https://doi.org/10.31298/sl.149.1-2.2

Izvorni znanstveni članci – Original scientific papers
Šumarski list, 1–2 (2025): 25–34

# VARIJACIJE U SADRŽAJU UKUPNIH FENOLA I ANTIOKSIDACIJSKE AKTIVNOSTI SVIJEŽIH LISTOVA ČUVARKUĆE (*Sempervivum tectorum* L.) S OBZIROM NA PROVENIJENCIJU IZ URBANE I RURALNE SREDINE – PODRUČJE MOSTARA, BOSNA I HERCEGOVINA

## VARIATIONS IN THE TOTAL PHENOLIC CONTENT AND ANTIOXIDANT ACTIVITY OF FRESH HOUSELEEK LEAVES (*Sempervivum tectorum* L.) WITH REGARD TO PROVENANCES FROM URBAN AND RURAL ENVIRONMENTS – THE AREA OF MOSTAR, BOSNIA AND HERZEGOVINA

Esmera KAJTAZ[1]*, Dženita ALIBEGIĆ[1], Haris NIKŠIĆ[1], Željko ŠPANJOL[2], Boris Dorbić[3]

## SAŽETAK

Cilj ovog istraživanja bio je utvrditi antioksidacijsko djelovanje i ukupni fenolni sastav svježih listova *Sempervivum tectorum* L. s obzirom na provenijenciju iz urbane i ruralne sredine. Svježi listovi biljnog materijala čuvarkuće prikupljeni su za sunčanog dana sredinom lipnja 2024. god. Homogenizirani uzorak je podvrgnut ekstrakciji maceracije na sobnoj temperaturi uz uporabu destilirane vode i vodene otopine etanola 70 % i 50 % te metanola 70 % i 50 %. Ukupni sadržaj fenola određen je Folin-Ciocalteu metodom, a antioksidacijska aktivnost procijenjena je DPPH „scavenging" metodom te izražena primjenom standarda Trolox-a kao ekvivalenta (μmol TE/g). Udio ukupnih fenola kretao se u rasponu od 42,91 ± 0,83 do 115,96 ± 0,48 mg GAE/g, u ovisnosti od vrste korištenog otapala i porijeklu biljnog materijala. Najviše vrijednosti antioksidacijske aktivnosti pokazao je metanolni ekstrakt s vrijednošću 672,51 ± 2,47 μmol TE/g, a najniže vodeni ekstrakti biljnog materijala oba porijekla. Uzorci lista čuvarkuće s više nadmorske sredine pokazali su izuzetnu antioksidacijsku aktivnost s vrijednostima od 672,51 ± 2,47 do 359,79 ± 3,97 μmol TE/g, dok uzorci prikupljeni na nižim nadmorskim visinama pokazuju nižu sposobnost uklanjanja radikala prema DPPH metodi s vrijednostima od 366,86 ± 6,91 do 232,78 ± 4,55 μmol TE/g. Uporabom multipla linearne regresije, pokazano je kako su provenijencija ($\beta$ = -0,64; t = -3,167; 0,0016 < 0,05) i otapalo ($\beta$ = 0,552; t = 2,734; 0,029 < 0,05) značajni prediktori sadržaja ukupnih fenola za analizirane uzorke. Provenijencija ($\beta$ = 0,78; t = 4,55; 0,003 < 0,05) i otapalo ($\beta$ = -0,422; t = 2,445; 0,044 < 0,05) predstavljaju također značajne prediktore i za rezultate antioksidacijske aktivnosti analiziranih uzoraka čuvarkuće. Rezultat t-testa je pokazao da postoji statistički značajna razlika (0,013 < 0,05) za antioksidacijsku aktivnost s obzirom na provenijenciju biljnog materijala (urbano/ruralno).

**KLJUČNE RIJEČI:** čuvarkuća *Sempervivum tectorum*, Folin-Ciocalteu metoda, ukupni fenoli, DPPH metoda, antioksidacijska aktivnost

[1] Esmera Kajtaz, Dženita Alibegić, prof. dr. sc. Haris Nikšić, Farmaceutski fakultet Univerziteta u Sarajevu, Bosna i Hercegovina
[2] Prof. dr. sc. Željko Španjol – Sveučilište u Zagrebu Fakultet šumarstva i drvne tehnologije, Zagreb
[3] Izv. prof. dr. sc. Boris Dorbić, Sveučilište u Splitu, Samostalni studij Mediteranska poljoprivreda, Split
* dopisni autor:Esmera Kajtaz, email: esmera.kajtaz@mail.com

## UVOD
## INTRODUCTION

Aromatično i ljekovito bilje, kao i šumski plodovi i gljive su se od davnina koristile kao narodni lijekovi ili kao pomoćna ljekovita sredstva (naprimjer tinkture, čajevi, melemi, itd.) ili kao hrana, prirodni aditivi, te konzervansi. U doba industrijalizacije isti postaju sirovina za farmaceutsku industriju, industriju pića, te kozmetologiju (Dajić Stevanović i sur., 2013). Cilj tradicionalne medicine je stvaranje blagotvornog olakšavajućeg učinka na bol ili bolest uporabom ljekovitog bilja ili biljnih pripravaka koji predstavljaju složene mješavine organskih komponenti (Cattaneo i sur., 2019).

*Sempervivum tectorum* L., u narodu poznata kao čuvarkuća, pripada obitelji *Crassulaceae* kao sukulentne biljke, odnosno biljke s debljim sukulentnim listovima u kojima se skladišti voda (Srečec i Erhatić, 2021). Rod *Sempervivum* obuhvaća oko 50 vrsta koje su rasprostranjene u sušnim predjelima Mediterana od Španjolske do Male Azije (Cattaneo i sur., 2019). Taksonomija porodice *Sempervivum* posjeduje jedinstvene biološke karakteristike. Niz bioloških ograničenja kao što su fragmentacijska područja, odnosno prema Favarger i Zesiger (1964) te Parnell i Favarger (1992) ukazuju na to da čuvarkuća raste isključivo u otvorenim staništima iznad 1000 do 2000 m. Upravo iz tog razloga većina vrsta obitava na različitim mjestima planinskog lanca, zbog čega su reproduktivno izolirane (Hart i sur., 2003). Čuvarkuća je oreofitna biljka, porijeklo se bilježi i na područjima europskih visokih planina, najčešće Alpa, Pirineja, ali raste i na Balkanu (Praeger, 1932; Klein i Kaderit, 2015, prema Villadangos i Munné-Bosch, 2023). Čuvarkuća je rasprostranjena u mediteranskim kamenjarima, a može se uzgajati i izvan izvornog staništa (Parnell i Favarger, 1993; prema Villadangos i Munné-Bosch, 2023). Čuvarkuća je zimzelena vrsta s višegodišnjim korijenom, mesnatim glatkim listovima i stabljikom koja polazi iz središnjeg dijela lišća, a završava cimoznim cvjetovima (Stojković i sur., 2015). Može narasti oko 50 cm u širinu i 15 cm u visinu, a dok cvjeta, može biti i 20 do 25 cm visine. Aktivno raste tijekom travnja i svibnja, a za vrijeme ljetnog razdoblja iz središta rozete razvija se cvijet na dugoj peteljci (Giczi i sur., 2023).

Čuvarkuća je autohtona vrsta koja raste na području Hrvatske i Bosne i Hercegovine (Nikolić, 2015).

Javlja se na kamenjaru i to na vapnenačkoj podlozi. Rasprostranjena je u centralnoj i južnoj Europi, a kao kultivirana vrsta raste u vrtovima i na krovovima kuća. Cvate od 7-9 mjeseca (Gelenčir i Gelenčir, 1991). Posjeduje dekorativne karakteristike i kao autohtona vrsta poželjna je i atraktivna za primjenu prilikom uređenja vrtova i krajobraznih površina na Mediteranu (Dorbić i sur., 2018; Dorbić i Temim, 2018).

Osim navedene vrste iz roda *Sempervivum* (čuvarkuća) u hrvatskoj flori su prisutne sljedeće vrste: *Sempervivum dolomiticum* Facchini (dolomitska čuvarkuća), *Sempervivum marmoreum* Griseb (crvena čuvarkuća) i *Sempervivum montanum* L. (brdska čuvarkuća) (Nikolić, 2015). Od navedenih vrsta u bosansko-hercegovačkoj flori dolazi vrsts *S. marmoreum* (Euro+Med PlantBase).

U bosanskohercegovačkoj flori su prisutne i sljedeće vrste iz roda *Sempervivum*: *Sempervivum erythraeum* Velen, *Sempervivum kosaninii* Praeger, *Sempervivum macedonicum* Praeger (Euro+Med PlantBase).

S fitokemijskog stanovišta značajna je i karakterizacija bioaktivnih spojeva čuvarkuće, među kojima su istaknuta antioksidacijska i antiinflamatorna svojstva, kao i mogućnost bržeg zacjeljivanja rana. Većina ovih svojstava je povezana s prisustvom fenolnih spojeva koji su identificirani u svježe cijeđenim sokovima iz listova biljke (Gentscheva i sur., 2021). Svježe cijeđeni sok čuvarkuće se u Europi često koristi u tradicionalnoj medicini kao terapija protiv upale uha ili kod opeklina. Ekstrakt biljke sadrži oko 20 različitih flavona i flavonola, najčešće kvercetina i kempferol glikozida, polisaharide, polifenolne spojeve i mikronutrijente (Dedić i sur., 2019). Biljni fenoli i polifenoli predstavljaju sekundarne prirodne metabolite koji imaju obrambenu ulogu kod uzročnika oksidativnog stresa kao što su jaka svjetlost, niska temperatura, patogeni, biljojedi. Njihov nedostatak može dovesti do povećane proizvodnje slobodnih radikala (Lattanzio, 2013). Biljke kao višestanični organizmi nemaju sposobnost za preobrazbu, ali imaju dobro razvijene sustave i mehanizme prilagodbe te zaštitu od različitih okolišnih uvjeta. Suše ili nagle varijacije visokih/niskih temperatura predstavljaju vanjske čimbenike (tzv. stresore) s nepovoljnim učinkom na biljke. Kao standardna karakteristika različitih stresora objašnjava se potencijal prekomjerne produkcije reaktivnih kisikovih molekula, tj. ROS-a (eng. *reactive oxygen species*) u biljnom tkivu, a nakupljanje istih unutar stanice uzrokuje oksidativni stres (Dumanović i sur., 2021). Primarni antioksidansi djeluju na hvatanje i neutralizaciju reaktivnih spojeva kisika i dušika te tako utječu na zaustavljanje lančane reakcije, dok fenolne komponente predstavljaju dobre „hvatače" slobodnih radikala. Drugi mehanizam djelovanja antioksidanasa u kojoj isti imaju učinak kao preventivni antioksidansi, jeste sprječavanje početka stvaranja slobodnih radikala ili smanjivanje brzine kojom se provodi lančana reakcija. Sastav i antioksidacijsko djelovanje biljnih vrsta ovisi o različitim čimbenicima kao što su: načini uzgoja biljke i uzorkovanja biljnog materijala, način prerade biljne sirovine, geografsko porijeklo i klimatski uvjeti, proces obrade te optimizacija tehnoloških postupaka pri izdvajanju bioaktivnih komponenti koji pokazuju antioksidacijsko djelovanje. Osim navedenog, na rezultat antioksidacijske aktivnosti utječe i ekstrakcija, vrsta otapala, kao i „*pretreatment*" (Dedić i sur., 2019). Pregledom objavljenih članaka je utvrđeno da nema mnogo istraživanja o pripremi ekstrakata biljke čuvarkuće, sadržaju ukupnih fenola te rezultatima ispitivanja antioksidacijskog svojstva u istom. Cilj

ovog istraživanja jeste utvrditi razlike u sadržaju ukupnih fenola i razlike u sadržaju antioksidacijske aktivnosti ovisno o provenijenciji iz urbane i ruralne sredine. Ispitat će se i razlike u sadržaju ukupnih fenola za uzorke svježeg biljnog materijala u odnosu na uporabu različitih otapala. Zbog nedostatka referentnih izvora baziranih na analizi fitokemijskog sastava lista biljnog materijala čuvarkuće, ovaj rad predstavlja znanstveni doprinos (i inspiraciju) sadašnjim i budućim autorima u istraživačkom pogledu za detaljnije istraživanje fitokemijske i biološke raznolikosti komponenti biljke *Sempervivum tectorum* L.

## MATERIJALI I METODE
## MATERIALS AND METHODS

### Biljni materijal – *Plant material*

Svježi listovi biljnog materijala čuvarkuće prikupljeni su u jutarnjim satima, između 7 i 9 h, sunčanog dana sredinom lipnja 2024. god., s dnevnim temperaturama između 19 i 31 °C. Biljni materijal je prikupljen iz urbane sredine (Lokacija: Latitude: 43.3273°N; Longitude: 17.893°E; Opine – grad Mostar, BiH; nadmorska visina:111m) i ruralne sredine (Lokacija: Latitude: 43.1857566; Longitude: 17.7934672; selo Pijesci, Općina Mostar, BiH; nadmorska visina: 243 m). Analizirane kultivirane forme čuvarkuće su rasle u vrtnom tlu. Botanička pripadnost prikupljenog biljnog materijala *Sempervivum tectorum* potvrđena je od strane naslovnog izv. prof. dr. sc. Borisa Dorbića, prof. struč. stud. (boris.dorbic@veleknin.hr), uz upotrebu relevantne florističke literature (Kovačić i sur., 2008; Nikolić i sur., 2020).

### Kemikalije – *Chemicals*

U radu su upotrjebljene sljedeće kemikalije: 2,2-difenil-1-pikrilhidrazil- ($C_{18}H_{12}N_5O_6$) – Sigma – Aldrich – (USA), destilirana voda, etanol ($C_2H_6O$) – Gram – Mol (Hrvatska), Folin-Ciocalteu reagens – Kemika Zagreb (Hrvatska), galna kiselina ($C_7H_6O_5H_2O$) – Fluka Chemica (Švicarska), metanol ($CH_3OH$) - LabExpert (Slovenija), natrij karbonat ($Na_2CO_3$) - Centrohem (Srbija), TROLOX -6-hidroksi-2,5,7,8-tetrametilhroman-2-karboksilna kiselina- ($C_{14}H_{18}O_4$) - Tokyo Chemical Industry (Japan).

### Aparatura – *Apparatus*

Aparatura korištena u istraživanju je: Mettler Toledo analitička vaga, IKA Lab Dancer Vortex, MEMMERT vodena kupelj, Evolution 60s UV-Visible Spectrophotometer.

### Ekstrakcija uzoraka lista biljnog materijala čuvarkuće – *Extraction of leaf samples of houseleek plant material*

Nakon vaganja i mljevenja, listovi biljnog materijala su podvrgnut ekstrakcijskim tehnikama uporabom metode maceracije na sobnoj temperaturi. Ovaj postupak je proveden koristeći destiliranu vodu, vodenu otopinu etanola 50 % i 70 % te vodenu otopinu metanola 50 % i 70 %. Ekstrakcijskim tehnikama su podvrgnuti listovi svježeg biljnog materijala. Uzorak od 1 g usitnjenih listića biljke premješten je u Erlenmeyerovu tikvicu volumena 100 mL. Zatim je dodano 25 mL ekstrakcijskog otapala, u kojem se uzorak natapao tijekom 72 sata. Nakon završetka procesa maceracije, sadržaj tikvice je filtriran kroz lijevak s filter papirom u odmjernu tikvicu volumena 25 mL. Nakon izvršene filtracije, tikvica je nadopunjena otapalom do oznake.

### Metoda Folin-Ciocalteu za određivanje ukupnih fenola – *Folin-Ciocalteu method for the determination of total phenols*

Prema Folin-Ciocalteu metodi vršeno je određivanje sadržaja ukupnih fenola (Singelton i Rosi, 1965) u laboratoriju katedre za farmakognoziju na farmaceutskom fakultetu Univerziteta u Sarajevu tijekom lipnja 2024. godine. Metoda se temelji na spektrofotometrijskom mjerenju sadržaja ukupnih fenola u reakcijskoj smjesi ispitivanog ekstrakta uz dodatak destilirane vode, Folin-Ciocalteu reagensa (tj. smjese fosfomolibdatne i fosforvolframatne kiseline) te 20 % otopine natrij-karbonata. Reakcijska otopina poprima intenzivno plavu boju, a intenzitet boje je proporcionalan koncentraciji fenolnih spojeva. Koncentracija ukupnih fenola izračunata je prema jednadžbi smjera dobivenoj u softverskom programu Excel 2010., s galnom kiselinom koncentracije (mg/L) nanesene na apscisu i vrijednosti apsorbancije izmjerene Evolution 60s UV-Visible Spektrofotometru na 765 nm.

### Postupak određivanja ukupnih fenola – *Procedure for the determination of total phenols*

Prethodno razrijeđeni alikovit od 125 µL ekstrakta čuvarkuće otpipetiran je u staklenu epruvetu, nakon čega je dodano 625 µL Folin-Cioalteu reagensa i 10 mL destilirane vode. Nakon 3 minute dodano je 1,9 mL zasićene otopine nartij karbonata te se smjesa promiješala s pomoću Vorteksa. U vodenoj kupelji, uzorci su se termostatirali 25 minuta na temperaturi 50 °C. Apsorbancija je mjerena na 765 nm valne duljine. Maseni udjeli ukupnih fenola su izraženi kao ekvivalent galne kiseline mg GAE/g suhe tvari.

### Određivanje antioksidacijske aktivnosti DPPH metodom – *Determination of antioxidant activity by DPPH method*

DPPH metoda, odnosno 1,1-difenil-2-pikrilhidrazil radikal otkriven je 1922. godine od strane Goldschmidt i Renn, a metoda je razvijena od strane Bloiss upotrebom stabilnog slobodnog radikala za određivanje antioksidacijske aktivnosti (Goldschmidt, Renn, 2022; Blois, 1958; prema Gulcin i Alwasel, 2023). Kao model antioksidansa, Bloiss je koristio aminokiselinu cistein koja sadrži tiol (Kumara i sur., 2018).

1,1-difenil-2-pikrilhidrazil predstavlja vrlo stabilan slobodni radikal. Delokalizacija rezervnog elektrona preko molekule zadržava molekule od dimerizacije, dok većina drugih, slobodnih radikala nema ovu značajku. Delokalizacija također dovodi do karakteristične tamnoljubičaste boje koju karakterizira apsorpcijski pojas u otopini etanola na 517 nm. Kada se DPPH otopina pomiješa sa tvari koja donira vodik, dolazi do stvaranja reduciranog DPPH oblika i gubitka ljubičaste boje. Zaostaje blijedo žuta boja koja potiče od pikril-skupine. Predstavi li se DPPH radikal kao Z, a donorska molekula kao AH, reakcija izgleda:

$$Z + AH = ZH + A \quad (1)$$

Pri čemu je:

ZH – reducirani oblik;
A – slobodni radikal.

Dobiveni slobodni radikal prolazi daljnje reakcije koje kontroliraju ukupnu stehiometriju. Stoga, reakcija (1) je namijenjena predstavljanju reakcija koje se odvijaju u sustavu oksidacija. Molekula DPPH Z predstavlja slobodne radikale koji su nastali u sustavu te čija aktivnost treba biti potisnuta od tvari AH (Kumara i sur., 2018). Zapažene promjene u apsorbanciji prije i poslije dodavanja antioksidansa, a sve tijekom vremena od 30 do 60 minuta, koriste se za izražavanje TAC (eng. total *antioxidant capacity*), odnosno ukupnog antioksidacijskog kapaciteta. TAC ili ukupni antioksidacijski kapacitet je generiran složenim kemijskim sastavom kao sinergističkim učinkom koji može dovesti do stvaranja mnoštva aktivnih tvari prisutnih u biljkama. Na taj indeks utječe količina antioksidanasa koji su reagirali s unaprijed poznatom količinom DPPH radikala te njihova međusobna interakcija u ekstraktu (Fadda i sur., 2014; Campos i sur., 2012; prema Angeli i sur., 2023).

Nedavno uvedeni parametar koji se koristi za tumačenje rezultata dobivenih DPPH metodom je $IC_{50}$ ili tzv. "učinkovita koncentracija", a definira se kao koncentracija supstrata koja dovodi do smanjivanja DPPH aktivnosti za 50 % (Molyneux, 2003). Pregledom vrijednosti rezidualne DPPH apsorbancije, može se vidjeti antioksidacijska aktivnost svake ispitivane otopine. Iz dobivene vrijednosti apsorbancije, izračunava se postotak inhibicije slobodnih DPPH radikala, odnosno količina aktivnosti antioksidacijskih spojeva koji mogu djelovati kao "hvatači" slobodnih DPPH radikala (Budaraga i Putra, 2020).

$$\text{DPPH\%}\mathit{Inhibicije} = \frac{A_{kontrolna} - A_{uzorka}}{A_{kontrolna}} * 100 \quad (2)$$

Pri čemu je:

$A_{kontrolna}$ – mješavina otapala: metanola/etanola/vode i DPPH otopine;

$A_{uzorka}$ – mješavina ekstrakta uzorka i DPPH otopine (Hussen i Endalew, 2023).

Standardna krivulja za koncentraciju standardnog spoja i brzina uklanjanja DPPH radikala može biti "iscrtana" uporabom: Trolox-a, askorbinske kiseline, katehina i galne kiseline (Hwang i Lee, 2022). Trolox kao standard je najaktivniji oblik vitamina E, odnosno sitnetiski analog α-tokoferola koji se koristi za usporedbu antiradikalne aktivnosti izražene kao TEAC – *Trolox equivalent antioxidant capacity* (Triantis i sur., 2005; prema Frangu i sur., 2020).

[%] RSA ili aktivnost hvatanja radikala se može izračunati uporabom sljedeće formule:

$$RSA\left[\%\right] = \left(1 - \left(\frac{A_{sample}}{A_{blank}}\right)\right) * 100\% \quad (3)$$

Pri čemu su $A_{sample}$ – apsorbancija ispitivanog uzorka i $A_{blank}$ – apsorbancija slijepe probe.

Iscrtavanjem kalibracijske krivulje Trolox izračunava se cTe odnosno koncentracija Trolox ekvivalenta (TE) na sljedeći način:

$$\text{cTE}\left[\frac{\mu g}{mL}\right] = \frac{RSA * - b_{cal}}{m_{cal}} \quad (4)$$

Pri čemu su: $b_{cal}$ – sjecište kalibracijske krivulje i $m_{cal}$ – nagib kalibracijske krivulje.

Na osnovu molarne mase Trolox-a koja iznosi 250.3 $^{g}/_{mol}$ i koncentracije otopine uzorka $c_{sample}$, određuje se vrijednost TEAC:

$$\text{TEAC}\left[\frac{\mu mol}{g}\right] = \frac{c_{TE} * \frac{1}{M_{TROLOX}}}{c_{sample}} \text{(Rumpf i sur., 2023).} \quad (5)$$

## DPPH "scavenging" metoda za određivanje antioksidacijske aktivnosti – *DPPH scavenging method for determining antioxidant activity*

### Postupak određivanja antioksidacijske aktivnosti s pomoću DPPH metode – *Procedure for determining antioxidant activity by DPPH method*

Antioksidacijska aktivnost ekstrakata uzoraka lista biljnog materijala određivana je prema proceduri Aoshima i sur., (2004). Na 2,9 mL prethodno pripremljenog DPPH reagensa dodaje se 100 µL ekstrakta i promiješa. Promiješana smjesa se ostavi 30 minuta na sobnoj temperaturi, a zatim se mjeri apsorbancija DPPH u odnosu na slijepu probu na 517 nm s Evolution 60s UV-Visible spektrofotometrom. Svi uzorci su analizirani u triplikatima te predstavljeni preko linearne kalibracijske krivulje Trolox-a ($R^2$ = 0,996).

## Statistička analiza – *Statistical analysis*

Izračun rezultata je izvršen s pomoću softverskog programa Excel 2010, a za statističku provjeru na osnovu koje bi se saznalo da li provenijencija i otapalo imaju utjecaj na sadržaj ukupnih fenola i antioksidacijsku aktivnost korišten je

softverski program IBM SPSS verzija 27. Za ovu analizu korištena je multipla linearna regresija. Kriterijske varijable su: antioksidacija i fenoli, a prediktorske: provenijencija i otapalo. Kroz ovu analizu pokušalo se saznati jesu li provenijencija i otapalo prediktori antioksidaciji i fenolima. Statističkim t-testom se ispitalo da li postoji postoji razlika u antioksidacijskoj aktivnosti s obzirom na provenijenciju biljnog materijala čuvarkuće (urbano/ruralno).

## REZULTATI I DISKUSIJA
## RESULTS AND DISCUSSION

### Određivanje sadržaja ukupnih fenola – *Determination of the total phenolic content*

Fenolni spojevi predstavljaju najzastupljenije sekundarne metabolite u biljkama, a zbog širokog spektra bioloških aktivnosti koje pokazuju, sve više su u fokusu istraživača. Polifenolni spojevi, zbog svoje kompleksne strukture, svrstavaju se u brojne grupe, među kojima se posebno ističu flavonoidi i fenolne kiseline. Važna karakteristika ovih spojeva je antioksidacijsko djelovanje koje je povezano s različitim fiziološkim djelovanjem u ljudskom organizmu, a iskazuje se hvatanjem slobodnih radikala te vezanjem metalnih iona. Svrha ovog istraživanja bila je utvrditi utjecaj različitih otapala na ekstrakciju fenolnih spojeva iz svježih listova čuvarkuće prikupljenih s različitih nadmorskih visina te procjena njihovog antioksidacijskog učinka.

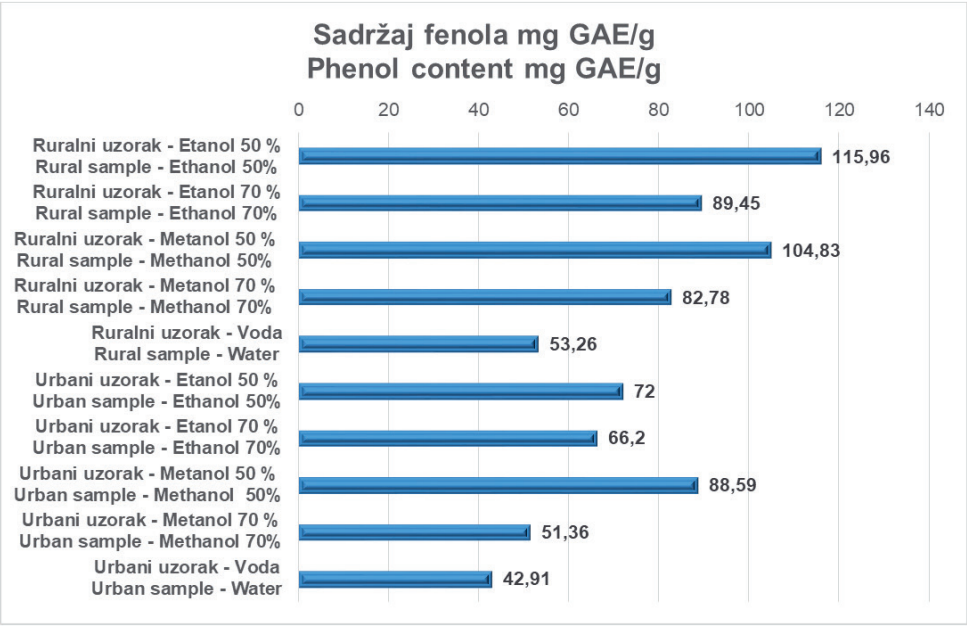
Srednje vrijednosti ukupnih fenola u ovisnosti od primijenjenog otapala i nadmorske visine prikazane su grafikonom 1.

Iz grafikona 1. može se uočiti da udio ukupnih fenola varira u rasponu od 42,91 ± 0,83 do 115,96 ± 0,48 mg GAE/g, ovisno o vrsti korištenog otapala i porijeklu biljnog materijala. Uporabom etanola 50 % postiže se najveći ekstrakcijski kapacitet ukupnih fenola, dok je kapacitet najniži pri uporabi vode kao otapala. Najveći udio fenola pokazuje ruralni uzorak koji je ekstrahiran u etanolu 50 % čija vrijednost iznosi 115,96 ± 0,48 mg GAE/g, dok najmanji udio fenola pokazuje uzorak čuvarkuće iz urbane sredine s vrijednošću 42,91 ± 0,83 mg GAE/g.

Dobiveni ekstrakti su bogat izvor fenolnih spojeva, ali njihova koncentracija značajno varira s obzirom na uvjete ekstrakcije i polarnost otapala. Prisutnost i udio vode u organskoj fazi otapala ima važnu ulogu jer voda potiče proces difuzije i olakšava ekstrakciju fenolnih spojeva iz biljnog materijala. Ako se usporede rezultati masenih udjela ukupnih fenola može se zaključiti da vodeni ekstrakti etanola i metanola koncentracije 50 % doprinose većem ekstrakcijskom kapacitetu za izolaciju ukupnih fenola iz čuvarkuće, u oba ispitana uzorka.

U ekstrakciji maceracijom, etanol ili metanol se često biraju kao otapalo za fitokemijsko ispitivanje koje bi moglo ekstrahirati organska fenolne spojeve iz biljnih uzoraka (Shi i sur., 2022). Istraživanje provedeno od strane Alberti i sur. (2008), utvrđeno je da se koncentracija fenola u 80 % ekstraktu čuvarkuće kretale od 0,26 ± 0,03 mg GAE/g do 0,94 ± 0,07 mg GAE/g.

Gentscheva i sur. (2021) su u svom istraživanju zaključili da se sadržaj fenola u ekstraktima čuvarkuće kretao 0,84 ± 0,08 mg GAE/g za 50 % etanolni ekstrakt čuvarkuće, dok




*Svi uzorci su analizirani u triplikatima – *All samples were analyzed in triplicate.*

**Grafikon 1.** Srednje vrijednosti ukupnih fenola u ovisnosti od primijenjenog otapala i nadmorske visine
Graph 1. Mean values of total phenols depending on the applied solvent and altitude

je vrijednost 90 % etanolnog ekstrakta čuvarkuće iznosila 0,18 ± 0,04 mg GAE/g što je značajno niže u usporedbi s rezultatima ovoga istraživanja. Ono što je karakteristično za ovu studiju je da su prisutne veće vrijednosti sadržaja fenola za 50 % etanolni ekstrakt te da navedena vrijednost opada što je koncentracija etanola veća. Ovi rezultati korespondiraju s rezultatima studije Gentscheva i sur. (2021) koji sugeriraju da se bolji ekstrakcijski kapacitet postiže korištenjem 50 % etanola kao otapala.

Prema istraživanju predvođenom od strane Rovčaninom i sur. (2015) utvrđeno je da sadržaj ukupnih fenola u vodenim i etanolim esktaktima čuvarkuće iznosi od 28,5 mg GAE/g do 16,0 mg GAE/g.

Dégi i sur. (2023) u svom istraživanju navode da je ukupan sadržaj fenola u 50 % ekstraktu čuvarkuće iznosio 126,17 ± 0,334 mg GAE/g. Rezultati su u velikoj mjeri u skladu s rezultatima ove studije, koja također ukazuje da se optimalan ekstrakcijski kapacitet postiže uporabom 50 % etanola kao otapala.

Na sadržaj fenola jasno utječu visinske varijacije, pri čemu su uzorci s veće nadmorske visine pokazali veći sadržaj fenola u usporedbi s uzorcima s niže nadmorske visine. Rezultati u sadržaju fenola za uzorke s viših nadmorskih visina varirali su u rasponu od 115,96 ± 0,48 do 53,26 ± 2,67 mg GAE/g, dok su uzorci s nižih nadmorskih visina pokazali relativno manji sadržaj fenola koji su varirali u rasponu 88,59 ± 0,48 do 42,91 ± 0,83 mg GAE/g. Brojni istraživači su istraživali utjecaj visinskih varijacija na koncentracije fenolnih spojeva u raznim divljim i kultiviranim biljnim vrstama. Faktori okoline poput nadmorske visine, sastava tla, atmosferskog tlaka, dužine vegetacionog perioda i intenziteta zračenja mogu značajno utjecati na broj i količinu fitokemikalija u biljkama. Prema Yangu i suradnicima (2018) ustanovljena je veća akumulacija fenolnih spojeva na višim nadmorskim visinama kao zaštita od UV zračenja. Također, Bilger i sur. (2007) su primijetili da je na višim nadmorskim visinama u biljkama sadržano više fenolnih spojeva s ciljem sprječavanja oštećenja biljaka koje može biti izazvano niskim temperaturama.

Na osnovu dobivenih rezultata zaključuje se da vodeni ekstrakti etanola 50 % značajno povećavaju ekstrakcijski kapacitet za izolaciju ukupnih fenola iz lista čuvarkuće. Pored navedenog, viša nadmorska visina dodatno poboljšava kapacitet ekstrakcije za izolaciju fenolnih spojeva.

U tablici 1. prikazan je model koji se odnosi na fenole kao kriterij varijable, a prediktorske varijable su provenijencija (urbano/ruralno) i otapalo. Rezultati pokazuju da je model statistički značajan ($R = 0,845$; $R^2 = 0,714$; $F = 8,752$; $0,004 < 0,05$) i da se ovim modelom koji uključuje varijable provenijencija i otapala objašnjava 71,4 % varijance.

Rezultati prikazani tablicom 2., pri čemu fenoli predstavljaju kriterij, pokazuju da su provenijencija ($\beta = -0,64$; $t = -3,167$; $0,0016 < 0,05$) i otapalo ($\beta = 0,552$; $t = 2,734$; $0,029 < 0,05$) značajni prediktori istih.

## Određivanje antioksidacijske aktivnosti – *Determination of antioxidant activity*

Antioksidacijska aktivnost uzoraka svježih listova biljnog materijala čuvarkuće određivana je DPPH metodom, a rezultati su izraženi uz upotrebu standarda Trolox kao ekvivalenta [μmol TE/g]. Slobodni radikal DPPH se koristi za procjenu sposobnosti spojeva da djeluju kao „hvatači" slobodnih radikala i „opskrbljivači" vodikom (Baliyan i sur., 2022). Analizi su podvrgnuti metanolni (50 i 70 %), etanolni (50 i 70 %) i vodeni ekstrakti svježih listova biljnog materijala čuvarkuće. Analizirani uzorci su podijeljeni u dvije grupe s obzirom na provenijenciju biljnog materijala čuvarkuće iz urbane i ruralne sredine.

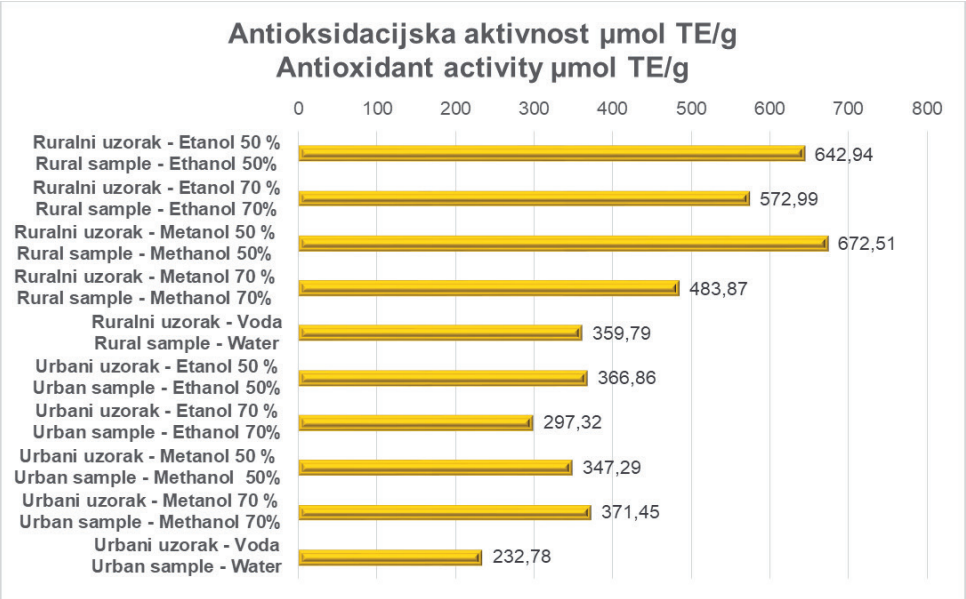
Rezultati prikazani grafikonom 2. ukazuju da metanolni ekstrakt (metanol 50 % kao otapalo) dobiven iz biljnog materijala čuvarkuće (ruralna sredina) ima najbolju antioksidacijsku aktivnost s vrijednošću 672,51 ± 2,47 μmol TE/g. Izrazitu antioksidacijsku aktivnost pokazuje i 50 % ekstrakt etanola biljnog materijala također iz ruralne sredine s vrijednošću 642,94 ± 4,41 μmol TE/g. Literaturnim istraživanjem ustanovljene su sličnosti u zaključcima na osnovu dobivenih rezultata s rezultatima Albertia i sur. (2015). Naime,

**Tablica 1.** Model multipla regresijeske analize za fenole
Table 1. Multiple regression analysis model for phenols

| Kriterij / *Criterion* | R | $R^2$ | F | p |
|---|---|---|---|---|
| Fenoli / *Phenols* | 0,845 | 0,714 | 8,752 | 0,004 |

**Tablica 2.** Prediktivni model za fenole
Table 2. A predictive model for phenols

| Model / *Model* | β | t | p |
|---|---|---|---|
| Konstanta / *Constant* | | 4,010 | 0,05 |
| Provencijencija / *Provenance* | –0,64 | –3,167 | 0,016 |
| Otapalo / *Solvent* | 0,552 | 2,734 | 0,029 |




*Svi uzorci su analizirani u triplikatima ± SD – *All samples were analyzed in triplicate ± SD*

**Grafikon 2.** Rezultati DPPH metode za uzorke izraženi primjenom standarda Trolox-a kao ekvivalenta (µmol TE/g)
Graph 2. Results of DPPH method for samples expressed using Trolox standards as equivalents (µmol TE/g)

prema istraživanju Albertia i sur. (2015) u ekstrakciji otapalima različite polarnosti, značajne razlike u antioksidacijskoj aktivnosti prema DPPH metodi i vrijednostima izraženim kao $IC_{50}$ (µg/mL) imao je 80 % (v/v) uzorak metanolnog ekstrakta čuvarkuće 34,9 ± 1,8, 70 % (v/v) etanolni ekstrakt 74,5 ± 3,6 te vodeni ekstrakt s vrijednošću od 159 ± 10, a razlike se pripisuju pretpostavci o sinergijskom djelovanju tvari prisutnih u cijelom ekstraktu.

Grupiranjem dobivenih rezultata u dvije grupe: na osnovu provenijencije biljnog materijala iz urbane i ruralne sredine, te njihovim pregledom, ustanovljeno je sljedeće: uzorci biljnog materijala čuvarkuće ruralnog porijekla pokazuju izrazitu antioksidacijsku aktivnost s vrijednostima od 672,51 ± 2,47 do 359,79 ± 3,97 µmol TE/g, dok uzorci biljnog materijala čuvarkuće urbanog porijekla pokazuju nižu sposobnost uklanjanja radikala prema DPPH metodi s vrijednostima od 366,86 ± 6,91 do 232,78 ± 4,55 µmol TE/g. Najniže vrijednosti antioksidacijske aktivnosti prema DPPH metodi pokazuju vodeni ekstrakti biljnog materijala oba porijekla. Prema istraživanju Gentscheva i sur. (2021) antioksidacijska aktivnost i ukupni sadržaj fenola ispitivanih uzoraka u ekstraktu 10 % etanola je imao približno dva puta niže vrijednosti u odnosu na 50 % etanolni ekstrakt (s vrijednošću 7,02 ± 0,71 mM TE/mL), a najnižu antioksidacijsku aktivnost imao je 95 % etanolni ekstrakt. Smatra se da je izrazita antioksidacijska aktivnost 50 % etanolnog ekstrakta posljedica visokog sadržaja ukupnih fenola u istom. Na osnovu navedenog, može se zaključiti kako je u ekstrakciji bioaktivnih spojeva, kao i za određivanje antioksidacijske aktivnosti istih neophodan izbor odgovarajućeg otapala. Navedeno potvrđuje i istraživanje Knez Marevci i sur. (2021) u kojem antioksidacijske aktivnosti ekstrakata variraju od 6,8 do 90 %, a rezultati se pripisuju visokom sadržaju polifenola koji imaju izraziti antioksidacijski potencijal te zaključuju kako se pravilnom metodom ekstrakcije i adekvatnim izborom otapala mogu ekstrahirati maksimalne količine spojeva izrazite antioksidacijske aktivnosti. U istraživanju Stojičević i sur. (2008) analizirana je antioksidacijska i antimikrobna aktivnost ekstrakata *Sempervivum marmoreum* L. koji su dobiveni različitim metodama ekstrakcije, te studija sugerira kako su metanolni ekstrakti *S. marmoreum* potencijalni izvor prirodnih antioksidanasa.

Opsežnijim literaturnim pregledom ustanovljeno je da nema mnogo objavljenih radova koji bi se u ovom slučaju koristili kao relevantni materijal za korelaciju laboratorijskih rezultata u procjeni antioksidacijske aktivnosti svježih listova čuvarkuće. Ne postoje dosad objavljeni podaci koji bi se koristili kao korelacija u analizi procjene statistički značajne razlike između rezultata antioksidacijske aktivnosti ekstrakata biljnog materijala s obzirom na provenijenciju iz urbane i ruralne sredine. Slobodno se može zaključiti da rezultati analize objavljeni ovim istraživanjem predstavljaju izvorni znanstveni doprinos predmetnoj tematici.

**Tablica 3.** t-test za provenijenciju iz urbane/ruralne sredine
Table 3. t-test for provenance from urban/rural environment

| Provenijencija / *Provenance* | | |
|---|---|---|
| t | df | p |
| –3,568 | 8 | 0,013 |

**Tablica 4.** Model multipla regresijeske analize za antioksidaciju
Table 4. Multiple regression analysis model for antioxidation

| Kriterij / *Constant* | R | $R^2$ | F | p |
|---|---|---|---|---|
| Antioksidacija / *Antioxidation* | 0,890 | 0,792 | 13,315 | 0,012 |

**Tablica 5.** Prediktivni model za antioksidaciju
Table 5. A predictive model for antioxidation

| Model / *Model* | β | t | p |
|---|---|---|---|
| Konstanta / *Constant* | | 2,430 | 0,045 |
| Provencijencija / *Provenance* | 0,784 | 4,554 | 0,003 |
| Otapalo / *Solvent* | –0,422 | 2,445 | 0,044 |

Provjera statistički značajne razlike je ispitana t testom. Test se vršio s ciljem ispitivanja da li se rezultati antioksidacijskog učinka razlikuju s obzirom na provenijencije biljnog materijala. Dobiveni rezultat prikazan u tablici 3. pokazuje da postoji razlika u antioksidacijskoj aktivnosti (0,013 < 0,050) s obzirom na provenijenciju biljnog materijala (urbano/ruralno). Rezultat dobiven t-testom nije bilo moguće usporediti jer ne postoje dosad objavljeni literaturni podaci bazirani na ispitivanju navedene statističke razlike.

U tablici 4. prikazan je model koji se odnosi na antioksidaciju kao kriterijumsku varijablu, a prediktorske varijable su provenijencija i otapalo. Rezultati pokazuju da je model statistički značajan (R = 0,890; $R^2$ = 0,792; F = 13,315; 012 < 0,05) i da se ovim modelom koji uključuje varijable provenijenciju i otapalo objašnjava 79,2 % varijance.

Promatrajući tabelu 5. koja se odnosi antioksidaciju, rezultati pokazuju da su provenijencija (β = 0,78; t = 4,55; 0,003 < 0,05) i otapalo (β = -0,422; t = 2,445; 0,044 < 0,05) značajni prediktori.

## ZAKLJUČAK
## CONCLUSION

Na osnovu provedenog istraživanja i analize, zaključuje se da ekstrakti lista biljke čuvarkuće *Sempervivum tectorum* L. pokazuju izrazitu antioksidacijsku aktivnost, što je direktno povezano s visokom koncentracijom fenolnih spojeva. Rezultati dobiveni u ovom istraživanju pokazuju da količina ukupnih fenola se kreće u rasponu od 42,91 ± 0,83 do 115,96 ± 0,48 mg GAE/g, u zavisnosti od vrste korištenog otapala i porijekla biljnog materijala. Na osnovu dobivenih rezultata zaključuje se da se upotrebom etanola 50 % postiže najveći kapacitet ekstrakcije ukupnih fenola, dok je kapacitet najniži kada se koristi voda kao otapalo. Viša nadmorska visina također ubrzava ekstrakcijski kapacitet za izolaciju fenolnih spojeva. Najviše vrijednosti antioksidacijske aktivnosti pokazao je metanolni ekstrakt s vrijednošću 672,51 ± 2,47 µmol TE/g, a najniže vodeni ekstrakti biljnog materijala oba porijekla s vrijednostima od 232,78 ± 4,55 do 359,79 ± 3,97. Uzorci čuvarkuće s više nadmorske visine pokazali su izuzetnu antioksidacijsku aktivnost s vrijednostima od 672,51 ± 2,47 do 359,79 ± 3,97 µmol TE/g, dok uzorci biljnog materijala prikupljeni na nižim nadmorskim visinama pokazuju nižu sposobnost uklanjanja radikala prema DPPH metodi s vrijednostima od 366,86 ± 6,91 do 232,78 ± 4,55 µmol TE/g. Navedeni rezultati sugeriraju da biljka čuvarkuća može biti značajan izvor prirodnih antioksidanasa, korisnih u prehrambenoj i farmaceutskoj industriji. Uporaba različitih otapala (etanol 50 i 70 %, metanol 50 i 70 % te voda) i provenijencija (urbano/ruralno) su pokazali utjecaj na sadržaj ukupnih fenola i rezultate antioksidacijske aktivnosti za analizirane uzorke ekstrakta biljnog materijala čuvarkuće. Na osnovu multipla linearne regresije, zaključuje se da su provenijencija (β = -0,64; t = -3,167; 0,0016 < 0,05) i otapalo (β = 0,552; t = 2,734; 0,029 < 0,05) značajni prediktori sadržaja ukupnih fenola za analizirane uzorke čuvarkuće. Također, isti slučaj je i za rezultate antioksidacijske aktivnosti, odnosno provenijencija (β = 0,78; t = 4,55; 0,003 < 0,05) i otapalo (β = -0,422; t = 2,445; 0,044 < 0,05) predstavljaju značajne prediktore antioksidacijskog djelovanja uzoraka čuvarkuće. Statistički t-test je pokazao da postoji razlika u antioksidacijskoj aktivnosti (0,013 < 0,050) s obzirom na provenijenciju biljnog materijala (urbano/ruralno). Na temelju dostignutih rezultata, istraživanje će se nastaviti s fokusom na detaljniju analizu bioaktivnih komponenti biljke čuvarkuće.

## LITERATURA
## LITERATURE


- Alberti, A., B. Blazics, A. Kery, 2008: Evaluation of Sempervivum tectorum L. Flavonoids by LC and LC–MS. Chromatographia, 68. (S1):107-111. doi: 10.1365/s10337-008-0750-z.
- Alberti, A., E. Riethmüllera, S. Béni, A. Kéry, 2015: Evaluation of Radical Scavenging Activity of Sempervivum tectorum and Corylus avellana Extracts with Different Phenolic Composition. Natural Product. 11. (4): 469 – 474.
- Angeli, L., K. Morozova, M. Scampicchio, 2023: A kinetic-based stopped-fow DPPH• method. Scientifc Reports. Nature portofolio 13:7621. doi: https://doi.org/10.1038/s41598-023-34382-7. London.

- Aoshima, H., H. Tsunoue, H. Koda, Y. Kiso, 2004: Aging of whiskey increases 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl radical scavenging activity. Journal of Agricultural and Food Chemistry 52. (16):5240-4. doi: 10.1021/jf049817s.
- Baliyan, S., R. Mukherjee, A. Priyadarshini, A. Vibhuti, A. Gupta, R. P. Pandey, C-M. Chang, 2022: Determination of Antioxidants by DPPH Radical Scavenging Activity and Quantitative Phytochemical Analysis of Ficus religiosa. Molecules. 27. (4): 1326. doi: 10.3390/molecules27041326.
- Bilger, W., M. Rolland, L. Nybakken, 2007: UV screening in higher plants induced by low temperature in the absence of UV-B radiation. Photochem Photobiol Sci, 6. (2):190-5. doi: 10.1039/b609820g.
- Blois, M. S., 1958: Antioxidant Determinations by the Use of a Stable Free Radical. Nature 181: 1199-1200. doi: http://dx.doi.org/10.1038/1811199a0.
- Budaraga, K. I., D. P. Putra, 2021: Analysis Antioxidant IC50 Liquid Smoke of Cocoa Skin with Several Purification Methods. IOP Conf. Ser.: Earth Environ. Sci. 757 012053. Zapadna Sumatra. doi: 10.1088/1755-1315/757/1/012053.
- Cattaneo F., S. De Marino, M. Parisi, C. Festa, M. Castaldo, C. Finamore, F. Duraturo, C. Zollo, R. Ammendola, F. Zollo, M. Iorizzi, 2019: Wound healing activity and phytochemical screening of purified fractions of Sempervivum tectorum L. leaves on HCT 116. Phytochemical Analysis. 30. (5): 524-534. doi: https://doi.org/ 10.1002/pca.2844.
- Dajić Stevanović, Z., D. Stešević, D. Pljevljakušić, 2013: Različite mogućnosti korišćenja samoniklog, ljekovitog i aromatičnog bilja, Regionalni priručnik za sakupljače ljekovitog bilja. Crna Gora: Općina Plužine; Srbija: Općina Ljubovija. Str. 7.
- Dedić, S., H. Jukić, A. Džaferović, M. Rodić, 2019: Influence of sempervivum tectorum on the phenolic content of meadow honey. 12th International Scientific Conference on Production Engineering. Development and modernization of production. 597-602. Rim.
- Dégi, D. M., K. Imre, V. Herman, J. Dégi, R. T. Cristina, A. Marcu, 2023: Antimicrobial Activity of Sempervivum tectorum L. Extract on Pathogenic Bacteria Isolated from Otitis Externa of Dogs. Vet. Sci. 10(4):265. Bazel. doi: https://doi.org/10.3390/vetsci10040265.
- Dorbić, B., L. Zemunović, T. Zemunović, E. Friganović, E. Temim, K. Arar, 2018: Istraživanje općih saznanja o nekim vrstama trajnica na Mediteranu. Glasilo Future, 1. (5-6): 1-12. Šibenik. doi: https://doi.org/10.32779/gf.1.5-6.1.
- Dorbić, B., E. Temim, 2018: Valorizacija dendro elemenata u parkovima i pejsažnim površinama na području Šibensko-kninske županije. Annales-Anali za Istrske in Mediteranske Studije-Series Historia et Sociologia, 28. (1): 167-192. Kopar. doi: 10.19233/ASHS.2018.12.
- Dumanović, J., E. Nepovimova, M. Natić, K. Kuča, V. Jaćević, 2021: The significance of reactive oxygen species and antioxidant defense system in plants: A concise overview. Front. Plant Sci. 11:552969. doi: https://doi.org/10.3389/fpls.2020.552969
- Euro+Med PlantBase. Dostupno na: https://www.emplantbase.org/home.html. (pristupljeno: svibanj 2024).
- Frangu, A., A. M. Ashrafi, M. Sys, T. Arbneshi, R. Metelka, V. Adam, M. Vlček, L. Richtera, 2020: Determination of Trolox equivalent antioxidant capacity in berries, using amperometric tyrosinase biosensor based on multi-walled carbon nanotubes. Appl. Sci. 2020, 10. (7): 2497. doi: 10.3390/app10072497.
- Gelečir, J., J. Gelenčir, 1991: Atlas ljekovitog bilja. Prosvjeta, Zagreb.
- Gentscheva, G., I. Karadjova, S. Minkova, K. Nikolova, V. Andonova, N. Petkova, I. Milkova-Tomova, 2021: Optical Properties and Antioxidant Activity of Water-Ethanolic Extracts from Sempervivum tectorum L. from Bulgaria. Horticulturae 2021, 7: 520. doi: https://doi.org/10.3390/horticulturae7120520.
- Gentscheva, G., I. Karadjova, P. Radusheva, S. Minkova, K. Nikolova, Y. Sotirova, I. Yotkovska, V. Andonova, 2021: Determination of the Elements Composition in Sempervivum tectorum L. from Bulgaria. Horticulturae 2021, 7. (9), 306. doi: https://doi.org/10.3390/horticulturae7090306.
- Giczi, Z., B. Sik, V. Kapcsándi, E. Lakatos, A. Mrázik, R. Székelyhidi, 2023: Determination of the health-protective effect of different Sempervivum and Jovibarba species. Journal of King Saud University - Science 36. 102998. doi: https://doi.org/10.1016/j.jksus.2023.102998.
- Goldschmidt, S., K. Renn, 1922: Zweiwertiger Stickstoff: Über das α, α-Diphenyl-β-trinitrophenyl-hydrazyl. (IV. Mitteilung über Amin-Oxydation). 55. (3): 628-643. doi: https://doi.org/10.1002/cber.19220550308.
- Gulcin, I., S. H. Alwasel, 2023: DPPH Radical Scavenging Assay. Processes 2023, 11. (8): 2248; doi: https://doi.org/10.3390/pr11082248.
- Hart, H't., B. Bleij, B. Zonneveld, 2003: Sempervivum, u knjizi Illustrated Handbook of Succulent Plants: Crassulaceae, Eggli, U. Eds. Springer-Verlag Berlin Heidelberg. Str: 333. Zürich.
- Hussen, E. M., S. A. Endalew, 2023: In vitro antioxidant and free-radical scavenging activities of polar leaf extracts of Vernonia amygdalina. BMC Complementary Medicine and Therapies. 23:146. doi: https://doi.org/10.1186/s12906-023-03923-y.
- Hwang, S. J., J. H. Lee, 2022: Comparison of antioxidant activities expressed as equivalents of standard antioxidant. Food Sci. Technol, Campinas, 43, e121522- doi: https://doi.org/10.1590/fst.121522.
- Knez Marevci, M. S. Bjelić, B. Dariš, Ž. Knez, M. Leitgeb, 2021: The influence of extracts from common houseleek (Sempervivum tectorum) on the metabolic activity of human melanoma cells WM-266-4. Processes 9. (9): 1549. doi: https://doi.org/10.3390/pr9091549.
- Kovačić, S i sur. 2008: Flora Jadranske obale i otoka 250 najčešćih vrsta. Školska knjiga, Zagreb.
- Kumara, P., K. Sunil, B. A. Kumar, 2018: Determination of DPPH Free Radical Scavenging Activity by RP-HPLC, Rapid Sensitive Method for the Screening of Berry Fruit Juice Freeze Dried Extract. Nat Prod Chem Res. 6:5 doi: 10.4172/2329-6836.1000341.
- Lattanzio, V., 2013: Phenolic Compounds: Introduction. K.G. Ramawat, J.M. Me´rillon (eds.). Natural Products. Springer-Verlag Berlin Heidelberg 2013: 1543-1580. doi: 10.1007/978-3-642-22144-6_57.
- Molyneux, P., 2003: The use of the stable free radical diphenylpicrylhydrazyl (DPPH) for estimating antioxidant activity. Songklanakarin J. Sci. Technol., 2004, 26. (2): 211-219.
- Nikolić, T., 2020: Flora Croatica 3 - Vaskularna flora Republike Hrvatske. Alfa d.d., Zagreb.
- Nikolić T. ur.: 2015: Flora Croatica baza podataka (http://hirc.botanic.hr/fcd). Prirodoslovno-matematički fakultet, Sveučilište u Zagrebu (pristupljeno: svibanj 2024).

- Rovčanin, B. R., T. Ćebović, D. Stešević, D. Kekić, M. Ristić, 2015: Antibacterial effect of herniaria hirsuta, prunus avium, rubia tinctorum and Sempervivum tectorum plant extracts on multiple antibiotic resistant Escherichia coli. Biosci. J., Uberlândia, 31: 6, 1852-1861, doi: https://doi.org/10.14393/BJ-v31n6a2015-29091.
- Rumpf, J., R. Burger, M. Schulze, 2023: Statistical evaluation of DPPH, ABTS, FRAP, and Folin-Ciocalteu assays to assess the antioxidant capacity of lignins. International Journal of Biological Macromolecules 233:123470. doi: https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2023.123470.
- Shi, L., W. Zhao, Z. Yang, V. Subbiah, H. A. R. Suleria, 2022: Extraction and characterization of phenolic compounds and their potential antioxidant activities. Environmental Science and Pollution Research 29:81112–81129. doi: 10.1007/s11356-022-23337-6.
- Singleton, V. L., J. A. Rossi, 1965: Colorimetry of total phenols with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. American Journal of Enology and Viticulture, 16: 144-158. doi: 10.5344/ajev.1965.16.3.144.
- Srečec, S., R. Erhatić, 2021: Poljoprivredna botanika – Sistematika višeg bilja. Visoko gospodarsko učilište u Križevcima. Str. 50. Križevci.
- Stojičević, S. S., I. Stanisavljević, D. T. Veličković, V. B. Veljković, M. L. Lazić, 2008: Comparative screening of the anti-oxidant and antimicrobial activities of Sempervivum marmoreum L. extracts obtained by various extraction techniques. J. Serb. Chem. Soc. 73. (6):597–607. doi: 10.2298/JSC0806597S.
- Stojković, D., L. Barros, J. Petrović, J. Glamoclija, C. Santos-Buelga, I. C. F. R. Ferreira, M. Soković, 2015: Ethnopharmacological uses of Sempervivum tectorum L. in southern Serbia: Scientific confirmation for the use against otitis linked bacteria. Journal of Ethnopharmacology 176. (2015): 297–304. doi: http://dx.doi.org/10.1016/j.jep.2015.11.014.
- Villadangos, S., S. Munné-Bosch, 2023: Acclimation to a combination of water deficit and nutrient deprivation through simultaneous increases in abscisic acid and bioactive jasmonates in the succulent plant Sempervivum tectorum L. Journal of Plant Physiology 287. 154040. doi: https://doi.org/10.1016/j.jplph.2023.154040.
- Yang, L., K.-S. Wen, X. Ruan, Y.-X. Zhao, F. Wei, Q. Wang, 2018: Response of Plant Secondary Metabolites to Environmental Factors. Molecules, 23. (4): 762. doi: https://doi.org/10.3390/molecules23040762.


## SUMMARY


This research aimed to determine the antioxidant activity and total phenolic content of fresh leaves of *Sempervivum tectorum* concerning provenances from urban and rural environments. Fresh leaves of the houseleek plant material were collected on a sunny day in June 2024. The homogenized sample was then subjected to maceration extraction at room temperature using distilled water and aqueous solutions of 70% and 50% ethanol and 70% and 50% methanol. The total phenolic content was determined by the Folin-Ciocalteu method, and the antioxidant activity was evaluated by the DPPH scavenging method and expressed using the Trolox standard as an equivalent (μmol TE/g). Total phenolic content ranged from 42.91 ± 0.83 to 115.96 ± 0.48 mg GAE/g, depending on the type of solvent used and the origin of the plant material.

The highest values of antioxidant activity had the methanol extract with a value of 672.51 ± 2.47 μmol TE/g, and the lowest values had aqueous extracts of plant material of both origins. The houseleek samples from higher altitudes showed exceptional antioxidant activity with values from 672.51 ± 2.47 to 359.79 ± 3.97 μmol TE/g, while the samples collected at lower altitudes showed a lower ability to remove radicals according to the DPPH method with values from 366.86 ± 6.91 to 232.78 ± 4.55 μmol TE/g. Using multiple linear regression, it was shown that provenance ($\beta = -0.64$; $t = -3.167$; $0.0016 < 0.05$) and solvent ($\beta = 0.552$; $t = 2.734$; $0.029 < 0.05$) are significant predictors of the total phenolic content for the analyzed samples. Provenance ($\beta = 0.78$; $t = 4.55$; $0.003 < 0.05$) and solvent ($\beta = -0.422$; $t = 2.445$; $0.044 < 0.05$) are also significant predictors for the antioxidant activity results of the analyzed samples. The result of the t-test showed that there is a statistically significant difference ($0.013 < 0.050$) in antioxidant activity regarding the provenance of the plant material (urban/rural).


**KEY WORDS:** *Sempervivum tectorum*, Folin-Ciocalteu method, total phenols, DPPH method, antioxidant activity