



GİRESUN ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

BİYOLOJİ ANABİLİM DALI  
DOKTORA TEZİ

*PARMOTREMA PERLATUM* (HUDSON) M. CHOISY (PARMELIACEAE) VE  
*PROTOPARMELIOPSIS MURALIS* (SCHREB) M. CHOISY (LECANORACEAE)  
TÜRLERİNİN ANTİMİKROBİYAL, ANTİOKSİDAN VE ANTİTİROZİNAZ  
AKTİVİTELERİNİN ARAŞTIRILMASI

SİNEM AYDIN

TEMMUZ 2017

GİRESUN ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

BİYOLOJİ ANABİLİM DALI  
DOKTORA TEZİ

*PARMOTREMA PERLATUM* (HUDSON) M. CHOISY (PARMELIACEAE) VE  
*PROTOPARMELIOPSIS MURALIS* (SCHREB) M. CHOISY  
(LECANORACEAE) TÜRLERİNİN ANTİMİKROBİYAL, ANTİOKSİDAN VE  
ANTİTİROZİN AZ AKTİVİTELERİNİN ARAŞTIRILMASI

SİNEM AYDIN

TEMMUZ 2017

Fen Bilimleri Enstitü Müdürünün Onayı.

.../.../...

Prof. Dr. Başak TAŞELİ

Müdür

Bu tezin Doktora tezi olarak BİYOLOJİ Anabilim Dalı standartlarına uygun olduğunu onaylarım.

Prof. Dr. İhsan AKYURT

Anabilim Dalı Başkanı

Bu tezi okuduğumu ve Doktora tezi olarak bütün gerekliliklerini yerine getirdiğini onaylarım.

Doç. Dr. Kadir KINALIOĞLU

Danışman

Jüri Üyeleri

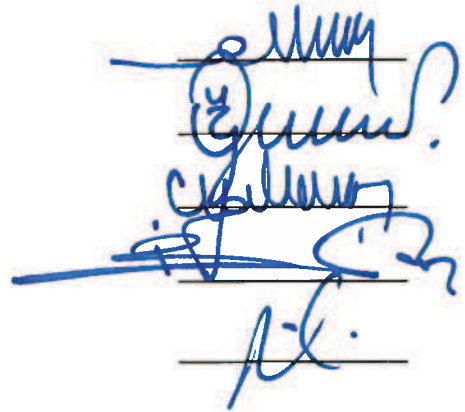
Doç. Dr. Kadir KINALIOĞLU

Prof. Dr. Öznur ERGEN AKÇİN

Doç. Dr. Emine YALÇIN

Doç. Dr. Beyhan TAŞ

Doç. Dr. Bahar BİLGİN SÖKMEN



## ÖZET

*PARMOTREMA PERLATUM* (HUDSON) M. CHOISY (PARMELIACEAE) VE  
*PROTOPARMELIOPSIS MURALIS* (SCHREB) M. CHOISY (LECANORACEAE)  
TÜRLERİNİN ANTİMİKROBİYAL, ANTİOKSİDAN VE ANTİTİROZİNAZ  
AKTİVİTELERİNİN ARAŞTIRILMASI

AYDIN, Sinem

Giresun Üniversitesi

Fen Bilimleri Enstitüsü

Biyoloji Anabilim Dalı, Doktora Tezi

Danışman: Doç. Dr. Kadir KINALIOĞLU

TEMMUZ 2017, 104 sayfa

Bu doktora tezinde, *Protoparmeliopsis muralis* ve *Parmotrema perlatum* liken türleri kurutulup öğütüldükten sonra su, etanol ve kloroform çözücülerini kullanılarak Sokslet ekstraksiyonuna tabi tutulmuştur. Likenlerden elde edilen ekstraktların test mikroorganizmaları üzerine olan antimikrobiyal aktiviteleri disk difüzyon yöntemi, Minimum İnhibisyon Konsantrasyonu (MİK), Minimum Bakteriyosidal Konsantrasyon (MBC)/Minimum Fungisidal Konsantrasyonu (MFC) yöntemleri kullanılarak denenmiştir.

*P. muralis* likeni test bakterilerine karşı *P. perlatum* likenine oranla daha yüksek antimikrobiyal aktivite sergilemiştir. Ekstraktların antimikrobiyal aktiviteleri kloroform ekstraktı> Etanol ekstraktı> su ekstraktı şeklinde sıralanmaktadır.

Likenlerin antioksidan aktiviteleri toplam fenolik içeriği, toplam flavonoid içeriği, metal şelatlama aktivitesi, toplam antioksidan kapasitesi, troloks eşdeğer antioksidan kapasitesi ve bakır iyonları indirgeme kapasitesi (CUPRAC) gibi çeşitli metodlarla belirlenmiştir. En yüksek toplam fenol içeriği *P. perlatum* likeni etanol ekstraktında; en yüksek toplam flavonoid içeriği ise *P. muralis* likeninin etanol ekstraktında saptanmıştır. Liken ekstraktları Etilen Diamin Tetra Asetik Asit (EDTA)'dan daha

düşük metal şelatlama aktivitesi sergilemiştir. En yüksek CUPRAC aktivitesi *P. perlatum* likeni kloroform ekstraktında bulunmuştur.

Ayrıca, ekstraktların antitirozinaz aktiviteleri de incelendi. Her iki liken türünün yalnızca etanol ekstraktlarının tirozinaz inhibisyonu gösterdiği belirlendi. Çalışılan diğer ekstraktlarda ise herhangi bir aktiviteye rastlanmadı.

Elde edilen verilere göre, *P. muralis* ve *P. perlatum* liken türlerinin sentetik antimikrobiyal, antioksidan ve tirozinaz inhibitörü ajanlarına bir alternatif olabilecekleri sonucuna varılmıştır.

**Anahtar Kelimeler:** Liken, Antimikrobiyal Aktivite, Tirozinaz İnhibitörü.

## ABSTRACT

EXPLOITATION OF ANTIMICROBIAL, ANTIOXIDANT AND  
ANTITYROSINASE ACTIVITIES OF *PARMOTREMA PERLATUM* (HUDSON)  
M. CHOISY (PARMELIACEAE) VE *PROTOPARMELIOPSIS MURALIS*  
(SCHREB) M. CHOISY (LECANORACEAE) SPECIES

AYDIN, Sinem

Giresun University

Graduate School of Natural and Applied Sciences

Department of Biology, Postgraduate Thesis

Supervisor: Assoc. Prof. Dr. Kadir KINALIOĞLU

JULY 2017, 104 pages

In this postgraduate thesis, *Protoparmeliopsis muralis* and *Parmotrema perlatum* lichen species were dried and powdered then they were subjected Soxhlet extraction using water, ethanol and chloroform solvents. Antimicrobial activity of extracts that were obtained from lichens were tested on test microorganisms by using disc diffusion method, Minimum Inhibition Concentration (MIC), Minimum Bakteriocidal Concentration (MBC)/Minimum Fungicidal Concentration (MFC) *P. muralis* lichen exhibited more antimicrobial activity when compared with *P. perlatum* lichen. Among antimicrobial activities of the extracts increases in the following order: chloroform extract > ethanol extract > water extract.

Antioxidant activity of the lichens were evaluated by different methods such as total phenolic content, total flavonoid content, metal chelating activity, trolox equivalent antioxidant capacity and copper reducing antioxidant capacity (CUPRAC). Whereas the highest total phenolic content was determined in the ethanol extract of *P. perlatum* lichen; the lowest total phenolic content was determined in the ethanol extract of *P. muralis* lichen. Lichen extracts were exhibited lower metal chelating activity than Etilen Diamine Tetra Asetic Acid (EDTA). The highest CUPRAC activity was found in chloroform extract of *P. perlatum*.

Moreover, antityrosinase activity of the extract were examined. Only ethanol extract of the both lichens showed tyrosinase inhibition, any activity in the other extracts didn't found.

According to the obtained data, it is concluded that *P. muralis* and *P. perlatum* lichen species extracts might be an alternative to synthetic antioxidant, antimicrobial and antityrosinase agents.

**Key Words:** Lichen, Antimicrobial Activity, Tyrosinase Inhibitor.



## TEŞEKKÜR

Doktora eđitimimin her aŐamasında desteđini esirgemeyen, bilgi birikimini ve tecrubesini benimle paylaŐan, tez konusunun dűzenlenmesinde ve deđerlendirilmesinde ilgi ve desteđi ile bana yol gűsteren danıŐman Hocam Sayın Dođ. Dr. Kadir KINALIOđLU'na sonsuz teŐekkűrű bir borç bilirim.

FEN-BAP-C-140316-02 numaralı proje dahilinde, mevcut çalıŐmaya maddi imkan sađlayan Giresun Őniversitesi Rektűrlűđű Bilimsel AraŐtırma Projeleri Koordinasyon Birimine de çok teŐekkűr ederim.

ÇalıŐmalarım boyunca desteđini gűrdűđűm tűm dostlarıma, ideallerimi gerçekleŐtirmemde desteklerini benden hiçbir zaman esirgemeyen eŐime ve bu gűnlere gelmemde bűyűk emekleri olan anne ve babama da Őűkranlarımı sunuyorum.



## İÇİNDEKİLER

ÖZET.....	I
ABSTRACT .....	III
TEŞEKKÜR.....	V
İÇİNDEKİLER .....	VI
TABLolar DİZİNİ.....	IX
ŞEKİLLER DİZİNİ .....	X
SİMGE VE KISALTMALAR DİZİNİ.....	XI
1. GİRİŞ .....	1
1.1.Likenlerin Antimikrobiyal Aktiviteleri .....	7
1.2. Likenlerin Antioksidan Aktiviteleri .....	12
1.3. Likenlerin Tirozinaz İnhibisyonu Aktiviteleri .....	17
1.4. Çalışmanın Amacı.....	22
2. MATERYALVE METOT .....	23
2.1. Materyal.....	23
2.1.1.Kullanılan Kimyasal Maddeler .....	23
2.1.2. Kullanılan Cihazlar .....	23
2.1.3.Liken Materyalleri .....	24
2.1.4. Liken Materyallerinin Toplandığı Lokaliteler.....	24
2.1.5. Kullanılan Bakteri ve Mantarlar.....	25
2.1.6. Antioksidan Aktivite Tayininde Kullanılan Kimyasallar ve Hazırlanışı .....	26
2.1.6.1. Folin-Ciocalteu Reaktifi .....	26
2.1.6.2. NaNO <sub>2</sub> Çözeltisi .....	27
2.1.6.3. AlCl <sub>3</sub> .6H <sub>2</sub> O Çözeltisi .....	27
2.1.6.4. H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> Çözeltisi .....	27
2.1.6.5. Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> .12H <sub>2</sub> O Çözeltisi .....	27
2.1.6.6. (NH <sub>4</sub> ) <sub>6</sub> Mo <sub>7</sub> O <sub>24</sub> .4H <sub>2</sub> O Çözeltisi .....	27
2.1.6.7. ABTS çözeltisi.....	27
2.1.6.8. FeCl <sub>2</sub> Çözeltisi.....	27
2.1.6.9. Ferrozin çözeltisi .....	27
2.1.6.10. CuCl <sub>2</sub> .2H <sub>2</sub> O Çözeltisi .....	27
2.1.6. 11. NH <sub>4</sub> Ac Tamponu .....	28

2.1.6.12. Neokuproin çözeltisi.....	28
2.1.7. Antitirozinaz Aktivitesinin Belirlenmesi için Kullanılan Çözeltilerin Hazırlanması .....	28
2.1.7.1. L-Tirozin çözeltisi.....	28
2.1.8. Antimikrobiyal Aktivite Tayininde Kullanılan Besiyerilerin Hazırlanması .....	28
2.1.8.1. Bakteriler için Besiyeri Hazırlanışı.....	28
2.1.8.2. Mantarlar için Besiyeri Hazırlanışı.....	28
2.2. METOT .....	28
2.2.1. Liken Ekstraktlarının Hazırlanışı .....	28
2.2.2. Ekstraksiyon Verimleri .....	29
2.2.3. Liken Ekstraktlarının Antimikrobiyal Aktivitesinin Belirlenmesi.....	29
2.2.3.1. Bakteri ve Mantar Kültürlerinin Hazırlanması .....	29
2.2.3.2. Antibakteriyal Aktivitenin Belirlenmesi.....	29
2.2.3.3. Antifungal Aktivitenin Belirlenmesi .....	30
2.2.3.4. MİK Değerinin Belirlenmesi .....	31
2.2.3.5. MBK/MFK Değerlerinin Belirlenmesi.....	31
2.2.4. Liken Ekstraktlarının Antioksidan Aktivitelerinin Belirlenmesi .....	32
2.2.4.1. Toplam Fenolik İçeriği .....	32
2.2.4.2. Toplam Flavonoid İçeriği .....	32
2.2.4.3. Metal Şelatlama Aktivitesi.....	32
2.2.4.4. Troloks Eşdeğer Antioksidan Kapasitesi (TEAC).....	33
2.2.4.5. Toplam Antioksidan Kapasitesi.....	33
2.2.4.6. CUPRAC Deneyi .....	33
2.2.5. Antitirozinaz Aktivitesinin Belirlenmesi .....	33
2.2.6. İstatistiksel Analiz.....	34
3. ARAŞTIRMA BULGULARI .....	35
3.1. Ekstraksiyon Verimi (%).....	35
3.2. Antimikrobiyal Aktivite .....	35
3.3. Antioksidan Aktivite .....	46
3.3.1. Toplam Fenolik İçeriği .....	46
3.3.2. Toplam Flavonoid İçeriği.....	47

3.3.3. Metal Şelatlama Aktivitesi .....	48
3.3.4. Toplam Antioksidan Kapasitesi .....	50
3.3.5. TEAC Deneyi .....	51
3.3.6. CUPRAC Deneyi .....	52
3.4. Antitirozinaz Aktivitesi .....	54
4. TARTIŞMA VE SONUÇ .....	57
KAYNAKLAR .....	73
ÖZGEÇMİŞ .....	94



## TABLÖLAR DİZİNİ

### TABLO

2.1. Çalışmalarda kullanılan cihazlar ve markaları.....	23
2.2. Kullanılan mantar ve kodları.....	26
2.3. Kullanılan bakteri ve kodları.....	26
3.1. Liken ekstraktlarının yüzde verimleri .....	35
3.2. Liken ekstraktlarının inhibisyon zonu değerleri .....	40
3.3. Liken ekstraktlarının MİK değerleri .....	42
3.4. Liken ekstraktlarının MBK/MFK değerleri .....	44
3.5. Liken ekstraktlarının toplam fenolik içerikleri .....	46
3.6. Liken ekstraktlarının toplam flavonoid içerikleri .....	48
3.7. Liken ekstraktlarının ve EDTA'nın metal şelatlama aktivitesi.....	49
3.8. Liken ekstraktlarının toplam antioksidan kapasiteleri .....	51
3.9. Liken ekstraktlarının TEAC değerleri.....	52
3.10. Liken ekstraktlarının ve BHT'nin CUPRAC değerleri .....	53
3.11. Liken ekstraktlarının ve kojik asitin antitirozinaz aktiviteleri değerleri .....	55

## ŞEKİLLER DİZİNİ

### ŞEKİL

1.1. Antioksidanlar ve serbest radikaller.....	15
1.2. Tirozinaz enziminin yapısı.....	18
2.1. <i>Protoparmeliopsis muralis</i> .....	25
2.2. <i>Parmotrema perlatum</i> .....	25
3.1. <i>Protoparmeliopsis muralis</i> likeninin <i>Staphylococcus aureus</i> (a), <i>Bacillus subtilis</i> (b), <i>Gordonia rubripertincta</i> (c), <i>Proteus vulgaris</i> (d), <i>Enterobacter aerogenes</i> (e), <i>Bacillus cereus</i> (f) ve <i>Staphylococcus cohnii</i> (g) üzerine etkileri.....	37
3.2. <i>Parmotrema perlatum</i> likeninin <i>Staphylococcus aureus</i> (a), <i>Bacillus subtilis</i> (b), <i>Gordonia rubripertincta</i> (c), <i>Proteus vulgaris</i> (d), <i>Enterobacter aerogenes</i> (e), <i>Bacillus cereus</i> (f) ve <i>Staphylococcus cohnii</i> (g) üzerine etkileri.....	38
3.3. <i>Parmotrema perlatum</i> ve <i>Protoparmeliopsis muralis</i> likenlerinin <i>Saccharomyces cerevisiae</i> (a), <i>Candida albicans</i> (b) ve <i>Candida tropicalis</i> üzerine etkileri.....	39
3.4. Gallik asit standart grafiği.....	46
3.5. Kateşin standart grafiği.....	47
3.6. Askorbik asit standart grafiği.....	50
3.7. Troloks standart grafiği.....	52

## SİMGELER DİZİNİ

°C	Santigrat derece
g	Gram
Mg	Miligram
µg	Mikrogram
µL	Mikrolitre
mL	Mililitre
mm	Milimetre
nm	Nanometre
%	Yüzde

## KISALTMALAR DİZİNİ

ATCC	American Type Culture Collection
MHB	Müller Hinton Broth
MHA	Müller Hinton Agar
SDA	Sabaroud Dekstroz Agar
SDB	Sabaroud Dekstroz Broth
MİK	Minimal İnhibisyon Konsantrasyonu
MBK	Minimal Bakteriyosidal Konsantrasyonu
MFK	Minimal Fungisidal Konsantrasyonu
ABTS	2,2'-Azino-bis (3-etilbenzenothiazoline-6-sülfonik asid)
BHT	Bütillenmiş Hidroksitoluen
GAE	Gallik Asit Eşdeğeri
QE	Kateşin Eşdeğeri
DMSO	Dimetil Sülfoksit
EDTA	Etilen Diamin Tetra Asetik Asit
IC <sub>50</sub>	%50 İnhibisyon Sağlayan Konsantrasyon
ROT	Reaktif Oksijen Türleri

## 1. GİRİŞ

Tıbbi bitkiler ilk çağlardan itibaren halk hekimliğinde ilaç olarak kullanılmaktadır. İnsan ve bitkiler arasındaki bu etkileşim neticesinde, günümüzde tüm dünyada önemli bir yere sahip olan ve üzerinde ciddi çalışmaların gerçekleştiği etnobotanik bilim dalı ortaya çıkmıştır (1). Etnobotanik, deneme yanılma sayesinde elde edilerek ve nesilden nesile aktarılacak bitkilerin bilimsel olarak değerlendirilmelerine de önemli katkılar sağlamaktadır (2).

Tıbbi bitkiler, Dünya Sağlık Örgütü (WHO) tarafından “bir ya da daha fazla kısmının tedavi edici ya da hastalıkları engelleyici özelliklere sahip olduğu ve kimyasal farmasötik bir sentezin öncüsü olabilen bitki” olarak tarif edilmektedir (3).

Sentetik ilaçların öncülleri olmaları ve sentetik ilaçlara model teşkil etmeleri, kullanıldıktan sonra vücutta toksik etkilere neden olmamaları, ucuz ve kolay elde edilebilmeleri gibi avantajları nedeniyle tıbbi bitkilerin kullanımında artış görülmektedir (4).

Doğal kökenli ilaçların gelişmiş ülkelerde kullanım oranı % 60 dolaylarındayken, gelişmekte olan ülkelerde % 4 civarındadır (5). Dünya nüfusunun yaklaşık % 80'i geleneksel tedavide tıbbi bitkilerden faydalanmaktadır (6). WHO'a göre günümüzde kullanılan tıbbi ve aromatik bitkilerin sayısı 20.000 civarındadır. Bu bitkilerden elde edilen 4.000 drog sıklıkla kullanılmaktadır (7).

Son zamanlarda alternatif ilaç terimi çok yaygın olarak kullanılmaktadır. Alternatif ilaç, tıbbi bitkiler iyileştirici özellikleri nedeniyle sentetik ilaçlara alternatif olarak kullanılmaktadır. Tıbbi bitkiler aktif bileşiklerin (laksatifler, kan incelticiler, antibiyotikler vb.) ekstraksiyonunda ham materyal olarak kullanılmaktadır (8).

Bitkilerden üretilmiş ilaçlar tarih öncesi dönemlerden beri insan hastalıklarının yanı sıra hayvan hastalıklarının tedavisinde de kullanılmaktadır. Bitkilerin çevrelerindeki bakteriyel da mantar büyümelerini inhibe eden, çevrelerindeki diğer bitkilerin gelişimini düzenleyen bazı biyoaktif moleküller ürettikleri bilinmektedir (9).

Bitkilerin iyileştirici özelliği doğal yapılarında bulunan ve sekonder bileşikler olarak isimlendirilen kimyasalların ve bu kimyasalların değişik kombinasyonlarından kaynaklanmaktadır (10).

Tıbbi bitkiler sinerjik ilaçlardır. Bu bitkilerin içerdikleri bileşikler eş zamanlı olarak etki eder. Bu nedenle de kullanımları bitkinin içerdği bazı bileşiklerin diğer bileşiklere zarar vermesini ya da diğer bileşiklerin olası negatif etkilerinin ortadan kaldırılmasına da neden olmaktadır. Tıbbi bitkiler resmi olarak satılan ilaçlara da destek olmaktadır. Kanser gibi kompleks hastalıklarda bitki bileşenlerinin çok etkili oldukları kanıtlanmıştır. Ayrıca, tıbbi bitkiler bazı hastalıkların görülmesini engelleyebildiklerinden ve hatta mevcut olan hastalıklarda kullanılan sentetik ilaçların yan etkilerini de azaltabildiklerinden koruyucu ilaçlardır (8).

Geçmişteki fitoterapi uygulamaları ile günümüzdeki fitoterapi uygulamaları arasındaki en önemli değişiklik bitkilerin tamamının kullanılması yerine fayda sağlayan kısımlarının tedavide kullanılmasıdır. Bu durum bitkinin diğer faydasız ve yan etkiye sahip olan kısımlarından hastayı uzak tutmaktadır. Almanya, fitoterapinin en çok geliştiği ülkedir (11).

Yüksek yapılı bitkilerde olduğu gibi likenlerde eski çağlardan beri doğal ilaç kaynakları olarak kullanılmaktadır. Likenler aminoasit türevleri, şeker alkolleri, alifatik asitler, makrosiklik laktonlar, monosiklik aromatik bileşikler, kinonlar, kromanlar, ksantonlar, dibenzofuranlar, depsidler, depsidonlar, depsonlar, terpenoidlerde oluşan ve liken bileşikleri olarak adlandırılan pek çok metabolit üreten ve filamentsi bir fungus ve fotosentetik bir partnerden (ökaryotik alg ya da siyanobakteri) oluşan zorunlu simbiyotik birlikteliklerdir. (9, 12). Mikobiyont mantar olup birlikteliğin baskın olan partneridir. Fotobiyont ise alg ya da siyanobakteridir. Likenler alg ve mantarın tek başına hayatta kalamayacağı tropikal bölgelerden kutup bölgelerine kadar pek çok ekstrem çevre koşullarında kolaylıkla hayatta kalabilirler (13).

Likenler insan ve diğer hayvanların besin maddesi olarak, tıbbi amaçlı, boya kaynağı olarak, parfüm endüstrisinde, biyolojik indikatör olarakta kullanılmaktadır. Acı



tadları ve besinsel değerlerinin azlığı nedeniyle insanlar tarafından genellikle kıtlık zamanlarında kullanılmıştır) (Örn: *Umbilicaria* Hoffm., *Cetraria islandica* (L.) Ach., *Bryoria fremontii* (Tuck.) Brodo & D. Hawksw. (14).

Likenlerin böcek larvalarının likenlerle beslenmelerine karşı caydırıcı ve nematosidal etkiye sahip olduğu da görülmüştür (15).

Likenler liken asitleri olarak bilinen maddeleri sentezlerler. Oluşturulan maddeler birliğin üyeleri tarafından ayrı ayrı sentezlenememektedir. Bu da likenlerde bulunan bazı kimyasal maddelerin sentezinde simbiyoz yaşamın önemini ve zorunluluğunu göstermektedir (16).

Likenlerin görsel olarak en karakteristik özelliklerinden birisi de, renkli ve göz alıcı talluslarıdır. Talluslarındaki bu dikkat çekici renkler kimyasal açıdan kompleks moleküllerden (likin maddeleri) kaynaklanmaktadır. Bu maddeler, mikobiyont tarafından üretilir ve liken tallusunun üst kısımlarında ya da iç kısımlarında biriktirilir. Likenlerin kimyasal ve farmakolojik özellikleri ilk kez 1907'de Zopf tarafından çalışılmıştır. Biyosentezleri göz önünde bulundurulduğunda, liken metabolitleri aromatik liken maddeleri, alifatik liken maddeleri ve karbonhidratlar olmak üzere 3 ana sınıfa ayrılmaktadır. Likin metabolitlerinin bazıları UV absorpsiyonunda, substrattan likene mineral temin etmede, böcek, solucan, nematod gibi canlılara karşı savunmada toksin olarak rol oynarlar (17).

Likenler primer ve sekonder olmak üzere iki farklı tip metabolit üretir. Primer metabolitler yapısal görevlere sahiptir olup ve hücre metabolizmasında rol oynarlar. Primer metabolitler hücre içi olup her iki simbiyont tarafından da bağımsız olarak sentezlenebilir. Primer bileşikler çoğunlukla kitin, likenin, izolikenin, hemiselüloz, pektinler, disakkaritler, polialkoller, aminoasitler, enzimler ve algel kromoforlara benzer pigmentlerden oluşur. Sekonder metabolitler ise mantar tarafından üretilerek mantar hücrelerinin dışına doğru salınırlar ve tallusun değişik kısımlarında çoğunlukla üst korteks ya da üreme organı gibi spesifik yapılarda kristal olarak birikirler. Sekonder metabolitlerin mantar orjinli oldukları Culberson ve Armaleo, Hamada ve arkadaşları, Kan ve arkadaşları, Stocker-Worgotter ve Elix' in çalışmalarıyla da

doğrulanmıştır. Liken sekonder metabolitleri çoğunlukla mantar kökenli olmasına rağmen sekonder kimyasalların üretimi için mantar ve alg arasındaki metabolik etkileşim gereklidir. Liken sekonder maddeleri tallusun kuru ağırlığının % 20'sini oluşturmaktadır. Ancak bu oran bazı likenlerde % 5-10 arasında değişmektedir (12).

Molnar ve Farkas'a göre 1050 liken metaboliti (laboratuvar şartlarında sentezlenenler de dahil) tanımlanmıştır, bu metabolitlerin pek çoğunun yalnızca likenlere özgü olduğu düşünülmektedir (18).

Likenler tarafından sentezlenen sekonder metabolitlerin çoğunun önemli fonksiyonlara sahip olduğu bildirilmiştir (13). Metabolitler güneş ışığını filtreleyerek liken birliğindeki fotobiyontların aşırı radyasyondan etkilenmelerine engel olmaktadır. Mikrobiyal degradasyona karşı korunmada antibiyotik özelliklere sahiptirler. Atranorin, fumarprotosetrarik asit, giroforik asit, lekanorik asit, fisodik asit, protosetrarik asit, stiktik asit ve usnik asitin, insan, hayvan, bitki patojeni, mikotoksin üreticisi ve besin bozulmalarına neden olan pek çok bakteri ve mantara karşı oldukça güçlü bir antimikrobiyal etki göstermektedir. Ayrıca, sekikaik asit, lekanorik asit ve lobarik asit gibi pek çok depsidin rutinle kıyaslanabilir radikal süpürme aktivitesine sahip olduğu da bildirilmiştir (13). Bunun yanı sıra bazı liken türlerinin antipiretik, analjezik, antiinflamatuvar, antiproliferatif ve sitotoksik etkilere de sahip olduğu bilinmektedir (12).

Diğer organizmalarla karşılaştırıldığında likenlerin biyolojik aktiviteleri ile ilgili yapılan çalışmalar oldukça azdır. Liken bileşiklerinin biyolojik aktiviteleri ile ilgili deneysel verilerin az olmasının nedeni, liken tallusunun yavaş büyümesi ve laboratuvar koşulları altında liken mikobiyontunun kültüre edilmesinin ve yaşayabilirliğinin sınırlı olmasıdır (19).

*Teloschistes chrysophthalmus* (L.) Th. Fr' dan ekstrakte edilen parietin, Jünün ve Taccribe arenavirüsleri için virüsidal aktivite göstermiştir. Likenlerde oldukça yaygın metabolitlerden olan likenan'ın tütün mozaik virüsünü inhibe ettiği kanıtlanmıştır (15).

Likenler dünya çapında araştırılan önemli bir potansiyel antikanser ilacıdır. Liken sekonder metabolitlerinin antikanser ilacı olarak kullanımı 1960'larda liken polisakkaritlerinin tümör hücrelerine karşı aktivite gösterdiği çalışmalara dayanmaktadır (12).

Literatürlerde liken metabolitlerinin oldukça kuvvetli sitotoksik etkilere sahip oldukları belirtilmektedir. Liken bileşiklerindeki farklı fonksiyonel grupların pozisyonu sitotoksite seviyesini de etkilemektedir. Hücre döngüsünün düzenlenmesi kanser hücrelerinin büyümesi ve gelişimi için çok önemlidir. Bazı liken bileşiklerinin kanser hücrelerinin büyümelerini sub G1 ya da S fazında durdurduğu saptanmıştır. Likenlerdeki polisakkaritlerden özellikle b-glukan ve galaktomannan'ın çoğu kanser hücresine karşı aktif olduğu belirlenmiştir (12).

1844'da izole edildiğinden beri en sık çalışılan liken metabolitlerinden olan usnik asitin insan lösemi hücresi (K562) ve endometriyal karsinoma (HEC50) hücrelerine karşı antiproliferatif etki gösterdiği tespit edilmiştir. Bir liken bileşiği olan pannarin insan prostat karsinoma DU-145 ve insan melanoma M14 hücrelerindeki apoptozisi azaltmak suretiyle hücre büyümesini inhibe ettiği görülmüştür. Liken polisakkariti olan CFP-2, HL-60 ve K562 hücrelerinin yaşayabilirliğini azaltmıştır. *Cetraria islandica*'dan izole edilmiş protolikesterinik asit göğüs kanseri hücrelerinin büyümesini inhibe etmiştir (15).

15. yüzyılda yazılmış olan işaretler doktrini bir bitkinin görüntüsüne göre bir hastalığı iyileştirebileceğinden bahsetmektedir. Bu doktrin, geleneksel Hindistan ilacı (Ayurveda), geleneksel Çin ilacı ve batı tıbbi herbalizminin temelini oluşturmaktadır (20). Liken kelimesi Yunanca bir kelime olan leprozdan köken alır ve soyulmuş cilt görünümü nedeniyle cilt hastalıklarının tedavisinde kullanılır. *Lobaria pulmonaria* (L.) Hoffm. likeni akciğerlerle ilgili ve kafatası ile ilgili hastalıkların tedavisinde kullanılmıştır. Benzer şekilde, sarı renkli olan *Xanthoria parietina* (L.) Th. Fr. sarılık tedavisinde kullanılmıştır (20).

Likenlerin tıbbi kullanımları 18. yüzyıla kadar dayanmaktadır. İlk kez 18. yüzyılda *Evernia prunastri* (L.) Ach. likeni ilaç olarak kullanılmıştır. Bazı likenlerin öksürük, kuduz, sarılık ve saç kayıplarını tedavi etmede kullanıldığı iddia edilmektedir.

Tıbbi bitkilerle ilgili metinlerde *Cladonia* P. Browne, *Evernia* Ach., *Lobaria* (Schreb.) Hoffm., *Parmelia* Ach., *Peltigera* Willd., *Pertusaria* DC., *Physcia* (Schreb.) Michx., *Roccella* DC., *Usnea* Dill. ex Adans. ve *Xanthoria* (Fr.) Th. Fr. gibi likenlerin isimleri de geçmektedir. 1753'de Linnaeus *Peltigera* sp.'yi *Letharia* *Lichen caninus* (köpek likeni) olarak adlandırmıştır. Bu liken alt yüzeyindeki rizinleri nedeniyle kuduz için spesifiktir. *Peltigera canina* (L.) Willd. karaciğer toniği ve laksatif olarak kullanılmıştır. *P. aphthosa* (L.) Willd. İrlanda'da solucan ilacı olarak kullanılmıştır (20).

*Letharia vulpina* (L.) Hue Güney Kaliforniya'da mide hastalıklarında kullanılmaktadır. Waorani'ler *Dictyonema* C. Agardh ex Kunth'un yeni bir türünü halüsinojen olarak kullanmaktadır. *Alectoria usneoides* (Ach.) Ach. dalak büyümesi tedavisinde Araplar tarafından kullanılmıştır (20).

*Usnea diffracta* Vainio Çin'de ilaç olarak kullanılmıştır. Hipokrat *Usnea barbata* Fr.'yi rahim rahatsızlıkları için tavsiye etmiştir. *Parmelia saxatilis* (L.) Ach. İsveç'te siğillerin tedavisinde kullanılmaktadır. *Lethariella cashmeriana* Krog, *Lethariella sernanderi* (Motyka) Obermayer, *Lethariella sinensis* J.C. Wei & Y.M. Jiang ve *Thamnolia vermicularis* J.C. Wei & Y.M. Jiang Çin'de tıbbi çay olarak kullanılmaktadır. *Usnea* sp. Çin'de homeopatik tedavide kullanılmaktadır. *Usnea* sp. yatıştırıcı özelliklere sahiptir, ağız ve gırtlak mukozası inflamasyonlarında kullanılmaktadır (20).

Likenlerin İspanyol halk ilacı olarak kullanıldığı belgelenmiştir. *Pseudevernia furfuracea* (L.) Zopf Alfacar ve Viznar'da solunum yolu hastalıklarında kullanılmaktadır. *Ramalina bourgeana* Mont. ex Nyl. diüretik olarak kullanılır ve taş düşürücü özelliklere sahiptir (20).

Polonya'nın Quollahuaya Andeans yerlileri, kalp krizleri ve araba tutmalarına karşı *Flavocetraria nivalis* Mont. ex Nyl. likeninden hazırlanan çayı kullanmaktadır (20).

*Cetraria islandica* İrlanda yosunu olarak bilinmektedir. Bu tür akciğer hastalıkları, böbrek ve mesane şikayetlerinde kullanılmasının yanı sıra iştah açıcı ve hazımsızlık giderici olarak da kullanılmaktadır. Öte yandan Avrupa'da halk ilacı olarak kanser tedavisinde kullanılmaktadır (20).

Ren geyiği likenleri de önemli tıbbi likenlerdendir. *Cladonia rangiferina* (L.) F. H. Wigg. sıklıkla çalışılan ren geyiği likenlerinden biridir. Bu tür soğuk algınlığı, artrit, ateş ve diğer sağlık problemlerinin tedavisinde tıbbi çay olarak kullanılmaktadır. Ren geyiği likenleri iltihaplı eklemlerin ağrılarını hafifletmede lapa olarak kullanılmaktadır (20).

*Parmelia nepalensis* Taylor Nepal'de diş ağrıları ve boğaz ağrılarının tedavisinde kullanılmaktadır. *Thamnia vermicularis* Batı Himalayalarda antiseptik olarak, *Heterodermia diademata* (Taylor) D. D. Awasthi ise Sikkim'de kesik ve yaraların tedavilerinde kullanılmaktadır (20).

Bizim çalışmamızı oluşturan türlerden birinin sinonimi olan *Parmelia chinense* (= *Parmelia perlatum*) auct. ve *Parmelia sancti-angeli* Lynge Hindistan geleneksel ilaçlarında kullanılmaktadır. Bu türlerden *P. chinense* Hindistan'da diüretik ve yara iyileştirici toz olarak kullanılmaktadır. *P. sancti-angeli* ise mantar hastalıklarının tedavisinde kullanılmaktadır. Bu likenin külü hardal ya da keten yağı ile karıştırılarak hastalıklı bölgeye uygulanır (20).

### **1.1. Likenlerin Antimikrobiyal Aktiviteleri**

Enfeksiyon hastalıkları, insanlığın varoluşundan bu yana bütün toplumları etkileyen en önemli problemlerden biri olmuştur. Eski çağlardan beri enfeksiyon etkeni olan bakterilere karşı pek çok organik ve inorganik kimyasal, tütsü ve boya kullanılmıştır.

Kemoterapötik ilaçların çok düşük miktarları dahi mikroorganizmalar üzerinde yüksek miktarda zarar verici etkiye sahip olmasına rağmen, konakçı organizma üzerinde çok az ya da hiçbir etkiye sahip değildir (21). Bir maddenin enfeksiyon hastalıklarında etkili olabilmesi için mikroorganizmalar üzerinde zararlı etki gösterirken, konakçı hücreler için nispeten zararsız olması gerekmektedir. Bu özellik antibiyotikleri dezenfektan ve antiseptiklerden ayıran ana noktadır (21).

Antibiyotikler; bazı bakteri veya mantar türleri tarafından elde edilen ya da yarı sentetik olarak üretilen ve diğer mikroorganizmaların gelişmesini ve üremesini önleyen ya da onlar üzerinde öldürücü etkiye sahip olan maddelerdir (21).

Antibiyotiklerin keşfi sırasında mevcut bakterilerin bu antibiyotiklere karşı direnç geliştirebileceği ve yeterli tedbirler alınmadığında mevcut antibiyotiklerin enfeksiyon hastalıklarının önlenmesinde etkisini kaybedebileceği ve bu nedenle de insanlığın antibiyotik öncesindeki döneme yeniden dönebileceği düşünülmektedir. Geçmişte antibiyotiklerle enfeksiyon hastalıklarının çoğu tedavi edilebilmiş ancak antibiyotiklerin hatalı kullanımı sonucu yeni bulunan her antibiyotiğe karşı bazı bakterilerin kısa sürede direnç gösterdiği görülmüştür. Örneğin *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* ve enterokok gibi hastane enfeksiyonlarından izole edilen patojenlerde sıklıkla çoklu ilaç direnci rastlanılmaktadır (22).

Antibiyotik direnci gelişmiş ülkelerde her yıl yüksek ölüm oranlarına neden olan ciddi ve yaygın problemlerden biridir. Antibiyotiklerin uygunsuz kullanımı antibiyotik direncini etkileyen en önemli faktördür. Çoklu ilaç direnci günümüzdeki ilaçların bakteriler üzerindeki etkisini gittikçe azaltmakta ve tedavilerde de önemli derecelerde başarısızlıklara neden olmaktadır. Antibiyotiklerin neredeyse tüm önemli antibiyotik grupları (tetrasiklin, sefalosporin, aminoglikozit ve makrolidler) “Altınçağ” döneminde keşfedilmiştir. Günümüzde bu heyecan verici bileşikler artan mikrobiyal direnç nedeniyle etkinliklerini kaybetme tehlikesi ile karşı karşıyadır (23).

Özellikle son yıllarda, bulaşıcı hastalıklara ve hastane enfeksiyonlarına yol açan birçok mikroorganizma türü tedavi amacıyla yararlanılan mevcut antibiyotiklerin çoğuna karşı direnç geliştirmiştir. Bağışıklık sisteminde baskıya neden olan ve kemoterapiye bağımlı bireyler ile AIDS hastalarında görülen fırsatçı enfeksiyonlar açısından durum daha sıkıntılıdır. Yüksek zehir etkilerinden dolayı pek çok antifungal ve antiviral ilacın kullanımı da sınırlandırılmıştır (24).

Antibiyotik direnç, antibakteriyel ilaçların etkinliğinin azaltmakta, hastalıkların iyileşmesini zorlaştırmakta, maliyeti artırmakta ve hatta imkansız hale getirmektedir. Özellikle antibiyotik direncinin savunmasız hastalarda yol açtığı en sık sonuçlar hastalık süresinin uzaması ve artan ölüm oranlarıdır. Bu durum, yeni antimikrobiyal ajanların geliştirilmesini zorunlu hale getirmiştir (25).

Doğal ürünler günümüzün yeni ilaçlarının ana kaynaklarını oluşturmaktadır. Bu doğal ürünler, prokaryot bakteri, ökaryot mikroorganizmalar ve hayvanlardan elde edilmektedir (23). Antibiyotik direncinden korunmanın alternatif yollarından biride bakterilere karşı bitkilerden daha güvenli, daha etkili ve daha düşük maliyetli alternatif terapötik ajanlar elde etmektir (25). Bitki bileşenleri sadece direkt ya da terapötik ajan olarak kullanılmazlar. Bunlar ilaç sentezi için başlangıç materyali ya da farmakolojik olarak aktif bileşiklere model olarak da kullanılmaktadır (26). Bilimsel bulgularbitkilerin biyolojik olarak aktif kimyasal yapılar oluşturduklarını ve günümüzde kullanılan pek çok ilacın bitki kökenli maddelerin analogları olduğu hipotezini desteklemektedir (27).

Antimikrobiyal etkinliğe sahip bitki bileşiklerinin etki mekanizması ile ilgili pek çok hipotez ileriye sürülmüştür. Bitkisel bileşikler doğrudan ya da dolaylı yoldan mikroorganizmaların hücrelerinin biyokimyasal olaylarını etkilemekte ve onların hücre zarlarının fizikokimyasal bütünlüğüne zarar vermektedir. Hücre zarının fizikokimyasal yapısının bozulması sonucunda proton hareketi ve elektron akışı taşınımında eksiklikler oluşarak hücre içeriğinin koagülasyonu meydana gelmektedir. Antimikrobiyal özellikli bileşikler mikroorganizmaların hücre duvarında bulunan proteinleri de etkilemektedir (28).

Liken metabolitlerinin antibiyotik özellikleri likenlerin en fazla çalışılan biyolojik aktivitelerinden biridir. Likenlerin antibiyotik özellikleri ile ilgili ilk çalışma Burkholder ve arkadaşları tarafından yapılmıştır. Burkholder ve arkadaşları 42 liken türünün su ekstraktlarını *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli* bakterilerine karşı aktivitesini denemiştir. Bu likenlerden 27 tanesi *S. aureus* ve/ya da *B. subtilis*'e karşı aktifken, hiçbir liken türü *E. coli*'ye karşı aktivite göstermemiştir. Liken bileşikleri yalnızca duyarlı bakteri suşlarına karşı değil çoklu ilaç dirençli bakterilere karşı da etki göstermektedir. Ayrıca, liken metabolitlerinin tıbbi araçlarla ya da sinerjistik etki için diğer antibiyotiklerle birleştirilmesi, bakteriyal biyofilm oluşumuna karşı bu cihazların ve antibiyotiklerin aktivitelerini de yükseltmiştir (29).

Likenlerde binden fazla metabolit tanımlanmasına rağmen, oldukça az sayıda liken türü antibiyotik özellikleri bakımından araştırılmıştır. Vartia'nın denediği likenlerin % 50'sinden fazlası antibiyotik aktivite göstermiştir. Bu sonuçlar, liken ekstraktlarının ve liken metabolitlerinin araştırılması için çok daha fazla çaba sarfedilmesi gerektiğini göstermektedir (30).

Cezayir'den toplanan *Evernia prunastri* ve *Ramalina farinacea* (L.) Ach. likenlerinin esansiyel yağlarının antimikrobiyal aktivitelerinin araştırılmasını konu alan bir çalışmada bu likenlerin esansiyel yağlarının oldukça düşük antimikrobiyal etkiye sahip olduğu görülmüştür (31).

Bir Himalaya likeni olan *Cetrelia olivetorum* (Nyl.) Culb. & C. Culb. likeninin kültüre edilmiş tallusunun metanol ekstraktının antimikrobiyal potansiyel sergilediği belirlenmiştir (32).

*Parmotrema tinctorum* (Delise ex Nyl.) Hale likeninden elde edilen 2-propanol bileşiğinin çalışılan test bakterilerine karşı etkili olduğu gözlemlenmiştir (33).

Güney Amerika'nın değişik bölgelerinden toplanan 36 farklı liken türünün 4 bakteri suşuna (*Staphylococcus aureus*, metisiline dirençli *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus aureus* COL, *Escherichia coli* ve *Pseudomonas aeruginosa*) karşı aktiviteleri incelenmiş ve *Lobaria pulmonaria* dışındaki diğer tüm liken



ekstraktlarının bakteriyal suşlar üzerinde aktivite gösterdiği belirlenmiştir. Bu araştırmada, bakteriyal hücre ölümüne yol açan liken metabolitleri olan usnik asit ve vulpinik asitin inhibisyon mekanizmaları da incelenmiştir (12).

*Flavoparmelia caperata* (L.) Hale, *Evernia prunastri*, *Hypogymnia physodes* (L.) Nyl. ve *Cladonia foliaceae* (Huds.) Willd. likenlerinin metanol ekstraktlarının çeşitli bakteri suşları üzerindeki aktivitelerinin incelendiği çalışmada, en güçlü antibakteriyel etkinin *H. physodes* ve *C. foliaceae* likenleri tarafından gösterildiği belirlenmiştir. Ayrıca, *E. prunastri* ve *H. physodes*'in kuvvetli antifungal etki gösterdiği kaydedilmiştir. *E. prunastri* en iyi etkiyi mayalara karşı, *H. physodes* ise filamentsi mantarlara karşı sergilemiştir (15).

Ülkemizde de likenlerin antimikrobiyal etkinliği ile ilgili çalışmalar gerçekleştirilmiştir. Örneğin, Bursa'dan toplanan *Ramalina farinaceae* ve *Usnea intermedia* Jatta likenlerinin antimikrobiyal aktivite çalışmalarında *R. farinaceae* likeninin en yüksek aktiviteyi *Salmonella enteritidis* ve *Candida albicans* türlerine, *U. intermedia* likeninin ise *Streptococcus pyogenes* ve *C. albicans* türlerine karşı gösterdiği bulunmuştur (34).

*Physcia aipolia* (Ehrh. ex Humb.) Furnr, *Xanthoria parietina*, *Usnea florida* (L.) F. H. Wigg., *Usnea subflorida* (Zahlbr.) Motyka ve *Melanohalea exasperata* (De Not.) O. Blanco, A. Crespo, Divakar Essl., D. Hawksw&Lumbsch türlerinin metanol ve kloroform ekstraktlarının antimikrobiyal aktivite çalışmalarında *Enterococcus faecalis* ve *Staphylococcus aureus*'a karşı aktivite göstermediği ve *P. aipolia* türü dışındaki diğer liken türlerinin *Candida albicans*'a karşı orta derecede aktivite gösterdiği ortaya konmuştur (35).

*Ramalina farinaceae*, *Ramalina fastigiata* (Pers.) Ach. ve *Ramalina fraxinea* (L.) Ach. türlerinin metanol ekstraktlarının MİK değerlerinin 64 µg/mL ve 512 µg/mL arasında değiştiği kaydedilmiştir (36).

*Usnea intermedia*, *Usnea filipendula* (Ach.) Nyl. ve *Usnea fulvoreaegens* (Räsänen) Räsänen likenlerinin metanol ekstraktlarının antimikrobiyal aktivite sergilediği belirlenmiştir (37).

## **1.2. Likenlerin Antioksidan Aktiviteleri**

Vücutta meydana gelen reaktif oksijen türleri (ROT) ve serbest radikaller biyolojik moleküllerde hasarlara neden olmaktadır.

Serbest radikaller, genellikle bir elektronunu kaybeden ve bir oksijen atomu içeren moleküller olarak tanımlanmaktadır. Elektron eksiklikleri nedeniyle komşu moleküllerin elektronlarına göz dikerler. Deoksiribonükleik asit (DNA)'e saldırarak fonksiyon bozukluğu, mutasyon ve kanserlere neden olabilirler. Enzimlere ve proteinlere de zarar verebilirler. Kan damarlarımızı döşeyen hücrelerin zarlarında oluşan bir hasar, atardamarların sertleşmesine ve kalınlaşmasına bunun sonucunda da kalp krizi ve felçlere neden olabilir. Serbest radikaller kollajendeki protein yapılarına da saldırarak protein molekülleri arasında çapraz bağlar oluşturup dokularda sertliklere yol açmaktadır (38).

Serbest radikal üretimi devamlı ve kaçınılmaz bir süreçtir. Serbest radikaller vücutta olumlu etkilere sahiptir. Serbest radikallerin yıkıcı güçleri bağışıklık sistemi ve inflamatuvar reaksiyonlarında kullanılabilir. Buna rağmen bazen bu süreç kontrolden çıkarak aşırı miktarda serbest radikal üretilen bir zincirleme reaksiyona dönüşebilir. Bu da bedende yıkımlara yol açmaktadır (38).

Oksijen insan yaşamı için elzem olmasına rağmen, normal metabolik süreçler sırasında üretilen ROT'lar vücuda zarar verebilmektedir. ROT'ların çoğu serbest radikallerden oluşur. ROT'ların yaşlanmaya yol açtığı, kalp damar hastalıkları, çeşitli kanser türleri, katarakt, bağışıklık sisteminin zayıflaması, sinir sisteminde dejeneratif hastalıklar gibi pek çok hastalığa neden olduğu bildirilmiştir (39).

Asbest, ozon, hipoklorid, kükürt dioksit, mineral tozlar gibi bazı kirleticiler, radyasyon, pestisitler, herbisitler, demir, bakır, kadmiyum gibi iyonlar, çözücüler, sigara dumanı, alkol, güneş ışınları, stres, çeşitli tıbbi tedavi yolları ve kontamine

sular gibi birçok faktör oksijen türevli serbest radikallerin meydana gelmesine zemin hazırlamaktadır (40). Bazı enzimlerin (ksantin oksidaz, aminoasit oksidaz vb.) katalitik döngüleri sonucunda serbest radikaller meydana gelebilmektedir (41).

Ayrıca endoplazmik retikulum membranı ve diğer membranlarda bulunan enzim sistemleri doymamış yağ asitlerini ve organizma için yabancı olan maddeleri okside ederek serbest radikal oluşturur (42). Reaktif oksijen türleri kloroplastlarda, mitokondride ve plazma membranındaki elektron taşıma zincirinde yan ürünler olarak da meydana gelebilir (43).

Enfeksiyonlara karşı vücudun tepkisini başlatan başlıca hücreler makrofajlar, nötrofiller ve eozinofillerdir. Fagositik faaliyetler sırasında çeşitli serbest oksijen radikalleri meydana gelir. Fagosite edilmiş mikroorganizma, serbest radikallerin etkisiyle yok edilir. Öte yandan, bu oksidan ürünler hücrelerin antioksidan savunma güçlerini aştığında normal konakçı hücrelerine zarar vererek çeşitli hastalıkları meydana getirirler (44).

Oksijenli ortamda yaşam, oksidatif fosforilasyonla adenzintrifosfat (ATP) üretimi açısından önemli ölçüde yarar sağlarken birtakım tehlikeleri de beraberinde getirmektedir. Güçlü reaktif özelliği bulunan serbest radikaller, biyolojik moleküllerle etkileşerek yeni serbest radikal oluşumuna neden olan zincirleme bir reaksiyona yol açarlar (44).

Organizmada sürekli reaktif oksijen ve azot türleri üretilmekte, buna karşılık antioksidan sistem tarafından istenilmeyen bu etkiler giderilmektedir. Bu durum bir denge içinde sürekli olarak devam etmektedir. Bu dengenin oksidanlar lehine bozulması durumu oksidatif stres olarak isimlendirilir. Oksidatif stres durumunda ROT ve azot türlerinin reaksiyon hızları artar. Bu durumdan lipitler, proteinler ve nükleik asitler gibi pek çok sistem olumsuz etkilenir (45).

Oksidatif strese karşı çok duyarlı olan beyin ROT üretmek yoluyla nöronlarda hasara neden olmaktadır. Beyin dokusunda oluşan hasarlar sonucunda beyin iskemisi, hafıza bulanıklığı, Alzheimer, Parkinson gibi birçok sinirsel hastalık meydana gelmektedir.

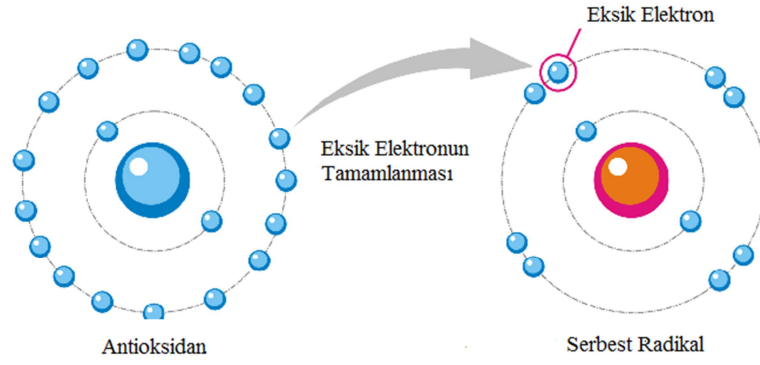
Serbest radikaller proteinlerdeki tiyol (-SH) gruplarının oksidasyonuna neden olarak oksidatif protein hasarlarına yol açar (46). Proteinler serbest radikallerden etkilenmesi sonucunda sülfür radikalleri oluşur ve yapısında disülfid bağları bulunan proteinlerin tersiyer yapıları bozular (41).

Hidroksil radikalının DNA molekülünün bileşenleriyle reaksiyona girerek pürin ve pirimidin bazlarına ve deoksiriboz iskelete de zarar verdiği bilinmektedir (46). Son yıllarda yapılan araştırmalarda oksidatif DNA hasarının göstergesi olarak baz hasarları gösterilmektedir. Oksidatif hasar sonucu meydana gelen genetik materyal hasarı, mutajenez ve yaşlanmanın ilk adımıdır (44).

Hücre dışında meydana gelen serbest radikaller, hücrenin diğer kısımlarıyla etkileşime girebilmek için ya plazma membranını geçmeli ya da toksik reaksiyonları membranda başlatmalıdır. Membran yapısındaki doymamış yağ asitleri, fosfolipitler, gliserol ve steroller serbest radikallere karşı oldukça hassastır. Serbest radikallerin neden olduğu lipid peroksidasyonu hücre membranı iyon geçirgenliğinin bozulmasına, sekresyon fonksiyonlarında kayıplara neden olabilir (47). Lipid peroksidasyonu, hücre membranına direkt ya da oluşturdukları reaktif aldehitlerle diğer hücre bileşenlerine dolaylı olarak zarar verebilen bir süreçtir (48).

Oksidatif stresin ROT'un neden olduğu birçok hastalığa etkisi olduğu bilinmektedir. İskemi/reperfüzyon hasarı (49, 45), ateroskleroz, yaşlanma (50), Alzheimer hastalığı, Parkinson hastalığı (51, 52), Kronik Obstrüktif Akciğer Hastalığı (KOAH) (53), felç, kanser, hipertansiyon, alerji, astım, inflamasyon, katarakt, multiple skleroz gibi pek çok hastalığa oksijen serbest radikallerinin de etki ettiği bildirilmiştir (54-56).

Serbest radikallerin yol açtığı oksidasyonları engelleyen, serbest radikalleri yakalama ve onları dengede tutma özelliğinde olan maddeler antioksidan olarak isimlendirilmektedir (38). Antioksidan maddeler endojen (enzimatik) ve eksojen (enzimatik olmayan) olarak 2'ye ayrılır. Antioksidan savunmada öncelikli olan enzimatik antioksidanlardır (SOD, katalaz, glutatyon redüktaz vb.) Enzimatik olmayan antioksidan savunmada esansiyel mikro besin bileşiklerinin (tokoferoller, askorbik asit, karotinoidler, polifenoller, flavonoidler) önemli bir yeri vardır (44).



**Şekil 1.1** Antioksidan ve serbest radikaller (57)

Özellikle bitkisel kaynaklardan elde edilen doğal ürünler antioksidanlar gibi davranarak oksidatif stresi azaltma yeteneğine sahiptir (58).

Tıbbi bitkilerin antioksidan içerikleri serbest radikallerin neden olduğu hastalıklara karşı korunmaya katkı sağlamaktadır. Doğal antioksidanların tüketilmesi dejeneratif hastalıkların neden olduğu ölüm oranı ve hasta olma oranı ile de ilişkilidir. Doğal kaynaklı antioksidan ajanlar serbest radikal süpürme aktiviteleri nedeniyle özel bir ilgi kazanmıştır (59).

Tıbbi bitkilerde olduğu gibi likenlerde de antioksidan özelliğe sahip pek çok bileşik bulunmaktadır (örneğin, sekikaik asit, homosekikaik asit, umbilikarik asit, lekanorik asit, giroforik asit, divarikatik asit, pannarin, benzoik asit, difraktaik asit, vikanisin, atranorin, zeorin, protosetrarik asit, salazinik asit, usnik asit, evernik asit, fisodik asit, barbatik asit ve ramalin) (60). Fenolik bileşikler olan mantar melaninlerinin pek çoğu likenlerde sentezlenir ve UV-B ışığını absorbe etmek ve fotobiyontu aşırı radyasyona karşı korumak için tallusta biriktirilir. Bu ışığı koruyucular güçlü antioksidan kapasiteye sahiptir ve kozmetik endüstrisinde de koruyucu madde olarak kullanılabilir (15).

Dünyanın çeşitli bölgelerinde likenlerin antioksidan aktivitelerini inceleyen pek çok araştırma mevcuttur.

75'ten fazla liken türünün ve likenlerden izole edilmiş 65 metabolitin radikal süpürme aktivitesi, lipid peroksidasyon inhibisyonu ve indirgeme gücü gibi parametreleri incelenmiş ve çalışılan likenlerin antioksidan kapasiteye sahip oldukları ortaya konmuştur (61).

Hindistan'dan toplanan *Parmotrema austrosinense* (Zahlbr.) Hale, *Parmotrema hababianum* (Gyelnik) Hale ve *Parmotrema tinctorum* likenlerinin petrol eteri, etil asetat, aseton, etanol ve su ekstraktlarının antioksidan potansiyellerini çalışılmıştır. Analizler sonucunda en yüksek toplam antioksidan kapasite *P. tinctorum* likeninin aseton ekstraktında bulunurken, *P. hababianum* ve *P. austrosinense* likenlerinin metanol ve benzen ekstraktları ise yüksek serbest radikal süpürme aktivitesi sergilemiştir (62).

Tıbbi olarak kullanılan *Ramalina pacifica* Asahina ve *Roccella montagnei* Bel. isimli liken türlerinin kloroform, etil asetat, etanol ve metanol ekstraktlarının toplam fenolik içeriği, 2,2-difenil-1-pikrilhidrazil (DPPH) serbest radikal süpürme aktivitesi ve indirgeme gücü incelenmiştir. *R. pacifica*'nın etanol ekstraktında kuvvetli DPPH radikal süpürme ve indirgeme gücü aktivitesine rastlanılmıştır. En yüksek fenolik içeriğin ise *R. montagnei*'nin etil asetat ve etanol ekstraktlarında saptanmıştır (63).

*Ramalina nervulosa* (Müll. Arg.) Abbayes likeninin metanol, petrol eteri ve su ekstraktlarının total fenolik ve flavonoid içeriklerinin, serbest radikal süpürme aktivitelerinin ve bakır iyonu indirgeme güçlerinin incelendiği bir araştırmada en yüksek toplam fenolik ve flavonoid içeriği su ekstraktlarında saptanırken, her üç ekstraktın kuvvetli serbest radikal süpürme aktivitesine ve bakır iyonu indirgeme gücüne sahip olduğu bulunmuştur (64).

Türkiye'de de likenlerin antioksidan etkileri ile ilgili çalışmalar yapılmıştır. Örneğin, *Anaptychia ciliaris*, *Bryoria fuscescens* (Gyelnik) Brodo & D. Hawksw, *Parmotrema chinense* ve *Xanthoria candelaria* (L.) Th. Fr. likenlerinin metanol ekstraktlarının oksidatif strese karşı insan lenfositlerindeki AFB1'in malondialdehit seviyelerini ve superoksit dismutaz, glutatyon peroksidaz, glutatyon aktivitelerini etkilediği görülmüştür (65).

*Pseudevernia furfuracea* likeninden izole edilen olivetorik asit ve fisodik asit antioksidan aktivite sergilemiştir (66).

*Usnea intermedia*, *Usnea filipendula* ve *Usnea fulvoreagens* likenlerinin aseton, etanol ve metanol ekstraktlarının toplam fenolik içeriklerinin ve toplam antioksidan kapasitelerinin araştırıldığı bir çalışmada, en yüksek toplam fenolik içeriği ve toplam antioksidan aktivite sırasıyla *U. fulvoreagens*'in metanol ekstraktında ve *U. filipendula*'nın aseton ekstraktında saptanmıştır (37).

*Ramalina farinacea*, *Ramalina fastigiata* ve *Ramalina fraxinea* likenlerinin aseton, etanol ve metanol ekstraktlarının toplam fenolik içerikleri ve antioksidan kapasiteleri çalışılmış ve her üç liken türünde metanol ekstraktında en yüksek toplam fenolik içerik saptanmıştır (36).

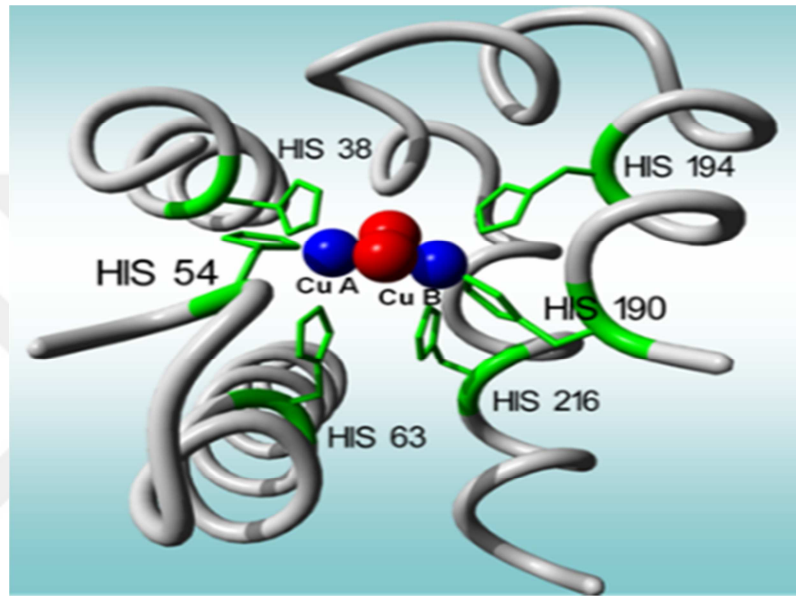
Buçukoğlu ve arkadaşları Orta Anadolu'dan topladıkları *Umbilicaria aprina* Nyl., *Umbilicaria cylindrica* (L.) Delise ex Duby, *Umbilicaria decussata* (Vill.) Zahlbr., *Umbilicaria leiocarpa*, *Umbilicaria nylanderiana* (Zahlbr.) H. Magn. ve *Umbilicaria virginis* Schaerer'in metanol ekstraktlarının ve bu likenlerden izole edilen giroforik asitin toplam fenolik içerikleri ve DPPH radikali süpürme aktivitesini incelemiş ve sonuçta en yüksek toplam fenolik içeriğini *U. nylanderiana*'da, en yüksek DPPH aktivitesini ise giroforik asitte belirlemişlerdir (67).

### **1.3. Likenlerin Tirozinaz İnhibisyonu Aktiviteleri**

Enzimler, hücre çoğalması, enerjinin ya da besinlerin çevreden alınması ve enerjinin dönüşümü, metabolitlerin taşınması ve kısaca metabolizma olarak tanımlanan bütün hücre fonksiyonlarının gerçekleştirilmesinde gerekli olan biyokatalizörlerdir (68).

Enzimler, canlı hücreler tarafından biyolojik yollarla sentezlenmesine rağmen aktivite göstermeleri için hücre içinde bulunmaları şart değildir. Enzimler, kimyasal reaksiyonların normalden en az milyon defa daha hızlı gerçekleşmesini sağlarlar. Katalizlenmemiş bir reaksiyonun dengeye varması yavaş yavaş olmasına rağmen enzimlerin varlığında birkaç saniyede gerçekleşebilmektedir (44).

Tirozinaz enziminin (E.C. 1.14.18.1) sistematik adı; 1,2-benzendiol:oksijen oksidoredüktazdır. Tirozinaz polifenol oksidaz, fenolaz, katekol oksidaz adıyla da bilinmektedir. İlk kez 1856 yılında Schobenbein tarafından mantar içinde keşfedilmiştir (69). Şekil 2’de tirozinaz enziminin yapısı belirtilmektedir. Bu enzimin aktif merkezinde her biri üç histidin amino asidine bağlanmış iki bakır atomu yer almaktadır. Aktif merkezdeki iki bakır atomu ile iki tane oksijen atomu etkileşim halindedir (44).



Şekil 1.2 Tirozinaz enziminin yapısı (70)

Tirozinaz ismi enzimin substrat olarak tirozin ve dihidroksifenilalanine karşı spesifikliğı nedeniyle verilmiştir. Enzimlerin etkinliklerinin in vivo ve in vitro aktivitelerinin bazı aktif bileşikler tarafından azaltılması ve yok edilmesine inhibisyon ismi verilmektedir. Bu duruma yol açan bileşiklere de inhibitör adı verilir (56). Tirozinaz enzimini inhibe etme özelliğine sahip bileşiklere ise tirozinaz inhibitörü adını almaktadır (71).

Tirozinaz, tirozinden oksidasyon yoluyla melanin ve diğer pigmentlern üretimini katalizleyen bakır içeren bir enzimdir. Tirozinaz, cilt melanositlerinde sentezlenen melanozomların içersinde bulunur (72). Tirozinaz enzimi memelilerin cilt, göz ve saçlarındaki pigmentlerden sorumludur (73).



Tirozinaz genindeki bir mutasyon, tip 1 okulokutan albinizm hastalığına neden olmaktadır. Tirozinaz enzimi birçok bitki dokusunda, bazı mantarlarda ve böceklerde de bulunmaktadır. Yüksek yapılı bitkilerde enzim, bitkiyi böcek ve mikroorganizma saldırılarına karşı koruyan ve kurumayı engelleyici bir melanin tabakası meydana getirmektedir. Tirozinaz enziminin böceklerin dış iskeletlerinin sertleşmesine yardımcı olduğu ve böcekleri mikroorganizmalara karşı koruduğu ileri sürülmüştür (74-75).

Tirozinaz enzimi böceklerde yara iyileşmesi, böceklerde deri değişimi sonrası kutikulanın sertleşmesi, melanin sentezi ve parazit kapsüllenmesi gibi pek çok önemli fonksiyona sahiptir. Bu önemli fonksiyonlarından dolayı bazı insektisitler tirozinaz enzimini inhibe etmeyi amaçlamaktadır (72).

Tirozinaz enzimi insanlar için de önemli bir yere sahiptir. Bu enzimin kullanıldığı en önemli noktalardan biri melanin sentezidir. Melanin, deriyi ultraviyole ışınlarından koruma ve ROT'lerini giderme gibi önemli fonksiyonlara sahiptir. (76).

Melanoma sırasında tirozinaz aktivitesi kontrol edilmezse bu durum melanin sentezinde artışa neden olur (72). Lokal hiperpigmentasyon lentigo, ben ve çil gibi pek çok cilt rahatsızlığına neden olmaktadır. Akne ve egzema da hiperpigmentasyona neden olmaktadır. Diğer bir hiperpigmentasyon çeşidi olan melazma ise hamilelik döneminde hormonlar nedeniyle meydana gelmektedir (73). Tirozinaz enziminin aktivitesinin azaltılması ile hiperpigmentasyonla alakalı cildin melazma ve yaşlılık benekleri gibi olumsuzlukların ortadan kaldırılması amaçlanmaktadır (72).

Tirozinaz enzimi, Parkinson hastalığında da önemli bir yere sahiptir. Dopa, tirozinaz enzimi etkisiyle fenilalaninin yükseltgenmesi neticesinde meydana gelen kimyasal bir maddedir. Dopa, Parkinson hastalığının tedavisinde başarı gösteren bir bileşiktir (77).

Gerek sağlık ve kozmetik gerekse gıda endüstrisinde tirozinaz enziminin birçok uygulama alanı bulunmaktadır. Tirozinaz, meyve ve sebzelerin işlenmesinin ardından enzimatik kararmaya neden olarak ürünün kalitesini düşürerek maddi

kayıplara da yol açmaktadır. Bu olumsuzluklar nedeniyle, bu alanda yapılan çalışmalarda hasat ve işleme sonrasında enzimin aktivitesini minimuma indirebilmek amaçlanmaktadır (44).

Flavonoid ve stilbenoid gibi pek çok polifenol, substrat analogları, serbest radikal süpürücülerin ve bakır şelatlarının tirozinaz enzimini inhibe ettiği bilinmektedir. Tıbbi ve kozmetik endüstrileri ciltle ilgili problemleri tedavi etmek için tirozinaz inhibitörleri üzerinde yoğunlaşmıştır (73).

Melanin sentezi inhibitör aktivitesi içeren doğal ürünler, cilt beyazlatıcı olarak da ilgi çekmektedir. Her gün büyüyen kozmetik endüstrisi pazarı ve daha iyi besin işleme tekniklerine karşı artan talepler nedeniyle yeni antitirozinaz bileşiklere devamlı ihtiyaç duyulmaktadır. Pek çok antitirozinaz bileşiği elde edilmesine rağmen, bitki kaynakları güvenilir ve kolay elde edilebilirdir (73).

Melanin oksidasyon reaksiyonları yoluyla üretildiğinden, çoğu antioksidan maddenin de melanin üretimini inhibe ettiği düşünülmektedir (78).

Çalışma materyalimizi oluşturan likenler doğal kökenli tirozinaz enzimi inhibitörlerinden biridir.

Liken ekstraktlarının antioksidan ve antimikrobiyal aktiviteleri ile ilgili pek çok çalışma bulunmasına karşın, likenlerin antitirozinaz aktiviteleri ile ilgili araştırmalar oldukça sınırlıdır.

Brezilya'dan toplanan *Cladia aggregata* (Sw.) Nyl., *Cladonia confusa* R. Sant., *Cladonia crispatula* (Nyl.) Ahti, *Cladonia dimorphoclada* Robbins, *Cladonia furcata* (Hudson) Schrader, *Lobaria erosa* (Eschw.) Trevisan, *Punctelia canaliculata* (Lynge) Krog, *Stereocaulon microcarpum* Mull. Arg. ve *Stereocaulon ramulosum* (Sw.) Rausch. likenlerinin tirozinaz inhibisyon aktivitesi test edilmiş ve bu çalışmalar sonucunda *C. aggregata*, *C. dimorphoclada*, *S. ramulosum* ve *S. microcarpum* likenlerinin tirozinaz enziminin inhibisyonu üzerinde pozitif sonuçlar verdiği tespit edilmiştir (79).

Chakma ve Yoganandam tarafından yapılan bir çalışmada, *Roccella belangeriana* D.D. Awasthi likeninden izole edilen usnik asitin yüksek oranlarda antitirozinaz aktivitesine sahip olduğu kaydedilmiştir (80).

Behera ve arkadaşları *Heterodermia podocarpa* (Bel.) D. D. Awasthi, *Arthothelium awasthii* Patw. & Makhija, *Usnea ghattensis* G. Awasthi ve *Parmotrema tinctorum* likenlerinin metanol ekstraktlarının antitirozinaz aktivitelerini çalışmış ve sonuçta dört liken türünde farklı oranlarda tirozinaz inhibisyon aktivitesi gösterdiğini kaydetmişlerdir. Ayrıca, en düşük aktivitenin *U. ghattensis*'de, en yüksek aktivitenin ise *P. tinctorum* likeninde bulunduğu rapor edilmiştir (81).

Laufer ve arkadaşları Peltigerinaceae familyasına ait 40 liken türünün tirozinaz enzimi üzerine inhibisyon etkisini incelemiştir. Çalışılan 20 türde kuvvetli tirozinaz aktivitesine rastlanırken geri kalan 20 türde ise çok çok düşük oranlarda aktiviteye rastlanılmıştır (82).

Higuchi ve arkadaşları 46 farklı tür liken kültürünün antitirozinaz aktivitesini incelemiş ve bu türlerden özellikle *Hypogymnia physodes*, *Letharia vulpina* ve *Cetraria juniperina* (L.) Fr. türlerinin oldukça güçlü antitirozinaz aktiviteye sahip olduğunu tespit etmişlerdir (83). Bu çalışma sonucunda bazı liken kültürlerinin antitirozinaz aktiviteye sahip olduğuna dair resmi olarak patent de alınmıştır (European Patent Office EP 0503828 A1).

Mevcut literatürlere göre Türkiye'de likenlerin antitirozinaz aktiviteleri ile ilgili yeterince çalışma yapılmadığı görülmektedir. Konuyla ilgili Kınalıoğlu ve arkadaşları tarafından *Cladonia stellaris* (Opiz) Pouzar & Vezda, *Cladonia pyxidata* (L.) Hoffm. ve *Cladonia furcata* türleri üzerinde gerçekleştirilen bir çalışmada, bu türlerin antitirozinaz aktivitelerini incelenmiş ve bu liken türlerinin tirozinaz inhibitörü özelliği gösterdiği sonucuna varılmıştır (84).

Çalışma materyalimizi oluşturan türlerden *Protoparmeliopsis muralis* (Schreber) M. Choisy'in sinonimlerinden biri olan *Lecanora muralis* (Schreb.) Rabenh. Amerika'nın Kaliforniya eyaletinde çay olarak koliklerin tedavisinde ve sarımsı-

kahverengi zeytin rengi elde etmede boya kaynağı olarak kullanılmaktadır (60, 85). Hava kirliliğine karşı hassas olan bu türden aynı zamanda hava kirliliğinin belirlenmesinde indikatör olarak da yararlanılmaktadır (86-87).

Çalışmamızda kullanılan diğer tür olan *Parmotrema perlatum* (Hudson) M. Choisy Hindistan'da kalpasi adıyla bilinmektedir ve bu ülkede yemeklerin kokusunu ve tadını artırmada baharat olarak kullanılmaktadır (88). Hindistan'daki Ayurveda terapilerinde baş ağrılarını rahatlatıcı tıbbi yağ olarak da sıklıkla kullanılmaktadır. Ayrıca, antibakteriyel, antiinflammatuar, ateş düşürücü ve kanamayı durdurucu özelliklere de sahiptir. Himalaya V-jel ve Renikare şurup isimli ilaçların yapımında da *P. perlatum* likeninden faydalanılmaktadır (89). Bu tür ayrıca idrar söktürücü, mesane taşıyı eritici, doku ve damarları büzücü özelliklere sahip olduğu bildirilmiştir. (90, 91). Bu liken türünün laksatif ve gaz giderici özelliklerinin yanı sıra bronşit, boğaz ağrısı, tükürük salgısının aşırı azalması, diş ağrıları, inflamasyon, hazımsızlık, kan hastalıkları, kalp hastalıkları, mide hastalıkları, uyuz, genel ağrılar ve lepra tedavisinde de kullanılabileceği bildirilmiştir (92).

*P. perlatum* likeni, hava kirliliği indikatörü olarak da kullanılmaktadır (93-95).

#### **1.4. Çalışmanın Amacı**

Bu çalışmada, yapraksı bir liken türü olan *Parmotrema perlatum* ve plakodiod bir liken türü olan *Protoparmeliopsis muralis*'in etanol, su ve kloroform ekstraktlarının antimikrobiyal, antioksidan ve antitirozinaz aktivitelerinin incelenmesi amaçlandı.

## 2. MATERYAL VE METOD

### 2.1. Materyal

#### 2.1.1. Kullanılan Kimyasal Maddeler

Deneysel çalışmalarda kullanılan kimyasal maddeler aşağıda verilmektedir:

**Merck;** Müller Hinton Agar (MHA), Müller Hinton Broth (MHB), Sabaroud Dekstroz Broth (SDB), Sabaroud Dekstroz Agar (SDA), Folin Ciocalteu reaktifi, Sodyum karbonat ( $\text{Na}_2\text{CO}_3$ ), L- Askorbik asit, Sodyum fosfat ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ ), Bakır (II) klorid ( $\text{CuCl}_2$ ), Sodyum hidroksit ( $\text{NaOH}$ ), Amonyum molibdat ( $\text{NH}_4$ )<sub>6</sub>Mo<sub>7</sub>O<sub>24</sub>·4H<sub>2</sub>O, Sülfürik asit ( $\text{H}_2\text{SO}_4$ )(d=1,840 g/mL, %95-97), Amonyum asetat (Amonyum asetat ( $\text{NH}_4\text{Ac}$ )).

**Sigma Aldrich;** Kateşin, ( $\pm$ )-6-hidroksi-2,5,7,8, tetrametilkroman-2-karboksilik asit (Troloks), Gallik asit, Metanol, Kloroform, Potasyum persülfat ( $\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_8$ ), EDTA, Bütillenmiş Hidroksi Toluen (BHT), Demir (II) klorür ( $\text{FeCl}_2$ ), Sodyum nitrit ( $\text{NaNO}_2$ ), Alüminyum klorid hidrat ( $\text{AlCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ ), 2,2'-Azino-bis (3-etilbenzenotiyazolin-6-sülfonik asit (ABTS), (3-(2-piridil)-5,6-bis (4-fenil-sülfonik asit)-1,2,4-triazin (Ferrozin), Etanol, Kloroform, Metanol, Dimetil sülfoksit (DMSO), 2,9 dimethyl 1-10 phenantrolin (Neokuprin), Tirozinaz enzimi (tyrosinase from mushroom).

**Oxoid;** Gentamisin, Tetrasiklin, Nistatin.

#### 2.1.2. Kullanılan Cihazlar

Araştırmalarda kullanılan cihazlar ve markaları Tablo 2.1'de verilmiştir.

**Tablo 2.1** Çalışmalarda kullanılan cihazlar ve markaları

Cihaz Adı	Marka
Buzdolabı	Vestel
Etüv	POL-ECO-Aparatura

**Tablo 2.1**'in devamı

Distile Su Cihazı	GFL, 2001/4
Otomatik pipetler	Gilson ve Dragon pipetleri
Manyetik Karıştırıcı	Wisd Laboratory Instruments
pH Metre	Hanna Instruments, HI 221
Soksalet Cihazı	Velp Scientifica
Steril Kabin	ESCO, Class II, Type A2
Çalkalayıcılı Su Banyosu	Julabo SW22
Vorteks	Heidolph
UV-Vis Spektrofotometre	Shimadzu UV-mini-1240
Otoklav	Zealway GR85DR

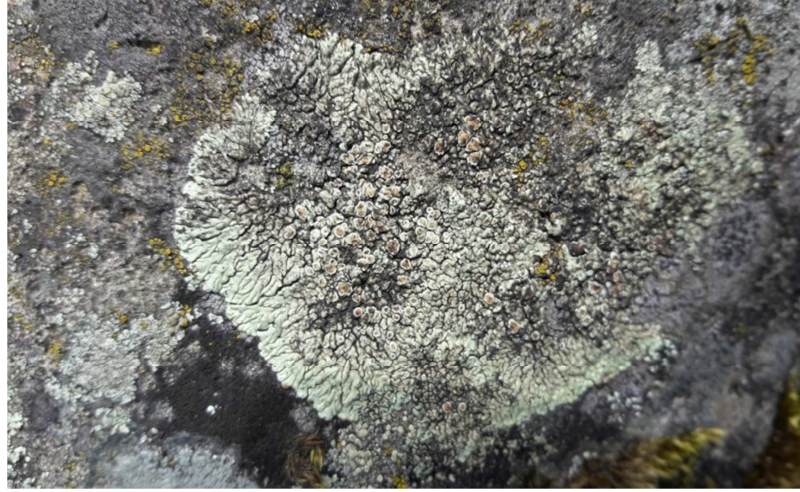
### **2.1.3. Liken Materyali**

Çalışmayı oluşturan *Protoparmeliopsis muralis* (plakodioid) ve *Parmotrema perlatum* (yapraksı) örneklerinin tamamı Doğu Karadeniz Bölgesi'nde yer alan ve aşağıda detaylı olarak verilen lokalitelerden toplandı (Şekil 2.1 ve Şekil 2.2). *P. muralis* örnekleri kayalardan, *P. perlatum* örnekleri ise hem kayalardan hemde ağaç kabuklarından toplandı. Toplanan örnekler laboratuvar şartlarında yeterince kurutulduktan sonra Dr. Kadir KINALIOĞLU tarafından teşhis edildi. Mevcut liken örneklerinin birer örneği Giresun Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümünde saklanmaktadır.

### **2.1.4. Liken Materyallerinin Toplandığı Lokaliteler**

*Protoparmeliopsis muralis*: Trabzon, Araklı, Kızılkaya yaylası, 2222 m, 40°40'08" N, 40°01'39" E", 19.07.2015.

*Parmotrema perlatum*: Giresun, Merkez, Boztekke köyü 22 m, 40°53'59" N, 38°19'09" E, 16. 04.2015.



Şekil 2.1 *Protoparmeliopsis muralis*



Şekil 2.2 *Parmotrema perlatum*

#### 2.1.5. Kullanılan Bakteri ve Mantarlar

Çalışmalarda kullanılan mantar suşlarından *Candida albicans*, *Candida tropicalis* Fırat Üniversitesi Biyoloji Bölümünden; *Candida parapsilosis* Giresun Üniversitesi Eğitim Fakültesinden ve *Saccharomyces cerevisiae* Giresun İl Kontrol Laboratuvarından temin edilmiştir.

Çalışmalarda kullanılan bakteri suşlarından *Salmonella enterica* ve *Staphylococcus aureus* Giresun İl Kontrol Laboratuvarından, *Bacillus cereus* Rize Üniversitesi Moleküler Biyoloji Anabilim Dalından, *Enterobacter aerogenes*, *Bacillus subtilis* ve

*Proteus vulgaris* Fırat Üniversitesi Biyoloji Bölümünden, *Morganella morganii* Bilecik Şeyh Edebali Üniversitesi Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalından, *Gordonia rubripertincta*, *Staphylococcus cohnii* ve *Yersinia pseudotuberculosis* Yeditepe Üniversitesi Genetik ve Biyomühendislik Bölümünden temin edilmiştir.

**Tablo 2.2** Kullanılan mantar ve kodları

<b>Mantar</b>	<b>Kodu</b>
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	ATCC 9763
<i>Candida albicans</i>	FMC 17
<i>Candida parapsilosis</i>	ATCC 22019
<i>Candida tropicalis</i>	ATCC 13803

**Tablo 2.3** Kullanılan bakteri ve kodları

<b>Bakteri</b>	<b>Kodu</b>
<i>Salmonella enterica</i>	ATCC 14028
<i>Staphylococcus aureus</i>	ATCC 25923
<i>Staphylococcus cohnii</i>	Laboratuvar izolatu
<i>Yersinia pseudotuberculosis</i>	ATCC 911
<i>Bacillus subtilis</i>	IMG 22
<i>Enterobacter aerogenes</i>	CCM 2531
<i>Gordonia rubripertincta</i>	Laboratuvar izolatu
<i>Bacillus cereus</i>	ROMA 702
<i>Proteus vulgaris</i>	FMC 1
<i>Morganella morganii</i>	Laboratuvar izolatu

## **2.1.6. Antioksidan Aktivite Tayininde Kullanılan Kimyasallar ve Hazırlanışı**

### **2.1.6.1. Folin-Ciocalteu Reaktifi**

1:3 oranında seyreltilerek kullanılır.



#### **2.1.6.2. NaNO<sub>2</sub> Çözeltisi**

5 g NaNO<sub>2</sub> tartılarak distile suda çözülerek son hacim balon jodede 100 mL'ye tamamlanır.

#### **2.1.6.3. AlCl<sub>3</sub>.6H<sub>2</sub>O Çözeltisi**

10 g AlCl<sub>3</sub>.6H<sub>2</sub>O tartılarak distile suda çözülerek son hacim balon jodede 100 mL'ye tamamlanır.

#### **2.1.6.4. H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> Çözeltisi**

0,83175 mL H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> alınarak üzerine sızdırılarak 24,18825 mL saf su ilave edilir.

#### **2.1.6.5. Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>.12H<sub>2</sub>O Çözeltisi**

0,025 g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>.12H<sub>2</sub>O tartılıp son hacim balon jodede 25 mL'ye tamamlanır.

#### **2.1.6.6. (NH<sub>4</sub>)<sub>6</sub>Mo<sub>7</sub>O<sub>24</sub>.4H<sub>2</sub>O Çözeltisi**

0,123585 g (NH<sub>4</sub>)<sub>6</sub>Mo<sub>7</sub>O<sub>24</sub>.4H<sub>2</sub>O tartılarak son hacim 25 mL'ye tamamlanır.

#### **2.1.6.7. ABTS Çözeltisi**

0,00406 g ABTS 1 mL suda çözüldü. 0,0007 gr K<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>8</sub> 1 mL suda çözüldü. Çözeltiler karıştırılarak 12-16 saat oda sıcaklığında karanlıkta bekletilir.

#### **2.1.6.8. FeCl<sub>2</sub> Çözeltisi**

0,02535 g FeCl<sub>2</sub> tartılarak distile suda çözülür ve son hacim 100 mL'ye tamamlanır.

#### **2.1.6.9. Ferrozin Çözeltisi**

0,24623 g ferrozin tartılarak distile suda çözülür ve son hacim 100 mL'ye tamamlanır.

#### **2.1.6.10. CuCl<sub>2</sub>.2H<sub>2</sub>O Çözeltisi**

CuCl<sub>2</sub>.2H<sub>2</sub>O'den 0,4262 g tartılarak distile suda çözünür ve son hacim 250 mL'ye tamamlanır.

### **2.1.6.11. NH<sub>4</sub>Ac Tamponu**

NH<sub>4</sub>Ac'dan 19,27 g tartılarak distile suda çözünür ve son hacim 250 mL'ye tamamlanır.

### **2.1.6.12. Neokuprin Çözeltilisi**

0,039 g neokuprin tartılarak susuz etanolde çözünür ve son hacim 25 mL'ye tamamlanır.

## **2.1.7. Antitirozinaz Aktivitesi için Kullanılan Çözeltilerin Hazırlanması**

### **2.1.7.1. L-Tirozin Çözeltilisi**

0,0014 g L-Tirozin tartılarak distile suda çözünür ve son hacim balon jodede 5 mL'ye tamamlanır.

## **2.1.8. Antimikrobiyal Aktivite Tayininde Kullanılan Besiyerilerin Hazırlanışı**

### **2.1.8.1. Bakteriler için Besiyeri Hazırlanışı**

21 g MHB tartılır ve 1 lt su ilave edilerek 121 °C'de 15 dakika steril edilir. 36 g MHA tartılır ve 1 lt distile su ilave edilerek 121 °C'de 15 dakika steril edilir. Sterilizasyon sonrasında steril petri kaplarına dökülür.

### **2.1.8.2. Mantarlar için Besiyeri Hazırlanışı**

30g SDB tartılır ve 1 lt distile su ilave edilerek 121 °C'de 15 dakika steril edilir. 65 g SDA tartılır ve 1 lt distile su ilave edilerek 121 °C'de 15 dakika steril edilir. Sterilizasyon sonrasında steril petri kaplarına dökülür.

## **2.2. METOT**

### **2.2.1. Liken Ekstraktlarının Hazırlanışı**

Kurutulan liken örnekleri blendarda öğütülerek su, etanol ve kloroform çözücülerini kullanarak ekstraktlar elde edildi. Liken örnekleri 30'ar g halinde tartılarak 300 mL distile su, 300 mL etanol ve 300 mL kloroform çözücülerini ile ayrı ayrı Sokslet cihazında ekstraksiyona tabi tutuldu. Ekstraksiyon işlemi sonrasında elde edilen ekstraktlar Whatman No.1 kağıdı ile filtre edildi. Filtratların çözücülerini 40 °C'de etüvde uçuruldu. Ekstraktların miktar tayininde kullanılmak üzere tartımları alındı. Analiz işlemlerine geçinceye kadar ekstraktlar -80 °C de saklandı (96).

### 2.2.2. Ekstraksiyon Verimleri

Ekstraktların verimleri aşağıdaki denklem yardımıyla hesaplanmıştır:

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

$W_1$  ekstraksiyonda kullanılan ve çözücü uçurulduktan sonra geriye kalan katı liken ekstraktı ağırlığını,  $W_2$  ise ekstraksiyon sırasında kullanılan toz haline dönüştürülmüş liken örneğinin ağırlığını ifade etmektedir.

### 2.2.3. Liken Ekstraktlarının Antimikrobiyal Aktivitelerinin Belirlenmesi

#### 2.2.3.1. Bakteri ve Mantar Kültürlerinin Hazırlanması

Bakteri kültürlerinin hazırlanmasında Nutrient agar, maya kültürlerinin hazırlanmasında ise SDA kullanıldı. Steril edilmiş petri kaplarına Nutrient agar ve SDA döküldü. Bakteri kültürleri 37 °C'de, maya kültürleri ise 30 °C'de etüvde inkübasyona bırakıldı.

Antimikrobiyal aktivitenin belirlenmesinde disk difüzyon yöntemi ve makrodilüsyon broth yöntemi kullanılmıştır.

Disk difüzyon yönteminde, test mikroorganizmasından elde edilen süspansiyonun yayıldığı agar plakların yüzeyine belirli miktarlarda antimikrobiyal madde içeren kağıt diskler yerleştirilir. Bu sayede diskteki antimikrobiyal madde besiyeri içerisine yayılır ve etkili olduğu düzeylerde bakterinin gelişmesine engel olur ve diskin çevresinde bakterilerin gelişemediği bir inhibisyon zonu meydana gelir (9).

Makrobroth dilüsyon metodunda ise MİK ve MBK/MFK'nın saptanabildiği bir yöntemdir. Antimikrobiyal maddenin seri dilüsyonları hazırlanarak üzerine bakteri/mantar süspansiyonunun eklenmesiyle üreme değerlendirilir (97).

#### 2.2.3.2. Antibakteriyel Aktivitenin Belirlenmesi

*Protoparmeliopsis muralis* likeninin su ekstraktları DMSO ile çözülemediğinden ekstraksiyonda kullanılan su çözücüsü kullanılarak, *P. muralis* likeninin diğer ekstraktları ve *Parmotrema perlatum* likeninin ekstraktları ise DMSO ile 30 mg/mL

konsantrasyonda hazırlandı. Hazırlanan her bir liken ekstraktı 0.45 µm çapındaki steril filtrelerden geçirilerek steril edilmiştir.

Gece kültüründen  $10^8$  CFU/mL (bakteri yoğunluğu Mc Farland standart konsantrasyonuna göre spektrofotometrede ölçülmüştür. Bakteri içeren 300 mL bakteri süspansiyonu MHA üzerine yayıldı. Her bir bakteri türü için benzer şekilde hazırlanmış biri *Protoparmeliopsis muralis* ekstraktlarını içeren, diğeri de *Parmotrema perlatum* ekstraktlarını içeren disklerin bulunduğu iki petri kabı kullanıldı. Petri kaplarına 5 mm çapındaki steril boş diskler bırakıldı. Petrilere birindeki disklerle sırasıyla 25 µL *P. muralis* su ekstraktı, 25 µL *P. muralis* etanol ekstraktı, 25 µL *P. muralis* kloroform ekstraktı, 25 µL steril su ve 25 µL DMSO ilave edildi. Diğer petrideki boş disklere ise sırasıyla 25 µL *P. perlatum* su ekstraktı, 25 µL *P. perlatum* etanol ekstraktı, 25 µL *P. perlatum* kloroform ekstraktı, 25 µL steril su ve 25 µL DMSO ilave edildi. Standart antimikrobiyal ajan olarak gentamisin ve tetrasiklin diskleri kullanıldı. Petriler buzdolabında 2 saat bekletildikten sonra 37 °C'de 20-24 saat inkübe edildi. İnhibisyon zonlarının çapları cetvelle ölçüldü. Tüm testler iki tekrarlı olarak yürütüldü (98, 99).

### **2.2.3.3. Antifungal Aktivitenin Belirlenmesi**

SDB'de hazırlanan gece kültüründen  $10^7$  CFU/mL mantar içeren ( $10^7$  CFU/mL mantar yoğunluğu 0.5 McFarland Standard konsantrasyonuna göre spektrofotometrede 600 nm'de ölçüldü) süspansiyon SDA üzerine yayıldı (100).

Mayaların antifungal aktivitelerinin belirlenmesinde disk difüzyon yöntemi kullanıldı. Liken ekstraktları antibakteriyel aktivite belirlenmesinde olduğu gibi 30 mg/mL konsantrasyonunda hazırlanarak steril filtrelerden (0.45 mikrometreçaplı) geçirilerek steril edildi. Her bir maya türü için benzer şekilde hazırlanmış biri *Protoparmeliopsis muralis* ekstraktlarını içeren, diğeri de *Parmotrema perlatum* ekstraktlarını içeren disklerin bulunduğu iki petri kabı kullanıldı. Petri kaplarına 5 mm çapındaki steril boş diskler bırakıldı. Petrilere birindeki disklerle sırasıyla 25 µL *P. muralis* su ekstraktı, 25 µL *P. muralis* etanol ekstraktı, 25 µL *P. muralis* kloroform ekstraktı, 25 µL steril su ve 25 µL DMSO ilave edildi. Diğer petrideki boş

disklere ise sırasıyla 25 µL *P. perlatum* su ekstraktı, 25 µL *P. perlatum* etanol ekstraktı, 25 µL *P. perlatum* kloroform ekstraktı, 25 µL steril su ve 25 µL DMSO ilave edildi. Standart antimikrobiyal ajan olarak nistatin diski kullanıldı. Petriler buzdolabında 2 saat bekletildikten sonra 30°C’de 72 saat inkübe edildi. İnkübasyon sonrasında inhibisyon çapları cetvelle ölçüldü. Tüm testler iki tekrarlı olarak yürütüldü (101).

#### **2.2.3.4. MİK Değerinin Belirlenmesi**

Mikroorganizmanın üremesine engel olan, gözle görünür bir bulanıklığın meydana gelmediği en düşük ilaç konsantrasyonu MİK olarak adlandırılır (102).

Liken ekstraktlarının 30000 µg/mL konsantrasyonları hazırlandı. Steril tüplerin her birine 950 µL MHB konuldu. 30 mg/mL konsantrasyonunda hazırlanan liken ekstraktlarından ilk tüpe 1000 µL ilave edilerek seri dilüsyonlar hazırlandı. Son olarak tüplere 50 µL mikroorganizma süspansiyonu ilave edildi. Bakteri süspansiyonu içeren tüpler 37 °C’de 24 saat, maya içeren tüpler ise 30 °C’de 72 saat inkübe edilerek MİK değerleri kaydedildi. Tüm testler iki tekrarlı olarak yürütüldü (142).

#### **2.2.3.5. MBK/MFK Değerlerinin Belirlenmesi**

MİK deneyi sonucunda bulanıklaşmanın olmadığı bakteri süspansiyonu içeren tüplerden alınan 20 µL sıvı petri kaplarına yayılarak 37 °C’de 24 saat inkübe edildi. Subkültürleme sonucunda bakteriyal büyümenin görülmediği en düşük konsantrasyon MBK olarak adlandırılır. Tüm testler iki tekrarlı olarak yürütüldü (103).

Benzer şekilde MİK deneyi sonrasında inhibisyonun görülmediği maya süspansiyonu içeren tüplerden alınan 20 µL sıvı SDA içeren petrilere yayıldı. Petriler 30°C’de 72 saat inkübe edildi. Agar yüzeyinde maya üremesinin görülmediği en düşük konsantrasyon MFK olarak adlandırılır. Tüm testler iki tekrarlı olarak yürütüldü (104).

## **2.2.4. Liken Ekstraktlarının Antioksidan Aktivitelerinin Belirlenmesi**

### **2.2.4.1. Toplam Fenolik İçeriği**

Ekstraktların toplam fenolik bileşik miktarı Folin-Ciocalteu ayırıcı kullanılarak belirlendi. Tüplere 100 µL liken ekstraktı konuldu. Üzerlerine 4,5 mL distile su ve 100 µL Folin-Ciocalteu ayırıcı (1:3 oranında seyreltilmiş) ilave edildi. 3 dk sonra karışıma % 2'lik Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> çözeltisinden 300 µL ilave edildi. Tüpler vortekslendi ve karışımın absorbansı 760 nm'de spektrofotometrede okundu. Çalışmada standart olarak gallik asit kullanıldı. Toplam fenolik madde miktarı gallik asidin standart grafik denkleminde µg gallik asit eşdeğeri (GAE)/g liken olarak belirlendi. Testler üç tekrarlı gerçekleştirildi (105).

### **2.2.4.2. Toplam Flavonoid İçeriği**

Liken ekstraktlarından 250 µL tüplere konularak üzerlerine 1,25 mL distile su ve % 5'lik 75 µL NaNO<sub>2</sub> ilave edildi ve karışım 6 dakika oda sıcaklığında bekletildi. Sonrasında tüplere % 10'luk 150 µL AlCl<sub>3</sub>.6H<sub>2</sub>O ilave edilerek karışım 5 dakika daha bekletildi. Karışıma 1 M 50 µL NaOH ve 725 µL eklenerek tüpler vortekslendi ve absorbans 510 nm'de okundu. Çalışmada standart madde olarak kateşinden faydalanıldı. Toplam flavonoid miktarı kateşinin standart grafik denkleminde µg kateşin eşdeğeri (QE)/g liken olarak belirlendi. Testler üç tekrarlı yapıldı (106).

### **2.2.4.3. Metal Şelatlama Aktivitesi**

Çalışmada kullanılacak standart maddenin (EDTA) ve liken örneklerinin 250-1000 µg/mL konsantrasyonlarında çözeltileri hazırlandı. Liken ekstraktlarından 500 µL alınarak üzerine 1,6 mL distile su ilave edildi. Sonrasında 0,05 mL FeCl<sub>2</sub> ilave edilerek karışım 30 dk bekletildi. Daha sonra 0,1 mL ferrozin ilave edilerek 10 dk daha bekletildi ve absorbans 562 nm'de ölçüldü. Sonuçlar % aktivite olarak aşağıdaki denklemden hesaplandı (107).

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

A<sub>0</sub>=Kontrol absorbans değeri

A<sub>1</sub>= Örnek absorbans değeri

#### **2.2.4.4. Troloks Eşdeğer Antioksidan Kapasitesi (TEAC)**

Liken örneklerinin troloks eşdeğer antioksidan kapasiteleri Arnao ve arkadaşlarının geliştirdiği yöntemine göre yapıldı (108). 7,4 mM ABTS ve 2,6 mM potasyum persülfatın su ile çözeltileri hazırlandı. Bu çözeltiler karıştırılarak 12-16 saat karanlıkta bekletildi. Sonrasında bu karışıma metanol ilave edildi. Bu çözeltinin absorbansı 734 nm'de okundu ve ABTS<sup>+</sup> katyonunun absorbansı 0,700±0,02'dir. Hazırlanan ABTS çözeltisinden 2850 µL alınarak üzerine 150 µL liken ekstraktı ilave edildi ve elde edilen karışım karanlıkta 2 saat bekletilerek absorbansı 734 nm'de ölçüldü. Çalışmada standart madde olarak troloks kullanıldı. Troloks eşdeğer antioksidan kapasitesi troloksun standart grafik denkleminde µg Troloks/g liken olarak hesaplandı. Testler üç tekrarlı yapıldı.

#### **2.2.4.5. Toplam Antioksidan Kapasitesi**

Liken materyallerinin toplam antioksidan kapasiteleri Prieto ve arkadaşları yöntemine göre belirlendi. 0,3 mL liken ekstraktı ile 0,6 M sülfürik asit, 28 mM sodyum fosfat ve 28 mM amonyum molibdat içeren 3 mL'lik çözelti karıştırıldı. Karışım 95 °C'da 90 dk su banyosunda inkübe edildi ve absorbans 695 nm'de spektrofotometrede ölçüldü. Sonuçlar askorbik asit standart grafik denkleminde µg askorbik asit/g liken olarak hesaplandı. Testler üç tekrarlı olarak yürütüldü (109).

#### **2.2.4.6. CUPRAC Deneyi**

250 µL sulu CuCl<sub>2</sub> çözeltisi, alkolde hazırlanmış 250 µL neokuprin çözeltisi ve 250 µL sulu NH<sub>4</sub>Ac tamponu (pH 7,0) karıştırılarak üzerine incelenecek örnek ya da standart çözelti eklendi. 30 dk sonra, karışımın absorbansı 450 nm'de ölçüldü. Sonuç, absorbans-konsantrasyon tablosu olarak verilmiştir (110).

#### **2.2.5. Antitirozinaz Aktivitesinin Belirlenmesi**

Farklı konsantrasyonlarda hazırlanan liken ekstraktlarının antitirozinaz aktiviteleri, Vanni ve arkadaşlarının yöntemine göre belirlendi (111).

L-Tirozin substratı ve tirozinaz enzimi fosfat tamponunda (pH: 6,5, 0,1 M) hazırlanmıştır. 490 nm'de absorbans değerleri ölçüldü ve bu değerlerden % inhibisyon değerleri, aşağıdaki formülde absorbans değerleri yerine konularak

hesaplandı. Tirozinaz enziminin IC<sub>50</sub> değeri (%50 inhibisyona neden olan madde miktarı), absise konsantrasyon, ordinata % tirozinaz inhibisyon verilerinin uygulanması ile çizilen eğrinin lineer kesiminden elde edilen regresyon denkleminde hesaplandı. IC<sub>50</sub> değerinin düşük değerde olması, ekstraktın ya da standartların tirozinaz inhibisyon aktivitelerinin yüksek olduğunu göstermektedir.

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

A<sub>0</sub>=Kontrol absorbans değeri

A<sub>1</sub>= Örnek absorbans değeri

### **2.2.6. İstatistiksel Analiz**

Liken ekstraktlarının antioksidan ve antitirozinaz aktivite araştırmaları üç tekrarlı gerçekleştirilmiş olup istatistiksel analizler SPSS 17.0 (SPSS Inc, Chicago, USA) istatistiksel analiz programı kullanılarak yapılmıştır. Elde edilen verilerin değerlendirilmesinde Varyans Analizi (ANOVA) ve Duncan Testleri kullanılmıştır. Örneklerle ait verilerin karşılaştırılması sonucunda elde edilen P değerleri 0,05'ten küçük olduğunda (P<0,05) istatistiksel açıdan önemli olarak kabul edilmiştir. Toplam fenolik içeriği, toplam flavonoid içeriği, toplam antioksidan kapasitesi, troloks eşdeğer antioksidan kapasitesi deneylerinde istatistiksel farklılıklar ekstraktlar arasında hesaplanırken; metal şelatlama aktivitesi, metal şelatlama aktivitesi ve antitirozinaz aktivitesi deneylerindeki istatistiksel farklılıklar her bir ekstraktın konsantrasyonları kendi arasında olacak şekilde hesaplanmıştır.



### 3. ARAŞTIRMA BULGULARI

#### 3.1. Ekstraksiyon Verimi (%)

*Protoparmeliopsis muralis* ve *Parmotrema perlatum* likenlerinin ekstraktlarının su, kloroform ve etanol çözücülerindeki % ekstraksiyon verimleri Tablo 3.1’de verilmiştir. Yüzde ekstraksiyon verimi sonuçları % 3,19 ile % 16,99 arasında değişiklik göstermektedir. *P. muralis* türünün su ekstraktı en düşük verime sahipken (% 5,40), etanol ekstraktı en yüksek verime (% 15,09) sahiptir. Benzer şekilde, *P. perlatum* likeninin en düşük ve en yüksek ekstraksiyon verim değerleri su (% 3,19) ve etanol (% 16,99) çözücülerinde elde edilmiştir.

**Tablo 3.1** Liken ekstraktlarının yüzde verimleri

Liken	Çözücü	Ekstrakt adı ve kısaltması	Verim (%)
<i>Protoparmeliopsis muralis</i>	Su	Su ekstraktı (SE)	5,40
	Etanol	Etanol ekstraktı (EE)	15,09
	Kloroform	Kloroform ekstraktı (KE)	11,23
<i>Parmotrema perlatum</i>	Su	Su ekstraktı (SE)	3,19
	Etanol	Etanol ekstraktı (EE)	16,99
	Kloroform	Kloroform ekstraktı (KE)	6,16

#### 3.2. Antimikrobiyal Aktivite

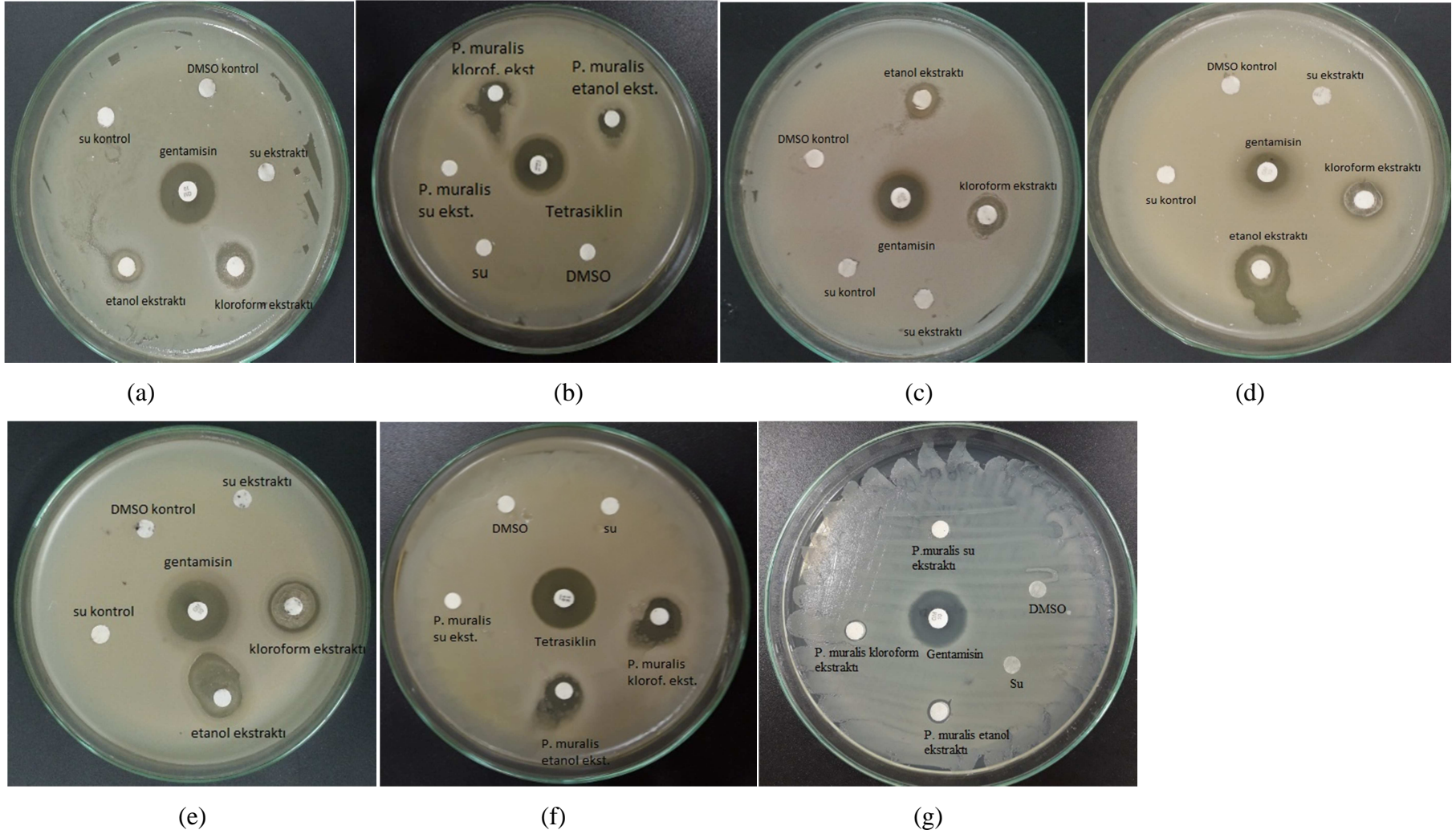
İki liken türünden elde edilen su, kloroform ve etanol ekstraktlarının on bakteri suşu ve dört maya türüne karşı antimikrobiyal etkileri test edilerek meydana gelen inhibisyon zonları Tablo 3.2’de verilmiştir. Mevcut liken ekstraktlarından bazıları bakteri ve mantar türlerine karşı yüksek aktivite gösterirken, bazıları daha sınırlı bir aktivite gösterdi. Test ekstraktlarının Gram negatif ve gram pozitif bakteriler üzerine etkileri kıyaslandığında gram pozitif bakteriler üzerinde nispeten daha olumlu sonuçlar elde edilmiştir. Gram negatif bakteriler olan *Salmonella enterica*, *Morganella morganii* ve *Yersinia pseudotuberculosis* (*Parmotrema perlatum* likeninin kloroform ekstraktı hariç) suşları çalışılan tüm liken ekstraktlarına karşı dirençlidir.

*Protoparmeliopsis muralis* likeni test bakterilerine karşı *Parmotrema perlatum* likenine göre daha yüksek antibakteriyel aktivite sergilemiştir. *P. muralis* likeninin su ekstraktı test bakterileri üzerinde inhibitör etki göstermezken, *P. perlatum* likeninin su ekstraktı *Bacillus cereus* ve *Staphylococcus cohnii* suşları üzerinde zayıf bir etki göstermiştir. Her iki liken türünün ekstraktları aktiviteleri arasında kloroform ekstraktı > etanol ekstraktı > su ekstraktı şeklinde bir sıralama bulunmaktadır.

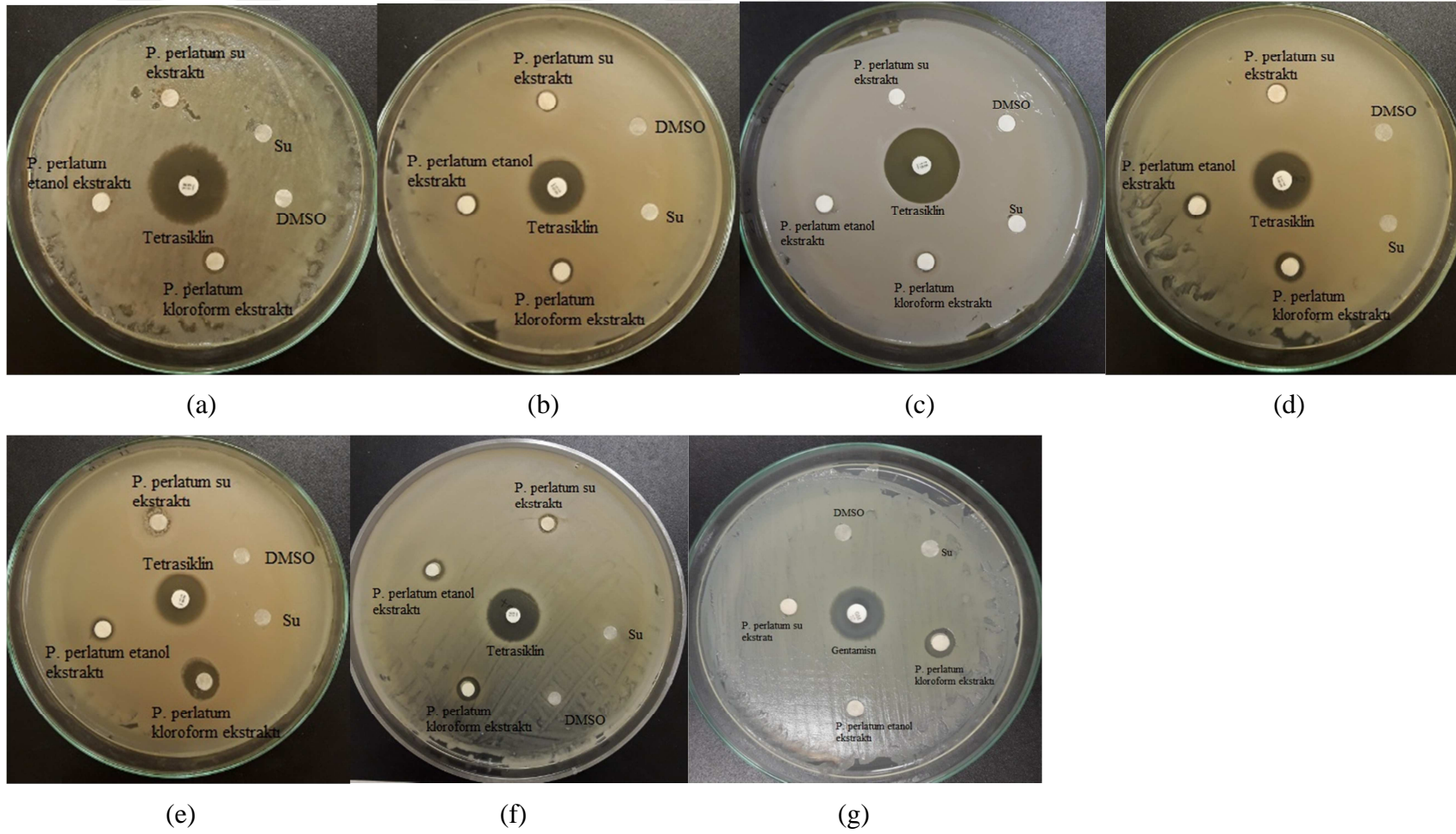
Liken ekstraktlarının oluşturdukları inhibisyon zonlarının fotoğrafları Şekil 3.1, Şekil 3.2 ve Şekil 3.3'te verilmiştir. En yüksek aktivite *Protoparmeliopsis muralis* likeninin etanol ekstraktında *Proteus vulgaris* bakterisine karşı gözlenirken (16,5 mm), en düşük aktivite *Parmotrema perlatum* likeninin kloroform ekstraktında *Gordonia rubriperticta* (6 mm) ve *Yersinia pseudotuberculosis* (6 mm) gözlenmiştir.

Negatif kontrol olarak kullanılan DMSO ve suda aktivite gözlenmemektedir. Pozitif kontrol olarak kullanılan test antibiyotikleri genel olarak liken ekstraktlarından daha yüksek aktiviteye sahiptir. *Protoparmeliopsis muralis* likeninin etanol ekstraktı *Enterobacter aerogenes* bakterisine karşı tetrasikline yakın, *P. muralis*'in etanol ekstraktı *Proteus vulgaris* bakterisine karşı gentamisine yakın, *P. muralis* likeninin etanol ve kloroform ekstraktları *Gordonia rubripertincta* suşuna karşı gentamisine yakın çaplarda zonlar oluşturmuştur.

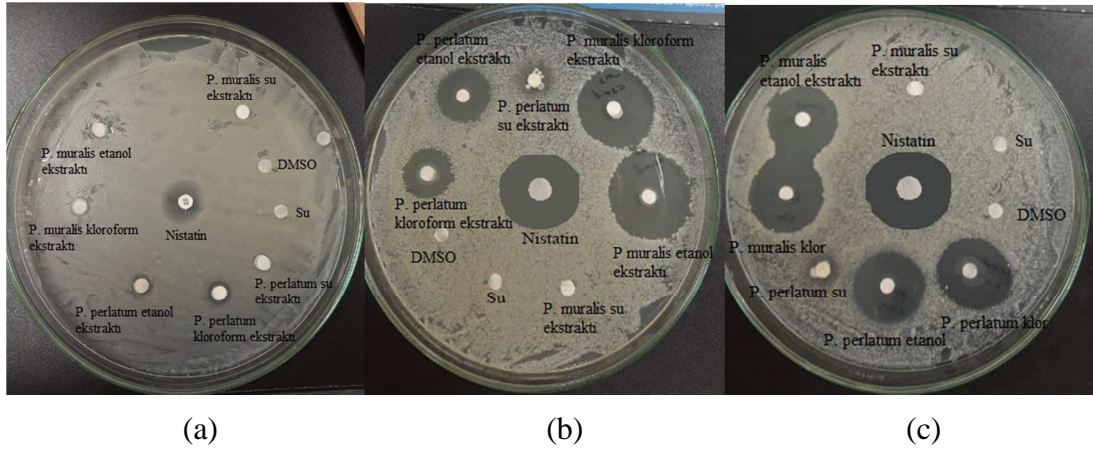
Çalışmamızda mantarlara karşı bakterilere oranla daha yüksek aktiviteler elde edilmiştir. Çalışılan liken ekstraktları *Candida parapsilosis* dışındaki tüm test mantarlarına karşı değişik oranlarda aktivite göstermiştir. En yüksek aktivite *Protoparmeliopsis muralis* kloroform ekstraktında *Candida albicans*'a karşı elde edilirken (34 mm), en düşük aktivite *Parmotrema perlatum* kloroform ekstraktında *Saccharomyces cerevisiae*'ye karşı elde edilmiştir (6 mm).



**Şekil 3.1** *Protoparmeliopsis muralis* likeninin *Staphylococcus aureus* (a), *Bacillus subtilis* (b), *Gordonia rubripertincta* (c), *Proteus vulgaris* (d), *Enterobacter aerogenes* (e), *Bacillus cereus* (f) ve *Staphylococcus cohnii* (g) üzerine etkileri



**Şekil 3.2** *Parmotrema perlatum* likeninin *Staphylococcus aureus* (a), *Bacillus subtilis* (b), *Gordonia rubripertincta* (c), *Proteus vulgaris* (d), *Enterobacter aerogenes* (e), *Bacillus cereus* (f) ve *Staphylococcus cohnii* üzerine etkile



**Şekil 3.3** *Parmotrema perlatum* ve *Protoparmeliopsis muralis* likenlerinin *Saccharomyces cerevisiae* (a), *Candida albicans* (b) ve *Candida tropicalis* (c) üzerine etkileri

Çalışılan liken ekstraktları *Candida parapsilosis* dışında tüm test mantarlarına karşı etki göstermiştir.

Antibakteriyel etkisi tespit edilen ekstraktların MİK değerleri Tablo 3.3'de verilmiştir. Bakterilerde en düşük MİK konsantrasyonu *Protoparmeliopsis muralis*'in kloroform ekstraktında *Bacillus cereus* bakterisine karşı (0,46875 mg/mL), en yüksek değer ise *P. muralis* ve *Parmotrema perlatum* etanol ekstraktlarında *Gordonia rubripertincta* ve *Staphylococcus cohnii* bakterilerine karşı tespit edilmiştir (15 mg/mL).

Mantarlara karşı elde edilen MİK değerleri 0,07322-15 mg/mL arasında değişmektedir. MİK değerleri mantarlarda bakterilere kıyasla daha düşük bulunmuştur.

Liken ekstraktlarının MBK ve MFK değerleri Tablo 3.4'te verilmektedir. Test ekstraktlarının bakteriler üzerindeki MBK değerleri oldukça yüksek, mantar türleri üzerine MFK değerleri ise bakterilere kıyasla çok çok düşüktür.

**Tablo 3.2** Liken ekstraktlarının inhibisyon zonu değerleri (mm)

Mikroorganizmalar	<i>Protoparm eliopsis muralis</i> (SE)	<i>Protoparmel iopsis muralis</i> (EE)	<i>Protoparmel iopsis muralis</i> (KE)	<i>Parmotr ema perlatum</i> (SE)	<i>Parmotre ma perlatum</i> (EE)	<i>Parmotre ma perlatum</i> (KE)	Gen	Tet	Nis	DM SO	Su
<i>Salmonella enterica</i> ATCC 14028		--	--	--	--	--	18±1,41	20±1,41	--	--	--
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	--	11±1,41	14,5±0,70	--	--	8,5±0,70	19±1,41	25±1,41	--	--	--
<i>Bacillus cereus</i> ROMA 702	--	11,5±0,70	12±1,41	8±1,41	9,5±0,70	10±0,00	21,5±0,70	24±1,41	--	--	--
<i>Enterobacter aerogenes</i> CCM 2531	--	16±0,00	13±1,41	--	8,5±0,70	13,5±0,70	20±1,41	16±1,41	--	--	--
<i>Proteus vulgaris</i> FMC 1	--	16,5±0,70	12,5±0,70	--	9±1,41	10±1,41	16±1,41	17±1,41	--	--	--
<i>M.organella morganii</i> (lab izolatu)	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--
<i>Bacillus subtilis</i> IMG 22	--	9±0,00	12±0,00	7±1,41	7±1,41	8±1,41	18±1,41	16±1,41	--	--	--
<i>Gordonia rubripertincta</i> (lab izolatu)	--	12±0,00	12,5±0,70	--	--	6±0,00	14±1,41	25±1,41	--	--	--

**Tablo 3.2'nin devamı**

<i>Staphylococcus cohnii</i> (izolat)	--	9±1,41	7±1,41	8±1,41	--	10±1,41	19±1,41	21±1,41	--	--	--
<i>Yersinia pseudotuberculosis</i> ATCC 911	--	--	--	--	--	6±1,41	18±1,41	--	--	--	--
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> ATCC 9763	--	--	7±1,41	--	10±1,41	6±0,00	--	--	17±0,00	--	--
<i>Candida tropicalis</i> ATCC 13803	--	27±1,41	30±1,41	--	27±1,41	27±0,00	--	--	30±1,41	--	--
<i>Candida albicans</i> FMC 17	--	33±1,41	34±1,41	--	22±0,00	18±1,41	--	--	30±1,41	--	--
<i>Candida parapsilosis</i> ATCC 22019	--	--	--	--	--	--	--	--	25±1,41	--	--

--: Aktiviteye rastlanmadı; Gen: Gentamisin (10µg/disk); Tet: Tetrasiklin (10µg/disk); Nis: Nistatin (100 µg/disk)

**Tablo 3.3** Liken ekstraktlarının MİK değerleri (mg/mL)

Mikroorganizmalar	<i>Protoparmeliopsis muralis</i> (SE)	<i>Protoparmeliopsis muralis</i> (EE)	<i>Protoparmeliopsis muralis</i> (KE)	<i>Parmotrema perlatum</i> (SE)	<i>Parmotrema perlatum</i> (EE)	<i>Parmotrema perlatum</i> (KE)
<i>Salmonella enterica</i> ATCC 14028	--	--	--	---	--	--
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	--	7,5±0,00	7,5±0,00	--	--	7,5±0,00
<i>Bacillus cereus</i> ROMA 702	--	0,9375±0,00	0,46875±0,00	15±0,00	7,5±0,00	3,75±0,00
<i>Enterobacter aerogenes</i> CCM 2531	--	0,9375±0,00	1,875±0,00	--	7,5±0,00	3,75±0,00
<i>Proteus vulgaris</i> FMC 1	--	7,5±0,00	3,75±0,00	--	7,5±0,00	3,75±0,00
<i>Morganella morganii</i> (lab izolatı)	--	--	--	--	--	--
<i>Bacillus subtilis</i> IMG 22	--	7,5±0,00	3,75±0,00	15±0,00	7,5±0,00	7,5±0,00
<i>Gordonia rubripertincta</i> (lab izolatı)	--	15±0,00	7,5±0,00	--	15±0,00	15±0,00



**Tablo 3.3'**ün devamı

<i>Staphylococcus cohnii</i> (izolat)	--	15±0,00	7.5±0,00	15±0,00	7,5±0,00	7,5±0,00
<i>Yersinia pseudotuberculosis</i> ATCC 911	--	--	--	--	7,5±0,00	7,5±0,00
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> ATCC 9763	--	--	15±0,00	--	0,9346±0,00	15±0,00
<i>Candida tropicalis</i> ATCC 13803	--	0,014645±0,00	0,234375±0,00	--	0,46875±0,0 0	0,46875±0,00
<i>Candida albicans</i> FMC 17	--	0,007322±0,00	0,234375±0,00	--	0,46875±0,0 0	7,5±0,00
<i>Candida parapsilosis</i> ATCC 22019	--	--	--	--	--	--

**Tablo 3.4** Liken ekstraktlarının MBK veya MFK değerleri (mg/mL)

Mikroorganizmalar	<i>Protoparmeliopsis muralis</i> (SE)	<i>Protoparmeliopsis muralis</i> (EE)	<i>Protoparmeliopsis muralis</i> (KE)	<i>Parmotrema perlatum</i> (SE)	<i>Parmotrema perlatum</i> (EE)	<i>Parmotrema perlatum</i> (KE)
<i>Salmonella enterica</i> ATCC 14028	--	--	--	--	--	--
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	--	7,5±0,00	30±0,00	--	--	7,5±0,00
<i>Bacillus cereus</i> ROMA 702	--	>30±0,00	0.46875±0,00	>30±0,00	>30±0,00	
<i>Enterobacter aerogenes</i> CCM 2531	--	1,875±0,00	7,5±0,00	--	>30±0,00	
<i>Proteus vulgaris</i> FMC 1	--	>30±0,00	>30±0,00	--	>30±0,00	>30±0,00
<i>Morganella morganii</i> (lab izolatı)	--	--	--	--	--	--
<i>Bacillus subtilis</i> IMG 22	--	>30±0,00	>30±0,00	>30±0,00	>30±0,00	>30±0,00
<i>Gordonia rubripertincta</i> (lab izolatı)	--	30±0,00	30±0,00	--	30±0,00	>30±0,00

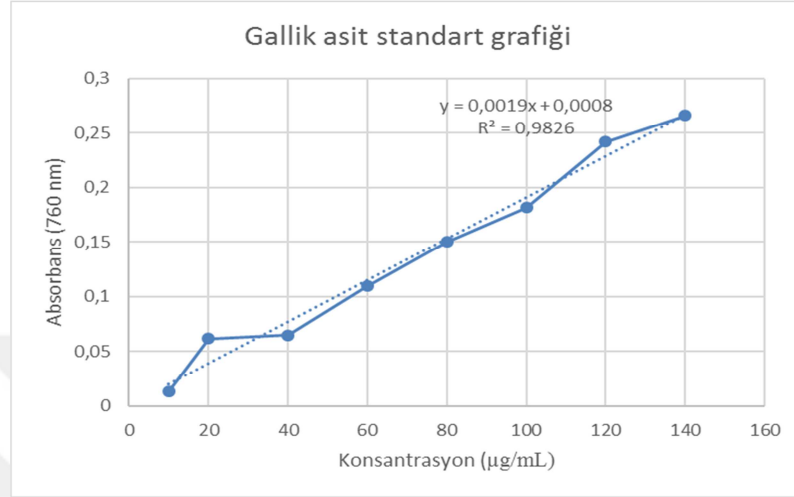
**Tablo 3.4'**ün devamı

<i>Yersinia pseudotuberculosis</i> ATCC 911	--	--	--	--	30±0,00	30±0,00
<i>S. cohnii</i> (izolat)	--	30±0,00	30±0,00	>30±0,00	15±0,00	15±0,00
<i>S. cerevisiae</i> ATCC 9763	--	--	15±0,00	--	1,875±0,00	15±0,00
<i>C. tropicalis</i> ATCC 13803	--	0,05859±0,00	0,9346±0,00		1,875±0,00	1,875±0,00
<i>C. albicans</i> FMC 17	--	0,05859±0,00	0,46875±0,00	--	1,875±0,00	15±0,00
<i>C. parapsilosis</i> ATCC 22019	--	--	--	--	--	--

### 3.3. Antioksidan Aktivite

#### 3.3.1. Toplam Fenolik İçeriği

Çalışılan liken ekstraktlarının toplam fenolik içeriği sonuçları Tablo 3.5’de gallik asit kalibrasyon eğrisi grafiği ise Şekil 3.4’de verilmiştir.



Şekil 3.4 Gallik asit standart grafiği

Tablo 3.5 Liken ekstraktlarının toplam fenolik içerikleri\* (µg GAE/g liken)

Liken ekstraktı	Toplam fenolik içerikleri* (µg GAE/g liken)
<i>Protoparmeliopsis muralis</i> su ekstraktı	18,29±0,006 <sup>a</sup>
<i>Protoparmeliopsis muralis</i> etanol ekstraktı	200,97±0,002 <sup>d</sup>
<i>Protoparmeliopsis muralis</i> kloroform ekstraktı	156,76±0,002 <sup>c</sup>
<i>Parmotrema perlatum</i> su ekstraktı	45,65±0,005 <sup>b</sup>
<i>Parmotrema perlatum</i> etanol ekstraktı	468,32±0,014 <sup>e</sup>
<i>Parmotrema perlatum</i> kloroform ekstraktı	203,23±0,032 <sup>d</sup>

\*Değerler üç deneyin ortalamasıdır ± standart sapma

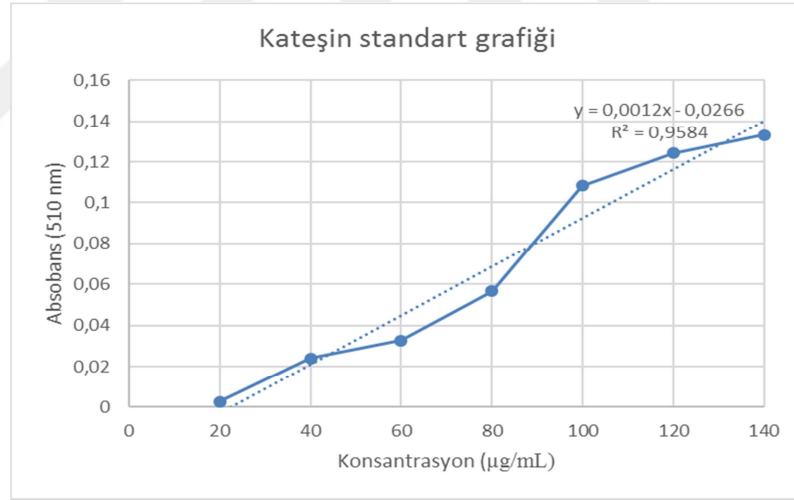
*Protoparmeliopsis muralis* likeninin su, kloroform ve etanol ekstraktlarının toplam fenolik içeriği Folin-Ciocalteu reaktifi kullanılarak gallik asit kalibrasyon eğrisinden elde edilen  $y=0,0019x+0,0008$  denkleminden ( $R^2= 0,9826$ ) faydalanılarak sırasıyla 18,29±0,006, 156,76±0,002 ve 200,97±0,002 GAE/g liken olarak hesaplandı.

*Parmotrema perlatum* likeninin su, kloroform ve etanol ekstraktlarının toplam fenolik içeriği ise sırasıyla  $45,65 \pm 0,005$ ,  $203,23 \pm 0,032$  ve  $468,32 \pm 0,014$  GAE/g liken olarak hesaplandı.

İstatistiksel açıdan örnekler incelendiğinde *P. muralis* etanol ve *P. perlatum* kloroform ekstraktları arasındaki farklılıklar önemli değildir ( $P > 0,05$ ). Bu iki liken ekstraktı dışındaki tüm liken ekstraktları arasındaki farklılıklar istatistiksel açıdan önemlidir ( $P < 0,05$ ).

### 3.3.2. Toplam Flavonoid İçeriği

Sonuçlar Tablo 3.6'da, kateşin kalibrasyon eğrisi grafiği ise Şekil 3.5'te verilmiştir. Liken ekstraktlarının toplam flavonoid içeriği miktarı kateşinin kalibrasyon eğrisinden elde edilen  $y = 0,0012x - 0,0266$  ( $R^2 = 0,9584$ ) denkleminde faydalanılarak hesaplanmıştır.



Şekil 3.5 Kateşin standart grafiği

**Tablo 3.6** Liken ekstraktlarının toplam flavonoid içerikleri\* ( $\mu\text{g QE/g}$  liken)

Liken ekstraktı	Toplam flavonoid içerikleri* ( $\mu\text{g QE/g}$ liken)
<i>Protoparmeliopsis muralis</i> su ekstraktı	39,90 $\pm$ 0,008 <sup>b</sup>
<i>Protoparmeliopsis muralis</i> etanol ekstraktı	275,14 $\pm$ 0,020 <sup>c</sup>
<i>Protoparmeliopsis muralis</i> kloroform ekstraktı	180,38 $\pm$ 0,010 <sup>d</sup>
<i>Parmotrema perlatum</i> su ekstraktı	13,95 $\pm$ 0,005 <sup>a</sup>
<i>Parmotrema perlatum</i> etanol ekstraktı	89,27 $\pm$ 0,018 <sup>c</sup>
<i>Parmotrema perlatum</i> kloroform ekstraktı	88,35 $\pm$ 0,007 <sup>c</sup>

\*Değerler üç deneyin ortalamasıdır  $\pm$  standart sapma

*Protoparmeliopsis muralis* likeninin ekstraktlarının toplam flavonoid içerikleri 39,90 $\pm$ 0,008 ile 275,14 $\pm$ 0,020  $\mu\text{g QE/g}$  liken arasında; *Parmotrema perlatum* likeni ekstraktlarının ise 13,95 $\pm$ 0,005 ile 89,27 $\pm$ 0,018  $\mu\text{g QE/g}$  liken arasında değişmektedir. En yüksek toplam flavonoid içeriği *P. muralis* likeninin etanol ekstraktında elde edilirken, en düşük toplam flavonoid içeriği ise *P. perlata* likeninin su ekstraktında elde edilmiştir.

*Parmotrema perlatum* kloroform ve etanol ekstraktları arasındaki farklılıklar istatistiksel açıdan önemli değilken ( $P>0,05$ ); diğer tüm ekstraktlar arasındaki farklılıklar önemlidir ( $P>0,05$ ).

### 3.3.3. Metal Şelatlama Aktivitesi

Liken ekstraktlarının metal şelatlama aktiviteleri Tablo 3.7'de verilmektedir. Sonuçlara bakıldığında *Protoparmeliopsis muralis* likeninin su ve etanol ekstraktında aktivite gözlenmezken, kloroform ekstraktında % 1,4-3,01 değerleri arasında inhibisyon saptanmıştır. *Parmotrema perlatum* likeninin ise su ve kloroform ekstraktında aktivite saptanamamışken, etanol ekstraktında % 15,26 ve % 32,09 arasında aktiviteye rastlanılmıştır. İki liken örneği metal şelatlama aktiviteleri bakımından kıyaslandığında, *P. perlatum* likeninin daha etkili olduğu görülmüştür. Standart madde olan EDTA çalışılan liken ekstraktlarından daha yüksek metal şelatlama aktivitesi sergilemiştir.

**Tablo 3.7** Liken ekstraktlarının ve EDTA'nın metal şelatlama aktivitesi (% Aktivite)

Liken	Konsantrasyon ( $\mu\text{g/mL}$ )	%Aktivite*
<i>Protoparmeliopsis muralis</i> (SE)	250	--
	500	--
	750	--
	1000	--
<i>Protoparmeliopsis muralis</i> (EE)	250	--
	500	--
	750	--
	1000	--
<i>Protoparmeliopsis muralis</i> (KE)	250	1,4 $\pm$ 0,23 <sup>a</sup>
	500	1,57 $\pm$ 0,45 <sup>a</sup>
	750	2,44 $\pm$ 1,59 <sup>a</sup>
	1000	3,01 $\pm$ 2,01 <sup>a</sup>
<i>Parmotrema perlatum</i> (SE)	250	--
	500	--
	750	--
	1000	--
<i>Parmotrema perlatum</i> (EE)	250	15,26 $\pm$ 0,306 <sup>a</sup>
	500	19,73 $\pm$ 0,346 <sup>b</sup>
	750	22,75 $\pm$ 0,273 <sup>c</sup>
	1000	32,09 $\pm$ 0,170 <sup>d</sup>
<i>Parmotrema perlatum</i> (KE)	250	--
	500	--
	750	--
	1000	--
EDTA	250	94,56 $\pm$ 4,54 <sup>a</sup>
	500	96,33 $\pm$ 0,91 <sup>a</sup>
	750	96,90 $\pm$ 1,51 <sup>a</sup>
	1000	97,68 $\pm$ 2,06 <sup>a</sup>

\*Değerler üç deneyin ortalamasıdır  $\pm$  standart sapma

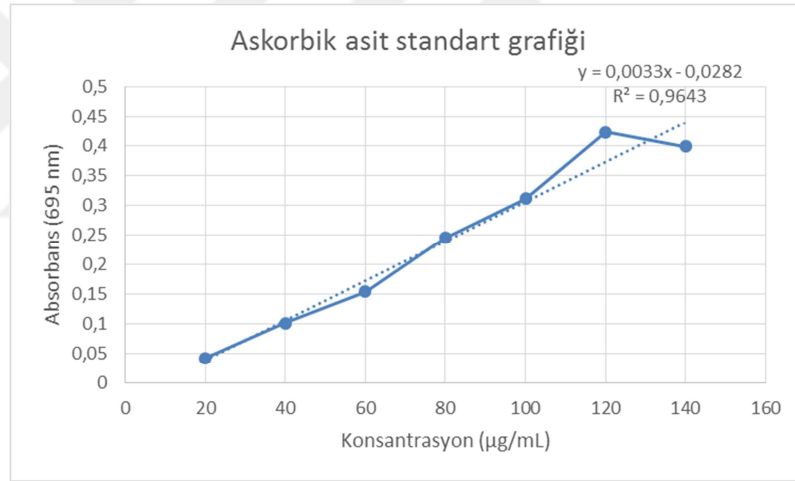
İstatistiksel açıdan ekstraktların konsantrasyonları arasındaki farklılıklar kendi aralarında incelenmiştir. *Protoparmeliopsis muralis* likeninin kloroform ekstraktının

250, 500, 750 ve 1000 µg/mL konsantrasyonları arasında farklar istatistiksel açıdan önemsizdir ( $P>0,05$ ). Benzer şekilde standart madde olarak kullanılan EDTA'nın 250, 500, 750 ve 1000 µg/mL konsantrasyonları arasında fark önemsizdir ( $P>0,05$ ). *Parmotrema perlatum* likeninin etanol ekstraktının 250, 500, 750 ve 1000 µg/mL konsantrasyonları arasında farklılıklar istatistiksel olarak önemlidir ( $P<0,05$ ).

Mevcut kaynaklara göre *Protoparmeliopsis muralis* ve *Parmotrema perlatum* likenlerinin metal şelatlama aktivitesi ile ilgili herhangi bir çalışmaya rastlanılmamıştır.

### 3.3.4. Toplam Antioksidan Kapasitesi

Likenlerin su, kloroform ve etanol ekstraktlarının toplam antioksidan kapasiteleri Tablo 3.8'de, askorbik asit kalibrasyon eğrisi grafiği ise Şekil 3.6'da verilmiştir.



Şekil 3.6 Askorbik asit standart grafiği

Likenlerin tüm ekstraktları değişik oranlarda toplam antioksidan kapasitesi aktivitesi göstermiştir. *Protoparmeliopsis muralis* likeninin etanol ekstraktı en yüksek aktiviteyi sergilerken, bunu sırasıyla *Protoparmeliopsis muralis* kloroform ekstraktı, *Parmotrema perlatum* etanol ekstraktı, *Parmotrema perlatum* kloroform ekstraktı, *Protoparmeliopsis muralis* su ekstraktı ve *Parmotrema perlatum* su ekstraktı takip etmektedir. Her iki liken türünün de etanol ekstraktlarında en yüksek aktiviteye rastlanılmıştır.



**Tablo 3.8** Liken ekstraktlarının toplam antioksidan kapasiteleri\* ( $\mu\text{g}$  askorbik asit/g liken)

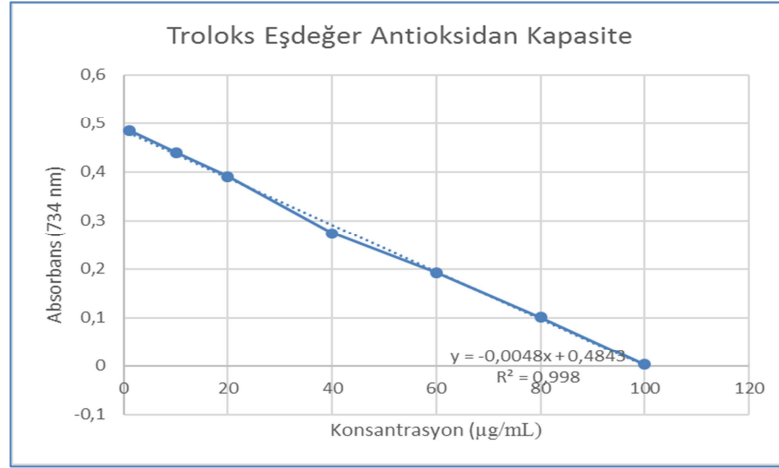
Liken ekstraktı	Toplam antioksidan kapasiteleri* ( $\mu\text{g}$ askorbik asit/g liken)
<i>Protoparmeliopsis muralis</i> su ekstraktı	69,45 $\pm$ 0,49 <sup>b</sup>
<i>Protoparmeliopsis muralis</i> etanol ekstraktı	246,55 $\pm$ 0,77 <sup>f</sup>
<i>Protoparmeliopsis muralis</i> kloroform ekstraktı	166,59 $\pm$ 1,00 <sup>e</sup>
<i>Parmotrema perlatum</i> su ekstraktı	22,11 $\pm$ 1,17 <sup>a</sup>
<i>Parmotrema perlatum</i> etanol ekstraktı	146,81 $\pm$ 1,21 <sup>d</sup>
<i>Parmotrema perlatum</i> kloroform ekstraktı	86,85 $\pm$ 0,21 <sup>c</sup>

\*Değerler üç deneyin ortalamasıdır  $\pm$  standart sapma

Çalışılan liken ekstraktları arasındaki farklılıklar istatistiksel olarak önemlidir (P<0,05).

### 3.3.5. TEAC Deneyi

Liken ekstraktlarının troloks eşdeğer antioksidan kapasitesi sonuçları Tablo 3.9’da verilmiştir, askorbik asit standart grafiği ise Şekil 3.7’de verilmiştir. Çalışılan liken ekstraktlarından en yüksek ve en düşük troloks eşdeğer kapasiteleri sırasıyla *Parmotrema perlatum* likeninin kloroform ekstraktında ve *P. perlatum* likeninin su ekstraktında belirlenmiştir. Genel olarak *Protoparmeliopsis muralis* likeninin troloks eşdeğer antioksidan kapasitesi *P. perlatum*’unkinden daha yüksektir (*P. perlatum* likeninin kloroform ekstraktı dışında).



Şekil 3.7 Troloks standart grafiği

Tablo 3.9 Liken ekstraktlarının TEAC değerleri (µg troloks/g liken)

Liken ekstraktı	Troloks eşdeğer antioksidan kapasiteleri* (µg troloks/g liken)
<i>Protoparmeliopsis muralis</i> su ekstraktı	91,20±0,013 <sup>b</sup>
<i>Protoparmeliopsis muralis</i> etanol ekstraktı	213,10±0,033 <sup>e</sup>
<i>Protoparmeliopsis muralis</i> kloroform ekstraktı	155,34±0,055 <sup>d</sup>
<i>Parmotrema perlatum</i> su ekstraktı	61,48±0,010 <sup>a</sup>
<i>Parmotrema perlatum</i> etanol ekstraktı	107,70±0,001 <sup>c</sup>
<i>Parmotrema perlatum</i> kloroform ekstraktı	335,63±0,001 <sup>f</sup>

\*Değerler üç deneyin ortalamasıdır ± standart sapma

İstatistiksel açıdan karşılaştırıldığında, çalışılan tüm liken ekstraktları arasında önemli farklılıklar bulunmaktadır (P<0,05).

### 3.3.6. CUPRAC Deneyi

*Protoparmeliopsis muralis* ve *Parmotrema perlatum* türleri ekstraktlarının CUPRAC sonuçları Tablo 3.10'da özetlenmektedir. Ekstraktların absorbanslarındaki artış CUPRAC aktivitelerindeki artışı göstermektedir.

**Tablo 3.10** Liken ekstraktlarının ve BHT'nin CUPRAC değerleri (nm)

Liken	Konsantrasyon	Absorbans*
<i>Protoparmeliopsis muralis</i> (SE)	250	0,223±0,007 <sup>a</sup>
	500	0,301±0,015 <sup>b</sup>
	750	0,354±0,006 <sup>c</sup>
	1000	0,409±0,006 <sup>d</sup>
<i>Protoparmeliopsis muralis</i> (EE)	250	0,284±0,013 <sup>a</sup>
	500	0,316±0,011 <sup>b</sup>
	750	0,390±0,010 <sup>c</sup>
	1000	0,434±0,021 <sup>d</sup>
<i>Protoparmeliopsis muralis</i> (KE)	250	0,192±0,005 <sup>a</sup>
	500	0,209±0,004 <sup>a</sup>
	750	0,275±0,017 <sup>b</sup>
	1000	0,314±0,012 <sup>c</sup>
<i>Parmotrema perlatum</i> (SE)	250	0,264±0,014 <sup>a</sup>
	500	0,338±0,019 <sup>b</sup>
	750	0,435±0,025 <sup>c</sup>
	1000	0,509±0,008 <sup>d</sup>
<i>Parmotrema perlatum</i> (EE)	250	0,205±0,017 <sup>a</sup>
	500	0,300±0,023 <sup>b</sup>
	750	0,435±0,022 <sup>c</sup>
	1000	0,505±0,014 <sup>d</sup>
<i>Parmotrema perlatum</i> (KE)	250	0,420±0,004 <sup>a</sup>
	500	0,526±0,035 <sup>b</sup>
	750	0,602±0,014 <sup>c</sup>
	1000	0,766±0,041 <sup>d</sup>
BHT	250	0,643±0,008 <sup>a</sup>
	500	0,695±0,015 <sup>b</sup>
	750	0,805±0,017 <sup>c</sup>
	1000	0,882±0,001 <sup>d</sup>

\*Değerler üç deneyin ortalamasıdır ± standart sapma

Sonuçlar incelendiğinde *Parmotrema perlatum* likeninin *Protoparmeliopsis muralis* likenine kıyasla daha yüksek CUPRAC aktivitesine sahip olduğu görülmektedir. *P.*

*muralis* likeni için en yüksek aktivite ve en düşük aktivite sırasıyla etanol ve kloroform ekstraktlarında, *P. perlatum* likeni için en yüksek ve en düşük aktiviteler ise sırasıyla kloroform ve etanol ekstraktlarında belirlenmiştir. Çalışılan liken ekstraktları standart madde olarak kullanılan BHT'ye oranla daha düşük aktivite göstermiştir. Ayrıca, liken ekstraktlarında konsantrasyona bağlı olarak artan CUPRAC aktivitesi saptanmıştır.

İstatistiksel açıdan ekstraktların konsantrasyonları arasındaki farklılıklar kendi aralarında incelenmiştir. *Protoparmeliopsis muralis* likeninin su ekstraktının 250, 500, 750 ve 1000 µg/mL konsantrasyonları arasında istatistiksel açıdan önemli farklılıklar saptanmıştır ( $P<0,05$ ). *P. muralis* likeninin etanol ekstraktının 250, 500, 750 ve 1000 µg/mL konsantrasyonları arasında istatistiksel açıdan önemli farklılıklar saptanmıştır ( $P<0,05$ ). *P. muralis* likeninin kloroform ekstraktlarının 250 ve 500 µg/mL konsantrasyonları arasındaki farklılıklar önemli bulunmazken ( $P>0,05$ ), 750 ve 1000 µg/mL konsantrasyonları arasındaki farklılıklar önemlidir ( $P<0,05$ ).

*Parmotrema perlatum* su ekstraktının 250, 500, 750 ve 1000 µg/mL konsantrasyonları arasında istatistiksel açıdan önemli farklılıklar belirlenmiştir ( $P<0,05$ ). *P. perlatum* etanol ekstraktının 250, 500, 750 ve 1000 µg/mL konsantrasyonları arasında istatistiksel açıdan önemli farklılıklar tespit edilmiştir ( $P<0,05$ ). Benzer şekilde, *P. perlatum* kloroform ekstraktının 250, 500, 750 ve 1000 µg/mL konsantrasyonları arasında istatistiksel açıdan önemli farklılıklar tespit edilmiştir ( $P<0,05$ ). Standart madde olarak kullanılan BHT'nin 250, 500, 750 ve 1000 µg/mL konsantrasyonları arasında istatistiksel açıdan önemli farklılıkların olduğu görülmüştür ( $P<0,05$ ).

### **3.4. Antitirozinaz Aktivitesi**

Liken ekstraktlarının antitirozinaz aktiviteleri yüzde inhibisyonları ve  $IC_{50}$  değerleri Tablo 3.11'de verilmiştir. Her iki likeninde etanol ekstraktlarında tirozinaz inhibisyonu aktivitesine rastlanırken, diğer liken ekstraktlarında aktiviteye rastlanılmamıştır.

**Tablo 3.11** Liken ekstraktlarının ve kojik asitin antitirozinaz aktiviteleri

Liken	Konsantrasyon	%inhibisyon*	IC <sub>50</sub>
<i>Protoparmeliopsis muralis</i> (EE)	0,00001	7,83±2,02 <sup>b</sup>	3,191±0,057
	0,001	13,33±1,52 <sup>a</sup>	
	0,01	14,83±4,64 <sup>a</sup>	
	10	16,33±1,89 <sup>a</sup>	
<i>Parmotrema perlatum</i> (EE)	0,00001	6,83±3,78 <sup>a</sup>	2,862±0,049
	0,001	7,66±2,25 <sup>ab</sup>	
	0,01	13,16±3,78 <sup>bc</sup>	
	10	13,66±1,52 <sup>c</sup>	
Kojik asit	0,00001	70,83±0,90 <sup>a</sup>	1,868±0,443
	0,001	79,68±1,56 <sup>b</sup>	
	0,01	89,06±1,56 <sup>c</sup>	
	10	91,66±0,90 <sup>d</sup>	

\*Değerler üç deneyin ortalamasıdır ± standart sapma

IC<sub>50</sub>, yüzde 50 inhibisyona neden olan inhibitör konsantrasyonu olarak tanımlanmaktadır. Bir inhibitörün IC<sub>50</sub> değerinin düşük değerde olması, yüksek aktivite gösterdiğinin ifadesidir. Liken örneklerinin IC<sub>50</sub> değerleri incelendiğinde *P. muralis* likeninin *Parmotrema perlatum* likenine kıyasla daha yüksek IC<sub>50</sub> değerine sahip olduğu görülmektedir. Ayrıca, antitirozinaz standardı olarak kullanılan kojik asitin IC<sub>50</sub> değeri, çalışılan iki liken türünden daha düşük bulunmuştur.

İstatistiksel açıdan ekstraktların konsantrasyonları arasındaki farklılıklar kendi aralarında incelenmiştir. *Parmotrema perlatum* likeninin etanol ekstraktının 10, 0,1, 0,001 ve 0,00001 µg/mL konsantrasyonları arasında istatistiksel açıdan önemli farklılıklar tespit edilmiştir (P<0,05). *Protoparmeliopsis muralis* likeninin etanol ekstraktının 10, 0,1, 0,001 µg/mL konsantrasyonları arasında farklılıklar istatistiksel olarak önemsiz iken (P>0,05); 0,00001 µg/mL konsantrasyonu arasındaki fark önemlidir (p<0,05). Benzer şekilde kojik asitin 10, 0,1, 0,001 ve 0,00001 µg/mL

konsantrasyonları arasında istatistiksel açıdan önemli farklılıklar saptanmıştır (P<0,05).



#### 4. TARTIŞMA VE SONUÇ

Bu çalışmada Lecanoraceae familyasına ait *Protoparmeliopsis muralis* likeninin ve Parmeliaceae familyasına ait *Parmotrema perlatum* liken türlerinin su, etanol ve kloroform çözücülerini kullanılarak Sokslet cihazı kullanılarak ekstraksiyonları gerçekleştirildi. Ekstraksiyon sonrasında elde edilen ekstraktların değişik mikroorganizmalar üzerine antimikrobiyal etkinliği disk difüzyon yöntemi kullanılarak belirlendi. Ayrıca ekstraktların MİK, MBK ve MFK değerleri de belirlendi. Farklı konsantrasyonlarda hazırlanan liken ekstraktlarının antitirozinaz aktiviteleri, metal şelatlama aktiviteleri ve CUPRAC aktiviteleri belirlendi. Toplam fenolik içeriği galik asit standart grafiğinden, toplam flavonoid içeriği kateşin standart grafiğinden, toplam antioksidan kapasitesi askorbik asit standart eğrisinden ve TEAC değerleri troloks standart grafiğinden elde edilen denklemler kullanılarak hesaplandı.

Doğal materyallerdeki biyoaktif bileşikler farklı özelliklere ve farklı polaritelere sahip olduklarından biyoaktif bileşiklerin ekstraksiyonu için ideal çözücüyü belirleme, biyoaktif bileşiklerin ekstraksiyon verimlerinin maksimuma çıkarılması açısından önemlidir (112).

Ürün kalitesini belirlemede en önemli faktör olan ekstrakt içindeki kristallerin kinetikleri ve morfolojileri ekstrakt içersinde bulunan çözücünden etkilenebilir (113). Bu nedenle de, uygun bir çözücü seçimi, bir örnekteki biyoaktif bileşiklerin en iyi şekilde kullanılabilmesi için ilk adımdır (114). Bitki örneklerinden biyolojik olarak aktif bileşikler ekstraksiyonu, kullanılan çözücü içersindeki her özel yapının çözünebilirliğinden etkilenir. Ayrıca, çözücünün polaritesi ve diğer özellikler bu biyoaktif materyallerin çözünebilirliğinin artırılmasında çok önemli bir role sahiptir (115).

Değişik ekstraksiyon yöntemleri ve farklı çözücüler kullanılarak yapılan liken çalışmalarında, farklı polaritelerdeki çözücülerin % ekstrakt miktarı üzerinde farklı etkilere sahip olduğu gösterilmiştir (116, 117). Araştırmamızda her iki liken türü için de % ekstrakt miktarı deneylerde kullandığımız çözücülere göre etanol>kloroform>su şeklinde sıralanmaktadır.

Doğa, tıbbi bitkiler açısından çok değerli bir kaynaktır. Tıbbi bitkilerden biyoaktif bileşikler içeren ekstraktların hazırlanması bu bitkilerin fizyolojik aktivitelerinin gösterilmesine de olanak sağlar. Ayrıca, azaltılmış toksisiteye sahip daha potansiyel ilaçların üretimine yol açan farmakolojik çalışmaları da kolaylaştırır (118).

Bu çalışmada *Protoparmeliopsis muralis* ve *Parmotrema perlatum* likenlerinin su, etanol ve kloroform ekstraktlarının beş gram pozitif bakteri, beş gram negatif bakteri ve dört maya türüne karşı antimikrobiyal aktivitesi disk difüzyon yöntemi ile belirlendi. Ayrıca, çalışılan ekstraktların MİK, MBK ve MFK değerleri de belirlendi. Sonuçta *P. muralis* liken ekstraktlarının inhibisyon zonları 9-34 mm aralığında; *P. perlatum* likeni ekstraktlarının inhibisyon zonları ise 6-27 mm aralığında değişmektedir. *P. muralis* ve *P. perlatum* likenlerinin ekstraktlarının MİK değerleri sırasıyla 0,007322-15 mg/mL aralığında ve 0,46875-15 mg/mL aralığında bulundu.

Doğal ajanların antimikrobiyal aktivite sergilemelerindeki muhtemel mekanizmalardan birisi de bakteriyal eflüks pompalarının inhibisyonudur. Bakteriler antibiyotikleri hücrelerinden çıkarırken, kendini savunma mekanizması olarak eflüks pompalarını kullanırlar. Pek çok çalışmada özellikle *S. aureus* ve *Staphylococcus epidermidis* gibi gram pozitif bakterilerin etkili eflüks pompa inhibitörü araştırmalarında fitokimyasalların önemli bir yere sahip olduğu kaydedilmiştir (119).

Bazı araştırmacılar, bitki ekstraktlarının antimikrobiyal bileşenlerinin mantar hücresindeki membranların proteinleri ve enzimleri ile etkileşerek hücre membranlarından geçtiğini ve böylelikle mantar hücresinin ölümüne neden olduklarını ileri sürmüştür. Bazı araştırmacılar ise bitki ekstraktlarının inhibitör etkisini bitki ekstraktları ve bileşenlerinin hidrofobik karakterine bağlamaktadır. Bitki metabolitleri mantar hücre membranı ve mitokondrisinin lipidlerini ayırarak hücre içersindeki iyonların ve hücre içeriğinin hücreden sızmasına bağlı hücre ölümlerine neden olabileceğini bildirmiştir (120).

Tez çalışmamızda kullandığımız türlerden *Protoparmeliopsis muralis*'in antimikrobiyal etkinliği ile ilgili pek çok çalışma yapılmıştır. Örneğin, Jeon ve arkadaşları *P. muralis*'in kırmızı biberde antrakinoza neden olan mantarlar üzerine



aktivitesini değerlendirmiş ve *P. muralis* likeninin mantarlar üzerinde inhibe edici etki gösterdiği sonucuna varılmıştır (121).

Valadbeigi ve Rashki *Lecanora muralis*'in metanol ve su ekstraktlarının antibakteriyel etkinliklerini *Bacillus megaterium*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Shigella sonnei* üzerinde denemiştir. Bu türün su ekstraktının hiçbir test bakterisine karşı aktivite sağlamadığı belirlenirken, metanol ekstraktının güçlü antimikrobiyal etkiye sahip olduğu belirlenmiştir (122). Araştırmamızı oluşturan ve *L. muralis*'in sinonimi olan *Protoparmeliopsis muralis* likeninin su ekstraktının da benzer şekilde çalışılan test mikroorganizmaları üzerinde inhibe edici etkisi bulunmadığı gözlemlenmiştir.

Rankovic ve arkadaşları *L. muralis*'in aseton ekstraktının *Bacillus mycoides* IPH 197, *Bacillus subtilis* IPH 189, *Staphylococcus aureus* IPH 221, *Enterobacter cloaceae* IPH 241, *E. coli* IPH 246 ve *Klebsiella pneumoniae* IPH 251 bakterileri ve *Candida albicans* IPH 1316 suşlarına karşı MİK değerlerini belirlemiştir. *B. subtilis* ve *S. aureus* bakterilerine karşı MİK değerleri sırasıyla 6,25 mg/mL ve 3,12 mg/mL olarak saptanırken, *C. albicans*'a karşı antimikrobiyal etkinlik saptanmamıştır (123). Araştırmalarımızda *P. muralis*'in *B. subtilis* ve *S. aureus* bakterileri üzerinde daha yüksek MİK değerleri gösterdiği ve *C. albicans*'a karşı antifungal aktivite sergilediği belirlenmiştir. Bu çalışma ile Rankovic ve arkadaşlarının çalışması arasındaki farklılıkların, çalışılan liken türlerinin farklı coğrafyalardan toplanmasından, liken ekstraktlarının hazırlanmasında farklı çözücüler kullanılmasından, çalışılan mikroorganizma suşlarının kültür numaralarının farklı olmasından ve çalışılan ekstrakt konsantrasyonlarının farklı olmasından kaynaklandığı düşünülmektedir.

Kosanic ve Rankovic'in *L. muralis* likeninin aseton, metanol ve su ekstraktlarının antimikrobiyal aktivitelerini inceledikleri bir çalışmada, bu likenin çalışılan bakteri suşlarına karşı güçlü antibakteriyel etki, mantar suşlarına karşı oldukça zayıf antifungal etki gösterdiğini tespit etmişlerdir. Ayrıca, su ekstraktının test mikroorganizmaları üzerine aktivite göstermediği belirlenmiştir (124). Çalışmamızda *P. muralis* likeninin etanol ve kloroform ekstraktlarının antibakteriyel etkisinin antifungal etkiye kıyasla zayıf olduğu ortaya konmuştur. Su ekstraktının ise

literatürle benzer şekilde test mikroorganizmaları üzerinde aktivite göstermediği sonucuna varılmıştır.

Semnain ve arkadaşları *L. muralis*'in su, asetonlu ve etanollü ekstraktlarının *Staphylococcus aureus* ve *Salmonella typhimurium* üzerindeki etkilerini inceledi. Çalışma sonucunda su ekstraktının test bakterilerine karşı aktiviteye sahip olmadığı belirlenmiştir. Ayrıca aynı çalışma sonucunda etanol ekstraktının aseton ekstraktından daha aktif olduğu da saptanmıştır (125). Literatürle uyumlu olarak çalışmalarımızda *P. muralis* likeninin su ekstraktının antimikrobiyal açıdan aktif olmadığı belirlenmiştir.

Almola ve arkadaşları *L. muralis* türünün etanol ve aseton ekstraktlarının *Bacillus* sp., *Micrococcus luteus* ve *Staphylococcus intermedius* suşlarına karşı aktif olduğunu rapor etmiştir. Ayrıca, liken ekstraktlarının gram pozitif bakteriler üzerinde gram negatif bakterilere oranla daha etkili olduğu belirtilmiştir(126). Çalışmalarımızda da Almola ve arkadaşları ile uyumlu sonuçlar elde edilmiştir. Çalıştığımız liken ekstraktları gram pozitif bakteriler üzerinde daha olumlu etkiler sergilemiştir.

Gram negatif hücre duvarları gram pozitif hücre duvarlarından daha karmaşık bir yapıya sahiptir. İnce peptidoglukan tabakası plazma membranının yakınındadır ve duvar ağırlığının yaklaşık % 5-10'unu oluşturan periplazmik boşluk tarafından sınırlanır. Dış membran ince peptidoglukan tabakasının dışarsında uzanır, dış membranın en önemli bileşeni lipopolisakkaritlerdir. Lipopolisakkaritlerin en önemli fonksiyonu geçirgen bir bariyer meydana getirmektir. Lipopolisakkaritlerin geometrisi ve komşu lipopolisakkarit molekülleri ile arasındaki etkileşimlerin bakterinin yaralanması ya da ölmesini sağlayan safra tuzları, antibiyotik ve diğer toksik maddelerin girişini sınırlandırmak olduğu düşünülmektedir. Lipopolisakkaritler patojenik gram-negatif bakterilerin konak savunmasından korunmasında da rol oynar.

Gram pozitif hücre duvarı ise plazma membranının dışarsında uzanan tek ve kalın homojenik bir peptidoglukan tabakasından (murein) oluşur. Ayrıca, gram pozitif hücre duvarları bol miktarda teikoik asit içerir (127).

Misic ve arkadaşları *L. muralis*'in su ekstraktının antimikrobiyal aktivite göstermediğini, aseton ve metanol ekstraktlarının ise aktivite gösterdiğini gözlemlemiştir (128).

Karagöz ve arkadaşlarının yaptıkları bir çalışma sonucunda, *L. muralis*'in su ekstraktının etanol ekstraktına oranla aktif olduğunu rapor etmiştir (9). Çalışmamızda ise bu likenin etanol ekstraktının su ekstraktına oranla daha aktif olduğu belirlenmiştir. Bu durum, kullanılan test mikroorganizmalarının farklılığından, ekstraksiyon metodunun farklılığından ve kullanılan liken konsantrasyonlarından kaynaklanmaktadır.

Çalışmamızda kullanılan *Parmotrema perlatum* likeni de değişik araştırmacılar tarafından antimikrobiyal özellikleri açısından incelenmiştir.

Hoda ve Vijayaraghavan *P. perlatum* likeninin hekzan ekstraktının *Escherichia coli*, *Pseudomonas* sp., *Bacillus subtilis* bakterileri ve *Cryptococcus neofarmans*, *Candida albicans*, *Aspergillus niger* ve *Aspergillus fumigatus* mantarları üzerindeki etkilerini incelemiş ve bu ekstraktın çalışılan tüm test mikroorganizmaları üzerinde olumlu sonuçlar verdiğini saptamıştır (129). Çalışmamızda ise *P. perlatum* likeninin etanol ve kloroform ekstraktları *B. subtilis* üzerinde zayıf bir etki gösterirken, *C. albicans* üzerinde oldukça kuvvetli etki göstermiştir.

*P. perlatum* likeninin etanol ekstraktı kullanılarak sentezlenen gümüş nanopartiküllerinin *Streptococcus* sp., *Enterococcus* sp., *Klebsiella* sp., *Escherichia coli*, *Pneumoniae* sp., *Serratia* sp. ve *Planomicrobium* sp. mikroorganizmaları üzerindeki antimikrobiyal aktivitelerinin incelendiği bir araştırmada, maksimum aktivite *Streptococcus* sp.'ye karşı elde edilirken, minimum aktivite *Klebsiella planticola*'ya karşı elde edilmiştir (130).

*P. perlatum* likeninin etanol ve metanol ekstraktlarının *Pseudomonas aeruginosa*, *Proteus vulgaris*, *Bacillus subtilis*, *Streptococcus pneumoniae*, *Streptococcus faecalis* ve *Staphylococcus aureus* üzerinde etkilerinin denendiği bir çalışmada, metanol ekstraktının etanol ekstraktından daha aktif olduğu sonucuna varılmıştır

(131). Araştırmamızda da *P. perlatum* likeninin etanol ekstraktının *B. subtilis* bakterisi üzerinde zayıf bir antimikrobiyal etkiye sahip olduğu, *S. aureus* üzerinde ise etki göstermediği ortaya konmuştur.

Kumar ve arkadaşlarının *P. perlatum* likeninin etanol ekstraktı ile gerçekleştirdikleri çalışmalarında liken ekstraktının *Staphylococcus aureus*'a karşı etkili olduğunu saptamışlardır (132). Araştırmamızda da *P. perlatum* likeninin etanol ekstraktının *S. aureus* üzerinde inhibitör etki göstermediği belirlenmiştir. Bu durumun, likenlerin farklı coğrafyalardan toplanmasından ve test mikroorganizmalarına uygulanan ekstraktların konsantrasyonlarının farklı olmasından kaynaklanabileceği düşünülmektedir.

Ağaçlı bitkilerin patojenik mantarlardan korunması amacıyla *P. perlatum* likeninin su ve aseton ekstraktlarının antifungal etkisi Shaffer tarafından bitki patojeni bir mantar olan *Cladosporium* sp. üzerinde çalışılmıştır. Çalışmalar neticesinde, ekstraktların mantar gelişimini başarılı bir şekilde inhibe ettiği ve su ekstraktlarının aseton ekstraktlarından daha aktif olduğunu ortaya konmuştur (133). Araştırmamızda ise bu literatür çalışmasının aksine *P. perlatum* likeninin etanol ve kloroform ekstraktlarının *Candida albicans* ve *Candida tropicalis* türleri üzerinde kuvvetli etki gösterdiği fakat su ekstraktının mantarlar üzerinde aktif olmadığı belirlenmiştir. Literatür çalışması ve araştırmamız arasında farklılığın en temel nedeni, kullanılan mikroorganizma türünün farklı olmasıdır.

*P. perlatum* likeninin sinonimi olan *P. perlata*'nın metanol, etil asetat ve aseton ekstraktlarının *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* ve *Proteus mirabilis* bakterileri üzerindeki etkinliklerinin incelendiği bir çalışmada, bu likenin ekstraktlarının yalnızca *S. aureus*'a karşı antibakteriyel aktivite sergilediği görülmüştür (134).

Momoh ve Adikwu *P. perlata* likeninin etanol ekstraktının *Staphylococcus aureus*'a karşı antimikrobiyal aktivitesi ile koloidal gümüşün antimikrobiyal aktivitesini kıyaslamış ve koloidal gümüşün *S. aureus*'a karşı aktivite göstermediğinde bile, liken ekstraktının *S. aureus*'a karşı etkili olduğunu görmüştür (135).

Araştırmalarımızda, *P. perlata* likeninin sinonim olan *P. perlatum* likeninin etanol ekstraktının da *S. aureus*'u inhibe edemediği belirlenmiştir.

Gehlot ve arkadaşları *P. perlata* likeninin etanol ve metanol ekstraktlarının ilaca dirençli *Helicobacter pylori* izolatları üzerinde inhibitör aktivite gösterdiklerini açığa ıkarımıştır (136).

*P. perlata* likeninin % 50 su etanollü ve etanollü ekstraktlarının *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus mutans*, *Bacillus cereus*, *Corynebacterium xerosis*'e karşı aktif olduğu bildirilmiştir (137).

Sibi ve arkadaşları *P. perlata* türünün metanol ekstraktının besin kökenli bakteriler üzerine aktivitesini değerlendirmiştir (138).

Hindistan mutfak baharatlarından biri olan *P. perlata* likeninin metanol ekstraktının soğan siyah küfüne karşı aktivitesinin incelendiği bir çalışmada *P. perlata*'nın küfü inhibe ettiği ortaya konmuştur (139).

*P. perlata* likeninin petrol eteri, kloroform ve metanol ekstraktlarının *Pseudomonas solanacearum*, *Clavibacter michiganensis*, *Escherichia coli* bakterilerine ve *Fusarium oxysporum*, *Aspergillus niger*, *Rhizopus nigricans* mantarlarına karşı etkinlik gösterdiği tespit edilmiştir (140). Benzer şekilde aynı likenin ekstraktlarının antibakteriyel ve antifungal aktiviteleri kaydedilmiştir (141).

*P. perlata* likeninin etanol ekstraktının *Bacillus cereus*, *Mycobacterium smegmatis*, *Micrococcus luteus* ve *Staphylococcus aureus*'a karşı aktivite gösterdiği, *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis*, *Proteus vulgaris*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Enterococcus faecalis*, *Staphylococcus saprophyticus*, *Candida albicans*, *Microsporum* sp., *Cypseum* sp. ve *Trichophyton rubrum*'a karşı ise aktivite göstermediği ortaya konmuştur (142). Çalışmalarımızda ise mevcut literatürün aksine *P. perlatum* likeninin etanol ekstraktının *S. aureus*'a aktivite göstermediği; *B. subtilis*, *P. vulgaris* ve *C. albicans* üzerine etki gösterdiği belirlenmiştir. Bu durumun, araştırmamızda ekstraktların elde edilmesinde soksalet ekstraksiyonu kullanılırken bahsedilen

literatür çalışmasında ekstraktların elde edilmesinde maserasyon tekniğinin kullanılmasından ve çalışma konumuzu oluşturan likenin Türkiye’de toplanmasına rağmen literatür çalışmasını oluşturan türün Pakistan’dan da toplanmasından kaynaklandığından düşünülmektedir.

*P. perlata* türünün % 70 su metanol ekstraktının *Bacillus cereus*, *Bacillus pumilis*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*, *Citrobacter freundii*, *Klebsiella pneumoniae*, *Candida albicans* ve *Aspergillus niger* üzerine inhibitör etkisinin olduğu belirlenmiştir (132).

*P. perlata* likeninin petrol eteri, etil asetat, metanol ekstraktlarının *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* ve *Candida albicans*’a antimikrobiyal etki gösterdiği kaydedilmiştir (143).

Leela ve Iyer *P. perlata* likeninin metanol ekstraktının *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis* ve *Pseudomonas aeruginosa*’ya karşı olumlu sonuçlar verdiğini belirtmiştir (144).

Antimikrobiyal etkinliğe sahip bileşikler mikroorganizmaları öldüren ya da bunların üremesini geçici olarak azaltan etkiler gösterirler. Gerçekleştirilen disk difüzyon metodu, öldürücü ve üremeyi baskılayan dozu belirlemek için yetersizdir. Nasıl bir etki sergilendiğini saptamak için disk difüzyon testinin yanı sıra, MİK ve MBK/MFK testlerinin de uygulanması daha sağlıklıdır. Letal etkiye sahip maddelerin MBK/MFK değerleri MİK değerlerine yakın iken, üremeyi baskılayıcı etki gösteren maddelerin MİK değerleri MBK/MFK değerlerinden çok daha fazladır. Gözle görülebilir mikroorganizma gelişiminin engellendiği en düşük madde konsantrasyonu MİK değeridir (145).

Mikroorganizma gelişimini engelleyen en düşük konsantrasyon MBK ya da MFK adını almaktadır (145).

Antioksidan bileşikler kardiyovasküler hastalıklar başta olmak üzere pek çok hastalığa karşı koruyucu rol üstlenmektedir. Bu çalışmada *Parmotrema perlatum* ve

*Protoparmeliopsis muralis* likenlerinin su, etanol ve kloroform ekstraktlarının antioksidan aktiviteleri de metal şelatlama aktivitesi, toplam fenolik içeriğin belirlenmesi, toplam flavonoid içeriğin belirlenmesi, toplam antioksidan kapasitesi, TEAC ve CUPRAC yöntemleri ile belirlendi.

Sonuçta, *P. perlatum* likeninin toplam fenolik içeriği en düşük ve en yüksek değerleri sırasıyla 45,65 ve 468,32 µg GAE/g liken olarak; *P. muralis* likeninin toplam fenolik içeriği en düşük ve en yüksek değerleri ise 18,29 ve 200,97 µg GAE/g liken olarak saptandı. *P. perlatum* likeninin toplam flavonoid içeriği en düşük ve en yüksek değerleri sırasıyla 13,95 ve 89,27 µg QE/ g liken olarak; *P. muralis* likeninin toplam flavonoid içeriği en düşük ve en yüksek değerleri ise 39,90 ve 275,14 µg QE/ g liken olarak belirlendi. Liken ekstraktlarının konsantrasyonları arttıkça metal şelatlama aktivitelerinin arttığı ve EDTA'nın liken ekstraktlarından daha yüksek aktivite gösterdiği de ortaya konmuştur.

Ayrıca, çalışmalarımız neticesinde *P. muralis* likeninin *P. perlatum* likenine oranla daha yüksek toplam antioksidan kapasitesine sahip olduğu da belirlenmiştir. Liken türlerinin CUPRAC değerleri kıyaslandığında *P. perlatum* likeninin *P. muralis* likenine oranla daha yüksek CUPRAC aktivitesi sergilediği görülmüştür.

Antioksidan aktivitesinin belirleme metodları, kullanılan kimyasal madde sonucu oluşan reaksiyon bakımından iki sınıfa ayrılır:

- a) Hidrojen atomu transferi reaksiyonuna bağlı olanlar (HAT)
- b) Tek elektron transferi reaksiyonlarına bağlı olanlar (ET)

HAT reaksiyonuna dayanan yöntemlerde aktivite belirleme yöntemlerinin pekçoğu azo bileşiklerinin bozunması neticesinde meydana gelen peroksil radikallerinin antioksidan ve substrat tarafından yarışmalı bir şekilde süpürülmesi esasına bağlıdır. ET'ye dayalı analiz metodları ise, antioksidanın oksidan maddeyi indirgeme yeteneğini göre renk değişimine bağlı olarak aktivitenin ölçülmesine bağlıdır.

Bitkilerdeki antioksidan maddelerin moleküler çeşitlilikleri göz önüne alındığında yalnızca tek bir metod kullanılarak bir bitkinin antioksidan özelliği hakkında karar vermek uygun olmayabilir (146).

Polifenoller, bitkiler aleminin en etkili antioksidatif bileşiklerinden biridir (146). Fenolikler aktif metal iyonlarını şelatlama, lipid serbest radikal zincirlerini inaktif ederek lipid peroksidasyonuna karşı koruma, hidroperoksitlerin reaktif oksiradikallere dönüşümü engelleme gibi önemli özelliklere sahiptir (147). Fenoliklerin yapılarındaki hidroksil grupları sayesinde serbest radikal süpürme yetenekleri arttığından, total fenolik konsantrasyonu antioksidan aktivitenin hızlı bir şekilde araştırılmasında temel teşkil etmektedir. Düşük seviyelerde oksidasyonun gerçekleştiği ve oksijen içermeyen C3 yan zincire sahip fenolik bileşiklerin antimikrobiyal karaktere de sahip olduğu bildirilmiştir. Fenolik bileşiklerin kısmen hidrofobik doğası onların antimikrobiyal aktivitelerinden sorumludur. Mikroplara karşı polifenollerin toksisitesi, mikrobiyal adhezinliği, hücre zarı taşıma proteinlerini inaktive etmeleri, karbonhidratlarla spesifik olmayan interaksiyonları ve hidrolitik enzimlerin inhibisyonları nedeniyledir. Fenolik bileşiklerin antimikrobiyal aktivite sergilediği yapılan çalışmalarla da ortaya konmuştur (148).

Fenolikler, olumsuz iklim koşullarında ve stres durumlarında likenlerin gelişmelerinin regüle edilmesinde önemli rol oynayan major liken sekonder metabolitlerinden biridir. Likenler genellikle ekstrem çevre koşullarında yaşar ve oksidatif strese karşı koyabilmek için polifenol üretimlerini artırır. Likenlerin antioksidatif özelliklerinin içerdikleri fenoliklere bağlı olduğu düşünülmektedir (149).

Rankovic ve arkadaşları *Lecanora muralis* likeninin aseton ekstraktının toplam fenolik içeriğini  $43,19 \pm 1,085$  µg pirokateşol eşdeğeri olarak belirlemiştir (123). Mevcut çalışmamızda ise kullanılan çözücüler ve kullanılan standart antioksidan madde farklılığından dolayı  $18,29 \pm 0,006$  ve  $200,97 \pm 0,002$  gallik asit eşdeğeri/g liken şeklinde farklı sonuçlara ulaşılmıştır.



Yapılan bir çalışmada *L. muralis*'in toplam fenolik içeriği  $50,93 \pm 1,191$  µg pirokateşol/mg ekstrakt olarak belirlenirken (150), başka bir araştırmada aynı türün toplam fenolik içeriği  $74,66 \pm 0,09$  mg gallik asit eşdeğeri/g kuru ağırlık olarak saptanmıştır (122).

*Parmotrema perlatum* likeninin toplam fenolik içeriği ile ilgili de çalışmalar yapılmıştır. Rahman ve arkadaşları *P. perlata*'nın metanol ekstraktının toplam fenolik içeriğini 78,4 µg/mL olarak belirlerken (118), Paul ve Singh aynı likenin 9:1 oranında etanol:su karışımı ekstraktının toplam fenolik içeriğini 55,06 µg/mL olarak belirlemiştir (150). Patil ve arkadaşları *P. perlata* likeninin toplam fenol içeriğini 118,5 mg GAE/g liken olarak hesaplamıştır (151).

Farklı bir çalışmada ise *P. perlatum*'un etanol ekstraktının toplam fenolik içeriğininin çok düşük oranlarda olduğunu rapor edilmiştir (132).

Flavonoid sınıfı, 10.000'den daha fazla yapıya sahiptir. Bitkilerdeki antioksidan flavonoidlerin biyosentezi, strese hassas olan türlerde, strese toleranslı türlere oranla daha hızlıdır (152). Flavonoidler, vitamin P olarak da bilinmektedir. Bitkilerde sarı ve diğer renkli pigmentleri üretmek için kullanılırlar (153).

Flavonoidler bitki polifenol sekonder metabolitlerinin geniş gruplarından biridir ve bitki yaprakları, tohumları, ağaç kabukları ve çiçeklerde yaygın olarak bulunmaktadır. Flavonoidlerin antitümör, antiistemik, antiarterjenik, antiinflamatuvar ve antibakteriyel özelliklere sahip oldukları bilinmektedir. Flavonoidler ayrıca oksijen serbest radikallerini süpürerek, antioksidan enzimleri teşvik ederek ya da oksidatif enzimleri inhibe ederek kuvvetli antioksidan özellikler gösterirler (154).

Flavonoidlerin biyolojik aktiviteleri ile ilgili bugüne kadar pek çok çalışma yürütülmüş ve sonuç olarak bu maddelerin en iyi tanımlanan biyolojik aktivitesinin antioksidan aktivite olduğu görülmüştür. Flavonoidlerin, reaktif oksijen türlerinin üretiminde yer alan biyokimyasal metabolik yollara engel olarak, serbest radikalleri

süpürerek, geçiş metalleri şelatlayarak ve bu metallerin Fenton reaksiyonlarındaki redokslarını iade ederek antioksidan aktivite sergiledikleri rapor edilmiştir (155).

Rankovic ve arkadaşları *Lecanora muralis* likeninin aseton ekstraktının toplam flavonoid içeriğini  $34,56 \pm 1,074$  µg rutin eşdeğeri olarak belirlemiştir (123). Kosanic ve arkadaşları *L. muralis* likeninin toplam flavonoid içeriğini  $39,91 \pm 1,066$  µg rutin eşdeğeri/mg ekstrakt olarak belirlerken (156), Valadbeigi ve Raskhi aynı liken türünün toplam flavonoid içeriğini  $74,78 \pm 0,07$  mg kateşin eşdeğeri/g kuru ağırlık olarak belirlemiştir (122). Patil ve arkadaşları *Parmotrema perlata* likeninin toplam flavonoid içeriğini  $6,89 \pm 0,07$  mg kuersetin eşdeğeri/g liken olarak hesaplamıştır (151).

*P. perlata* likeninin toplam flavonoid içeriğini araştıran çalışmalar da bulunmaktadır. *P. perlata* likeninin 9:1 etanol: su karışımının toplam flavonoid içeriğini  $7,5 \pm 0,3$  µg/mL olarak belirlenmiştir (150). Araştırmamızda ise *P. perlatum* likeninin toplam flavonoid içeriği  $39,90 \pm 0,008$  µg/mL olarak belirlenmiştir.

Geçiş iyonları, özellikle de demir Fenton reaksiyonları sayesinde lipid peroksidasyonuna neden olabilir ve lipid hidroperoksitlerinin zincir reaksiyonlarını sürdürebilen ve hidroperoksitlerin peroksil ve alkoksil radikallerine ayrıştırarak lipid peroksidasyonlarını hızlandırabilir. Lipid peroksidasyonunu katalizleyen geçiş metalleri konsantrasyonunu azalttıklarından metal iyonu şelatlama kapasitesi önemlidir (157).

Talesemi gibi kronik anemili hastalar hayat kalitelerini ve yaşam sürelerini artırmak için düzenli kan transfüzyonlarına ihtiyaç duymaktadır. Transfüze edilmiş kırmızı kan hücrelerinin yıkımından ortaya çıkan demiri insanlar elimine edemezler ve aşırı demir karaciğer, dalak, endokrin organlar ve miyokardiyumda hemosiderin ve ferritin olarak depolanır. Demirin toksik miktarlarda birikimi doku hasarlarına yol açar ve sonunda kalp krizi, diyabet, hipotroidizm ve karaciğer yetmezliği gibi hastalıklar ortaya çıkar. Demir şelatörleri dokulardaki aşırı demiri çözerek onları kararlı ve vücuttan feçes ya da üre ile atılabilen kompleksler haline getirir (158).

Demir (II) şelatlama aktivitesi oldukça önemlidir çünkü geçiş metal iyonları Alzheimer ve Parkinson gibi nörodejeneratif hastalıklara da neden olmaktadır (159).

Çalışılan liken ekstraktlarının metal şelatlama aktiviteleri ile ilgili herhangi bir literatüre ulaşamamıştır.

Fosfomolibdat testi, özellikle kullanılan reaktiflerin ucuzluğu ve metodun çok kısa sürede sonuç vermesi nedeniyle genellikle bitkisel ekstraktların antioksidan aktivitelerinin belirlenmesinde sıklıkla yararlanılan rutin bir testtir (160). Bu deney, antioksidan, oksidan ve molibdenum ligandı arasındaki redüksiyon reaksiyonu oranını araştıran kantitatif bir deneydir (157).

Fosfomolibdenum metodu, antioksidan maddenin Mo (IV)'ü Mo(V)'e indirgemesi ve sonrasında asidik pH'da yeşil fosfat/Mo(V) kompleksinin meydana gelmesi esasına dayanmaktadır. Fosfomolibdat yöntemi ile belirlenen toplam antioksidan kapasitesi deneyi hem suda çözünebilir hem de yağda çözünebilir maddelerin antioksidan kapasitelerinin ortaya konmasında yararlanılabilir. Askorbik asit antioksidan kapasitesinin belirlenmesinde referans antioksidan madde olarak kullanılmaktadır (161).

*Protoparmeliopsis muralis* likeninin toplam antioksidan aktivitesi ile ilgili herhangi bir çalışmaya ulaşamamıştır. Ancak, *Parmotrema perlata* likeninin toplam antioksidan aktivitesi ile ilgili yapılan değişik çalışmalar mevcuttur.

Örneğin, Rahman ve arkadaşları *P. perlata* likeninin metanol ekstraktının toplam antioksidan kapasitesini  $1.3 \text{ mg/mL}^{-1}$  askorbik asit eşdeğeri olarak belirlemiştir (118). Çalışmamızda ise *P. perlatum* likeninin su, etanol ve kloroform ekstratlarının toplam antioksidan kapasiteleri sırasıyla  $22,11 \pm 1,17$ ,  $146,81 \pm 1,21$  ve  $86,85 \pm 0,21 \mu\text{g}$  askorbik asit eşdeğeri/g liken olarak bulunmuştur.

Leela ve Iyer *P. perlata* likenini toplam antioksidan kapasitesini % inhibisyon cinsinden hesaplamış ve sonucu % 39 olarak bulmuştur (144).

*P. muralis* likeninin troloks eşdeğer antioksidan kapasitesi ile ilgili herhangi bir çalışmaya ulaşılamamıştır.

Literatürlerde, *P. perlata* likeninin TEAC deneyinin yapıldığı çalışmalar bulunmaktadır. Hara ve arkadaşları *P. perlatum*'un sinonimlerinden olan *P. chinense* örneklerinin troloks eşdeğer antioksidan kapasitesini incelemiştir ve bu türün örneklerinin TEAC değerlerini 158  $\mu\text{mol/L}$  ve 94  $\mu\text{mol/L}$  olarak bulmuştur (162). Bizim araştırmamızda ise TEAC değerleri mevcut literatürden daha yüksek belirlenmiştir. Bu durumun, çalışılan likenlerin farklı coğrafyalardan toplanmasından kaynaklandığı düşünülmektedir.

CUPRAC metodunun diğer elektron transferi yöntemli antioksidan deneylerinden farkı, kolaylıkla pH'ın ayarlanabilmesi, stabil bir metod olması, maliyetinin düşük olması ve hidrofilik antioksidanların yanısıra lipofilik antioksidanlar içinde uygulanabilmesidir (163). CUPRAC yöntemi teknik olarak basittir. Yöntem geniş pH aralığında kullanılabilir ve antioksidan mekanizmasında pH'ın etkisinin çalışılmasını sağlar. Bu nedenle de antioksidan mekanizmasında pH'ın etkisinin çalışılmasında da bu metoddan yararlanılabilir (164).

Diğer antioksidan yöntemlerle kıyaslandığında CUPRAC metodu daha yeni bir metoddur. CUPRAC deneyinde redoks reaksiyonu neticesinde çeşitli etkenlerden etkilenmeyen (örneğin, hava, güneş ışığı, çözücü türü ve pH) Cu (I)-Neokuprin isimli renkli bir şelat oluşur (165).

*P. muralis* likeninin ve *P. perlatum* likenlerinin CUPRAC aktivitesi ile ilgili herhangi bir çalışmaya rastlanmamıştır.

Bu çalışma neticesinde, her iki liken türünün yalnızca etanol ekstraktlarının antitirozinaz aktivitesi sergilediği, su ve kloroform ekstraktlarının ise antitirozinaz aktivitesi sergilemediği belirlenmiştir.

Tirozinaz enzimi meyve ve sebzelerde istenmeyen enzimatik kararmalardan da sorumludur. Tirozinaz meyve ve sebzelerdeki fenolik bileşiklerin oksidasyonunu

katalizleyerek kahverengi polimerik pigmentlerin oluşumuna yol açmaktadır. Bu pigmentler proteinlerin amino ya da sülfhidril grupları ile dönüşümsüz olarak reaksiyona girerek esansiyel amino asitlere zarar verir, proteinlerin sindirilebilirliğini ve besinsel değerlerini azaltır. Etkili tirozinaz inhibitörlerinin gelişimi ziraat alanında ve besin endüstrisi içinde önemlidir (166).

*Protoparmeliopsis muralis* likeninin antitirozinaz aktivitesi ile ilgili bir bilgiye ulaşamamıştır. Ancak *Parmotrema perlatum* likeninin sinonimi olan *Parmotrema chinense* türü ile ilgili yapılan bir çalışma sonucunda bu türün tirozinaz inhibisyonu aktivitesine sahip olmadığı rapor edilmiştir (167). Çalışmalarımız neticesinde, *P. perlatum* likeninin etanol ekstraktının düşük bir antitirozinaz aktivitesi sergilediği belirlenmiştir.

Bitkilerde etken maddeyi oluşturan bileşikler ve bu bileşiklerin miktarları bitkinin yetiştiği yer, iklim şartları ve mikroorganizma türünebağlı olarak farklılık göstermektedir (168). Ayrıca, aynı tür bitki örneklerinin farklı coğrafyalardan, farklı dönemlerde toplanması da bitki örneklerinin biyolojik aktiviteleri arasında farklılıklara neden olabilmektedir (169).

Bu çalışma ile *P. muralis* ve *P. perlatum* likenlerinin antibiyotiklere direnç gösteren mikroorganizmalara karşı tedavilerde alternatif olabileceği gösterilmiştir. Hem antibakteriyel hem de antifungal aktiviteye sahip olmalarından dolayı bu likenlerin enfeksiyonların tedavi edilmesinde yardımcı olarak farmasötik endüstrisinde kullanılabilmesi düşünülmektedir.

Bu liken türlerinin hem sentetik antioksidan maddelere hem de sentetik tirozinaz inhibitörlerine alternatif olarak kullanılabilmesi mevcut araştırma ile ortaya konmuştur.

Likenlerin su ekstraktlarında antimikrobiyal aktivite oldukça sınırlıyken, etanol ve kloroform ekstraktlarında daha yüksektir. Bu nedenle de, bu liken türleri metanol, hekzan, aseton ve diklorometan gibi farklı organik çözücülerle ekstrakte edilerek daha etkili antibiyotik, antioksidan ve antitirozinaz ajanlar elde edilebilir.

Likenler içersinde antimikrobiyal, antioksidan ve antitirozinaz aktiviteden sorumlu olan maddelerin izolasyonu ve tanınlanması ile ilgili detaylı çalışmalara ihtiyaç duyulmaktadır.



## KAYNAKLAR

1. Koçyiğit, M. 2005. Yalova İlinde Etnobotanik Bir Araştırma. İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi, pp. 174, İstanbul.
2. Faydaoğlu, F., Sürücüoğlu, M.S. 2011. Geçmişten Günümüze Tıbbi ve Aromatik Bitkilerin Kullanılması ve Ekonomik Önemi. *Kastamonu Üniversitesi Orman Fakültesi Dergisi* 11 (1): 52-67.
3. As, R. 2014. Ticari Olarak Temin Edilen Çeşitli Bitki Uçucu Yağlarının Antibakteriyel Etkinliklerinin ve Penisilin Üzerine Sinerjistik/Antagonistik Etkisinin Belirlenmesi. Erciyes Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Bitirme Ödevi, pp. 59, Kayseri.
4. Kayıhan, S. 2012. Farklı Lokalitelerden Toplanan *Gypsophila perfoliata* L. var. *perfoliata*'nın Antioksidan ve Antibakteriyel Aktivitesinin Belirlenmesi. Pamukkale Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi, pp.51, Denizli.
5. <http://www.baka.org.tr/uploads/1357649536TiBBi-VE-AROMATiK-BiTKiLERSEKTOR-RAPORU-5ARALiK.pdf> Web adresinden 07.04.2017 tarihinde edinilmiştir.
6. Toksoy, D., Bayramoğlu, M., Hacisalihoğlu, S. 2010. Usage and the Economic Potential of the Medicinal Plants in Eastern Black Sea Region of Turkey. *Journal of Environmental Biology* 31 (5): 623-628.
7. [http://www.fao.org/pgrfa-gpa-archive/tur/docs/turkey2\\_tur.pdf](http://www.fao.org/pgrfa-gpa-archive/tur/docs/turkey2_tur.pdf) Web adresinden 07.04.2017 tarihinde edinilmiştir.
8. <http://www.omicsonline.org/medicinal-plants-importance-and-uses-2153-2435-1000e139.php?aid=10654> Web adresinden 05.03.2017 tarihinde edinilmiştir.

9. Karagöz, A., Doğruöz, N., Zeybek Z., Aslan, A. 2009. Antibacterial Activity of Some Lichen Extracts. *Journal of Medicinal Plants Research* 3 (12): 1034-1039.
10. Karaşin, N. 2011. Diyarbakır ve Çevresinde Yetişen *Cynara syriaca* Metanol Ekstraktının Antimikrobiyal, Antioksidan ve Mutajenik Aktivitesinin Belirlenmesi. Dicle Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi, pp. 51, Diyarbakır.
11. Şen, C. 2011. *Hibiscus subdariffa* L. Bitkisinin Antimikrobiyal ve Antioksidan Aktivitesinin Araştırılması. Trakya Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi, pp. 57, Edirne.
12. Shrestha, G., Clair, L.L. 2013. Lichens: A Promising Source of Antibiotic and Anticancer Drugs. *Phytochemistry Reviews* 12(1): 229-244.
13. Gunasekaran, S., Rajan, V.P., Ramanathan, S., Murugalyah, V., Samsudin, M.W., Din, L.B. 2016. Antibacterial and Antioxidant Activity of Lichens *Usnea rubrotincta*, *Ramalina dumeticola*, *Cladonia verticillata* and Their Chemical Constituents. *Malaysian Journal of Analytical Sciences* 20 (1): 1-13.
14. <http://www.unomaha.edu/lichens/Bio%204350%20PDF/Uses%20of%20Lichens.Pdf> Web adresinden 15. 06. 2016 tarihinde edinilmiştir.
15. Mitrovic, T., Stamenkovic, S., Cvetkovic, V., Nikolic, M. Tomic, S., Stojicic D. 2011. Lichens As Source of Versatile Bioactive Compounds. *Biologica Nyssana* 2 (1): 1-6.
16. Gücin, F., Dülger, B., Aslan, A. 1997. Antimicrobial Activity of the Lichen *Psudevernia furfuraceae* (L.) Zopf. *Çevre Dergisi* 7 (25): 22 -24.
17. [http://skemman.is/stream/get/1946/23887/54275/1/PhD\\_thesis\\_jan2016\\_MAS\\_final.pdf](http://skemman.is/stream/get/1946/23887/54275/1/PhD_thesis_jan2016_MAS_final.pdf) Web adresinden 21.02.2017 tarihinde edinilmiştir.



18. Molnar, K., Farkas, E. 2010. Current Results on Biological Activities of Lichen Secondary Metabolites: A Review. *Zeitschrift für Naturforschung C* 65: 157–173.
19. Verma, N., Behera, B.C., Sonone, A., Makhija U. 2008. Lipid Peroxidation and Tyrosinase Inhibition by Lichen Symbionts Grown in Vitro. *African Journal of Biochemistry Research* 2 (12): 225-231.
20. Malhotra, S., Subhan, R., Singh, A. 2007. Lichens-Role in Traditional Medicine and Drug Discovery. *The Internet Journal of Alternative Medicine* 5 (2): 1-6.
21. Arslan, İ. 2006. Denizli ve Çevresinde Doğal Yayılış Gösteren Bazı Adaçayı Bitki Türlerinin (*Salvia fruticosa* MILLER, *S. cedronella* BOISS ve *S. chrysophylla* STAPF.) Antistafilokokkal Etkilerinin Araştırılması. Pamukkale Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi, pp. 39, Denizli.
22. Çiftçi, A., Aksoy A. 2015. Antibiyotiklere Neden Olan Direnç Mekanizmaları. *Türkiye Klinikleri Journal of Veterinary Sciences Pharmacology and Toxicology-Special Topics* 1 (2): 1-10.
23. Balouiri, M., Sadici, M., Ibsouda, S.K. 2016. Methods for in vitro Evaluating Antimicrobial Activity: A Review. *Journal of Pharmaceutical Analysis* 6 (2): 71-79.
24. Berber, İ., Avşar, C., Çine, N., Bozkurt, N., Elmas, E. 2013. Sinopta Yetişen Bazı Bitkilerin Metanolik Ekstraktlarının Antibakteriyel ve Antifungal Aktivitelerinin Belirlenmesi. *Karaelmas Science and Engineering Journal* 3 (1): 12-16.
25. Wikaningtyas, P., Sukandar, E.Y. 2016. The Antibacterial Activity of Selected Plants towards Resistant Bacteria Isolated from Clinical Specimens. *Asian Pasific Journal of Tropical Biomedicine* 6 (1): 16-19.

26. Ghareeb, M.A., Refahy, L.A., Saad, A.M., Osman, N.S., Abdal-Aziz, M.S., El-Shazyl, M.A., Mohamet, A.S. 2015. In vitro Antimicrobial Activity of Five Egyptian Plant Species. *Journal of Applied Pharmaceutical Sciences* 5 (2): 045-049.
27. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25719410> Web adresinden 10.04.2017 tarihinde edinilmiştir.
28. As, R. 2014. Ticari Olarak Temin Edilen Çeşitli Bitki Uçucu Yağlarının Antibakteriyel Etkinliklerinin ve Penisilin Üzerine Sinerjistik/Antagonistik Etkisinin Belirlenmesi. Erciyes Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Bitirme Ödevi, pp. 59, Kayseri.
29. Burkholder, P.R., Evans, A.W., McVeigh, I., Thornton, H.K. 1944. Antibiotic Activity of Lichens. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 30 (9): 250-255.
30. Vartia, K.O. 1973. Antibiotics in Lichens. In: The Lichens (Ahmadjian, V. ve. Hale, H.E. Ed.) pp: 547-561, Academic Press, Inc. New York.
31. Chahra, D., Ramdani, M., Lograde, T., Chalard P., Figueredo, G. 2016. Chemical Composition and Antimicrobial Activity of *Evernia prunastri* and *Ramalina farinacea* from Algeria. *Issues in Biological Sciences and Pharmaceutical Research* 4 (5): 35-42.
32. Savale, S.A., Pol, C.S., Khare, R., Verma, N., Gaikwad, S., Mandal, B., Behera, B.C. 2016. Radical Scavenging, Propyl Endopeptidase Inhibitory and Antimicrobial Potential of a Cultured Himalayan Lichen *Cetrelia olivetorum*. *Pharmaceutical Biology* 54 (4): 692-700.
33. Anjali, D.B., Mahabe, S., Reddy, A.M., Nayaka, S. 2015. Antimicrobial Activities of 2-Propanol Crude Extract from Lichen *Parmotrema tinctorum*

- (Despr. Ex. Nyl.) Hale, Collected from Eastern Ghats, India. *Current Research in Environmental&Applied Mycology* 5 (3): 160-168.
34. Şirin, N., Dülger, B. 2015. *Ramalina farinaceae* (L.) Ach. Ve *Usnea intermedia* (A. Massal) Jatta Likenlerinin Antimikrobiyal Aktiviteleri Üzerine Araştırmalar. *Düzce Üniversitesi Bilim ve Teknoloji Dergisi* 3: 340-349.
35. Çobanoğlu, G., Sesal, C., Açıköz, B., Karaltı, İ. 2016. Evaluation of Antimicrobial Activity of the Lichens *Physcia aipolia*, *Xanthoria parietina*, *Usnea florida*, *Usnea subfloridana* and *Melanohalea exasperata*. *Modern Phytopharmacology* 10: 19-24.
36. Şahin, S., Oran, S., Şahintürk, P., Demir C., Öztürk, Ş. 2015. *Ramalina* Lichens and Their Major Metabolites as Possible Natural Antioxidant and Antimicrobial Agents. *Journal of Food Biochemistry* 39 (4): 471-477.
37. Oran, S., Sahin, S., Şahintürk, P., Öztürk, Ş., Demir, C. 2016. Antioxidant and Antimicrobial Potential, and HPLC Analysis of Stictic and Usnic Acids of Three *Usnea* Species from Uludağ Mountain (Bursa, Turkey). *Iranian Journal of Pharmaceutical Research* 15(2): 527-535.
38. <http://www.antioksidan.info/> Web adresinden 10.03.2017 tarihinde edinilmiştir.
39. [http://www.gidamo.org.tr/resimler/ekler/7b16ecf8ca53723\\_ek.pdf](http://www.gidamo.org.tr/resimler/ekler/7b16ecf8ca53723_ek.pdf) Web adresinden 15.05.2017 tarihinde edinilmiştir.
40. Abdollahi, M., Ranjbar, A., Shadnia, S., Nikfar, S., Rezaie, A. 2004. Pesticides and Oxidative Stress: A Review. *Medical Science and Monitoring* 10: 141-147.
41. Murray, R.K., Granner, D.K., Mayes, P.A., Rodwell, V.W. 1996. *Harper'in Biyokimyası*. pp. 978-975-953-311-3. Barış Kitapevi. İstanbul.

42. Hasani, A. 1999. Sıçanlarda Kafa Travması Sonrası Artan Serbest Oksijen Radikalleri Üzerine Sevofluranın Etkisi. Marmara Üniversitesi Tıp Fakültesi Anesteziyoloji ve Reanimasyon Anabilim Dalı, pp. 23-24, İstanbul.
43. Blokhina, O., Virolainen, E., Fagerstedt, K.V. 2003. Antioxidants, Oxidative Damage and Oxygen Deprivation Stress: A Review. *Annals of Botany* 91: 179-194.
44. Eş, S. 2013. İlk Defa Sentezlenen 1,2,4-Triazol Schiff Bazı Bileşiklerinin Antioksidan, Anti-Elastaz ve Anti-Tirosinaz Aktivitelerinin İncelenmesi. Giresun Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi, pp. 92, Giresun.
45. Taşçı, I., Yavuz, N., Caner, M., Göksel, S., Yılmaz, O. 1995. Karaciğer Sıcak İskemi ve Reperfüzyon Hasarında Dimetilsülfoksit (DMSO), Allopurinol ve Deferoksamin'in Etkileri. *Çağdaş Cerrahi Dergisi* 9: 198-202.
46. Halliwell, B., Gutteridge, J.M.C. 1999. *Free Radicals in Biology and Medicine*. Oxford University Press, New York.
47. Çelik, S. 2001. APS İle Opere Edilen Tavşanların Kan ve Karaciğer Dokularındaki Serbest Oksijen Radikallerin Antioksidan Enzim Düzeylerinin Tayini. Dumlupınar Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi, pp. 35, Kütahya.
48. Onat, T., Emerk, K., Sözman, E.Y. 2002. *İnsan Biyokimyası*. Palme Yayıncılık, Ankara.
49. Cruthirds, D.L., Novak, L., Akhi, K.M., Sanders, P.W., Thompsan, J.A. 2003. Mitochondrial Targets of Oxidative Stress During Renal Ischemia/Reperfusion. *Archives Biochemistry and Biophysics* 412:27-33.
50. Hipkiss, A.R. 2007. Biological Aspects of Ageing. *Psychiatry* 6: 476-479.

51. Dauer, W., Przedborski, S. 2003. Parkinson's Disease: Mechanism and Models. *Neuron* 39: 889-909.
52. Mosley, R.L., Benner, E.J., Kadiu, I., Thomas, M., Boska, M.D. 2006. Neuroinflammation Oxidative Stress and Pathogenesis of Parkinson's Disease. *Clinical Neuroscience Research* 6: 261-281.
53. Bowler, R.P., Barnes, P.J., Crapo, J.D. 2004. The Role of Oxidative Stress in Chronic Obstructive Pulmonary Disease. *Journal of Chronic Obstructive Pulmonary Disease* 1: 255-277.
54. Anderson, R.A. 2007. Prescribing Antioxidants. In: *Integrative Medicine* (Rakel, D., Ed.), pp. 1083-2094, Elsevier Saunders Publishing, USA.
55. Halliwell, B. 1994. Free Radicals and Antioxidants: A Personal View. *Nutrition Reviews* 52: 253-265.
56. Halliwell, B., Gutteridge, J.M.C. 1990. Role of Free Radicals and Catalytic Metal Ions in Human Disease. *Methods in Enzymology* 186: 1-85.
57. <https://gidabilinci.com/antioksidanlar-nedir-ve-gida-endustrisindeki-yeri> Web adresinden 10.04.2017 tarihinde edinilmiştir.
58. <http://www.usc.es/congresos/ecsoc/17/files/B/b001/index.pdf> Web adresinden 20.12.2016 tarihinde edinilmiştir.
59. Saeed, N., Khan, M.R., Shabbir, M. 2012. Antioxidant Activity, Total Phenolic and Total Flavonoid Contents of Whole Plant Extracts *Torilis leptophylla* L. *BMC Complementary and Alternative Medicine* 12 (221): 2-12.
60. Rankovic, B. 2015. *Lichen Secondary Metabolites, Bioactive Properties and Pharmaceutical Potential*. Springer, London.

61. Fernandez-Morianu, C., Gomez- Serranillos, M.P., Crespo, A. 2016. Antioxidant Potential of Lichen Species and Their Secondary Metabolites. A Systematic Review. *Pharmaceutical Biology* 54 (1): 1-17.
62. Ganesan, A., Thangapandian, M.P., Ponnusamy, P., Sundararaj, J.P., Nayaka, S. 2015. Antioxidant and Antibacterial Activity of Parmelioid Lichens from Shevaroy Hills of Eastern Ghats, India. *International Journal of PharmTech*, 8 (9): 13-23.
63. Smitha, K.C., Garampalli, R.H. 2015. Evaluation of Phytochemicals and in vitro Antioxidant Activity of *Ramalina pacifica* and *Roccella montagnei*. *Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry* 4 (4): 270-274.
64. Sundararaj, J.P., Kuppuraj, S., Ganesan, A., Ponnusamy, P., Nayaka, S. 2015. In vitro Assessment of Antioxidant and Antimicrobial Activities of Different Solvent Extracts from Lichen *Ramalina nervulosa*. *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences* 7 (8): 200-204.
65. Anar, M., Aslan, A., Agar, G., Özgencil, İ. 2016. Antigenotoxic and Antioxidant Activity of Lichens *Anaptychia ciliaris*, *Bryoria fuscescens*, *Parmotrema chinensa* and *Xanthoria candelaria*: An in vitro Study. *Medicinal&Aromatic Plants* 5 (2): 233-238.
66. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27206701> Web adresinden 10.04.2017 tarihinde edinilmiştir.
67. Buçukoğlu, T.Z., Albayrak, S., Halıcı, M.G., Tay, T. 2013. Antimicrobial and Antioxidant Activities of Extracts and Lichen Acids Obtained From Some *Umbilicaria* Species from Central Anatolia, Turkey. *Journal of Food Processing and Preservation* 37 (6): 1103-1110.
68. Güner, S. 2007. *Biyokimya I*. KTÜ Yayınları, Trabzon.

69. Whitaker, J.R. 1994. *Principles of Enzymology For The Food Sciences*. Marcel Dekker Inc., USA.
70. [http://biochem.pepperdine.edu/dokuwiki/doku.php?id=chem330:fall2013:lab\\_3\\_enzyme\\_activity](http://biochem.pepperdine.edu/dokuwiki/doku.php?id=chem330:fall2013:lab_3_enzyme_activity) Web adresinden 16.03.2017 tarihinde edinilmiştir.
71. Bingöl, G. 1977. *Vitaminler ve Enzimler*. Ankara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Yayınları Ders Kitabı Serisi, Ankara.
72. <https://en.wikipedia.org/wiki/Tyrosinase> Web adresinden 25. 12. 2016 tarihinde edinilmiştir.
73. Vardhan, A., Khan, S., Pandey, B. 2014. Screening of Plant Parts for Anti-Tyrosinase Activity by Tyrosinase Assay Using Mushroom Tyrosinase. *Indian Journal of Scientific Research* 4 (1): 134-139.
74. Sherman, T.O., Vaughn, K.C., Duke, S.O. 1991. A Limited Survey of the Phylogenetic Distribution of Polyphenol Oxidase. *Phytochemistry* 30: 2499-2506.
75. Sugumaran, M. 1990. Prophenoloxidase Activation and Insect Immunity. In: *Defense Molecules* (Ed. Marchalonis, J.J. ve Reinisch, E.R.), Wiley-Liss, New York.
76. <http://www.egelisesi.k12.tr/dosyalar/editor/file/21.pdf> Web adresinden 17. 05. 2017 tarihinde edinilmiştir.
77. <http://www.saglikkitabi.org/dopa-34-dihidroksifenilalanin> Web adresinden 23. 05. 2017 tarihinde edinilmiştir.
78. Chang, Y., Ryu, J., Lee, S., Park, S.G., Bhattari, H.D., Yim, J.H., Jin, M.H. 2012. Inhibition of Melanogenesis by Ramalin from the Antarctic Lichen *Ramalina terebrata*. *Journal of the Society of Cosmetic Scientists of Korea* 38 (3): 247-254.

79. Honda, N.K., Gonçalves, K., Brandoo, L.F.G., Coelho, R.G., Micheletti, A.C., Spielmann, A.A., Canez, L.S. 2016. Screening of Lichen Extracts Using Tyrosinase Inhibition and Toxicity Against *Artemia salina*. *Orbital: The Electronic Journal of Chemistry* 8 (3): 181-188.
80. Chakma, R.K.,Yoganandam, P.G. 2016. Tyrosinase Inhibitory Activity of Isolated Usnic Acid from *Roccella belangeriana* (Lichen). *International Journal of Biological&Pharmaceutical Research* 7 (2): 106-108.
81. Behera, B.C., Verma, N., Sonone, A., Makhija, U. 2007. Tissue Culture of Some Lichens and Screening of Their Antioxidant, Antityrosinase and Antibacterial Properties. *Phytotherapy Research* 21: 1159-1170.
82. Laufer, Z., Beckett, R.P., Minibayeva, F.V. 2006. Co-occurrence of Multicopper Oxidants Tyrosinase and Laccase in Lichens in Sub-order *Peltigerinaceae*. *Annals of Botany* 98: 1035-1042.
83. Higuchi, M., Miura, Y., Boohene, J., Kinoshita, Y., Yamamoto, Y., Yoshimura, I., Yamada, Y. 1993. Inhibition of Tyrosinase Activity by Cultured Lichen Tissues and Bionts. *Planta Medica* 59: 253-255.
84. Kınalıoğlu, K., Güder, A., Aydın, S. Investigation of Antioxidant, Antibacterial, Antityrosinase Activities and Atranorin of Some *Cladonia* Species. 1. International on Black Sea Congress on Environmental Sciences, 31 August-3 September 2016, Giresun, TURKEY.
85. Casselman, K.A. 2001. *Lichen Dyes: The New Source Book*. Dover Publications, New York.
86. Jeffrey, D.W.,Madden, B. 1991. *Bioindicators and environmental management*. Academic Press, London.
87. Aslan, A., Çiçek, A., Yazıcı, K., Karagöz, Y., Turan, M., Akkuş, F., Yıldırım, Ö.S. 2011. The Assessment of Lichens As Bioindicator of Heavy Metal Pollution



- from Motor Vehicles Activities. *African Journal of Agricultural Research* 6 (7): 1698-1706.
- 88.** [https://en.wikipedia.org/wiki/Parmotrema\\_perlatum](https://en.wikipedia.org/wiki/Parmotrema_perlatum) Web adresinden 07.03.2017 tarihinde edinilmiştir.
- 89.** Balaji, P., Bharath, P., Valarmathi, R., Mohapatra, T., Hariharan, G.R. 2006. Lichen Bioprospecting-Future Prospects. *Journal of Swamy Botanical Club* 23: 81-90.
- 90.** Chitme, H.R., Alok, S., Jain, S.K., Sabharwal, M. 2010. Herbal Treatment for Urinary Stones. *International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research* 1 (2): 24-31.
- 91.** Goyal, P.K., Verma, S.K., Sharma, A.K. 2015. Antiurolithiatic Potential of *Parmelia perlata* Extract Against AMPH Crystals. *CT International Journal of Pharmaceutical and Integrated Life Sciences* 1 (1): 40-44.
- 92.** Kumar, G.P., Kumar, V.S., Kumar, S.A. 2016. Pharmacological and Phytochemical Aspects of Lichen *Parmelia perlata*: A Review. *International Journal of Research in Ayurveda and Pharmacy* 7 (1): 102-107.
- 93.** Podaril, A.L., Colbert, J.T. 2016. Elemental Concentrations of Iowa *Parmotrema* Species. *Evansia* 33 (1): 18-25.
- 94.** Çobanoğlu, G. 2015. The Use of Lichens for Biomonitoring of Atmospheric Pollution. *Sigma Journal of Engineering and Natural Sciences* 33 (4): 591-613.
- 95.** Piccotto, M., Bidussi, M., Tretiach, M. 2011. Effects of the Urban Environmental Conditions on the Chlorophyll A Fluorescence Emission in Transplants of Three Ecologically Distinct Lichens. *Environmental and Experimental Botany* 73: 102-107.

96. Kumar, S., Dhankhar, S., Arya, V. P., Yadav, S., Yadav, J. P. 2012. Antimicrobial Activity of *Salvadora oleoides* Decne. Against Some Microorganisms. *Journal of Medicinal Plants Research* 6 (14): 2754-2760.
97. <http://www.authorstream.com/Presentation/durum68-1078044-mikrobiyolojik-tan-ntemleri/>- Web adresinden 16.03.2017 tarihinde edinilmiştir.
98. Murray, P.R., Baron, E.J., Pfaller, M.A., Tenovar, F.C., Tenover, R.H. 1995. *Manual of Clinical Microbiology*. ASM Press, Washington D.C.
99. Saric, C.L., Cabarkapa, S.I., Beljkas, M.B., Misan, C.A., Sakac, B.M., Plavsic, V.D. 2009. Antimicrobial Activity of Plant Extracts from Serbia. *Food Processing Quality and Safety* 1 (2):1-5.
100. Ertürk, Ö. 2006. Antibacterial and Antifungal Activity of Ethanolic Extracts from Eleven Spice Plants. *Biologia Bratislava* 61 (3): 275-278.
101. Uçan, F. 2008. D-Limonenin Mayalar Üzerine Antifungal Etkisi. Çukurova Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi, pp. 62, Adana.
102. <http://www.klimik.org.tr/wp-content/uploads/2012/02/128201112107-49.pdf> Web adresinden 16.03.2017 tarihinde edinilmiştir.
103. Yiğit, D., Yiğit, N., Aktaş, E., Özgen, U. 2009. Ceviz (*Juglans regia* L.)'in Antimikrobiyal Aktivitesi. *Türk Mikrobiyoloji Cemiyeti Dergisi* 39 (1-2): 7-11.
104. Kang, C., Hah, D., Kim, C., Kim, Y., Kim, E., Kim, J. 2011. Evaluation of Antimicrobial Activity of the Methanol Extracts from 8 Traditional Medicinal Plants. *Toxicology Research* 27 (1): 31-36.
105. Slinkard, K., Singleton, V.L. 1977. Total Phenol Analysis: Automation and Comparison With Manual Methods. *American Journal of Enology and Viticulture* 28: 49-55.

- 106.** Zhishen, J., Mengcheng, T., Jianming, W. 1999. The Determination of Flavonoid Contents in Mulberry and Their Scavenging Effects on Superoxide Radicals. *Food Chemistry* 64: 555-559.
- 107.** Loizzo, M.R., Tundis, R., Bonesi, M., Menichini, F., Mastellone, V., Avallone, L., Menichini, F. 2012. Radical Scavenging, Antioxidant and Metal Chelating Activities of *Annola cherimola* Mill. Peel and Pulp in Relation to Their Total Phenolic and Total Flavonoid Contents. *Journal of Food Composition and Analysis* 25: 179-184.
- 108.** Arnao, M.B., Cano, A., Acosta, M. 2001. The Hydrophilic and Lipophilic Contribution to Total Antioxidant Activity. *Food Chemistry* 73: 239-244.
- 109.** Prieto, P., Pineda, M., Aguilera, M. 1999. Spectrophotometric Quantitation of Antioxidant Capacity through the Formation of a Phosphor Molybdenum Complex: Specific Application to the Determination of Vitamin E. *Analytical Biochemistry* 269: 337-341.
- 110.** Özyürek, M., Bektaşoğlu, B., Güçlü, K., Apak, R. 2009. Measurement of Xanthine Oxidase Inhibition Activity of Phenolics and Flavonoids with a Modified Cupric Reducing Antioxidant Capacity (CUPRAC) Method. *Analytica Chimica Acta* 636: 42-50.
- 111.** Vanni, A. Gastaldi, D., Giunata, G. 1990. Kinetic Investigations on the Double Enzymatic Activity of the Tyrosinase Mushroom. *Annali Di Chimica* 80: 35-60.
- 112.** Pham, H.N.T., Nguyen, V.T., Vuong, Q.V., Bowyer, M.C., Scarlett, C.J. 2015. Effect of Extraction Solvents and Drying Methods on the Physiochemical and Antioxidant Properties of *Helicteres hirsuta* Lour. Leaves. *Technologies* 3: 285-301.

- 113.** Dasola, A.M., Tunbosun, L.A., Adeyemi, A.L., Abidemi, O.O. 2014. Effect of Solvent Type on the Yields and Mineral Compositions of the Leaf Extracts of *Moringa oleifera* L. *African Journal of Pure and Applied Chemistry* 8 (9): 134-146.
- 114.** Butsat, D., Sriamornpun, S. 2016. Effect of Solvent Types and Extraction Times on Phenolic and Flavonoid Contents and Antioxidant Activity in Leaf Extracts of *Amomum chinense* C. *International Food Research Journal* 23 (1): 180-187.
- 115.** Chiste, R.C., Benassi, M.T., Mercadante, A.Z., 2013. Efficiency of Different Solvents on the Extraction of Bioactive Compounds from the Amazonian Fruit *Caryocar villosum* and the Effect on Its Antioxidant and Colour Properties. *Phytochemical Analysis* 25 (4): 364-372.
- 116.** Bisht, S., Sharma, S., Kumar, V., Kumar, M., Bisht, S.S., Nautiyal, B.P. 2014. Assessment of Antimicrobial Efficiency of Secondary Metabolites of Lichen Species from Uttarakhand Temperate Himalayas, India. *Journal of Natural Products* 7: 168-176.
- 117.** Aoussar, N., Manzali, R., Nattah, I., Rhallabi, N., Vasiljevic, P., Bouksaim, M., Douira, A., Manojlovic, N., Mellouki, F. 2017. Chemical Composition and Antioxidant Activity of Two Lichen Species (*Pseudevernia furfuraceae* L. and *Evernia prunastri* L.) Collected from Morocco. *Journal of Materials and Environmental Sciences* 8 (6): 1968-1976.
- 118.** Rahman, H., Vijaya, B., Ghosh, S., Pant, G., Sibi, G. 2014. In vitro Studies on Antioxidant, Hypolipidemic and Cytotoxic Potential of *Parmelia perlata*. *American Journal of Life Sciences* 2 (6-1): 7-10.
- 119.** Abidi, S.H., Ahmed, K., Sherwani, S.K., Kazmi, S.U. 2015. Synergy Between Antibiotics and Natural Agents Results in Increased Antimicrobial Activity Against *Staphylococcus epidermidis*. *The Journal of Infection in Developing Countries* 9 (9): 925-929.

- 120.** Al-Rahman, A.N., Mostafa A.A., Abdel-Megeed, A., Yakout, S.M., Husein, S.A. 2013. Fungicidal Activities of Certain Methanolic Plant Extracts Against Tomato Phytopathogenic Fungi. *African Journal of Microbiology Research* 7 (6): 517-524.
- 121.** Jeon, H., Lökös, L., Han, K.S., Ryu, J., Kim, J.A., Koh, Y.J., Hur, J. 2009. Isolation of Lichen-Forming Fungi from Hungarian Lichens and Their Antifungal Activity Against Fungal Pathogens of Hot Pepper Anthracnose. *The Plant Pathology Journal* 25 (1): 38-46.
- 122.** Valadbeigi T., Raskhi, S. 2015. GC-MS Analysis and Anticancer Effect Against MCF-7 and HT-29 Cell Lines and antioxidant, Antimicrobial and Wound Healing Activities of Plant-Derived Compounds. *Journal of Basic Research in Medical Sciences* 2 (4): 1-11.
- 123.** Rankovic, B.R., Kosanic, M.M., Stanojkovic, T.P. 2011. Antioxidant, Antimicrobial and Anticancer Activity of the Lichens *Cladonia furcata*, *Lecanora atra* and *Lecanora muralis*. *BMC Complementary and Alternative Medicine* 11 (97):1-8.
- 124.** Kosanic, M., Rankovic, B. 2010. Screening of Antimicrobial Activity of Some Lichen Species in vitro. *Kragujevac Journal of Science* 32: 65-72.
- 125.** Semnain, S.N., Rahnema, M., Ghasempour, H., Alizadeh, H. 2014. Evaluation of Antibacterial Effects of *Lecanora muralis* sp. Extract on *Staphylococcus aureus* and *Salmonella typhimurium* in in-vitro in Animal Model. *Journal of Fasa University of Medical Sciences* 4 (3): 318-326.
- 126.** Almola, Z.S., Al-Ni'ma, B.A. , Ramadan, N.A. 2016. Antibacterial Effect of Some Iraqi Lichen Extracts. *International Journal of Science and Technology* 5 (9): 448-456.

127. Willey, J.M. Sherwood, L.M., Woolverton, C.J. 2009. *Prescott's Principles of Microbiology*. The McGraw-Hill Companies, Inc., New York.
128. <https://www.thieme-connect.com/products/ejournals/abstract/10.1055/s-0028-1084279> Web adresinden 15.02.2017 tarihinde edinilmiştir.
129. Hoda, S., Vijayaraghavan, P. 2015. Evaluation of Antimicrobial Prospective of *Parmotrema perlatum* Hexane Extract. *International Journal of Pharmaceutical Research&Allied Sciences* 4 (2): 47-53.
130. Reveathy, M., Mathiazhagan, A., Annadurai, G. 2015. Biosynthesis, Characterization, Antibacterial Activity of Silver Nanoparticles Using the Lichen *Parmotrema perlatum*. *European Journal of Biomedical and Pharmaceutical Sciences* 2 (4): 348-361.
131. Reveathy, M., Sathyashree, S., Manimekala, N., Annadurai, G., Ahila, M. 2015. Preliminary Phytochemical Investigation and Antibacterial Effects of Lichen *Parmotrema perlatum* Against Human Pathogens. *European Journal of Biomedical and Pharmaceutical Sciences* 2 (4): 336-342.
132. Kumar, V., Naik, B., Kumar, V., Kumar, S., Singh, D., Aslam, M. 2014. Evaluation of Antibacterial and Antioxidant Activity of Some Lichens of Uttarakhand. *American Journal of Current Biology* 1 (1): 1-8.
133. <http://spatial.cisr.ucsc.edu/envs/thesis/ShafferJ.pdf> Web adresinden 20.03.2017 tarihinde edinilmiştir.
134. Vidyalakshmi, A., Kruthika, K. 2012. Antibacterial Activity of *Parmelia perlata*. *Asian Pasific Journal of Tropical Biomedicine* 892-894.
135. Momoh, M.A., Adikwu, M.U. 2008. Evaluation of the Effect of Colloidal Silver on the Antibacterial Activity of Ethanolic Extract of the Lichen *Parmelia perlata*. *African Journal of Pharmacy and Pharmacology* 2(6): 106-109.

- 136.** Gehlot, V., Mahant, S., Vijayraghwan, P., Das, K., Hoda, S., Das, R. 2016. Therapeutic Potential of Lichen *Parmelia perlata* Against Dual Drug-resistant *Helicobacter pylori* Isolates. *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences* 8 (1): 205-208.
- 137.** Abdur, R., Latif, A., Sumbul, R., Afaq, S.H.2013. Study on Extracts of *Parmelia perlata* Ach. for Its Antimicrobial Potential Against Certain Microorganisms. *International Research Journal of Pharmacy* 4 (11): 102-106.
- 138.** Sibi, G., Apsara, V., Dhananjaya, K., Ravikumar, K.R., Mallesha, H. 2013. Phytochemical and Antibacterial Properties of Spices Against Food Borne Bacteria With Special Reference to *Parmelia perlata*. *Global Journal of Bioscience and Biotechnology* 2 (2): 145-149.
- 139.** Sibi, G., Wadhavan, R., Singh, S., Dhananjaya, K., Ravikumar, K.R., Mallesha, H. 2013. Biological Control of Onion Black Mold by Indian Culinary Spices under in vitro Conditions. *Asian Journal of Pharmaceutical and Clinical Research* 6 (2): 156-158.
- 140.** Thippeswamy, B., Sushma, N.R., Naveenkumar, K.J. 2012. Antimicrobial Property of Bioactive Factor Isolated from *Parmelia perlata*. *International Multidisciplinary Research Journal* 2 (2): 1-5.
- 141.** Thippeswamy, B., Sushma, N.R., Naveenkumar, K.J. 2013. Evaluation of Antimicrobial Property of Lichen-*Parmelia perlata*. *African Journal of Pharmacy and Pharmacology* 7 (20): 1242-1250.
- 142.** Hussain, M., Raza, S.M., Farooq, U., Bakhsh, H., Majeed, A., Aziz, A. 2014. In vitro Antimicrobial Potential of Lichen (*Parmelia perlata*) Against Different Pathogenic Microbes. *International Journal of Pharma Sciences* 4 (4): 666-670.

- 143.** Hassabo, A.A.M. 2016. Evaluation The Antimicrobial Activity of Four Fractions of Sudanese *Parmelia perlata* Lichen. *World Journal of Pharmaceutical Research* 6(1): 1-10.
- 144.** Leela, K., Iyer, P. 2016. Extraction and Application of Secondary Metabolites from *Parmelia perlata*. *Asian Journal of Biological and Life Sciences* 5 (2): 211-216.
- 145.** Altuner, E.M., Çetin, B., Çökmüş, C. 2010. *Tortella tortulosa* (Hedw.) Limp. Özütlerinin Antimikrobiyal Aktivitesi. *Kastamonu Üniversitesi Orman Fakültesi Dergisi* 10(2): 111-116.
- 146.** Ardağ, A. 2008. Antioksidan Kapasite Tayin Yöntemlerinin Analitik Açıdan Karşılaştırılması, Adnan Menderes Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi, pp. 54, Aydın.
- 147.** Ira, S., Manisha, M., Singh, G.P., Anirudha R. 2014. Quantitative Estimation of Phenolic and Flavonoid Content and Antioxidant Activity of Various Extracts of Different Parts of *Plumbago zeyanica* Linn. *International Journal of Drug Development and Research* 6 (2): 136-140.
- 148.** Baba, S.A., Malik, S.A. 2015. Determination of Total Phenolic and Flavonoid Content, Antimicrobial and Antioxidant Activity of a Root Extract of *Arisaemia jacquemontii* Blume. *Journal of Taibah University for Science* 9 (4): 449-454.
- 149.** Kosanic, M., Rankovic, B. 2015. Studies on Antioxidant Properties of Lichen Secondary Metabolites. In: *Lichen Secondary Metabolites Bioactive Properties and Pharmaceutical Potential* (Ed. Rankovic, B.), pp. 105-125. Springer International Publishing, Switzerland.
- 150.** Paul, S., Singh, A.R.J. 2014. An Antioxidant and Bioactive Compound Studies of *Parmelia perlata*, *Ganoderma lucidum* and *Phellinus igniarius*-Supplementary Drug. *Asian Journal of Pharmaceutical Technology & Innovation* 2 (7): 13-22.



- 151.** Patil, B.S., Adhikrao, G.V., Subhash, T.S., Ramesh, K.C., Umesh, A.A. 2011. Insulin Secretagogue, Alpha-glucosidase and Antioxidant Activity of Some Selected Spices in Streptozotocin-Induced Diabetic Rats. *Plant Food for Human Nutrition* 66: 85-90.
- 152.** Tripathi, P., Iqbal, S., Singh, A. 2016. Total Antioxidant Potential of Indigenous Indian Plants. *Journal of Chemical and Pharmaceutical Research* 8 (5): 579-583.
- 153.** Rebeaya, A., Belghith, S.I., Baghdikian, B., Leddet, V.M., Mabrouki, F., Olivier, E., Cherif, J.K., Ayadi, M.T. 2014. Total Phenolic, Total Flavonoid, Tanin Content and Antioxidant Capacity of *Halimium halimifolium* (Cistaceae). *Journal of Applied Pharmaceutical Science* 5 (1): 52-57.
- 154.** Nourian, S., Sani, A.M., Golmakani, E., Feizi, P., Roghani, K. 2016. Determination of Antioxidant Activity by High Performance Liquid Chromatography, Phenolic and Flavonoid Contents of *Vincetoxicum nigrum*. *International Journal of Pharmatech Research* 9 (3): 150-157.
- 155.** Amoussa, A.M.O., Sanni, A., Lagnika, L. 2015. Antioxidant Activity and Total Phenolic, Flavonoid and Flavonol Contents of the Bark Extracts of *Acacia ataxacantha*. *Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry* 4 (2): 172-178.
- 156.** Kosanic, M., Seklic, D., Markovic, S., Rankovic, B. 2014. Evaluation of Antioxidant, Antimicrobial and Anticancer Properties of Selected Lichens from Serbia. *Digest Journal of Nanomaterials and Biostructures* 9 (1): 273-287.
- 157.** Mohan, S.C., Balamurugan, V., Salini, S.T., Rekha, R. 2012. Metal Ion Chelating Activity and Hydrogen Peroxide Scavenging Activity of Medicinal Plant *Kalanchoe pinnata*. *Journal of Chemical and Pharmaceutical Research* 4 (1): 197-202.

- 158.** Ebrahimzadeh, M.A., Pourmorad, F., Bekhradnia, A.R. 2008. Iron Chelating Activity, Phenol and Flavonoid Content of Some Medicinal Plants from Iran. *African Journal of Biotechnology* 7 (18): 3188-3192.
- 159.** <http://dx.doi.org/10.1155/2014/179865> Web adresinden 18.03.2017 tarihinde edinilmiştir.
- 160.** Arkan, T. 2011. *Daphne oleoides* subsp. *oleoides* ve *Daphne sericea*'nın Farklı Çözücülerle Antioksidan Özellikleri. Selçuk Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi, pp. 63, Konya.
- 161.** Aliyu, A.B., İbrahim, M.A., İbrahim, H., Musa, A.M., Loyal, A.Y., Oshanimi, J.A., Usman, M., Abdulkadir, I.E., Oyewale, A.O., Amupitan, J.O. 2012. Free Radical Scavenging and Total Antioxidant Capacity of Methanol Extract of *Ethulia conyzoides* Growing in Nigeria. *Romanian Biotechnological Letters* 17 (4): 7458-7465.
- 162.** Hara, K., Endo, M., Kawakami, H., Komine, M., Yamamoto, Y. 2011. Anti-oxidation Activity of Ethanol Extracts from Natural Thalli of Lichens. *Mycosystema* 30 (6): 950-954.
- 163.** Okan, O.T., Varlıbaş, H., Öz, M., Deniz, İ. 2013. Antioksidan Analiz Yöntemleri ve Doğu Karadeniz Bölgesinde Antioksidan Kaynağı Olarak Odun Dışı Bazı Bitkisel Ürünler, *Kastamonu Üniversitesi Orman Fakültesi Dergisi* 13 (1): 48-59.
- 164.** Albayrak, S., Sağdıç, O., Aksoy, A. 2010. Bitkisel Ürünlerin ve Gıdaların Antioksidan Kapasitelerinin Belirlenmesinde Kullanılan Yöntemler. *Erciyes Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi* 26 (4): 401-409.
- 165.** Phatak, R.S., Hendre, A.S. 2014. Total Antioxidant Capacity (TAC) of Fresh Leaves of *Kalanchoe pinnata*. *Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry* 2 (5): 32-35.

- 166.** <https://peerj.com/articles/1305/> Web adresinden 14.04.2017 tarihinde edinilmiştir.
- 167.** <http://indianlichenology.com/pdfFiles/1%20Chapter%20Medicinal%20lichens%20of%20India.pdf> Webadresinden 04.04.2017 tarihinde edinilmiştir.
- 168.** Boyraz, N., Koçak, R. 2006. Bazı Bitki Ekstraktlarının in vitro Antifungal Etkileri. *Selçuk Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi* 20 (38): 82-87.
- 169.** Mohamed, H., Adriani, Y., Bakar, K., Siang, C.C., Syamsumir, D.F., Alias, A., Radzi, S.A.M. 2015. Effect of Drying Method on Anti-microbial, Anti-oxidant Activities and Isolation of Bioactive Compounds from *Peperomia pellucida* (L.) Hbk. *Journal of Chemical and Pharmaceutical Research* 7 (8): 578-584.

## **ÖZGEÇMİŞ**

28.02.1985 tarihinde İstanbul ilinde doğdu. İlkokul öğrenimini Burhaniye İlköğretim Okulunda, ortaokul öğrenimini Ali Fuat Başgil okulunda, lise öğrenimini ise Halide Edip Adivar 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 Doktora programında öğrenim görmeye devam etmektedir.