



***Ganoderma lucidum* Metanolik Ekstraktının Fitotoksik Etkilerinin ve Antioksidan Potansiyelinin Araştırılması**

Fuat Bozok^{1*}, Tülin Eker², Gökhan Sezer¹, Adnan Bozdoğan², Hasan Hüseyin Doğan³, Saadet Büyükalaca⁴

¹Osmaniye Korkut Ata Üniversitesi, Fen-Edebiyat Fakültesi, Biyoloji Bölümü, Karacaoğlan Kampüsü, 80000 Osmaniye, Türkiye

²Osmaniye Korkut Ata Üniversitesi, Mühendislik Fakültesi, Gıda Mühendisliği Bölümü, Karacaoğlan Kampüsü, 80000 Osmaniye, Türkiye

³Selçuk Üniversitesi, Fen Fakültesi, Biyoloji Bölümü, Kampüs, 42031 Konya, Türkiye

⁴Çukurova Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Bahçe Bitkileri Bölümü, 01330 Adana, Türkiye

MAKALE BİLGİSİ

Geliş 28 Ekim 2015
Kabul 27 Aralık 2015
Çevrimiçi baskı, ISSN: 2148-127X

Anahtar Kelimeler:

Ganoderma
Allelopati
Antioksidan
Zorkun
Amanos

ÖZET

Bu çalışmanın amacı, Osmaniye ilinin Zorkun yaylasından toplanan *Ganoderma lucidum* metanolik ekstraktının allelopatik etkilerini ve antioksidan aktivitelerini ortaya çıkarmaktır. *G. lucidum* metanol ekstraktının artan konsantrasyona (1, 2, 4, 8 mg/mL) bağlı olarak test edilen *Hordeum vulgare* (Arpa) ve *Triticum aestivum* (Buğday)'a karşı önemli ölçüde fitotoksik etki gösterdiği tespit edilmiştir. Ayrıca, mantarın toplam fenol bileşikleri ve flavonoid miktarlarının (mg/kg) sırasıyla 114,55 ve 8,95 olduğu belirlenmiştir. Artan konsantrasyona (1,25, 2,5 ve 5 mg/mL) bağlı olarak mantar örneğinin DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl) giderme aktivitesinin (%60, 91 ve 92), indirgeme gücünün (0,83, 1,43 ve 2,23 Abs) ve nitrik oksit (NO) giderme aktivitesinin (% 48, 55 ve 70) arttığı tespit edilmiştir. Benzer şekilde farklı konsantrasyonlardaki mantarın (0,0156-0,125 mg/mL) hidrojen peroksit (H₂O₂) giderme aktivitesi sırasıyla; %18, 56, 60 ve 86 olarak bulunmuştur. Bu sonuçlardan yola çıkarak, *G. lucidum* metanolik ekstraktının önemli ölçüde fitotoksik etkiye ve antioksidan aktiviteye sahip olduğu söylenebilir. Ayrıca, bu araştırma Amanos Dağları'ndan toplanan ve sıklıkla tüketilen bir mantar türü olan *G. lucidum* metanolik ekstraktının fitotoksik etkileri ve antioksidan aktiviteleri üzerine yapılan ilk çalışmadır.

* Sorumlu yazar:

E-mail: fbozok@osmaniye.edu.tr

Turkish Journal Of Agriculture - Food Science And Technology, 4(3): 163-170, 2016

Investigation of Antioxidant Potential and Phytotoxic Effects of *Ganoderma lucidum* Methanol Extract

ARTICLE INFO

Article history:

Received 28 October 2015
Accepted 27 December 2015
Available online, ISSN: 2148-127X

Keywords:

Ganoderma
Allelopathy
Antioxidant
Zorkun
Amanos

ABSTRACT

The aim of this study is to reveal allelopathic effects and antioxidant activities of methanolic extract of *Ganoderma lucidum* in Zorkun plateau (Osmaniye). It was determined that methanolic extract of *G. lucidum* has significantly phytotoxic effect by increasing the doses (1, 2, 4, 8 mg/mL) on *Hordeum vulgare* and *Triticum aestivum*. Total phenol and flavonoid amounts of *G. lucidum* were 114.55 mg/kg and 8.95 mg/kg, respectively. 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH), scavenging activity (60%, 91% and 92%), reducing power (0.83, 1.43 and 2.23 Abs), and nitric oxide (NO) scavenging activity (48%, 55% and 70%) of this mushroom at the different concentrations (1.25, 2.5 and 5 mg/mL) were determined, respectively. However, H₂O₂ scavenging activity of the different concentrations (0.0156-0.125 mg/mL) was found as 18%, 56%, 60% and 86%, respectively. Based on these findings, it can suggest that *G. lucidum* methanolic extract has significantly phytotoxic effect and antioxidant activity. The present study is the first report on the phytotoxic effects and antioxidant activities of *G. lucidum* which consumed and collected from Amanos Mountains.

* Corresponding Author:

E-mail: fbozok@osmaniye.edu.tr

Giriş

Ganodermataceae familyasına ait ve tıbbi bir mantar olan *Ganoderma lucidum*, Çin ve diğer doğu ülkelerinde "Lingzhi ya da Reishi" olarak isimlendirilmekte, sağlıklı ve uzun yaşam için sıklıkla tüketilmektedir (Lu ve ark., 2004). Ayrıca, her derde deva olarak nitelendirilen bu mantar, "muhteşem bitki" ve "ölümsüzlük mantarı" olarak da isimlendirilmektedir (Yuen ve Gohel, 2008). *G. lucidum*'un bronşit, hepatit, hipertansiyon, kalp-damar hastalıkları, AIDS, diyabet, kanser ve tümör gibi çeşitli hastalıkları engellemek için uzun zamandır kullanıldığı bilinmektedir (Wasser ve Weis, 1999; Shiao, 2003).

Mantarlar tarafından üretilen ikincil bileşikler doğal ürünlerin en büyük sınıflarından birini oluşturmaktadır (Angelini ve ark. 2010). Bu bileşikler, normalde mantarların gelişmesinde veya büyümesinde rol almamasına rağmen, bitki kökleriyle etkileşimlerde, simbiyotik yaşamın düzenlenmesinde ve allelo kimyasallarla diğer organizmaların engellenmesi ya da uyarılması gibi ekolojik olarak etkili olması sebebiyle mantarların yaşamında önemli bir yere sahiptir (Zhong ve Xiao, 2009; Angelini ve ark., 2010).

Oksidasyon birçok canlı organizmanın enerji üretmesi için önemlidir (Elmastas ve ark., 2007). Bununla birlikte, serbest radikaller ve diğer reaktif oksijen türleri, hücrelerde sürekli üretilmekte ve sonuç olarak, ölü hücreler ya da zarar görmüş dokular meydana gelmektedir (Barros ve ark., 2007b). Bu serbest radikallerin, kanser, şeker hastalığı, siroz, romatizma ve damar sertliği gibi hastalıklara sebep olabildiği bildirilmektedir (Halliwell ve Gutteridge 1984; Chan ve ark., 1997; Visioli ve ark., 2000). Doğal antioksidanları içeren besinleri tüketmek oksidatif zararı azaltmak için insan vücuduna yardımcı ve faydalı olabileceği belirtilmektedir (Nakayama ve ark., 1993; Halliwell, 1996; Elmastas ve ark., 2007).

Daha önce yapılan çalışmalarda, farklı lokasyonlardaki *G. lucidum*'un çeşitli ekstraktlarının antitümör, antioksidan ve antikanserojen aktivitesinin olduğu açığa çıkarılmasına rağmen (Janardhanan, 2000; Liu ve ark., 2002; Cao ve Lin, 2004; Yuen ve Gohel, 2005; Boh ve ark., 2007; Liu ve ark., 2010), Amanos Dağları'ndan toplanan *G. lucidum*'un antioksidan potansiyeli ve *Hordeum vulgare* (Arpa) ve *Triticum aestivum* (Buğday)'a karşı fitotoksik etkileri üzerine herhangi bir araştırma bulunmamaktadır. Böylelikle, bu çalışmanın amacı, Osmaniye Zorkun yaylasından toplanan *G. lucidum* metanolik ekstraktının allelopatik etkilerini ve antioksidan aktivitelerini ortaya çıkarmaktır.

Materyal ve Metot

Mantarların Toplanması

Ganoderma lucidum örnekleri 30 Aralık 2014 tarihinde Amanos Dağları (Osmaniye), Zorkun Yaylası'nın Ergenekon (37°01'42"K, 36°17'09"D, 725 m) ve Olukbaşı (37°00'33"K, 36°17'11"D, 962 m) bölgelerinden toplanmıştır (Şekil 1). Araziden toplanan mantar örnekleri laboratuvara getirilerek dehidratörde kurutulmuştur. Toplanan mantar örnekleri Selçuk Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü'nde muhafaza edilmektedir.

Metanolik Ekstraktın Elde Edilmesi

Kurutulmuş mantar örnekleri küçük parçalar haline getirilerek blender içerisinde toz haline gelinceye kadar öğütülmüştür. Öğütülmüş mantar örneklerinden 50 g tartılıp ağzı kapaklı cam şişelere konulmuş ve üzerine 400 ml metanol ilave edilerek 72 saat 60°C'de su banyosunda bekletilmiştir. Daha sonra örnekler süzülüp, metanol rotary evaporator aracılığıyla uzaklaştırılmıştır. *G. lucidum* metanolik ekstraktının % verimi 1,79 g olarak tespit edilmiştir. Elde edilen *G. lucidum* metanolik ekstraktı kullanılıncaya kadar +4°C'de karanlık bir ortamda muhafaza edilmiştir.



Şekil 1 *Ganoderma lucidum*'un Fruktifikasyon Organı

Fitotoksisite Deneyi

Hordeum vulgare ve *Triticum aestivum* bitki tohumları % 1,5 NACIO (sodyum hipoklorit) solüsyonu içerisinde 15 dk boyunca batırılarak yüzey sterilizasyonu yapılmıştır. Yüzey sterilizasyonu yapılan tohumlardan 20'şer tane alınarak daha önceden steril edilen ve içlerinde çift tabakalı filtre kağıdı bulunan petri kaplarına yerleştirilmiştir. *G. lucidum* metanolik ekstraktının farklı konsantrasyonları steril saf su eklenerek 1, 2, 4 ve 8 mg/mL olarak ayarlanmıştır. Kontrol olarak saf su kullanılmıştır. İçlerinde tohum bulunan petri kaplarına farklı konsantrasyonlarda hazırlanan solüsyonlardan 10 mL konulmuş ve etrafı streç film ile iyice sarılmıştır. Daha sonra petri kapları, 7 gün boyunca 24°C'de 12 saat aydınlık/12 saat karanlık ve %80 nem olan bir ortamda çimlenmeye bırakılmıştır. Her gün tohumların çimlenip çimlenmediği kontrol edilmiş ve 7. günün sonunda çimlenme yüzdeleri, kök ve gövde uzunlukları hesaplanarak, fidelerin yaş ağırlıkları tartılmıştır. Yaş ağırlıkları tartılan fideler bir gün boyunca 70°C'de etüvde bekletildikten sonra kuru ağırlıkları tartılmıştır (Sarkar ve ark. 2012).

Toplam Klorofil ve Karoten İçeriğinin Belirlenmesi

Çimlenen tohumlardan gelişen fidelerin yapraklarından 100 mg alınarak porselen havan içerisinde %80'lik aseton ile iyice ezilmiştir. Ezilen örnekler ağız kapaklı tüplere konulmuş ve son hacmi 10 mL olacak şekilde %80'lik aseton ile ayarlanmıştır. Daha sonra örnekler 4°C'de karanlık ortamda iki gün bekletilmiş ve 4000 g'de 10 dk santrifüj edildikten sonra santrifüj yapılan örneklerin üst (sıvı) kısmı (faz) alınarak 480, 510, 645 ve 663 nm dalga boylarında spektrofotometre cihazında ölçülmüştür. Tanık olarak %80'lik aseton solüsyonu kullanılmıştır. Toplam klorofil miktarı Arnon (1949)'un, karoten miktarı ise Duxbury ve Yentsch (1956)'in geliştirdiği formüllere göre hesaplanmıştır.

Elektrolit Sızıntı Seviyesinin Belirlenmesi

Elektrolit sızıntı seviyesi Devi ve Prasad (1998)'a göre elektriksel iletkenlik ölçer yardımıyla tespit edilmiştir. Uygulama sonunda kök ve gövdesi gelişen fidelerden 500 mg alınarak 100 mL dH₂O içerisine konularak bir gün bekletilmiştir. Daha sonra elektriksel iletkenlik ölçer yardımıyla elektrolit sızıntı seviyeleri ölçülmüştür.

Toplam Fenol Bileşikleri Miktarı

2000 µg ekstrakt içeren 1 mL metanolik ekstrakt bir erlen içine konularak üzerine 45 mL saf su ve 1 mL Folin-Ciocalteu reaktifi ilave edilmiştir. Erlen iyice çalkalanarak 3 dakika sonra üzerine 3 mL Na₂CO₃ (% 2) ilave edilmiştir. Karışım 2 saat karanlıkta oda sıcaklığında inkübasyona bırakılmış ve bekleme boyunca erlenler sıra karıştırılmıştır. Inkübasyondan sonra, örnekler 760 nm de tanığa karşı okunmuştur. Tanık çözelti, ekstrakt yerine aynı hacimde metanol eklenerek, diğer işlemler aynı olacak şekilde hazırlanmıştır. Sonuçlar oluşturulan standart eğri kullanılarak gallik asit cinsinden (mg kg⁻¹) ifade edilmiştir (Gursoy ve ark., 2009).

Toplam Flavonoid Miktarı

Toplam fenol bileşikleri için hazırlanan metanolik ekstraktlardan 1 mL alınmış üzerine 1 mL AlCl₃ (%2) ilave edilmiştir. Tanık çözeltisi için ise yine 1 ml ekstrakt ve üzerine AlCl₃ yerine metanol ilave edilerek hazırlanmıştır. Örnekler iyice karıştırılmış ve tanık çözeltiye karşı 415 nm' dalga boyunda okunmuştur. Toplam flavonoid miktarı kuarsetin eşdeğeri olarak ifade edilmiştir (mg kg⁻¹) (Gursoy ve ark., 2009).

DPPH Yöntemi ile Antioksidan Aktivite Tayini

Farklı konsantrasyonlarda (1,25, 2,5 ve 5 mg/ mL) hazırlanan metanolik ekstraktların 0,1 mL'sine, metanol içinde hazırlanmış 60 mM'lık DPPH (0,02365 mg/L) çözeltisinden 3,9 mL ilave edilerek karanlıkta oda koşullarında 1 saat bekletilmiş ve örneklerin absorbansı "UV 1800 Shimadzu" marka spektrofotometrede 517 nm dalga boyunda metanole karşı okunmuştur. Örneklerin DPPH serbest radikalini süpürme aktivitesi aşağıdaki formüle göre hesaplanmıştır (Brand-Williams ve ark., 1995).

$$\% \text{ DPPH Giderme Aktivitesi} = \frac{A_{\text{kontrol}} - A_{\text{örnek}}}{A_{\text{kontrol}}} \times 100$$

İndirgeme Gücü Kapasitesi

Metanolik ekstraktlarının Fe³⁺ iyonlarını indirgeme gücü kapasitesi Oyaizu (1986) metoduna göre tayin edilmiştir. Ortamdaki indirgen madde, Fe³⁺ iyonlarını Fe²⁺ iyonlarına indirger ve FeCl₃ ilavesiyle oluşan prusya mavisi rengindeki kompleksin absorbansı ölçülür. Yüksek absorbans değeri yüksek indirgeme kapasitesinin göstergesidir. Farklı konsantrasyonlardaki (1,25, 2,5 ve 5 mg/mL) metanolik ekstraktların 1 mL'sine, 2,5 mL fosfat tamponu (0,2 M, pH=6,6) ve 2,5 mL %1'lik K₃Fe(CN)₆ eklenmiştir.

Karışımlar 50°C'de 20 dakika bekletildikten sonra, oda sıcaklığına gelmesi beklenerek üzerine 2,5 mL %10'luk TCA (trikloroasetik asit) eklenmiş ve 4500 rpm'de 10 dakika santrifüj edilmiştir. Santrifüj sonrası üst fazdan 2,5 mL alınarak üzerine 2,5 mL distile su ve 0,5 mL %0,1'lik FeCl₃ çözeltisi ilave edilmiştir. Tüpler 10 dakika karanlıkta bekletildikten sonra absorbansları 700 nm'de "UV 1800 Shimadzu" marka spektrofotometrede tanığa karşı okunmuştur. Tanık çözelti ekstrakt yerine aynı hacimde metanol eklenerek, diğer işlemler aynı olacak şekilde hazırlanmıştır.

Nitrik Oksit (NO) Giderme Aktivitesi

Farklı konsantrasyonlarda (1,25, 2,5 ve 5 mg/mL) hazırlanmış metanolik ekstraktların nitrik oksit giderme aktivitesi Griess IIosvoy reaksiyonuna göre yapılmıştır (Garrat, 1964). 0,5 ml metanolik ekstrakta, 0,1 M fosfat tamponu (pH 7,4, 0,5 ml) ve fosfat tamponu ile hazırlanmış sodyum nitroprussid çözeltisi (10 mM, 2 ml) ilave edilmiştir. Kontrol ise örnek yerine aynı miktarda saf su ilave edilerek hazırlanmıştır. Oda sıcaklığında, karanlıkta 150 dakika bekletilen örneklerden inkübasyondan sonra 1,25 mL alınarak üzerine 1,25 mL Greiss reaktifi ilave edilmiş, reaktif ilavesinden sonra 30 dakika oda sıcaklığında karanlıkta bekletilmiştir.

Örneklerin absorbansları 548 nm de "UV 1800 Shimadzu" marka spektrofotometrede okunmuştur. Greiss reaktifi; greiss reaktifi (a) (% 5'lik fosforik asit içinde hazırlanmış %1'lik sülfanilamid) ve greiss reaktifi (b) (N-(1-Naftil)-etilendiamin dihidroklorür'ün saf su ile hazırlanmış % 0,1'lik çözeltisi) nin kullanmadan önce 1:1 oranında karıştırılması ile hazırlanır. Nitrik oksit giderme aktivitesi aşağıdaki formüle göre hesaplanmıştır.

$$\% \text{ NO Giderme Aktivitesi} = \frac{A_{\text{kontrol}} - A_{\text{örnek}}}{A_{\text{kontrol}}} \times 100$$

Hidrojen Peroksit (H₂O₂) Giderme Aktivitesi

Daha önce test edilen konsantrasyonlar (1,25, 2,5 ve 5 mg/mL) bulanık olduğundan dolayı en düşük konsantrasyon olan 1,25 mg/ mL 10 kat seyreltilip dilüsyon yapılarak konsantrasyonlar (0,0156-0,125 mg/ mL) hazırlanmıştır. Farklı konsantrasyonlardaki ekstraktların H₂O₂ giderme yeteneği Ruch ve arkadaşlarının (1989) metoduna göre yapılmıştır. 3.4 mL fosfat tamponu (0,1 M, pH=7,4) ve 0,6 ml H₂O₂ çözeltisine (40 mM, fosfat tamponu ile hazırlanmış) 1 mL örnek ekstraktı ilave edilmiştir. Kontrol tüpü ise 3,4 mL fosfat tamponu ve 0,6 ml 40 mM H₂O₂ çözeltisi ilave edilerek hazırlanmıştır. Ayrıca her bir örnek için ayrı ayrı 1 mL örnek ve 4 mL fosfat tamponundan oluşan ve H₂O₂ içermeyen numune körleri hazırlanmıştır. Hazırlanan

örnekler iyice çalkalandıktan sonra absorbansları 10 dk sonra 230 nm'de tampon çözeltiye karşı okunmuştur. Aşağıdaki denklem yardımıyla ekstraktların H₂O₂'yi giderme aktivitesi hesaplanmıştır.

$$GA = \frac{A_{\text{kontrol}} - (A_{\text{numune}} - A_{\text{numune körü}})}{A_{\text{kontrol}}} \times 100$$

GA= % H₂O₂ Giderme Aktivitesi

Sonuç ve Tartışmalar

Bu çalışmada, Amanos Dağları'ndan toplanan *Ganoderma lucidum*'un metanolik ekstraktının fitotoksik etkileri ve antioksidan potansiyelleri araştırılmıştır. *G. lucidum* metanolik ekstraktının fitotoksik etkileri Şekil 2'de ve antioksidan aktiviteleri ise Şekil 3'de gösterilmektedir.

Fitotoksisite

Mantarlarda bulunan sekonder metabolitlerin bitkiler üzerinde, tohum çimlenmesini baskılama ve fide gelişimini yavaşlatma gibi önleyici etkilere sahip olabileceği belirtilmiştir (Eaton ve Ayres, 2002; Xuan ve ark. 2005; Araya, 2007). Bu amaçla, farklı konsantrasyonlarda (1, 2, 4, 8 mg/mL) *G. lucidum* metanolik ekstraktının *H. vulgare* ve *T. aestivum* üzerine fitotoksik etkileri araştırılmış ve Şekil 2'de gösterilmiştir.

En yüksek konsantrasyonda uygulanan (8 mg/ mL) *G. lucidum* metanolik ekstraktı *H. vulgare* ve *T. aestivum*'un sırasıyla (%) çimlenmesini 25 ve 20, kök gelişimlerini 29 ve 32, gövde gelişimlerini 44, yaş ve kuru ağırlık miktarlarını ise 40, 37 ve 20, 23 oranlarında engellemiştir. Aynı şekilde, en yüksek konsantrasyonda uygulanan *G. lucidum* metanolik ekstraktı kontrol ile karşılaştırıldığında, *H. vulgare* ve *T. aestivum*'daki klorofil-a, b ve karoten miktarlarını (%) sırasıyla 78, 74, 73 ve 50, 43, 41 oranlarında azalttığı tespit edilmiştir. Bununla birlikte artan konsantrasyona bağlı olarak test edilen her iki bitkide de elektriksel iletkenlik (EC) değerinin arttığı görülmüştür (Şekil 2).

Nithya ve ark. (2014)'ı tarafından yapılan çalışmada, farklı konsantrasyonlarda (100 ve 200 ppm) test edilen *G. lucidum* etanolik ekstraktının turp tohumları üzerine fitotoksik etkileri araştırılmış ve araştırma sonunda, 100 ve 200 ppm konsantrasyonlar sırasıyla çimlenmeyi %97 ve 98, kök uzamasını ise %80 ve 88 oranlarında önlediği belirlenmiştir. Aynı zamanda, *Tuber aestivum*, *T. borchii* ve *T. brumale* f. *moschatum*'un farklı konsantrasyonlardaki (2,5, 5 ve 10 mg/mL) metanolik ekstraktının, *Hieracium pilosella*, *Lotus corniculatus*, *Melica ciliata* ve *Silene vulgaris* üzerine allelopatik etkileri araştırılmış ve araştırma sonunda en yüksek konsantrasyonda uygulanan her üç mantar metanolik ekstraktının test edilen bütün tohumların çimlenmesini tamamen inhibe ettiği tespit edilmiştir (Angelini ve ark. 2010).

Toplam Fenol Bileşikleri ve Flavonoid Miktarı

Fenol bileşikleri, bitki ve meyvelerde yaygın olarak bulunmakta, renklenmeye ve duyuşal özelliklere katkıda bulunmaktadır (Rice-Evans ve ark. 1997). Flavonoidler ise düşük molekül ağırlıklı polifenolik bileşiklerdir

(Hertog ve ark. 1992). Fenol bileşikleri, *in vitro* LDL (low-density lipoprotein)'nin oksidasyonunu inhibe ederek etki göstermekle birlikte, hipertansiyonun oluşturduğu etkilerin ortadan kaldırılmasında ve glikozun emiliminde önemli rol oynamaktadır (Frankel ve ark., 1995; Teissedre ve ark., 1996; Donovan ve ark., 1998; Del Caro ve ark., 2004). Ayrıca, fenol bileşiklerinin serbest radikalleri nötralize ederek, tümörlerin gelişimi üzerine engelleyici etkiye sahip olduğu bilinmektedir (Stacewicz-Sapuntzakis ve ark., 2001).

Bu çalışmada, *G. lucidum*'un toplam fenol ve flavonoid içerikleri mg kg⁻¹ gallik asit ve kuarsetin cinsinden ifade edilmiş ve sırasıyla, 114,55 ve 8,95 olarak belirlenmiştir.

İtalya ve Çin'den toplanan *G. lucidum*'un misellerindeki toplam fenolik madde miktarı ise (mg/g) 27,9 ve 16,5 olarak tespit edilmiştir (Saltarelli ve ark., 2009).

DPPH Giderme Aktivitesi

DPPH radikalini giderme çalışması diğer metotlarla karşılaştırıldığında kısa zamanda antioksidan aktiviteyi değerlendirmek için yaygın şekilde kullanılan bir metottur (Sharma ve Bhat, 2009; Elmastas ve ark., 2007). Ayrıca, DPPH radikalini kullanımı, enzim inhibisyonu ve metal şelatlama gibi yan reaksiyonlarla etkilenmediğinden dolayı bir avantaja sahiptir (Wettasinghe ve Shahidi, 1999). Antioksidan maddeler, hidrojen atomu ya da bir elektron transferiyle DPPH radikalini nötralize etmekte ve DPPH'in giderilme kapasitesi 517 nm'de spektrofotometrede okunmayla mordan sarıya renk değişimiyle belirlenebilmektedir (Menega ve ark. 2013).

G. lucidum metanolik ekstraktının DPPH giderme aktivitesi artan konsantrasyona bağlı olarak bir artış göstermiştir. Farklı konsantrasyonlarda (1,25, 2,5 ve 5 mg/mL) hazırlanan *G. lucidum* metanolik ekstraktının DPPH giderme aktivitesi sırasıyla, %60,71, 91,32 ve 92,26 olduğu tespit edilmiştir. Standart olarak kullanılan BHT'nin DPPH giderme aktivitesi ise en yüksek konsantrasyonda (5 mg/mL) % 96 olarak bulunmuştur.

Saltarelli ve ark. (2009)'larının yaptıkları çalışmada, *G. lucidum* misellerinden elde edilen etanolik ekstraktın DPPH giderme aktivitesi 0,6 mg/ml konsantrasyonda %60 olarak tespit edilmiştir. Ayrıca, *G. lucidum*'dan elde edilen toplam polisakkaritlerin DPPH giderme aktivitesi 10 mg/mL konsantrasyonda %94,5 olarak tespit edilirken (Kozarski ve ark. 2011), havada, vakumda ve vakumda dondurarak kurutma yöntemleriyle *G. lucidum*'dan elde edilen üç polisakkaritin (GLP-H, GLP-V ve GLP-F) DPPH giderme aktivitesi 3 mg/ml konsantrasyonda sırasıyla, %56,2, %63,7 ve %47,3 olarak tespit edilmiştir (Fan ve ark. 2012). *Ganoderma* cinsinin farklı bir türü olan *G. tsuage*'den elde edilen metanolik ekstraktın 1 mg/mL konsantrasyondaki DPPH giderme aktivitesinin ise %90 olduğu bulunmuştur (Yen ve Wu, 1999).

İndirgeme Gücü

Antioksidan aktivitenin, indirgeme kapasitesinin artmasıyla doğru orantılı olduğu bildirilmiştir (Tanaka ve ark., 1988). İndirgeme kapasitesi genellikle bir hidrojen atomu ya da bir elektron transferiyle, serbest radikal zincirleri kırarak etki gösteren bileşiklerin varlığıyla ilişkilidir (Shimada ve ark., 1992; Barros ve ark., 2007a).

İndirgeyicilerin varlığı Fe^{+3} 'ün Fe^{+2} 'ye dönüşmesine sebep olmakta ve 700 nm'de elde edilen yüksek absorbans yüksek indirgeme gücünün olduğunu işaret etmektedir (Barros ve ark., 2007a).

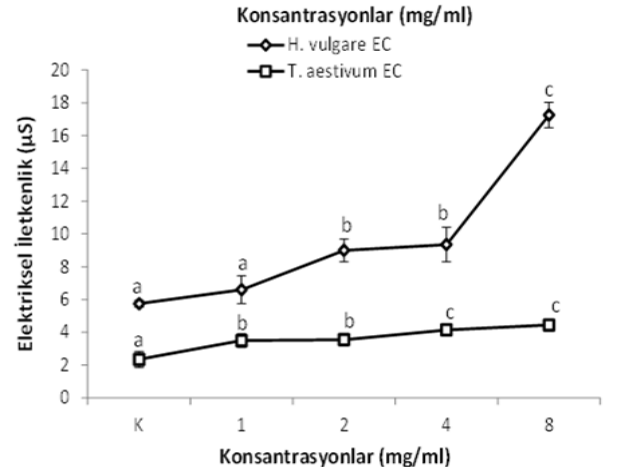
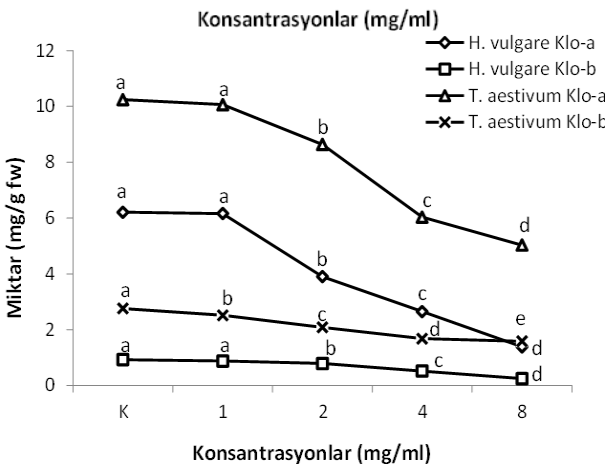
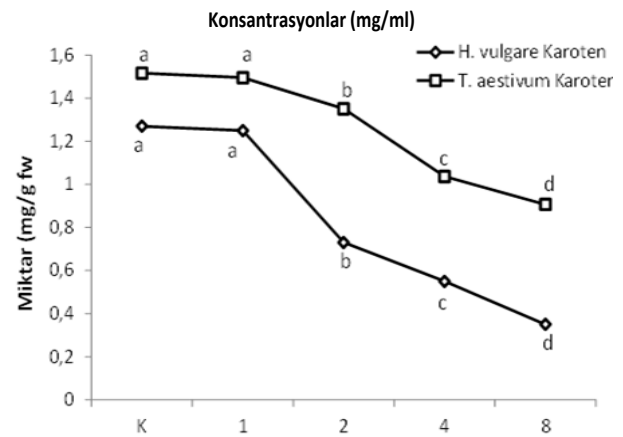
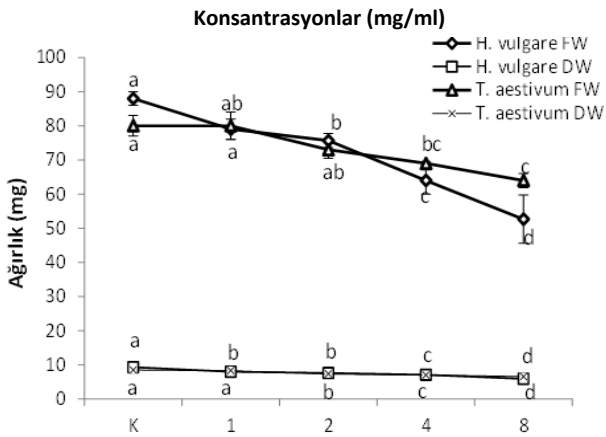
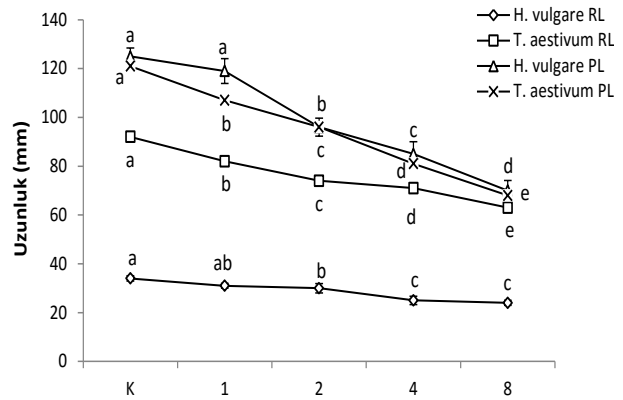
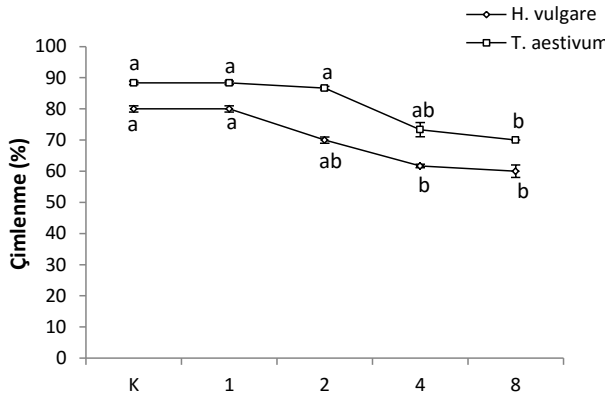
Bu çalışmada, *G. lucidum* metanolik ekstraktının indirgeme gücü konsantrasyon artışına bağlı olarak bir artış göstermiş ve farklı konsantrasyonlardaki (1,25, 2,5 ve 5 mg/ml) indirgeme gücü (Abs) sırasıyla, 0,83, 1,43 ve 2,23 olarak belirlenmiştir.

Daha önce yapılan çalışmalarda, *G. lucidum*'dan izole edilen iki polisakkaritin (GLP_{L1}, GLP_{L2}) indirgeme gücü (Abs) 10 mg/mL konsantrasyonda sırasıyla, 0,242 ve 0,303 olduğu belirlenirken (Liu ve ark., 2010), *G. lucidum*'dan elde edilen toplam polisakkaritlerin indirgeme gücü 20 mg/mL konsantrasyonda, 3.14 olarak

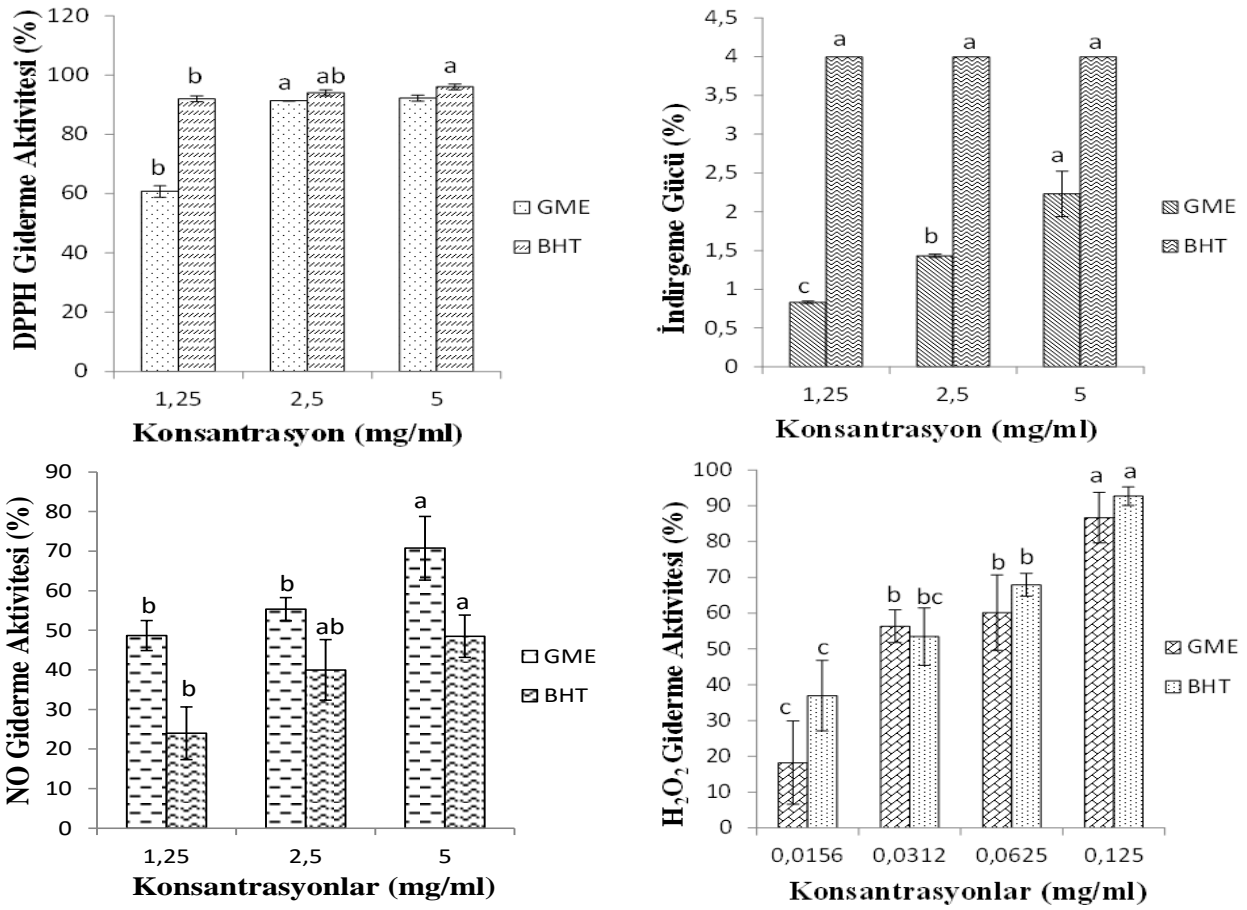
tespit edilmiştir (Kozarskive ark., 2011). Aynı şekilde, Fan ve ark. (2012)'larının yaptıkları çalışmada, havada, vakumda ve vakumda dondurarak kurutma yöntemleriyle *G. lucidum*'dan elde edilen üç polisakkaritin (GLP-H, GLP-V ve GLP-F) indirgeme gücü (Abs) sırasıyla, 0,5, 0,4 ve 0,3 olarak tespit edilmiştir.

Nitrik oksit (NO) Giderme Aktivitesi

Nitrik oksit, nitrik oksit sentaz enzimi tarafından l- arjinin'den üretilen serbest radikallerden bir tanesidir (Reuter ve ark., 2010) ve yüksek konsantrasyonları toksik olabilmektedir (Lim et al., 2007; Pal et al., 2010). Bununla birlikte, nitrik oksitin aşırı üretiminin engellenmesi önemli bir işlem olarak vurgulanmıştır (Wang ve ark., 1996).



Şekil 2 *G. lucidum* metanolik ekstraktının *H. vulgare* ve *T. aestivum* üzerine fitotoksik etkileri. Farklı harflerle gösterilen ortalamalar $P < 0,05$ düzeyinde önemlidir. K: Kontrol, RL: Kök uzunluğu, PL: Gövde uzunluğu, FW: Yaş ağırlık, DW: Kuru ağırlık, Klorofil-a: Klorofil-a, Klorofil-b: Klorofil-b, EC: Elektriksel iletkenlik



Şekil 3 *G. lucidum* metanolik ekstraktının antioksidant aktivitesi. Her bir değer ortalama \pm standart sapma olarak belirtilmiştir. Farklı harflerle gösterilen sütunlar $P < 0,05$ düzeyinde konsantrasyonlar arasındaki istatistiksel olarak farklılığı ifade etmektedir. GME: *Ganoderma* Metanolik Ekstrakt, BHT: Butil Hidroksi Toluen

G. lucidum'un farklı konsantrasyonlardaki (1,25, 2,5 ve 5 mg/mL) metanolik ekstraktlarının NO giderme aktiviteleri sırasıyla, %48, 55 ve 70 olarak bulunurken, kontrol olarak test edilen BHT'nin ise NO giderme aktivitesi %24, 40 ve 48 olarak tespit edilmiştir. Böylelikle, *G. lucidum* metanolik ekstraktının NO giderme aktivitesinin kontrol olarak test edilen BHT'den yüksek olduğu tespit edilmiştir.

Daha önceki çalışmalarda, *Pleurotus squarrosulus*'un metanolik, sıcak ve soğuk su ekstraktlarının ve *Pleurotus florida*'nın metanolik ekstraktının NO giderme aktiviteleri 1 mg/mL konsantrasyonda sırasıyla, %80, 67, 20 ve 81,8 olduğu bulunurken (Pal ve ark., 2010; Menega ve ark., 2013), *Tricholoma matsutake*'nin su, etil asetat ve butanol ekstraktlarının 2 mg/mL konsantrasyondaki NO giderme aktivitesi ise sırasıyla %28,8, 61,6 ve 46,6 olduğu tespit edilmiştir (Lim ve ark., 2007).

Hidrojen peroksit (H₂O₂) Giderme Aktivitesi

Hidrojen peroksit, oksidatif süreçlerle dokularda meydana gelen nispeten kararlı ve radikal olmayan oksitleyici bir türdür (Özyürek ve ark., 2014). H₂O₂, bitkilerde ekstraselular matrikste, sitoplazma ve plazma membranında üretilmekte ve sitoplazmadaki endoplazmik retikulum ile ilişkili elektron taşıma zinciri, H₂O₂'nin ana kaynağı olarak belirtilmektedir (Slesak ve ark., 2007). Ayrıca, bitki dokularında H₂O₂'nin birikmesi hücreler arası sinyal olarak işlev gördüğü rapor edilmekle birlikte, birçok gen ile birlikte katalaz, peroksidaz ve alternatif

oksidaz gibi stres cevaplarıyla ilgili proteinleri uyardığı bilinmektedir (Lee ve ark., 2001). H₂O₂, oksidatif strese maruz kalan herhangi bir dokuya zarar vermekte ve kansere neden olduğu belirtilmektedir (Mates ve Sanchez-Jimenez, 2000).

Farklı konsantrasyonlarda (0,0156-0,125 mg/mL) hazırlanan *G. lucidum* metanolik ekstraktının H₂O₂ giderme aktivitesi konsantrasyon artışına bağlı olarak bir artış göstermiştir.

En yüksek konsantrasyonda, H₂O₂ giderme aktivitesi *G. lucidum*'un metanolik ekstraktında %86,63 olduğu bulunurken, BHT'de ise %93,76 olduğu tespit edilmiştir.

Daha önceki yapılan çalışmalarda, *G. lucidum*'dan izole edilen düşük moleküler ağırlıklı iki polisakkaritin (GLP_{L1} ve GLP_{L2}) H₂O₂ giderme aktiviteleri 8 mg/mL'de sırasıyla, %50 ve 30 olduğu tespit edilirken (Liu ve ark., 2010), farklı konsantrasyonlarda (5, 10 ve 15 mg/mL) test edilen *Boletus edulis*, *Lactarius volemus* ve *Terfezia boudieri*'nin metanolik ekstraktlarının ise H₂O₂ giderme aktiviteleri 15 mg/mL'de sırasıyla, %94,5, 78,7 ve 58,1 olduğu belirlenmiştir (Özyürek ve ark., 2014).

Bu sonuçlardan yola çıkarak, Amanos Dağları'ndan toplanan *G. lucidum* metanolik ekstraktının önemli ölçüde fitotoksik etkiye ve antioksidan aktiviteye sahip olduğu söylenebilir. Bu araştırma, daha önce yapılan çalışmalarla kıyaslandığında antioksidan aktivite bakımından farklılıkların olduğu görülmektedir. Farklı araştırmacılar tarafından çalışılan *G. lucidum*'un antioksidan aktivitelerindeki bu farklılıklar, çeşitli ekstrakt

yöntemleri, *G. lucidum*'un kültür formunun kullanılması, toplama yeri ve zamanı gibi faktörlerden kaynaklanmış olabilir. Ayrıca, doğadan toplanan ve antioksidan özelliğe sahip yenebilen mantarların tüketilmesi oksidatif zarara karşı insan vücudunu korumak için yararlı olabilir. Aynı zamanda, ileriki çalışmalarda, mantarların farklı ekstraktlarındaki antioksidan aktiviteden sorumlu olan spesifik bileşiklerin tanımlanması ve izole edilmesi gerekmektedir.

Kaynaklar

- Angelini P, Donnini D, Pagiotti R, Granetti B, Venanzoni R. 2010. Biological activities of methanolic extract from *Tuber aestivum*, *Tuber borchii* and *Tuber brumale* f. *moschatum*, Österr. Z. Pilzk., 19: 281-290.
- Araya H. 2007. Fruiting Bodies of Mushrooms as Allelopathic Plants, Allelopathy: New Concepts and Methodology, 22: 341-352.
- Arnon DI. 1949. Copper enzyme in isolated chloroplast polyphenol oxidase in *Beta vulgaris*. Plant Physiol. 24: 1-15.
- Barros L, Ferreira MJ, Queiros B, Ferreira ICFR and Baptista P. 2007a. Total phenols, ascorbic acid, β -carotene and lycopene in Portuguese wild edible mushrooms and their antioxidant activities, Food Chemistry 103: 413-419.
- Barros L, Baptista P, Ferreira ICFR. 2007b. Effect of *Lactarius piperatus* fruiting body maturity stage on antioxidant activity measured by several biochemical assays, Food and Chemical Toxicology 45: 1731-1737.
- Boh B, Berovic M, Zhang J, Zhi-Bin L. 2007. *Ganoderma lucidum* and its pharmaceutically active compounds, Biotechnology Annual Review 13: 265-301.
- Brand-Williams W, Cuvelier ME, Berset C. 1995. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. Food Science and Technology. 28(1): 25-30.
- Cao QZ, Lin Z. 2004. Antitumor and anti-angiogenic activity of *Ganoderma lucidum* polysaccharides peptide, Acta Pharmacol. Sin, 25(6): 833-838.
- Chan MMY, Fong D, Ho CT, Huang HI. 1997. Inhibition of Inducible Nitric Oxide Synthase Gene Expression and Enzyme Activity by Epigallocatechin Gallate, a Natural Product from Green Tea, Biochemical Pharmacology, 54: 1281-1286.
- Del Caro A, Piga A, Pinna I, Fenu PM, Agabbio M. 2004. Effect of Drying Conditions and Storage Period on Polyphenolic Content, Antioxidant Capacity, and Ascorbic Acid of Prunes, J. Agric. Food Chem. 52: 4780-4784.
- Devi SR, Prasad MNV. 1998. Copper toxicity in *Ceratophyllum demersum* L. (Coontail), a free floating macrophyte: response of antioxidant enzymes and antioxidants. Plant Sci. 13: 157-165.
- Donovan JL, Meyer AS, Waterhouse AL. 1998. Phenolic Composition and Antioxidant Activity of Prunes and Prune Juice (*Prunus domestica*), J. Agric. Food Chem. 46: 1247-1252
- Duxbury AC, Yentsch CS. 1956. Plankton pigment monograph. J. Mar. Res. 15: 93-101.
- Eaton GK, Ayres MP. 2002. Plasticity and constraint in growth and protein mineralization of ectomycorrhizal fungi under simulated nitrogen deposition, Mycologia, 94(6): 921-932.
- Elmastas M, Isildak O, Turkecul I, Temur N. 2007. Determination of antioxidant activity and antioxidant compounds in wild edible mushrooms, Journal of Food Composition and Analysis, 20: 337-345.
- Fan L, Li J, Deng K, Ai L. 2012. Effects of drying methods on the antioxidant activities of polysaccharides extracted from *Ganoderma lucidum*, Carbohydrate Polymers 87: 1849-1854.
- Frankel EN, Waterhouse AL, Teissedre PL. 1995. Principal Phenolic Phytochemicals in Selected California Wines and Their Antioxidant Activity in Inhibiting Oxidation of Human Low-Density Lipoproteins, J. Agric. Food Chem. 43: 890-894.
- Garratt DC. 1964. The quantitative analysis of drugs (Vol. 3). Japan: Chapman and Hall Ltd., pp. 456-458.
- Gursoy N, Sarıkürkçü C, Cengiz M, Solak MH. 2009. Antioxidant activities, metal contents, total phenolics and flavonoids of seven *Morchella* species. Food and Chemical Toxicology: An International Journal Published for the British Industrial Biological Research Association, 47(9): 2381-8.
- Halliwell B, Gutteridge JHMC. 1984. Oxygen toxicity, oxygen radicals, transition metals and disease, Biochem. J. 219: 1-14.
- Halliwell B. 1996. Antioxidants in Human Health and Disease, Annu. Rev. Nutr. 16: 33-50.
- Hertog MGL, Hollman PCH, Katan MB. 1992. Content of Potentially Anticarcinogenic Flavonoids of 28 Vegetables and 9 Fruits Commonly Consumed in The Netherlands, J. Agric. Food Chem. 40: 2379-2383.
- Janardhanan KK. 2000. Antioxidant and Antitumor Activity of *Ganoderma lucidum* (Curt.:Fr.) P. Karst.-Reishi (Aphyllophoromycetideae) from South India, International Journal of Medicinal Mushrooms, 2(3): 1-6.
- Kozarski M, Klaus A, Niksic M, Jakovljevic D, Helsen JPF, Van Griensven LJD. 2011. Antioxidative and immunomodulating activities of polysaccharide extracts of the medicinal mushrooms *Agaricus bisporus*, *Agaricus brasiliensis*, *Ganoderma lucidum* and *Phellinus linteus*, Food Chemistry 129: 1667-1675.
- Lee DH, Kim YS, Lee CB. 2001. The inductive responses of the antioxidant enzymes by salt stress in the rice (*Oryza sativa* L.), J. Plant Physiol. 158: 737-745.
- Lim HW, Yoon JH, Kim YS, Lee MW, Park SY, Choi HK. 2007. Free radical-scavenging and inhibition of nitric oxide production by four grades of pine mushroom (*Tricholoma matsutake* Sing.), Food Chemistry 103: 1337-1342.
- Liu X, Yuan JP, Chung CK, Chen XJ. 2002. Antitumor activity of the sporoderm-broken germinating spores of *Ganoderma lucidum*, Cancer Letters 182(2): 155-161.
- Liu W, Wang H, Pang X, Yao W, Gao X. 2010. Characterization and antioxidant activity of two low-molecular-weight polysaccharides purified from the fruiting bodies of *Ganoderma lucidum*, International Journal of Biological Macromolecules, 46(4): 451-457.
- Lu QY, Jin YS, Zhang Q, Zhang Z, Heber D, Go VLW, Li FP, Rao JY. 2004. *Ganoderma lucidum* extracts inhibit growth and induce actin polymerization in bladder cancer cells in vitro Cancer Letters, 216: 9-20.
- Mates JM, Sanchez-Jimenez FM. 2000. Role of reactive oxygen species in apoptosis: implications for cancer therapy, The International Journal of Biochemistry & Cell Biology 32: 157-170.
- Menega D, Rajakumar S, Ayyasamy PM. 2013. Free Radical Scavenging Activity of Methanolic Extract of *Pleurotus florida* Mushroom, International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences, 5(4): 601-606.
- Nakayama T, Yamada M, Osawa T, Kawakishiki S. 1993. Suppression of active oxygen-induced cytotoxicity by flavonoids, Biochemical Pharmacology, 45: 265-267.
- Nithya M, Ambikapathy V, Panneerselvam A. 2014. Collection, Identification, Phytochemical analysis and Phytotoxicity test of Wood inhabiting Fungi *Ganoderma lucidum* (Curt.Fr.) P.Karst., Hygeia. J. D. Med. 6: 31-39.
- Oyaizu M. 1986. Studies on products of browning reactions: antioxidative activities of products of browning reaction prepared from glucosamine. Japanese Journal of Nutrition, 44: 307-315.

- Özyürek M, Bener M, Güçlü K, Apak R. 2014. Antioxidant/antiradical properties of microwave-assisted extracts of three wild edible mushrooms, *Food Chemistry* 157: 323-331.
- Pal J, Ganguly S, Tahsin KS, Ancharya K. 2010. In vitro free radical scavenging activity of wild edible mushroom, *Pleurotus squorrosulus* (Mont.) Singer, *Indian Journal of Experimental Biology*, 47: 1210-1218.
- Reuter S, Gupta SC, Chaturvedi MM, Aggarwal BB. 2010. Oxidative stress, inflammation, and cancer: How are they linked?, *Free Radical Biology & Medicine* 49: 1603-1616.
- Rice-Evans CC, Miller NJ, Paganpa G. 1997. Antioxidant properties of phenolic compounds, *Trends in Plant Science*, 2(4): 152-159.
- Ruch RJ, Cheng SJ, Klaunig JE. 1989. Prevention of cytotoxicity and inhibition of intracellular communication by antioxidant catechins isolated from Chinese green tea. *Carcinogenesis*, 10: 1003-1008.
- Saltarelli R, Ceccaroli P, Iotti M, Zambonelli A, Buffalini M, Casadei L, Vallorani L, Stocchi V. 2009. Biochemical characterisation and antioxidant activity of mycelium of *Ganoderma lucidum* from Central Italy, *Food Chemistry* 116: 143-151.
- Sarkar E, Chatterjee SN, Chakraborty P. 2012. Allelopathic effect of *Cassia tora* on seed germination and growth of mustard. *Turk J. Bot.* 36: 458-494.
- Sharma OP, Bhat TK. 2009. DPPH antioxidant assay revisited, *Food Chemistry*, 113: 1202-1205.
- Shiao MS. 2003. Natural products of the medicinal fungus *Ganoderma lucidum*: Occurrence, biological activities, and pharmacological functions. *The Chemical Record*, 3: 172-180.
- Shimada K, Fujikawa K, Yahara K, Nakamura T. 1992. Antioxidative Properties of Xanthan on the Autoxidation of Soybean Oil in Cyclodextrin Emulsion, *J. Agric. Food Chem.* 40: 945-948.
- Slesak I, Libik M, Karpinska B, Karpinski S and Miszalski Z. 2007. The role of hydrogen peroxide in regulation of plant metabolism and cellular signalling in response to environmental stresses, *Acta Biochimica Polonica*, 54(1): 39-50.
- Stacewicz-Sapuntzakis M, Bowen PE, Hussain EA, Damayanti-Wood BI, Farnsworth NR. 2001. Chemical Composition and Potential Health Effects of Prunes: A Functional Food?, *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 41(4): 251-286.
- Tanaka M, Chui WK, Nagashima Y, Taguchi T. 1988. Application of Antioxidative Maillard Reaction Products from Histidine and Glucose to Sardine Products, *Nippon Suisan Gakkaishi*, 54(8): 1409-1414.
- Teissedre PL, Frankel EN, Waterhouse AL, Peleg H, German JB. 1996. Inhibition of in vitro Human LDL Oxidation by Phenolic Antioxidants from Grapes and Wines, *J Sci Food Agric.* 70: 55-61.
- Visioli F, Borsani L, Galli C. 2000. Diet and prevention of coronary heart disease: the potential role of phytochemicals, *Cardiovascular Research*, 47: 419-425.
- Wang H, Cao G, Piror RL. 1996. Total Antioxidant Capacity of Fruits, *J. Agric. Food Chem.* 44: 701-705.
- Wasser SP, Weis AL. 1999. Medicinal properties of substances occurring in higher basidiomycetes mushrooms. *International Journal of Medicinal Mushrooms*, 1: 31-62.
- Wettasinghe M, Shahidi F. 1999. Antioxidant and free radical-scavenging properties of ethanolic extracts of defatted borage (*Borago officinalis* L.) seeds, *Food Chemistry* 67: 399-414.
- Xuan TD, Tawata S, Khanh TD, Chung IM. 2005. Decomposition of Allelopathic Plants in Soil, *J. Agronomy & Crop Science* 191: 162-171.
- Yen GC, Wu JY. 1999. Antioxidant and radical scavenging properties of extracts from *Ganoderma tsugae*, *Food Chemistry* 65: 375-379.
- Yuen JWM, Gohel MDI. 2005. Anticancer Effects of *Ganoderma lucidum*: A Review of Scientific Evidence, *Nutrition and Cancer*, 53(1): 11-17.
- Yuen JWM, Gohel MDI. 2008. The dual roles of *Ganoderma* antioxidants on urothelial cell DNA under carcinogenic attack, *Journal of Ethnopharmacology*, 118: 324-330.
- Zhong JJ, Xiao JH. 2009. Secondary Metabolites from Higher Fungi: Discovery, Bioactivity, and Bioproduction, *Adv Biochem Engin/Biotechnol*, 113: 79-150.