

Sakarya'da Yetişen Mandalina Yaprığının Antioksidan Aktivitelerinin Belirlenmesi

Rabia Ersarı¹, Latif Berke Ersarı¹, Derin Altıntığ², Gülnur Arabacı^{3*}

¹Kimya Bölüm / Fen Bilimleri Enstitüsü, Sakarya Üniversitesi, Türkiye

²Tıp Fakültesi, Maltepe Üniversitesi, Türkiye

³Kimya Bölüm / Fen Fakültesi, Sakarya Üniversitesi, Türkiye

*(garabaci@sakarya.edu.tr)

(Received: 03 December 2024, Accepted: 06 December 2024)

(3rd International Conference on Recent Academic Studies ICRAS 2024, December 03-04, 2024)

ATIF/REFERENCE: Ersarı, R., Ersarı, L. B., Altıntığ, D. & Arabacı, G. (2024). Sakarya'da Yetişen Mandalina Yaprığının Antioksidan Aktivitelerinin Belirlenmesi. *International Journal of Advanced Natural Sciences and Engineering Researches*, 8(11), 287-293.

Özet – Antioksidanlar, sağlık açısından birçok olumlu etkisi bulunan ve gıda takviyeleri, kozmetik ürünler ve işlenmiş gıdalarda sıkça bulunan bileşenlerdir. Sağlığa olan faydaları çeşitlilik gösteren antioksidanlar, vücudu kararsız radikallere karşı savunarak hücrel tahribatı önlemeye veya yavaşlatmaya yardımcı olur. Bunlar, besinler aracılığıyla veya takviye gıdalar yoluyla alınabilirler. Ayrıca vücut içinde de üretilebilirler, bu da vücudu dış tehditlere karşı korumak için doğal bir savunma mekanizması sağlar. Oksidatif stres, vücudun serbest radikalleri etkili bir şekilde temizleyemediği durumda ortaya çıkar. Buda hücrelerde DNA'da tahribatına ve hatta da hücre ölümüne yol açabilir. Antioksidanlar, vücudun oksidatif stresi dengelemesine yardımcı olur. Dolayısıyla, antioksidan bakımından zengin bir diyetle beslenmek oldukça önemlidir. Özellikle birçok meyve ve sebze antioksidan açısından zengindir ve bunları diyetle dahil etmek önemlidir. Günümüzde bu anlamda oldukça geniş çalışmalar yapılmakta ve yeni doğal antioksidan kaynakların bulunması önemli olmaktadır. Bu çalışma kapsamında, Sakarya bölgesinde yetiştirilen mandalina bitkisinin yaprağı etanol ve su ile ekstrakte edilerek bu ekstraktların antioksidan aktiviteleri beş farklı yöntemle incelenmiştir. Bu yöntemler DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl) serbest radikal giderim testi, bakır iyonlarını indirgeme aktivitesi (CUPRAC), demir indirgeme kapasitesi, toplam fenol madde miktarı ve toplam flavonoid madde miktarı tayin yöntemleridir. Elde edilen sonuçlar değerlendirildiğinde mandalina yapraklarının etanol ekstraktının tüm antioksidan test değerlerinde su ekstraktına göre yüksek olduğu belirlenmiştir.

Anahtar Kelimeler – Antioksidan, Mandalina Yaprığı, DPPH Aktivite, Bakır İyonlarını İndirgeme (CUPRAC), İndirgeme Kapasitesi.

I. GİRİŞ

Antioksidanlar, serbest radikallerin yol açtığı oksidatif hasarı önleyen veya en azından sınırlayan bileşiklerdir. Oksidatif stres, vücutta normal metabolik süreçlerin bir sonucu olarak serbest radikallerin aşırı birikmesiyle ortaya çıkar ve bu durum hücrel düzeyde hasara yol açarak, kanser, diyabet, kardiyovasküler hastalıklar ve nörolojik bozukluklar gibi birçok kronik hastalığın gelişiminde rol oynar

[1]. Serbest radikaller, özellikle oksijenin parçalanmasıyla meydana gelen yüksek reaktif moleküllerdir ve DNA, proteinler ve lipidler gibi biyomolekülleri oksitleyerek hücresel işlevleri bozarlar. Antioksidanlar, bu zararlı molekülleri nötralize ederek vücudun doğal savunma mekanizmalarını destekler ve hücre hasarı minimize ederler [2].

Antioksidanlar, doğrudan gıdalardan alınabileceği gibi, vücutta endojen olarak da üretilir. Bununla birlikte, özellikle bitkisel kaynaklı antioksidanlar, fenolik bileşikler, flavonoidler, karotenoidler ve organik asitler gibi çeşitli bileşiklerle zengindir. Bu bileşikler, bitkilerin metabolik süreçlerinde, UV ışınlarına, patojenlere ve diğer çevresel stres faktörlerine karşı savunma mekanizması olarak görev alır. Antioksidan özellikleri nedeniyle, bu bileşikler farmasötik, kozmetik ve gıda endüstrilerinde de yaygın olarak kullanılmaktadır [3].

Citrus türleri, özellikle mandalina (*Citrus reticulata*) [4], hem meyveleri hem de yapraklarıyla bilinen antioksidan potansiyeline sahip bitkiler arasında yer almaktadır. Mandalina yaprağı, zengin bir fenolik bileşik kaynağı olup, flavonoidler (özellikle hesperidin, rutin ve quercetin), fenolik asitler (kafeik asit ve ferulik asit) ve askorbik asit (vitamin C) gibi biyoaktif bileşikler içerir. Bu bileşikler, güçlü serbest radikal giderici özelliklere sahiptir ve vücudun oksidatif strese karşı savunmasını güçlendirir. Özellikle flavonoidler ve fenolik asitler, hücresel oksidasyonu engelleyerek, çeşitli hastalıkların gelişimini önlemede önemli bir rol oynar.

Mandalina yaprağının antioksidan kapasitesi, birçok in vitro ve in vivo çalışmada doğrulanmıştır. Yaprığın etanol, metanol ve su ekstraktlarının serbest radikallerle etkileşimde bulunarak yüksek antioksidan aktivite gösterdiği belirlenmiştir. Bu aktivite, mandalina yaprağının, vücutta serbest radikal birikimini engelleyerek hücrelerdeki oksidatif hasarı azaltma potansiyeline sahip olduğunu göstermektedir. Ayrıca, mandalina yaprağının içeriğindeki vitamin C, bağışıklık sistemini destekleyerek inflamasyonu azaltma ve serbest radikallerin yol açtığı hücre hasarı engelleme kapasitesine sahiptir.

Mandalina yaprağının antioksidan özellikleri, bu bitkinin sağlık alanındaki potansiyel kullanımını artırmaktadır. Geleneksel tıpta, mandalina yaprağı, sindirim sistemi sağlığı, anti-inflamatuar etki ve bağışıklık fonksiyonlarını iyileştirme amacıyla kullanılmaktadır. Son yıllarda yapılan araştırmalar, mandalina yaprağının antioksidan etkinliğinin, özellikle kardiyovasküler hastalıklar, kanser, diyabet ve nörolojik hastalıklar gibi birçok kronik hastalığın önlenmesinde faydalı olabileceğini göstermektedir. Ayrıca, mandalina yaprağının kozmetik endüstrisinde de kullanımı artmaktadır. Cilt sağlığını iyileştirme, yaşlanma karşıtı etkiler gösterme ve ciltteki oksidatif hasarı onarma gibi özellikleri nedeniyle kozmetik ürünlerde yer bulmaktadır [5].

II. MATERYAL VE YÖNTEM

Mandalina yaprağı (*Citrus reticulata*) Sakarya bölgesinden toplanıp ekstraksiyon işlemleri uygulanmıştır.

A. Kullanılan Kimyasallar

Antioksidan aktivite değerlendirmeleri için DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl), Trolox (\pm -6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-carboxylic acid), BHT (Butylated hydroxy-toluene), etanol, $K_4Fe(CN)_6 \cdot 3H_2O$, TCA, $FeCl_2$ (Demir(II) klorür), $FeCl_3$ (Demir(III) klorür), ferrozin, hidroklorik asit, fosforik asit, Folin-Ciocalteu reaktifi, askorbik asit ve $NaHPO_4$ gibi kimyasallar Sigma-Aldrich (Almanya) firmasından temin edilmiştir.

B. Bitki Ekstraktlarının Hazırlanması

Bu çalışmada, Sakarya bölgesinde yetişen mandalina (*Citrus reticulata*) yapraklarının iki farklı çözücü ile ekstraksiyon yöntemi uygulanmış ve elde edilen özlerinin antioksidan aktivitesi değerlendirilmiştir. İlk olarak, mandalina yaprakları su ile yıkanıp yaklaşık 40°C sıcaklıkta etüvde kurutulmuş ve bir öğütücüde ince toz haline getirilmiştir. Etanol ekstraksiyonu, yaprak örneklerinin etanolde belirli bir süre

bekletilmesiyle gerçekleştirilmiş ve ardından çözücüsü buharlaştırılarak öz elde edilmiştir. Ekstraksiyon sonrasında, süzme işlemi Whatman filtre kâğıdı aracılığıyla yapılmış, elde edilen süzüntü buharlaştırılarak katı hale getirilmiş ve istenilen konsantrasyonlarda etanolde çözülüp stok çözeltisi hazırlanmıştır. İkinci ekstraksiyon yöntemi olarak, 40C'de kurutulmuş yaprak örnekleri alınarak sıcak su ile 7 dakika süreyle demlenmiştir.

C. DPPH serbest radikali giderim aktivitesi tayini

Bitkilerin ve standart maddelerin DPPH radikal giderme aktivitesi, Brandt-Williams ve arkadaşlarının metodolojisine göre belirlenmiştir [6]. DPPH çözeltisi etanol içerisinde hazırlanmış ve bu çözeltilerden alınan örneklerle, farklı konsantrasyonlarda (100-500 µg/mL aralığında) bitki ekstraktları eklenmiştir. Örnekler, oda sıcaklığında 30 dakika süreyle inkübe edilmiştir. Ardından, absorbans değerleri, bir spektrofotometre cihazında 517 nm dalga boyunda ölçülmüştür. Standart olarak Trolox kullanılmıştır. Deneyler üç kez tekrarlanmış ve her bir ölçüm için ortalama değerler hesaplanmıştır [7]. Absorbans değerindeki azalma, DPPH çözeltisinin serbest radikal süpürme aktivitesini yansıtmaktadır. DPPH radikal giderme kapasitesi, aşağıdaki formülle hesaplanmıştır:

$$\text{DPPH giderim kapasitesi (\% inhibisyon)} = [(A_0 - A_1) / A_0] \times 100$$

A_0 = Kontrol absorbansın değeri

A_1 = Örneğin veya standardının absorpsiyon değeri

D. Bakır İyonlarını İndirgeme Tayini (CUPRAC)

Bir cam tüpe, sırasıyla bakır (II) çözeltisi, neokuproin çözeltisi ve amonyum asetat tampon çözeltisi eklenmiştir. Ardından, tüpe antioksidan çözeltisi ve distile su ilave edilerek iyice karıştırılmıştır. Hazırlanan çözeltiler, oda sıcaklığında ve ağzı kapalı olarak 30 dakika süreyle inkübe edilmiştir. İnkübasyon süresi tamamlandıktan sonra, örnek içermeyen referans çözeltisi ile karşılaştırmalı olarak, 450 nm dalga boyunda absorbans ölçümleri gerçekleştirilmiştir [8].

E. İndirgeme Kapasitesi Tayini

Bitki ekstraktlarının indirgeme kapasitesi, ortamda bulunan Fe^{3+} iyonlarının Fe^{2+} iyonlarına indirgenmesi ve $FeCl_3$ ilavesiyle oluşan mavi renkteki kompleks bileşiğin absorbans değerinin ölçülmesiyle belirlenmektedir [9]. İndirgeme kapasitesindeki artış, absorbans değerinin yükselmesiyle doğru orantılıdır. 100-1000 µg/mL konsantrasyonları arasında hazırlanan 1 mL bitki ekstraktları ve standart madde çözeltilerine, sırasıyla 2,5 mL %1'lik $K_4Fe(CN)_6 \cdot 3H_2O$ çözeltisi ve 2,5 mL 0,2 M fosfat tamponu eklenmiştir. Çözeltiler, 50°C'de 20 dakika süreyle inkübe edilmiştir. Ardından, 2,5 mL %10'luk TCA eklenerek, 3000 rpm'de 8 dakika santrifüj edilmiştir. Santrifüj sonrası elde edilen süpernatantlardan 2,5 mL alınarak, eşit hacimde distile su ve 0,5 mL %0,1'lik $FeCl_3$ çözeltisi ile karıştırılmış ve 700 nm dalga boyunda, deiyonize suya karşı absorbans ölçümleri yapılmıştır. Tüm analizler üç tekrarlı olarak gerçekleştirilmiştir.

F. Toplam Fenolik Bileşik Madde Miktarı

Folin-Ciocalteu reaktifi kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Bitki ekstraktının hazırlanan stok çözeltisinden alınarak, saf su ile karıştırılır. Ardından, %2'lik Na_2CO_3 çözeltisi ve Folin-Ciocalteu reaktifi eklenmiş ve karışım, vorteks ile iyice karıştırılmıştır. Karışım, oda sıcaklığında 2 saat inkübe edilmiştir. Sonrasında, absorbans değeri 760 nm dalga boyunda spektrofotometre ile ölçülmüş ve elde edilen sonuçlar, gallik asit eşdeğeri (GAE) cinsinden hesaplanmıştır [10].

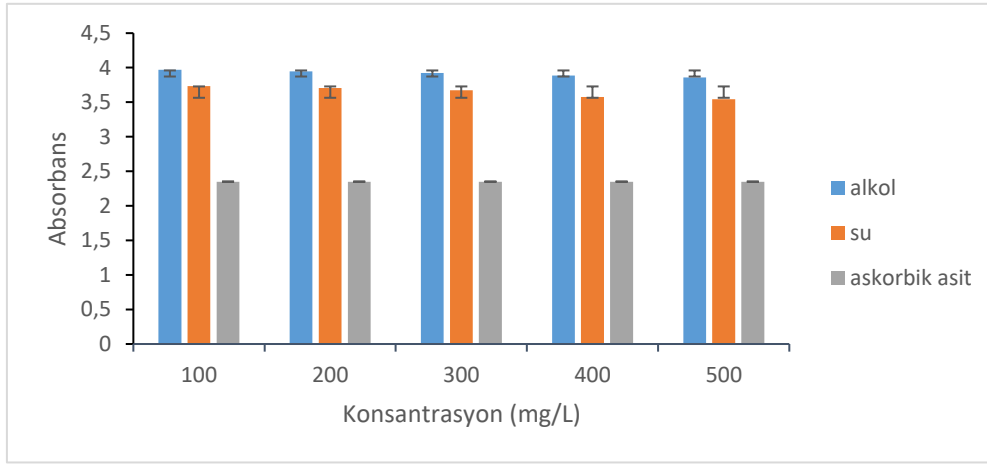
G.Toplam Flavonoid Bileşik madde miktarı

Bitki ekstraktının stok çözeltisinden alınarak, etanol ile karıştırılır. Ardından, sırasıyla %10'luk alüminyum nitrat ($Al(NO_3)_3$) ve 1M amonyum asetat (NH_4CH_3COO) çözeltileri eklenmiştir. Karışım, vorteks cihazında karıştırıldıktan sonra, oda sıcaklığında 40 dakika süreyle inkübe edilmiştir. İnkübasyon süresi sonunda, absorbans ölçümleri spektrofotometre kullanılarak 415 nm dalga boyunda gerçekleştirilmiş ve kaydedilmiştir. Elde edilen sonuçlar, kuersetin eşdeğeri (QE) cinsinden hesaplanmıştır [11].

III. BULGULAR

A. DPPH Serbest Radikal Giderim Aktivitesi Tayini

Sakarya bölgesinden toplanan mandalina yaprağı örnekleri, etanol ve su ile ekstrakte edilerek DPPH serbest radikal giderme aktivitesi değerlendirilmiştir. Ekstraktlar, 100-500 $\mu g/mL$ konsantrasyonlarında kullanılmıştır. Standart olarak Trolox kullanılmıştır. Elde edilen veriler Şekil 1'de sunulmuştur.

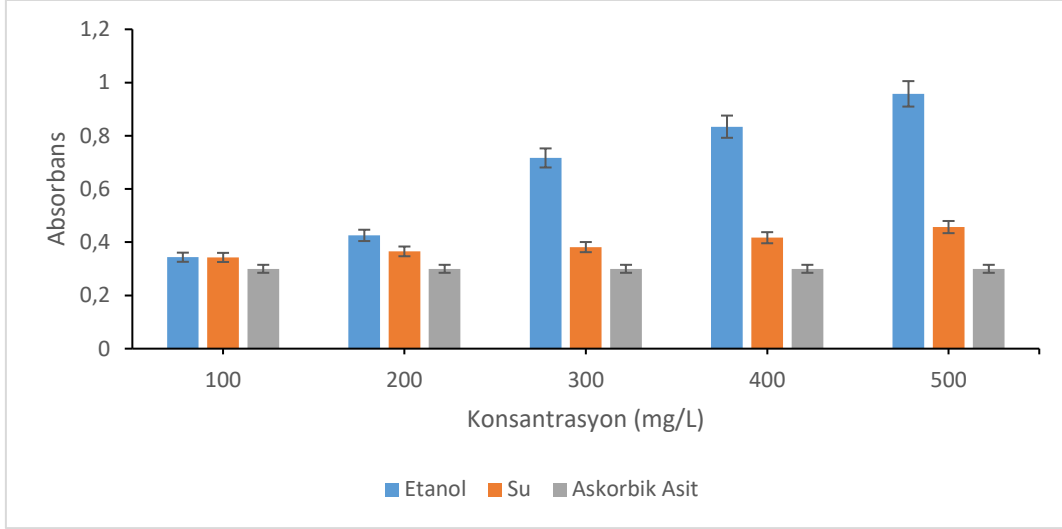


Şekil 1. Mandalina yaprağının etanol ve su ekstraktlarının DPPH serbest radikal kapasitesi

Elde edilen sonuçlara göre tüm ekstraktların trolox standartına oranla DPPH serbest radikal giderim aktiviteleri düşük olmasına rağmen etanol ekstraktı su ekstraktına oranla yüksek olduğu gözlenmiştir.

B. İndirgeme Kapasitesi Tayini

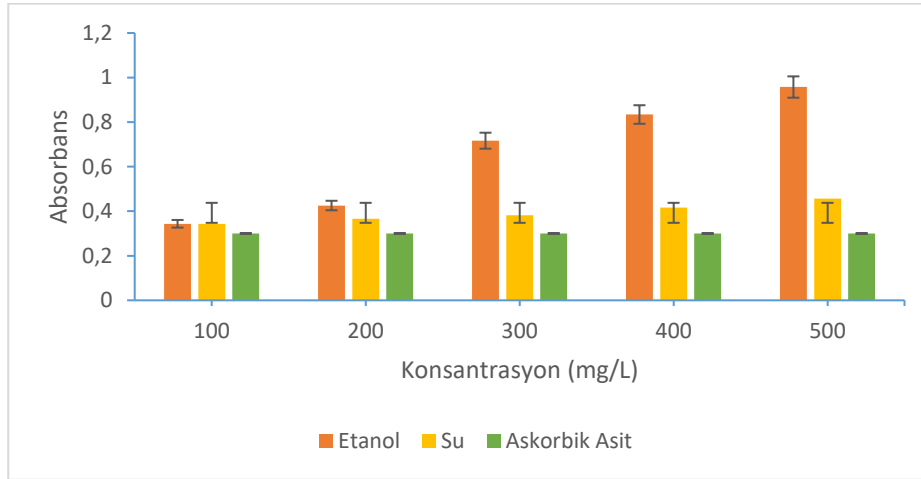
Demir iyonlarının indirgeme tayini yöntemi kullanılarak, mandalina yaprağının etanol ve su ekstraktlarının antioksidan aktiviteleri değerlendirilmiştir. Bu yöntem, Fe^{3+} iyonlarının Fe^{2+} 'ye indirgenmesi prensibine dayanmaktadır. Mandalina yaprağı etanol ve su ekstraktlarının indirgeme kapasitesine ilişkin elde edilen sonuçlar Şekil 2'de sunulmuştur. Sonuçlara göre, ekstraktların indirgeme kapasitesinin konsantrasyon ile paralel olarak arttığı gözlemlenmiştir. Yapılan testlerde, mandalina yaprağı etanol ekstraktlarının, standart antioksidan madde askorbik asitten daha yüksek indirgeme kapasitesine sahip olduğu belirlenmiştir. Elde edilen veriler, en yüksek indirgeme kapasitesinin etanol ekstraktlarında gözlemlendiğini göstermektedir.



Şekil 2. Mandalina yaprağının etanol ve su ekstraktların demir indirgenme kapasiteleri

C. Bakır (II) İyonlarını İndirgeme Tayini (CUPRAC)

Maddelerin indirgeme güçleri ile antioksidan aktiviteleri arasında genellikle doğrusal bir ilişki bulunmaktadır. Bu kapsamda, mandalina yaprağından elde edilen ekstraktların ve standartların demir indirgeme kapasiteleri incelenmiş ve sonuçlar Şekil 3'te sunulmuştur. Elde edilen veriler, askorbik asit ile karşılaştırılarak eşdeğerlik hesaplanmıştır. Sonuç olarak etanol ekstraktının su ekstraktına ve standarta göre yüksek olduğu gözlenmiştir.



Şekil 3. Mandalina yaprağının etanol ve su ekstraktlarının bakır iyonlarını indirgeme kapasitesi

D. Toplam Fenolik Bileşik ve Toplam Flavonoid Bileşik Madde Miktarı

Ekstraktın toplam fenolik ve flavonoid içeriği, deneysel bölümde belirtilen yöntemler kullanılarak spektrofotometrik olarak belirlenmiş ve etanol ekstraktının antioksidanı demleme ekstraktına göre yüksek çıktığını gözlemledik. Elde edilen sonuçlar Tablo 1'de sunulmuştur.

Tablo 1. Mandalina yaprağının etanol ve su ekstraktlarının toplam fenol –toplam flavonoid madde miktarları

Özüt	Toplam Fenol (mg GAE/g)	Toplam Flavonoit (mg QE/g)
Etanol	16,51	8,31
Su	12,35	3,16

IV. TARTIŞMA

İnsan vücudunda kararsız radikallerin neden olduğu oksidatif stresi ortadan kaldırmanın en önemli yollarından biri antioksidan maddelerin etkinliğidir. Antioksidanlar, serbest radikalleri nötralize ederek hücrel hasarı engelleyebilen bileşiklerdir. Bu maddeler, vücutta doğal olarak üretilbildiği gibi, dışarıdan besin yoluyla da alınabilirler. Hem endojen hem de eksojen antioksidanlar, serbest radikalleri temizleyici olarak görev yaparak vücudun savunma sisteminin etkinliğini artırır ve böylece çeşitli hastalıkların risklerini azaltır.

Bu bağlamda, bu çalışmada Sakarya Bölgesi'nden mandalina yaprakları toplanmıştır. İki farklı çözücü, su ve etanol ile ekstraksiyon yöntemi uygulanarak hem demleme hem de etanol ekstraktları elde edilmiştir. Elde edilen bu ekstraktlar, DPPH serbest radikal giderimi aktivitesi, bakır (II) iyonlarını indirgeme (CUPRAC), indirgeme kapasitesi, toplam fenolik madde tayini ve toplam flavonoid madde tayini yöntemleriyle test edilmiştir. Literatürde de bu konuda çalışmalar mevcut olup narenciye türlerinin kabukları ekstraktları incelendiğinde DPPH ve ABTS değerleri arasında yüksek korelasyon olup bunu toplam fenolik ve toplam flavonoid içerikleri desteklediği gözlenmiştir [12,13]. Buradaki çalışmada da mandalina yapraklarının etanol ekstraktlarının uygulanan tüm antioksidan metodlarda su ekstraktlarına oranla daha yüksek ve artan konsantrasyonlalar antioksidan özelliklerinin arttığı ve bununda toplam fenol ve flavonoid miktarları ile orantılı olduğu belirlenmişti. Bu sonuçlar literatürdeki çalışmalarla benzerlik içerisindedir.

V. SONUÇLAR

Bu çalışmada, Sakarya bölgesinde yetiştirilen mandalina (*Citrus reticulata*) yaprağının etanol ve demleme ekstraktlarının antioksidan aktiviteleri farklı yöntemle karşılaştırılmıştır. Kullanılan yöntemler arasında DPPH radikal giderme testi, demir indirgeme kapasitesi, Bakır (II) iyonu indirgeme (CUPRAC), toplam fenolik madde tayini ve toplam flavonoid madde tayini yer almıştır. Bu çalışmada elde edilen sonuçlar uygulanan tüm metodlar da genel olarak mandalina yaprağının etanol ekstraktının su ekstraktına göre daha yüksek oranda antioksidan aktiviteye sahip olduğunu göstermiştir.

KAYNAKLAR

- [1]. O. I. Aruoma, "Free radicals, oxidative stress, and antioxidants in human health and disease", Journal of the American Oil Chemists' Society, 75, 199-212, 1998.
- [2]. E. Cadenas & K. J. A. Davies, Mitochondrial free radicals. Free Radical Biology and Medicine, 29(3-4), 222-230, 2000.
- [3]. B. Halliwell, & J. M. C. Gutteridge, Free Radicals In Biology And Medicine. Oxford University Press, 2007.
- [4]. J. F. Ayala-Zavala, S. Y. Wang, C. Y. Wang & G. A. González-Aguilar, Effect of storage temperatures on antioxidant capacity and aroma compounds in strawberry fruit. LWT Food Science and Technology, 37(7), 687-695, 2004.
- [5]. M. D. López, Antioxidant and antimicrobial properties of mandarin (*Citrus reticulata*) peel essential oil. Journal of the Science of Food and Agriculture, 95(12), 2431-2439, 2015.
- [6]. W. Brand-Williams, M. E. Cuvelier & C. Berset, Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. LWT- Food Science and Technology, 28(1), 25-30, 1995.

- [7]. C. Sánchez-Moreno, Methods used to evaluate the free radical scavenging activity in foods and biological systems. *Food Science and Technology International*, 8(3), 121-137, 2002.
- [8]. R. Apak, K. Güçlü, M. Ozyürek, S. E. Karademir, & S. E. Çelik, Novel total antioxidant capacity index for antioxidants based on their cupric ion reducing capacity: CUPRAC method. *Free Radical Research*, 42(3), 135-144, 2008.
- [9]. M. Oyaizu, Studies on products of browning reactions: Antioxidative activities of products of browning reaction prepared from glucosamine. *Japanese Journal of Nutrition*, 44(6), 307-315, 1986.
- [10]. V. L. Singleton, & J. A. Rossi, Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. *American Journal of Enology and Viticulture*, 16(3), 144-158, 1965.
- [11]. J. Zhishen, , T. Mengcheng, & W. Jianming, The determination of flavonoid contents in mulberry and their scavenging effects on superoxide radicals. *Food Chemistry*, 64(4), 555-559, 1999.
- [12]. D. Barreca, E. Bellocco, U. Leuzzi, G. Gattuso , First evidence of C- and O-glycosyl flavone in blood orange (*Citrus sinensis* (L.) Osbeck) juice and their influence on antioxidant properties. *Food Chemistry*, 149, 244–252, 2014.
- [13]. K. Papoutsis, P. Pristijono, J. B. Golding, C. E. Stathopoulos, M. C. Bovyer, C. J. Scarlett, Q. V. Vuong , Optimisation of aqueous extraction conditions for the recovery of phenolic compounds and antioxidants from lemon pomace. *International Journal of Food Science & Technology*, 51, 2009–2018, 2016.