https://doi.org/10.63356/stes.nat.2026.002 УДК 582.635.3:547.972.3.056

# BIOLOŠKA AKTIVNOST EKSTRAKTA LISTA SMOKVE (Ficus carica L.): ANTIOKSIDATIVNI KAPACITET I SPOSOBNOST INHIBICIJE ALFA-AMILAZE

**Autor:** IVONA IVETIĆ
**e-mail:** ivona.ivetic@student.pmf.unibl.org
**Mentor:** prof. dr Biljana Kukavica
Studijski program Biologija
Prirodno-matematički fakultet Univerziteta u Banjoj Luci

**Uvod:** Ficus carica L. (smokva) je biljka bogata različitim bioaktivnim jedinjenjima, posebno fenolnim jedinjenjima i flavonoidima. Fenolna jedinjenja imaju sposobnost neutralizacije slobodnih radikala, dok njihova sposobnost inhibicije enzima uključenih u metabolizam ugljenih hidrata predstavlja predmet brojnih istraživanja. List smokve tradicionalno se koristi u narodnoj medicini za regulaciju nivoa glukoze u krvi, smanjenje koncentracije triglicerida, ublažavanje probavnih tegoba, kao i za tretman različitih kožnih problema.

**Cilj:** Ispitati sadržaj ukupnih fenolnih jedinjenja i flavonoida, procijeniti in vitro antioksidativni kapacitet etanolnog ekstrakta lista F. carica L. i inhibitornog djelovanja prema α-amilazi.

**Materijal i metode:** Listovi F. carica L. sakupljeni su na području Bosne i Hercegovine (Republika Srpska), osušeni i ekstrahovani primjenom 80% etanola. Sadržaj ukupnih fenolnih jedinjenja i flavonoida, antioksidativni kapacitet mjeren različitim metodama kao i inhibicija α-amilaze su određeni spektrofotometrijski. Identifikacija fenolnih jedinjenja je urađena primjenom tankoslojne hromatografije (TLC).

**Rezultati:** Sadržaj ukupnih fenolnih jedinjenja u ekstraktu lista F. carica L. iznosio je 16,255 ± 0,484 mg galne kiseline/g suve mase (DW), dok je sadržaj ukupnih flavonoida iznosio 5,203 ± 0,0117 mg kvercetina/g DW. Ekstrakt je pokazao izraženu antioksidativnu aktivnost, pri čemu je ABTS (2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolin-6-sulfonska kiselina)) metodom određena $IC_{50}$ vrijednost od 3.01 ± 0.14 μg/mL. Ukupni antioksidativni kapacitet određen fosfomolibdenskom metodom iznosio je 285,33 ± 42,96 μg/mL ekvivalent vitamina E i 140,38 ± 20,29 μg/mL ekvivalent vitamina C. Sposobnost redukcije $Cu^{2+}$ iznosila je 21,167 ± 6,94 μg troloksa/mL, dok je sposobnost redukcije $Fe^{3+}$ iznosila 0,582 ± 0,035 mmol $Fe^{2+}$/L. Tankoslojnom hromatografijom je na osnovu standarda pokazano prisustvo galne i hlorogene kiseline kao i kvercetina. Ekstrakt je pokazao inhibitorno djelovanje prema α-amilazi sa $IC_{50}$ vrijednošću od 305.59 ± 8.02 μg/mL.

**Zaključak:** Ekstrakt lista F. carica L. predstavlja značajan izvor fenolnih jedinjenja i flavonoida sa izraženim antioksidativnim potencijalom i sposobnošću in vitro inhibicije aktivnosti α-amilaze.

Ključne riječi: Ficus carica L; fenolna jedinjenja; flavonoidi; antioksidativna aktivnost; α-amilaza; tankoslojna hromatografija

## UVOD

Slobodni radikali predstavljaju različite jone, atome i molekule koji sadrže jedan ili više nesparenih elektrona [1]. Povećane koncentracije slobodnih radikala dovode do oštećenja ćelijskih komponenti što dalje dovodi do gubitka funkcije pa i smrti ćelije kao i do različitih oboljenja. Slobodni radikali sveukupno „iscrpljuju" prirodni odbrambeni mehanizam

organizma i izazivaju oksidativni stres, odnosno stanje u kome je povećana koncentracija oksidanata u ćelijama.

Fenolna jedinjenja, sekundarni metaboliti biljaka, glavni su prirodni antioksidansi. Načini na koji fenolna jedinjenja ispoljavaju svoju antioksidativnu sposobnost jesu kroz procese heliranja prelaznih metala, supstrati su enzima te učestvuju u direktnim reakcijama sa reaktivnim vrstama kiseonika [1]. Fenolne kiseline i flavonoidi pokazale su se kao jedinjenja sa najvećom efikasnošću po svojim antioksidativnim svojstvima.

Dijabetes melitus se najčešće klasifikuje na dijabetes tip 1 i tip 2, koji se razlikuju prema mehanizmu nastanka i poremećaju metabolizma glukoze. Dijabetes melitus tip 1 je autoimuna bolest koju karakteriše destrukcija β-ćelija pankreasa, odgovornih za proizvodnju insulina, što dovodi do njegovog potpunog ili gotovo potpunog nedostatka. Zbog toga je osobama sa dijabetesom tip 1 neophodna doživotna primjena insulina radi održavanja normalnog nivoa glukoze u krvi. Dijabetes melitus tip 2 predstavlja najčešći oblik dijabetesa i karakteriše ga smanjena osjetljivost perifernih tkiva na insulin (insulinska rezistencija), uz postepeno smanjenje sposobnosti β-ćelija pankreasa da proizvode dovoljne količine insulina. Kao posljedica toga dolazi do poremećaja regulacije glukoze i razvoja hiperglikemije. Dijabetes može nastati i kao posljedica povećane proizvodnje reaktivnih vrsta kiseonika (ROS, reactive oxigen species) budući da ROS direktno djeluju na beta ćelije pankreasa koje su zaslužne za proizvodnju hormona insulina. ROS utiču kako na smanjenu sintezu insulina tako i na insulinsku rezistenciju ćelija [2]. Tokom varenja ugljenih hidrata, enzim α-amilaza katalizuje hidrolizu skroba do jednostavnijih oligosaharida i disaharida, što dovodi do povećanja koncentracije glukoze u krvi nakon obroka. Inhibicija aktivnosti α-amilaze može usporiti razgradnju skroba i apsorpciju glukoze u gastrointestinalnom traktu. Posljedica toga je sporiji porast koncentracije glukoze u krvi (postprandijalna glikemija). Pokazalo se da fenolna jedinjenja djeluju inhibitorno na dejstvo alfa amilaze i time mogu učestovati u kontroli postprandijalne glikemije. Ova jedinjenja mogu ostvarivati vodonične i hidrofobne interakcije sa aktivnim ili alosteričnim mjestima enzima, čime smanjuju njegovu sposobnost hidrolize skroba. Pored toga, pojedini polifenoli mogu formirati komplekse sa molekulima skroba i time dodatno ograničiti pristup supstrata enzimu.

Smokva ( *Ficus carica* L.) je jedna od prvih biljaka koju je čovjek kultivisao. Pripada porodici *Moraceae*, rodu *Ficus,* sa više od 800 različitih vrsta rasprostranjenih širom tropskog i suptropskog pojasa.

Nalazi koji su objavljeni u literaturi govore o procesu domestifikacije ove biljke koja se sa područja Bliskog istoka i Mediterana reznicama vegetativno razmnožavala i pripitomljavala te se ovakvim dugotrajnim procesom došlo do različitih modifikacija primarnih karakteristika biljke što se ogleda u povećanju sadržaja šećera i veličine ploda [3].

Biljni ekstrakti predstavljaju značajan izvor bioaktivnih molekula koji mogu djelovati kao prirodni katalizatori u različitim biohemijskim i hemijskim procesima [4]. Prema Walia i sar. (2022), među fenolnim jedinjenjima prisutnim u vrstama roda *Ficus* izdvajaju se kvercetin, kempferol, miricetin, luteolin, rutin i hlorogenska kiselina. Kvercetin pokazuje antioksidativno, antiinflamatorno i antibakterijsko djelovanje, dok se miricetinu, pored antioksidativnog, pripisuju antivirusno, antimikrobno i citoprotektivno djelovanje. Kempferol se odlikuje antioksidativnom aktivnošću, dok luteolin, osim antioksidativnog, ispoljava i antiinflamatorni potencijal. Hlorogenska kiselina povezuje se sa antioksidativnim, antiinflamatornim, dok se rutinu pripisuju povoljni efekti na funkciju krvnih sudova i metabolizam lipida. Takođe, za izoramnetin su opisane antioksidativna i potencijalna antitumorska aktivnost. Pored toga, u eksperimentalnim istraživanjima pojedinih vrsta roda *Ficus* zabilježeni su antihiperglikemijski efekti frakcija tanina, što ukazuje na njihov potencijalni značaj u istraživanjima antidijabetičke aktivnosti [4].

Zahvaljujući svojim ljekovitim sposobnostima, nutritivnim vrijednostima, smokva je

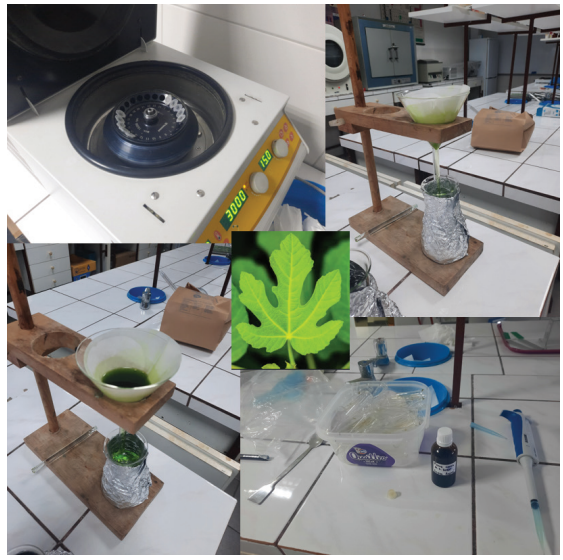
stekla popularnost širom svijeta te zainteresovala naučnike o svojim mogućim benefitima naročito kada je u pitanju borba protiv dijabetesa tip 2 [4]. Takođe, njeni listovi se tradicionalno koriste u narodnoj medicini u formi čaja ili se pak mliječni sok koristi kao tretman kod različitih kožnih oboljenja. Pored toga, bogata je i šećerima, vlaknima te različitim mineralima i vitaminima što joj još više daje na značaju [5]. Bogata je i antocijaninima, karotenoidima te vitaminima C, E i K [5]. Zahvaljujući svim aktivnim jedinjenjima koristi se i kao antibakterijsko, hepatoprotektivno, antikancerogeno sredstvo, ali i u borbi sa kardiovaskularnim oboljenjima [4]. S obzirom na to sve navedeno, cilj ovog rada je bio da se ispita antioksidativna aktivnost ekstrakta lista smokve kao i sposobnost ekstrakta da in vitro inhibira aktivnost alfa-amilaze i time uspori razgradnju skorba i povećanje koncentracije glukoze u krvi nakon obroka.

## MATERIJAL I METODE

### Priprema biljnog materijala

Listovi smokve (*Ficus carica* L.) prikupljeni su na području Trebinja, Jazina, Republika Srpska, Bosne i Hercegovine u periodu formiranja ploda, a botaničku determinaciju izvršio je prof. dr Siniša Škondrić. Nakon prikupljanja, listovi su oprani, osušeni na sobnoj temperaturi i pohranjeni u papirne vrećice do dalje upotrebe.

Miješani uzorak je pripremljen mljevenjem najmanje 50 osušenih listova smokve. Za pripremu ekstrakta korišteno je 10 g usitnjenog biljnog materijala, koji je ekstrahovan sa 300 mL 80% etanola. Ekstrakcija je započeta tretiranjem uzorka u ultrazvučnom kupatilu (*Ultrawave U300, Cardiff, UK*) tokom pet minuta, nakon čega je smjesa miješana na magnetnoj mješalici 30 minuta pri sobnoj temperaturi. Dobijeni ekstrakt je potom filtriran kroz filter papir radi uklanjanja čvrstih čestica biljnog materijala. Filtrat je sakupljen u tamne staklene bočice za tinkture i skladišten do izvođenja eksperimentalnih analiza. Koncentracija fenolnih jedinjenja je izrežena po masi biljnog uzorka (10g korišteno za ekstrakciju) pri čemu je u obzir uzeta zapremina rastvarača. Pošto je korišten miješani uzorak rađena je jedna biološka replika, a za svaki parametar urađene su najmanje tri tehničke replike.



**Slika br. 1** Priprema biljnog ekstrakta lista Ficus carica L. Izvor:autor

**Određivanje sadržaja ukupnih fenolnih jedinjenja fenola**

Određivanje sadržaja ukupnih fenolnih jedinjenja je vršeno prema metodi Singleton i Rossi (1965) [6]. Reakciona smješa je sadržala 100 μL biljnog ekstrakta (ekstrakt razblažen sa 80% etanolom u odnosu 1:4), 450 μL Folin-Čikalteovog reagensa (razblažen u odnosu 1:3 sa destilovanom vodom) i 450 μL 1M $Na_2CO_3$. Smješa je potom inkubirana 1 h na tamnom. Nakon posljednje inkubacije mjerena je apsorbanca na spektrofotometru na talasnoj dužini od 724 nm. Kvantifikacija sadržaja fenolnih jedinjenja je izvršena na osnovu jednačine pravca kalibracione krive za galnu kiselinu. Kao slijepa proba se koristi ista zapremina 80% etanola umjesto biljnog ekstrakta. Sva mjerenja su rađena u triplikatu.

**Određivanje sadržaja ukupnih flavonoida**

Sadržaj ukupnih flavonoida je određen metodom koju su dali Chang i sar. (2002) [7]. Reakciona smješa je sadržavala 90 μL biljnog ekstrakta, 270 μL metanola, 18 μL 0,3 M Na-acetata, 18 μL $AlCl_3$ i 510 μL vode. Smješa je potom inkubirana 30 min na tamnom. Nakon inkubacije izmjerena je apsorbanca na talasnoj dužini od 415 nm. Kao slijepa proba se koristi ista smješa samo se umjesto uzorka dodaje ekvivalentna zapremina 80% etanola. Koncentracija flavonoida određena je na osnovu jednačine pravca standardne krive koja je dobijena mjerenjem apsorbance standardnog jedinjenja kvercetina.

**Određivanje sposobnosti uklanjanja ABTS radikala**

Određivanje sposobnosti uklanjanja ABTS radikala (2,2'-azino-bis (3-etilbenzotiazolin-6-sulfonska kiselina)) je rađeno prema metodi koju su dali Re i sar. (1999) [8]. Ova metoda podrazumijeva pripremu radnog rastvora miješanjem jednakih zapremina ABTS rastvora (7 mM ABTS) i K-persulfata ($K_2S_2O_8$; 2,4 mM) u cilju dobijanja stabilnog radikala, i inkubiranjem 24 h na tamnom. Uzorci su pripremljeni tako što je 0,5 mL ekstrakta pomiješano sa 0,5 mL ABTS radnog rastvora nakon čega slijedi inkubacija 7 min na tamnom. Radni rastvor ABTS se dobija podešavanjem apsorbance na 734 nm na približnu vrijednost od 0,750 nakon razblaživanja osnovnog rastvora sa metanolom. Nakon pripreme uzoraka i inkubacije slijedi mjerenje apsorbance na 734 nm. Kao kontrola koristi se 0,5 mL rastvora ABTS i 0,5 mL 80% etanola.

$IC_{50}$ predstavlja vrijednost koncentracije fenolnih jedinjenja za koju se postiže 50% inhibicije nestanka ABTS radikala i izračunava se prema formuli:

$$IC_{50} = \frac{A\,(kontrole) - A\,(uzorka)}{A(kontrole)} x100$$

**Određivanje uku0pnog antioksidativnog kapaciteta fosfomolibdenskom metodom**

Ovu metodu su dali Prieto i sar. (1999) [9]. Ona se zasniva na redukciji Mo (VI) do Mo (V) djelovanjem etanolnih ekstrakata koji daju zeleni kompleks. Radni rastvor rastvor sadrži 28 mM $K_3PO_4$, 0,6 M $H_2SO_4$ i 4 mM $(NH_4)Mo_7O_{24}$. Za svaku koncentraciju fenolnih jedinjenja biljnog ekstrakta se pravi slijepa proba na način da se pomiješa 1 mL radnog rastvora bez molidbena i 0,1 mL biljnog ekstrakta. Kontrola sadrži 1 mL radnog rastvora i 0,1 mL 80% etanola.

Uzorci se zatim pripremaju na način da se 1 mL radnog rastvora pomiješa sa 0,1 mL biljnog ekstrakta, miješaju se na Wortexu te inkubiraju 2 h na 95 °C. Nakon inkubacije uzorci su ohlađeni i mjerena im je apsorbanca na 695 nm.

Kao standardi su korišteni vitamin E i vitamin C na osnovu čijih jednačina pravca je izračunat antioksidativni kapacitet fosfomolibdenskom metodom.

**Određivanje sposobnosti ekstrakta da redukuje bakar**

CUPRAC (*eng. Cupric Reducing Antioxidant Capacity*) metoda je opisana od strane Apaka i sar. (2007) [10]. Uzorak se sastoji od 0,3 mL 0,01 M $CuCl_2$, 0,3 mL 10 mM acetatnog pufera pH 7, 0,3 mL 7,5 mM etanolnog rastvora neokuprina (2,9-dimetil-1,10-fenantrolin) i 0,05 mL biljnog ekstrakta. Uzorci se izmiješaju na Wortexu i inkubiraju 30 min na sobnoj temperaturi. Kontrola se priprema na isti način, s tim da se umjesto uzorka dodaje ekvivalentna zapremina 80% etanola. Apsorbanca se mjeri nakon inkubacije na talasnoj dužini od 450 nm. Kao standard se koristi troloks u opsegu koncentracija od 20 do 300 μg/mL, te se sposobnost biljnog ekstrakta da redukuje bakar računa na osnovu jednačine pravca dobijene na osnovu standardne krive za troloks.

**Određivanje sposobnosti ekstrakta da redukuje gvožđe**

FRAP (*eng. Ferric reducing antioxidant power*) metod je rađen prema radu Benzie i Strain (1996) [11]. Radni rastvor sadrži 10 zapremina 300 mM acetatnog pufer pH 3,6, 1 zapreminu 10 mM TPTZ-a (2,4,6-tris(2-piridil)-1,3,5-triazin) rastvorenog u 40 mM HCl i 1 zapreminu 20 mM $FeCl_3$. Potom se 2 mL radnog rastvora pomiješa sa 50 μL biljnog uzorka i 150 μL vode te slijedi inkubacija od 4 min na 37 °C. Slijepa proba se priprema korištenjem iste zapremine 80% etanola umjesto biljnog ekstrakta. Vrijednost slijepe probe se oduzima od vrijednosti uzorka. Apsorbanca se mjeri nakon 4 min od početka reakcije na 593 nm talasne dužine.

**Tankoslojna hromatografija (TLC)**

Tankoslojna hromatografija (*eng. Thin Layer Chromatography*) primijenjena je kao metoda za razdvajanje i identifikaciju analiziranih komponenti na osnovu njihove različite raspodjele između stacionarne i mobilne faze. Kao stacionarna faza korištene su TLC ploče (20 x 20 cm) presvučene silika-gelom, dok je mobilna faza predstavljala odgovarajući sistem rastvarača odabran u skladu sa karakteristikama analiziranih jedinjenja. U radu je korištena smješa organskih rastvarača: etil acetat-mravlja kiselina-sirćetna kiselina-destilovana voda u omjeru 100:11:11:26. Uzorci su nanošeni na početnu liniju ploče pomoću mikropipete u zapremini od 20 μL. Fenolna jedinjenja koja su korištena kao standardi (kvercetin, hidroksibenzojeva kiselina, vanilična kiselina, galna kiselina, hlorogena kiselina, kafeična kiselina, reservatol, kumarična kiselina) su pravljena u koncentraciji od 5 mg/mL u etanolu. Nakon sušenja nanesenih uzoraka, ploče su postavljene u zatvorenu hromatografsku komoru prethodno zasićenu parama mobilne faze. Razvijanje hromatograma trajalo je do dostizanja par centimetara od kraja ploče, nakon čega su izvađene iz komore, obilježen je front rastvarača i ostavljene su da se osuše na sobnoj temperaturi. Vizualizacija razdvojenih komponenti izvršena je pomoću UV svjetlosti. Identifikacija komponenti zasnivala se na poređenju njihovih migracionih karakteristika sa standardima i određivanju vrijednosti retencionog faktora (Rf), koji je izračunat kao odnos udaljenosti koju je prešla analizirana supstanca i udaljenosti koju je prešao front mobilne faze.

**Određivanje *in vitro* inhibitornog dejstva biljnog ekstrakta na aktivnost α-amilaze**

Metoda zahtjeva prethodno pripremljenu seriju rastvora biljnog ekstrakta u 80% etanolu različitih koncentracijafenolnih jedinjenja: (15, 35, 50, 100, 200, 300, 400, 540) μg/

mL. Rastvor α-amilaze je pripremljen na način da je 0,025 g enzima (svinjskog pankreasnog porijekla) rastvoreno u 50 mL 6 mM NaPi (natrijum fosfatni) pufera. Za mjerenje apsorbance uzorka potrebno je pomiješati 100 µL biljnog ekstrakta određene koncentracije sa 200 µL rastvora α-amilaze nakon čega slijedi inkubacija 10 min na 37 °C, a potom se dodaje 0,1 % rastvor skroba nakon čega ponovo slijedi inkubacija 10 min na 37 °C. Na kraju za prekid reakcije dodaje se 100 µL 1 M HCl te 400 µL Lugolovog rastvora nakon čega slijedi mjerenje apsorbance na 630 nm. Slijepa proba bez skroba je pripremljena na isti način osim što je umjesto biljnog ekstrakta i rastvora skroba korištena ekvivalentna zapremina 6 mM NaPi pufera pH 6,8. Proba bez α-amilaze je pripremljena na isti način osim što je umjesto biljnog ekstrakta i rastvora enzima korištena ekvivalentna zapremina NaPi pufera. Slijepa proba je pripremljena sa 100 µL uzorka i 900 µL NaPi pufera.

### Statistička analiza

Svi rezultati su obrađeni u Microsoft Excel (Microsoft offiice professional 2016) i predstavljeni kao srednje vrijednosti ± standardna devijacija sa n=3.

## REZULTATI

### Kvantitativna i kvalitativna analiza fenolnih jedinjenja

Sadržaj ukupnih fenolnih jedinjenja u ekstraktu smokve je bio 16,255 ± 0,484 mg GAE/g DW, dok je sadržaj flavonoida bio 5,203 ± 0,0117 mg QE/g DW (Tabela br. 1). Rezultati su izraženi kao ekvivalenti galne kiseline za fenolna jedinjenja i ekvivalenti kvercetina za flavonoide po gramu suve mase biljnog tkiva.

### Antioksidativna aktivnost

Sposobnost neutralizacije $ABTS^{\bullet+}$ radikala povećavala se sa porastom koncentracije fenolnih jedinjenja i iznosila je 30,64 ± 0,58% za koncentraciju od 1 µg/mL, 68,02 ± 1,30% za koncentraciju od 5 µg/mL, 84,20 ± 6,22% za koncentraciju od 7 µg/mL i 99,33 ± 0,17% za koncentraciju od 10 µg/mL. Izračunata $IC_{50}$ vrijednost iznosila je 3,01 ± 0,14 µg/mL za sposobnost neutralizacije $ABTS^{\bullet+}$ radikala (Tabela br. 1).Ukupni antioksidativni kapacitet mjeren fosfomolibdenskom metodom iznosio je 285,33 ± 42,96 µg/mL, kada je izražen kao ekvivalent vitamina E, odnosno 140,38 ± 20,29 µg/mL kao ekvivalent vitamina C (Tabela br. 1).

Antioksidativni kapacitet ekstrakta lista *F. carica* pri koncentraciji fenolnih jedinjenja od 7 µg/mL određen CUPRAC metodom iznosio je 21,167 ± 6,94 µg ekvivalenta troloksa/mL (Tabela 1). FRAP vrijednost za koncentraciju fenolnih jedinjenja od 0,54 mg/mL iznosila je 0,582 ± 0,035 mmol $Fe^{2+}$/L, dok je pri koncentraciji od 7 µg/mL iznosila 0,007 ± 0,001 mmol $Fe^{2+}$/L. Redukcijska sposobnost povećavala se sa koncentracijom ekstrakta (Tabela br. 1).

TLC analizom detektovano je prisustvo jedinjenja koja odgovaraju kvercetinu (Rf=0,28), hlorogenoj kiselini (Rf=0,47) i galnoj kiselini (Rf=0,82). Dodatno su registrovane mrlje pri Rf vrijednostima 0,55, 0,15 i 0,06, što ukazuje na prisustvo drugih komponenti u ekstraktu, ali zbog nedostatka standarda nismo ih identifikovali (Slika br. 2, Tabela br. 2).

### Određivanje *in vitro* inhibitornog dejstva biljnog ekstrakta na aktivnost α-amilaze

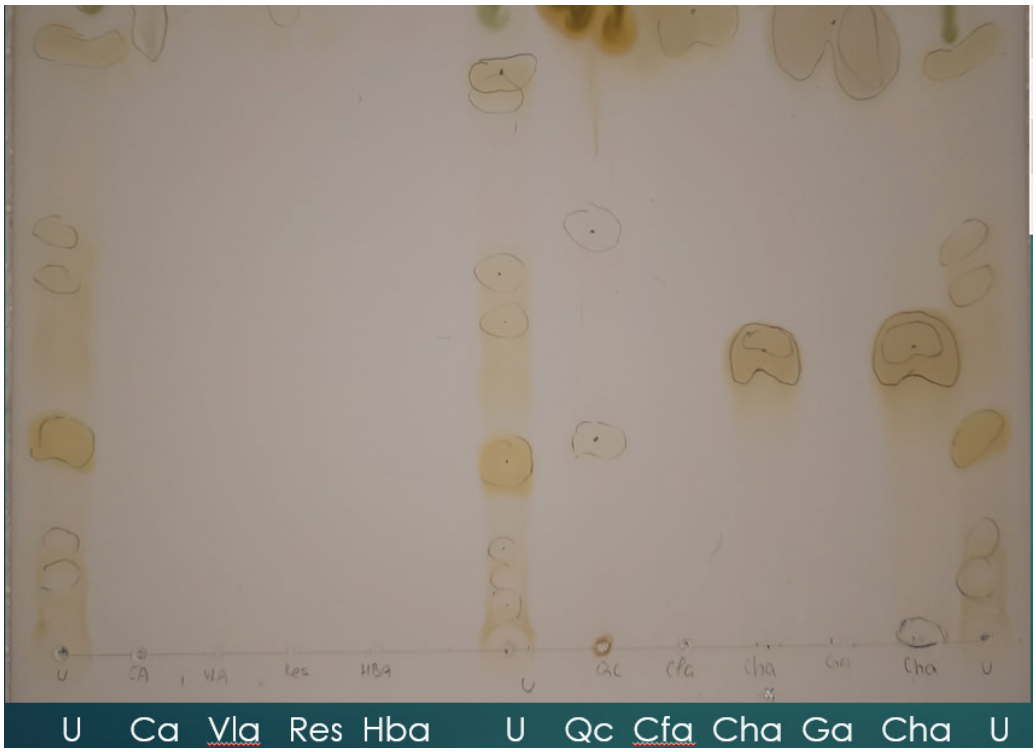
Ekstrakt *F. carica* je pokazao sposobnost inhibicije α-amilaze zavisnu o koncentraciji fenolnih jedinjenja. U ispitivanom rasponu koncentracija fenolnih jedinjenja od 15 do 540

μg/mL, procenat inhibicije se kretao od 9,77% do 92,11%, sa izračunatom $IC_{50}$ vrijednošću od 305.59 ± 8.02 μg/mL (Tabela br.1).

Tabela 1. Koncentracija fenolnih jedinjenja, antioksidativni kapacitet i antidijabetička svojstva ekstrakta lista *Ficus carica* L.

| Koncentracija fenolnih jedinjenja i flavonoida | | Antioksidativni kapacitet | | | | | | Inhibicija α-amilaze |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Fenolna jedinjenja (mgGAE/gDW) | Flavonoidi (mgQE/gDW) | ABTS $IC_{50}$ (μg/mL) | FRAP (mmol$Fe^{2+}$/L) | | CUPRAC (μg troloksa/mL) | PM (μg/mL) | | $IC_{50}$ (μg/mL) |
| | | | Koncentracija fenolnih jedinjenja | | Koncentracija fenolnih jedinjenja | ekvivalenata Vit. C | ekvivalenata Vit. E | |
| | | | 7 μg/mL | 540 μg/mL | 7 μg/mL | | | |
| 16,25±0,48 | 5,20±0,01 | 3.01 ± 0.14 | 0,007±0,0009 | 0,58±0,03 | 21,17±0,69 | 140,38± 20,29 | 285,33± 42,96 | 305.59 ± 8.02 |

GAE-galna kiselina; DW-suva masa; QE-kvercetin; ABTS-metoda uklanjanja ABTS (2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolin-6-sulfonska kiselina)) radikala; FRAP-*Ferric reducing antioxidant power*; CUPRAC-*Cupric Reducing Antioxidant Capacity*; PM-fosfomolibdenska reakcija




**Slika br. 2** TLC hromatogram ekstrakta lista smokve i referentnih standarda
*U-uzorak, Qc-kvercetin, Hba-hidroksibenzojeva kiselina, Vla-vanilična kiselina, Ga-galna kiselina, Cha-hlorogena kiselina, Cfa- kafeinska kiselina, Res- reservatol, Ca-koumarinska kiselina*

| **Tabela br. 2.** Rf vrijednosti detektovanih jedinjenja u ekstraktu lista smokve i standardnih jedinjenja | | | |
|---|---|---|---|
| Rf vrijednost jedinjenja ekstrakta | Standard | Rf standarda | Podudarnost |
| 0,82±0,021 | Galna kiselina | 0,86 | moguća podudarnost |
| 0,82±0,021 | Kafeična kiselina | 0,87 | nema podudarnosti |
| 0,55±0,030 | – | – | nema podudarnosti |
| 0,47±0,025 | Hlorogena kiselina | 0,41 | moguća podudarnost |
| 0,28±0,021 | Kvercetin | 0,29 | moguća podudarnos |
| 0,15±0,012 | – | – | nema podudarnosti |
| 0,06±0,01 | – | – | nema podudarnosti |
| | | | |

## DISKUSIJA

### Kvantitativna i kvalitativna analiza fenolnih jedinjenja

Dobijena vrijednost za koncentraciju fenolnih jedinjenja u našem radu (Tabela br. 1) je nešto niža u poređenju sa rezultatima koje su objavili Abdolinejad i saradnici [12] za dvije iranske sorte smokve (*Sabz* i *Tors*) sa vrijednostima od, 18,52 do 23,604 mg GAE/g DW.

Za ekstrakciju fenolnih jedinjenja iz listova smokve Alcántara i saradnici [13] su koristili vodu i 50% etanol. Primjenom ove metode autori su utvrdili sadržaj ukupnih fenolnih jedinjenja od 21,2 mg GAE/g DE(suvog ekstrakta) za vodeni ekstrakt i 17,1 mg GAE/g DE za ekstrakt u 50% etanolu.

Renda i saradnici [14] su odredili sadržaj ukupnih fenolnih jedinjenja za list od 28,38 ± 2,19 mg GAE/g DW u dihlormetanskom ekstraktu, 29,93 ± 1,27 mg GAE/g DW u n-heksanskom ekstraktu, 33,72 ± 1,55 mg GAE/g DW u metanolnom ekstraktu, 36,88 ± 5,64 mg GAE/g DW u vodenom ekstraktu i 72,58 ± 4,52 mg GAE/g DW u n-butanolskom ekstraktu.

S druge strane, koncentracija fenolnih jedinjenja u našem radu su bile više u odnosu na rezultate koje su objavili Ivanov i saradnici [15] za različite ekstrakte lista smokve sakupljene u Plovdivu u Bugarskoj. U navedenom radu autori su utvrdili sadržaj ukupnih fenolnih jedinjenja u rasponu od 0,6 (ekstrakcija u n-heksanu) do 6,6 mg GAE/g DW (ekstrakcija u vodi), dok su vrijednosti za metanolni, etanolni i acetatni ekstrakt iznosile 3,9 mg GAE/g DW i 2,5 mg GAE/g DW, 1,5 mg GAE/g DW, respektivno. Manji sadržaj fenolnih jedinjenja dobijen u njihovom istraživanju može biti posljedica korištenja 95% etanola kao ekstrakcionog rastvarača jer u 80% etanolu veće prisustvo vode u smjesi povećava sposobnost ekstrakcije polarnih fenolnih jedinjenja iz biljnog tkiva.

Boukhalfa i saradnici [16], su u metanolnom ekstraktu lista *F. carica* izmjerili sadržaj ukupnih fenola od 19,78 mg GAE/g DW.

Prema istraživanjima koja su obavili Mahmoudi i saradnici [17], raspon ukupnog sadržaja fenolnih jedinjenja u različitim sortama *F. carica* sakupljenih u Alžiru je bio u

opsegu od 42.889 ± 0.357 mg GAE/g DE (suvog ekstrakta) do 58.704 ± 0.455 mg GAE/g DE. Mahmoudi i saradnici koristili su Soxhlet ekstrakciju u metanolu, dok je u našem istraživanju korišten 80% etanol kao ekstrakcioni rastvarač. Takođe, rezultati su izraženi kao mg GAE/g suvog ekstrakta te poređenje ne može biti direktno budući da vrijednosti izražene prema masi ekstrakta često daju veće koncentracije fenolnih jedinjenja nego vrijednosti izražene prema početnoj masi biljnog materijala.

Orhan i saradnici [18], odredili ukupan sadržaj fenolnih jedinjenja u ekstraktima listova *Ficus carica* var. *domestica.* U njihovom istraživanju n-butanolni ekstrakt listova sadržavao je 85,9 ± 3,2 mg GAE/g ekstrakta.

U radu koji su objavili Mopuri i sar. [19] pokazano je da ukupni sadržaj fenolnih jedinjenja u listovima smokve sakupljenim u Seshachalam šumi, u Indiji, bio različit za različita ekstrakciona sredstva. Tako je koncentracija fenolnih jedinjenja za etanolni ekstrakt iznosila 54,14 ± 4,325 mg GAE/g ekstrakta, za vodeni ekstrakt 32,45 ± 5,058 mg GAE/g ekstrakta, etilacetatni ekstrakt 12,22 ± 0,124 mg GAE/g ekstrakta. Ovdje treba naglasiti da su rezultati izraženi po g ekstrakta pa se ne mogu direktno upoređivati sa našim rezultatima.

Treba imati u vidu da Folin-Čikalteova metoda nije potpuno specifična isključivo za fenolna jedinjenja, jer reaguje i sa drugim jedinjenjima redukcionih svojstava poput askorbinske kiseline i pojedinih redukujućih šećera. Zbog toga dobijene vrijednosti predstavljaju procjenu ukupnog redukcionog kapaciteta uzorka i pokazatelji su ukupnog sadržaja fenolnih jedinjenja. Na rezultate može uticati primjenjeni rastvarač, način ekstrakcije, geografsko porijeklo biljaka kao i period uzorkovanja.

Koncentracija flavonoida u ekstraktu lista smokve je bila 5,2 mg QE/g DW (Tabela br. 1). Vrijednosti za koncentraciju fenolnih jedinjenja dobijene u ovom radu više su od rezultata objavljenih u radu Ivanov i saradnici [15], koji su primjenom slične $Al^{3+}$ kolorimetrijske metode odredili sadržaj ukupnih flavonoida u rasponu od 0,3 mg QE/g DW u n-heksanskom ekstraktu do 2,1 mg QE/g DW u vodenom ekstraktu, dok su vrijednosti za acetonski, etanolni i metanolni ekstrakt iznosile 1,3, 1,6 i 1,4 mg QE/g DW, redom.

Boukhalfa i saradnici [16] su pokazali sadržaj flavonoida od 9,72±0,09 mg QE/g DW.

Orhan i saradnici [18] su u hloroformskom ekstraktu lista *F. carica* utvrdili znatno viši sadržaj ukupnih flavonoida 252,5 ± 1,1 mg QE/g ekstrakta, što se može objasniti razlikama u vrsti ekstrakta, načinu izražavanja rezultata i primijenjenim uslovima ekstrakcije.

Mopuri i saradnici (2018) [19], utvrdili su sadržaj ukupnih flavonoida od 9,24 ± 0,22 mg QE/g ekstrakta u etilacetatu, 24,52 ± 1,10 mg QE/g ekstrakta u etanolnom ekstraktu i 24,05 ± 3,02 mg QE/g ekstrakta u vodenom ekstraktu.

Yassien i saradnici [20] su zabilježili vrijednost od 43,92 mg QE/g suhog ekstrakta lista.

Mahmaudi i saradnici [17] su pokazali da se sadržaj ukupnih flavonoida za različite sorte *F.carica* iz Alžira, kreće u rasponu od 11,67 ± 0,04 do 16,21 ± 0,16 mg QE/g DE.

U ekstraktu lista smokve tankoslojnom hromatografijom smo detektovali prisustvo flavonoida kvercetina i dvije fenolne kiseline (hlorogene i galne kiseline) (Slika 2, Tabela br. 2).

Dobijeni rezultati u skladu su s nalazima Abdulah i saradnika [24] koji su TLC analizom utvrdili prisustvo flavonoida i fenolnih jedinjenja, kao i drugih sekundarnih metabolita, uključujući terpenoide, kumarine, saponine, alkaloide i glikozide.

Takođe, Al Jabri i saradnici [34] primjenom TLC i HPLC (*eng. High-Performance Thin-Layer Chromatography)* metoda identifikovali su kvercetin kao dominantni flavonoid, uz prisustvo rutina u manjim količinama, što potvrđuje značaj kvercetina kao jednog od glavnih flavonoida lista smokve.

Dewi i saradnici [35] u etanolnom ekstraktu lista *F. carica* ispitivali su kvercetin i luteolin kao bioaktivna jedinjenja u *in silico* analizi imunomodulatornog potencijala, pri čemu

su oba jedinjenja pokazala afinitet vezivanja prema proteinima interferon-gama (IFN-γ), faktor nekroze tumora alfa (TNF-α) i interleukin-2 (IL-2), potvrđujući njihov značaj u biološkoj aktivnosti lista smokve.

Rezultati ovog istraživanja djelimično su u skladu i sa nalazima Agatonović-Kustrin i saradnika [32], koji su primjenom HPTLC analize utvrdili prisustvo flavonoida i polifenolnih kiselina, uključujući hlorogenu i kafeičnu kiselinu.

Slične rezultate objavili su i Renda i saradnici [14], koji su LC–HRMS (*eng. Liquid Chromatography–High-Resolution Mass Spectrometry*) analizom n-butanolskog ekstrakta lista *F. carica* identifikovali 27 fenolnih jedinjenja. Najzastupljeniji su bili rutin (40,13 g/kg), fumarična kiselina (4,658 g/kg), hiperozid (1,767 g/kg) i hlorogena kiselina (1,517 g/kg), dok su među identifikovanim jedinjenjima bili i kvercetin, vanilična kiselina i kafeična kiselina.

Razlike između dobijenih rezultata i podataka iz literature mogu se objasniti primjenom različitih analitičkih metoda. TLC predstavlja jednostavnu i brzu metodu za preliminarnu kvalitativnu identifikaciju fenolnih jedinjenja, dok HPTLC i posebno LC–HRMS omogućavaju znatno osjetljiviju identifikaciju i kvantifikaciju većeg broja jedinjenja.

**Antioksidativna aktivnost**

Dobijena vrijednost za sposobnost uklanjanja ABTS radikala u našem radu značajno odstupa od rezultata dostupnih u literaturi. Prema dobijenoj vrijednosti $IC_{50}$ od 3.01 ± 0.14 μg/mL ispitivani list smokve pokazuje izuzetnu antioksidativnu vrijednost mjerenu ABTS metodom (Tabela br. 1).

Boukhalfa i saradnici [16], za metanolni ekstrakt lista smokve navode $IC_{50}$ od 288,3 ± 4,98 μg/mL, dok su Ergul i saradnici [21] odredili vrijednosti od 559,39 μg/mL za metanolni i 428,51 μg/mL za vodeni ekstrakt.

Sweidan i saradnici [22] takođe su zabilježili znatno višu vrijednost od 0,488 ± 0,030 mg/mL, odnosno 488 ± 30 μg/mL.

Posebno je značajno da su Maulid i saradnici [23] za 70% etanolni ekstrakt lista *Ficus benjamina* odredili $IC_{50}$ od 28,4 μg/mL, dok je za vitamin C dobijena vrijednost 3,1 μg/mL.

Prema Abdulah i sar. [24] pokazano je da antioksidativna aktivnost značajno zavisi od vrste rastvarača korištenog za ekstrakciju. U njihovom istraživanju najizraženiju aktivnost pokazala je metanolna frakcija, sa $IC_{50}$ vrijednošću od 72,6 ± 0,06 μg/mL i maksimalnom inhibicijom slobodnih radikala od 72,31%, što ukazuje na najveću sposobnost neutralizacije ABTS radikala među ispitivanim ekstraktima. Sirovi metanolni ekstrakt pokazao je umjerenu antioksidativnu aktivnost ($IC_{50}$=194 ± 0,07 μg/mL, maksimalna inhibicija 60,94%), dok je dihlormetanski ekstrakt imao nešto slabiju aktivnost ($IC_{50}$=227,74 ± 0,08 μg/mL, maksimalna inhibicija 52,45%). Najniži antioksidativni potencijal zabilježen je kod heksanske frakcije, za koju nije bilo moguće odrediti $IC_{50}$ vrijednost zbog maksimalne inhibicije od svega 29,87%. Kao referentni antioksidans korišten je troloks, koji je pokazao znatno veću antioksidativnu aktivnost u odnosu na sve ispitivane biljne ekstrakte, sa $IC_{50}$ vrijednošću od 5 ± 0,03 μg/mL i maksimalnom inhibicijom od 93,29% [24].

Akhtar i sar. [25] su analizirali antioksidativne aktivnosti ABTS metodom osamnaest kultivara lista *F.carica*. Ekstrakti lista su dobijeni maceracijom i ultrazvučnom ekstrakcijom. Autori su utvrdili veoma visok kapacitet neutralizacije ABTS radikala, pri čemu se procenat inhibicije kretao od 96,61 ± 0,22% do 99,33 ± 0,23% za ekstrakte dobijene maceracijom, odnosno od 97,82 ± 0,23% do 99,79 ± 0,13% za ekstrakte dobijene ultrazvučnom ekstrakcijom. Antioksidativni kapacitet izražen kao troloks ekvivalentni (TEAC) iznosio je 57,48 ± 0,13 do 58,57 ± 0,07 mg TE (troloks ekvivalenta)/g DW, pri čemu je kultivar *Violette Solise* pokazao najveću, a kultivar *Alma* najmanju antioksidativnu aktivnost. Veća efikasnost ultrazvučne ekstrakcije u odnosu na maceraciju, može se objasniti intenzivni-

jim razaranjem ćelijskih zidova i boljim oslobađanjem fenolnih jedinjenja odgovornih za antioksidativnu aktivnost.

Ukupni antioksidativni kapacitet mjeren fosfomolibdenskom metodom našem radu je bio viši izražen u odnosu na ekvivalente vitamin E (Tabela br. 1). Tikent i saradnici [26] su primjenom fosfomolibdenske metode ispitivali hidroetanolne ekstrakte listova *F. carica* različitih marokanskih kultivara. Najveći ukupni antioksidativni kapacitet zabilježen je kod hidroetanolnog ekstrakta kultivara *Malha* i iznosio je 179,0 ± 2,1 μg vitamina C/mg ekstrakta, dok su niže vrijednosti utvrđene za hidroetanolne ekstrakte kultivara *Ghoudane* sa 133,0 ± 9,2 μg vitamina C/mg ekstrakta, *Chetoui* sa 113,0 ± 6,5 μg C/mg ekstrakta i *Onk Hmam* pri čemu je najmanja vrijednost iznosila 92,9 ± 9,7 μg C/mg ekstrakta.

S druge strane, Abdel-Rahman i saradnici [27], odredili su ukupni antioksidativni kapacitet etanolnog ekstrakta lista *F.carica* (70% etanol) i dobili vrijednost od 0,569 mg vitamina C/g ekstrakta.

Konyalıoğlu i sar. [28] procijenili su ukupni antioksidativni kapacitet n-heksanskog, etanolnog, metanolnog, etilacetatnog i vodenog ekstrakta lista *F. carica* primjenom fosfomolibdenske metode. Najveći ukupni antioksidativni kapacitet zabilježen je kod vodenog ekstrakta (23,507 ± 1,154 mM α-TAE (α-tokoferol acetat ekvivalenata)/g suve mase), zatim etilacetatnog (22,950 ± 1,731 Mm α-TAE/g DW) i metanolnog ekstrakta (17,126 ± 1,542 mM α-TAE/g DW), dok su etanolni (14,546 ± 1,760 mM α-TAE/g DW) i n-heksanski ekstrakt (14,040 ± 1,417 mM α-TAE/g DW) pokazali nešto niže vrijednosti. Iako su rezultati izraženi u različitim jedinicama i stoga nisu direktno uporedivi s rezultatima ovog istraživanja, oba rada potvrđuju da etanolni i hidroetanolni ekstrakti lista *F. carica* posjeduju izražen ukupni antioksidativni kapacitet.

Naši rezultati su pokazali da ekstrakt lista smokve ima sposobnost redukcije $Fe^{3+}$ jona i da je ta sposobnost izraženija za veće koncentracije fenolnih jedinjenja (0,581 mmol$Fe^{2+}$/L za koncentraciju fenolnih jedinjenja od 0,54 mg/mL, (Tabela 1). Prema Ergul i sar. [21] metanolni ekstrakt lista smokve pokazao je veću sposobnost redukcije $Fe^{3+}$ u $Fe^{2+}$ u odnosu na vodeni ekstrakt pri višim koncentracijama, dok pri nižim koncentracijama između ekstrakata nisu uočene značajne razlike u redukcijskom kapacitetu.

Slični rezultati zabilježeni su i u istraživanju Abdulah i saradnika [24] gdje su različite frakcije ekstrakta lista *F. carica* pokazale izraženu redukcionu sposobnost u FRAP testu. Najveća vrijednost zabilježena je za metanolnu frakciju (92,97 ± 0,10 mM $Fe^{2+}$/mg uzorka), zatim za sirovi metanolni ekstrakt (87,88 ± 0,08 mM $Fe^{2+}$/mg uzorka), dihlormetansku frakciju (82,16 ± 0,02 mM $Fe^{2+}$/mg uzorka) i heksansku frakciju (75,86 ± 0,12 mM $Fe^{2+}$/mg uzorka), dok je standard kvercetin pokazao znatno veću redukcionu sposobnost (353,08 ± 0,06 mM $Fe^{2+}$/mg) [24].

Boukhalfa i saradnici [16] su ispitivali antioksidativni potencijal ekstrakata lista i grančica *F. carica* primjenom FRAP metode. Autori su dobili $IC_{50}$ vrijednosti od 50,8 μg/mL za ekstrakt lista. Takođe su naveli da su Shi i saradnici utvrdili redukcionu moć ekstrakta lista *F. carica* od približno 33% pri koncentraciji od 0,25 mg/mL, što potvrđuje izražen antioksidativni potencijal ove biljne vrste.

Ivanov i sar. [15] u radu u kojem je antioksidativna aktivnost različitih ekstrakata lista *F. carica* izražena kao mM troloks ekvivalenata po gramu suve mase (mM TE/g DW) pokazuju najveću redukcionu aktivnost vodenog ekstrakta (53,9 mM TE/g DW), zatim metanolnog (30,7 mM TE/g DW), etanolnog (19,3 mM TE/g DW), acetonskog (8,3 mM TE/g DW) i heksanskog ekstrakta (1,3 mM TE/g DW).

Razlike u načinu izražavanja rezultata (mmol $Fe^{2+}$/L, mM TE/g DW, μmol TE/g ili $IC_{50}$) posljedica su različitih metodologija i načina proračuna, zbog čega direktno numeričko poređenje nije moguće.

Etanolni ekstrakt smokve je pokazao sposobnost redukcije $Cu^{2+}$ (Tabela br. 1).

Guler i saradnici [29] su primjenom CUPRAC metode ispitivali antioksidativni kapa-

citet metanolnog i etanolnog ekstrakta lista *F. carica*. Pri koncentraciji od 10 mg/mL metanolni ekstrakt pokazao je veći redukcioni kapacitet (oko 4 μg/mL TE) u odnosu na etanolni ekstrakt (oko 3,5 μg/mL TE). Najveća antioksidativna aktivnost zabilježena je pri koncentraciji od 100 mg/mL, gdje je metanolni ekstrakt dostigao približno 17 μg/mL TE, dok je etanolni ekstrakt pokazao nižu vrijednost od približno 11 μg/mL TE. Ovi rezultati ukazuju na koncentracijski zavisno povećanje redukcionog kapaciteta ekstrakata, pri čemu je metanol bio efikasniji rastvarač za ekstrakciju jedinjenja odgovornih za antioksidativnu aktivnost.

Malefaki i sar. [30] su primijenili CUPRAC metodu prema Apaku i saradnicima u istraživanju u kome su poredili različite ekstrakte lista *F. carica*. Prema njihovim rezultatima najveći antioksidativni kapacitet pokazao je ekstrakt dobijen ekstrakcijom sa 40% etanolom i vodom (47,2 ± 1,5 mg troloks ekvivalenta/g DW), zatim metanolni ekstrakt (44,8 ± 2,0 mg TE/g DW), dok je etilacetatni ekstrakt imao znatno nižu vrijednost (9,5 ± 0,8 mg TE/g DW).

Slični rezultati objavljeni su u istraživanju Elshaafi i sar. [31] u kojem je ispitivan uticaj različitih postupaka sušenja na antioksidativnu aktivnost tri kultivara lista smokve (BTM 6, MD-J i TGF-J). Načina sušenja je značajno uticao na antioksidativni kapacitet određen CUPRAC metodom. Najveće vrijednosti zabilježene su kod listova sušenih u sušnici na 40 °C, pri čemu je kultivar *BTM 6* pokazao najveću aktivnost (3893 ± 162 mg TE/100 g DW), zatim kultivar *TGF-J* (3473 ± 61 mg TE/100 g DW) i *MD-J* (3011 ± 176 mg TE/100 g DW). Smanjenje antioksidativne aktivnosti uočeno je nakon sušenja na višim temperaturama (50 i 60 °C), dok su svježi listovi pokazali najniže CUPRAC vrijednosti (434–634 mg TE/100 g DW). Autori su zaključili da način sušenja značajno utiče na očuvanje bioaktivnih jedinjenja odgovornih za antioksidativnu aktivnost, pri čemu sušenje na 40 °C najbolje čuva fenolna jedinjenja i flavonoide.

Utvrđene razlike između rezultata mogu biti zbog uticaja polarnosti rastvarača na efikasnost ekstrakcije fenolnih i flavonoidnih jedinjenja, pri čemu su polarniji rastvarači pokazali veću sposobnost ekstrakcije jedinjenja odgovornih za antioksidativni potencijal. Razlike u sadržaju bioaktivnih komponenti i njihovog dejstva u odnosu na rezultate prethodnih istraživanja mogu biti posljedica međusobnog djelovanja genetičkih karakteristika sorte, klimatskih i geografskih uslova, starosti listova i vremena berbe, kao i primijenjenih uslova ekstrakcije i analitičkih metoda. Na varijabilnost rezultata mogu dodatno uticati koncentracija i vrsta rastvarača, odnos biljnog materijala i rastvarača, temperatura i trajanje ekstrakcije, kao i uslovi i protokoli korištenih analitičkih metoda.

### *In vitro* inhibicija α-amilaze

Antidijabetička aktivnost ekstrakta smokve je određena kao sposobnost inhibicije α-amilaze (Tabela br. 1). U istraživanju Mopuri i saradnika [19] etanolni ekstrakt lista pokazao je $IC_{50}$ vrijednost od 550,96 ± 33,93 μg/mL, dok su vodeni, etilacetatni i heksanski ekstrakti imali još slabiju inhibitornu aktivnost, sa $IC_{50}$ vrijednostima od 687,50 ± 41,99 μg/mL, 2665,57 ± 514,92 μg/mL i 11611,26 ± 318,90 μg/mL, respektivno.

Vrijednost $IC_{50}$ određena u našem radu ukazuje da je za postizanje 50% inhibicije bila potrebna znatno niža koncentracija fenolnih jedinjenja od one korištene u istraživanju Ergula i saradnika [21] (Tabela br. 1). Navedeni autori su inhibitornu aktivnost procjenjivali pri koncentraciji ekstrakta od 2 mg/mL (2000 μg/mL), pri kojoj su metanolni i vodeni ekstrakti ostvarili 67,32 ± 2,46% i 69,08 ± 6,05% inhibicije α-amilaze. .

Agatonović-Kustrin i saradnici [32] potvrdili su inhibitornu aktivnost ekstrakta lista *F. carica* prema α-amilazi primjenom HPTLC metode kombinovane sa efektno usmjerenom analizom. Autori su utvrdili da je $IC_{50}$ vrijednost ekstrakta bila značajno viša od vrijednosti standardnog inhibitora akarboze, što ukazuje na slabiju inhibitornu aktivnost

sirovog ekstrakta u odnosu na čisti farmakološki inhibitor. Ipak, rezultati potvrđuju prisustvo bioaktivnih komponenti u listu smokve koje mogu doprinijeti inhibiciji α-amilaze.

U istraživanju Ara i saradnika [33] 70% metanolni ekstrakt lista *F. carica* pokazao je najveću inhibitornu aktivnost prema α-amilazi među ispitivanim dijelovima biljke, sa vrijednošću $IC_{50}$ od 0,896 mg/mL (896 μg/mL). Navedena vrijednost bila je znatno viša od $IC_{50}$ vrijednosti dobijene u ovom istraživanju. Biljni materijal u istraživanju Ara i saradnika prikupljen je u Pakistanu, gdje se klimatski i ekološki uslovi razlikuju od uslova područja iz kojeg je prikupljen materijal analiziran u ovom istraživanju.

## ZAKLJUČAK

Rezultati ovog istraživanja pokazali su da ekstrakt lista *Ficus carica* sadrži značajnu količinu fenolnih jedinjenja i flanovonoida kao i izraženu antioksidativnu aktivnost. Takođe, ekstrakt je pokazao *in vitro* sposobnost inhibicije aktivnosti alfa amilaze što ukazuje na njegovu sposobnost da uspori razgradnju skroba i nagli porast koncentracije glukoze u krvi nakon obroka. Buduća istraživanja trebalo bi usmjeriti na identifikaciju i izolaciju pojedinačnih bioaktivnih jedinjenja ekstrakata lista *F. carica* odgovornih za antioksidativnu aktivnost i sposobnost inhibicije alfa amilaze. Posebnu pažnju potrebno je posvetiti optimizaciji postupaka sakupljanja, ekstrakcije, prečišćavanja i standardizaciji.

## LITERATURA


[1] Davidović-Plavšić B., Kukavica B. (2023): *Abiotički stres i redoks homeostaza ćelije*. Univerzitet u Banjoj Luci, Banja Luka.

[2] Lenzen S. (2008): Chemistry and biology of reactive species with special reference to the antioxidative defence status in pancreatic β-cells. *Biochimica et Biophysica Acta – General Subjects*, 1780(2), 384–392. doi: 10.1016/j.bbagen.2017.05.013

[3] Zohary D., Hopf M. (2000): *Domestication of Plants in the Old World*. 3rd edition. Oxford University Press. Oxford.

[4] Walia A., Kumar N., Singh R., Kumar H., Kumar V., Kaushik R., i sar.. Bioactive compounds in *Ficus* fruits, their bioactivities, and associated health benefits: A review. Int J Food Sci, 2022, 2022, 6597092, doi:10.1155/2022/6597092.

[5] Ašić S. Ljekovito bilje i njegova upotreba. Zagreb: Erudit; 2002.

[6] Singleton, V. L., & Rossi Jr, J. A. (1965). Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. *American journal of Enology and Viticulture*, *16*(3), 144-158 doi: 10.5344/ajev.1965.16.3.144

[7] Chang, C. C., Yang, M. H., Wen, H. M., & Chern, J. C. (2002). Estimation of total flavonoid content in propolis by two complementary colorimetric methods. *Journal of food and drug analysis*, *10*(3). doi: 10.38212/2224-6614.2748

[8] Re, R., Pellegrini, N., Proteggente, A., Pannala, A., Yang, M., & Rice-Evans, C. (1999). Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free radical biology and medicine*, *26*(9-10), 1231–1237. doi: 10.1016/S0891-5849(98)00315-3

[9] Prieto, P., Pineda, M., & Aguilar, M. (1999). Spectrophotometric quantitation of antioxidant capacity through the formation of a phosphomolybdenum complex: specific application to the determination of vitamin E. *Analytical biochemistry*, *269*(2), 337–341. doi: 10.1006/abio.1999.4019

[10] Apak, R., Güçlü, K., Demirata, B., Özyürek, M., Çelik, S. E., Bektaşoğlu, B., ... & Özyurt, D. (2007). Comparative evaluation of various total antioxidant capacity assays applied to phenolic compounds with the CUPRAC assay. *Molecules*, *12*(7), 1496-1547. doi: 10.3390/12071496

[11] Benzie, I. F., & Strain, J. J. (1996). The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of "antioxidant power": the FRAP assay. *Analytical biochemistry*, *239*(1), 70–76. doi: 10.1006/abio.1996.0292

[12] Abdolinejad R., Shekafandeh A., Jowkar A. In vitro tetraploidy induction creates enhancements in morphological, physiological and phytochemical characteristics in the fig tree (*Ficus carica* L.). Plant Physiology and Biochemistry, 2021, 166, 191–202, doi:10.1016/j.plaphy.2021.05.047.

[13] Alcántara C., Žugčić T., Abdelkebir R., García-Pérez J. V., Jambrak A. R., Lorenzo J. M., Collado M. C., Granato D., Barba F. J. (2020): Effects of ultrasound-assisted extraction and solvent on the phenolic profile, bacterial growth, and anti-inflammatory/antioxidant activities of Mediterranean olive and fig leaves extracts. *Molecules*, 25, 1718. doi.org/10.3390/molecules25071718.
[14] Renda G., Barut B., Ceren R., Aydin E. (2023): In vitro tyrosinase inhibitory, DNA interaction studies, and LC-HRMS analysis of *Ficus carica* leaves. *Turkish Journal of Chemistry*, 47(2), 465–475. doi.org/10.55730/1300-0527.3552.
[15] Ivanov I., Dencheva N., Petkova N., Denev P. (2018): Determination of total polyphenols and antioxidant activity of different extracts from *Ficus carica* L. leaves. *Journal of Chemical Technology and Metallurgy*, 53(5), 963–970. doi: 10.15547/artte.2015.01.011
[16] Boukhalfa F., Kadri N., Chibane M. (2018): Antioxidant activity and hypolipidemic effect of *Ficus carica* leaf and twig extracts in Triton WR-1339-induced hyperlipidemic mice. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 101, 668–674. 10.3233/MNM-17180
[17] Mahmoudi S., Khali M., Benkhaled A., Benamirouche K., Baiti I. Phenolic and flavonoid contents, antioxidant and antimicrobial activities of leaf extracts from ten Algerian *Ficus carica* L. varieties. Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine, 2016, 6(3), 239–245, doi:10.1016/j.apjtb.2015.12.010.
[18] Orhan I.E., Ustün O., Sener B. Estimation of cholinesterase inhibitory and antioxidant effects of the leaf extracts of *Anatolian Ficus carica* var. *domestica* and their total phenol and flavonoid contents. Nat Prod Commun, 2011, 6(3), 375–378.
[19] Mopuri R., Ganjayi M., Meriga B., Koorbanally N. A., Islam M. S. (2018): The effects of *Ficus carica* on the activity of enzymes related to metabolic syndrome. *Journal of Food and Drug Analysis*, 26(2), 783–791. doi: 10.1016/j.jfda.2017.03.001
[20] Yassien E.E., Mohamed A.M.S., Mahmoud M.E., Zaki A.M. Sodium benzoate induced toxicities in albino male rats: mitigating effects of *Ficus carica* and *Cymbopogon citratus* leaf extract. Environ Sci Pollut Res, 2022, 29(60), 90567–90579, doi:10.1007/s11356-022-22020-0.
[21] Ergül M., Ergül M., Eruygur N., Ataş M., Uçar E. (2020): In vitro evaluation of the chemical composition and various biological activities of *Ficus carica* leaf extracts. *South African Journal of Botany*, 130, 385–393.doi: 10.4274/tjps.galenos.2018.70037
[22] Sweidan N., Shakya A.K., Mahmoud I., Al Ma'areef A., Ali L., Khalaf H. *Ficus carica* leaf: phytochemical analysis, antioxidant and antibacterial activities. Kuwait Journal of Science, 2026, članak 100555, doi:10.1016/j.kjs.2026.100555.
[23] Wicahyo S. M., Raharjo D., Permata B. R. Antioxidant Activity of Weeping Fig (Ficus benjamina L.) Leaf Extract: A Comparative Analysis Using ABTS and FRAP Assays. Proceedings of the 6th International Conference on Health, Science and Technology (ICOHETECH), 2025, doi:10.47701/4rwtq796.
[24] Abdullah T. A., Mohd K. S., Tajul Ariffly N. 'A., Abu Bakar F., Alwi A. Phytochemical Screening and Antioxidant Properties of *Ficus carica* L. Leaves, Malaysian Journal of Applied Sciences, 2025, 10(1), 56–64, doi: 10.37231/myjas.2025.10.1.427.
[25] Akhtar P., Yaakob Z., Ahmed Y., Shahinuzzaman M., Con M.M. Potential of leaves from eighteen cultivars of *Ficus carica* as antioxidants and profiling of phenolic compounds as active molecules. Iranian Journal of Pharmaceutical Sciences, 2019, 15(2), 41–60. doi: 10.55730/1300-0527.3552
[26] Tikent A., Laaraj S., Bouddine T., Chebaibi M., Bouhrim M., Elfazazi K., i sar.. Antioxidant potential, antimicrobial activity, polyphenol profile analysis, and cytotoxicity against breast cancer cell lines of hydro-ethanolic extracts of leaves of *Ficus carica* L. from Eastern Morocco. Frontiers in Chemistry, 2024, 12, doi:10.3389/fchem.2024.1505473.
[27] Abdel-Rahman R., Ghoneimy E., Abdel-Wahab A., Eldeeb N., Salem M., Salama E., i sar.. (2021): The therapeutic effects of *Ficus carica* extract as antioxidant and anticancer agent. *South African Journal of Botany*, 141, 273–277. doi.org/10.1016/j.sajb.2021.04.019.
[28] Konyalıoğlu S., Sağlam H., Kıvçak B. (2005): α-Tocopherol, flavonoid, and phenol contents and antioxidant activity of *Ficus carica* leaves. *Pharmaceutical Biology*, 43(8), 683–688. doi: 10.1080/13880200500383538
[29] Güler E.M., Özkan B.N., Bozalı K., Dundar T., Kocyiğit A. *Ficus carica* L. extract: a glimmer of hope on AGS human gastric adenocarcinoma. World Cancer Research Journal, 2024, 11, e2746, doi:10.32113/wcrj_20242_2746.
[30] Xyderou-Malefaki A., Martău G.A., Călinoiu L.F., Ranga F., Vodnar D.C., Dimopoulou M., i sar.. Multicriteria comparison of green and conventional phenolic extraction technologies applied to *Ficus carica* L. leaves. Food Chemistry, 2026, 519, 149512, doi:10.1016/j.foodchem.2026.149512.
[31] Elshaafi I.M., Musa K.H., Abdullah Sani N. Effect of oven and freeze drying on antioxidant activity,

total phenolic and total flavonoid contents of fig (*Ficus carica* L.) leaves. Food Research, 2020, 4(6), 2114–2121, doi:10.26656/fr.2017.4(6).072.
[32] Agatonovic-Kustrin S., Gegechkori V., Kustrin E., Morton D.W. The effect of lactic acid fermentation on the phytochemical content of fig leaf extracts compared to single solvent and sequential solvents extraction. South African Journal of Botany, 2024, 166, 218–225, doi:10.1016/j.sajb.2024.01.050.
[33] Ara I., Naqvi S. H., Rehman N. U., Qureshi M. M. (2020): Comparative antioxidative and antidiabetic activities of *Ficus carica* pulp, peel and leaf and their correlation with phytochemical contents. *Journal of King Saud University – Science*, 32, 2520–2526. doi: 10.23880/oajpr-16000197
[34] Al Jabri H., Nyamathulla S., Hashim N. M., Chung L. Y. (2026): Antioxidant potential and flavonoid marker detection in two *Ficus carica* Linn. varieties. *Pharmacognosy Magazine*, 22(3), 1127–1138. doi. org/10.1177/09731296251391607.
[35] Dewi A., Rahmayanti F., Bagir H., Jannah A.F., Winanta A. Potential of fig leaf (*Ficus carica* L.) as immunomodulatory agent *in vitro* and *in silico*. OnLine Journal of Biological Sciences, 2023, 23(1), 71–80, doi:10.3844/ojbsci.2023.71.80.

# BIOLOGICAL ACTIVITY OF FIG LEAF EXTRACT (Ficus carica L.): ANTIOXIDANT CAPACITY AND α-AMYLASE INHIBITORY ACTIVITY

**Author:** IVONA IVETIĆ
**E-mail:** ivona.ivetic@student.pmf.unibl.org
**Mentor:** Prof. Biljana Kukavica
Biology Department, Faculty of Natural Sciences and Mathematics, University of Banja Luka

**Introduction:** Ficus carica L. (fig) is a plant rich in various bioactive compounds, particularly phenolic compounds and flavonoids. Phenolic compounds can neutralise free radicals, while their potential to inhibit enzymes involved in carbohydrate metabolism has been the subject of numerous studies. Fig leaves have traditionally been used in folk medicine to regulate blood glucose levels, reduce triglyceride concentrations, alleviate digestive disorders, and treat various skin conditions.

**Aim:** The aim of this study was to determine the total phenolic and flavonoid contents, evaluate the antioxidant capacity of the ethanolic extract of Ficus carica L. leaves, and determine its inhibitory activity against α-amylase.

**Materials and Methods:** Ficus carica L. leaves were collected in Bosnia and Herzegovina (the Republic of Srpska), dried, and extracted using 80% ethanol. Total phenolic and flavonoid contents, antioxidant capacity (using different assays), and α-amylase inhibitory activity were determined spectrophotometrically. Phenolic compounds were identified by thin-layer chromatography (TLC).

**Results:** The Ficus carica L. leaf extract showed high total phenolic and flavonoid contents, pronounced antioxidant activity, and α-amylase inhibitory activity. Total phenolic content was 16.255 ± 0.484 mg gallic acid equivalents (GAE)/g dry weight (DW), and total flavonoid content was 5.203 ± 0.0117 mg quercetin equivalents (QE)/g DW. The extract showed strong antioxidant activity, with an $IC_{50}$ value of 3.01 ± 0.14 μg/mL in the ABTS assay. The phosphomolybdenum assay gave a total antioxidant capacity of 285.33 ± 42.96 μg/mL as vitamin E equivalents and 140.38 ± 20.29 μg/mL as vitamin C equivalents. The $Cu^{2+}$-reducing capacity was 21.167 ± 6.94 μg Trolox equivalents/mL, and the $Fe^{3+}$ reducing capacity was 0.582 ± 0.035 mmol $Fe^{2+}$/L. Thin-layer chromatography, based on comparison with standards, indicated the presence of gallic acid, chlorogenic acid, and quercetin. The extract also inhibited α-amylase, with an $IC_{50}$ value of 305.59 ± 8.02 μg/mL. Conclusion: Ficus carica L. leaf extract is a significant source of phenolic compounds and flavonoids, with pronounced antioxidant potential and notable in vitro α-amylase inhibitory activity. These results indicate considerable biological potential of fig leaf extract.

**Keywords:** Ficus carica L.; phenolic compounds; flavonoids; antioxidant activity; α-amylase; TLC