterdeki bileşenlerinin farklı etkileşimi, farklı tür likenlerin kullanılması, aynı liken türlerinin farklı coğrafyalardan toplanması ve farklı tür mikroorganizmaların kullanılmasından kaynaklanabilmektedir.

3.3. Antioksidan Aktivite

3.3.1. DPPH· Radikali Süpürme Aktivitesi

DPPH çözeltisi ve ekstraktlarla hazırlanan karışımlar 30 dk karanlıkta inkübasyona tabi tutuldu. İnkübasyon sürecinden sonra karışımların absorbansları 517 nm dalga boyunda spektrofotometrede okundu.

Ekstraktların DPPH· radikali giderme aktivitesine ait % inhibisyon-konsantrasyon grafiği çizildi (Şekil 3.5). Yüzde (%) inhibisyon değeri ne kadar yüksekse antioksidan etki de o kadar yüksek kabul edilmektedir.



Şekil 3.5. Liken ekstraktları ve standart antioksidan maddelerin DPPH· radikali süpürme aktivitesi (% inhibisyon değerleri).

DPPH· radikali doğal antioksidanların serbest radikal yakalama aktivitesini değerlendirmek için kullanılır. Ortamda antioksidan bulunması halinde DPPH çözeltisinin renginde değişim meydana gelir. Ortamda antioksidan maddenin bulunması durumunda mor renkte bir azalma gerçekleşir ve renk sarıya döner. Bu nedenle absorbans değerinde bir azalma gerçekleşir. Bu durumda ortamda DPPH·

radikalinin konsantrasyonunun azaldığını gösterir.

DPPH[•] radikali giderme aktivitesi sonuçları incelendiğinde, *F. caperata* etanol ekstraktlarının 250 µg/mL, 500 µg/mL, 750 µg/mL ve 1000 µg/mL konsantrasyonları (*F. caperata* etanol 250=58.27±1.09, *F. caperata* etanol 500=68.7±1.48, *F. caperata* etanol 750=70.08±1.55, *F. caperata* etanol 1000=76.37±1.43) BHT'nin eşdeğer konsantrasyonları ile karşılaştırıldığında (BHT 250=48.69±0.52, BHT 500=53.17±1.01, BHT 750=56.58±0.58, BHT 1000=58.37±0.54) *F. caperata* etanol ekstraktlarının BHT'den daha yüksek serbest radikal giderme aktivitesine sahip olduğu görülmüştür. Benzer şekilde, *F. caperata* etanol ekstraktlarının 250 µg/mL 500 µg/mL ve 750 µg/mL'lik konsantrasyonlarının (*F. caperata* etanol 250=58.27±1.09, *F. caperata* etanol 500=68.7±1.48, *F. caperata* etanol 750=70.08±1.55) Trolox'un (Tro 250= 31.97±0.69, Tro 500=46.6±0.97, Tro 750=66.94±0.97) ve Askorbik asitin (As 250= 30.87±0.16, As 500=48.66±0.84) eşdeğer konsantrasyonlarından daha yüksek serbest radikal giderme aktivitesine sahip olduğu görülmüştür. *R. phycopsis* etanol ve metanol ekstraktlarının tüm konsantrasyonlarının BHT, Trolox ve Askorbik asitten daha düşük aktiviteye sahip olduğu gözlenmiştir. Sonuç olarak çalışılan liken örneklerinin ve standart antioksidan maddelerin 1000 µg/mL konsantrasyonlarındaki serbest radikal giderme aktiviteleri Askorbik asit >Trolox>*F. caperata* etanol ekstraktı>*F. caperata* metanol ekstraktı>BHT>*R. phycopsis* metanol>*R. phycopsis* etanol şeklinde yazılabilir.

R. phycopsis ve *F. caperata* likenlerinin etanol ve metanol ekstraktlarının tümünde konsantrasyon artışı ile birlikte DPPH[•] radikali süpürme aktivitesinde artış gözlenmiştir.

Mitrović ve arkadaşları (2011) tarafından yürütülmüş bir çalışmada *F. caperata* likeninden elde edilen metanolik ekstraktın DPPH[•] radikali süpürme aktivitesi için IC₅₀ değeri 549.01±1.69 µg/mL olarak, toplam fenol içeriği 90.83±0.98 µg/mL ve toplam flavonoid içeriği 33.55±0.93 µg/mL olarak tespit edilmişken, çalışmamızda *F. caperata* likeninin metanol ekstraktının DPPH[•] radikali süpürme aktivitesi için IC₅₀ değeri 723.59±12.57 µg/mL olarak, 1000 µg/mL konsantrasyonunda toplam fenol içeriği 62.44±0.004 µg/mL ve 1000 µg/mL konsantrasyonunda toplam flavonoid içeriği 65.23±0.007 µg/mL olarak tespit edilmiştir (66).

Reaksiyon ortamındaki DPPH[•] radikalinin %50'sinin yok edilmesi için gereken etkili antioksidan konsantrasyonu IC₅₀ değeri olarak tanımlanır. Düşük IC₅₀ değeri yüksek radikal giderme aktivitesinin göstergesidir. Elde edilen IC₅₀ değerleri Tablo 3.5.'te verilmiştir. Tablo 3.5'ya göre çalışılan liken örneklerinden en düşük IC₅₀ değeri *F. caperata* likeninin etanol ekstraktlarında tayin edilirken, en yüksek IC₅₀ değeri ise *R. phycopsis* likeninin etanol ekstraktlarında tayin edilmiştir.

Tablo 3.5. Çalışılan liken örnekleri ve standart maddelerin IC₅₀ değerleri (µg/mL)

<i>R. phycopsis</i> etanol	1655.63±49.38
<i>R. phycopsis</i> metanol	1533.74±75.46
<i>F. caperata</i> metanol	723.59±12.57
<i>F. caperata</i> etanol	526.87±10.55
BHT	672.04±8.13
Askorbik Asit	494.56±3.42
Trolox	580.72±9.45

Tablo 3.6. Liken ekstraktları ve standart antioksidan maddelerin DPPH[•] radikali süpürme aktivitelerinin istatistiksel analizi (konsantrasyonlara göre)

Konsantrasyon	DPPH [•] Radikali Süpürme Aktivitesi (% inhibisyon)
250 µg/mL	32.22±28.43 ^{bc}
500 µg/mL	45.18±27.24 ^{ab}
750 µg/mL	60.24±23.45 ^a
1000 µg/mL	67.94±25.93 ^a

Veriler ortalama ± standart sapma (SD) olarak gösterildi (n = 3). Ortalamalar arasındaki istatistiksel önem “Duncan” testini takiben “one-way” varyans analizi kullanılarak araştırıldı. Aynı sütun içerisinde farklı harfler ile gösterilen ortalamalar istatistiksel açıdan önemlidir (P<0.05).

Tablo 3.6.'ya göre; *F. caperata* likeninin etanol ve metanol ekstraktlarının, *R. phycopsis* likeninin etanol ve metanol ekstraktlarının ve standart antioksidan maddelerin (BHT, Askorbik asit, Trolox) DPPH[•] radikali süpürme aktiviteleri

bakımından 750 µg/mL ve 1000 µg/mL konsantrasyonları arasında istatistiksel açıdan önemli bir farklılık görülmezken ($p>0.05$); 250 µg/mL konsantrasyonları arasında önemli farklılıklar görülmüştür ($p<0.05$). Ayrıca, konsantrasyon artışıyla birlikte liken ekstraktları ve standart antioksidan maddelerinin DPPH[•] radikali süpürme aktivitelerinin arttığı görülmüştür.

Tablo 3.7. Liken ekstraktlarının ve standart antioksidan maddelerin DPPH[•] radikali süpürme aktivitelerinin istatistiksel analizi (örneklere göre)

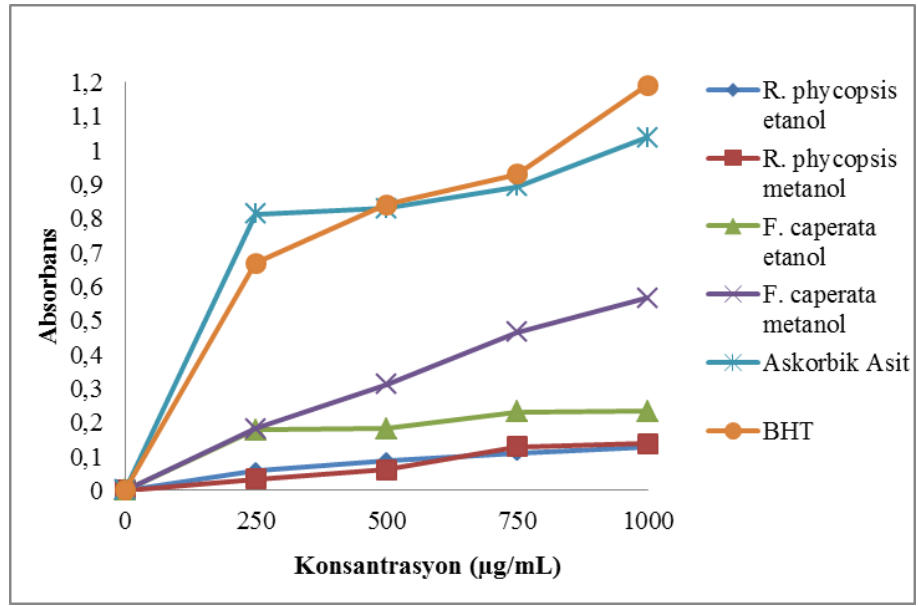
Örnekler	DPPH [•] Radikali Süpürme Aktivitesi (% inhibisyon)
<i>R. phycopsis</i> etanol	17.22±13.47 ^c
<i>R. phycopsis</i> metanol	19.31±12.21 ^c
<i>F. caperata</i> metanol	44.08±19.03 ^b
<i>F. caperata</i> etanol	68.36±6.89 ^a
BHT	54.11±3.84 ^a
Askorbik asit	64.26±27.14 ^a
Trolox	56.34±19.23 ^a

Veriler ortalama ± standart sapma (SD) olarak gösterildi ($n = 3$). Ortalamalar arasındaki istatistiksel önem “Duncan” testini takiben “one-way” varyans analizi kullanılarak araştırıldı. Aynı sütun içerisinde farklı harfler ile gösterilen ortalamalar istatistiksel açıdan önemlidir ($P<0.05$).

Tablo 3.7.’de, Trolox, Askorbik asit, BHT ve *F. caperata* etanol arasında DPPH[•] radikali süpürme aktivitesi bakımından önemli bir fark bulunmamıştır ($p>0.05$). *R. phycopsis* likeninin metanol ve etanol ekstraktları arasında DPPH[•] radikali süpürme aktivitesi bakımından önemli bir fark bulunmazken ($p>0.05$), *F. caperata* likeninin etanol ve metanol ekstraktları arasında önemli farklılıklar vardır ($p<0.05$). Ayrıca, *F. caperata* likeninin etanol ve metanol ekstraktları ile *R. phycopsis* likeninin etanol ve metanol ekstraktları arasında da önemli farklılıklar vardır ($p<0.05$).

3.3.2. İndirgeme Gücü

Ekstraktların indirgeme gücü aktivitesine ait absorbans-konsantrasyon grafiği çizilerek absorbans-konsantrasyon değerleri grafiği oluşturuldu (Şekil 3.6).



Şekil 3.6. Liken ekstraktlarının ve standart antioksidan maddelerinin indirgeme gücü aktivitesi

Çalışmada kullanılan liken ekstraktlarının ve standart antioksidan maddelerin indirgeme gücü Oyaizu metoduna göre yapıldı. Deneyin esası; Fe^{+3} 'ün Fe^{+2} 'ye indirgenerek Fe^{+2} 'nin spektrofotometrik olarak izlenmesidir. Bu metot da; test çözeltisinin sarı rengi ortamda bulunan antioksidan maddelerin indirgeme aktivitelerinden dolayı farklı tonlardaki yeşil rengine dönüşmektedir (72, 73).

Absorbans değerlerinin artışı; indirgeme gücünün yüksek olduğunun belirtisidir. Denemelerde, Askorbik asit ve BHT standart antioksidan madde olarak kullanıldı. Çalışılan ekstrakt ve standart antioksidan madde konsantrasyonu arttıkça indirgeme gücü de doğru orantılı olarak artmaktadır. Kullanılan standartlar her iki liken ekstraktından daha yüksek indirgeme kapasitesi göstermiştir. Sonuç olarak; 1000 µg/mL konsantrasyonunda indirgeme güçleri sırasıyla BHT>Askorbik asit>*F. caperata* metanol ekstraktı>*F. caperata* etanol ekstraktı>*R. phycopsis* metanol ekstraktı>*R. phycopsis* etanol ekstraktı şeklindedir.

F. caperata likeninin metanol ekstraktlarının antioksidan aktivitesini belirlemek amacıyla Stojanović ve arkadaşları (2010) tarafından gerçekleştirilen bir çalışmada, *F. caperata* likeninin metanol ekstraktının toplam fenol içeriği 11.99 ± 0.18 µg/mL gallik asit eşdeğeri; indirgeme gücü 21.63 ± 0.28 µg/mL askorbik asit eşdeğeri ve DPPH $^{\cdot}$ radikali süpürme aktivitesi için IC_{50} değeri 347.2 ± 0.33 µg/mL olarak saptanmışken, çalışmamızda *F. caperata* likeninin metanol ekstraktının DPPH $^{\cdot}$ radikali süpürme aktivitesi için IC_{50} değeri 723.59 ± 12.57 µg/mL

olarak, 1000 µg/mL konsantrasyonunda toplam fenol içeriği 62.44±0.004 µg/mL olarak saptanmıştır. Ayrıca, çalışmamızda *F. caperata* likeninin metanol ekstraktının çalışma likenleri arasında standartlardan sonra en yüksek indirgeme gücüne sahip liken türü olduğu da görülmüştür (74).

Tablo 3.8. Liken ekstraktlarının ve standart maddeleri indirgeme gücü aktivitelerinin istatistiksel analizi (konsantrasyonlara göre)

Konsantrasyon	İndirgeme Gücü
250 µg/mL	0.377±0.37 ^a
500 µg/mL	0.385±0.34 ^a
750 µg/mL	0.459±0.35 ^a
1000 µg/mL	0.549±0.44 ^a

Veriler ortalama ± standart sapma (SD) olarak gösterildi (n = 3). Ortalamalar arasındaki istatistiksel önem “Duncan” testini takiben “one-way” varyans analizi kullanılarak araştırıldı. Aynı sütun içerisinde farklı harfler ile gösterilen ortalamalar istatistiksel açıdan önemlidir (P<0.05).

Tablo 3.8. incelendiğinde, *R. phycopsis* likeninin etanol ve metanol ekstraktları, *F. caperata* likeninin etanol ve metanol ekstraktları ve standart maddelerin çalışılan tüm konsantrasyonları arasında toplam fenol içerikleri bakımından önemli farklılıklar bulunmamaktadır (p>0.05). Ayrıca, konsantrasyon artışıyla birlikte liken ekstraktları ve standart antioksidan maddelerinin indirgeme güçlerinin de arttığı görülmüştür.

Tablo 3.9. Liken ekstraktlarının ve standart maddelerin indirgeme gücü aktivitelerinin istatistiksel analizi (örneklere göre)

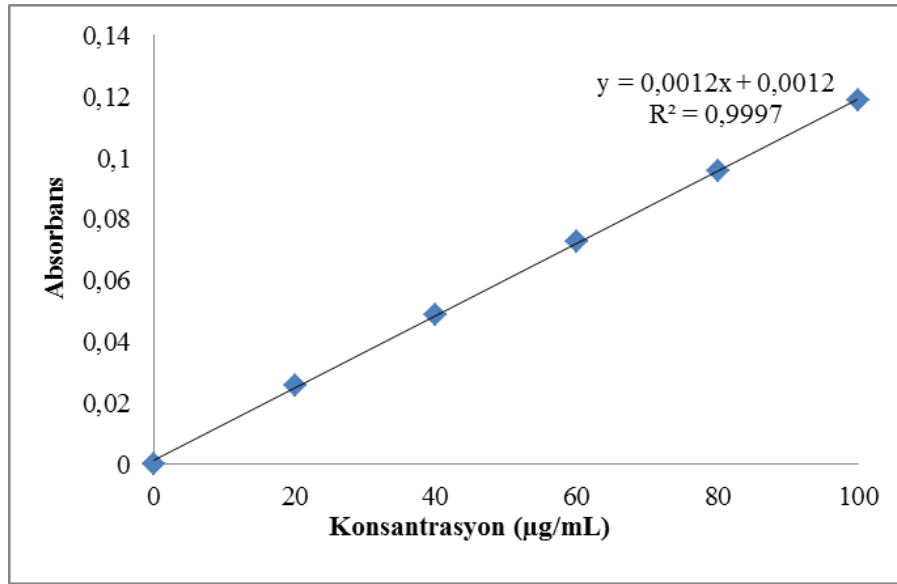
Örnek	İndirgeme Gücü
<i>R. phycopsis</i> etanol	0.096±0.027 ^c
<i>R. phycopsis</i> metanol	0.090±0.046 ^c
<i>F. caperata</i> etanol	0.206±0.027 ^c
<i>F. caperata</i> metanol	0.464±0.263 ^b
Askorbik asit	0.893±0.093 ^a
BHT	0.907±0.20 ^a

Veriler ortalama ± standart sapma (SD) olarak gösterildi (n = 3). Ortalamalar arasındaki istatistiksel önem “Duncan” testini takiben “one-way” varyans analizi kullanılarak araştırıldı. Aynı sütun içerisinde farklı harfler ile gösterilen ortalamalar istatistiksel açıdan önemlidir (p<0.05).

Tablo 3.9.’a göre; standart antioksidan madde olarak kullanılan Askorbik asit ve BHT arasında indirgeme gücü bakımından önemli farklılıklar bulunmamaktadır (p>0.05). *R. phycopsis* likeninin etanol ve metanol ekstraktları arasında indirgeme gücü bakımından önemli farklılıklar görülmezken (p>0.05); *F. caperata* likeninin etanol ve metanol ekstraktları arasında indirgeme gücü bakımından önemli farklılıklar görülmektedir (p<0.05). Ayrıca, *R. phycopsis* likeninin etanol ekstraktı ile *F. caperata* likeninin etanol ekstraktı arasında indirgeme gücü bakımından önemli farklılıklar görülmezken (p>0.05); *R. phycopsis* likeninin metanol ekstraktı ile *F. caperata* likeninin metanol ekstraktı arasında önemli farklılıklar görülmüştür (p<0.05).

3.3.3. Toplam Fenolik İçeriği

Tüm likenlerin metanol ve etanol ekstraktlarındaki toplam çözünebilir fenolik maddeler Folin- Ciocalteu reaktifi ile *R. phycopsis* ve *F. caperata* likenlerinin değişik polaritedeki çözücüler ile hazırlanan ekstraktlarında tayin edildi. Gallik asit kullanılarak standart grafikleri hazırlandı (Şekil 3.7). Bu standart grafikler kullanılarak örneklerin toplam fenolik madde miktarları µg GAE/mg ekstrakt eşdeğeri olarak hesaplandı (Tablo 3.10).



Şekil 3.7. Gallik asit standart grafiği

Bitki ekstraktlarının toplam fenol bileşimi konsantrasyonu, standart olarak kullanılan gallik asitin kalibrasyon eğrisinden yararlanılarak hesaplanmıştır ($R^2=0.9967$; $y=0.0012x+0.0012$).

Tablo 3.10. Liken ekstraktları ve standart antioksidan maddelerin toplam fenol içerikleri (RP=*Rocella phycopsis*, FC=*Flavoparmelia caperata*)

Liken Ekstraktı Konsantrasyonu (µg /mL)	RP etanol ekstraktı (µg /mL)	RP metanol ekstraktı (µg /mL)	FC etanol ekstraktı (µg /mL)	FC metanol ekstraktı (µg /mL)
1000	109.35±0.005	106.55±0.007	62.44±0,004	63.5±0.002
2000	169±0.022	113.72±0.012	81.94±0.001	102.58±0.006
3000	193.8±0.013	176.22±0.023	113.94±0.013	137.14±0.004
4000	221.77±0.003	212.27±0.008	119.85±0.010	170.14±0.016

Birçok antioksidan fenoller serbest radikalleri sonlandırıcı olarak fonksiyon gösterir. Fenollerin serbest radikallerle reaksiyona girmesi sonucu oluşan fenoksi radikalleri kararlıdır ve diğer serbest radikallerle reaksiyona girerek farklı yönlerde radikal reaksiyonlarını sonlandırıcı etki gösterir. Hidroksil grubu bulundurduklarından fenoller, radikal yok etme yetenekleri nedeniyle çok önemli bitki bileşenleridir (75). Brudzynski ve Miotto (2012) tarafından yürütülen deneysel çalışmalarda, antioksidan aktivite ile toplam fenol miktarı arasında ilişki olduğu sonucuna varılmıştır (76).

Kullanılan ekstraksiyon çözücüsü ve materyale bağlı olarak toplam fenol içeriği *R. phycopsis* etanol ekstraktı için 109.35-221.77 µg GAE/mg ekstrakt, *R. phycopsis* metanol ekstraktı için 106.55-212.27 µg GAE/mg ekstrakt, *F. caperata* etanol ekstraktı için 62.44-119.85 µg GAE/mg ekstrakt, *F. caperata* metanol ekstraktı için 63.5-170.14 µg GAE/mg ekstrakt olarak bulunmuştur. Ekstrakt bazında en yüksek fenol içeriği *R. phycopsis* likeninin etanol ekstraksiyonundan elde edilirken, en düşük fenol içeriği *F. caperata* likeninin metanol ekstraksiyonundan elde edilmiştir. *R. phycopsis* likeni ekstraktlarının toplam fenol içeriği *F. caperata* likeni ekstraktlarına göre daha yüksek tespit edilmiştir. Ekstraksiyon verimlerinde de aynı eğilim gözlenmiştir. Ayrıca alınan ekstrakt miktarına bağlı olarak toplam fenolik bileşik miktarında da artış olduğu tespit edildi. Liken ekstraktlarının toplam fenol bileşik içeriği sırasıyla *R. phycopsis* etanol>*R. phycopsis* metanol>*F. caperata* metanol>*F. caperata* etanol olarak saptandı.

Tablo 3.11. Liken ekstraktlarının toplam fenol içeriklerinin istatistiksel analizi (konsantrasyonlara göre)

Konsantrasyon	Toplam Fenol İçeriği
1000 µg/mL	102.8±28.6 ^c
2000 µg/mL	140.9±41.5 ^b
3000 µg/mL	186.5±41.5 ^a
4000 µg/mL	217.4±51.3 ^a

Veriler ortalama ± standart sapma (SD) olarak gösterildi (n = 3). Ortalamalar arasındaki istatistiksel önem “Duncan” testini takiben “one-way” varyans analizi kullanılarak araştırıldı. Aynı sütun içerisinde farklı harfler ile gösterilen ortalamalar istatistiksel açıdan önemlidir (P<0.05).

Tablo 3.11’e göre; *F. caperata* likeninin etanol ve metanol ekstraktlarının ve *R. phycopsis* likeninin etanol ve metanol ekstraktlarının 3000 µg/mL ve 4000 µg/mL konsantrasyonları arasında toplam fenol içerikleri bakımından önemli farklılıklar bulunmazken (p>0.05); 1000 µg/mL ve 2000 µg/mL konsantrasyonları arasında önemli farklılıklar vardır (p<0.05). Ayrıca, konsantrasyon artışıyla birlikte ekstraktların toplam fenol içerikleri de artmıştır.

Tablo 3.12. Liken ekstraktlarının ve standartların toplam fenol içeriklerinin istatistiksel analizi (örneklere göre)

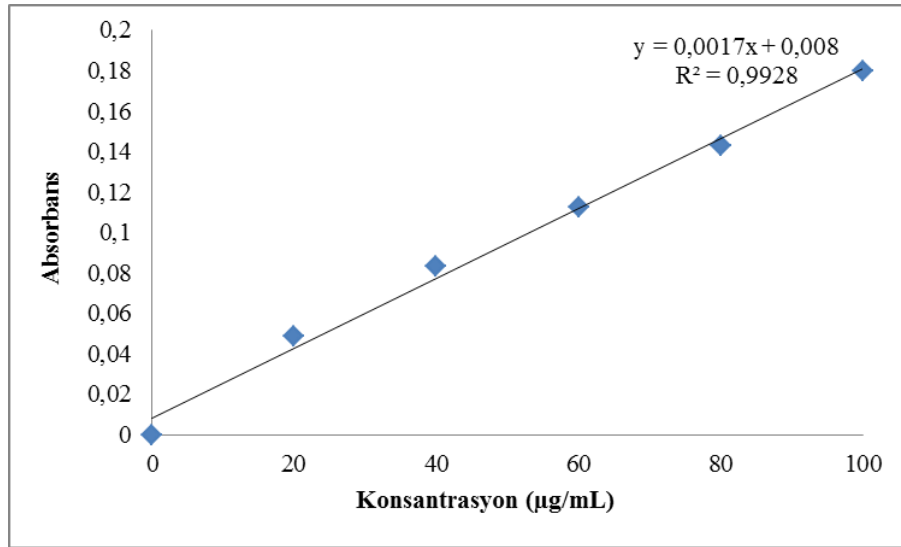
Örnek	Toplam Fenol İçeriği
<i>R. phycopsis</i> etanol	208.3±53.2 ^a
<i>R. phycopsis</i> metanol	182.8±56.5 ^a
<i>F. caperata</i> etanol	113.7±30.4 ^b
<i>F. caperata</i> metanol	142.7±50.1 ^b

Veriler ortalama $\pm$ standart sapma (SD) olarak gösterildi (n = 3). Ortalamalar arasındaki istatistiksel önem “Duncan” testini takiben “one-way” varyans analizi kullanılarak araştırıldı. Aynı sütun içerisinde farklı harfler ile gösterilen ortalamalar istatistiksel açıdan önemlidir (P<0.05).

Tablo 3.12’ye göre, *R. phycopsis* likeninin etanol ve metanol ekstraktlarının toplam fenol içerikleri arasında önemli farklılıklar görülmemiştir (p>0.05). Benzer şekilde, *F. caperata* likeninin etanol ve metanol ekstraktlarının toplam fenol içerikleri arasında da önemli farklılıklar görülmemiştir (p>0.05). *R. phycopsis* likeninin etanol ve metanol ekstraktları ile *F. caperata* likeninin etanol ve metanol ekstraktlarının toplam fenol içerikleri arasında ise önemli farklılıklar görülmüştür (p<0.05).

3.3.4. Toplam Flavonoid İçeriği

Deneyssel çalışmalarda kullanılan liken ekstraktlarının ve standart antioksidan maddenin (kateşin) toplam flavonoid miktarları Zhishen ve Jiamming metotlarına göre tayin edildi. Toplam flavonoid analizinde örneklerin flavonoid madde miktarı kateşin eşdeğeri olarak verilmiştir. Bu amaçla öncelikle kateşin kalibrasyon eğrisi çizilmiştir (Şekil 3.8).



Şekil 3.8. Kateşin standard grafiği

Bitki ekstraktlarının toplam flavonoid bileşimi konsantrasyonu, standart olarak kullanılan kateşinin kalibrasyon eğrisinden yararlanılarak hesaplanmıştır ($R^2=0.9928$; $y= 0.0017x+0.008$).

Tablo 3.13. Liken ekstraktlarının ve standart antioksidan maddelerin toplam flavonoid içerikleri

Liken Ekstraktı Konsantrasyonu (µg /mL)	<i>R. phycopsis</i> etanol ekstraktı (µg /mL)	<i>R. phycopsis</i> metanol ekstraktı (µg /mL)	<i>F. caperata</i> etanol ekstraktı (µg /mL)	<i>F. caperata</i> metanol ekstraktı (µg /mL)
1000	40.96±0.005	154.1±0.007	65.23±0.007	110.06±0.004
2000	122.9±0.003	174.36±0.005	106.86±0.004	199.82±0.006
3000	142.43±0.005	350.76±0.009	166.13±0.002	215.53±0.004
4000	256.96±0.006	427.36±0.009	204.86±0.002	287.26±0.006

Flavonoidler, $C_6-C_3-C_6$ karbon iskeletleri ile karakterize edilmektedir. Lipitlerde çözünen antioksidanlar sınıfından olan flavonoidler, bitkilerdeki sarı, mavi ve kırmızı renk pigmentlerini oluşturan polifenollerdir (62).

Toplam flavonoid içeriği *R. phycopsis* etanol ekstraktı için 40.96-256.96 µg kateşin/mg ekstrakt, *R. phycopsis* metanol ekstraktı için 154.1-427.36 µg kateşin/mg ekstrakt, *F. caperata* etanol ekstraktı için 65.23-204.86 µg kateşin/mg ekstrakt, *F. caperata* metanol ekstraktı için 110.06-287.26 µg kateşin/mg ekstrakt olarak bulunmuştur. Ekstrakt bazında en yüksek flavonoid içeriği *R. phycopsis* likeninin metanol ekstraksiyonundan elde edilirken, en düşük flavonoid içeriği *F. caperata*

likeninin etanol ekstraksiyonundan elde edilmiştir. Ayrıca alınan ekstrakt miktarına bağlı olarak toplam flavonoid bileşik miktarında da artış olduğu tespit edildi. Liken ekstraktlarının toplam flavonoid bileşik içeriği sırasıyla *R. phycopsis* metanol > *F. caperata* metanol > *R. phycopsis* etanol > *F. caperata* etanol olarak saptandı.

Tablo 3.14. Liken ekstraktlarının ve standartların toplam flavonoid içeriklerinin istatistiksel analizi (konsantrasyonlara göre)

Konsantrasyon	Toplam Flavonoid İçeriği
250 µg/mL	92.6±45.6 ^d
500 µg/mL	150.7±39.7 ^c
750 µg/mL	219.3±83.9 ^b
1000 µg/mL	294.1±86.2 ^a

Veriler ortalama ± standart sapma (SD) olarak gösterildi (n = 3). Ortalamalar arasındaki istatistiksel önem “Duncan” testini takiben “one-way” varyans analizi kullanılarak araştırıldı. Aynı sütun içerisinde farklı harfler ile gösterilen ortalamalar istatistiksel açıdan önemlidir (P<0.05).

Tablo 3.14’e göre, *R. phycopsis* likeninin etanol ve metanol ekstraktları, *F. caperata* likeninin etanol ve metanol ekstraktlarının ve standart maddelerin tüm konsantrasyonları arasında toplam flavonoid içeriği bakımından istatistiksel açıdan önemli farklılıklar bulunmaktadır (p<0.05). Ayrıca, liken ekstraktlarının konsantrasyonlarının artmasıyla ekstraktların toplam flavonoid içerikleri de artmıştır.

Tablo 3.15. Liken ekstraktlarının ve standartların toplam flavonoid içeriklerinin istatistiksel analizi (örneklere göre)

Örnek	Toplam Flavonoid İçeriği
<i>R. phycopsis</i> etanol	141.1±80.8 ^b
<i>R. phycopsis</i> metanol	276.6±121.2 ^a
<i>F. caperata</i> etanol	135.8±56.1 ^b
<i>F. caperata</i> metanol	203.2±66.0 ^b

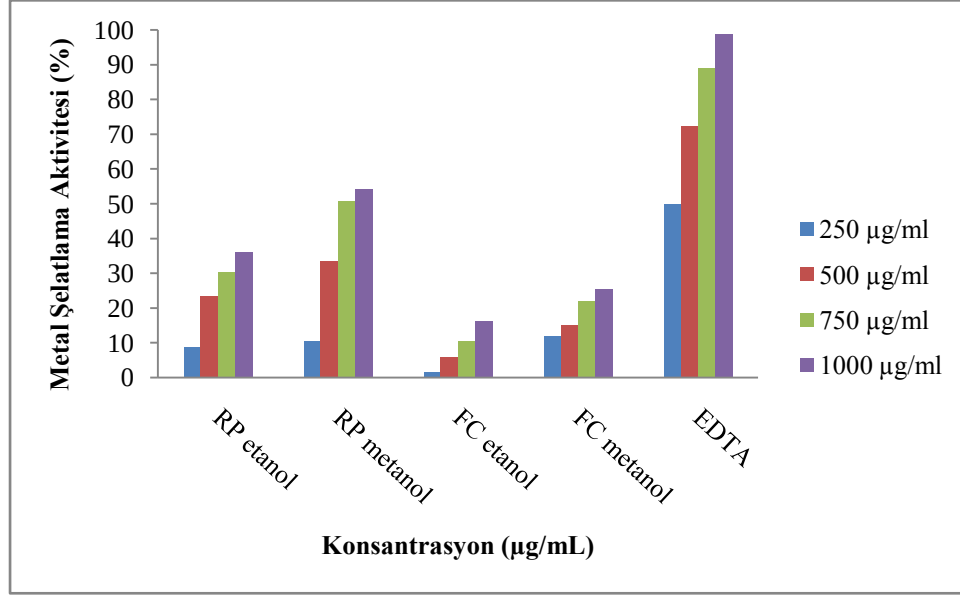
Veriler ortalama $\pm$ standart sapma (SD) olarak gösterildi (n = 3). Ortalamalar arasındaki istatistiksel önem “Duncan” testini takiben “one-way” varyans analizi kullanılarak araştırıldı. Aynı sütun içerisinde farklı harfler ile gösterilen ortalamalar istatistiksel açıdan önemlidir (P<0.05).

Tablo 3.15’e göre, *R. phycopsis* likeninin etanol ve metanol ekstraktları arasında toplam flavonoid içeriği bakımından önemli farklılıklar görülürken (p<0.05); *F. caperata* likeninin etanol ve metanol ekstraktları arasında önemli farklılıklar görülmemiştir (p>0.05). Ayrıca, *F. caperata* likeninin etanol ekstraktı ile *R. phycopsis* etanol ekstraktının toplam flavonoid içerikleri arasında istatistiksel açıdan önemli farklılıklar bulunmazken (p>0.05); *F. caperata* likeninin metanol ekstraktı ile *R. phycopsis* metanol ekstraktı arasında toplam flavonoid içeriği bakımından önemli farklılıklar bulunmaktadır (p<0.05).

3.3.5. Metal Şelatlama Aktivitesi

Çalışmada kullanılan liken ekstraktlarının ve standart antioksidan maddenin metal-şelat aktiviteleri Dinis metoduna göre tayin edildi. Standart antioksidan madde olarak EDTA kullanıldı.

Çalışmada kullanılan liken ekstraktlarının metal şelatlama potansiyelini gösteren % inhibisyon-konsantrasyon grafiği oluşturuldu (Şekil 3.9).



Şekil 3.9. Liken ekstraktları ve standart antioksidan maddelerin metal-şelat aktivitesi

Fe^{+2} miktar bakımından ferrozin ile kompleks yapabilir, şelatlayıcı ajanların varlığında oluşan kompleksin yapısı kırılır, kompleksin kırmızı rengine azalma gözlenir. Bu çalışma, şelatla birlikte mevcut olan metal-şelat aktivitesinin değerlendirilmesinde renk azalmasının spektrofotometrik olarak ölçülmesine dayanır. Çalışmada kullanılan tüm ekstraktlar, konsantrasyon arttıkça artan şelatlama aktivitesi göstermiştir. *R. phycopsis* metanol ekstraktının 750 µg/mL konsantrasyonu ve 1000 µg/mL konsantrasyonu (*R. phycopsis* etanol 750=50.59±0.73, *R. phycopsis* etanol 1000=54.23±0.41) EDTA 250 µg/mL konsantrasyonundan (EDTA 250=49.96±1.40) daha yüksek metal-şelat aktivitesi göstermiştir.

Sonuç olarak çalışılan liken ekstraktlarının ve EDTA'nın 1000 µg/mL konsantrasyonunda metal-şelat aktiviteleri sırasıyla EDTA>*R. phycopsis* metanol>*R. phycopsis* etanol>*F. caperata* metanol>*F. caperata* etanol şeklinde sıralanmaktadır.

Tablo 3.16. Liken ekstraktlarının ve standartların metal şelatlama aktivitelerinin istatistiksel analizi (konsantrasyonlara göre)

Konsantrasyon	Metal Şelatlama Aktivitesi
250 µg/mL	16.55±17.71 ^{ab}
500 µg/mL	30.10±23.78 ^a
750 µg/mL	40.49±28.56 ^a
1000 µg/mL	46.15±30.22 ^a

Veriler ortalama ± standart sapma (SD) olarak gösterildi (n = 3). Ortalamalar arasındaki istatistiksel önem “Duncan” testini takiben “one-way” varyans analizi kullanılarak araştırıldı. Aynı sütun içerisinde farklı harfler ile gösterilen ortalamalar istatistiksel açıdan önemlidir (P<0.05).

Tablo 3.16’ya göre, *F. caperata* likeninin etanol ve metanol ekstraktlarının, *R. phycopsis* likeninin etanol ve metanol ekstraktlarının ve standart antioksidan maddenin (EDTA) metal şelatlama aktiviteleri bakımından 500 µg/mL, 750 µg/mL ve 1000 µg/mL konsantrasyonları arasında istatistiksel açıdan önemli bir farklılık görülmemiştir (p>0.05). Ayrıca, konsantrasyon artışıyla birlikte liken ekstraktları ve standart antioksidan maddelerinin metal şelatlama aktivitelerinin de arttığı görülmüştür.

Tablo 3.17. Liken ekstraktlarının ve standartların metal şelatlama aktivitelerinin istatistiksel analizi (örneklere göre)

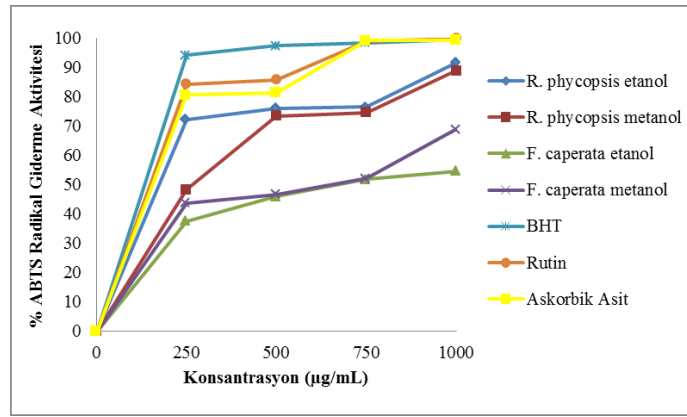
Örnekler	Metal Şelatlama Aktivitesi
<i>R. phycopsis</i> etanol	24.71±10.66 ^c
<i>R. phycopsis</i> metanol	37.20±18.09 ^b
<i>F. caperata</i> etanol	8.53±5.69 ^{dc}
<i>F. caperata</i> metanol	18.65±5.57 ^c
EDTA	77.52±19.35 ^a

Veriler ortalama ± standart sapma (SD) olarak gösterildi (n = 3). Ortalamalar arasındaki istatistiksel önem “Duncan” testini takiben “one-way” varyans analizi kullanılarak araştırıldı. Aynı sütun içerisinde farklı harfler ile gösterilen ortalamalar istatistiksel açıdan önemlidir (P<0.05).

Tablo 3.17'ye göre, kullanılan standart madde (EDTA) ile diğer liken ekstraktları arasında önemli farklılıklar vardır ($p<0.05$). *R. phycopsis* likeninin etanol ve metanol ekstraktları arasında da metal şelatlama aktivitesi bakımından önemli farklılıklar görülürken ($P<0.05$); *F. caperata* likeninin etanol ve metanol ekstraktlarının metal şelatlama aktivitesi bakımından önemli farklılıklar görülmemiştir ($p>0.05$).

3.3.6. ABTS^{•+} Radikal Giderme Aktivitesi

Çalışmada kullanılan liken ekstraktlarının ABTS^{•+} radikal giderme aktivitesini gösteren % inhibisyon-konsantrasyon grafiği oluşturuldu (Şekil 3.10).



Şekil 3.10. Liken ekstraktları ve standart antioksidan maddelerin ABTS^{•+} radikali giderme aktivitesi

Farklı konsantrasyonlardaki liken ekstraktlarının (250-1000 µg/mL) ABTS^{•+} radikal giderme aktiviteleri birer standart olan Rutin, Askorbik asit, BHT ile mukayese edilmiştir. *R. phycopsis* etanol ekstraktının 1000 µg/mL'lik konsantrasyonu (91.77 ± 1.44) ve *R. phycopsis* metanol ekstraktının 1000 µg/mL'lik konsantrasyonu (88.92 ± 0.47) aynı standart konsantrasyonuna (BHT= 99.51 ± 0.02 , Askorbik asit= 99.47 ± 0.01 , Rutin= 99.92 ± 0.03) yakın ABTS^{•+} radikal giderme aktivitesi göstermiştir. *R. phycopsis* likeni ekstraktları *F. caperata* likeni ekstraktlarına göre daha yüksek ABTS^{•+} radikal giderme aktivitesi göstermiştir. Konsantrasyon artışına bağlı olarak ABTS^{•+} radikali giderme aktivitesinde artış görülmektedir. Sonuç olarak 1000 µg/mL'de ABTS^{•+} radikali giderme aktivitesi Rutin>BHT>Askorbik asit>*R. phycopsis* etanol>*R. phycopsis* metanol>*F. caperata* metanol>*F. caperata* etanol şeklinde sıralanmaktadır.

Reaksiyon ortamındaki ABTS^{·+} radikalinin %50'sinin yok edilmesi için gereken etkili antioksidan konsantrasyonu IC₅₀ değeri olarak tanımlanır. Düşük IC₅₀ değeri yüksek radikal giderme aktivitesinin göstergesidir. Elde edilen IC₅₀ değerleri Tablo 2'de verildi. Tablo 3.18.'e göre çalışılan liken örneklerinden en düşük IC₅₀ değeri *R. phycopsis* likeninin etanol ekstraktlarında tayin edilirken, en yüksek IC₅₀ değeri ise *F. caperata* likeninin etanol ekstraktlarında tayin edilmiştir.

Tablo 3.18. Çalışılan liken örnekleri ve standart maddelerin IC₅₀ değerleri (µg/mL)

<i>R. phycopsis</i> etanol	456.26±5.42
<i>R. phycopsis</i> metanol	484.02±3.28
<i>F. caperata</i> etanol	744.04±9.97
<i>F. caperata</i> metanol	657.89±11.26
BHT	381.67±0.58
Rutin	393.39±0.62
Askorbik asit	399.36±0.64

Tablo 3.19. Liken ekstraktlarının ve standartların ABTS^{·+} radikali süpürme aktivitelerinin istatistiksel analizi (konsantrasyonlara göre)

Konsantrasyonlar	ABTS ^{·+} Radikali Süpürme Aktivitesi (% inhibisyon)
250 µg/mL	66.08±21.30 ^{bc}
500 µg/mL	72.47±18.41 ^{ab}
750 µg/mL	78.74±19.85 ^a
1000 µg/mL	86.15±16.80 ^a

Veriler ortalama ± standart sapma (SD) olarak gösterildi (n = 3). Ortalamalar arasındaki istatistiksel önem “Duncan” testini takiben “one-way” varyans analizi kullanılarak araştırıldı. Aynı sütun içerisinde farklı harfler ile gösterilen ortalamalar istatistiksel açıdan önemlidir (P<0.05).

Tablo 3.19'a göre, *F. caperata* likeninin etanol ve metanol ekstraktlarının, *R. phycopsis* likeninin etanol ve metanol ekstraktlarının ve standart antioksidan maddelerin (BHT, Rutin, Askorbik asit) ABTS^{·+} radikali süpürme aktiviteleri bakımından 750 µg/mL ve 1000 µg/mL konsantrasyonları arasında istatistiksel açıdan önemli bir farklılık görülmezken (p>0.05); 250 µg/mL konsantrasyonları arasında önemli farklılıklar görülmüştür (p<0.05). Ayrıca, konsantrasyon artışıyla

birlikte liken ekstraktları ve standart antioksidan maddelerinin ABTS^{·+} radikali süpürme aktivitelerinin arttığı görülmüştür.

Tablo 3.20. Liken ekstraktlarının ve standartların ABTS^{·+} radikali süpürme aktivitelerinin istatistiksel analizi (örneklere göre)

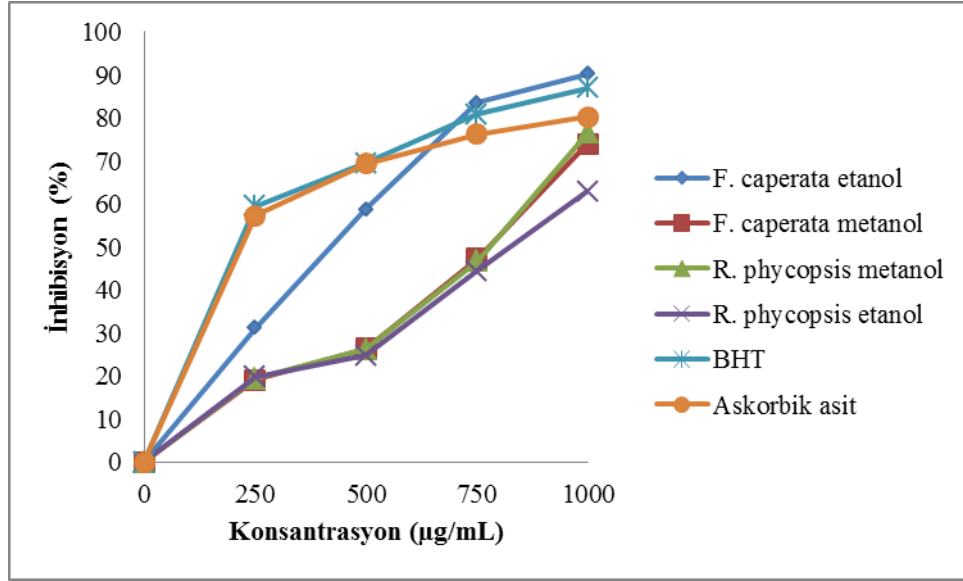
Örnekler	ABTS ^{·+} Radikali Süpürme Aktivitesi (% inhibisyon)
<i>R. phycopsis</i> etanol	79.48±7.56 ^b
<i>R. phycopsis</i> metanol	71.36±15.27 ^c
<i>F. caperata</i> metanol	52.94±10.18 ^d
<i>F. caperata</i> etanol	47.56±6.87 ^d
BHT	97.41±2.10 ^a
Rutin	92.32±7.52 ^a
Askorbik asit	89.99±9.30 ^a

Veriler ortalama ± standart sapma (SD) olarak gösterildi (n = 3). Ortalamalar arasındaki istatistiksel önem “Duncan” testini takiben “one-way” varyans analizi kullanılarak araştırıldı. Aynı sütun içerisinde farklı harfler ile gösterilen ortalamalar istatistiksel açıdan önemlidir (P<0.05).

Tablo 3.20’ye göre, standart maddeler olarak kullanılan BHT, Rutin ve Askorbik asit arasında ABTS^{·+} radikali süpürme aktivitesi bakımından önemli bir fark bulunmamıştır (p>0.05). *F. caperata* likeninin metanol ve etanol ekstraktları arasında da önemli bir fark bulunmazken (p>0.05); *R. phycopsis* likeninin etanol ve metanol ekstraktları arasında önemli bir fark bulunmuştur (p<0.05).

3.3.7. TBA Testi

TBA testinde çalışılan liken türlerinin göstermiş olduğu antioksidan aktivite değerleri Şekil 3.11’de verilmiştir.



Şekil 3.11. Liken ekstraktları ve standart antioksidan maddelerin inhibisyon yüzdeleri

TBA testi sonuçları incelendiğinde, *F. caperata* etanol ekstraktının en yüksek % inhibisyon oranına sahip olduğu görülmüştür. *F. caperata* etanol ekstraktlarının 750 µg/mL ve 1000 µg/mL konsantrasyonları (*F. caperata* etanol 750=83.50±1.27; *F. caperata* etanol 1000=90.17±0.69) askorbik asitin ve BHT'nin eşdeğer konsantrasyonları ile karşılaştırıldığında (As 750=76.13±1.39, As 1000=80.16±0.85, BHT 750=80.79±1.31, BHT 1000=86.86±1.23) *F. caperata* etanol ekstraktlarının askorbik asitten ve BHT'den daha yüksek % inhibisyon oranına sahip olduğu görüldü. Ayrıca, çalışılan ekstraktlarda ve standartlarda konsantrasyon artışına paralel olarak % inhibisyon oranlarında artış görülmüştür. Ekstraktların ve standartların 1000 µg/mL konsantrasyonundaki % inhibisyon oranları *F. caperata* etanol>BHT>Askorbik asit>*R. phycopsis* metanol>*F. caperata* metanol>*R. phycopsis* etanol şeklindedir.

Tablo 3.21. Liken ekstraktlarının ve standartların TBA testi aktivitesinin istatistiksel analizi (konsantrasyonlara göre)

Konsantrasyon	TBA testi aktivitesi
250 µg/mL	33.96±17.38 ^d
500 µg/mL	46.37±20.83 ^c
750 µg/mL	63.13±17.69 ^b
1000 µg/mL	78.31±9.16 ^a

Veriler ortalama ± standart sapma (SD) olarak gösterildi (n = 3). Ortalamalar arasındaki istatistiksel önem “Duncan” testini takiben “one-way” varyans analizi kullanılarak araştırıldı. Aynı sütun içerisinde farklı harfler ile gösterilen ortalamalar istatistiksel açıdan önemlidir (P<0.05).

Tablo 3.21’e göre, *R. phycopsis* likeninin etanol ve metanol ekstraktlarının, *F. caperata* likeninin etanol ve metanol ekstraktlarının ve çalışılan standart antioksidan maddelerin tüm konsantrasyonları arasında TBA testi aktiviteleri bakımından önemli farklılıklar görülmüştür (p<0.05). Konsantrasyon artışıyla birlikte liken ekstraktları ve standart antioksidan maddelerinin TBA testi aktivitelerinin de arttığı görülmüştür.

Tablo 3.22. Liken ekstraktlarının ve standartların TBA testi aktivitesinin istatistiksel analizi (örneklere göre)

Örnek	TBA testi aktivitesi
<i>F. caperata</i> etanol	65.92±24.25 ^a
<i>F. caperata</i> metanol	41.66±22.28 ^b
<i>R. phycopsis</i> metanol	42.23±23.18 ^b
<i>R. phycopsis</i> etanol	38.53±17.50 ^b
BHT	73.50±12.00 ^a
Askorbik asit	70.81±8.85 ^a

Veriler ortalama ± standart sapma (SD) olarak gösterildi (n = 3). Ortalamalar arasındaki istatistiksel önem “Duncan” testini takiben “one-way” varyans analizi kullanılarak araştırıldı. Aynı sütun içerisinde farklı harfler ile gösterilen ortalamalar istatistiksel açıdan önemlidir (P<0.05).

Tablo 3.22’ye göre, BHT, Askorbik asit ve *F. caperata* likeninin etanol ekstraktı arasında TBA testi aktivitesi bakımından önemli farklılıklar görülmemiştir

($p>0.05$). *R. phycopsis* likeninin etanol ve metanol ekstraktları arasında TBA testi aktivitesi bakımından önemli farklılıklar görülmezken ($p>0.05$); *F. caperata* likeninin etanol ve metanol ekstraktları arasında önemli farklılıklar görülmüştür ($p<0.05$). Ayrıca, *R. phycopsis* likeninin metanol ekstraktı ile *F. caperata* likeninin metanol ekstraktı arasında önemli farklılıklar görülmezken ($p>0.05$); *R. phycopsis* likeninin etanol ekstraktı ile *F. caperata* likeninin etanol ekstraktı önemli farklılıklar vardır ($p<0.05$).

Thadhani ve arkadaşları (2010) gerçekleştirilen bir çalışmada *R. montagnei*'den izole edilmiş eritrin maddesinin antioksidan aktivite sergilediği görülmüştür (77). Çalışmamızda ise *R. phycopsis* likeninin antioksidan aktivite sergilediği tespit edilmiştir.

4. SONUÇ

F. caperata ve *R. phycopsis* likenlerinin etanol ve metanol ekstraktlarının test mikroorganizmalarına karşı 14-26 mm arasında değişen büyüklüklerde zon çapları oluşturduğu ve bazı ekstraktların kontrol grubu olarak kullanılan antibiyotiklere kıyasla daha büyük zonlar oluşturduğu gözlemlenmiştir. Bu durum, çalışılan bazı ekstraktların kontrol olarak kullanılan antibiyotiklerden daha etkili olduğu sonucunu göstermektedir.

Çalışılan liken ekstraktlarına en dirençli bakteri *B. megaterium* iken, en duyarlı bakteri *P. vulgaris* olarak saptanmıştır.

Kullanılan ekstraktların antioksidan özelliklerinin farklı olması; ekstraksiyon sırasında farklı çözügenlerin kullanılmasından, farklı tür likenlerin kullanılmasından, aynı liken türlerinin farklı coğrafyalardan toplanmasından, likenler içersindeki antioksidan özellik gösteren maddelerin ve miktarlarının farklı olmasından kaynaklanabilmektedir.

Çalışılan liken örneklerinin ve standart antioksidan maddelerin 1000 µg/mL konsantrasyonlarındaki DPPH[•] serbest radikal giderme aktiviteleri Askorbik asit >Trolox>*F. caperata* etanol ekstraktı>*F. caperata* metanol ekstraktı> BHT>*R. phycopsis* metanol>*R. phycopsis* etanol şeklinde yazılabilir.

Çalışılan liken örneklerinin ve standart antioksidan maddelerin 1000 µg/mL konsantrasyonunda indirgeme güçleri sırasıyla BHT>Askorbik asit>*F. caperata* metanol ekstraktı>*F. caperata* etanol ekstraktı>*R. phycopsis* metanol ekstraktı>*R. phycopsis* etanol ekstraktı şeklindedir.

Kullanılan ekstraksiyon çözücüsü ve materyale bağlı olarak toplam fenol içeriği *R. phycopsis* etanol ekstraktı için 109.35-221.77 µg GAE/mg ekstrakt, *R. phycopsis* metanol ekstraktı için 106.55-212.27 µg GAE/mg ekstrakt, *F. caperata* etanol ekstraktı için 62.44-119.85 µg GAE/mg ekstrakt, *F. caperata* metanol ekstraktı için 63.5-170.14 µg GAE/mg ekstrakt olarak bulunmuştur.

Toplam flavonoid içeriği *R. phycopsis* etanol ekstraktı için 40.96-256.96 µg kateşin/mg ekstrakt, *R. phycopsis* metanol ekstraktı için 154.1-427.36 µg kateşin/mg ekstrakt, *F. caperata* etanol ekstraktı için 65.23-204.86 µg kateşin/mg ekstrakt, *F. caperata* metanol ekstraktı için 110.06-287.26 µg kateşin/mg ekstrakt olarak bulunmuştur.

Çalışılan liken ekstraktlarının ve EDTA'nın 1000 µg/mL konsantrasyonunda metal-şelat aktiviteleri sırasıyla EDTA>*R. phycopsis* metanol>*R. phycopsis* etanol>*F. caperata* metanol>*F. caperata* etanol şeklinde sıralanmaktadır.

Çalışılan liken ekstraktlarının ve standartların 1000 µg/mL'de ABTS⁺ radikali giderme aktivitesi Rutin>BHT>Askorbik asit>*R. phycopsis* etanol>*R. phycopsis* metanol>*F. caperata* metanol>*F. caperata* etanol şeklinde sıralanmaktadır.

Ekstraktların ve standartların 1000 µg/mL konsantrasyonundaki TBA testi % inhibisyon oranları *F. caperata* etanol>BHT>Askorbik asit>*R. phycopsis* metanol>*F. caperata* metanol>*R. phycopsis* etanol şeklindedir.

Çalışılan liken ekstraktlarında yapılan bütün testlerde antioksidan ve antibakteriyal aktivite gözlemlendiğinden çalışılan liken ekstraktlarının doğal bir antioksidan ve antibakteriyal kaynağı olabileceği sonucuna varılmıştır.

Likenler, doğal antioksidan ve antimikrobiyal madde kaynakları olarak sentetik antioksidanlara ve antimikrobiyal maddelere bir alternatif olarak görülebilir. Bu nedenle de, likenler içersinde antimikrobiyal ve antioksidan aktiviteden sorumlu olan maddelerin izolasyonu ve tanımlanması ile ilgili çalışmalar artırılmalıdır.

KAYNAKLAR

1. Farnsworth, N. R., Akerev, O. ve Bingel, A. S. 1985. *The Bulletin of WHO* 63: 9865-9871.
2. Vanderbank, H. 1949. Ergebnisse der Chemotherapie der Tuberculose. *Pharmazie* 4: 198-207.
3. Çetin, Ö. T. ve Sümbül, H. 2008. 21 Temmuz 1997 Yangınında Zarar Gören Düzlerçamı Bölgesi'nin (Antalya) Likenleri. *Ekoloji Dergisi* 17(67): 31-36.
4. Özdoğan, S., Durak, P. ve Bilgiç, S. 2007. Likenler Ve Kullanım Alanları. Karadeniz Teknik Üniversitesi, Giresun Fen-Edebiyat Fakültesi, Lisans Bitirme Tezi, pp.36 Giresun.
5. Vartia, K.O. 1973. Antibiotics in lichens. In: *The Lichens* (Ahmadjian, V. ve Hale, M.E., eds.) pp. 547-561, Academic Press, New York.
6. Ahmadjian, V. ve Hale, M.E. 1973. *The Lichens*. Academic Press, New York.
7. Kosanic, M. M., Rankovic, R. B. ve Stanojkovic, P. T. 2012. Antioxidant, Antimicrobial and Anticancer Activities of the Three *Parmelia* Species. *Journal of the Science of Food and Agriculture* DOI: 10.1002/jsfa.5559.
8. Manojlovic, T. N., Vasiljevic, J. P., Maskovic, Z. P., Justovic, M. ve Bogdonovic-Dusanovic, G. 2012. Chemical Composition, Antioxidant and Antimicrobial Activities of Lichen *Umbilicaria cylindrica* (L.) Delise (*Umbilicariaceae*). *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine* DOI-10.1155/2012/452431.
9. Marijana, K., Branislav, B. ve Slobodon, S. 2010. Antimicrobial Activity of the Lichen *Lecanora fustulata* and *Parmeliopsis hyperopta* and Their Divaricatic Acid and Zeorin Constituents. *African Journal of Microbiology Research* 4 (9): 885-890.

10. Yücel, O., Odabaşoğlu, F., Güllüce, M., Çalık, Z. Z., Çakır, A., Aslan, A., Yazıcı, K. ve Halıcı, M. 2007. Antioxidant and Antimicrobial Properties of a Lichen Species, *Cladonia rangiformis* Growing in Turkey. *Turkish Journal of Pharmaceutical Sciences* 4 (2): 101-109.
11. Duman, D. C. 2009. Evaluation of Usnic Acid in Some Lichens of Turkey by HPLC Analysis and Screening of their Antimicrobial Activity. *Türk Hijyen ve Deneysel Biyoloji Dergisi* 66 (4): 153-160.
12. Karagöz, A., Doğruöz, N., Zeybek, Z. ve Aslan, A. 2009. Antibacterial Activity of Some Lichen Extracts. *Journal of Medicinal Plants Research* 3 (12): 1034-1039.
13. <http://www.beslenmedestegi.com/saglik-rehberi/antioksidan-nedir> web adresinden 15 Mart 2012 tarihinde edinilmiştir.
14. Özen, T. 2003. Bazı Bitkilerin Antioksidant Aktivitesinin in Vitro ve in Vivo Araştırılması. On Dokuz Mayıs Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Doktora Tezi, pp. 103, Samsun.
15. Yılmaz, M. 2009. *Verbascum pinetorum* (Boiss) O. Kuntze Bitki Ekstraktının Antimikrobiyal ve Antioksidant Aktivitelerinin Belirlenmesi. Mustafa Kemal Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi, pp. 49, Hatay.
16. Velioğlu, Y. S., Mazza, G., Gao, L. ve Oomah, B. D. 1998. Antioxidant Activity and Total Phenolics in Selected Fruits, Vegetables and Grain Products. *Journal of Agricultural of Food and Chemistry* 46: 4113-4117.
17. Kosanić, M., Ranković, B. ve Vukojević, J. 2011. Antioxidant Properties of Some Lichen Species. *Journal of Food Science and Technology* 48 (5): 584-590.
18. Ranković, R. B., Kosanić, M. M. ve Stanojković, P. T. Antioxidant, Antimicrobial and Anticancer Activity of the Lichens *Cladonia furcata*, *Lecanora*

atra and *Lecanora muralis*. *BMC Complementary and Alternative Medicine* doi: 10.1186/ 1472-6882-11-97.

19. Paudel, B., Bhattarai, H. D., Lee, J. S., Hong, S. G., Shin, H. W. ve Yim, J. H. 2008. Antioxidant activity of polar lichens from King George Island (Antarctica). *Polar Biology* 31: 605-608.

20. Behera, B. C., Verma, N., Sonone, A. ve Makhija, U. 2005. Antioxidant and Antibacterial Activities of Lichens *Usnea ghattensis* in vitro. *Biotechnology Letters* 27: 991-995.

21. Papadopoulou, P., Tzakou, O., Vagias, C., Kefalas, P. ve Roussis, V. 2007. β -Orcinol Metabolites from the Lichen *Hypotrachyna revoluta*. *Molecules* 12: 997-1005.

22. Aslan, A., Güllüce, M., Sökmen, M., Adıgüzel, A., Şahin, F. ve Özkan, H. 2006. Antioxidant and Antimicrobial Properties of the Lichens *Cladonia foliaceae*, *Dermatocarpon miniatum*, *Evernia divaricata*, *Evernia prunastri* and *Neofuscella pulla*. *Pharmaceutical Biology* 44 (4): 247-252.

23. Karamanoğlu, K., 1971. *Türkiye'nin Önemli Liken Türleri*. Cilt:1, Sayı: 1, Ankara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi.

24. <http://dogaokulu.net/notlar/likenler.pdf> web adresinden 15 Mart 2012 tarihinde edinilmiştir.

25. Nash T. H. 1996. *Lichen Biology*. Cambridge University Press, Great Britain.

26. http://www.turk liken.org/haber_detay.asp?haber_id=28 web adresinden 15 Mart 2012 tarihinde edinilmiştir.

27. Mutlu, S. 2008. Bazı Liken Türlerinden Elde Edilen Su, Etanol ve Aseton Ekstraktlarının Antioksidant Özelliklerinin Belirlenmesi. Atatürk Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi, pp. 107, Erzurum.

28. Müller, K. 2001. Pharmaceutically Relevant Metabolites. *Applied Microbiology and Biotechnology* 56 (1-2): 9-16.
29. Ingolfssdottir, K. 2002. Usnic Acid. *Phytochemistry* 61 (7): 729-736.
30. Jigna, P. ve Chanda, V. S. 2007. In vitro Antimicrobial Activity and Phytochemical Analysis of Some Indian Medicinal Plants. *Turkish Journal of Botany* 31: 53-58.
31. Çöleri, A. 2001. *Bakterilerde Antibiyotik Direnç Mekanizmaları*. Seminer notları (basılmamış), Ankara Üniversitesi, Ankara.
32. Stoll, A., Brack, A. ve Renz, J. 1950. Die Wirkung von Flechtenstoffen auf Tuberkelbakterien und Auf Einige Andere Mikroorganismen. *Journal of Pathology and Bacteriology* 13: 729-751.
33. Lauterwein, M., Oethinger, M., Belsner, K., Peters, T. ve Marre, R. 1995. In vitro Activities of the Lichen Secondary Metabolites Vulpinic Acid, (+)- Usnic Acid Against Aerobic and Anaerobic Microorganisms. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 39 (11): 2541-2543.
34. Ingolfssdottir, K., Hjalmsdottir, M. A., Guojonsdottir, G. A., Brynjolfsdottir, A., Sigurdsson, A. ve Steingrimsson, O. 1997. In Vitro Susceptibility of Helicobacter pylori to Protolichsterinic Acid from Cetraria Lichen Substances. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 41: 215-217.
35. Fournet, A., Ferreira, M.E. Arias, A. R., Ortiz, S. T., Inchausti, A., Yaluff, G., Quilhot, W., Fernandez, E., Hidalgo, M. E. 1997. Activity of Compounds Isolated from Chilean Lichens Against Experimental Cutaneous Leishmaniasis. *Comparative Biochemistry and Physiology* 116: (1997) 51-57.
36. Dülger, B., Gücin, F. ve Aslan, A. 1998. *Cetraria islandica* (L.) Ach. Likenin Antimikrobiyal Aktivitesi. *Turkish Journal of Biology* 22: 111-118.

37. <http://www.yerkoy.bel.tr/yr4.php> web adresinden 15 Mart 2012'de edinilmiştir.
38. <http://tr.wikipedia.org/wiki/Antioksidan> web adresinden 15 Mart 2012'de edinilmiştir.
39. Kinoshita, K., Togawa, T., Hiraishi, A., Nakajima, Y., Koyama, K., Narui, T., Wang, L. ve Takahashi, K. 2010. Antioxidant Activity of Red Pigments from the Lichens *Lethariella sernanderi*, *L. cashmeriana* and *L. sinensis*. *Journal of Natural Medicines* 64: 85-88.
40. Atalay, F., Halici, M. B., Mavi, A., Çakır, A., Odabaşoğlu, F., Kazaz, C., Aslan, A. ve Küfrevioğlu, Ö. İ. 2011. Antioxidant Phenolics from *Lobaria pulmonaria* (L.)Hoffm. and *Usnea longissima* Ach. Lichen Species. *Turkish Journal of Chemistry* 35: 647-661.
41. Huneck, S. 1999. The Significance of Lichens and Their Metabolites. *Naturwissenschaften* 86: 559-570.
42. Uphof, J. C. T. 1959. *Dictionary of Economic Plants*. Hafner Press, New York.
43. <http://web.uvic.ca/~stucraw/part2NX.html> web adresinden 15 Mart 2012 tarihinde edinilmiştir.
44. Freitas, M., Costa, N., Rodrigues, M., Marques, J. ve Vieira De Silva, M. 2011. Lichens as Bio Indicators of Atmospheric Pollution in Porto, Portugal. *Journal of Biodiversity and Ecological Sciences* 1 (1): 30-39.
45. Çelik, N., Çevik, U., Çelik, A. ve Koz, B. 2008. ¹³⁷Cs and ⁴⁰K Activity Concentration Measurements and Elemental Analysis in Lichen Samples Northeastern Turkey. *Isotopes in Environmental and Health Studies* 44 (3): 315-323.
46. Saraswathy, A., Rajendiran, A. ve Sarada, A. 1990. Lichen Substances of *Parmelia caperata*. *Indian Drugs* 27: 460-462.

47. Brodo, I. M., Sharnoff, S. D. ve Sharnoff, S. 2001. *Lichens of North America*. Yale University Press, London.
48. Purvis, O.W., Coppins, B. J., Hawksworth, D. L., James, P. W. ve Moore D. M. 1992. *The Lichen Flora of Great Britain and Ireland*. Natural History Museum & British Lichen Society, London.
49. Smith, C. W., Aproot, A., Coppins, B. J., Fletcher, A., Gilbert, O. L., James, P. W. ve Wolseley, P. A. 2009. *The lichens of Great Britain and Ireland*. British Lichen Society, London.
50. Kumar, S., Dhankhar, S., Arya, V. P., Yadav, S. ve Yadav, J. P. 2012. Antimicrobial Activity of *Salvadora oleoides* Decne. Against Some Microorganisms. *Journal of Medicinal Plants Research* 6 (14): 2754-2760.
51. Murray P. R., Baron E. J., Pfaller M. A., Tenover F. C. ve Tenover R. H. 1995. *Manual of Clinical Microbiology*. ASM Press, Washington, DC.
52. Šarić, C. L., Čabarkapa, S. I., Beljkaš, M. B., Mišan, C. A., Sakač, B. M. ve Plavšić, V. D. 2009. Antimicrobial Activity of Plant Extracts from Serbia. *Food Processing, Quality and Safety* 1(2): 1-5.
53. Yiğit, D., Yiğit, N., Aktaş, E. ve Özgen, U. 2009. Ceviz (*Juglans regia* L.)’in Antimikrobiyal Aktivitesi. *Türk Mikrobiyoloji Cemiyeti Dergisi* 39 (1-2): 7-11.
54. Tepe, B., Sökmen, M., Akpulat, H. A. ve Sökmen, A. 2006. Screening of the Antioxidant Potentials of Six *Salvia* Species from Turkey. *Food Chemistry* 95: 200-204.
55. Brand-Williams, W., Cuvelier, M. ve Berset, C. 1995. Use of a Free Radical Method to Evaluate Antioxidant Activity. *Lebensmittel-Wissenschaft und-Technologie - Food Science and Technology* 28: 25-30.

56. Oyaizu, M. 1986. Studies on product of Browning Reaction Prepared from Glucose Amine. *Japanese Journal of Nutrition* 44: 307–315.
57. Slinkard K. ve Singleton V. L. 1977. Total Phenol Analysis: Automation and Comparison with Manual Methods. *American Journal of Enology and Viticulture* 28: 49–55.
58. Zhishen, J., Mengcheng, T. ve Jianming, W. 1999. The Determination of Flavonoid Contents in Mulberry and Their Scavenging Effects on Superoxide Radicals. *Food Chemistry* 64: 555-559.
59. Dinis T. C. P., Madeira V. M. C. ve Almeida L. M. 1994. Action of Phenolic Derivates (Acetoaminophen, Salicylate and 5-Aminosalicylate) as Inhibitors of Membrane Lipid Peroxidation and as Peroxyl Radical Scavengers. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 315: 161–169.
60. Arnao, M. B., Cano, A. ve Acosta, M. 2001. The Hydrophilic and Lipophilic Contribution to Total Antioxidant Activity. *Food Chemistry* 73: 239-244.
61. Kahraman, S. 2009. Labada (*Rumex cristatus* DC)’nın Antioksidan Aktivitesi. İstanbul Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Doktora Tezi, pp. 109, İstanbul.
62. Güder, A. 2008. *Urtica dioica* L. ve *Malva neglecta* Wallr. Bitkilerinin ve Karışımlarının Antioksidan Aktivitelerinin Belirlenmesi. 19 Mayıs Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi, pp.108, Samsun.
63. Kikuzaki, H. ve Nakatani, N. 1993. Antioxidant Effects of Some Ginger Constituents. *Journal of Food Science* 58: 1407–1410.
64. Albayrak, A. 2006. Ceviz Yaprakları Özütleri Ve Juglonun Bazı Mikroorganizmalar Üzerine Etkisi. Dumlupınar Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi, pp. 35, Kütahya.

65. Demirhan, A., Yeşil, Ö. F., Yıldız, A. ve Gül, K. 2007. Bazı Makrofungus Türlerinin Antimikrobiyal Aktiviteleri Üzerine Bir Araştırma. *Fırat Üniversitesi Fen ve Mühendislik Bilimleri Dergisi* 19 (4): 425-433.
66. Mitrović, T., Stamenković, S., Cvetković, V., Tošić, S., Stanković, M., Radojević, I., Stefanović, O., Čomić, L., Đačić, D., Ćurčić, M. ve Marković, S. 2011. Antioxidant, Antimicrobial and Antiproliferative of Five Lichen Species. *Internetal Journal of Molecular Sciences* 12: 5428-5448.
67. www.utas.edu.tr/scieng/nexus/nexus_v2/nexus2_pdfs/N2dehaan.pdf web adresinden 16 Mart 2012 tarihinde edinilmiştir.
68. Karthikaidevi, G., Thirumaran, G., Manivannan, K., Anantharaman, P., Kathiresan, K. ve Balasubaramanian, T. 2009. Screening of the Antibacterial Properties of Lichen *Roccellabelangeriana* (Awasthi) from Pichavaram Mangrove (*Rhizophora* sp.). *Advances In Biological Research* 3 (3-4): 127-131.
69. Balaji, P., Bharath, P., Satyan, R. S. ve Hariharan, G. N. 2006. In Vitro Antimicrobial Activity of *Rocella montagnei* Thallus Extracts. *Tropical Journal of Pharmaceutical Research* 7 (2): 169-173.
70. Dahake, P. A., Chakma, C. R., Chakma, C. ve Joshi, D. 2010. Antimicrobial and Anti-Inflammatory Activity of *Rocella belangeriana*. *Research Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry* 2 (1): 18-21.
71. Logesh, A. R., Thillaimaharai, K. A., Sharmila, K., Kalaiselvam, M. ve Raffi, S. M. 2012. Production of Chitosan From Endolichenic Fungi Isolated from Mangrove Environment and Its Antogonistic Activity. *Asian Pasific Journal of Tropical Biomedicine* 2 (2): 140-143.
72. Gülçin, İ. 2006. Antioxidant and Antiradical Activities Of L-Carnitine. *Life Sciences* 78: 803-811.

73. Gülçin, İ., Mshvildadze, V., Gepdiremen, A. ve Elias, R. 2006. Antioxidant Activity of a Triterpenoid Glycoside Isolated from the Berries of *Hedera colchica*: 3-o-(β -D-glucopyranosyl)-Hederogenin. *Phytotherapy Research* 20: 130-134.
74. Stojanović, G., Stojanović, I., Stankov-Jovanović, V., Mitić, V. ve Kostić, D. 2010. Reducing Power and Radical Scavenging Activity of Four *Parmeliaceae* Species. *Central European Journal of Biology* 5 (6): 808-813.
75. Hatano, T., Edamatsu, R., Mori, A., Fujita, Y. ve Yasuhara, E. 1989. Effect of Interaction of Tannins with Co-Existing Substances. Effects of Tannins and Related Polyphenols on Superoxide Anion Radical And DPPH Radical. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin* 37: 2016-2021.
76. Brudzynski, K. ve Miotto, D. 2012. The Relationship Between the Content of Maillard Reaction Like Products and Bioactivities of Canadian Honeys. *Food Chemistry* 124 (3) : 869-874.
77. Thadhani, V. M ., Choudhary, M.I., Anderson, R. J. ve Karumaratne, V. 2010. Novel Entry into 5-Decarbocydibenzofurans via Smiles Arrangement of the Lichen Para-depside, Erythrin. *Journal of Chemical Research* 34 (3): 154-157.

ÖZGEÇMİŞ

28. 02. 1985 tarihinde İstanbul ilinde doğdu. İlkokul öğrenimini Burhaniye İlköğretim Okulunda, ortaokul öğrenimini Ali Fuat Başgil okulunda, lise öğrenimini Halide Edip Adıvar Süper lisesinde tamamlamıştır. 2003 yılında girdiği K.T.Ü. Giresun Fen Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümünden 2007 yılında Giresun Fen Edebiyat Fakültesi birincisi olarak mezun oldu. 2007 yılında Giresun Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümünde Araştırma Görevlisi olarak çalışmaya başladı. Giresun Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Yüksek lisans programında öğrenim görmeye devam etmektedir.