



Determination of Antioxidant Capacities of Mistletoe (*Viscum album* ssp. *austriacum*) Leaf and Bud Extracts[#]

Fatma Ergün^{1,a,*}

¹Faculty of Health Sciences, Kırşehir Ahi Evran University, 40100 Kırşehir, Turkey

*Corresponding author

ARTICLE INFO	ABSTRACT
[#]This study was presented as an online presentation at the 2nd International Journal of Agriculture - Food Science and Technology (TURJAF 2021) Gazimağusa/Cyprus Research Article Received : 09/11/2021 Accepted : 25/12/2021 Keywords: <i>Viscum album</i> ssp. <i>Austriacum</i> Phenolic substance Flavonoid substance Antioxidant Yellow pine	In this study, it was determined that total phenolic and flavonoid substance amounts and antioxidant capacity of methanol extracts obtained from leaves (Y) and buds (T) of mistletoe (<i>V. album</i> ssp. <i>Austriacum</i>) collected from Northeast Anatolian Yellow Pine forests (<i>Pinus sylvestris</i> L). The amount of total phenolic substance was determined as 19.55 ±4.68 mg GAE/g in Y and 16.88 ±2.77 mg GAE/g in T, while amount of total flavonoid substance 17.56 ±2.53 mg QE/g in Y and 17.17 ±3.29 mg QE/g in T. IC₅₀ values were calculated as 476.26 ±22.54 µg/mL in Y and 778.57±25.61 µg/mL in T. In addition, the reducing antioxidant powers of Fe³⁺-Fe²⁺ were calculated as 303.00 ±1.73 µg AAE/mL in Y and 307.01±1.05 µg AAE/mL in T, equivalent to ascorbic acid. As a result, it was seen that mistletoe which is considered harmful for yellow pines, has antioxidant properties. It has been concluded that the evaluation of mistletoe collected during the struggle with mistletoe as a natural antioxidant source may contribute economically.

Türk Tarım – Gıda Bilim ve Teknoloji Dergisi, 9(sp): 2433-2436, 2021

Ökse Otu (*Viscum album* ssp. *austriacum*) Yaprak ve Tomurcuk Ekstraktlarının Antioksidan Kapasitelerinin Belirlenmesi

MAKALE BİLGİSİ	ÖZ
Araştırma Makalesi Geliş : 09/11/2021 Kabul : 25/12/2021 Anahtar Kelimeler: <i>Viscum album</i> ssp. <i>Austriacum</i> Fenolik madde Flavonoid madde Antioksidan Sarı çam	Bu çalışmada, Kuzeydoğu Anadolu Sarıçam (<i>Pinus sylvestris</i> L)' ormanlarından toplanan ökse otu (<i>Viscum album</i> ssp. <i>austriacum</i>, çeküm) bitkisinin yaprak (Y) ve tomurcuklardan (T) elde edilen metanol ekstraktlarının toplam fenolik ve flavonoid madde miktarı ve antioksidan kapasiteleri belirlendi. Toplam fenolik madde miktarı Y'de 19,55 ±4,68 mg GAE/g, ve T'de 16,88 ±2,77 mg GAE/g olarak, toplam flavonoid madde miktarları Y'de 17,56 ±2,53 mg KE/g ve T'de 17,17 ±3,29 mg KE/g olarak tespit edildi. IC₅₀ değerleri ise Y'de 476,26 ±22,54 µg/mL ve T'de 778,57±25,61 µg/mL olarak hesaplandı. Ayrıca Fe³⁺-Fe²⁺ indirgeyici antioksidan güçleri askorbik aside eşdeğer olarak Y'de 303,00 ±1,73 µg AAE/mL ve T'de ise 307,01±1,05 µg AAE/mL olarak hesaplandı. Sonuç olarak sarıçamlar için zararlı olarak kabul edilen ökse otunun antioksidan özelliğine sahip olduğu görüldü. Zararlı ile mücadele sırasında toplanan ökse otlarının doğal antioksidan kaynağı olarak değerlendirilmesinin ekonomik olarak katkı sağlayabileceği kanaatine varılmıştır.



Giriş

Santalaceae familyasına ait *Viscum album* L. (ökseotu) bitkisi çok yıllık bitkidir. Yarı parazit olarak bitkiler üzerinde yaşarlar. Üzerinde yaşadığı bitkilere vermiş olduğu zararlı etkinin yanında, biyoaktif bileşenler yönünden zengindir. İlk çağlardan beri tıbbi amaçlı kullanılmaktadır. Sahip olduğu tıbbi etki üzerinde yaşadığı bitkinin türüne göre değişmektedir (Ekhaise ve ark., 2010; Panossian ve ark., 1998). Bitkinin kardiyovasküler sistem ve kanser üzerine olumlu etkilerinin yanısıra antiinflamatuvar, antipsikotik, hipotansif, antidiyabetik etkileride vardır (Hegde ve ark., 2011; Orhue ve ark., 2014). Ayrıca bitki ekstraktlarının, radyoterapi ve kemoterapiden kaynaklanan zararlı ve mutajenik etkileride azalttığı bildirilmiştir (Büssing ve ark., 1994; Kovacs, 2002). Gelişmiş ülkelerde tıbbi amaçlı olarak kullanılan ve ticari önemi olan değerli bir bitkidir. Bu ülkelerde bitkiye ait ekstratlar piyasada satılmaktadır. Bitkinin yeşil yaprakları hayvancılık sektöründe kaba yem kaynağı olarak da kullanılmaktadır (Umucalı ve ark., 2007).

Bu bitkiye ait önemli üç alt türü vardır. Bunlar *V. album* ssp. *album*, *V. album* ssp. *abietis* ve *V. album* ssp. *austriacum*'dir. *V. album* ssp. *album* yapraklı ağaçlar üzerinde, *V. album* ssp. *abietis* Gökmar (Abies) üzerinde ve *V. album* ssp. *austriacum* Çam (Pinus) ve ender olarak ladinlerin (Picea) üzerinde yaşar (Yüksel ve ark., 2005).

V. album ssp. *austriacum* türü çamların gövde ve dallarında yaşar. Yapraklarını dökmez her mevsim yeşildir (Shinde ve ark., 2012). Yaşam süresi 9 ile 40 yıl arasında değişmektedir. Tomurcukları beyaz, sarımsı renktedir (şekil 1). Tomurcuklarının kenarındaki özü kuşlar çok sever ve tüketirler. Özün yapışkan olması tohumlarının kuşların gagalarına yapışmasına ve yayılmasına sebep olur (Bilgili ve ark., 2020). Ökse otu (*Viscum album* L.) türlerinin bitkiler üzerinde yapmış olduğu zarar büyüktür. Fakat tıbbi değerinin yüksek oluşu bu bitki ile yapılması gereken mücadele konusunda tereddütlerin oluşmasına neden olmaktadır.



Meyve Formu



Yaprak ve Tomurcuk Formu



Ağaç Formu

Şekil 1. *Viscum album* ssp. *austriacum*, bitkisinin üç farklı formu

Figure 1. Three different forms of *Viscum album* ssp. *austriacum* plant

Bu çalışmada, Erzurum Olur bölgesinde bulunan sarıçam (*Pinus sylvestris* L.) ormanlarından toplanan ökse otu (*V. album* ssp. *austriacum*) örneklerinin yaprak ve tomurcuklarında biyoaktif bileşenlerin ve antioksidan kapasitenin belirlenmesi amaçlanmıştır.

Materyal ve Yöntem

Bitki Örneklerinin Toplanması

V. album ssp. *austriacum* bitki numuneleri Erzurum Olur bölgesindeki sarıçam ormanlarından (40°49'11"N 42°04'04"E 1792 m / 40°49'03"N 42°04'28"E 1829 m / 40°49'42"N 42°04'51"E 1826 m) Ağustos ayında toplandı. Numuneler harmanlandı, tomurcuk (T) ve yaprak (Y) olarak ayrıldı. Destile su yardımıyla üzerlerindeki fiziksel kirler uzaklaştırıldı. Oda şartlarında kurutuldu, kullanımına kadar +4°C' de saklandı.

Ekstraktların Hazırlanması

Öğütücü yardımıyla T ve Y bitki örnekleri fiziksel olarak parçalandı. Her örnekten 10 gr tartıldı ve ağız kapalı iki erlene konuldu. Üzerlerine 200 mL metanol ilave edilerek manyetik karıştırıcıda karıştırıldı. Süzildükten sonra elde edilen ekstraktan metanol evaporatör yardımıyla 45°C'de uzaklaştırıldı. Daha sonra T ve Y ekstraktlarından 1000 ppm konsantrasyon olacak şekilde stok çözelti hazırlandı (Ergün, 2021).

Toplam Fenolik Madde Tayini

Toplam fenolik madde tayini Folin-Ciocalteu metodu kullanılarak yapıldı (Slinkard ve Singleton, 1977). Standart grafiğin oluşturulmasında Gallik asit kullanıldı. Toplam fenolik madde miktarları gallik aside eşdeğer olarak belirlendi (mg GAE/g).

Toplam Flavonoid Madde Tayini

Toplam flavonoid madde tayini alüminyum nitrat metodu ile yapıldı. Standart grafiğinin oluşturulmasında kuersetin kullanıldı (Nieva Moreno ve ark., 2000). Toplam flavonoid madde miktarları kuersetine eşdeğer olarak belirlendi (mg KE/g).

DPPH• Serbest Radikal Giderme Aktivitesi Tayini

Serbest radikal giderim aktivitesi Blois (1958) metodu kullanılarak belirlendi. Serbest radikal olarak 1,1-Difenil-2-pikrilhidrazil (DPPH•) (0,1 mM) çözeltisi ve standart olarak kullanılan 2,6-di-t-bütil-1-hidroksitoluen (BHT) (1000 ppm) kullanıldı (Babagil ve ark., 2018).

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

formülü ile hesaplandı. Formülde A_0 : Kontrol reaksiyonunun absorbansı, A_1 : Bitki ekstresinin ve standart çözeltinin absorbansı ifade etmektedir.

Fe³⁺-Fe²⁺ İndirgeme Gücü Tayini

Fe³⁺ indirgeme gücü tayini Oyaizu (1986)'ya göre yapıldı. Standart olarak BHT kullanıldı. Sonuçlar standart grafikten elde edilen eşitlik kullanılarak askorbik aside eşdeğer olarak hesaplandı (µg AAE/mL) (Çelik ve ark., 2014).

Bütün analizler her grup için üç tekrar olarak yapıldı. Tüm değerler ortalama±standart sapma (SD) olarak ifade edildi.

Bulgular ve Tartışma

Ökse otu yıllarca şifa amaçlı kullanılan doğal bitkilerden biridir. Çalışmamızda çam ökse otu (*V. album ssp. austriacum*) tomurcuk ve yapraklarında toplam fenolik madde miktarı sırasıyla $16,88 \pm 2,77$ mg GAE/g ile $19,55 \pm 4,68$ mg GAE/g olarak tespit edilmiştir (Çizelge 1). Yıldız ve ark. 2019 yılında sarıçam (*P. sylvestris*) üzerinde yaşayan ökse otunda yaptıkları bir çalışmada bitkinin metanol ekstraktlarının toplam fenolik değerinin 6,114 GAE/g olduğunu bildirilmişlerdir. Armut ve kavak ağaçlarında yaşayan ökse otunun üzerinde yapılan başka bir çalışmada ise toplam fenolik madde değerlerinin sırasıyla 9.589 mg GA/g ve 9.504 mg GA/g olduğu bildirilmiştir (Yıldız ve ark., 2021).

Toplam flavonoid miktarı ise tomurcuk ekstraktlarında $17,17 \pm 3,29$ mg QE/g yaprak ekstraktlarında $17,56 \pm 2,53$ mg QE/g olarak tespit edilmiştir (Çizelge 1). Bu değer armut ağacında 14,205 mg QE/g, kavak ağacında 13,489 mg QE/g (Yıldız ve ark., 2021), Çamda (pinus nigra Arn.) $4,40 \pm 0,75$ mg QE/g, kayısıda $4,17 \pm 0,55$ mg QE/g, erikte $6,60 \pm 0,99$ mg QE/g (Orhan ve ark., 2014) ve sarıçamda 2.73 mg QE/g (Yıldız ve ark., 2019) olduğu bildirilmiştir. Çalışmada bulduğumuz toplam fenolik ve flavonoid madde miktarları literatürde bildirilen değerlerden daha yüksektir. Bu durumun oluşmasında, bitkinin üzerinde yaşadığı ağacın, bölgenin, bitki ekstraktının elde edilme yönteminin ve çözücü farklılığının etkilerinin olabileceği kanaatine varılmıştır (Pietrzak ve ark., 2017).

DPPH• (1,1-difenil 2-pikrilhidrazil) 517 nm'de absorbans veren organik bir yapıya sahip bir radikaldır. Antioksidanlar, elektronları veya hidrojen atomlarını DPPH'ye transfer ederek serbest radikalleri nötralize eder (Ergün, 2021). Bu çalışmamızda DPPH• radikalının 517 nm'de absorbans azalması ölçülerek, kalan serbest DPPH• çözeltisi miktarı yani serbest radikal giderme aktivitesi belirlendi (Şekil 2). Aktivite çalışmalarında standart olarak BHT kullanıldı.

Ekstraktlar ve BHT'nin DPPH• radikal giderme aktiviteleri (%) hesaplandı. Konsantrasyon artışına (20-100 µg/mL) paralel olarak, Bitki ekstraktlarda ve BHT'de, DPPH• radikal giderme aktivitelerinde artış olduğu görüldü (Çizelge 2). Yapılan antioksidan analizinde 100 µg/ml konsantrasyonunda DPPH• radikali giderme aktivitelerinin kullanılan standarda göre düşük olmasına rağmen tomurcukların %6,39, yaprak ekstraktlarının ise %11,11 oranında radikali giderdiği görülmektedir.

Ökse otunun bitki kısmında yapılan bir çalışmada radikal giderme aktivitesi $7,2 \pm 2,71$ olarak bulunmuştur (Papuc ve ark., 2010). Sarıçam ökse otunun yaprak ekstraktlarında elde ettiğimiz değer bu değerden yüksektir.

DPPH• radikal gideriminin %50'sinin inhibisyonunu sağlayan ekstrak ve standart madde konsantrasyonu IC_{50} olarak belirlendi (Çizelge 3). IC_{50} değeri belirlenirken, çalışılan konsantrasyonlara karşı % DPPH• radikal giderme aktivite değerlerinin yerleştirilmesi ile elde edilen grafikler kullanıldı. Buna göre antioksidan kapasitesi $BHT > Y > T$ şeklindedir.

Ökse otundan elde edilen ekstraktların ve standart çözeltinin Fe^{3+} - Fe^{2+} indirgeme kapasitesi belirlendi. Fe^{3+} - Fe^{2+} indirgeme kapasitesi ölçümlerinde 700 nm'de absorbansları ölçüldü. Aynı şartlarda askorbik asidin belirli konsantrasyonlarında Fe^{3+} - Fe^{2+} indirgeme kapasitesi

belirlendi ve standart grafik çizildi. Grafiğin eğim denkleminde yararlanılarak askorbik aside eşdeğer indirgeme kapasiteleri belirlendi. Bunlar yaprakta $303,00 \pm 1,73$ µg AAE/ml, tohumda $307,01 \pm 1,05$ µg AAE/ml, ve BHT'de $881,40 \pm 34,01$ µg AAE/ml olarak tespit edildi.

Ekstraktların indirgeme gücüne sahip olduğu görüldü (Çizelge 4). Farklı konukçularda yaşayan ökse otları ile yapılan bir çalışmada erik, kaysı, söğüt ve yabani armutta yaşayan ökse otlarının metanol ekstraktlarında indirgeme gücü aktivitesi belirlenmiştir (Orhan ve ark., 2014).

Çizelge 1. Toplam fenolik ve flavonoid madde miktarları
Table 1. Total phenolic and flavonoid substance amounts

Ekstrakt	Fenolik madde miktarı (mg GAE/g)	Flavonoid madde miktarı (mg QE/g)
T	$16,88 \pm 2,77$	$17,17 \pm 3,29$
Y	$19,55 \pm 4,68$	$17,56 \pm 2,53$

Çizelge 2. Bitki ekstraktları ve BHT'nin DPPH radikal giderme aktiviteleri
Table 2. DPPH radical scavenging activities of plant extracts and BHT (µg/ml)

ES	20	40	60	80	100
T	1,16	3,57	4,24	5,48	6,39
Y	2,8	3,53	7,2	9,0	11,11
BHT	52,91	66,08	76,66	87,66	87,75

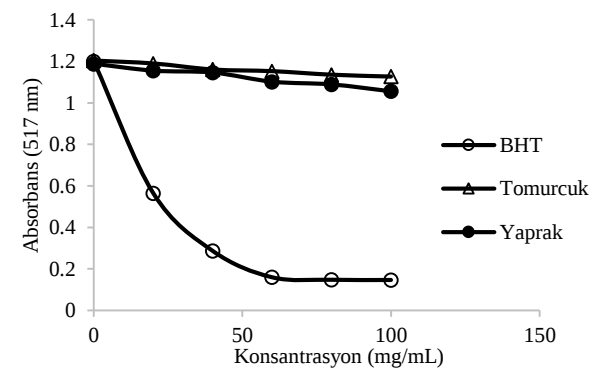
ES: Ekstraktlar ve standart

Çizelge 3. Bitki ekstraktının ve BHT'nin IC_{50} değerleri
Table 3. IC_{50} values of plant extracts and BHT

Ekstraktlar ve standart	IC_{50} (µg /ml)
T	$778,57 \pm 25,61$
Y	$476,26 \pm 22,54$
BHT	$10,41 \pm 3,30$

Çizelge 4. Ekstraktlara ve BHT'ye ait Fe^{3+} - Fe^{2+} indirgeme kapasitesi
Table 4. Fe^{3+} - Fe^{2+} reducing capacity of extracts and BHT

Ekstraktlar ve standart	(µg AAE/ml)
T	$307,01 \pm 1,05$
Y	$303,00 \pm 1,73$
BHT	$881,40 \pm 34,01$



Şekil 2. Ökse otu ekstraktları ve BHT'nin farklı konsantrasyonlarda DPPH• radikal giderme etkisi
Figure 2. DPPH• radical scavenging effect of mistletoe extracts and BHT at different concentrations

Sonuç

Sonuç olarak, bu çalışmada Erzurum Olur bölgesindeki çam ağaçlarından toplanan ökse otunun tohum ve yapraklarının toplam fenolik, flavonoid madde miktarları ve antioksidan aktiviteleri araştırılmıştır. Buna göre sarıçamlar için zararlı olarak kabul edilen ökse otunun tohum ve yapraklarının toplam fenolik ve flavonoid bileşik miktarının yüksek olduğu ilaveten antioksidan özelliğinin ise güçlü olduğu tespit edilmiştir. Bu özelliği nedeniyle doğal antioksidan olarak kullanımının yaygınlaştırılmasının, sarıçamlarda parazit olarak yaşayan ve bitkiye zarar veren ökse otu ile yapılan mücadeleye ekonomik katkı sağlayacağı düşünülmektedir. Ayrıca ökse otunun fitokimyasal yapısının vejetasyon dönemi, çevresel ve mevsimsel faktörlerden hangi yönde etkilendiğinin araştırılmasının gerektiği kanaati de oluşmuştur.

Teşekkür

Bu çalışma 2. Uluslararası Türk Tarım-Gıda Bilim ve Teknoloji Dergisi Kongresinde (25-29 Ekim 2021) (II. International Congress of the Turkish Journal of Agriculture - Food Science and Technology) sözlü bildiri olarak sunulmuştur ve özeti kongre bildiri kitabında yayınlanmıştır.

Kaynaklar

- Babagil A, Tasgin E, Nadaroglu H, Kaymak HC. 2018. Antioxidant and antiradical activity of beetroot (*Beta vulgaris* L. var. conditiva Alef.) grown using different fertilizers. Journal of Chemistry, 7101605.
- Bilgili E, Coskuner KA, Baysal I, Ozturk M, Usta Y, Eroglu M, Norton D. 2020. The distribution of pine mistletoe (*Viscum album* ssp. *austriacum*) in Scots pine (*Pinus sylvestris*) forests: from stand to tree level. Scandinavian Journal of Forest Research, 35: 20-28.
- Blois MS. 1958. Antioxidant determinations by the use of a stable free radical, Nature, 181: 1199- 1200.
- Büssing A, Azahari A, Ostendorp H, Lehnert A, Schweitzer K. 1994. *Viscum album* L. Extracts reduce sister chromatid exchanges in cultured peripheral blood mononuclear cells. European Journal of Cancer. 30(12): 1836-1841.
- Celik H, Nadaroglu H, Senol M. 2014. Evaluation of antioxidant, antiradical and antimicrobial activities of olive pits (*Olea europaea* L.). Bulgarian Journal of Agricultural Science, 20(6):1392-1400.
- Ekhaie FO, Ofoezie VG, Enobakhare DA. 2010. Antibacterial properties and preliminary phytochemical analysis of methanolic extract of mistletoe (*Tapinanthus bangwensis*). Bayero. J Pure Appl Sci., 3: 65-68.
- Ergün F. 2021. *Lonicera iberica* M. Bieb.: Investigation Antioxidant Activity and Bioactive Chemicals. Turkish Journal of Agriculture - Food Science and Technology. 9(6): 1124-1128.
- Hegde P, Maddur MS., Friboulet A, Bayry J, Kaveri SV. 2011. *Viscum album* exerts anti-inflammatory effect by selectively inhibiting cytokine-induced expression of cyclooxygenase-2. PLoS One. 6: 1-7.
- Kovacs, E. 2002. The in vitro effect of *Viscum album* (VA) extract on DNA repair of peripheral blood mononuclear cells (PBMC) in cancer patients. Phytother. Res. 16: 143-147.
- Nieva Moreno MI, Isla MI, Sampietro AR, Vattuone MA. 2000. Comparison of the free radical-scavenging activity of propolis from several regions of Argentina Journal of Ethnopharmacology, 71: 109-114.
- Orhan DD, Senol FS, Hosbas S, Orhan IE. 2014. Assessment of cholinesterase and tyrosinase inhibitory and antioxidant properties of *Viscum album* L. samples collected from different host plants and its two principal substances. Ind.Crops Prod. 62: 341-349.
- Orhue PO, Edomwande EC, Igbinsola E, Momoh ARM, Asekomhe OO. 2014. Antibacterial activity of extracts of mistletoe (*Tapinanthus dodoneifolius* (Dc) Dancer) from cocoa tree (*Theobroma cacao*). Int J Herbs Pharmacol Res. 3: 24-29.
- Oyaizu M. 1986. Study on products of Browning reactions: antioxidative activities of products of browning reaction prepared from glucosamine. Jpn. J. Nutr, 44, 307-315.
- Panossian A, Kocharian A, Matinian K, Amroyan E, Gabrielian E, Mayr C, Wagner H. 1998. Pharmacological activity of phenylpropanoids of the mistletoe, *Viscum album* L., host: *Pyrus caucasica* Fed. Phytomedicine. 5: 11-17.
- Papuc C, Crivineanu M, Goran G, Nicorescu V, Durdu N. 2010. Free radicals scavenging and antioxidant activity of European mistletoe (*Viscum album*) and European birthwort (*Aristolochia clematitis*). Revista de Chimie, 61(7): 619-622.
- Pietrzak W, Nowak R, Gawlik-Dziki U, Lemieszek M, Rzeski W. 2017. LC-ESI-MS/MS Identification of Biologically Active Phenolic Compounds in Mistletoe Berry Extracts from Different Host Trees. Molecules 22 (4): 624.
- Shinde A, Ganu J, Naik P. 2012. Effect of free radicals & Antioxidants on oxidative stress. J Dent Allied Sci., 1(2): 63-66.
- Slinkard K, Singleton VL. 1977. Total phenol analyses: Automation and comparison with manual methods. American Journal of Enology and Viticulture. 28: 49-55.
- Umucalilar, HD, Gülşen N, Coşkun B, Hayırlı A, Dural H. 2007. Nutrient composition of mistletoe (*Viscum album*) and its nutritive value for ruminant animals. Agroforestry Systems, 71: 77-87.
- Yıldız B, Öztürk YE, Kardeş YM, Mut H, Gülümser E. 2021. Kaba yem olarak değerlendirilen ökse otunun antioksidan özellikleri ve kondanse tanen içeriklerinin belirlenmesi. Anadolu Tarım Bilimleri Dergisi, 36(1): 132-137.
- Yıldız S, Gürgeç A, Kılıç C, Tabbouche S, Kılıç A, Can Z. 2019. Antioxidant, Antimicrobial, and Anti-Quorum Sensing Activities of *Usnea filipendula* and *Viscum album*. Anadolu Çev. ve Hay. Dergisi, 4(4): 613-620.
- Yüksel B, Akbulut S, Ketten A. 2005. Çam Ökseotu (*Viscum album* ssp. *austriacum* (wiesb.) vollman)'nın Zararı, Biyolojisi ve Mücadelesi. Süleyman Demirel Üniversitesi Orman Fakültesi Dergisi. 2: 111-24.