

T.C.
PAMUKKALE ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

ENDEMİK *Salix purpurea* L. subsp. *leucodermis* YALT.
(SALICACEAE) ÜZERİNDE BAZI BİYOLOJİK AKTİVİTE
ARAŞTIRMALARI

YÜKSEK LİSANS TEZİ

EZGİ ALVAR

DENİZLİ, OCAK 2024

T.C.
PAMUKKALE ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
BİYOLOJİ ANABİLİM DALI



ENDEMİK *Salix purpurea* L. subsp. *leucodermis* YALT.
(SALICACEAE) ÜZERİNDE BAZI BİYOLOJİK AKTİVİTE
ARAŞTIRMALARI

YÜKSEK LİSANS TEZİ

EZGİ ALVAR

DENİZLİ, OCAK 2024

Bu tezin tasarımı, hazırlanması, yürütülmesi, araştırmalarının yapılması ve bulgularının analizlerinde bilimsel etiğe ve akademik kurallara özenle riayet edildiğini; bu çalışmanın doğrudan birincil ürünü olmayan bulguların, verilerin ve materyallerin bilimsel etiğe uygun olarak kaynak gösterildiğini ve alıntı yapılan çalışmalara atfedildiğine beyan ederim.

Ezgi ALVAR

ÖZET

**ENDEMİK *Salix purpurea* L. subsp. *leucodermis* YALT. (SALICACEAE)
ÜZERİNDE BAZI BİYOLOJİK AKTİVİTE ARAŞTIRMALARI
YÜKSEK LİSANS TEZİ
EZGİ ALVAR
PAMUKKALE ÜNİVERSİTESİ FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
BİYOLOJİ ANABİLİM DALI
(TEZ DANIŞMANI: PROF. DR. GÜRKAN SEMİZ)
DENİZLİ, OCAK 2024**

Salix L. cinsi dünyada yaklaşık 500 türle yayılış gösteren zengin bir cinstir. Türkiye'deki *Salix* türleri üzerinde yapılan antioksidan ve anti-inflamatuar çalışmaları önemli ölçüde potansiyel göstermiştir. Bu çalışmamızda endemik *Salix purpurea* L. subsp. *leucodermis* Yalt. taksonunun farklı polaritedeki çözücülerdeki toplam fenolik madde miktarı, toplam flavonoid miktarı ve antioksidan aktivitesinin belirlenmesi amaçlanmıştır. Ekstraktların barındırdığı toplam fenolik madde miktarı Folin-Ciocalteu yöntemiyle, toplam flavonoid miktarı $AlCl_3$ kolorimetrik metoduyla ve antioksidan seviyesi DPPH yöntemi ile belirlenmiştir. Elde edilen sonuçlara göre en yüksek miktarda fenolik madde miktarı etanol (223,54 mg GAE/g) ve metanol (183,12 mgGAE/g) ekstraktlarında bulunmuştur. En yüksek miktarda flavonoid *n*-hekzan (152,34 mg RU/g; 116,03 mg QE/g), metanol (109,84 mg RU/g; 81,57 mg QE/g) ve etanol (109,13 mg RU/g; 80,99 mg QE/g) ekstraktlarında belirlenmiştir. Antioksidan testlerine göre ise metanol ekstraktının IC50 değeri 11,86 µg/ml, su ekstraktının IC50 değeri 19,81 µg/ml, etanol ekstraktının IC50 değer 34,96 µg/ml, kloroform ekstraktının IC50 değeri 175,66 µg/ml ve *n*-hekzan ekstraktının IC50 değeri ise 420,44 µg/ml olarak bulunmuştur. Bu çalışma, ülkemizde endemik olarak yayılış gösteren *S. purpurea* subsp. *leucodermis* bitkisi üzerine yapılmış ilk biyoaktivite çalışmasıdır.

ANAHTAR KELİMELELER: *Salix purpurea* subsp. *leucodermis*, Erguvani söğüt, biyolojik aktivite, antioksidan kapasite

ABSTRACT

SOME BIOLOGICAL ACTIVITY STUDIES ON ENDEMIC *Salix purpurea* L. subsp. *leucodermis* YALT. (SALICACEAE)

MSc THESIS

EZGİ ALVAR

PAMUKKALE UNIVERSITY INSTITUTE OF SCIENCE

BIOLOGY

(SUPERVISOR: PROF. DR. GÜRKAN SEMİZ)

DENİZLİ, JANUARY 2024

The genus *Salix* L. is a rich group distributed around the world with approximately 500 species. Antioxidant and anti-inflammatory studies conducted on *Salix* species in Türkiye have shown significant potential. In this study, we aimed to determine the total phenolic contents, total flavonoid contents and antioxidant activity of the endemic *Salix purpurea* subsp. *leucodermis* in solvents of different polarities. The total amount of phenolic substances contained in the extracts was determined by the Folin-Ciocalteu method, the total amount of flavonoids by AlCl₃ colorimetric method, and the antioxidant level by the DPPH method. According to the results, the highest amounts of phenolic contents were found in ethanol (223.54 mg GAE/g) and methanol (183.12 mg GAE/g) extracts. The highest flavonoid contents were determined in *n*-hexane (152.34 mg RU/g; 116.03 mg QE/g), methanol (109.84 mg RU/g; 81.57 mg QE/g) and ethanol (109.13 mg RU/g; 80.99 mg QE/g) extracts. According to antioxidant tests, the IC₅₀ value of methanol extract was 11.86 µg/ml, the IC₅₀ value of water extract was 19.81 µg/ml, the IC₅₀ value of ethanol extract was 34.96 µg/ml, the IC₅₀ value of chloroform extract was 175.66 µg/ml and the hexane extract IC₅₀ value was found to be 420.44 µg/ml. This study is the first bioactivity study conducted on the endemic *S. purpurea* subsp. *leucodermis*.

KEYWORDS: *Salix purpurea* subsp. *leucodermis*, purple willow, biological activity, antioxidant capacity

İÇİNDEKİLER

Sayfa

ÖZET.....	i
ABSTRACT.....	ii
İÇİNDEKİLER.....	iii
ŞEKİL LİSTESİ.....	iv
TABLO LİSTESİ.....	v
SEMBOL LİSTESİ.....	vi
KISALTMALAR LİSTESİ.....	vii
ÖNSÖZ.....	viii
1. GİRİŞ.....	1
2. GENEL BİLGİLER.....	3
2.1 <i>Salix</i> Cinsinin Genel Özellikleri.....	3
2.2 <i>Salix</i> Türlerinin Yayılışı.....	4
2.3 <i>Salix</i> Cinsinin Farmokolojik ve Ekonomik Önemi.....	5
2.2.1 <i>Salix</i> Cinsinin Biyoaktivitesi.....	8
2.3 Çalışmanın Amacı.....	10
3. YÖNTEM.....	11
3.1 Bitki Materyalinin Toplanması.....	11
3.2 Bitki ekstraktlarının elde edilmesi.....	12
3.3 Total Fenolik Madde Miktarı Tayini.....	12
3.4 Total Flavonoid Miktarının Belirlenmesi.....	14
3.5 DPPH Serbest Radikal Giderme Aktivitesi.....	15
4. BULGULAR.....	17
4.1 Total Fenolik Madde Miktarı.....	17
SMP: Örnek numaraları, ORT: Ortalama, SE: Standart Hata, ABS: Absorbans değerleri, R ² : Değişkenlik Oranı (Denklemin Belirlenme Katsayısı).....	18
4.2 Total Flavonoid Miktarı.....	18
SMP: Örnek numaraları, ORT: Ortalama, SE: Standart Hata, ABS: Absorbans değerleri, R ² : Değişkenlik Oranı (Denklemin Belirlenme Katsayısı).....	20
4.3 DPPH Serbest Radikal Aktivitesi.....	20
5. SONUÇ VE ÖNERİLER.....	26
6. KAYNAKLAR.....	31
7. ÖZGEÇMİŞ.....	37

ŞEKİL LİSTESİ

Sayfa

Şekil 3.1 Tez çalışmasında kullanılan <i>S. purpurea</i> subsp. <i>leucodermis</i> taksonu	11
Şekil 4.1 Gallik asit kalibrasyon eğrisi	17
Şekil 4.2 Rutin hidrat kalibrasyon eğrisi	19
Şekil 4.3 Kuersetin kalibrasyon eğrisi	19
Şekil 4.4 Kuersetin inhibisyon eğrisi	21
Şekil 4.5 Metanol ekstraktı inhibisyon eğrisi	21
Şekil 4.6 Su ekstraktı inhibisyon eğrisi	22
Şekil 4.7 Etanol ekstraktı inhibisyon eğrisi	22
Şekil 4.8 Kloroform ekstraktı inhibisyon eğrisi.....	23
Şekil 4.9 <i>n</i> -hekzan ekstraktı inhibisyon eğrisi	23
Şekil 5.1 <i>S. purpurea</i> subsp. <i>leucodermis</i> yapraklarının farklı ekstraktlarındaki total fenolik madde miktarı (TPC), total flavonoid miktarı (TFC) ve DPPH antioksidan aktivitesi sonuçları	24

TABLO LİSTESİ

Sayfa

Tablo 3.1 Total fonolik madde miktarı tayini için hazırlanan tüpler ve içerikleri.	13
Tablo 3.2 Total flavonoid miktarı için hazırlanan tüpler ve içerikleri	14
Tablo 4.1 <i>S. purpurea</i> subsp. <i>leucodermis</i> yapraklarının farklı çözücülerden elde edilen total fenolik madde miktarları.....	18
Tablo 4.2 <i>S. purpurea</i> subsp. <i>leucodermis</i> yapraklarının farklı çözücülerden elde edilen total flavonoid miktarları	20
Tablo 4.3 <i>S. purpurea</i> subsp. <i>leucodermis</i> DPPH antioksidan testi sonuçları .	25

SEMBOL LİSTESİ

'	: Dakika
°	: Derece
“	: Saniye
°C	: Santigrat derece
%	: Yüzde

KISALTMALAR LİSTESİ

subsp.	: Alttür
FCR	: Folin-Ciocalteu reaktifi
GA	: Gallik asit
GAE	: Gallik asit eşdeğeri
g	: Gram
pH	: Hidrojen iyonu konsantrasyonu
DPPH	: 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl
CHCl₃	: Kloroform
MeOH	: Metanol
µg	: Mikrogram
µl	: Mikrolitre
mg	: Miligram
ml	: Mililitre
mm	: Milimetre
nm	: Nanometre
cm	: Santimetre
UV	: Ultraviyole
vb.	: Ve benzeri

ÖNSÖZ

Tez çalışmam boyunca bilgi ve tecrübelerinden faydalandığım her türlü konuda yardım ve desteklerini esirgemeyen, bana bu tez çalışmasını yapma olanağı veren, saygıdeğer hocam Prof. Dr. Gürkan SEMİZ'e teşekkürü borç bilirim.

Ayrıca çalışmamda beni destekleyen çalışma arkadaşlarım Yüksek Lisans Öğrencisi Nilüfer TÜRKOĞLU'na ve Arş. Gör. Batıkan GÜNAL'a; maddi ve manevi her türlü desteği gösteren, ilgi ve sevgilerini hiçbir zaman esirgemeyen değerli aileme teşekkürü bir borç bilirim.

Ezgi ALVAR

1. GİRİŞ

Yeryüzünde yaklaşık 500.000 bitki türünün bulunduğu tahmin edilmektedir (Borris 1996). Bunların sadece küçük bir yüzdesi insanlar ve diğer hayvan türleri tarafından besin maddesi olarak kullanılmaktadır. Tıbbi amaçlar için kullanılan bitki türleri de hesaba katıldığında, bu rakamın daha da arttığı düşünülmektedir (Cowan 1999). Bitkilerin tıbbi amaçlarla kullanımı, çok eski zamanlardan beri bilinmektedir. Türkiye dahil olmak üzere dünyanın çeşitli bölgelerinde, bitkiler yıllardır halk arasında çeşitli amaçlarla, örneğin çay, baharat veya tedavi amacıyla kullanılmaktadır (Kırbağ ve Zengin 2005; Toroğlu ve Çenet 2006). Dünya Sağlık Örgütü (WHO) tarafından yapılan bir araştırmaya göre, tedavi amaçlı kullanılan tıbbi bitki türlerinin sayısının yaklaşık 20.000 olduğu belirtilmektedir (İlçim ve diğ. 1998).

Türkiye, bitki çeşitliliği ve coğrafi konumu itibariyle çevresindeki pek çok ülkeden daha farklı bir pozisyondadır. Türkiye’de bulunan bitki türlerinin sayısı, Avrupa genelinde bulunan türlerin sayısına oldukça yakındır. Türkiye florasında her yıl yeni keşiflerle artan bitki taksonu sayısı (tür, alt tür ve varyete düzeyinde) yaklaşık olarak 12.000 civarındadır. Bu taksonların yaklaşık 3649’u (3’te 1 oranında) endemiktir (Özyavuz 2011). Türkiye, Avrupa-Sibirya, Akdeniz ve İran-Turan flora bölgelerinin ortaya çıktığı bir coğrafyada bulunması, Güney Avrupa’yla Güneybatı Asya floralarının arasında bir bağlantı oluşturması, pek çok cins ve seksiyonun içi bir farklılaşım ve orijin merkezi olması, ekolojik ve fitocoğrafik zenginliğiyle alakalı olarak tür endemizmi bakımından yüksek bir çeşitliliğine sahiptir (Avcı 1993; Toroğlu ve Çenet 2006).

Türkiye, zengin ve çeşitli bir bitki örtüsüne ev sahipliği yapan bir ülkedir. Coğrafi konumu sayesinde biyoçeşitliliğin yoğun olduğu bir bölgede bulunmaktadır. Türkiye'nin bitki florası, Akdeniz, Ege, Marmara, İç Anadolu, Doğu Anadolu ve Karadeniz gibi çeşitli iklim bölgelerine sahip olması sebebiyle oldukça geniştir. Ülkenin farklı bölgelerinde çok çeşitli bitki türleri bulunmaktadır. Türkiye'nin coğrafi yapısı, binlerce bitki türünü barındırmasına ve bu türlerin iklim bölgelerine ve yüksekliklere göre farklılık göstermesine olanak sağlamaktadır. Bu çeşitlilik, ekolojik dengenin korunması, biyolojik çeşitliliğin devam ettirilmesi ve ekonomik faaliyetler için büyük bir öneme sahiptir. Ayrıca, ülkenin zengin canlı çeşitliliği, Türkiye için

önemli bir avantajı temsil etmektedir. Bu çeşitlilik, ülkenin doğal kaynaklarını zenginleştirerek ekosistemlerin ve biyoçeşitliliğin sürdürülebilirliğini destekler (Avcı 1993).

Türkiye, Akdeniz, İran-Turan ve Avrupa-Sibiryaya bölgelerinin kesişim noktasında bulunduğu için çeşitli topoğrafik ve iklimsel özelliklere sahip olmasıyla dikkat çeker. Bu çeşitlilik, oldukça zengin bir bitki örtüsüne ev sahipliği yapmasını sağlar. Türkiye'nin barındırdığı yaklaşık dokuz bin bitki türünün üçte birinden fazlasının endemik olması, ülkeyi tıbbi bitkiler açısından önemli bir potansiyele sahip kılar (Güvenç 2003).

2. GENEL BİLGİLER

2.1 *Salix* Cinsinin Genel Özellikleri

Salicaceae familyasının *Salix* L., *Populus* L. ve *Chosenia* Nakai gibi öne çıkan üç önemli cinsi bulunmaktadır. Bu bitkiler genellikle kuzey ılıman bölgelerde yaygın olarak bulunurlar. Kışın yapraklarını döken hem böceklerle hem de rüzgarla tozlaşan ağaçlar veya çalı formundaki odunsu bitkilerdir (Anşin ve Özkan 1993; Argus 1997). Bu familya ve cinslere ait bitkiler genellikle kuzey ılıman kuşakta yaygın olarak görülen, yapraklarını kışın döken, ağaç veya çalı formunda odunsu bitkilerdir. Bu bitkilerin çoğu, tozlaşmayı böcekler ya da rüzgâr aracılığıyla gerçekleştirebilir (Akkemik 2018). Yaprakları genellikle sarmal, nadiren karşılıklı olarak dizilmiş olabilir. Basit yapraklara sahiptirler ve genellikle kulakçıklıdır. Yaprak kenarları tam, dişli veya nadiren düz olabilir. Yaprak damarları genellikle tüyümsü ya da el şeklindedir. Çiçekler tek cinsiyetlidir. Çiçekler, tek yıllık sürgünlerin yanında veya az sayıda tepe sürgünlerindeki tomurcukların ilkbaharda açılmasıyla meydana gelir. Birden fazla çiçekten oluşmuş başak kuruluşunda bulunan çiçekler tipiktir. Kedicik dik veya sarkık olabilir (Akkemik 2018). Meyveleri genellikle çok tohumlu bir kapsül içinde bulunur ve tohumlar kadife tüyleri andıran özelliklere sahiptir (Akman ve diğ. 2007). Bu bitkilerin çimlenme özellikleri hızla kaybolabilir ve çelikle kolayca üretilebilirler (Anşin ve Özkan 1993).

Türkiye'de doğal olarak bulunan iki cins olan *Populus* ve *Salix*'e ait türleri ayırt etmek için genel olarak şu özellikler öne çıkmaktadır: *Salix* cinsine ait tomurcuklar tek bir dış pullu olup brakteler tamdır, tozlaşma böcekler sayesinde gerçekleşir. *Populus* cinsinde ise tomurcuklar bir ya da birden fazla dış pullu olup, brakteler dişli veya saçaklıdır, tozlaşma rüzgârla gerçekleşir (Skvortsov ve Edmondson 1982).

Salix simpodial büyüme özelliği gösteren, yapraklarını döken ağaç, çalı veya nadiren sürünücü çalı görünümünde odunsu bitkilerdir. Tomurcuklar genellikle tek bir dış pul ile örtülüdür ve sürgüne tamamen yatmış durumda olabilirler; bazen yapışkan tüylü veya tüysüz olabilirler ve sürgünlerde sarmal veya bazı türlerde karşılıklı olarak dizilmişlerdir. Yapraklar sarmal (bazen karşılıklı) olarak yerleşmiş, şerit veya ters yumurta şeklinde, kenarları tam veya hafifçe dişli, nadiren oldukça keskin dişli

olabilir. Yaprak sapı kısa olabilir veya bulunmayabilir. Yaprak damarları genellikle tüyümsü, nadiren el biçimindedir. Yaprak yüzeyleri genellikle tüysüz olup, bazen özellikle alt yüzeyleri tüylü olabilir; genellikle kulakçıklar vardır ve çoğu zaman erken dökülür, bazen hiç bulunmazlar. Çiçekler tek cinsli, iki evcikli olup, tozlaşma çoğunlukla böcekler aracılığıyla gerçekleşir. Kedicikler yapraklardan önce veya yapraklarla birlikte görünür; eliptik, yumurta biçiminde veya uzun silindirik şekillere sahip olabilirler, dik veya sarkık olabilirler ve saplı veya sapsız olabilirler. Braktelerin kenarı tam ve genellikle tüylüdür. *Salix* çiçeklerinin tabanında, değişik biçimlerde bir çift önlü-arkalı bal bezi bulunur. Erkek çiçeklerin stamen sayısı en fazla 10 olabilir. Bunların filamentleri genellikle ayrık, bazen az veya çok birleşiktir. Her dişi çiçeğin tüylü bir brakte ve bunun tabanında iki karpelli tek gözlü bir yumurtalığı vardır. Yumurtalık genellikle belirgin bir saplıdır, stilus kısa, dallı ve tepeciklidir ve çok sayıda tohum taslağına sahiptir. Meyve durumunda, 2 kapakçıklı bir kapsül bulunur; tüysüz veya tüylü olabilir, tohumlar küçük, kahverengi veya koyu yeşil renkte olabilir (Skvortsov ve Edmondson 1982; Salman 2019).

2.2 *Salix* Türlerinin Yayılışı

Salix, dünya çapında 500'den fazla türüyle yaygın olarak bulunan zengin bir cinstir. Türkiye'de ise 4'ü endemik olmak üzere 34 tür, 4 hibrit ve 39 taksonla temsil edilmektedir (Güner ve diğ. 2012; Eminağaoğlu ve diğ. 2014; Acar ve diğ. 2020). Dünya genelinde ve ülkemizde en fazla türü bulunan ağaç cinslerindedir (Çağlar 2003). *Salix* cinsi ve türleri Avrupa-Sibirya fitocoğrafik bölgesine aittir. *Salix alba* L. dünya genelinde İspanya'dan başlayarak Sibirya'ya kadar uzanan bir yayılış alanına sahiptir. Bu geniş yayılış alanının güney kesimlerinde, özellikle Türkiye, Kıbrıs, Lübnan, İsrail'in kuzeyi, Irak'ın kuzeydoğusu, Kafkaslar ve İran'ın kuzeybatı kesimlerinde oldukça yaygındır. İnsanlar farklı amaçlarla söğüt ağaçlarını oldukça fazla bölgeye dikmişlerdir, bu durum söğüdün doğal yayılış alanının sınırlarını belirlemeyi zorlaştırmaktadır. *S. alba* Türkiye'deki farklı iklim özelliklerine sahip coğrafi bölgelerin çoğunda geniş bir yayılış gösterir (Avcı 1999).

Salix cinsine ait bitkiler genellikle su ve dere kenarlarında, düzlüklerde yetişirler. Işığa yüksek bir ihtiyaçları vardır ve genellikle serin, nemli toprakları tercih

ederler. Bununla birlikte, bazı türleri kurak bölgelerde de yetişebilirler. Hızlı büyürler ve donlara karşı dirençlidirler. Odunları açık renklidir, hafif, kolayca yarılabılır ve esnektir. Bu nedenle keresteleri kâğıt hamuru, kutu, kibrit ve dalları ise sepet yapımı gibi farklı amaçlarla kullanılır (Seçmen ve diğ. 1995; Salman 2019). *Salix purpurea* L. subsp. *leucodermis* Yalt. (Erguvani Söğüt), Türkiye'nin güneybatısında, özellikle Sandras Dağı-Ulucadere Vadisi'nde yayılmış durumdadır. *Salix purpurea* subsp. *leucodermis*, *S. purpurea* türünün ülkemizdeki tek alt türüdür ve endemiktir. Genellikle karaçam ağaçlarının baskın olduğu, kuru ormanlık alanlarda 1200-1400 metrelik yüksekliklerde oldukça geniş topluluklar oluşturur (Avcı 1999). Endemik olan taksonumuzun tek yayılış noktası Sandras Dağı'ndaki üç farklı lokasyondaki küçük populasyonlar şeklindedir. *Purpurea* latince 'mor' anlamına gelen *purpuro* kelimesi ile 'renkli' anlamına gelen *-ea* son ekinin birleşiminden türetilmiştir.

2.3 *Salix* Cinsinin Farmakolojik ve Ekonomik Önemi

Tıbbi ve aromatik bitkiler, sağlığı korumak, hastalıkları önlemek veya tedavi etmek amacıyla kullanılan bitkilerdir. Tıbbi bitkiler, ilaç, gıda, kozmetik, kişisel bakım, tütsü veya dini törenlerde kullanılmak üzere tıbbi amaçlar için kullanılırken, aromatik bitkiler genellikle hoş kokuları veya tatlarıyla bilinir ve bu nedenle birçok alanda kullanılır (Kızıloğlu ve diğ. 2017). Gelişmiş ülkelerde geleneksel tıp yöntemlerinin bir parçası olarak bitkisel ilaçların kullanımı giderek artmaktadır (Koçtürk ve diğ. 2009). Bugün, bitkiler ve bitkisel ilaç hammaddeleri, reçeteli ilaçların yaklaşık %25'ini oluşturmaktadır (Kırbağ ve Zengin 2005).

Salicaceae familyasının fitokimyası, 19. yüzyıldan bu yana başlangıçta farmasötik amaçlarla incelenmiş ve daha sonra ekolojik nedenlerle sistemli bir şekilde araştırılmıştır. Bu çalışmaların sonucunda, fenolik bileşenlerden biri olan salisilik asit üzerine birçok çalışma gerçekleştirilmiştir (Boeckler ve diğ. 2011). Salisilik asit ilk kez *Salix* bitkisinden glikozit formunda izole edilmiştir. Salisilik asit, diğer fenolik bileşikler gibi bitki büyümesini düzenlemede ve bitkinin gelişimiyle birlikte diğer organizmalarla etkileşimde rol oynadığı bilinmektedir. Bitkiler, savunma mekanizmaları ve diğer süreçlerde aktif bir sinyal molekülü olarak salisilik asidi kullanırlar. Patojenlere karşı savunmada rol aldığı gibi, fitohormonların üretiminde de

katkısı olduğu belirtilmiştir (Davies 2004). Salisilik asit, bitkilerin tüm kısımlarında bulunabilen bir bileşiktir. Salisilik asit etilen biyosentezini engelleyerek ve yaşlanmayı geciktirerek etki gösterir (Özeker 2005). Ayrıca salisilik asidin, tohum çimlenmesi, fidelerin oluşumu, hücre büyümesi, solunum, stomaların kapanması, yaşlanmaya bağlı gen ekspresyonu, baklagillerde nodülasyon ve meyve verimini etkilediği bilinmektedir (Yusuf ve diğ. 2013).

Salix, tıbbi alanda farklı amaçlarla uzun bir geçmişe sahiptir. Babililer, söğüt bitkisinin özlerini ateş, ağrı ve iltihapları tedavi etmek için kullanmışlardır. Sümerler, 4000 yıl öncesine dayanan bir kil tabletinde ağrı için tıbbi bir reçete yazmanın bilinen ilk uygarlığı olarak öne çıkmaktadır. Ayrıca, Mezopotamya'daki Hammurabi Kanunu (M.Ö. 1750), insanların hastalığa yakalanma sürecinin uzun bir farmakolojik geçmişe yol açtığına dair tıbbi bir tarih sunar (Wells 2003). *Salix* türleri kurumuş dallarının kabuğunda yaklaşık %15 oranında tanen içerir. Bu tanenler, kuvvet verici, yatıştırıcı, peklilik yapıcı, antiromatizmal ve ateş düşürücü etkilere sahiptir (Baytop 1984). *Salix* türleri farklı amaçlarla da kullanılmaktadır. Bunlar arasında erozyonun ve rüzgârın engellenmesi amaçlı dikimler, su bentleri ve hendeklerin tahkim edilmesi, sepet yapımı, çit inşası, yakacak hammaddesi, selüloz ve kâğıt üretimi, küçük el aletleri yapımı ve hayvan yemi olarak gösterilebilir. Ayrıca, biyokütle üretimi ve enerji amaçlı tesislerde kullanılmak üzere, hızlı büyümesi, yüksek sürgün verme kapasitesi ve kolaylıkla vejetatif olarak üretilmesi gibi özellikleri nedeniyle enerji plantasyonlarında uygun türler olarak kabul edilir (Ager ve diğ. 1990).

Asırlar önce Amerikan yerlileri ve eski Yunanlılar, birbirlerinden bağımsız olarak söğüt bitkisinin kabuk ve yapraklarının ağrılara ve ateşe iyi geldiğini keşfetmişlerdir. Söğüt kabuğunu ilaç olarak tanımlayan en eski belgelerden biri, M.Ö. 2000'de yazılan Sümer tabletleridir. Hititler de söğüt kabuğunu ilaç olarak kullanmışlardır. Mısır'da M.Ö. 1550'lerde yazılan Eber Papirüsü'nde de söğüt kabuğunun ilaç olarak önerildiği bilinmektedir. M.Ö. 460 yılında Kos Adası'nda doğan Hipokrat, eserlerinde söğüt kabuğunun ateş düşürücü ve ağrı kesici etkilerini betimlemiştir. Romalı filozof Pliny the Elder (M.S. 23-79), kitaplarında söğüdün ağrı kesici özellikte olduğunu belirtmektedir. Söğüt, Abbasiler döneminde de ilaç olarak kullanılmıştır, ancak Orta Çağ'da bilimden uzaklaşan Avrupalılar bu bilgileri uzun süre

kullanmamıştır. *Salix* bitkisinin ilaç özelliği yüzyıllar sonra E. Stone tarafından yeniden keşfedilmiştir.

Söğüt kabuğundaki ağrı kesici etken maddeler, salisilik asit ve salisindir. Salisilik asit antiseptik olup bazı gıdalara koruyucu olarak katılmaktadır (Mahdi 2010). Salisilatlar (salisilik asit ve asetilsalisilik asit) içeren *Salix* türleri, uzun yıllardır analjezik, antipiretik ve anti inflamatuvar özellikleri nedeniyle kullanılmaktadır. Aspirinin keşfinden sonra *Salix* türlerine olan ilgi artmıştır. Yapılan araştırmalar, Türkiye'de bulunan *Salix* türleri (*Salix purpurea* L., *Salix alba* Thunb., *Salix amplexicaulis* Bory & Chaub., *Salix babylonica* L., *Salix eleagnos* Scop., *Salix fragilis* Host, *Salix triandra* L., *Salix caprea* Boiss. & Buhse, *Salix aegyptiaca* Thunb.), antioksidan ve anti-inflamatuvar etkileriyle potansiyel göstermiştir. Türkiye'deki çeşitlilik göz önüne alındığında, Türkiye'deki *Salix* türlerinin hem tıbbi hem de gıda ürünleri elde etme ve oksidatif stresle ilişkili hastalıkları önleme potansiyeline sahip olduğu görülmektedir. Salisilik asit ve diğer salisilatlar, çeşitli meyve ve sebzelerde doğal olarak bulunduğundan, bu bileşenlerin tüketimi, günlük beslenmede kolorektal kanser riskini önemli ölçüde azaltabilir (Avcı 1999).

Tarihsel olarak *Salix* kabuğu, Akdeniz bölgesi ve ardından Çin, Avrupa, Kuzey Amerika, Güney Amerika ve Karayipler dahil olmak üzere 2000 yılı aşkın bir süredir kullanılmaktadır. İngiltere'de, *Salix* kabuğu ekstraktının ağrı kesici ve ateş düşürücü olarak kullanıldığı 1763 yılına dair raporlar bulunmaktadır (Highfield ve Kemper 1999). 'Cortex Salicis', *Salix* kabuğundan elde edilen ve uzun süredir halk hekimliğinde ve fitoterapide kullanılan bir bileşendir. Bu bileşen, salisin adı verilen aspirinin öncü maddesi olan salisilik asit molekülüne dönüştüğünde etki gösterir (Baytop 1999). Salisilatlar (salisilik asit ve asetilsalisilik asit), analjezik, antipiretik ve anti inflamatuvar özelliklerinden dolayı yıllardır kullanılmaktadır (Enayat ve Banerjee 2009). Mekanizmaları, COX-1 (siklooksijenaz-1) ve COX-2'yi (siklooksijenaz-2) inhibe ederek prostaglandin sentezini engellemektir. Uzun süre asetilsalisilik asit (aspirin) kullanan hastaların, kalp-damar hastalıklarına ve kolorektal kansere yakalanma riskinin daha düşük olduğu gözlemlenmiştir (Enayat ve Banerjee 2009).

Salix, günümüzde kanser araştırmalarında kullanılmaktadır (Mahdi ve diğ. 2006, Manson ve diğ. 2010). Amerika Birleşik Devletleri'nde düşük dozda aspirin kullanımının kardiyovasküler hastalıklardan korunmada olumlu katkı sağladığı

belirtilmektedir (Manson ve diğ. 2010). Bu nedenle, *Salix* cinsinin tıbbi ve ekonomik değeri, biyoaktivite ve fitokimya çalışmaları için avantajlı ve uygun bir aday olarak ön plana çıkmaktadır. *Salix* türlerinin içerdiği salisilatlar, özellikle aspirinin keşfinden sonra bu cinsin ilgi odağı haline gelmiştir. Bununla birlikte, *Salix* cinsinin farmakolojik değeri yalnızca kabuğundaki salisin miktarından gelmemektedir. Ayrıca, *Salix* kabuğundaki antioksidan aktif bileşenler olan polifenol ve flavonoidlerin, anti-inflamatuar aktiviteye katkıda bulunduğu düşünülmektedir (Nahrstedt ve diğ. 2007; Freischmidt ve diğ. 2015; Shara ve Stohs 2015).

2.2.1 *Salix* Cinsinin Biyoaktivitesi

Sonboli ve diğ. (2010), İran'da yetiştirilen *Salix aegyptiaca*'nın erkek çiçek salkımından elde edilen metanolik ekstraktların *in vitro* antioksidan aktivitelerini ve toplam fenolik içeriklerini incelemek üzerine bir çalışma gerçekleştirmişlerdir. Metanolik ekstrakt ve bunun su, butanol ve kloroform içeren üç fraksiyonu hazırlanmış ve ardından antioksidan aktiviteleri ve toplam fenolik içerikleri sırasıyla DPPH serbest radikal temizleme testi ve Folin-Ciocalteu yöntemiyle değerlendirilmiştir. Metanol ekstraktının farklı fraksiyonları arasında bütanol, 27,7 µg/mL IC50 değeri ve 313,8 ppm toplam fenol ile en fazla antioksidan aktiviteyi göstermiştir. Elde ettikleri sonuçlara göre *S. aegyptiaca*'nın güçlü antioksidan aktivitesi, onun gıda endüstrilerinde ve diğer farmasötik preparatlarda doğal bir antioksidan olarak olası kullanılabileceğini belirtmişlerdir.

Karimi ve diğ. (2011), *Salix aegyptiaca* türünün yaprak, kabuk ve çiçeklerini siklohekzan (polar olmayan), bütanol, etanol ve su (polar) ile ekstrakte etmiş ve bu ekstraktların antioksidan kapasiteleri ile toplam fenol ve flavonoid miktarlarını araştırmışlardır. Yaptıkları çalışmada en yüksek antioksidan aktivitenin (DPPH radikal aktivitesi inhibisyonu için 19 µg/mL IC50), toplam fenolik içeriğin (212 mg GAE/g kurutulmuş ekstrakt) ve toplam flavonoidin (479 mg CE/g kurutulmuş ekstrakt) kabukların etanol ekstraktlarında olduğunu gözlemlemişlerdir. Yaprak ekstraktlarından elde ettikleri sonuçlar ise şu şekildedir: Bütanol ekstraktında Sulima ve diğ. (2017) tarafından yapılan çalışma ile birçok ülkede yaygın olarak listelenen *Salix purpurea* genotiplerinin kabuklarındaki major salisilik glikozitlerin kimyasal

bileşimi ve içeriğinin farmasötik işleme ve yaratıcı yetiştirmeye uygulanabilirliğini araştırmışlardır. Doğal lokasyonlardan seçilen doksan bir *S. purpurea* genotipinden alınan ağaç kabuğu ekstraktlarında sekonder metabolitleri analiz etmişlerdir. Analiz ettikleri tüm genotiplerin kabuklarında salisilik glikozitler, flavonlar ve flavan-3-ol içeren bileşikler tespit etmişlerdir. Picein ve populin içeren genotipler %10 oranında bulunmuştur. Mor *Salix* kabuklarının glikozit içeriği (salicin ve salicortin) %3,04 ile %10,96 arasında değişim göstermiştir, bu durum *S. purpurea* genotipleri arasında önemli bir varyasyona işaret etmektedir. Araştırmacılar, kontrollü koşullarda yetiştirilen ve istenen özelliklere sahip olan çeşitlerin ilaç endüstrisi için yüksek kaliteli bitkisel materyaller sağlayabileceğini belirtmişlerdir.

Sulaiman ve diğ. (2013), gerçekleştirdikleri çalışma ile *Salix alba* kabuğunun sıcak etanolik ekstraktının toplam fenolik içeriği, antioksidan, antimikrobiyal ve sitotoksik aktivitelerini araştırmışlardır. Ekstraktın antioksidan özellikleri ve toplam fenolik içeriği sırasıyla DPPH serbest radikal temizleme ve Folin Ciocalteu yöntemleriyle değerlendirilmiştir. Elde edilen sonuçlara göre *S. alba* kabuğunun etanolik ekstraktındaki fenolik içerik konsantrasyonunun $162,00 \pm 14,90$ mg GAE/g olduğunu göstermişlerdir. *S. alba* kabuğu ekstraktının farklı konsantrasyonlarının serbest radikal temizleme aktivitelerine göre DPPH radikallerinin inhibisyon modelinin, *S. alba* ekstraktı için konsantrasyona bağlı olduğu rapor edilmiştir. Ayrıca *S. alba* ekstraktının antimikrobiyal ve sitotoksik aktivitelerinin antioksidan potansiyelleri ile pozitif ilişkili olduğu görülmüştür.

El-Sayed ve diğ. (2015) gerçekleştirdikleri çalışmada *Salix mucronata* Thunb. yaprak ekstraktlarının fitokimyasal bileşenlerini ve bunların antioksidan aktivitelerini belirlemeyi amaçlamışlardır. Çalışmada kurutulmuş yaprak örnekleri MeOH, MeOH (%85), MeOH (%70) ve saf su ile ekstrakte edilmiştir. Toplam fenolik ve flavonoid içerikleri Folin-Ciocalteu ve alüminyum klorür analizleri ile ölçülmüştür. Test edilen ekstraktların antioksidan potansiyeli DPPH, ABTS ve toplam antioksidan kapasite (TAC) analizleri kullanılarak değerlendirilmiştir. Sonuçlar, MeOH (%85) ekstraktının yüksek toplam fenolik ve flavonoid içeriği sergilediğini gösterdi (TPC= $131,39 \pm 2,49$ mgGAE/g harici ve TFC= $67,69 \pm 1,47$ mg RE/g harici). Ayrıca MeOH (%85) ekstraktı yüksek antioksidan aktivite göstermiştir [DPPH SC50= $98,76 \pm 0,46$ (µg/ml), ABTS= $45,83 \pm 0,32$ mm Trolox® eşdeğeri/100 gm ekstrakt ve TAC= $199,18 \pm$

2,19mg askorbik asit eşdeğeri/g ekstrakt]. Bu çalışma sonucunda yazarlar, *S. mucronata* yaprağının iyi bir doğal antioksidan kaynağı olduğunu göstermiştir. Ayrıca toplam fenolik içerik ile antioksidan aktivite arasında yüksek bir korelasyon olduğunu vurgulamışlardır.

Utari ve diğ. (2020) gerçekleştirdikleri çalışmada Endonezya'dan toplanmış *S. tetrasperma* Roxb. türünün kabuk ve yapraklarının etil asetat ekstraktından sekonder metabolit bileşiklerini izole etmeyi ve çeşitli kısımlarındaki *n*-hekzan, etil asetat ve metanol ekstraktlarının antioksidan aktivitesini araştırmayı amaçlamışlardır. Tüm ekstraktlar arasında kabuğun metanol ekstraktı, 6,85 µg/mL IC50 değeriyle en yüksek antioksidan aktiviteye sahip olduğu belirlenmiştir. Ayrıca yaprakların metanol ve etil asetat ekstraktlarının IC50 değeri sırasıyla 27,43 µg/mL ve 142,18 µg/mL olarak rapor edilmiştir. Gerçekleştirdikleri araştırma sonucunda, *S. tetrasperma* kabuğu ve yapraklarının metanol ve etil asetat ekstraktında fenolik ve flavonoid varlığının yüksek antioksidan aktiviteye katkıda bulunabileceğini göstermiş ve bu nedenle bu bitkinin iyi bir doğal antioksidan kaynağı olarak değerlendirilebileceği öngörülmüştür.

2.3 Çalışmanın Amacı

Salix, dünyanın çeşitli bölgelerinde halk sağlığında yaygın olarak kullanıldığından dolayı endüstriyel olarak önemli bir grubu oluşturur (Desborough ve Keeling 2017). *Salix* bitkisinde, polifenoller ve flavonoidler gibi antioksidan etken maddeler bulunmaktadır. Özellikle *Salix* kabuğunun, anti inflamatuvar aktiviteye katkıda bulunduğu bilinmektedir (Shara ve Stohs 2015). Bu nedenle, *Salix* cinsinin farmakolojik etkileri, özellikle inflamasyonu ve antioksidan aktiviteyi anlamak, inflamasyon süreçlerini değerlendirmek için büyük önem taşımaktadır.

Bu tez çalışmasının amacı, Denizli ilinde yayılış gösteren lokal endemik *Salix purpurea* subsp. *leucodermis* taksonunun toplam flavonoid ve toplam fenolik madde miktarının belirlenmesi ve antioksidan kapasitesi test edilmesidir. Bu takson üzerinde literatürde henüz herhangi bir biyolojik aktivite çalışmasının bulunmaması, bu tezin özgün değerini oluşturmuştur. Elde edilen sonuçların potansiyel ilaç hammaddelerinin belirlenmesi ile endüstriyel anlamda ekonomik bir öneme sahip olabileceği düşünülmüştür.

3. YÖNTEM

3.1 Bitki Materyalinin Toplanması

Çalışma materyalini oluşturan *Salix purpurea* subsp. *leucodermis* yaprakları 06.07.2022 tarihinde Denizli, Beyağaç, Sandras Dağı, Kartal Gölü-Topuklu Yaylası yolundaki doğal popülasyonlarından toplanmıştır (Şekil 3.1).



Şekil 3.1 *S. purpurea* subsp. *leucodermis*, **A.** Habitusu, **B.** Yaprakları, **C.** Dişi çiçek durumu (Foto: G. Semiz)

Toplanan örneklerin bir kısmı herbaryum materyali halinde getirilerek Pamukkale Üniversitesi, Fen Fakültesi, Biyoloji Bölümü, Kimyasal Ekoloji Laboratuvarı herbaryumunda GSE 2491 toplayıcı numarası ile muhafaza edilmektedir. Tez çalışmasında kullanılacak örnekler ise serin ve gölgeli bir ortamda kurutulmuş, otomatik havan kullanılarak öğütülmüştür.

3.2 Bitki ekstraktlarının elde edilmesi

S. purpurea subsp. *leucodermis* yaprak örneklerinin ekstraksiyonu polaritesi farklı çözücüler [*n*-hekzan (Sigma-Aldrich, CAS No: 110-54-3), kloroform (Merck, CAS No: 67-66-3), etanol (Merck, CAS No: 64-17-5), metanol (Merck, CAS No: 67-56-1), distile su] kullanılarak elde edilmiştir. Serin ve kuru bir ortamda kurutulan yaprak örnekleri toz haline getirilmiştir. Toz haline getirilen yaprak örnekleri (10 gr.) 250 ml'lik bir erlenmayer içine alınmış ve üstüne 100 ml çözücü eklenmiştir. Örnekler sıcak su banyosunda 50 °C'de 24 saat bekletilmiştir. İnkübasyon sonunda çözücü, kaba filtre kağıdı yardımıyla süzümüştür. 250 ml'lik erlen içinde kalan bitki örnekleri üzerine tekrar çözücü eklenmiştir. Bu işlem üç kez tekrar edilmiştir.

Elde edilen su ekstraktları liyafilizatör (LABCONCO) ile, diğer çözücülerin ekstraktları ise rotary evaporatör (ISOLAB) ile kurutulmuştur. Elde edilen kuru ekstraktlar ependorf tüpler içine aktarılmış ve diğer aşamalarda çalışmalara kadar +4°C'de muhafaza edilmiştir.

3.3 Total Fenolik Madde Miktarı Tayini

S. purpurea subsp. *leucodermis* yapraklarından farklı çözücülerle elde edilen ekstraktlar içindeki total fenolik madde miktarları, Folin-Ciocalteu (Sigma-Aldrich, F9252) reaktifi kullanılarak Özgün-Acar ve diğ. (2022) tarafından kullanılan yöntemin modifiye edilmesiyle tayin edilmiştir. Çalışmada standart fenolik bileşik olarak gallik asit (Merck, CAS No: 149-91-7) kullanılmıştır. Gallik asit kalibrasyon eğrisi oluşturmak için çeşitli konsantrasyonlarda (25-50-100-150-250 µg/ml) gallik asit çözeltisi hazırlanmıştır. Çözeltiler hazırlanırken gallik asit metanol kullanılarak çözülmüştür. Rotary evaporatör ve liyafilizatör ile kurutulan ve +4 °C'de tutulan kuru ekstraktlar örneklerin son konsantrasyonu 1 mg/ml olacak şekilde kendi çözücüsü ile çözülmüştür. Örnekler 3 tekrarlı çalışılmıştır. Çalışmada kullanılan Folin-Ciocalteu reaktifi %10 konsantrasyonda olacak şekilde su ile seyreltilmiştir. Son olarak %7,5 sodyum bikarbonat çözeltisi (NaHCO₃, Sigma-Aldrich, S8761) hazırlanmış ve deney tüplerinde Tablo 3.1'de verilen karışımlar oluşturulmuştur.

Tablo 3.1 Total fenolik madde miktarı tayini için hazırlanan tüpler ve içerikleri.

	Solvent (0,5 ml)	Ekstrakt (1mg/ml) (0,5 ml)	Standart (0,5 ml)	F-C Reaktifi (%10) (2,5 ml)	NaHCO₃ (%7,5) (2,5 ml)
Kör	+	-	-	+	+
Std 1 (25 µg/ml)	-	-	+	+	+
Std 2 (50 µg/ml)	-	-	+	+	+
Std 3 (100 µg/ml)	-	-	+	+	+
Std 4 (150 µg/ml)	-	-	+	+	+
Std 5 (250 µg/ml)	-	-	+	+	+
Örnek 1	-	+	-	+	+
Örnek 1'	-	+	-	+	+
Örnek 1''	-	+	-	+	+

Tabloda verilen çözeltiler hazırlandıktan sonra vortekslenmiş ve 45 °C'de 15 dakika inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonunda tüm örnekler köre karşı 765 nm'de spektrofotometre kullanılarak okunmuştur. Örneklerin içindeki total fenolik madde miktarı, Microsoft Excel'de gallik asit kalibrasyon eğrisinden elde edilen eğim formülü ve aşağıda verilen formül kullanılarak mgGAE/g cinsinden hesaplanmıştır.

$$C = \frac{c \times V}{m}$$

Formülde yer alan:

C: kuru ekstrakt içinde bulunan mg GAE/g cinsinden total fenolik madde miktarı;

c: kalibrasyon eğrisi kullanılarak elde edilen mg/ml cinsinden fenolik madde miktarı;

V: ml cinsinden ekstrakt hacmi;

m: g cinsinden ekstrakt kütlesi olarak tanımlanır.

3.4 Total Flavonoid Miktarının Belirlenmesi

S. purpurea subsp. *leucodermis* yapraklarından farklı çözücülerle elde edilen ekstraktlar içindeki total flavonoid madde miktarları, Özgün-Acar ve diğ. (2022) tarafından kullanılan yöntemin modifiye edilmesiyle belirlenmiştir. Çalışmada standart flavonoid olarak rutin hidrat (Merck, CAS No: 153-18-4) ve kuersetin (Sigma-Aldrich, CAS No: 117-39-5) kullanılmıştır. Standartların kalibrasyon eğrisini oluşturmak için çeşitli konsantrasyonlarda rutin hidrat (25-50-75-100-150 µg/ml) ve kuersetin (5-10-25-50-75-100 µg/ml) çözeltileri hazırlanmıştır. Çözeltiler hazırlanırken standartlar metanol kullanılarak çözülmüştür. Rotary evaporatör ve liyafilizatör ile kurutulan ve +4 °C’de tutulan kuru ekstraktlar, örneklerin son konsantrasyonu 1 mg/ml olacak şekilde kendi çözücüsü ile çözülmüştür. Örnekler 3 tekrarlı çalışılmıştır. Çalışmada kullanılan Alimünyum Klorür metodu kullanılarak (Zhishen ve diğ. 1999). (AlCl₃, Merck, CAS No: 7446-70-0) metanol ile çözülmüş ve deney tüplerinde Tablo 3.2’de verilen karışımlar oluşturulmuştur.

Tablo 3.2 Total flavonoid miktarı için hazırlanan tüpler ve içerikleri

	<i>Solvent</i> (1 ml)	<i>Ekstrakt</i> (1mg/ml) (1 ml)	<i>Standart</i> (1 ml)	<i>AlCl₃</i> (%2) (1 ml)
Kör	+	-	-	+
Std 1	-	-	+	+
Std 2	-	-	+	+
Std 3	-	-	+	+
Std 4	-	-	+	+
Std 5	-	-	+	+
Örnek 1	-	+	-	+
Örnek 1’	-	+	-	+
Örnek 1’’	-	+	-	+

Tabloda yer alan çözeltiler hazırlandıktan sonra vortekslenmiş ve oda sıcaklığında 1 saat inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonunda tüm örnekler köre karşı 415 nm’de spektrofotometrik olarak okunmuştur. Örneklerin içindeki total flavonoid madde miktarı, Microsoft Excel’de rutin hidrat ve kuersetin kalibrasyon eğrisinden elde edilen eğim formülleri ve aşağıda verilen formül kullanılarak mg RU/g ve mg QE/g cinsinden hesaplanmıştır.

$$C = \frac{c \times V}{m}$$

Formülde yer alan:

C: kuru ekstrakt içinde bulunan mg GAE/g cinsinden total fenolik madde miktarı;

c: kalibrasyon eğrisi kullanılarak elde edilen mg/ml cinsinden flavonoid miktarı;

V: ml cinsinden ekstrakt hacmi;

m: g cinsinden ekstrakt kütlesi olarak tanımlanır.

3.5 DPPH Serbest Radikal Giderme Aktivitesi

S. purpurea subsp. *leucodermis* yapraklarının antioksidan aktivitesi DPPH (2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl, Sigma-Aldrich, CAS No: 1898-66-4) kullanılarak belirlenmiştir. Çalışmada kuersetin pozitif kontrol olarak kullanılmıştır. Her bir kuru ekstrakt ve kuersetin farklı konsantrasyonlarda metanol ile çözülmüş ve sonikatör kullanılarak homojen hale getirilmiştir. Son konsantrasyonları metanol ekstraktı için 2,5-5-10-12,5-25 µg/ml, etanol ekstraktı için 2,5-5-12,5-62,5-75-87,5 µg/ml, kloroform ekstraktı için 12,5-25-37,5-50-62,5-87,5-100 µg/ml, n-hekzan ekstraktı için 5-12,5-25-37,5-50-125-250-375-500 µg/ml, su ekstraktı için 2,5-5-10-12,5-25-50 µg/ml ve kuersetin için 0,125-0,25-0,5-1-2-4 µg/ml olacak şekilde örnekler hazırlanmıştır. DPPH konsantrasyonu %0,004 olacak şekilde metanol kullanılarak çözülmüştür. DPPH çözeltisi karanlık ortamda ışıktan korunacak şekilde her çalışmada taze olarak hazırlanmıştır. Çalışma materyalleri hazırlanırken yukarıda hazırlanan konsantrasyonlardaki çözeltilerden 1 ml kullanılmış ve üstüne 1 ml DPPH eklenmiştir. Çalışma üç tekrarlı gerçekleştirilmiştir. Çalışmada kör olarak metanol, kontrol olarak metanol (1 ml)-DPPH (1 ml) karışımı kullanılmıştır. Tüm tüpler hazırlandıktan sonra 30 °C'de, karanlıkta, 30 dakika inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonrasında tüm örnekler köre karşı 517 nm'de spektrofotometrik olarak okunmuştur. Elde edilen veriler Microsoft Excel kullanılarak grafiklendirilmiş ve aşağıda yer alan formül kullanılarak % inhibisyonları hesaplanmıştır. Grafiklerin eğim formülü kullanılarak her bir ekstraktın ve kuersetinin IC50 değerleri hesaplanmıştır.

$$\text{İnhibisyon}(\%) = 100 \times \frac{A_{\text{kontrol}} - A_{\text{örnek}}}{A_{\text{kontrol}}}$$

Formülde yer alan:

A_{kontrol}: Kontrolün (metanol-DPPH) absorbansı

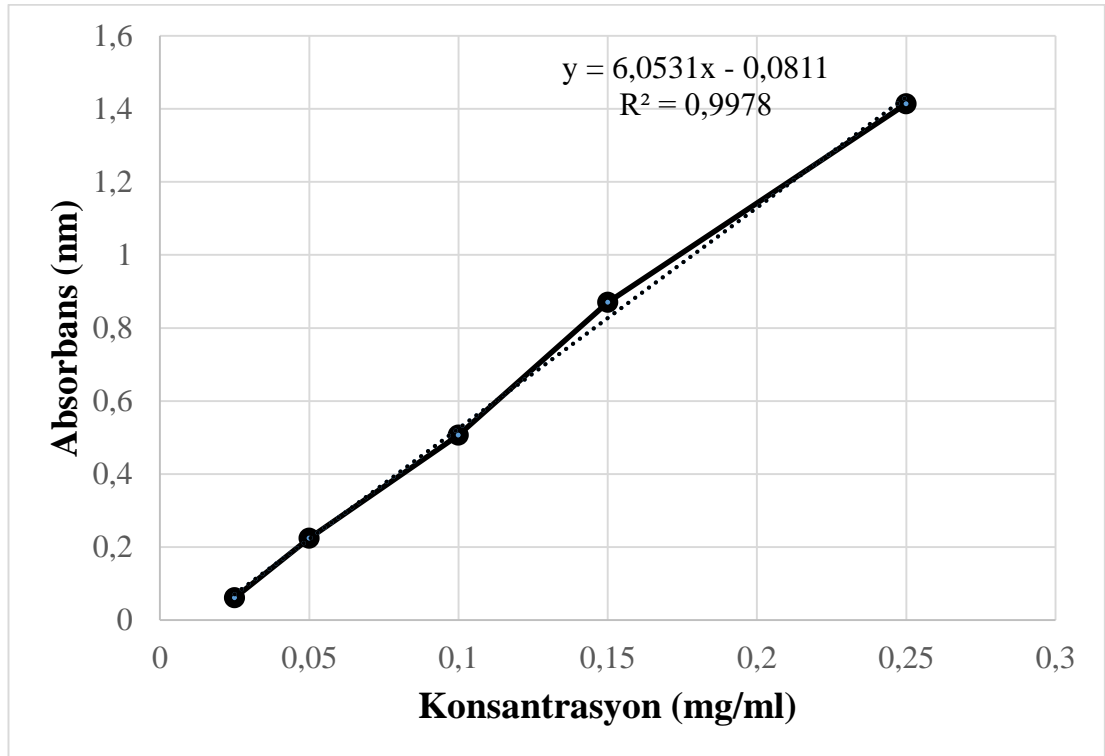
A_{örnek}: Örneğin absorbansı olarak tanımlanır.

4. BULGULAR

Bu çalışmada Denizli sınırları içinde yayılış gösteren ve ülkemiz için endemik bir takson olan *S. purpurea* subsp. *leucodermis* türünün toplam fenolik içeriği, toplam flavonoid miktarı ve antioksidan kapasitesi belirlenmeye çalışılmıştır.

4.1 Total Fenolik Madde Miktarı

Folin-Ciocalteu reaktifi kullanılarak gerçekleştirilen total fenolik madde miktarı tayini gallik asit eğrisi (Şekil 4.1) kullanılarak belirlenmiştir. Grafiğin eğim formülü $y=6,0531x-0,0811$ olarak hesaplanırken R^2 değeri 0,9978 olarak hesaplanmıştır. Çalışmada elde edilen veriler Tablo 4.1’de özetlenmiştir. Bu sonuçlara göre metanol ekstraktının total fenolik madde miktarı $183,12 \pm 29,12$ mg GAE/g, etanol ekstraktının total fenolik madde miktarı $223,54 \pm 2,54$ mg GAE/g, n-hekzan ekstraktının total fenolik madde miktarı $27,06 \pm 2,77$ mg GAE/g, kloroform ekstraktının total fenolik madde miktarı $45,78 \pm 4,01$ mg GAE/g ve su ekstraktının total fenolik madde miktarı $31,24 \pm 0,08$ mg GAE/g olarak bulunmuştur.



Şekil 4.1 Gallik asit kalibrasyon eğrisi

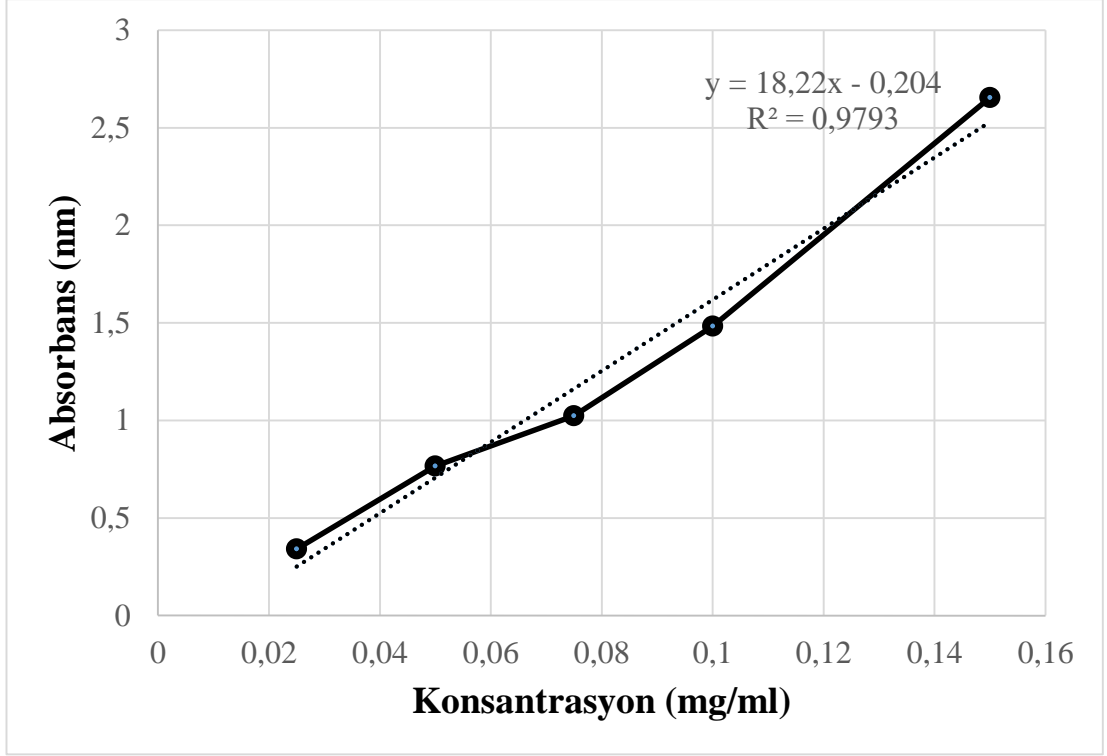
Tablo 4.1 *S. purpurea* subsp. *leucodermis* yapraklarının farklı çözücülerden elde edilen total fenolik madde miktarları (mg GAE/g)

ÇÖZÜCÜ	FORMÜL	R ²	SMP1	SMP2	SMP3	ORT.	SE	ABS1	ABS2	ABS3
Metanol	$y=6,0531x-0,0811$	0,9978	236,59	115,50	197,27	183,11	29,12	1,351	0,618	1,113
Etanol			228,66	217,92	224,04	223,54	2,54	1,303	1,238	1,275
<i>n</i> -hekzan			21,329	26,78	33,06	27,06	2,77	0,048	0,081	0,119
Kloroform			36,033	49,58	51,73	45,78	4,01	0,137	0,219	0,232
Su			33,059	31,08	29,60	31,24	0,082	0,119	0,107	0,098

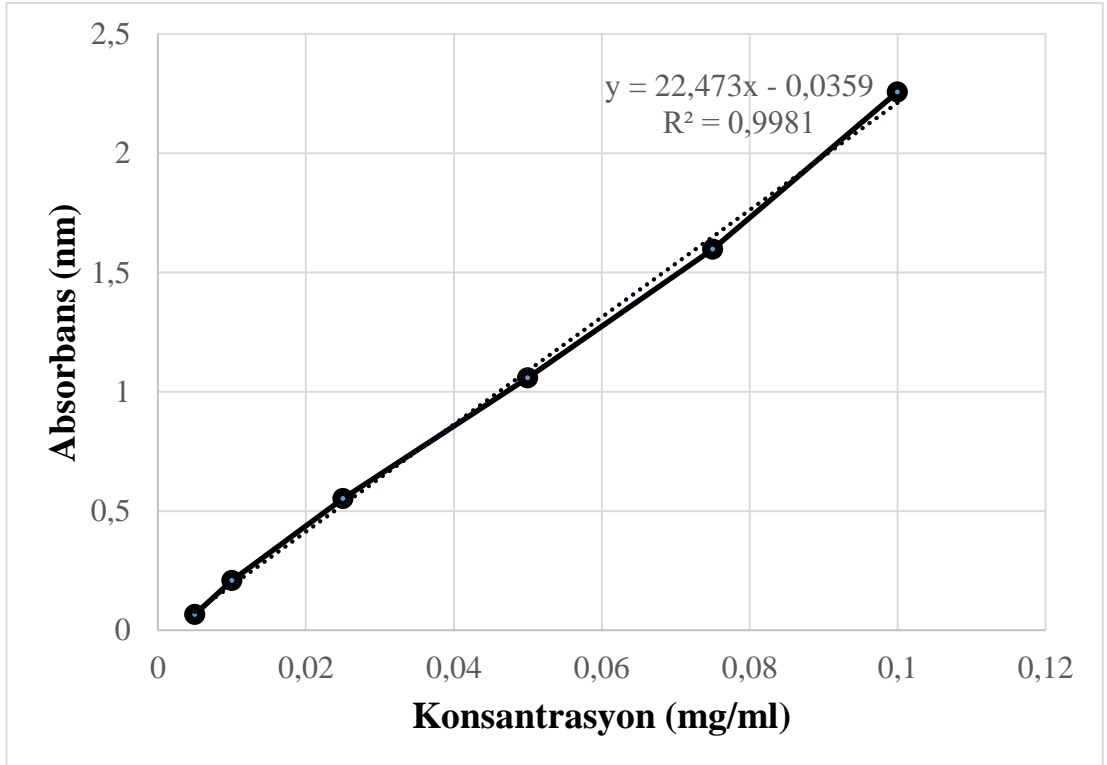
SMP: Örnek numaraları, **ORT:** Ortalama, **SE:** Standart Hata, **ABS:** Absorbans değerleri, **R²:** Değişkenlik Oranı (Denklemin Belirlenme Katsayısı)

4.2 Total Flavonoid Miktarı

Ekstraktlarda bulunan total flavonoid miktarı rutin hidrat (Şekil 4.2) ve kuersetin (Şekil 4.3) kalibrasyon eğrisi kullanılarak belirlenmiştir. Grafiklerin eğim formülü rutin için $y=18,22x-0,204$, kuersetin için $y=22,4734x-0,0359$ olarak belirlenirken, R² değerleri sırasıyla 0,9898 ve 0,9989 olarak hesaplanmıştır. Çalışmada elde edilen veriler Tablo 4.2’de özetlenmiştir. Bu sonuçlara göre metanol ekstraktının total flavonoid miktarı $109,84 \pm 0,79$ mg RU/g ve $81,57 \pm 0,64$ mg QE/g, etanol ekstraktının total flavonoid miktarı $109,13 \pm 2,76$ mg RU/g ve $81,00 \pm 2,24$ mg QE/g, *n*-hekzan ekstraktının total flavonoid miktarı $152,34 \pm 7,57$ mg RU/g ve $116,03 \pm 6,14$ mg QE/g, kloroform ekstraktının total flavonoid miktarı $93,40 \pm 14,57$ mg RU/g ve $68,24 \pm 11,82$ mg QE/g ve su ekstraktının total flavonoid miktarı $35,27 \pm 2,37$ mg RU/g ve $21,12 \pm 1,92$ mg QE/g, olarak bulunmuştur.



Şekil 4.2 Rutin hidrat kalibrasyon eğrisi



Şekil 4.3 Kuersetin kalibrasyon eğrisi

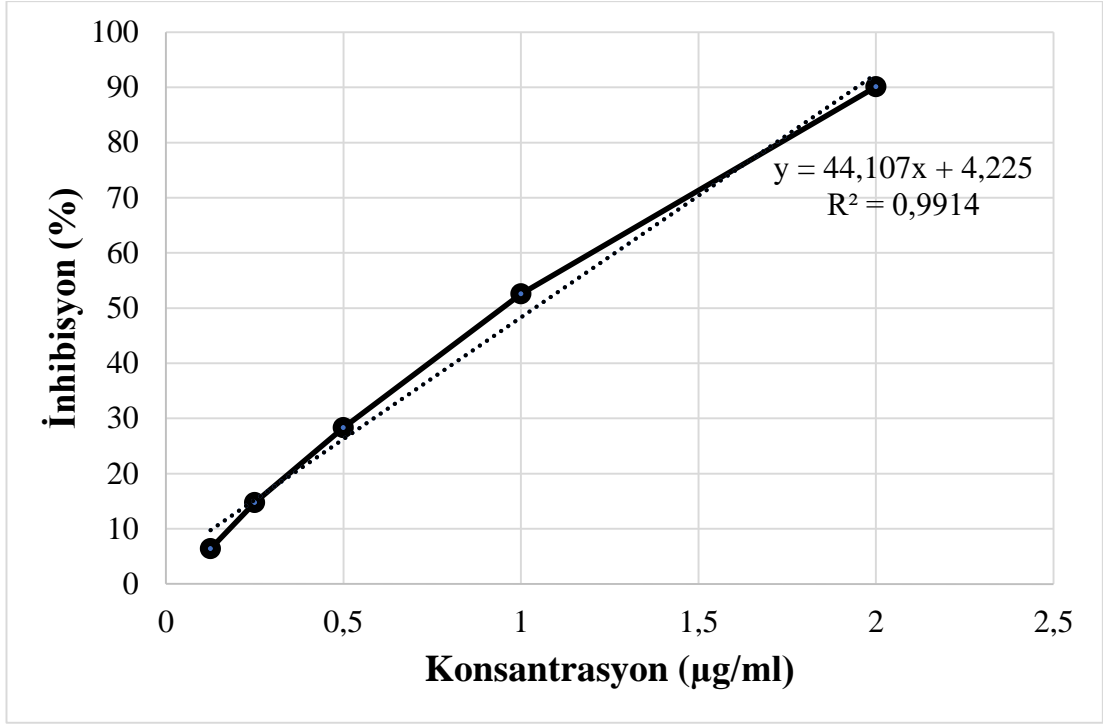
Tablo 4.2 *S. purpurea* subsp. *leucodermis* yapraklarının farklı çözücülerden elde edilen total flavonoid miktarları

	ÇÖZÜCÜ	FORMÜL	R ²	SMP1	SMP2	SMP3	ORT	SE	ABS1	ABS2	ABS3
RUTİN HİDRAT	Metanol	y=6,0531x-0,0811	0,9978	111,47	109,93	108,12	109,84	0,79	1,827	1,799	1,766
	Etanol			115,48	107,96	103,95	109,13	2,76	1,900	1,763	1,690
	n-hekzan			136,55	151,81	168,66	152,34	7,57	2,284	2,562	2,869
	Kloroform			129,09	76,02	75,08	93,40	14,57	2,148	1,181	1,164
	Su			38,04	38,31	29,47	35,27	2,37	0,489	0,494	0,333
KUERSETİN	Metanol	y=22,4734x-0,0359	0,9989	82,89	81,67	80,18	81,57	0,64	1,827	1,799	1,766
	Etanol			86,14	80,05	76,80	81,00	2,24	1,900	1,763	1,690
	n-hekzan			103,23	115,60	129,26	116,03	6,14	2,284	2,562	2,869
	Kloroform			97,12	54,15	53,39	68,24	11,82	2,148	1,181	1,164
	Su			23,36	23,58	16,42	21,12	1,92	0,489	0,494	0,333

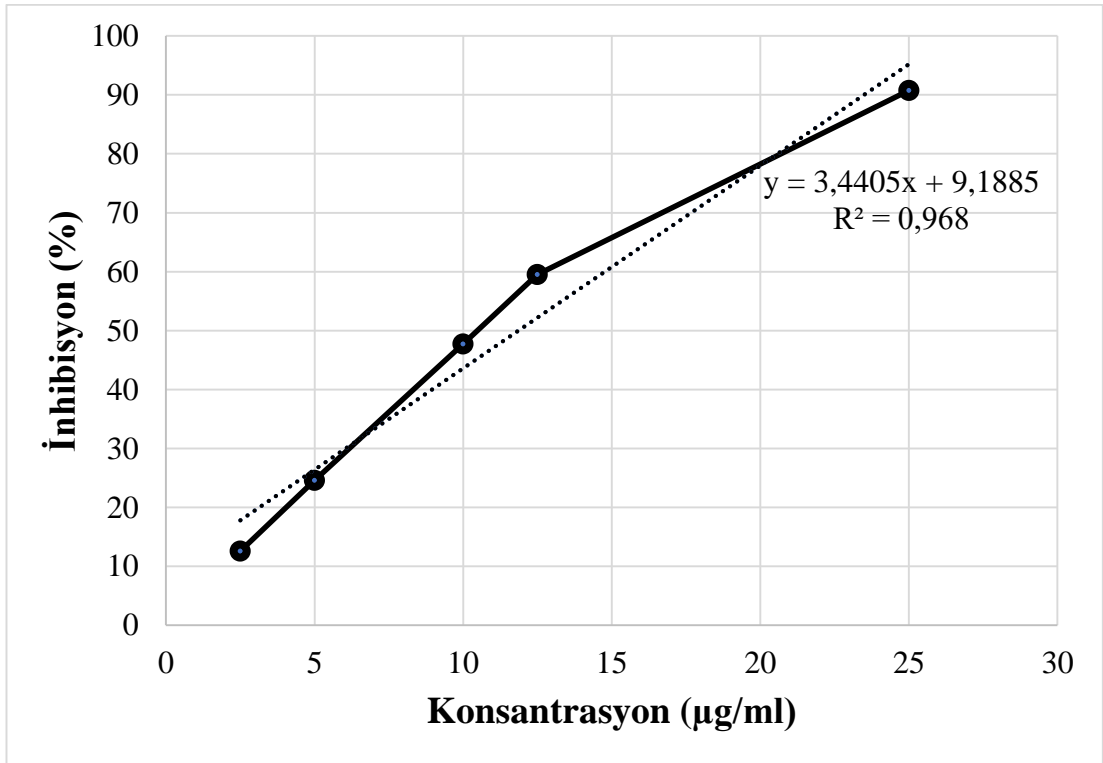
SMP: Örnek numaraları, **ORT:** Ortalama, **SE:** Standart Hata, **ABS:** Absorbans değerleri, **R²:** Değişkenlik Oranı (Denklemin Belirlenme Katsayısı)

4.3 DPPH Serbest Radikal Aktivitesi

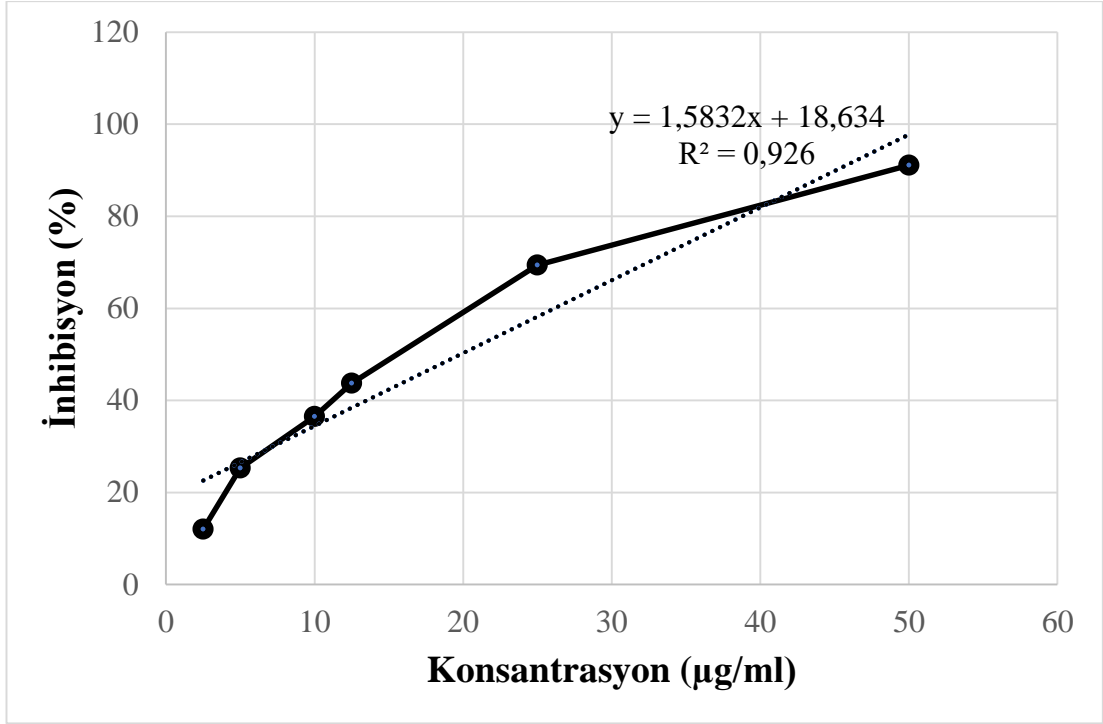
S. purpurea subsp *leucodermis* yapraklarının farklı çözücülerdeki antioksidan aktivitesi DPPH kullanılarak çalışılmıştır. Çalışmada pozitif kontrol olarak kuersetin kullanılmıştır. Elde edilen sonuçlar Tablo 4.3'te özetlenmiştir. IC50 değerleri grafiklerin eğim formülü (Şekil 4.4-Şekil 4.9) kullanılarak hesaplanmıştır. Bu sonuçlara göre pozitif kontrol olarak kullanılan kuersetinin IC50 değeri 1,04 µg/ml, metanol ekstraktının IC50 değeri 11,86 µg/ml, su ekstraktının IC50 değeri 19,81 µg/ml, etanol ekstraktının IC50 değer 34,96 µg/ml, kloroform ekstraktının IC50 değeri 175,66 µg/ml ve son olarak n-hekzan ekstraktının IC50 değeri 420,44 µg/ml olarak hesaplanmıştır.



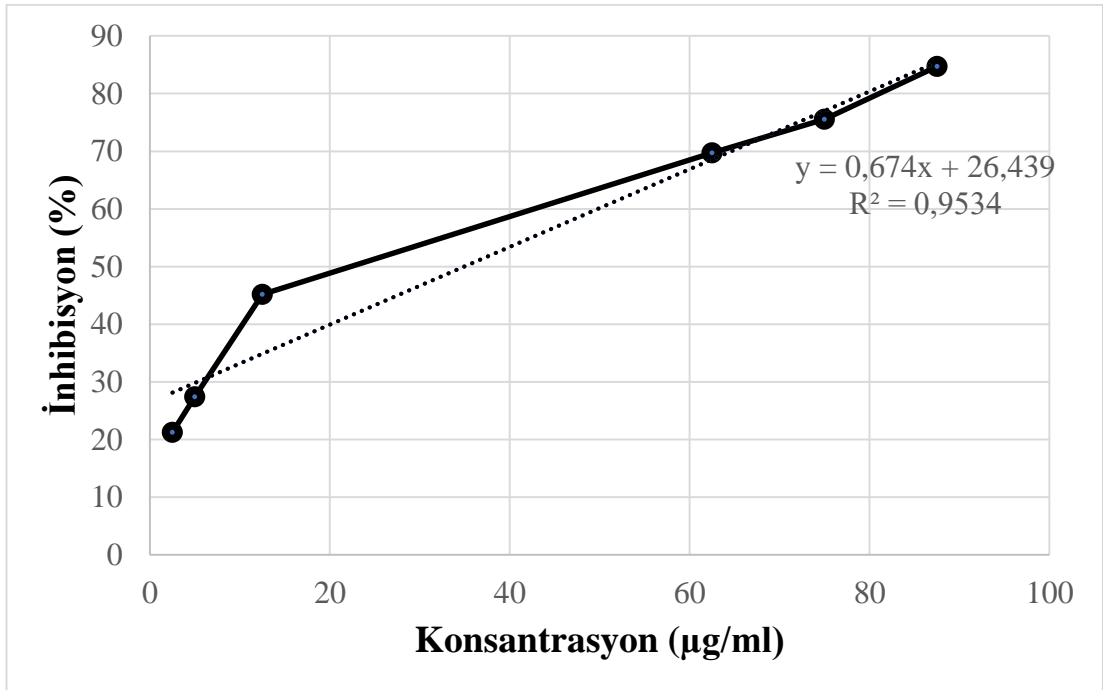
Şekil 4.4 Kuersetin inhibisyon eğrisi



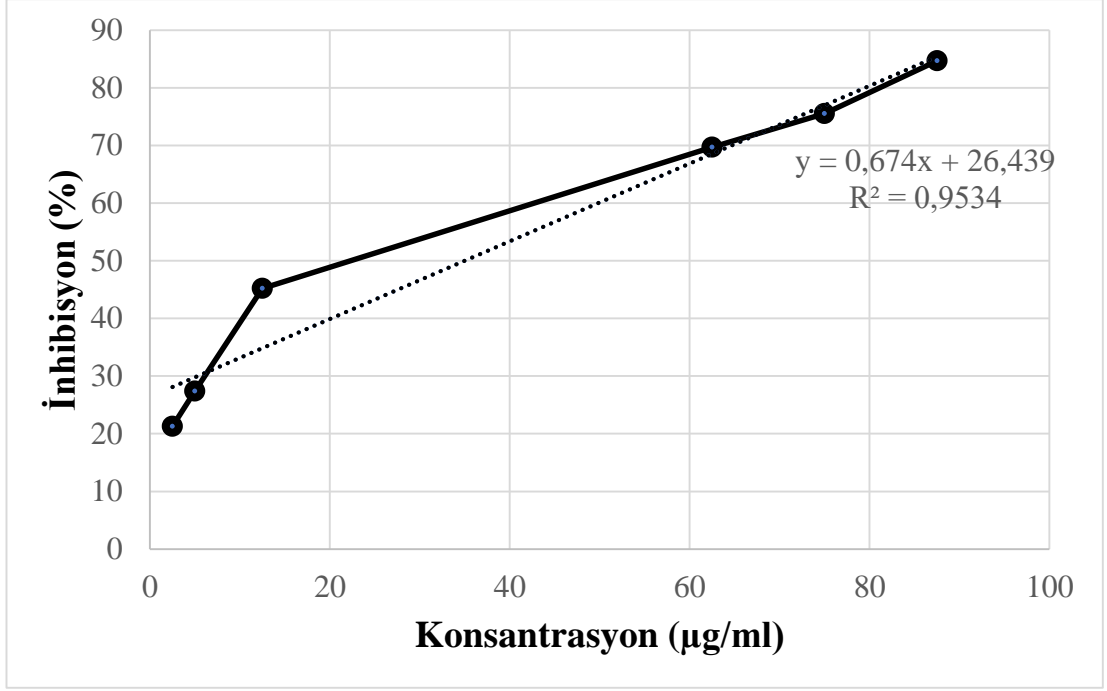
Şekil 4.5 Metanol ekstraktı inhibisyon eğrisi



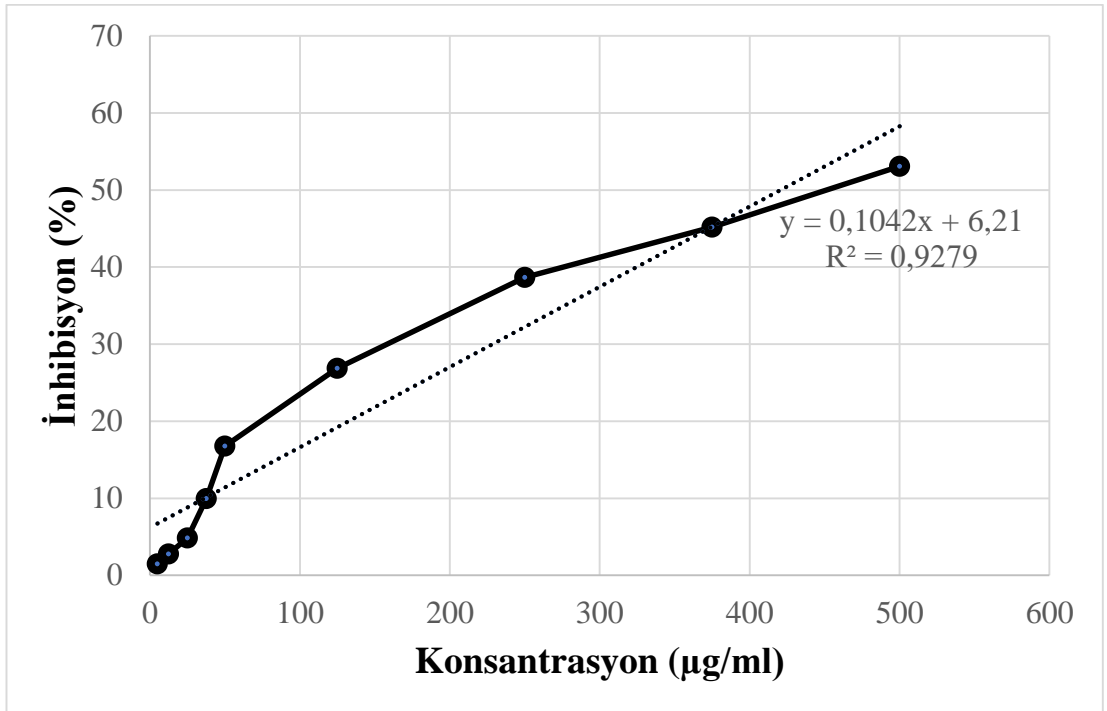
Şekil 4.6 Su ekstraktı inhibisyon eğrisi



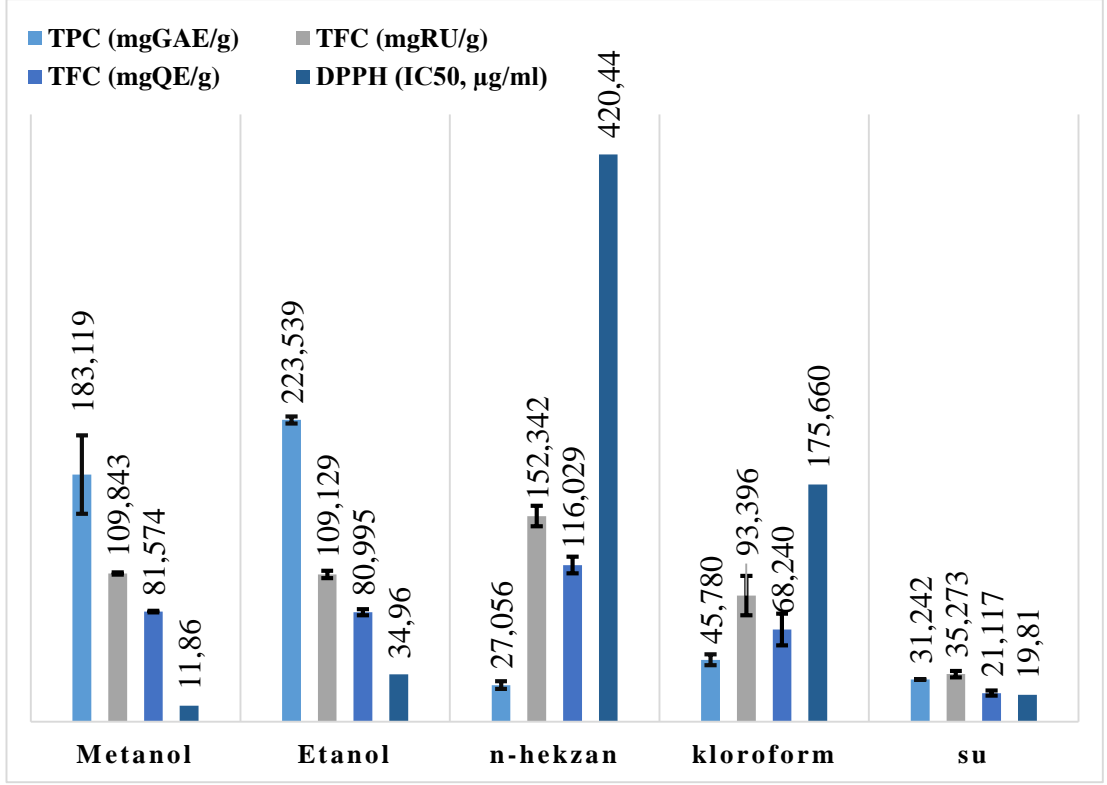
Şekil 4.7 Etanol ekstraktı inhibisyon eğrisi



Şekil 4.8 Kloroform ekstraktı inhibisyon eğrisi



Şekil 4.9 *n*-hekzan ekstraktı inhibisyon eğrisi



Şekil 4.10 *S. purpurea* subsp. *leucodermis* yapraklarının farklı ekstraktlarındaki total fenolik madde miktarı (TPC), total flavonoid miktarı (TFC) ve DPPH antioksidan aktivitesi sonuçları

Tablo 4.3 *S. purpurea* subsp. *leucodermis* DPPH antioksidan testi sonuçları [Kon: Konsantrasyon ($\mu\text{g/ml}$), Abs: Absorbans (nm), İnh: İnhibisyon (%), A_{kontrol} : Kontrolün absorbansı (nm)]

Kuersetin			Metanol			Su			Etanol			Kloroform			<i>n</i> -hekzan		
Kon	Abs	İnh	Kon	Abs	İnh	Kon	Abs	İnh	Kon	Abs	İnh	Kon	Abs	İnh	Kon	Abs	İnh
4	0,041	92,96	25	0,054	90,78	50	0,052	91,12	87,5	0,089	84,71	100	0,417	28,35	500	0,406	53,07
2	0,058	90,09	12,5	0,236	59,51	25	0,178	69,42	75,	0,142	75,54	87,5	0,436	25,17	375	0,474	45,20
1	0,276	52,58	10	0,304	47,71	12,5	0,328	43,70	62,5	0,176	69,70	62,5	0,457	21,53	250	0,530	38,66
0,5	0,417	28,29	5	0,439	24,57	10	0,370	36,51	12,5	0,319	45,19	50	0,476	18,27	125	0,632	26,85
0,25	0,496	14,72	2,5	0,509	12,60	5	0,435	25,26	5	0,423	27,38	37,5	0,512	11,97	50	0,719	16,78
0,125	0,545	6,36				2,5	0,512	12,03	2,5	0,458	21,25	25	0,528	9,28	37,5	0,778	9,95
												12,5	0,558	4,21	25	0,822	4,86
															12,5	0,840	2,78
															5	0,851	1,47
A_{kontrol}	0,582		A_{kontrol}	0,582		A_{kontrol}	0,582		A_{kontrol}	0,582		A_{kontrol}	0,582		A_{kontrol}	0,864	
IC50	1,04 $\mu\text{g/ml}$		IC50	11,86 $\mu\text{g/ml}$		IC50	19,81 $\mu\text{g/ml}$		IC50	34,96 $\mu\text{g/ml}$		IC50	175,66 $\mu\text{g/ml}$		IC50	420,44 $\mu\text{g/ml}$	

5. SONUÇ VE ÖNERİLER

Denizli ve çevresi sahip olduğu geniş biyoçeşitlilik ile tıbbi ve aromatik bitkiler için önemli bir bölgedir. Bu bölgede yetişen çok sayıda bitki türü yerel halk tarafından çay ve baharat olarak kullanılmakta, çeşitli bitkisel ilaçların hazırlanmasında bu bitkilerden faydalanılmaktadır (Kargıoğlu ve diğ. 2010; Arı ve diğ. 2015; Bulut ve diğ. 2017; Akbulut ve diğ. 2019). Çeşitli kullanım alanlarına sahip olan *Salix* taksonları üzerinde çok sayıda biyolojik aktivite çalışması mevcuttur (Hussain ve diğ. 2011; El-Shazly ve diğ. 2012; Kim ve diğ. 2015; Ramos ve diğ. 2019; Akyürek ve Acar 2020; Tienaho ve diğ. 2021; Lee ve diğ. 2023). Ancak *S. purpurea* subsp. *leucodermis* alt türüne ait herhangi bir çalışmaya rastlanmamıştır. Bu çalışmada Denizli ve ülkemiz için endemik olan *S. purpurea* subsp. *leucodermis* taksonunun farklı çözücülerdeki total fenolik madde miktarı, total flavonoid miktarı tespit edilmiş ve DPPH ile antioksidan aktivitesi belirlenmiştir (Şekil 4.10). *Salix* cinsine ait taksonlar salisin içerikleri, ekonomik değerleri ve ekosistemlerde üstlendikleri roller nedeniyle önemli bir bitki grubudur (Hsu ve diğ. 1985; Evans ve diğ. 1995; Jeon ve diğ. 2008; Tantry ve diğ. 2013; Yang ve diğ. 2013; Kim ve diğ. 2015).

Bu çalışma sonucunda elde ettiğimiz verilere göre en yüksek miktarda fenolik madde miktarı etanol (223,539 mg GAE/g) ve metanol (183,119 mgGAE/g) ekstraktlarında, en düşük fenolik madde miktarı ise n-hekzan (27,056 mg GAE/g), su (31,242 mg GAE/g) ve kloroform (45,780 mg GAE/g) ekstraktlarında bulunmuştur. Flavonoid madde miktarına bakıldığında en yüksek miktarda n-hekzan (152,342 mg RU/g; 116,029 mg QE/g), metanol (109,843 mg RU/g; 81,574 mg QE/g) ve etanol (109,129 mg RU/g; 80,995 mg QE/g) ekstraktlarında çıkarken en düşük flavonoid miktarı ise su (35,273 mg RU/g; 21,117 mg QE/g) ve kloroform (93,396 mg RU/g; 68,240 mg QE/g) ekstraktlarında görülmüştür.

Bitkisel kaynaklı antioksidan aktivite, bitki dokusundaki farklı antioksidan bileşenlerin varlığından kaynaklanmaktadır. Önceki çalışmalar, fenolik madde miktarı, tanen, antosiyanin, flavonoid miktarı, fenoller, alkaloidler ve pro-antosiyaninler gibi biyoaktif bileşenlerin antioksidan aktivitesinin esas olarak redoks özelliklerinden kaynaklandığını vurgulamıştır (Mukherjee ve diğ. 2011; Saeed ve diğ. 2012; Hamzah ve diğ. 2019). Antioksidan aktivitesi, mor renkli DPPH çözeltisinin sarı renkli ürün olan difenil pikril hidrazine indirgenmesini baz alan DPPH testine dayalı olarak ölçülür (Sepahpour ve diğ. 2018). Gerçekleştirdiğimiz çalışmada DPPH serbest radikal aktivitesi sonuçlarına göre en düşük IC50 değerine sahip olan ekstraktların sırasıyla metanol (11,86 µg/ml), su (19,81 µg/ml) ve etanol (34,96 µg/ml) ekstraktları olduğu görülmektedir. Kloroform (175,660 µg/ml) ve *n*-hekzan (420,440 µg/ml) ekstraktları ise en yüksek IC50 değerine sahiptir.

Fenolik maddeler ve flavonoidler bitkilerde en yaygın bulunan bileşiklerdir ve redoks özelliklerinden dolayı antioksidan aktiviteye önemli katkıda bulunurlar (Djeridane ve diğ. 2006; Mukherjee ve diğ. 2011; Li ve diğ. 2018). Bitkilerdeki fenolik madde miktarı türe, genetiğe ve çevresel koşullara bağlıdır (Kainama ve diğ. 2020). Elde edilen sonuçlar incelendiğinde total fenolik madde miktarı ve flavonoid miktarının yüksek konsantrasyonlarda bulunması ekstraktın antioksidan aktivitesindeki IC50 değerini genellikle düşürdüğü görülmektedir. Metanol ve etanol ekstraktlarında yer alan yüksek fenolik madde ve flavonoid miktarının bu ekstraktların antioksidan özelliğine doğrudan etki ettiği söylenebilir. Bu durum *n*-hekzan ve kloroform ekstraktlarında görülen düşük fenolik madde ve flavonoid miktarının daha yüksek IC50 değerine neden olabileceği yönünde de yorumlanabilir.

Sonboli ve diğ. (2010) gerçekleştirdikleri çalışma ile *Salix aegyptiaca* türünün erkek çiçeklerinin *in vitro* koşullardaki antioksidan aktivitesini ve total fenolik madde miktarını incelemişlerdir. Gerçekleştirdikleri çalışmada çözücü olarak metanol, bütanol, su ve kloroform kullanmışlardır. Elde ettikleri sonuçlara göre metanol (129,6 ppm) ve bütanol (313,8 ppm) ekstraktında en yüksek fenolik madde miktarını, su (37,7 ppm) ve kloroform (14,3 ppm) ekstraktında ise en düşük fenolik madde miktarını raporlamışlardır. Bu sonuçlar elde ettiğimiz sonuçlarla benzerlik göstermektedir.

Sulaiman ve diğ. (2013), gerçekleştirdikleri çalışma ile *Salix alba* kabuğunun sıcak etanolik ekstraktının toplam fenolik içeriği, antioksidan, antimikrobiyal ve

sitotoksik aktivitelerini araştırmışlardır. Ekstraktın antioksidan özellikleri ve toplam fenolik içeriği sırasıyla 1,1-Difenil-2-Pikrilhidrazil (DPPH) serbest radikal temizleme ve Folin Ciocalteu yöntemleriyle değerlendirilmiştir. Elde edilen sonuçlara göre *S. alba* kabuğunun etanolik ekstraktındaki fenolik içerik konsantrasyonunun $162,00 \pm 14,90$ mg GAE/ g olduğunu göstermişlerdir. *S. alba* kabuğu ekstraktının farklı konsantrasyonlarının serbest radikal temizleme aktivitelerine göre DPPH radikallerinin inhibisyon modelinin, *S. alba* ekstraktı için konsantrasyona bağlı olduğu rapor edilmiştir. Tez çalışmasından elde ettiğimiz verilere göre *S. purpurea leucodermis* yapraklarının etanolik ekstraktlarında $223,539$ mg GAE/g fenolik madde bulunmaktadır. İki çalışma arasındaki farkın temelinde farklı tür ve farklı coğrafik bölgelerden kaynaklanan çevresel faktörlerin olduğu düşünölmektedir.

El-Sayed ve diğ. (2015) gerçekleştirdikleri çalışmada *Salix mucronata* Thunb. yaprak ekstraktlarının fitokimyasal bileşenlerini ve bunların antioksidan aktivitelerini belirlemeyi amaçlamışlardır. Çalışmada kurutulmuş yaprak örnekleri MeOH, MeOH (%85), MeOH (%70) ve saf su ile ekstrakte edilmiştir. Toplam fenolik ve flavonoid içerikleri Folin-Ciocalteu ve alüminyum klorür analizleri ile ölçölmüştür. Test edilen ekstraktların antioksidan potansiyeli DPPH, ABTS ve toplam antioksidan kapasite (TAC) analizleri kullanılarak değerlendirilmiştir. Sonuçlar, MeOH (%85) ekstraktının yüksek toplam fenolik ve flavonoid içeriği sergilediğini gösterdi (TPC= $131,39 \pm 2,49$ mgGAE/g harici ve TFC= $67,69 \pm 1,47$ mg RE/g harici). Ayrıca MeOH (%85) ekstraktı yüksek antioksidan aktivite göstermiştir [DPPH SC50= $98,76 \pm 0,46$ (μ g/ml), ABTS= $45,83 \pm 0,32$ mm Trolox® eşdeğer/100 gm ekstrakt ve TAC= $199,18 \pm 2,19$ mg askorbik asit eşdeğer/g ekstrakt]. Tez çalışmasında elde ettiğimiz total fenolik madde miktarının ve flavonoid miktarının metanol ekstraktlarında en yüksek seviyede olduğu sonucu El-Sayed ve diğ. (2015) tarafından elde edilen sonuçları destekler niteliktedir.

Mantashlo ve diğ. (2017) gerçekleştirdikleri çalışma ile *Salix alba* türünün antioksidan bileşiklerin belirlenmesi amacıyla fenol ve flavonoid testleri yapmışlardır. Serbest radikal söndürme kapasitesinin belirlenmesi için 2,2-difenil-1-pikrilhidrazil (DPPH) testi kullanılmıştır. Toplam fenolün en yüksek değeri sırasıyla $60,87 \pm 1,19$ ve $69,98 \pm 1,41$ mg GAE/g ekstrakt ile dal ve gövde kabuğunun etanollü ekstraktlarında tespit edilirken, toplam fenolün en düşük değer kloroform

ekstraktlarda belirlenmiştir. Toplam flavonoid miktarı dal ve gövde kabuklarında sırasıyla $71,20 \pm 4,08$ ve $60,87 \pm 1,19$ ile etanolik ekstrakt miktarı ile ilişkili iken, en düşük seviye ise sırasıyla $12,56 \pm 0,29$ ve $13,80 \pm 0,57$ ile gövde ve dal kabuğu kloroformik ekstraktlarında tespit edilmiştir. Ayrıca serbest radikal söndürme kapasitesi DPPH'nin askorbik asitten sonra en fazla aktivitesinin dal ve gövde kabuğunun etanollü ekstraktlarında $0,129$ ve $0,130$ mg/ml olduğu rapor edilmiştir. Elde edilen sonuçlar gerçekleştirdiğimiz çalışmayla kloroformun en düşük flavonoid ve fenolik madde miktarı içermesi açısından paralellik göstermektedir.

Babeanu ve Dodocioiu (2017) yaptıkları çalışma ile doğal antioksidan kaynağı olarak en değerli genotipleri seçmek için altı *Salix* klonunun yapraklarındaki toplam fenolik içeriği, flavonoid içeriğini ve antioksidan aktiviteyi karşılaştırmalı olarak değerlendirmişlerdir. Elde ettikleri sonuçlara göre toplam fenolik içerik miktarları genotipler arasında farklılık göstermektedir ve $18,968$ mg GAE/g ile $32,4$ mg GAE/g arasında değişmektedir. Total flavonoid miktarı ise $9,44$ mg QE/g ve $17,94$ mg QE/g arasında değişiklik göstermektedir. Bu sonuçlar tez çalışmasında elde ettiğimiz sonuçlarla benzerlik göstermektedir.

Wahab ve diğ. (2018) tarafından *Salix babylonica*'nın yaprak ve kabuğunun metanolik ekstraktları ve ekstraktların petrol eter, metilen klorür ve etil asetat fraksiyonlarının antioksidan ve antimikrobiyal aktiviteleri araştırılmıştır. Ayrıca fenolik içerikleri açısından da niceliksel olarak analizler yapılmıştır. Kabuğun metanolik ekstraktının etil asetat fraksiyonu en yüksek toplam fenolik içeriği ve aynı zamanda en yüksek antioksidan aktiviteyi göstermiştir. Ayrıca yaprağın metanolik ekstraktın total fenolik madde miktarı $27,217$ µg/100 mg olarak bulunmuştur. Bu sonuçlar elde ettiğimiz verilerle benzerlik göstermemiştir.

Utari ve diğ. (2020) gerçekleştirdikleri çalışmada Endonezya'dan toplanmış *S. tetrasperma* türünün kabuk ve yapraklarının etil asetat ekstraktından sekonder metabolit bileşiklerini izole etmeyi ve çeşitli kısımlarındaki *n*-hekzan, etil asetat ve metanol ekstraktlarının antioksidan aktivitesini araştırmayı amaçlamışlardır. Tüm ekstraktlar arasında kabuğun metanol ekstraktı, $6,85$ µg/mL IC50 değeriyle en yüksek antioksidan aktiviteye sahip olduğu belirlenmiştir. Ayrıca yaprakların metanol ve etil asetat ekstraktlarının IC50 değeri sırasıyla $27,43$ µg/mL ve $142,18$ µg/mL olarak rapor edilmiştir. Bu çalışmada yaprakların metanol ekstraktlarının antioksidan seviyesi, tez

alışmasından elde edilen sonuçlarla (11,86 µg/mL) karşılaştırıldığında sonuçların birbiri ile paralellik gösterdiği görülmüştür.

Bu tez çalışmasından elde ettiğimiz sonuçlar, fenolik madde miktarı, toplam flavonoid miktarı ve antioksidan aktivite özellikleri nedeniyle *S. purpurea* subsp. *leucodermis* türünün farmasötik, kozmetik ve nutrasötiklerin geliştirilmesinde kullanılabilir önemli bir doğal kaynak olabileceğini göstermektedir. Ancak türün etken maddelerinin biyolojik sistemlerdeki aktivitelerini daha net anlayabilmek için özellikle *in vivo* testler olmak üzere daha ileri çalışmaların yapılması gerekmektedir.

6. KAYNAKLAR

- Acar, P., Taşkıran, B., Özdemir Değirmenci, F. and Kaya, Z., “Turkish *Salix* species: Molecular phylogeny and morphology”, *Forestist*, 70(2), 141-150, (2020).
- Ager, A., Nordh, N. E., Ledin, S., Ostry, M., Carlson, M. and Ronnberg-Wastljung, A., “International transfer of *Alnus*, *Populus*, and *Salix* germplasm: early test results”, *Biomass*, 22(1-4), 49–62, (1990).
- Akbulut, S., Karaköse, M. and Özkan, Z.C., “Traditional uses of some wild plants in Kale and Acıpayam Provinces in Denizli”, *Kastamonu University Journal of Forestry Faculty*, 19(1), 72–81, (2019).
- Akkemik, Ü., *Türkiye'nin doğal-egzotik ağaç ve çalıları*, Ankara: Orman Genel Müdürlüğü Yayınları, 684, (2018).
- Akman Y., Ketenoğlu O., Kurt L., Güney K., Hamzaoğlu E. ve Tuğ G. N., *Angiospermae (Kapalı Tohumlular)*, Ankara: Palme Yayıncılık, (2007).
- Akyürek, T.U. and Acar, P., “Potential of Turkish *Salix* L. species: Bioactivity and phytochemistry-a review”, *3rd International Eurasian Conference on Biological and Chemical Sciences (EurasianBioChem 2020)*, Ankara, 959–965, (2020).
- Anşın R. ve Özkan Z.C., *Tohumlu bitkiler (Spermatophyta)-Odunsu taksonlar*, Trabzon: Karadeniz Teknik Üniversitesi Basımevi, (1993).
- Argus, G.W., “Infrageneric classification of *Salix* L. (Salicaceae) in the New World”, *Syst. Bot. Monogr.*, 52, 1–121, (1997).
- Arı, S., Temel, M., Kargıoğlu, M. and Konuk, M., “Ethnobotanical survey of plants used in Afyonkarahisar-Turkey”, *J. Ethnobiol. Ethnomed.*, 11, 1–15, (2015).
- Avcı, M., “Türkiye'nin flora bölgeleri ve Anadolu Diagonali'ne coğrafi bir yaklaşım”, *Coğrafya Dergisi*, 28, 225–248, (1993).
- Avcı, M., “Türkiye'nin doğal söğütleri ve coğrafi dağılışları”, *Coğrafya Dergisi*, 7, 1–24, (1999).
- Babeanu, C. and Dodocioiu A.M., “Antioxidant enzymes activities and proline content in leaves of *Salix* species grown on fly ash dumps”, *Annals of the University of Craiova-Agriculture, Montanology, Cadastre Series*, 47(2), 20–24, (2017).
- Baytop, T., *Türkiye'de bitkilerle tedavi (geçmişte ve bugün)*, İstanbul: İstanbul Üniversitesi Yayınları, (1984).

- Baytop, T., *Türkiye’ de bitkilerle tedavi (geçmişte ve bugün)*, İstanbul: Nobel Tıp Kitabevleri Yayınları, (1999).
- Boeckler, G.A., Gershenzon, J., Sybille, B. and Unsicker, S.B., “Phenolic glycosides of the Salicaceae and their role as anti-herbivore defenses”, *Phytochem.*, 72, 1497–1509, (2011).
- Borris, R.P., “Natural products research: perspectives from a major pharmaceutical company”, *J. Ethnopharmacol.*, 51, 29–38, (1996).
- Bulut, G., Haznedaroğlu, M. Z., Doğan, A., Koyu, H. and Tuzlacı, E., “An ethnobotanical study of medicinal plants in Acipayam (Denizli-Turkey)”, *J. Herb. Med.*, 10, 64–81, (2017).
- Cowan, M.M., “Plant products as antimicrobial agents”, *Clin. Microbiol. Rev.*, 12(4), 564–582, (1999).
- Çağlar, Y., *Dendroloji (Ağaçbilim) ve orman ekolojisi okulu ders notları*, Ankara: Kırsal Çevre ve Ormancılık Sorunları Araştırma Derneği Yayını, (2003).
- Davies, C.E., Moss, D. and Hill, M. O., “EUNIS habitat classification revised” *European Environment Agency-European Topic Centre on Nature Protection and Biodiversity*, 127–143, (2004).
- Desborough, M.J. and Keeling, D.M., “The aspirin story—from willow to wonder drug”, *Br. J. Haematol.*, 177(5), 674–683, (2017).
- Djeridane, A., Yousfi, M., Nadjemi, B., Boutassouna, D., Stocker, P. and Vidal, N., “Antioxidant activity of some Algerian medicinal plants extracts containing phenolic compounds”, *Food Chem.*, 97(4), 654–660, (2006).
- El-Sayed, M.M., El-Hashash, M.M., Mohamed, H.R. and El-Sayed, E., “Phytochemical investigation and in vitro antioxidant activity of different leaf extracts of *Salix mucronata* Thunb.” *J. Appl. Pharm. Sci.*, 5(12), 80–85, (2015).
- El-Shazly, A., El-Sayed, A. and Fikrey, E., “Bioactive secondary metabolites from *Salix tetrasperma* Roxb.” *Z. Naturforsch. C*, 67(7-8), 353–359, (2012).
- Eminağaoğlu, Ö., Avcı, M. ve Aksoy, N., “*Salix* L.”, (ed: Ü. Akkemik), *Türkiye’nin doğal-egzotik ağaç ve çalıları II*, Ankara: Orman Genel Müdürlüğü Yayınları, 58–65, (2014).
- Enayat, S. and Banerjee, S., “Comparative antioxidant activity of extracts from leaves, bark and catkins of *Salix aegyptiaca* sp.”, *Food Chem.*, 116(1), 23–28, (2009).
- Evans, T.P., Clausen, T.P., Reichardt, P.B. and Chang, S., “Structurally intriguing glucosides from Alaskan littletree willow (*Salix arbusculoides*)”, *J. Nat. Prod.*, 58(12), 1897–1900, (1995).

Freischmidt, A., Untergehrer, M., Ziegler, J., Knuth, S., Okpanyi, S., Müller, J. and Jürgenliemk, G., “Quantitative analysis of flavanones and chalcones from willow bark”, *Pharmazie*, 70(9), 565–568, (2015).

Güner, A. (Ed.), *Türkiye bitkileri listesi-Damarlı bitkiler*, İstanbul: Nezahat Gökyiğit Botanik Bahçesi Yayınları, Flora Dizisi 1, (2012).

Güvenç, A., “Ankara çevresinde yetişen *Salix* L. (Söğüt) türleri üzerinde farmasötik botanik yönünden araştırmalar”, Ankara: *Ankara Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri*, (2003).

Hamzah, B. and Zubair, M.S., “Traditional usages and phytochemical screenings of selected Zingiberaceae from central Sulawesi, Indonesia”, *Pharmacogn. J.*, 11(3), 505–510, (2019).

Highfield, J. G., Claude, E. and Oguro, K., “Electrocatalytic synergism in Ni/Mo cathodes for hydrogen evolution in acid medium: a new model” *Electrochim. Acta*, 44(16), 2805–2814, (1999).

Hsu, F. L., Nonaka, G. I. and Nishioka, I., “Acylated flavanols and procyanidins from *Salix sieboldiana*”, *Phytochem.*, 24(9), 2089–2092, (1985).

Hussain, S. S., Kayani, M. A. and Amjad, M., “Transcription factors as tools to engineer enhanced drought stress tolerance in plants”, *Biotechnol. Prog.*, 27(2), 297–306, (2011).

İlçim, A., Dığrak, M. ve Bağcı, E., “Bazı bitki ekstraktlarının antimikrobiyal etkilerinin araştırılması”, *Turk. J. Biol.*, 22(1), 119–125, (1998).

Jeon, S.H., Chun, W., Choi, Y.J. and Kwon, Y.S., “Cytotoxic constituents from the bark of *Salix hulteni*”, *Arch. Pharm. Res.*, 31, 978–982, (2008).

Kainama, H., Fatmawati, S., Santoso, M., Papilaya, P. M. and Ersam, T., “The relationship of free radical scavenging and total phenolic and flavonoid contents of *Garcinia lasoar* PAM”, *Pharm. Chem. J.*, 53, 1151–1157, (2020).

Kargıoğlu, M., Cenkci, S., Serteser, A., Konuk, M. and Vural, G., “Traditional uses of wild plants in the middle Aegean region of Turkey”, *Hum. Ecol.*, 38, 429–450, (2010).

Karimi, I., Hayatgheybi, H., Kamalak, A., Pooyanmehr, M. and Marandi, Y., “Chemical composition and effect of an essential oil of *Salix aegyptiaca* L., Salicaceae, (musk willow) in hypercholesterolemic rabbit model”, *Rev. Bras. Farmacogn.*, 21, 407–414, (2011).

Kemper, S. and Harden, T., “Experimentally disentangling what's beneficial about elderspeak from what's not”, *Psychol. Aging*, 14(4), 656–670, (1999).

Kırbağ, S. ve Zengin, F., “Elazığ yöresindeki bazı tıbbi bitkilerin antimikrobiyal aktiviteleri”, *J. Agric. Sci.*, 16(2), 77–80, (2005).

- Kızıloğlu, R., Kızılaslan, H. ve Eren, H.Z., “Tıbbi ve aromatik amaçlı kullanılan bitkilerde tüketici davranışlarının incelenmesi (Kahramanmaraş ili örneği)”, *Gaziosmanpaşa Üniversitesi Ziraat Fakóltesi Dergisi*, 34 (3), 27–35, (2017).
- Kim, C.S., Subedi, L., Park, K.J., Kim, S.Y., Choi, S.U., Kim, K.H. and Lee, K.R., “Salicin derivatives from *Salix glandulosa* and their biological activities”, *Fitoterapia*, 106, 147–152, (2015).
- Koçtürk, M.O., Kalafatçılar, Ö.A., Özbilgin N. ve Atabay H., “Türkiye’de bitkisel ilaçlara bakış”, *Ege Üniv. Ziraat Fak. Derg.*, 46(3), 209–214, (2009).
- Lee, J., Song, Y., Son, H., Kim, S., Lee, K. H., Bazarragchaa, B., Lee, C. and Yoo, H.Y., “Phytochemical and antioxidant characterization of extracts from unexplored medicinal plants *Salix schwerinii* and *Salix kochiana*”, *Horticulturae*, 9(9), 955, (2023).
- Li, M., Pare, P. W., Zhang, J., Kang, T., Zhang, Z., Yang, D. and Xing, H., “Antioxidant capacity connection with phenolic and flavonoid content in chinese medicinal herbs”, *Rec. Nat. Prod.*, 12(3), 239–250, (2018).
- Mahdi S., He, Y. and Bhandari, B., “Nano-emulsion production by sonication and microfluidization a comparison”, *Int. J. Food Prop.*, 9(3), 475–485, (2006).
- Mahdi, J.G. “Medicinal potential of willow: A chemical perspective of aspirin discovery”, *J. Saudi Chem. Soc.*, 14(3), 317–322, (2010).
- Manson, S.C., Benedict, A., Pan, F., Wittrup-Jensen, K. U. and Mark Fendrick, A., “Potential economic impact of increasing low dose aspirin usage on CVD in the US.”, *Curr.Med. Res. Opin.*, 26(10), 2365–2373, (2010).
- Mantashlo, J., Deljou, A. and Piri, K., “The study of flavonoids and antioxidant power of ętanolic, metanolic, hydroalcoholic and etylacetatic extracts of branch and stem bark of *Salix alba*”, *Cellular and Molecular Research (Iranian Journal of Biology)*, 30(3), 295–303. (2017).
- Mukherjee, P.K., Maity, N., Nema, N.K. and Sarkar, B.K., “Bioactive compounds from natural resources against skin aging”, *Phytomed.*, 19(1), 64–73, (2011).
- Nahrstedt, A., Schmidt, M., Jäggi, R., Metz, J. and Khayyal, M.T., “Willow bark extract: the contribution of polyphenols to the overall effect” *Wien. Med. Wochenschr.*, 157(13), 348–351, (2007).
- Özgün-Acar, O., Celik-Turgut, G., Guner, H., Sezer, S. and Sen, A., “Biochemical, pharmacological, and toxicological attributes of caper (*Capparis ovata*) flowering buds and berries pickles”, *Food. Sci. Nutr.*, 10(12), 4189–4200, (2022).

- Özeker, E., “Salisilik asit ve bitkiler üzerindeki etkileri”, *Ege Üniv. Ziraat Fak. Derg.*, 42(1), 213–223, (2005).
- Özyavuz, M., “Bitki örtüsünün ekolojik artlarının coğrafi bilgi sistemleri ve uzaktan algılama teknikleri ile analizi”, *Tekirdağ: Ganos (Işıklar) Dağı, Tekirdağ Ziraat Fakültesi Dergisi*, 8(2), 37–47, (2011).
- Ramos, P. A., Moreirinha, C., Silva, S., Costa, E.M., Veiga, M., Coscueta, E., Santos, S.A.O., Almeida, A., Pintado, M.M., Freire, C.S.R., Silva, A.M.S. and Silvestre, A.J., “The health-promoting potential of *Salix* spp. bark polar extracts: Key insights on phenolic composition and in vitro bioactivity and biocompatibility”, *Antioxidants*, 8(12), 609, (2019).
- Salman, H., “*Salix (Salix alba L.)* odun ve kabuğunun kimyasal yapısı üzerine araştırmalar”, Yüksek Lisans, *Isparta Uygulamalı Bilimler Üniversitesi Lisansüstü Eğitim Enstitüsü*, Isparta, (2019)
- Saeed, N., Khan, M.R. and Shabbir, M. “Antioxidant activity, total phenolic and total flavonoid contents of whole plant extracts *Torilis leptophylla L.*”, *BMC Complement Altern. Med.*, 12, 1–12, (2012).
- Seçmen, Ö., Gemici, Y., Görk, G., Bekat, L. ve Leblebici, E. “*Tohumlu bitkiler sistematigi*”, Ege Üniversitesi Fen Fakültesi Kitaplar Serisi 116, 394, (1995).
- Sepahpour, S., Selamat, J., Abdul Manap, M.Y., Khatib, A. and Abdull Razis, A.F., “Comparative analysis of chemical composition, antioxidant activity and quantitative characterization of some phenolic compounds in selected herbs and spices in different solvent extraction systems”, *Molecules*, 23(2), 402, (2018).
- Shara, M. and Stohs, S.J., “Efficacy and safety of white willow bark (*Salix alba*) extracts”, *Phytother. Res.*, 29(8), 1112–1116, (2015).
- Skvortsov, A.K. and Edmondson, J.R., “*Salix L.*”, (ed: P. H. Davis), *Flora of Turkey and the East Aegean Islands*, Edinburgh: Edinburgh University Press, 694-716, (1982).
- Sonboli, A., Mojarrad, M., Ebrahimi, S.N. and Enayat, S., “Free radical scavenging activity and total phenolic content of methanolic extracts from male inflorescence of *Salix aegyptiaca* grown in Iran”, *Iran. J. Pharm. Res.*, 9(3), 293–296, (2010).
- Sulaiman, G. M., Hussien, N. N., Marzoog, T. R. and Awad, H. A., “Phenolic content, antioxidant, antimicrobial and cytotoxic activities of ethanolic extract of *Salix alba*”, *Am. J. Biochem. Biotechnol.*, 9(1), 41–46, (2013).
- Sulima, P., Przyborowski, J. A., Kuszewska, A., Załuski, D., Jędrzycka, M. and Rzykowski, W., “Identification of quantitative trait loci conditioning the main

biomass yield components and resistance to *Melampsora* spp. in *Salix viminalis* × *Salix schwerinii* hybrids”, *Int. J. Mol. Sci.*, 18(3), 677, (2017).

Tantry, M. A., Shah, S., Dar, M. Y., Mir, M. M., Ghazanfar, K., Sheikh, F. A. and Akbar, S., “Cyclolanostane triterpene from *Salix caprea* L. (Goat Willow)”, *Nat. Prod. Res.*, 27(2), 171–175, (2013).

Tienaho, J., Reshamwala, D., Sarjala, T., Kilpeläinen, P., Liimatainen, J., Dou, J. and Jyske, T., “*Salix* spp. bark hot water extracts show antiviral, antibacterial, and antioxidant activities the bioactive properties of 16 clones”, *Front. Bioeng. Biotechnol.*, 9, 797939, (2021).

Toroğlu S. ve Çenet M. “Tedavi amaçlı kullanılan bazı bitkilerin kullanım alanları ve antimikrobiyal aktivitelerinin belirlenmesi için kullanılan metodlar”, *KSÜ Fen ve Mühendislik Dergisi*, 9(2), 12–20, (2006).

Wahab, G. A., Sallam, A., Elgaml, A., Lahloub, M. F. and Afifi, M. S., “Antioxidant and antimicrobial activities of *Salix babylonica* extracts”, *World J. Pharm. Res.*, 1–6, (2018).

Wells, J.C.D., “Poppy juice and willow bark advances in their use for the 21st century”, *Cell Prolif.*, 147–155. (2003).

Utari, F., Itam, A. and Efdi, M., “Chemical constituents and antioxidant activity of *Salix tetrasperma* ROXB”, *Rasayan J. Chem.*, 13(2), 796–802, (2020).

Yang, J., Yi, J., Yang, C. and Li, C., “*Agrobacterium tumefaciens*-mediated genetic transformation of *Salix matsudana* Koidz. using mature seeds”, *Tree Physiol.*, 33(6), 628–639, (2013).

Yusuf, M., Hayat, S., Alyemeni, M. N., Fariduddin, Q. and Ahmad, A., “Salicylic acid: physiological roles in plants”, (Eds: Hayat, S., Ahmad, A. and Alyemeni, M.), *Salicylic Acid Plant Growth and Development*, Dordrecht: Springer Science+Business Media, (2013).

Zhishen, J., Mengcheng, T. and Jianming, W., “The determination of flavonoid contents in mulberry and their scavenging effects on superoxide radicals”, *Food Chem.*, 64(4), 555–559, (1999).