

## Edirne İlinde Yetişen Dut Ağacı Yapraklarının Antioksidan ve Antidiyabetik Aktivitesi Üzerine Bir Çalışma

Şebnem Selen İşbilir<sup>1\*</sup>, Ecren Çelik<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Kimya Bölümü, Fen Fakültesi, Trakya Üniversitesi, Edirne, Türkiye

### Makale Tarihi

Gönderim: 08.01.2021

Kabul: 21.05.2021

Yayın: 20.09.2021

### Araştırma Makalesi

**Öz** – Dut yaprakları halk arasında çeşitli hastalıklarda geleneksel olarak kullanılan bir bitkidir. Bitkilerin gösterdikleri çok çeşitli biyolojik etkinlikleri içerdikleri bileşenlerden kaynaklanmakta olup, bitkinin fitokimyasal bileşimi ve biyolojik potansiyeli yetiştiği bölgeye göre değişiklik göstermektedir. Bu çalışmada Edirne ilinde yetişen beyaz ve siyah dut ağacı yapraklarından elde edilen su ve etanol ekstraktlarının antioksidan aktivitesinin ve *in vitro* enzim inhibisyon testleri ile antidiyabetik kapasitesinin belirlenmesi amaçlanmıştır. Beyaz ve siyah dut ağacı yaprak ekstraktlarının toplam fenolik madde miktarı 35.08-47.57 µg gallik asit eşdeğeri/mg, flavonoid miktarı 18.40-46.25 µg rutin eşdeğeri/mg ve tanen miktarı 4.59-7.53 µg tannik asit eşdeğeri/mg aralıklarında tayin edildi. Antioksidan aktivite testlerinde 1,1-difenil-2-pikrilhidrazil (DPPH) ve 2,2'-azinobis-(3-etilbenzotiazolin-6-sülfonik asit) (ABTS) radikallerini gidermede (EC<sub>50</sub> sırasıyla 0.31 mg/mL ve 0.79 mg/mL) ve CUPRAC metodunda (9.1 µmol troloks eşdeğeri antioksidan kapasite-TEAC) siyah dut yapraklarının etanol ekstraktı yüksek aktivite gösterirken, beta-karoten ağartma metodunda beyaz dut yapraklarının etanol ekstraktı (EC<sub>50</sub> 0.47 mg/mL) daha iyi sonuç verdi. Dut yapraklarının sadece su ekstraktlarının metal iyonlarını şelatlama gücüne sahip olduğu görüldü. Antidiyabetik aktivite çalışmasında yaprakların su ekstraktları değişen oranlarda α-amilaz ve α-glukozidaz inhibisyonu gösterdi. Su ekstraktlarının karbonhidrat sindirim enzimleri üzerine potansiyel inhibitör etkisi göstermesi, ülkemizde besin olarak tüketilmeyen dut yapraklarının ilaç hammaddesi kaynağı olarak değerlendirilebileceğini; siyah dut yapraklarının ise antioksidan katkı amaçlı olarak kozmetik uygulamalarda kullanılmak üzere ekonomiye kazandırılabilirliğini düşündürmektedir.

**Anahtar Kelimeler** – Antiradikalik aktivite, dut ağacı yaprağı, enzim inhibisyonu, fenolik madde, metal şelatlama

## A Study on Antioxidant and Antidiabetic Activities of Mulberry Leaves Which Grown in Edirne Province

<sup>1</sup>Department of Chemistry, Faculty of Science, Trakya University, Edirne, Turkey

### Article History

Received: 08.01.2021

Accepted: 21.05.2021

Published: 20.09.2021

### Research Article

**Abstract** – Mulberry leaves are used traditional medicine in many diseases. The various biological activities of the plants are due to its chemical contents, therefore the phytochemical composition and biological potential of the plant vary according to the region where it grows. In this study, it was aimed to determine the antioxidant activity and antidiabetic potential using *in vitro* inhibition tests of leaves of white and black mulberry obtained from trees grown in Edirne. Total phenolic, flavonoid and tannin contents of leaves extracts were determined in the range of 35.08-47.57 µg gallic acid, 18.40-46.25 µg rutin and 4.59- 7.53 µg tannic acid equivalents, respectively. While ethanol extract of black mulberry leaves showed high activity in CUPRAC method (9.1 µmol TEAC), 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) and 2,2'-azinobis-(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) (ABTS) radicals scavenging assays (EC<sub>50</sub> 0.31 mg/mL and 0.79 mg/mL, respectively), the ethanol extract of white mulberry leaves showed better carotene bleaching activity (EC<sub>50</sub> 0.47 mg/mL). Only water extracts of leaves were observed to have metal chelating capacity. In the antidiabetic activity study, the water extracts of leaves showed varying degrees of inhibition on α-amylase and α-glucosidase. The potential inhibitory effect of water extracts on carbohydrate digestive enzymes shows that mulberry leaves can be considered as a source of a drug candidate in the antidiabetic drug researches. Also black mulberry leaves can be used in cosmetic applications due to their antioxidant properties.

**Keywords** – Antiradical activity, mulberry tree leaf, enzyme inhibition, phenolic content, metal chelating

<sup>1</sup> sebnemselenisbilir@trakya.edu.tr

<sup>2</sup> ecren\_11\_93@hotmail.com

\*Sorumlu Yazar / Corresponding Author

## 1. Giriş

Antioksidanlar serbest radikallerin zararlı etkilerine karşı metabolizmanın korunmasını sağlayan endojen veya eksojen maddelerdir. Günümüzde serbest radikaller ve oksidatif stres; yaşlanma, katarakt, diyabet, kanser, kardiyovasküler hastalıklar, çeşitli dokuların ve organların hasarı gibi birçok hastalık ile ilişkilendirildiği ([Dasgupta ve Klein, 2014](#); [Halliwell ve Gutteridge, 1990](#)) için metabolizmanın eksojen kaynaklı antioksidanlarca desteklenmesi önem kazanmıştır. Ayrıca lipid peroksidasyonunu önlemek üzere gıda sektöründe, kozmetik ve ilaç endüstrilerinde de antioksidan etkili moleküller veya karışımlar kullanılmaktadır. Bu sektörlerce ve tüketiciler tarafından özellikle taze meyve ve sebzelerde bulunan doğal antioksidanlara karşı artan bir ilgi vardır. Bitkilerin antioksidan özellikleri polifenolik bileşikler, karotenoidler ve askorbik asit başta olmak üzere içerikleri fitobileşenlerden kaynaklanmaktadır. Başlıca fenolik asitler, flavanonlar, flavonlar, antosiyaninler, izoflavonlar, tanenleri kapsayan polifenolik bileşikler; bitkilerin sekonder metabolitleridir ve bitkilerin savunma mekanizması olarak birçok kısmında sentezlenirler ([Pietta, Minoggio ve Bramati, 2003](#)).

Günümüze kadar yapılan antioksidan aktivite çalışmalarında meyve, sebze, baharat ve tıbbi bitkilerin çeşitli kısımları kullanılmıştır. Doğal antioksidan madde arayışında, incelenen antioksidan kaynağının etkili ve güvenilir olmasının yanında, son zamanlarda ucuz olması, kolay elde edilebilir olması ve atık bitkisel materyallerin değerlendirilmesi gibi özelliklere de sahip olması bir hedef haline gelmiştir. Bu sebeple meyveleri yenilebilen ancak yaprakları besin olarak kullanılmayan ağaçlar bu alandaki çalışmalarda yer almaktadır ([Gougoulis, 2015](#); [Liaudanskas vd., 2014](#); [Orak, Selen İsbilir ve Yagar, 2012](#); [Pontes vd., 2019](#); [Souza vd., 2020](#); [Zoral ve Turgay, 2014](#)).

Dut bitkisi Moraceae (Dutgiller) familyasından *Morus* cinsini oluşturan ağaç türleridir. Beyaz dut (akdut) ve siyah dut (karadut) olarak bilinen *Morus alba* ve *Morus nigra*'nın meyveleri sevilen bir yiyecek iken, yaprakları gıda olarak tüketilmemektedir. Beyaz dut ağacı meyvesi için, gölgesinden yararlanmak için ve yaprakları ipekböceği yetiştiriciliğinde kullanılmak üzere yetiştirilmektedir. Karadut eczacılıkta ilaçların tadını ve kokusunu değiştirmede, gıda sektöründe ise renk pigmenti olarak kullanılmaktadır. Ülkemizde dut yaprakları geleneksel halk ilacı olarak da kullanılmaktadır. Dut yaprağından hazırlanan çay; halk arasında boğaz iltihaplarını tedavi etme, kuru öksürüğü giderme, egzama tedavisi, kan şekerini düşürme amaçlarıyla kullanılırken, karadut meyvelerinden elde edilen şurup ise yeni doğmuş bebeklerin ağızlarında oluşan pamukçuk tedavisinde kullanılmaktadır. Beyaz ve siyah dut yaprakları özellikle kan şekeri seviyesini düşürmek amaçlı ülkemizin çeşitli bölgelerinde kullanılmaktadır ([Tuzlacı ve Bulut, 2007](#); [Tuzlacı ve Sadıkoğlu, 2007](#); [Tuzlacı ve Şenkardes, 2011](#)). Uzakdoğu ülkelerinde ise özellikle Çin tıbbında dut ağacının yaprak ve dalları karaciğeri korumak, ateş ve kan basıncını düşürmek için kullanılırken, Tayland'da dut yaprağı çayı antidiyabetik bir içecek olarak tüketilmektedir. Bununla birlikte son zamanlarda Çin'de dut yaprakları sebze olarak günlük diyete eklendiği için, pek çok dut çeşidi besin ve fonksiyonel bileşenleri açısından da bilimsel araştırmaların konusu olmaktadır ([Xiao vd., 2020](#); [Yu vd., 2018](#)).

Diyabet hastalığında geleneksel halk ilacı olarak çeşitli bitkiler kullanılmaktadır ([Yatoo vd., 2017](#)). Ülkemizde kullanılanlardan bazıları kudret narı, banaba, çemen, gurmar, tarçın, ginseng türleri, zeytin yaprağı, kekik, iğde yaprağı, ardıç ve ısırgandır ([Aslan ve Orhan, 2010](#); [Tuzlacı ve Sadıkoğlu, 2007](#); [Tuzlacı ve Bulut, 2007](#)). Genellikle şeker hastalığı olarak bilinen Diabetes mellitus (DM), başta karbonhidrat metabolizması olmak üzere lipid ve protein metabolizmalarını da etkileyen; hiperglisemiyle karakterize, kronik, metabolik bir hastalıktır ([Sonia ve Sharma, 2014](#)). DM'nin tıbbi tedavi sürecindeki temel yaklaşımlardan biri  $\alpha$ -amilaz ve  $\alpha$ -glukozidaz gibi karbonhidratları parçalayan enzimlerin inhibisyonunu sağlayarak, karbonhidrat emilimini azaltmaktır ([Çubuk ve İnce, 2015](#)). Bitkilerde yaygın olarak bulunan diyet polifenollerinin antioksidan kapasitelerinin yanında, sözü geçen bu sindirim enzimlerine karşı inhibitör etkilerinin de olduğu bildirilmiştir ([Xiao vd., 2013](#); [Asgar, 2013](#)). Literatürde farklı tür ve menşei dut yapraklarının antioksidan ve hipoglisemik etkilerini inceleyen çalışmalar mevcuttur ([Anwar vd., 2015](#); [Hasim, Uci ve Didah, 2020](#); [He vd., 2020](#); [Iqbal vd., 2012](#); [Levickiene vd., 2017](#); [Thabti, Marzougui, Elfalleh ve Ferchichi, 2011](#); [Yu vd., 2018](#)). Bu

çalışmalar incelendiğinde; dut yapraklarıyla yapılan antioksidan aktivite çalışmalarının toplam fenolik madde ve flavonoid tayinlerinin yanında özellikle DPPH veya ABTS radikallerini giderme aktivitesi ile sınırlı oldukları görülmektedir. Ayrıca bitkinin türü ve cinsi gibi genetik faktörler; iklim, bitkinin yetiştirildiği bölge, toprak çeşidi gibi çevresel etkiler ve tarım uygulamalarına bağlı faktörler dolayısıyla çalışılan dut yapraklarının biyoaktif bileşen miktarları geniş bir aralıkta olabildiği için gösterdikleri biyolojik aktiviteler de farklı olabilmektedir. Bu sebeplerden dolayı sunulan bu çalışmada Edirne ilinde yetişen beyaz ve siyah dut yapraklarının *in vitro* antidiyabetik aktivitesinin ve antioksidan aktivitesinin incelenmesi hedeflenmiştir. Dut yapraklarının antioksidan aktivitesi beş farklı metod (DPPH<sup>•</sup> ve ABTS<sup>•+</sup> giderme gücü,  $\beta$ -karoten ağartma metodu, CUPRAC metodu, metal şelatlama kapasitesi) kullanılarak kapsamlı bir şekilde değerlendirilmiş ve ekstraktlarda toplam fenolik madde, flavonoid madde ve tanen miktar tayinleri de yapılmıştır. Yapılan çalışma ile Edirne yöresinde yetiştirilen bu iki dut ağacı türünün yaprakları, içerdiği fitobileşenler ve antioksidan potansiyelleri açısından kıyaslanmıştır.

## 2. Materyal ve Yöntem

Musabeyli Köyü (Edirne)'nde yetişmiş olan beyaz ve siyah dut ağacı yaprakları yerel halk pazarından (Haziran, 2017) satın alındı. Kullanılan kimyasal maddeler Sigma-Aldrich ve Riedel-de Haen firmalarından satın alınmış olup, hepsi analitik saflıktadır.

### 2.1. Bitki Ekstraktlarının Hazırlanması

Yapraklar laboratuvarında direk güneş ışığı almayan, aydınlık ve havadar bir ortamda kurutulduktan sonra Waring blenderde öğütüldü. Kurutulmuş ve parçalanmış olan beyaz ve siyah dut yapraklarının üzerine örnek:çözücü oranı 1:25 (w/v) olacak şekilde etanol (%80) eklendi. Toplam 6 saat 25°C'de 180 rpm çalkalamalı su banyosunda ekstraksiyonları yapıldı. Süzüldükten sonra çözücüsü evapore edildi. Su ekstraktlarının hazırlanması için siyah ve beyaz dut yapraklarına örnek:çözücü oranı 1:10 (w/v) olacak şekilde saf su eklenerek, ağzı kapalı halde 15 dk ısıtıcıda 80°C'de ısıtıldı. Süzüldükten sonra örnekler liyofilize edildi. Deneylerde, elde edilen bu ham ekstraktlar kullanıldı. Tüm denemeler iki kez tekrarlandı ve her seferinde ikişer paralel örnek çalışıldı.

### 2.2. Fitobileşen Miktarının Tayini

Fenolik madde, flavanoid ve tanen miktar tayinleri spektrofotometrik yöntem kullanılarak gerçekleştirildi. Toplam fenolik madde tayini Folin-Ciocalteu reaktifi (FCR) kullanılarak [Singleton ve Rossi'nin \(1965\)](#) metoduna göre yapıldı. 100  $\mu$ L (1 mg/mL) örnek üzerine 4.5 mL destile su, 100  $\mu$ L FCR eklendi. Vortekste çalkalandıktan sonra 300  $\mu$ L %2'lik Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> eklendi ve iki saat çalkalamalı su banyosunda bekletildi. Spektrofotometrede 760 nm'de absorpsanları ölçüldü. Standart fenolik madde olarak 50-500  $\mu$ g/mL konsantrasyon aralığındaki gallik asit çözeltileri kullanıldı.

Toplam flavonoid tayininde AlCl<sub>3</sub> ile örneklerin şelat oluşturması esasına dayanan metod kullanıldı ([Zhishen, Mengcheng ve Jianming, 1999](#)). Etanol ve su ekstraktı örneklerinden 0.1 mL alınarak, hacimleri destile su ile 2.5 mL'ye tamamlandı. Üzerlerine 75  $\mu$ L %5 NaNO<sub>2</sub> eklendikten sonra 5 dk oda sıcaklığında bekletildi. Daha sonra 150  $\mu$ L %10'luk AlCl<sub>3</sub>·6H<sub>2</sub>O eklenip 6 dk oda sıcaklığında bekletildi. 0.5 mL 1 M NaOH eklenerek vortekslendi ve oluşan pembe renkli komplekslerin absorpsanları 510 nm'de ölçüldü. Standart flavonoid olarak 25-200  $\mu$ g/mL konsantrasyon aralığındaki rutin çözeltileri kullanıldı.

Tanen tayini için; 100  $\mu$ L (1 mg/mL) örnek üzerine 500  $\mu$ L Folin-Denis reaktifi ve 1 mL doymuş Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> çözeltisi eklendi. Toplam hacim saf su ile 10 mL'ye tamamlandıktan sonra 30 dk bekletildi ve  $\lambda=700$  nm'de absorpsanları ölçüldü ([Katoch, 2011](#)). Standart olarak 10-70  $\mu$ g/mL konsantrasyon aralığındaki tannik asit çözeltileri kullanıldı.

### 2.3. Antioksidan Aktivite Testleri

DPPH ve ABTS süpürme metodları kullanılarak örneklerin serbest radikal süpürme kapasiteleri belirlendi. Blois'in metoduna ([Blois, 1958](#)) göre çalışılan DPPH radikal süpürme aktivitesinde farklı konsantrasyonlarda (100-1000 µg/mL) hazırlanan örnek veya standart madde (BHA, bütillenmiş hidroksi anisol) çözeltilerine 0.1 mM DPPH çözeltisi eklendi ve 30 dakika oda koşullarında karanlıkta bekletildi, 517 nm'de absorbansları okundu. Örnek yerine etanol veya su kullanılarak kontrol tüpü hazırlandı. Denklem 2.1 kullanılarak standartların ve örneklerin serbest radikal giderme etkinlikleri % inhibisyon olarak hesaplandı.  $A_{\text{Kontrol}}$  kontrol tüpünün absorbansını ve  $A_{\text{Örnek}}$  örnek veya standartın absorbansını göstermektedir.

$$\%I = [ (A_{\text{Kontrol}} - A_{\text{Örnek}}) / A_{\text{Kontrol}} ] \times 100 \quad (2.1)$$

ABTS radikal süpürme aktivitesi deneyinde, ABTS çözeltisi ve sodyum persülfat çözeltisi 1:0.5 oranında karıştırılarak 16 saat bekletildi ve ABTS radikalinin ( $\text{ABTS}^{\bullet+}$ ) oluşumu sağlandı. Hazırlanan çözeltinin absorbansı etanolle seyreltilerek 734 nm'de 0.70 absorbans verecek hale getirildikten sonra kullanıldı. ABTS radikal çözeltisi eklenen örnek (100-1000 µg/mL) veya standart madde (BHT, bütillenmiş hidroksi toluen) çözeltileri 30 dk karanlıkta bekletildikten sonra 734 nm'de absorbansları ölçüldü ([Re vd., 1999](#)). Denklem 2.1'deki formül kullanılarak radikal giderme oranları hesaplandı.

Dut yaprağı ekstraktlarına β-karoten ağartma yöntemi uygulanarak ekstraktların lipid peroksidasyonunu önleme yetenekleri incelendi ([Miller ve Luiz-Larrea, 2002](#)). 100-1000 µg/mL konsantrasyonlarda hazırlanan örneklere, β-karoten ve linoleik asitten oluşan substrat emülsiyonu eklendi.  $\lambda=490$  nm'de ilk absorbansları ( $t_0$ ) ölçüldü. Mikroplakalar etüvde 50 °C'de 2 saat inkübe edildikten sonra absorbansları ( $t_{120}$ ) tekrar ölçüldü. Sentetik antioksidan BHT ile deney tekrarlandı. Tüm örnekler için denklem 2.2 ve 2.3'te verilen formüller ile hesaplamalar yapılarak, ortamda oluşturulan lipid peroksidasyonunu engelleme oranları % inhibisyon olarak hesaplandı.

$$R = [ \ln(A_{t_0} / A_{t_{120}}) ] / t \quad (2.2)$$

$$\beta\text{-Karoten ağartma oranı (\%I)} = [ (R_{\text{Kontrol}} - R_{\text{Örnek}}) / R_{\text{Kontrol}} ] \times 100 \quad (2.3)$$

Denklem 2.2'deki t inkübasyon süresini;  $A_{t_0}$  örneklerin inkübasyondan önceki ilk absorbans ölçümünü;  $A_{t_{120}}$  örneklerin inkübasyondan sonraki absorbans ölçümünü; R β-karotenin bozunma oranını ifade etmektedir.

Beyaz ve siyah dut yaprağı ekstraktlarının antiradikal aktivite ve lipid peroksidasyonunu önleme sonuçları  $EC_{50}$  değeri olarak verildi.  $EC_{50}$  (etkin konsantrasyon) değeri ortamdaki radikalın yarısını gidermek için gerekli olan ekstrakt miktarı olarak tanımlanmakta olup, ekstrakt konsantrasyonuna karşı inhibisyon grafikleri çizilerek hesaplanmaktadır.  $EC_{50}$  faktörü antioksidan aktiviteyi değerlendirmede en sık kullanılan parametredir ([Molyneux, 2004](#)).

Ekstraktların toplam antioksidan aktivite tayini CUPRAC (Bakır (II) indirgeyici antioksidan kapasite) yöntemi ile çalışıldı ([Apak, Güçlü, Özyürek ve Karademir, 2004](#)). Mikroplaka kuyucuklarına eşit hacimde (50 µL)  $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ , neokuproin ve amonyum asetat tampon (pH=7.0) çözeltileri konuldu. Üzerlerine her bir ekstraktan (50-750 µg/mL) eklendikten sonra su ile belirlenen toplam hacme (205 µL) tamamlandı ve 30 dk karanlıkta bekletildi.  $\lambda=450$  nm'de absorbans ölçümleri yapıldı. Ekstraktlar yerine alkol veya saf su konularak kontrol çalışıldı. Standart antioksidan (BHT) için de aynı deney prosedürü uygulandı. Antioksidan özellik gösteren çeşitli bileşiklerin antioksidan güçleri, troloks eşdeğeri antioksidan kapasitesi (TEAC) olarak verilmektedir.  $TEAC_{\text{CUPRAC}}$  değerlerini bulmak için test edilen bileşiğin ve troloksun konsantrasyon-absorbans grafikleri çizildi ve grafiklerin eğimleri birbirine oranlandı (Denklem 2.4) ([Apak vd., 2004](#)).

$$TEAC_{CUPRAC} = E_{\text{Örnek}} / E_{\text{Troloks}} \quad (2.4)$$

Metal şelatlama aktivitesi tayininde dut yaprağı ekstraktlarının  $Fe^{+2}$  iyonlarını şelatlama kapasitesi Dinis ve arkadaşlarının açıkladığı prosedüre göre çalışıldı (Dinis vd., 1994). Dut yaprağı su ve etanol ekstraktları 25-1000  $\mu\text{g/mL}$  konsantrasyon aralığında hazırlandı. Örnekler  $FeCl_2$  çözeltisi eklenerek 30 dk oda sıcaklığında bekletildi. Daha sonra ortama demir iyonu ile pembe renkli kompleks yapan ferrozin çözeltisi eklendi ve 10 dk bekletildikten sonra 562 nm'de absorbansları ölçüldü. Ekstrakt eklenmeden kontrol tüpü hazırlandı. Bu metodda düşük absorbans değerleri, yüksek demir iyonu şelatlama gücünü ifade etmektedir. Örneklerin metal giderme kapasiteleri Denklem 2.5 kullanılarak % olarak hesaplandı.

$$\text{Metal şelatlama oranı (\%)} = [(A_{\text{Kontrol}} - A_{\text{Örnek}}) / A_{\text{Kontrol}}] \times 100 \quad (2.5)$$

#### 2.4. Antidiyabetik Aktivite Testleri

Örneklerin antidiyabetik etkisini belirlemek üzere Apostolidis ve ark. önerdiği metod kullanıldı (Apostolidis, Kwon ve Shetty, 2007). Deney tüpüne 0.5 mL %0.1'lik nişasta ve 0.1 mL amilaz enzimi (3.0 U, domuz pankreatik kaynaklı) alınarak 25 °C'de 15 dk inkübe edildi. 3,5-dinitro salisilik asit (DNS) reaktifi eklenerek 5 dk kaynatıldı. Tüpler soğutulduktan sonra 550 nm'de absorbansları ölçüldü. Enzim yerine tampon alınarak şahit numune tüpü çalışıldı.

Ekstraktların  $\alpha$ -amilaz enzimi üzerinde inhibe edici etkisinin olup olmadığını incelemek için; öncelikle ekstraktlar (1.0, 2.5, 5.0 ve 10 mg/mL konsantrasyonlarda) ve amilaz enzimi 37 °C'de 15 dk inkübe edildi. Daha sonra yukarıdaki prosedür uygulandı. Ayrıca her bir örnek için enzim yerine tampon konularak numune körleri çalışıldı. Ekstrakt eklenmeden enzim aktivitesi ölçülen tüp %100 aktif kabul edildi. Denklem 2.6 kullanılarak örneklerin  $\alpha$ -amilaz enzimini inhibe etme oranları hesaplandı. Denklemde  $A_{\text{Amilaz}}$  %100 aktif kabul edilen tüpün absorbansı;  $A_{\text{Ekstrakt}}$  örneklerin absorbanslarından, numune körü absorbansları çıkarıldıktan sonra elde edilen absorbans değerini ifade etmektedir.

$$\text{Amilaz inhibisyonu (\%)} = [(A_{\text{Amilaz}} - A_{\text{Ekstrakt}}) / A_{\text{Amilaz}}] \times 100 \quad (2.6)$$

$\alpha$ -Glukozidazın aktivite tayininde substrat olarak p-nitrofenil- $\alpha$ -D-glukopiranosid (p-NPG) ve enzim çözeltisi (0.2 U, *Saccharomyces cerevisia* kaynaklı  $\alpha$ -glukozidaz) karıştırılarak 37 °C'de 15 dk inkübe edildi. 0.1 M  $Na_2CO_3$  çözeltisi eklendikten sonra 405 nm'de absorbansları okundu (Apostolidis, Kwon ve Shetty, 2007).

Ekstraktların  $\alpha$ -glukozidaz enzimi üzerinde inhibe edici etkisinin olup olmadığını incelemek için; 1.0, 2.5, 5.0, 10 mg/mL'lik konsantrasyonlardaki ekstraktlar enzim ile 37 °C'de 15 dk inkübe edildi. Daha sonra yukarıdaki gibi  $\alpha$ -glukozidaz aktivite tayin prosedürü uygulandı. Enzim yerine tampon konularak ekstraktların numune körleri çalışıldı. Ekstraktların  $\alpha$ -glukozidaz inhibisyon değerleri denklem 2.7'deki formül ile % inhibisyon olarak hesaplandı.  $A_{\text{Glukozidaz}}$  %100 aktif kabul edilen tüpün absorbansı;  $A_{\text{Ekstrakt}}$  örneklerin absorbanslarından numune körü absorbansı çıkarıldıktan sonra elde edilen absorbans değerini ifade etmektedir.

$$\text{Glukozidaz inhibisyonu (\%)} = [(A_{\text{Glukozidaz}} - A_{\text{Ekstrakt}}) / A_{\text{Glukozidaz}}] \times 100 \quad (2.7)$$

### 3. Bulgular ve Tartışma

Bitkilerin gösterdikleri biyolojik aktiviteleri ve sağlık üzerindeki etkileri içerdikleri başta fenolik bileşikler olmak üzere diğer biyoaktif metabolitlere atfedildiği için, öncelikle elde edilen ham ekstraktların toplam fenolik bileşik, flavonoid ve tanen miktarları belirlendi. Dut yaprağı ekstraktlarının fenolik madde içeriği bitkilerde en yaygın olarak bulunan gallik asit eşdeğeri olarak; flavonoidler geniş bir çeşitlilik gösterdiğinden flavonoid içeriği bir flavonol glikozidi olan rutin eşdeğeri olarak ve tanen miktarı ise hidrolizlenebilen tanenlerden en sık bulunan tannik asit eşdeğeri olarak hesaplandı (Tablo 1).

Tablo 1.  
Dut yapraklarının su ve etanol ekstraktlarının fitobileşen içerikleri

Ekstrakt/ Çözücü	Kısaltma	Toplam Fenolik <sup>1</sup> µg GAE/mg	Toplam Flavonoid <sup>2</sup> µg RE/mg	Tanen <sup>3</sup> µg TAE/mg
Beyaz Dut Yaprağı/Su	B-Su	47.57±0.21	40.97±0.11	4.59±0.29
Beyaz Dut Yaprağı/Etanol	B-EtOH	35.08±0.16	19.64±0.08	6.05±0.48
Siyah Dut Yaprağı/Su	S-Su	47.22±0.24	46.25±0.14	5.15±0.68
Siyah Dut Yaprağı/Etanol	S-EtOH	37.69±0.42	18.40±0.07	7.53±0.54

<sup>1</sup>Gallik asit eşdeğeri olarak, <sup>2</sup>Rutin eşdeğeri olarak ve <sup>3</sup>Tannik asit eşdeğeri olarak tayin edilmiştir. Sonuçlar 2 deneyin ortalaması ± standart sapma olarak verilmiştir.

Çalışmada siyah ve beyaz dut yapraklarının su ekstraktlarındaki (S-Su ve B-Su) fenolik madde miktarları etanol ekstraktlarından (S-EtOH ve B-EtOH) daha yüksektir. Siyah ve beyaz dut yapraklarının su ekstraktlarındaki toplam flavonoid miktarları, etanol ekstraktlarındakinin yaklaşık iki katı kadardır. Tanen miktarları birbirine yakın olmakla birlikte, 4.59-7.53 µg TAE/mg aralığındadır. Elli çeşit dut yaprağının %70'lik etanol ekstraktlarındaki tanen dağılımı 0.45-1.49 g/100 g olarak bildirilmiştir (Xiao vd., 2020). He vd. (2020) 12 çeşit dut yaprağının %50'lik etanol ekstraktlarında fenolik madde içeriğini 11.49-30.03 mg GAE/g ve flavonoid içeriğini de 24.24-58.42 mg RE/g aralığında belirlemişlerdir. Diğer bir çalışmada da 19 çeşit dut yaprağının %80'lik metanol ekstraktları için fenolik madde içeriği 8.76-20.26 mg GAE/g ve flavonoid içeriği ise 21.36-56.41 mg RE/g olarak tayin edilmiştir (Yu vd., 2018). Çalışmamızda tayin edilen flavonoid miktarları bu çalışmaların sonuçlarına yakın iken, toplam fenolik miktarları biraz daha yüksek değerlerdedir. Chon vd. (2009) beyaz dut (*Morus alba* L.)'un kök, yaprak, dal ve meyvesi ile yaptıkları çalışmalarında, en yüksek fenolik madde miktarının bitkinin kök ve yaprak kısımlarında olduğunu ifade etmişlerdir. Elde edilen metanolik ekstraktlarda toplam fenolik sıralamasını kg başına mg ferulik asit eşdeğeri cinsinden kök (117.7±2.0) > yaprak (71.4±2.4) > dal (49.0±1.5) > meyve (11.2±0.3) olarak bildirmişlerdir.

Dut ağacının farklı bölgelerde yetişmesi, ağacın türü, yaprağın toplanma zamanı ve olgunluk derecesi bitkinin biyobileşen içeriğini önemli ölçüde etkilemektedir. Ayrıca taze veya kurutulmuş örneklerle çalışılması, ekstraksiyon yöntemi ve çözücüsü de ekstrakta geçen fitobileşen içeriğini ve dolayısıyla ekstraktın göstereceği biyolojik aktiviteyi etkilemektedir. Zhishen vd. (1999) ilkbaharda (Mayıs, 11.7-26.6 µg rutin ekivalenti/g) toplanan dut yapraklarının flavonoid miktarlarının sonbaharda (Kasım, 9.84-23.4 µg rutin ekivalenti/g) toplananlardan daha yüksek olduğunu bildirmiştir. Aynı çalışmalarında taze yapraklar ile etüvde veya oda koşullarında kurutulmuş yaprakların flavonoid miktarlarının da farklı olduğunu belirtmişlerdir. He vd. (2020) genç yaprakların fenolik ve flavonoid içeriğinin olgun yapraklardan daha yüksek olduğunu ve daha yüksek antioksidan aktivite gösterdiklerini bildirmiştir. Fenolik ve flavonoid içeriğinde gözlenen bu farklılıklar çözücü ve ekstraksiyon proseslerinin çeşitliliğinden kaynaklanabileceği gibi, miktar tayini için kullanılan standart maddelerin farklı olması da çalışmaların kıyaslanmasını zorlaştırmaktadır.

Gıda, bitki ekstraktları ve biyolojik sistemlerin antioksidan kapasitelerini değerlendirmek için çeşitli *in vitro* metodlar kullanılmaktadır. Bu metodlar kullanılan substratın cinsi ve özelliği, oksidasyon şartları, test ortamının heterojenitesi gibi birçok faktörden etkilenmektedir ve dolayısıyla antioksidan kapasiteyi belirleyebilmek için kullanılacak standart bir tek metod yoktur. Bu yüzden gıda veya bitki ekstraktının antioksidan aktivitesini belirlemek için birden fazla metod kullanılmaktadır. Bu çalışmada da dut yaprağı ekstraktlarının serbest radikal süpürme etkinliğini belirlemek için DPPH ve ABTS radikallerini giderme metodları kullanıldı. CUPRAC ve  $\beta$ -karoten ağartma yöntemleri ile toplam antioksidan kapasiteleri belirlendi. Geçiş metalleri reaktif oksijen türlerinin oluşumunda rol oynadığı için örneklerin metal şelatlama aktivitesi de değerlendirildi.

Çalışmamızda siyah dut yaprağı, özellikle alkol ekstraktı, serbest radikal gideriminin ölçüldüğü iki metotta da beyaz dut yaprağından daha iyi sonuç vermiştir (Tablo 2). Her iki dut yaprağı etanol ekstraktlarının DPPH radikalini süpürme etkinliği konsantrasyona bağlı olarak artmakla birlikte, 500  $\mu\text{g}/\text{mL}$  ve üzerindeki konsantrasyonlarda daha yüksek olarak gözlenmiştir. Ayrıca siyah dut yaprağı etanol ekstraktının ( $\text{EC}_{50}=0.31$   $\text{mg}/\text{mL}$ ) DPPH' giderme gücünün, sentetik antioksidan BHA ( $\text{EC}_{50}=0.24$   $\text{mg}/\text{mL}$ ) ile karşılaştırılabilir düzeyde olduğu görülmektedir. Chon vd. (2009) dut bitkisinin (*Morus alba* L.) farklı kısımlarıyla yaptıkları çalışmada DPPH serbest radikalini giderme deneyinde 1000  $\mu\text{g}/\text{g}$  konsantrasyonda en yüksek aktiviteyi yaparak (%70), dal ve kökten elde edilen metanol ekstraktlarında; en düşük aktiviteyi ise %35 inhibisyon oranı ile meyve metanol ekstraktında tayin etmişlerdir. Çalışmamızda DPPH giderme oranı 1000  $\mu\text{g}/\text{mL}$  konsantrasyonda beyaz dut yaprağı etanol ekstraktında %83.16 $\pm$ 0.16, su ekstraktında ise %56.02 $\pm$ 2.84 olarak belirlenmiştir.

Tablo 2.

Siyah ve beyaz dut yaprağı ekstraktlarının antioksidan aktiviteleri

	DPPH <sup>*</sup> giderme ( $\text{EC}_{50}$ $\text{mg}/\text{mL}$ )	ABTS <sup>++</sup> giderme ( $\text{EC}_{50}$ $\text{mg}/\text{mL}$ )	Karoten ağartma ( $\text{EC}_{50}$ $\text{mg}/\text{mL}$ )	CUPRAC ( $\mu\text{mol TEAC}$ )
B-Su	0.53	0.83	-	5.5 $\pm$ 0.12
B-EtOH	0.52	0.84	0.47	8.7 $\pm$ 0.08
S-Su	0.415	0.83	-	6.5 $\pm$ 0.07
S-EtOH	0.31	0.79	0.72	9.1 $\pm$ 0.11
Sentetik Antioksidan	0.24 (BHA)	0.05 (BHT)	0.03 (BHT)	52.6 $\pm$ 0.24 (BHT)

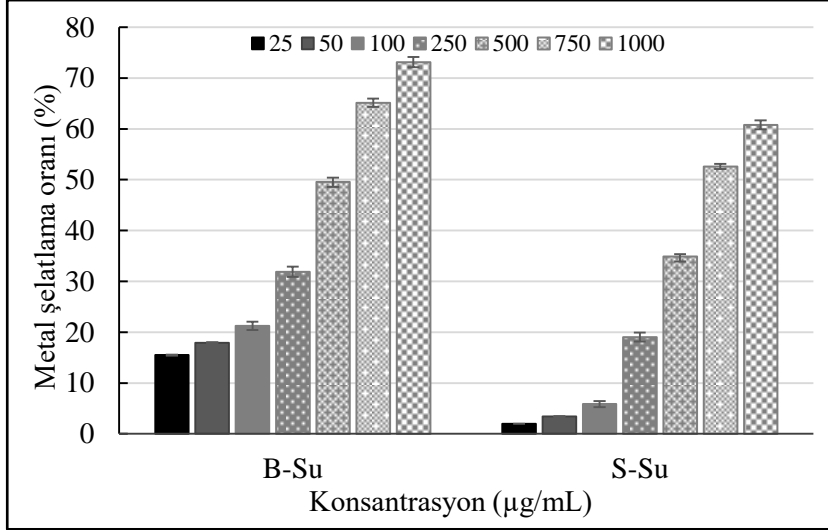
100-1000  $\mu\text{g}/\text{mL}$  konsantrasyon aralığında çözeltileri hazırlanan her bir dut yaprağı örneklerinin antiradikal etkinliği ABTS<sup>++</sup> giderme metodu ile de çalışıldı. Artan konsantrasyonla birlikte radikal giderme etkinliğinde artış olmasına rağmen, tüm örneklerde en yüksek inhibisyon oranları en yüksek konsantrasyonda gözlemlendi. Tablo 2'de verilen  $\text{EC}_{50}$  değerlerine göre ABTS radikalini gidermede en etkili örneğin, 0.79  $\text{mg}/\text{mL}$   $\text{EC}_{50}$  değeri ile siyah dut yaprağı etanol ekstraktının olduğu görülmektedir. Benzer şekilde Anwar vd. (2015) de dört tür dut yaprağından *Morus nigra* (siyah dut) yapraklarının güçlü antioksidan ve antimikrobiyal aktivite gösterdiğini bildirmişlerdir. He vd. (2020) 12 çeşit dut yaprağı ile yaptıkları araştırmada, DPPH ve FRAP antioksidan metodlarından elde ettikleri verilere göre, bazı kültürlerin daha yüksek aktivite gösterdiğini ve genel olarak da flavonoid ve fenolik miktarı yüksek olan dut yapraklarının yüksek antioksidan aktiviteye sahip olduğunu rapor etmişlerdir. Dutun meyvesiyle de çalışılmıştır; Gündoğdu vd. (2011) üç tür dut meyvesiyle yaptıkları ABTS radikali giderme çalışmasında, koyu renkli dutların açık renkli dutlardan daha yüksek TEAC değeri olduğunu bildirmişlerdir. Dut meyvesiyle ilgili başka bir çalışmada ise DPPH radikali, süperoksit ve hidroksil radikallerini giderme etkinlikleri çalışılmış ve genel olarak etanol ekstraktlarının 400  $\mu\text{g}$  ve üzerindeki miktarlarda iyi derecede DPPH' süpürme etkinliği olduğu bildirilmiştir (Bae ve Suh, 2007).

Ekstraktların toplam antioksidan aktivitesi  $\beta$ -karoten/linoleik asit model sistemi kullanılarak değerlendirildi. Yöntemin temeli ısı etkisiyle linoleik asit oksidasyonu sonucu oluşan peroksitlerin inhibisyonunun ölçülmesi esasına dayanır. Bu metotta tüm örnekler 100-1000  $\mu\text{g/mL}$  konsantrasyon aralığında çalışılmış ve su ekstraktlarından elde edilen sonuçların %40 inhibisyon oranının altında olduğu görülmüştür. Dolayısıyla bu sonuç deneysel ortamda oluşturulan lipid peroksidasyonunu önlemede, siyah ve beyaz dut yapraklarının su ekstraktlarının yeterince etkili olmadığını işaret etmektedir. Bu durum; diğer metodlara göre daha apolar karakterli olan test ortamında, su (1.00) ve etanol (0.65) çözücülerinin polaritelerinin farklı olması ve bu sebeple etanol ekstraktından daha fazla etki alınmış olmasıyla açıklanabilir. Alkol ekstraktları, su ekstraktlarına göre daha iyi olmakla birlikte 500  $\mu\text{g/mL}$  ve üzerindeki konsantrasyonlarda lipid peroksidasyonunu önlemede etkili olmuşlardır. Konsantrasyon-% inhibisyon grafiklerinden bulunan  $\text{EC}_{50}$  değerleri beyaz dut yaprağının etanol ekstraktı için 0.47  $\text{mg/mL}$  ve siyah dut yaprağının etanol ekstraktı için 0.72  $\text{mg/mL}$  olarak hesaplanırken, sentetik antioksidan BHT için ise 0.03  $\text{mg/mL}$  olarak hesaplanmıştır (Tablo 2). Literatürde eritrosit membran modeli (Andallu, Shankaran, Ullagaddi ve Iyer, 2014) ve amonyum tiyosiyanat yöntemi (Anwar vd., 2015) olarak bilinen farklı metodlar kullanılarak dut yapraklarının lipid peroksidasyonunu önlemesine dair yapılan çalışmalar bulunmaktadır. Anwar vd. 'nin araştırmasında çalışılan dört tür (*M. alba*, *M. nigra*, *M. macroura* Miq ve *M. laevigata* W.) dut ekstraktının yüksek oranlarda (%60.23-88.51) aktivite gösterdiği, Andallu vd. 'nin çalışmasında ise *Morus indica* L. yaprak ekstraktının eritrosit membran modelinde oluşturulan lipid peroksidasyonunu ve hidroperoksidlerin oluşumunu azalttığı bildirilmiştir. Hasim, Uci ve Didah (2020) *M. alba* L. (beyaz dut) yaprağı etanol ekstraktının, ısıyla indüklenen linoleik asit oksidasyonunu önleme gücünü TBA (tiyobarbitirik asit) metodu ile tayin etmişler ve çalıştıkları konsantrasyonlarda %36-45.3 inhibisyon oranlarına ulaşmışlardır.

Toplam antioksidan kapasitenin ölçümü; hidrofilik ve lipofilik antioksidanlara daha iyi cevap verebilen ve daha kararlı olan CUPRAC deneyi kullanılarak da değerlendirildi. Bu metotta örneklerin kuprik iyonunu, kupröze indirgeme kapasiteleri troloks eşdeğeri antioksidan kapasitesi (TEAC) olarak verilmekte ve büyük TEAC değeri yüksek antioksidan kapasiteyi ifade etmektedir. Karoten ağartma metodu ile yapılan toplam antioksidan aktivite tayinine benzer şekilde; her iki dut çeşidi için de alkol ekstraktlarından elde edilen sonuçlar su ekstraktlarına göre daha yüksek bulundu (Tablo 2).

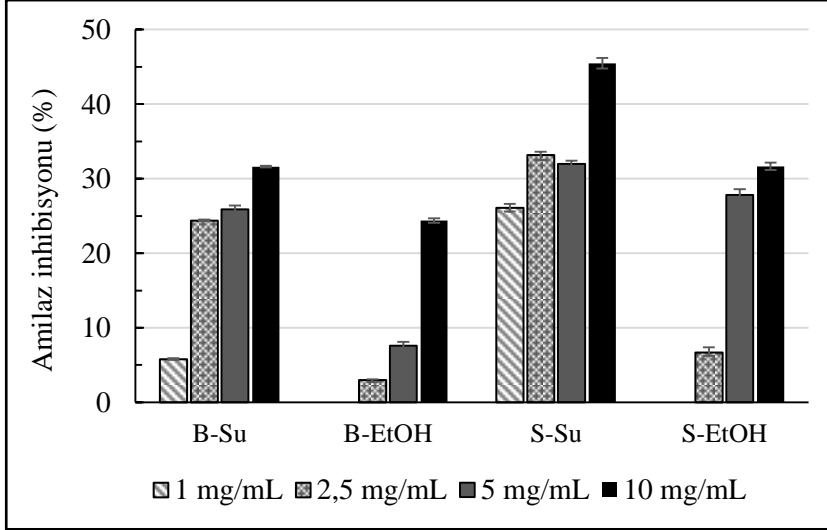
Hidrojen peroksit, geçiş metalleri arasında özellikle  $\text{Fe}^{+2}$  varlığında en reaktif tür olan hidroksil radikalinin oluşumuna yol açar. Bu yüzden geçiş metallerinin şelatlanması lipid peroksidasyon sürecinin önlenmesi veya geciktirilmesinde önemli rol oynamaktadır. Uygulanan metod  $\text{Fe}^{+2}$  iyonlarını bağlamak üzere, güçlü bir demir şelatlayıcı olan ferrozin reaktifi ile örnekte bulunan metal bağlayıcı bileşiklerin yarışması esasına dayanır. Örnek tarafından  $\text{Fe}^{+2}$ /ferrozin kompleksinin oluşumunun engellenmesi yani düşük absorban okunması örneğin metal şelatlama gücü olduğunun göstergesidir. Çalışmamızda siyah ve beyaz dut yaprağı su ekstraktları etanol ekstraktlarından daha iyi metal şelatlama yapmıştır ve bu ekstraktlarda metal şelatlama gücünde konsantrasyona bağlı bir artış gözlenmiştir. Ancak çalışılan tüm konsantrasyonlarda, alkol ekstraktlarının metal şelatlama oranları %15'in altında kalmıştır (grafikte gösterilmedi). En yüksek aktivite beyaz dut yaprağının su ekstraktında (B-Su) görülmüştür (Şekil 1). Fenolik bileşiklerden antosiyaninlerin metal şelatlama gücü olmadığı, ancak polifenolik bileşikler ve özellikle flavonoidlerin metal şelatlama kapasitesinin olduğu rapor edilmiştir (Brouillard ve Dangles, 1993). Çalışmamızda her iki dut türünün de su ekstraktlarının metal şelatlama gücünün alkol ekstraktlarından daha iyi olması; su ekstraktlarının toplam fenolik ve flavonoid miktarlarının alkol ekstraktlarına göre daha yüksek olmasından kaynaklanabilir.



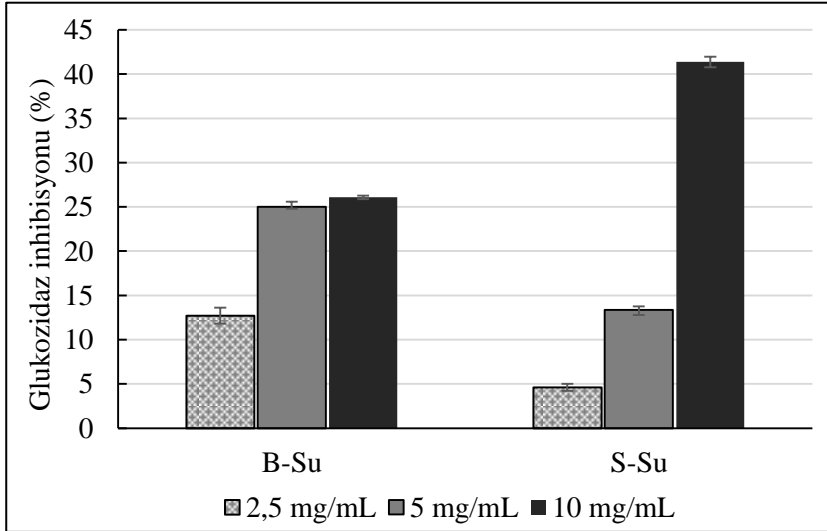


Şekil 1: Siyah ve beyaz dut yaprağı su ekstraktlarının metal şelatlama oranları (%) (Değerler 2 deneyin ortalaması  $\pm$  standart sapma olarak verilmiştir)

Diyabet tedavisinde en önemli terapötik yaklaşımlardan birisi yemek sonrası (postprandial) hiperglisemiye düşürmektir. Bu da sindirim kanalında karbonhidratları hidrolizleyen  $\alpha$ -amilaz ve  $\alpha$ -glukozidaz enzimlerinin inhibisyonu yoluyla karbonhidrat emilimini engelleyerek yapılmaktadır.  $\alpha$ -Glukozidaz inhibitörleri günümüzde oral antidiyabetik ajan olarak kullanılmaktadır ([Artuluk ve Ezer, 2012](#)), ancak yan etkileri olmayan ve doğal kaynaklı inhibitör arayışı da devam etmektedir. Dut kan şekerini düşürmek amaçlı halk ilacı olarak kullanıldığı için ([Tuzlacı ve Sadıkoğlu, 2007](#); [Tuzlacı ve Bulut, 2007](#)), dut ağacının farklı kısımlarıyla ilgili olarak dutun hipoglisemik etkisini incelemeye yönelik *in vivo* çalışmalar mevcuttur ([Bondada, Venkat ve Nallanchakravarthula, 2014](#); [Jozefczuka vd., 2017](#)), dut yaprağıyla ilgili olarak deneysel diyabet yapılmış sıçanlarda *Morus alba* (beyaz dut) yapraklarının ekstraktlarının hipoglisemik etkisi incelenmiştir ([Madalageri vd., 2016](#); [Mohammadi ve Naik, 2012](#)). Çalışmamızda dut yapraklarının antidiyabetik kapasitesini değerlendirmek üzere; su ve etanol ekstraktlarının dört konsantrasyonunda çalışılarak *in vitro*  $\alpha$ -amilaz ve  $\alpha$ -glukozidaz inhibisyon testi yapılmıştır. Her iki enzim için de; dut yapraklarının su ekstraktlarının alkol ekstraktlarından daha yüksek oranda enzimleri inhibe ettiği görüldü.  $\alpha$ -Amilaz enzimini siyah dut yaprağının etanol ekstraktı (S-EtOH) en yüksek  $31.65 \pm 0.48$  oranında inhibe ederken, su ekstraktı (S-Su)  $45.48 \pm 0.42$  oranında inhibe etmiştir ([Şekil 2](#)). Beyaz dut yaprağının su ekstraktında (B-Su), artan konsantrasyon ile inhibisyon oranı artmasına rağmen en fazla  $31.61 \pm 0.12$  oranında inhibisyon gözlenmiştir. Pozitif kontrol olarak kullanılan akarboz,  $\alpha$ -amilaz enzimini 1 mg/mL konsantrasyonda bile  $76.77 \pm 5.22$  oranında inhibe etmiştir.



Şekil 2: Siyah ve beyaz dut yaprağı ekstraktlarının  $\alpha$ -amilaz % inhibisyon oranları (Değerler 2 deneyin ortalaması  $\pm$  standart sapma olarak verilmiştir)



Şekil 3: Siyah ve beyaz dut yaprağı ekstraktlarının  $\alpha$ -glukozidaz % inhibisyon oranları (Değerler 2 deneyin ortalaması  $\pm$  standart sapma olarak verilmiştir)

Dut yapraklarının etanol ekstraktları çalışılan konsantrasyonlarda  $\alpha$ -glukozidaz enzimi üzerinde inhibisyon etkisi göstermezken, siyah dut yaprağının su ekstraktı (S-Su) 10 mg/mL konsantrasyonunda glukozidaz enzimini  $41.36 \pm 0.65$  oranında inhibe etmiştir.  $\alpha$ -Glukozidaz inhibitörü olarak kullanılan akarbozun inhibisyon oranı 1 mg/mL konsantrasyonda  $52.83 \pm 2.15$ 'tir. [Hasim, Uci ve Didah \(2020\)](#) da çalışmalarında beyaz dut yaprak ekstraktının  $309.8 \mu\text{g/mL}$   $\text{IC}_{50}$  değeri ile akarbozdan ( $\text{IC}_{50}$   $0.25 \mu\text{g/mL}$ ) çok düşük oranda inhibisyona yol açtığını belirtmiştir. Antidiyabetik aktivite çalışmasından elde edilen sonuçlar, örneklerin su ekstraktlarının alkol ekstraktlarından daha yüksek enzim inhibisyonuna yol açtığını göstermektedir. Bu, amilaz ve glukozidaz enzimlerini inhibe eden biyoaktif metabolitlerin etanolden çok su ekstraktına geçtiğini işaret etmektedir. Çalışmamızda beyaz ve siyah dut yapraklarının su ekstraktlarındaki toplam fenolik ve flavonoid bileşenleri etanol ekstraktlarından daha yüksek miktarda tayin edilmiştir ([Tablo 1](#)). Dut yaprakları rutin, kersetin, izokersetin ve diğer flavonoidleri içermektedir ([Zhishen vd., 1999](#)). Dut ekstraktlarının  $\alpha$ -glukozidaz üzerinde gösterdiği inhibisyon etkisi içerdiği fenolik ve flavonoid bileşenlerine ek olarak, dut yapraklarında bulunan 1-deksinojirimisin (DNJ) ([Hu vd., 2013](#)) ve moracin ([Tu vd., 2019](#)) gibi diğer biyoaktif bileşenlerden kaynaklanabilir. [Jozefczuka vd., \(2017\)](#) dut yaprağında yüksek oranda bulunan bir iminoşeker türevi

olan 1-deoksinojirimisinini nişasta sindirimini ve absorpsiyonunu azalttığını bildirmiştir. [Liu vd. \(2015\)](#) *M. alba* cinsi dutun dokuz farklı kısmından (genç sürgünler, yaprak, meyve, dalın kabuğu, ağaç gövdesi kabuğu, kök kabuğu, dalın odun kısmı, gövdenin odun kısmı ve kökün odun kısmı) hazırladıkları ekstraktlarda 1-deoksinojirimisin miktar tayinini yaparak, bu bileşiğin ekstraktların  $\alpha$ -glukozidaz üzerine inhibisyon aktivitesini araştırmıştır. DNJ bileşiğinin ağaç gövdesi kabuğu, kök kabuğu, yaprak ve genç sürgün ekstraktlarında diğer kısımlara göre daha yüksek olduğunu, yaprak ve genç sürgünlerin  $\alpha$ -glukozidaz üzerinde yarışmalı tip inhibisyon yaptığını bildirmişlerdir.

Elde edilen sonuçlara göre her iki tür dut yaprağının su ekstraktlarıyla karbonhidrat sindirimiyle ilişkili enzimlerin inhibe edilmesi, halk ilacı olarak dut yaprağı çayının içilmesi şeklindeki geleneksel kullanımı destekler niteliktedir. Bu ekstraktların gösterdiği antidiyabetik etki, dut yaprağının içerdiği bu flavonoid sınıfı fenolik bileşiklerinden kaynaklı olabilir. Flavonoidler ayrıca metal şelatlama, lipid peroksidasyonunu engelleme, reaktif oksijen türlerinin katıldığı prosesleri azaltma özellikleri ile güçlü antioksidan aktivite gösteren bileşiklerdir.

Yapılan bir çalışmada altı farklı kültüre ait dut yaprakları Nisan ve Ekim ayları boyunca her ay toplanarak dört temel fenolik bileşenleri (klorojenik asit, benzoik asit, rutin, astragalın) ve antioksidan aktivite üzerine hasat zamanının etkisi araştırıldığında, sonuçlarda dikkate değer farklılıklar olduğu bildirilmiştir ([Zou vd., 2012](#)). Son yapılan yeni bir çalışmada ise [Xiao vd. \(2020\)](#) 50 dut çeşidinin yapraklarında DNJ, gama-amino bütirik asit (GABA), tannin, flavonoid ve polisakkarit içeriklerini araştırmış ve Çin'in 11 farklı ili, Japonya, Sri Lanka ve Özbekistan'dan toplanan bu dut çeşitlerinde analizlenen biyoaktif bileşenler arasında farklılıklar olduğunu bildirmişlerdir. Dolayısıyla çalışmalarda ağacın türü, yetiştiği yer, materyalin toplanma zamanı gibi parametrelerin bitkinin fitokimyasal içeriği üzerinde etkili olduğu görülmektedir. Eski çağlardan beri yetişen ve farklı kültürlerde farklı uygulama alanları bulan dut yaprakları, önümüzdeki süreçte fonksiyonel bir gıda katkı maddesi olma potansiyeli ile ([İnce ve Çağındı, 2020](#)), özel çay veya içeceklere eklenmek sureti ile veya günlük diyetle sebze olarak dahil edilerek kullanım alanı bulabileceğinden dolayı bu çalışmada Edirne ilinde yetişen beyaz ve siyah dut yapraklarının antioksidan aktivite yönünden kapsamlı incelenmesi ve antidiyabetik aktivite açısından potansiyelinin araştırılması amaçlanmıştır.

#### 4. Sonuçlar

Çalışmamızda Edirne yöresinde yetişmiş olan beyaz ve siyah dut ağacı yapraklarının su ve etanol ekstraktlarının içerdiği fitobileşen miktarları belirlenmiş ve ham ekstrakta geçebilen biyoaktif bileşenlerin antioksidan aktiviteleri DPPH<sup>•</sup> ve ABTS<sup>•+</sup> giderme metodları,  $\beta$ -karoten ağartma metodu, CUPRAC metodu ve metal şelatlama metodunu içeren beş farklı antioksidan aktivite testi kullanılarak değerlendirilmiştir. Tüm ekstraktlarda konsantrasyon artışı ile radikal giderme oranlarında ve toplam antioksidan aktivitede artış olmakla birlikte, siyah dut yaprağının etanol ekstraktı diğerlerine göre daha iyi aktivite göstermiştir. Önemli ikincil metabolitlerden olan polifenolik bileşikler, bitkilerin gösterdikleri antioksidan aktivite ve enzim inhibisyonu gibi biyolojik aktivitelerden sorumludurlar. Çalışmamızda yaprak su ekstraktlarının *in vitro* koşullarda iki önemli karbonhidrat sindirim enziminin aktivitesini azaltması; kaynatılarak içilen dut yaprağı suyunun halk arasında hipoglisemik etki amaçlı kullanımını desteklemesine rağmen, daha genişletilmiş çalışmalara ihtiyaç vardır. Beyaz ve siyah dut yaprağı su ekstraktları, karbonhidrat sindirimi ile ilgili enzimler üzerinde %50'nin altında inhibisyon etkisi göstermiştir. Ancak son zamanlarda bitki kaynaklı doğal ürünler ile enzim inhibisyonu, ilaç geliştirme çalışmalarında önem kazandığı için bu inhibisyon oranları dikkate değerdir. Bu sonuçlar, bitkinin enzim aktivitesini inhibe eden biyoaktif bileşikler içerdiği anlamını taşımakta olup,  $\alpha$ -amilaz ve  $\alpha$ -glukozidaz inhibisyonundan sorumlu bileşiklerin tanımlanmalarına yönelik daha fazla çalışmanın gerçekleştirilmesiyle dut ağacı yaprakları sağlık, gıda veya kozmetik alanlarında doğal bir kaynak olarak değerlendirilebilir.

## Yazar Katkıları

Şebnem Selen İşbilir: Çalışmayı planlamış ve tasarlamış, denetlemiş, verileri kontrol etmiş ve makaleyi yazmıştır.

Ecren Çelik: Deneysel çalışmaları yürütmüş, verileri elde ederek deney sonuçlarını hazırlamıştır.

## Yazar Çatışması

Yazarlar arasında çıkar çatışması yoktur.

## Kaynaklar

- Andallu, B., Shankaran, M., Ullagaddi R. ve Iyer, S. (2014). *In vitro* free radical scavenging and *in vivo* anti-oxidant potential of mulberry (*Morus indica* L.) leaves. *Journal of Herbal Medicine*, 4, 10-17. <https://doi.org/10.1016/j.hermed.2013.10.002>
- Anwar, F., Kanwal, S., Shabir, G., Alkharfy, HM. ve Gilani, AH. (2015). Antioxidant and antimicrobial attributes of different solvent extracts from leaves of four species of mulberry. *International Journal of Pharmacology*, 11(7), 757-765. Erişim adresi: <https://scialert.net/abstract/?doi=ijp.2015.757.765>
- Apak, R., Güçlü, K., Özyürek, M. ve Karademir, S.E. (2004). Novel total antioxidant capacity index for dietary polyphenols and vitamins C and E, using their cupric ion reducing capability in the presence of neocuproine: CUPRAC method. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52, 7970-7981. <http://dx.doi.org/10.1021/jf048741x>
- Apostolidis, E., Kwon, YI. ve Shetty, K. (2007). Inhibitory potential of herbal, fruit, and fungal-enriched cheese against key enzymes linked to type 2 diabetes and hypertension. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 8(1), 46-54. <https://doi.org/10.1016/j.ifset.2006.06.001>
- Arituluk, ZC. ve Ezer, N. (2012). Halk arasında diyabete karşı kullanılan bitkiler (Türkiye)-II. *Hacettepe Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Dergisi*, 32(2), 179-208. Erişim adresi: <https://dergipark.org.tr/tr/pub/hujpharm/issue/49831/639072>
- Asgar A. (2013). Anti-diabetic potential of phenolic compounds: A review. *International Journal of Food Properties*, 16, 91-103. <https://doi.org/10.1080/10942912.2011.595864>
- Aslan, M., Orhan, N., Deliorman Orhan, D. ve Ergun, F. (2010). Hypoglycemic activity and antioxidant potential of some medicinal plants traditionally used in Turkey for diabetes. *Journal of Ethnopharmacology*, 128, 384-389. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2010.01.040>
- Bae, SH. ve Suh, HF. (2007). Antioxidant activities of five different mulberry cultivars in Korea. *LWT- Food Science and Technology*, 40, 955-962. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2006.06.007>
- Blois, M.S. (1958). Antioxidant determinations by the use of stable free radical. *Nature*, 26, 1199-1200.
- Bondada, A., Venkata, AVK. ve Nallanchakravarthula, V. (2014). Influence of mulberry (*Morus indica* L.) leaves on antioxidants and antioxidant enzymes in STZ-diabetic rats. *International Journal of Diabetes Developing Countries*, 34, 69-76. <https://doi.org/10.1007/s13410-013-0139-x>
- Brouillard, R. ve Dangles, O., (1993). Flavonoids and flower colour. In: Harborne JB. (Ed.), *The Flavonoids: Advances in Research Since 1986*, (sf. 565-588). London: Chapman and Hall.
- Chon, S., Kim YM., Park, YJ., Heo, BG., Park, YS. ve Gorinstein, S. (2009). Antioxidant and antiproliferative effects of methanol extracts from raw and fermented parts of mulberry plant (*Morus alba* L.). *European Food Research and Technology*, 230, 231-237. <https://doi.org/10.1007/s00217-009-1165-2>
- Çubuk G. ve İnce S. (2015). Oral Antidiyabetik İlaçlar, *Kocatepe Veterineri Journal*, 8(1), 95-102. Erişim adresi: <https://dergipark.org.tr/tr/download/article-file/385263>
- Dasgupta, A ve Klein, K. (2014). Oxidative Stress Related to Other Diseases, In: A. Dasgupta ve K. Klein (Ed.), *Antioxidants in Food, Vitamins and Supplements: Prevention and Treatment*, (sf. 185-207).
- Dinis, TCP., Madeira, VMC. ve Almeida, LM. (1994). Action of phenolic derivatives (Acetaminophen, salicylate, and 5-aminosalicylate) as inhibitors of membrane lipid peroxidation and as peroxy radical scavengers. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 315(1), 161-169. <https://doi.org/10.1006/abbi.1994.1485>
- Gougoulias, N. (2015). Evaluation of antioxidant activity and polyphenol content of leaves from some fruit species. *Oxidation Communications*, 38(1), 35-45. Erişim adresi: <https://scibulcom.net/en/article/QgkTj37Vp9nJIBTMwHH>

- Gündoğdu, M., Muradoğlu, F., Gazioğlu Sensoy, RI. ve Yılmaz, H. (2011). Determination of fruit chemical properties of *Morus nigra* L., *Morus alba* L. and *Morus rubra* L. by HPLC. *Scientia Horticulturae*, 132, 37-41. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2011.09.035>
- Halliwell B. ve Gutteridge JM., (1990). Role of free radicals and catalytic metal ions in human disease: An overview. *Methods in Enzymology*, 186, 1-85. [https://doi.org/10.1016/0076-6879\(90\)86093-B](https://doi.org/10.1016/0076-6879(90)86093-B)
- Hasim, WAL, Uci, S. ve Didah, NF. (2020). *In vitro*  $\alpha$ -glucosidase inhibition and antioxidant activity of mulberry (*Morus alba* L.) leaf ethanolic extract. *Jurnal Gizi dan Pangan*, 15(1), 45-52. <https://doi.org/10.25182/jgp.2020.15.1.45-52>
- He, X., Chen, X., Ou, X., Ma, L., Xu, X. ve Huang, K. (2020). Evaluation of flavonoid and polyphenol constituents in mulberry leaves using HPLC fingerprint analysis. *International Journal of Food Science and Technology*, 55, 526-533. <https://doi.org/10.1111/ijfs.14281>
- Hu, X., Jiang, L., Zhang, J., Deng, W., Wang, H. ve Wei, Z. (2013). Quantitative determination of 1-deoxynojirimycin in mulberry leaves from 132 varieties. *Industrial Crops and Products*, 49, 782-784. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2013.06.030>
- Iqbal, S., Younas, U., Sirajuddin, D., Chan, KV., Sarfraz, RA. ve Uddin, K. (2012). Proximate composition and antioxidant potential of leaves from three varieties of mulberry (*Morus* sp.): A comparative study. *International Journal of Molecular Science*, 13, 6651-6664. <https://doi.org/10.3390/ijms13066651>
- İnce, C. ve Çağındı, Ö. (2020). Beyaz ve tam buğday unlu ekmek çeşitlerine eklenen beyaz dut (*Morus alba*) yaprak ve posasının antioksidan ve antidiyabetik aktivite üzerine etkisi. *Gıda*, 45(5), 977-988. <https://doi.org/10.15237/gida.GD20039>
- Jozefczuka, J., Malikowska, K., Glapa, A., Nowak JK., Bajerska J., Lisowska A.ve Walkowiak J., (2017). Mulberry leaf extract decreases digestion and absorption of starch in healthy subjects-A randomized, placebo-controlled, crossover study. *Advances in Medical Sciences*, 62, 302-306. <https://doi.org/10.1016/j.advms.2017.03.002>
- Katoch, R. (2011). Methods for nutritional quality evaluation of food materials. In: *Analytical Techniques in Biochemistry and Molecular Biology*. Springer, New York. [https://doi.org/10.1007/978-1-4419-9785-2\\_13](https://doi.org/10.1007/978-1-4419-9785-2_13)
- Levickiene, D., Jarienė, E., Gajewski, M., Danilcenko, H., Vaitkevicienė, N., Przybyl, FL. ve Sitarek, M. (2017). Influence of harvest time on biologically active compounds and the antioxidant activity in leaves of mulberry grown in Lithuania. *Notulae Botanicae Horti Agrobotanici Cluj-Napoca*, 45(2), 431-436. <https://doi.org/10.15835/nbha45210779>
- Liaudanskas, M., Viškėlis, P., Raudonis, R., Kviklys, D., Uselis, N. ve Janulis, V. (2014). Phenolic composition and antioxidant activity of *Malus domestica* leaves. Article ID 306217. <https://doi.org/10.1155/2014/306217>
- Liu, C., Xiang, W., Yu, Y., Shi, Z., Huang, X. ve Xu, L. (2015). Comparative analysis of 1-deoxynojirimycin contribution degree to alfa-glucosidase inhibitory activity and physiological distribution in *Morus alba* L. *Industrial Crops and Products*, 70, 309-315. <https://dx.doi.org/10.1016/j.indcrop.2015.02.046>
- Madalageri, NK., Nagaraj, L. ve Nidamarthi SB. (2016). Evaluation and comparative study of hypoglycaemic activity of *Morus alba* with oral hypoglycaemic drug (Glibenclamide) in alloxan induced diabetic rats. *Journal of Evolution of Medical and Dental Sciences*, 5(48), 3062+. Erişim adresi: <https://link.gale.com/apps/doc/A469639576/HRC?u=anon~98bb8a98&sid=googleScholar&xid=a55996b5>
- Miller, NJ. ve Luiz-Larrea, MB. (2002). Flavonoids and other plant phenols in the diet: Their significance as antioxidants. *Journal of Nutritional & Environmental Medicine*, 12, 39-51. <https://doi.org/10.1080/13590840220123352>
- Mohammadi, J. ve Naik, PR. (2012). The histopathologic effects of *Morus alba* leaf extract on the pancreas of diabetic rats. *Turkish Journal of Biology*, 36, 211-216. Erişim adresi: <https://journals.tubitak.gov.tr/biology/abstract.htm?id=12520>
- Molyneux, P. (2004). The use of the stable free radical diphenylpicrylhydrazyl (DPPH) for estimating antioxidant activity. *Songklanakarin Journal of Science and Technology*, 26(2), 211-219.
- Orak HH., Selen İsbilir S. ve Yagar H. (2012). Determination of antioxidant properties of lyophilized olive leaf water extracts obtained from 21 different cultivars. *Food Science and Biotechnology*, 21(4), 1064-1074. <https://doi.org/10.1007/s10068-012-0138-6>

- Pietta, P., Minoggio, M. ve Bramati, L. (2003). Plant Polyphenols: Structure, Occurrence and Bioactivity. In: A. Rahman (Ed.) *Studies in Natural Products Chemistry*, Vol. 28, Part I (sf. 257-312), Elsevier. [https://doi.org/10.1016/S1572-5995\(03\)80143-6](https://doi.org/10.1016/S1572-5995(03)80143-6)
- Pontes, FC., Abdalla, VCP., Imatomi, M., Fuentes, LFG. ve Gualtieri, SCJ. (2019). Antifungal and antioxidant activities of mature leaves of *Myrcia splendens* (Sw.) DC. *Brazilian Journal of Biology*, 79(1), 127-132. <http://dx.doi.org/10.1590/1519-6984.179829>
- Re, R., Pellegrini, N., Proteggente, A., Pannala, A., Yang, M. ve Rice-Evans, C. (1999). Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radical Biology & Medicine*, 26(9-10), 1231-1237. [https://doi.org/10.1016/S0891-5849\(98\)00315-3](https://doi.org/10.1016/S0891-5849(98)00315-3)
- Singleton, VL. ve Rossi, JA. (1965). Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdicphosphotungstic acid reagents. *American Journal of Enology and Viticulture*, 16, 144-158.
- Sonia, TA. ve Sharma, CP. (2014). Diabetes mellitus – An overview. In book: *Oral Delivery of Insulin* (pp 1-57).
- Souza, JGL., Pinto, FGS., Toledo, AG., Alves LFA. ve Alves, DS. (2020). Biological activities and phytochemical screening of leaf extracts from *Zanthoxylum caribaeum* L. (Rutaceae). *Bioscience Journal, Uberlandia*, 36(1), 223-234. <https://doi.org/10.14393/BJ-v36n1a2020-48051>
- Thabti, I., Marzougui, N., Elfalleh, W. ve Ferchichi, A. (2011). Antioxidant composition and antioxidant activity of white (*Morus alba* L.), black (*Morus nigra* L.) and red (*Morus rubra* L.) mulberry leaves. *Acta Botanica Gallica*, 158(2), 205-214. Erişim adresi: <https://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/12538078.2011.10516267>
- Tu, J., Shi, D., Wen, L., Jiang, Y., Zhao, Y., Yang, J., Liu, H., Liu, G. ve Yang, B. (2019). Identification of moracin N in mulberry leaf and evaluation of antioxidant activity. *Food and Chemical Toxicology*, 132, 110730. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2019.110730>
- Tuzlacı, E. ve Bulut, GE. (2007). Turkish folk medicinal plants, Part VII: Ezine (Çanakkale). *Istanbul University Faculty of Pharmacy*, 39, 39-51. Erişim adresi: <https://dergipark.org.tr/tr/pub/iujfp/issue/577/5699>
- Tuzlacı, E. ve Sadıkoğlu, E. (2007). Turkish folk medicinal plants, Part VI: Koçarlı (Aydın). *Istanbul University Faculty of Pharmacy*, 39, 25-37. Erişim adresi: <https://dergipark.org.tr/en/pub/iujfp/issue/577/5697>
- Tuzlacı E. ve Şenkardeş İ. (2011). Turkish folk medicinal plants, X: Ürgüp (Nevşehir). *Marmara Pharmaceutical Journal*, 15, 58-68. Erişim adresi: <https://www.scopus.com/inward/record.url?eid=2-s2.0-84878797998&partnerID=40&md5=a40ea012eeae93d3a943f5dc7aed22e0>
- Xiao, J., Ni, X., Kai, G. ve Chen, X. (2013). A review on structure–activity relationship of dietary polyphenols inhibiting  $\alpha$ -amylase. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 53(5), 497-506. <https://doi.org/10.1080/10408398.2010.548108>
- Xiao, H., Zhang, YQ., Ding, XW., Huang, X.Z., Li, R. ve Shen, YH. (2020). Evaluation of bioactive compound contents in 50 varieties of mulberry leaves originating from different regions. *International Food Research Journal*, 27(3), 516-528.
- Yatoo, MI., Saxena, A., Gopalakrishnan, A., Alagawany, M. ve Dhama, K. (2017). Promising antidiabetic drugs, medicinal plants and herbs: An update. *International Journal of Pharmacology*, 137, 32-745. Erişim adresi: <https://scialert.net/abstract/?doi=ijp.2017.732.745>
- Yu, Y., Li, H., Zhang, B., Wang, J., Shi, X., Huang, J., Yang, J., Zhang, Y. ve Deng, Z. (2018). Nutritional and functional components of mulberry leaves from different varieties: Evaluation of their potential as food materials. *International Journal of Food Properties*, 21(1), 1495-1507. <https://doi.org/10.1080/10942912.2018.1489833>
- Zhishen, J., Mengchun, T. ve Jianming, W. (1999). The determination of flavonoid contents in mulberry and their scavenging effects on superoxide radicals. *Food Chemistry*, 64(4), 555-559. [https://doi.org/10.1016/S0308-8146\(98\)00102-2](https://doi.org/10.1016/S0308-8146(98)00102-2)
- Zoral, FB. ve Turgay Ö., (2014). Çeşitli gıda atıklarının toplam fenolik madde içeriğinin, antioksidan ve antimikrobiyel aktivitelerinin araştırılması. *KSÜ Doğa Bilimleri Dergisi*, 17(2), 24-33. <https://doi.org/10.18016/ksujns.03907>
- Zou, Y., Liao, S., Shen, W., Liu, F., Tang, C., Chen, CO. ve Sun, Y. (2012). Phenolics and antioxidant activity of mulberry leaves depend on cultivar and harvest month in Southern China. *International Journal of Molecular Sciences*, 13, 16544-16553. <https://doi.org/10.3390/ijms131216544>