Komparativna studija ispitivanja antibakterijskog djelovanja biljnog ekstrakta

Kujundžić, Dajana

Undergraduate thesis / Završni rad

2018

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **Josip Juraj Strossmayer University of Osijek, Department of biology / Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku, Odjel za biologiju**

Permanent link / Trajna poveznica: https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:181:577549

Rights / Prava: In copyright / Zaštićeno autorskim pravom.

Download date / Datum preuzimanja: **2024-03-28**

ODJEL ZA BIOLOGIJU
Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku

Repository / Repozitorij:

Repository of Department of biology, Josip Juraj Strossmayer University of Osijek

zir.nsk.hr

dabar
DIGITALNI AKADEMSKI ARHIVI I REPOZITORIJI

Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku

Odjel za biologiju

Preddiplomski sveučilišni studij Biologija

Dajana Kujundžić

Komparativna studija ispitivanja antibakterijskog djelovanja biljnog ekstrakta

Završni rad

Mentor: dr.sc. Valentina Pavić, docent

Osijek, 2018.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA **Završni rad**

Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku
Odjel za biologiju
Preddiplomski sveučilišni studij Biologija
Znanstveno područje: Prirodne znanosti
Znanstveno polje: Biologija

Komparativna studija ispitivanja antibakterijskog djelovanja biljnog ekstrakta

Dajana Kujundžić

Rad je izrađen na: Zavod za biokemiju i ekofiziologiju biljaka

Mentor: dr.sc. Valentina Pavić, doc.

Kratak sažetak završnog rada:

Od davnina čovječanstvo je koristilo biljke u svrhu svoga izlječenja. Prekomjerna upotreba antibiotika dovela je do brzog porasta prevalencije bakterija otpornih na lijekove, što je učinilo ključnim ispitivanja antibakterijskih svojstava biljnih ekstrakata. Sustavi probira koji se koriste za identifikaciju antibakterijskih spojeva i ispitivanje aktivnosti trebaju biti jednostavni, brzi, reproducibilni i jeftini. Cilj ovog rad usporediti osnovne i najčešće metode prilikom ispitivanja antibakterijskih djelovanja biljnih ekstrakata. Osnovna podjela metoda za ispitivanje antibakterijskog djelovanja su difuzijske metode, dilucijske metode te bioautografske metode.

Ključne riječi: biljni ekstrakt, metode ispitivanja, difuzijske metode, dilucijska metoda, bioautografska metoda

Rad je pohranjen: na mrežnim stranicama Odjela za biologiju te u Nacionalnom repozitoriju završnih i diplomskih radova Nacionalne i sveučilišne knjižnice u Zagrebu

BASIC DOCUMENTATION CARD **Bachelor thesis**

Josip Juraj Strossmayer University of Osijek
Department of Biology
Undergraduate university study programme in Biology
Scientific Area: Natural sciences
Scientific Field: Biology

Comparative study of the antimicrobial activity analysis of plant extracts

Dajana Kujundžić

Thesis performed at: Subdepartment of Plant Ecophysiology and Biochemistry

Supervisor: Valentina Pavić, PhD, Assistant Professor

Short abstract:

Healing with medicinal plants is as old as mankind itself. The overuse of antibiotics has led to a rapid rise in the prevalence of drug-resistant bacteria, making the investigation of antibacterial activity of plant extracts essential. Screening systems used for the identification and activity investigation of antibacterial activity should be simple, rapid, reproducible, and inexpensive. The aim of this paper is to compare the basic and most common method investigating the antibacterial activity of plant extracts. The basic classification of methods for testing antibacterial activities are diffusion methods, dilution methods and bioautographic methods.

Key words: plant extract, test methods, diffusion methods, dilution method, bioautographic method

Thesis deposited: on the Department of Biology website and the Croatian Digital Theses Repository of the National and University Library in Zagreb

Sadržaj

1. UVOD 1

2. PREGLED DOSADAŠNJIH METODA ISPITIVANJA ANTIBAKTERIJSKIH DJELOVANJA BILJNIH EKSTRAKATA 2

2.1. Difuzijske metode 3

2.1.1. Disk difuzijska metoda 3

2.1.2. Difuzijska metoda bušenjem kanalića u agaru 4

2.2. Dilucijske metode 5

2.2.1. Agar dilucijska metoda 5

2.2.2. Dilucijska metoda - razrjeđenje bujona 6

2.3. Tankoslojna kromatografija – bioautografija 6

2.4. E test (Epsilometar test) 8

2.5. Time killer metoda 9

3. USPOREDBA METODA ISPITIVANJA ANTIBAKTERIJSKIH SVOJSTAVA 9

4. ZAKLJUČAK 12

5. LITERATURA 3

1. UVOD

Stoljećima su biljni pripravci ljudskoj civilizaciji koristili zbog ljekovitih svojstava u izlječenju raznih bolesti. Poznato je kako su biljke bogate različitim biološki aktivnim komponentama. Vođeni upravo tim saznanjima, istraživači i znanstvenici su usmjerili svoja istraživanja prema ljekovitim biljkama kako bi doznali koje su to aktivne komponente koje mogu spasiti čovječanstvo od raznih bolesti i na koje načine ih upotrijebiti. Otkrićem antibiotika, sredinom 20.-og stoljeća, razvila se proizvodnja sintetičkih i polusintetičkih antimikrobnih lijekova (Dar i sur.,2016). Nekoliko godina nakon otkrića, pojavila se rezistentnost mikroba na određena djelovanja antibiotika te stvorila danas vrlo ozbiljan javnozdravstveni problem (Andrašević, 2007). Upravo zbog toga, ulažu se veliki napori kako bi se razvile nove metode ispitivanja antibakterijskog djelovanja iz različitih prirodnih izvora i tako smanjila rezistencija na antibiotike.

Znanstvenici brojnim istraživanjima ispituju antibakterijska svojstva biljnih ekstrakata i eteričnih ulja. Antiseptičke osobine aromatičnih i ljekovitih biljaka te njihovih ekstrakata prepoznate su još od antike, dok pokušaji da se ova svojstva obilježavaju u laboratoriju datiraju iz ranih 1900-ih godina (Dorman i i Deans, 2000; Martindale, 1910; Hoffman i Evans, 1911). Antimikrobna svojstva biljke proizlaze iz spojeva sintetiziranih u njezinom sekundarnom metabolizmu. Sjemenke, lišća, korijenje i ostali dijelovi biljaka služe za dobivanje ekstrakata i ulja. Eterična ulja su složene smjese koje sadrže mnoge pojedinačne spojeve. Kemijski su izvedeni iz terpena i njihovih oksidiranih spojeva. Svaki od tih sastojaka pridonosi blagotvornim ili štetnim učincima (Prabuseenivasan i sur., 2006). Fenolne sastavnice u eteričnim uljima se smatraju glavnima odgovornima za antibakterijsko djelovanje eteričnih ulja (Ćerić, 2015; Cosentino i sur., 1999). Biljni ekstrakti imaju veliki potencijal kao antimikrobni spojevi protiv mikroorganizama. Tako se mogu koristiti u liječenju zaraznih bolesti uzrokovanih rezistentnim mikroorganizmima (Nascimento i sur., 2000). Ponovo zanimanje za prirodne terapije i povećanje potrošačke potražnje za učinkovitim, sigurnim, prirodnim proizvodima znači da su potrebni kvantitativni podaci o biljnim uljima i ekstraktima (Hammer i sur., 1999).

2. PREGLED DOSADAŠNJIH METODA ISPITIVANJA ANTIBAKTERIJSKIH DJELOVANJA BILJNIH EKSTRAKATA

Mnogi mikroorganizmi su patogeni za ljude ili životinje i uzrokuju razne bolesti što rezultira opsežnim morbiditetom i mortalitetom (Chu i sur., 1996). Još od antičkih vremena, čovjek je koristio biljke za liječenje uobičajenih zaraznih bolesti, a neki od tih tradicionalnih lijekova i dalje su uključeni kao dio uobičajenog liječenja različitih oboljenja (Rios i Recio, 2005). Od otkrića penicilina, farmaceutske tvrtke su proizveli više od 100 antibakterijskih sredstava/antibiotika za borbu protiv širokog spektra bakterijskih infekcija (Chu i sur., 1996). Otkriće i kasnija velika proizvodnja antibiotika početkom dvadesetog stoljeća bila je jedna od najvažnijih postignuća u povijesti medicine (Mohr, 2016). Međutim, nakon izvjesnog vremena i prekomjernog korištenja takvih lijekova, mikrobi su razvili otpornost na više lijekova, poznato kao *Multi Drug Resistance* (MDR), te nije bilo moguće tretirati ih lijekovima iz komercijalnog asortimanam (Bashir Dar i sur., 2016). Idealni antimikrobni agens iskazuje selektivnu toksičnost, što znači da je lijek štetan za patogena, ali ne i za domaćina (Kalenić i Bedenić, 2013). U tradicionalnoj medicini za dobivanje ekstrakta, najčešće se koristila voda, no u dosadašnjim studijima doznalo se kako su biljke u organskim otapalima puno učinkovitiji ekstrakti u borbi protiv mikroorganizama (Parekh i sur., 2005). Znanstvenici su se složili kako bi istraživanje trebalo biti usmjereno na postizanje konačnog znanja o biljci i njezinim svojstvima, a to se može postići ispitivanjem biljke na različite načine. Tako je većina analiza obavljena nad onim rodovima ili vrstama biljaka kod kojih je već od prije poznata antimikrobna učinkovitost (van Vuuren, 2008).

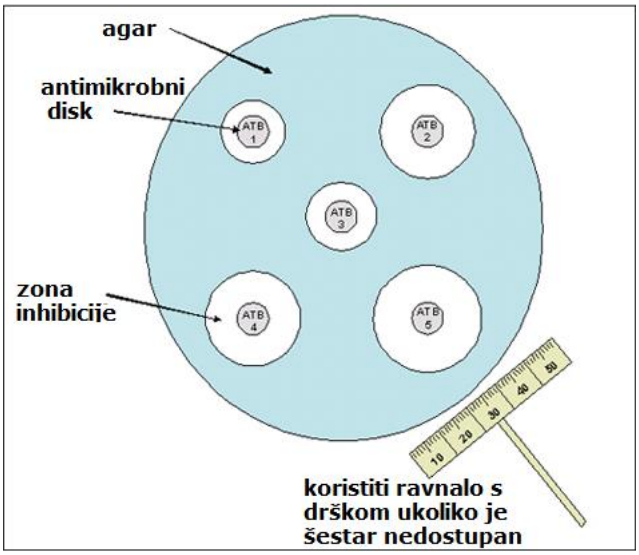
Kako su studije komercijalne proizvodnje antibiotika farmaceutskih tvrtki najčešće *in vitro*, tako su i metode ispitivanja antibakterijskog djelovanja biljnih ekstrakata prilagođene upravo takvom načinu znanstvenog istraživanja. U posljednjih nekoliko godina razvile su se sada već dobro poznate metode ispitivanja antibakterijske aktivnosti, a to su difuzijske metode, dilucijske metode te bioautografske metode (Rios i sur.,1988).

Budući da još uvijek ne postoji jedna jedinstvena metoda za ispitivanje antibakterijskog djelovanja, potrebno je razvijati i obavljati različite metode kako bi se utvrdila antibakterijska aktivnost. Sve ovo dovelo je do traganja za alternativnim načinima tretiranja patogenih mikroba u protivnom bi porast otpornosti na poznate antimikrobne lijekove prouzročila visoku smrtnost svjetske populacije

2.1. Difuzijske metode

2.1.1. Disk difuzijska metoda

Najčešća i vrlo jednostavna metoda ispitivanja u brojnim laboratorijama, znana i kao agar disk difuzijska metoda. Ova metoda temelji se na principu postavljanja diska impregniranog antibakterijskim uzorkom na agaru prethodno inokuliranom s test bakterijom (Tendencia, 2004). Postupak su prije četrdeset godina opisali Bauer, Kirby, Sherris i Turck (Bubonja i sur., 2008; Bauer i sur., 1966). U Petrijevu zdjelicu izlije se rastopljeni Muller-Hintov agar (MHA) inokuliran bakterijskom kulturom (Kelmanson i sur., 2000). Diskovi natopljeni određenim koncentracijama biljnog ekstrakta prenose se na površinu agara te slijedi inkubacija na 37°C na 12 sati kao prema radu Kelmanson i sur. (2000) ili dulje, na 24 sata kao prema radu Parekh i sur. (2005). Nakon inkubacije mjeri se promjer zone inhibicije rasta bakterija (Bubonja i sur., 2008; Jorgensen i sur., 2003), kako je shematski prikazano na Slici 1.. Neke od bakterija koje su se najčešće testirale ovakvom metodom su *Bacillus brevis* (Madhyastha i sur., 1994), *Staphilococcus aureus, Pseudomonas aeruginosa* i *Escherichia coli* (Zaidan i sur., 2005). Antibakterijsko djelovanje ekstrakata lišća, cvjetova i stabljike biljke *Heliotropium bacciferum* ispitani su disk difuzijskom metodom nad sedam bakterijskih vrsta (*Escherichia coli, Staphylococcus aureus, Bacillus cereus, Pseudomonas aeruginosa, Klisabiella pneumoniae, Proteus mirabilis, Erwinia carotovora*) (Ahmad i sur., 2016; Ishad i sur., 2014). Rezultati ispitivanja ekstrakata lišća, cvjetova i stabljike biljke nad svim navedenim bakterijama pokazale su niz inhibicijskih potencijala u različitim otapalima kao što su metanol, voda ili etilni acetat (Ahmad i sur., 2016). Prednosti ove metode su jednostavnost izvođenja i time niska cijena te sposobnost testiranja velikog broja antimikrobnih svojstava (Balouri i sur., 2015; Wilkins i Appleman, 1976). No, primijećen je i nedostatak ove metode, a to su moguće pogreške prilikom očitavanja zone inhibicije mjerene u milimetrima (Wilkins i Appleman, 1976). Prema radu van Vuuren (2008) zaključeno je kako se ova metoda ne bi trebala koristiti za ispitivanja eteričnih ulja. Korisnost ove metode ograničena je samo na stvaranje preliminarnih, kvalitativnih podataka, budući da hidrofobna priroda većine esencijalnih ulja i biljnih ekstrakata sprječava jednoliku difuziju tih tvari kroz medij agara (Janssen i sur., 1987; Rios i sur., 1988; Hammer i sur., 1999).



Slika 1. Shematski prikaz disk difuzijske metode

(Izvor: preuzeto i prilagođeno prema Web1)

2.1.2. Difuzijska metoda bušenjem kanalića u agaru

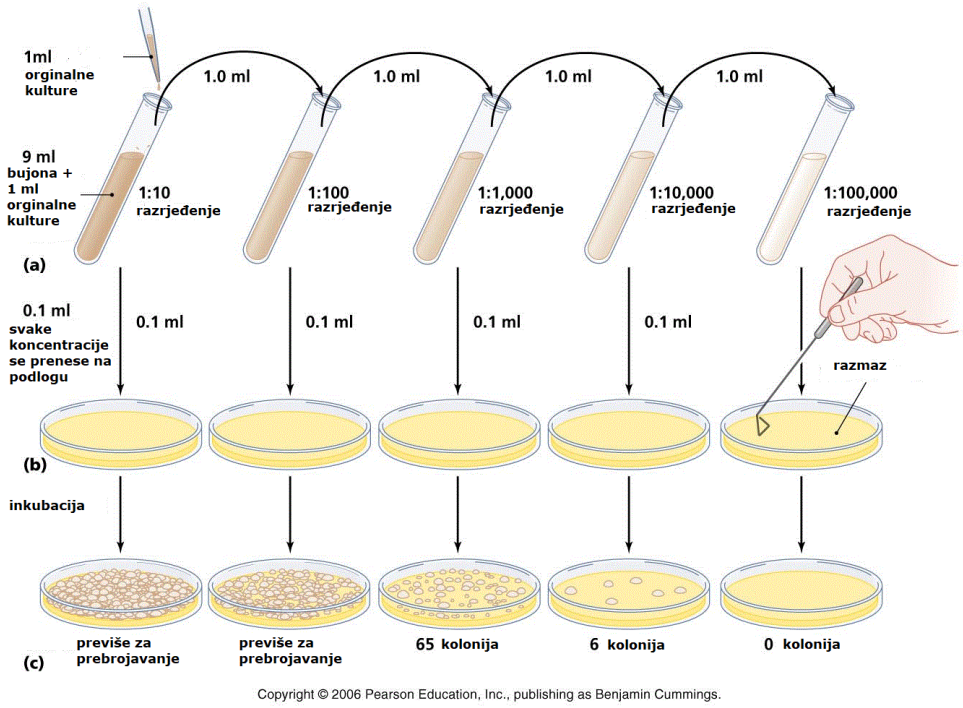
Metoda bušenja kanalića u agaru je metoda vrlo slična disk difuzijskoj metodi. Razni znanstvenici i istraživači ovu su metodu prilagodili zahtjevima svojih eksperimenata što se najviše očituje u dubini i promjerima bušenih kanalića u agaru. Promjer kanalića razlikuje se od 6 do 8 mm (Balouri i sur., 2016). No, često mogu biti i manji, 5 mm kao pri testiranju antibakterijske djelotvornosti ekstrakta biljke *Allium consanguineum* prema radovima Sadiq i sur. (2016) i Abdul- Awal i sur. (2016) koji su načinjeni sterilnim bušačem rupa toga promjera ili čak 3 mm prema radu Ramezanali i sur. (2016). Kanalići se još mogu načiniti stražnjim dijelom sterilne tipse prema radu Oses i sur. (2014). Zatim se u izbušene kanaliće dodaju već prije pripremljene koncentracije biljnih ekstrakata. Koncentracija, ali i volumen ekstrakta koji će se unositi u kanalić ovise o vrsti ekstrakta i biljke. Biljni se ekstrakt unosi sterilnom pipetom (Irshad i sur., 2012). Provodi se inkubacija 24 sata na 37°C nakon čega se mjeri promjer oko izbušenog kanalića tj. zona inhibicije u milimetrima (Ramezaneli i sur., 2016; Živković, 2015; Jahangirian i sur., 2013). Prednost ove metode je kratko vrijeme inkubacije za očitavanje rezultata te jednostavna laboratorijska oprema. Metode difuzije nisu najbolji izbor za testiranje nepolarnih uzoraka koji teško difundiraju u medijima (Valgas i sur. 2007). Prema radu Eloff (1998) utvrđeno je kako je ova metoda pogodna za dobro poznate i definirane inhibitore, no kada promatrani ekstrakti imaju više nepoznatih

komponenti, moguće su pogreške, ali je potvrdio da je pogodna za ispitivanje više ekstraktnih uzoraka.

2.2. Dilucijske metode

2.2.1. Agar dilucijska metoda

Minimalna inhibitorna koncentracija (MIC) je vrijednost definirana kao najmanja koncentracija antimikrobnog uzorka koji inhibira vidljiv prirast testiranog mikroorganizma, a izražava se u µg/mL ili mg/L (Balouri i sur., 2016). Za očitavanje upravo takve vrijednosti koristi se agar dilucijska metoda. Postupci ove metode ciljani su za ispitivanje osjetljivosti na antibiotska sredstva za razliku od ostalih antimikrobnih biocida kao što su konzervansi i dezinficijensi (Wiegand i sur., 2008). Antimikrobni uzorak se inkorporira u medij agara tako da svaka Petrijeva zdjelica ima drugačiju koncentraciju uzorka (Institut za kliničke i laboratorijske standarde, 2015) što je shematski prikazano na Slici 2.. Inkubacijsko razdoblje traje 48 sati nakon čega se očitavaju rezultati (Wilkins i Appleman, 1976). Postupak razrjeđivanja agara slijedi načelo utvrđivanja najniže koncentracije serijski razrijeđene koncentracije antibiotika kod koje je rast bakterija još uvijek inhibiran. Agar dilucijska metoda u usporedbi s difuzijskim metodama zahtjeva nešto više vremena kako bi se pripremile sve koncentracije razrjeđenja agara.



Slika 2. Dilucijska metoda (preuzeto i prilagođeno prema Web 2)

2.2.2. Dilucijska metoda - razrjeđenje bujona

Postupak uključuje pripravu dvostrukih razrjeđenja antimikrobnog sredstva (npr. 1, 2, 4, 8, 16 i 32 mg / mL) u sredstvu za rast tekućine raspodijeljenih u epruvetama koji sadrži minimalni volumen od 2 ml (makrodilucija) ili s manjim volumenom koristeći mikrotitsku ploču s 96 jažica (mikrodilucija) (Balouri i sur. 2016). Prema istraživanju Silva i sur. (2016) ispitana je minimalna inhibitorna koncentracija biljnog ekstrakta *Cleome spinosa* na bakterijskoj kulturi *Streptococcus mutans* uz pomoć ove metode – mikrodilucije. nakon čega je inkubacija trajala 24 sata na temperaturi od 37°C. Rezultat istraživanja pokazao je kako je biljni ekstrakt u cikloheksanu i kloroformu vrlo antibakterijski učinkovit s vrijednošću minimalne inhibitorne koncentracije u rasponu od 6,25 mg/mL i 12,5 mg/mL (Silva i sur., 2016). Također, istom metodom poslužili su se i Sadiq i sur. (2016) pri ispitivanju antibakterijskog učinka biljke *Notholirion thomsonianium* nad bakterijama *E. coli* i *Proteus mirabilis,* a rezultati su pokazali kako biljni ekstrakt u kloroformu daje pozitivnu MIC vrijednost od 280.00±3.00 μg/ml za *E. coli* i 39.67±4.05 μg/ml za *P. mirabilis.* Vrlo je značajno ukoliko neki ekstrakt pokaže MIC vrijednost manju od 100 μg/ml jer se onda smatra pogodnim za terapeutska liječenja ili daljnja slična istraživanja (Sadiq i sur., 2016; Kohanski i sur., 2010; Metzler i DeHaan, 1974). Ova metoda je osobito dobra za određivanje relativne jakosti ekstrakata ili eteričnih ulja i za uspostavljanje njihovog antimikrobnog djelovanja jer olakšava upotrebu različitih sojeva protiv ekstrakta na istoj ploči (Rios i sur., 2005). U odnosu na agar diluacijsku metodu, kraće je vrijeme inkubacije. Ovom metodom moguće je odrediti i minimalnu baktericidnu koncentraciju (MBC) koja označava najnižu koncentraciju ulja ili aktivne komponente koja ne pokazuje rast u podkulturi (Bosnić i sur., 2006).

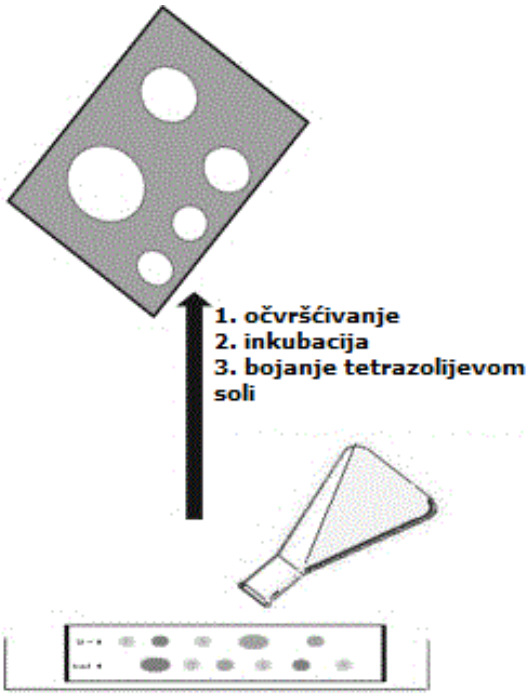
2.3. Tankoslojna kromatografija – bioautografija

Tankoslojna kromatografija bioautografija je metoda koja se koristi za bioaktivne komponente izolirane na TLC podlogama koja povezuje te komponente s antibakterijskom djelotvornošću (Ahmad i sur., 2016). Uvedene su mnoge bioautografske metode koje koriste ovu tehniku za brže odvajanje antimikrobnih tvari (Penzes i Oertel, 1970). Osnovna tehnika izvođenja metoda shematski je prikazana na Slici 3. Većina objavljenih istraživanja služi se metodom temeljenom na tzv. agar-difuzijskoj tehnici, pri čemu se antibakterijska

komponenta prenosi iz kromatografskog sloja na inokuliranu agarsku podlogu kroz proces difuzije (Hamburger i Cordell, 1987). Položaj zona na kromatogramu određen je Rf – vrijednošću za svaki sastojak. Rf vrijednost karakteristična je za pojedinu tvar u točno određenom kromatografskom sustavu. Rf vrijednost je faktor zadržavanja (retencijski faktor) odnosno veličina migracije u odnosu na otapalo, a izračunava se na slijedeći način (Kronja i Borčić, 2004):

$$Rf = \frac{\text{udaljenost koju je prešao sastojak}}{\text{udaljenost koju je prešla fronta otapala}}$$

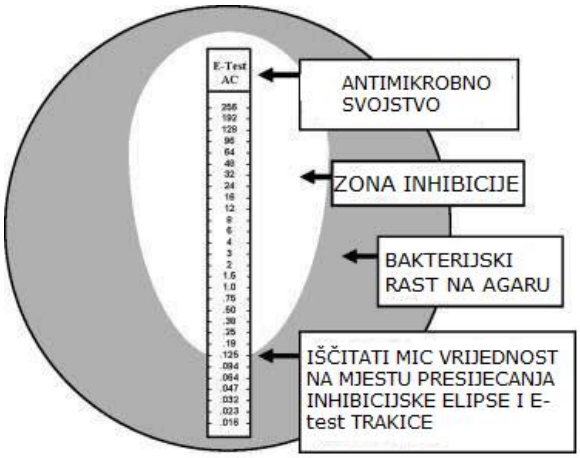
Prema znanstvenom radu Ahmad i sur. (2016) TLC bioautografijska metoda upotrebljena je za biljni ekstrakt lišća *Heliotropium bacciferum* u etil acetatu nad Gram pozitivnom bakterijom *Baccilus cereus* te nad Gram negativnom bakterijom *E.coli*. gdje su zabilježene najviše Rf vrijednosti s obzirom na druga otapala. Bioautografsku metodu pri ispitivanju biljnog ekstrakta *Helicrysum italicum* nad bakterijskom kulturom *S.aureus* uporabili su Nostro i sur. (2000); razvijene TLC podloge su pažljivo isušene zbog potpunog uklanjanja otapala i prekrivene agarom zasijanim bakterijskom kulturom, nakon čega je inkubacija trajala 24 sata pri 37°C. Ova je metoda smatrana najučinkovitijim testom za otkrivanje antimikrobnih spojeva (Shahverdi i sur., 2007). Bioautografija omogućuje jednostavno lokaliziranje aktivnosti čak i u kompleksnim smjesama (Hamburger i Cordell, 1987). Budući da se biološki aktivni spojevi koji se pojavljuju u biljnom materijalu sastoje od višekomponentnih smjesa, njihovo razdvajanje i određivanje još uvijek predstavlja problem. Većina njih se mora pročistiti kombinacijom više kromatografskih sredstava (Sasidharan i sur., 2011). Razvojem tehnologije, predstavljena je i novija dvodimenzionalna TLC bioautografska metoda (MGD-2D TLC) na uzorcima biljaka roda Juniperus i Thymi prema znanstvenom radu Matysik i sur. (2016) gdje se 15μL otopine tolena i esencijalnih ulja biljaka prenosi na 1 cm zone kromatografske podloge veličine 10x20 cm uz pomoć Hamilton HPLC šprice, a detekcija razdvojenih sastava odredila se pripremljenom otopinom anis aldehida u sumpornoj kiselini.



Slika 3. Shematski prikaz bioautografijske metode (preuzeto i prilagođeno prema Dewanjee i sur., 2014)

2.4. E test (Epsilometar test)

Epsilometar (E-test) je razvijen kako bi osigurao izravnu kvantifikaciju antimikrobne osjetljivosti mikroorganizama (Nachnani i sur., 1992). Ovo je kvantitativna metoda koja se odnosi na razrjeđivanje antibiotika i difuziju antibiotika u medij (Web 3). Temelji se na difuziji prethodno formiranog antimikrobnog gradijenta sačinjenog od plastičnih trakica položenih na agarnu podlogu inokuliranu testnim mikroorganizmom, a MIC vrijednosti se bilježi izravno s ljestvice na vrpci na mjestu gdje zona inhibicija presijeca traku (Huang i sur., 1992). Nakon 48 sati inkubacije, inhibicijska zona, u obliku kapljice, preklapa ocjenjivanu test traku pri inhibicijskoj koncentraciji (IC) antibiotika (Nachnani i sur., 1992) kako je shematski prikazano na Slici 4..



Slika 4. Shematski prikaz E-testa (preuzeto i prilagođeno prema Web 4)

2.5. „Time kill“ metoda

„Time kill“ test je najprikladnija kvantitativna metoda za određivanje baktericidnog ili fungicidnog učinka još zvana i suspenzijska. To je snažan alat za dobivanje informacija o dinamičkoj interakciji između antimikrobnog sredstva i mikrobnog soja (Balouri i sur., 2015). Osnovni koncept „Time-kill“ metode je utvrđivanje brzine kojom mikroorganizam biva ubijen antibiotskim spojem ili ekstraktom kao funkcija podataka o preživljavanju zabilježenih na dovoljnom broju vremenskih točaka izloženosti tako da se grafikon može konstruirati modeliranjem propadanja populacije tijekom vremena do točke izumiranja. Kinetika time-kill testa je prikazana kroz logaritamske i stacionarne faze rasta u testiranim stanicama. Sve su kinetičke studije provedene u kationo prilagođenim Muller-Hinton agarima s 0,5 % škroba (Coudron i Stratton, 1994). Prema Petersen i sur. (2006) jedna je od najčešćih metoda za ispitivanje procjene interakcija antibiotika. Ova metoda može se koristiti za određivanje sinergizma ili antagonizma između lijekova (dva ili više) u kombinacijama (Balouri i sur., 2015; White i sur., 1996). Pogreške su moguće pri očitavanju rezultata jer se razmatraju antibiotska svojstva pri vrlo malim koncentracijama u jednom trenutku (White i sur., 1996).

3. USPOREDBA METODA ISPITIVANJA ANTIBAKTERIJSKIH SVOJSTAVA

Oses i sur. (2015) utvrdili su antibakterijska svojstva lavandinog meda nad bakteriom *S. aureus* uz pomoć metoda agar dilucijske metode, metode razrjeđenje bujon te metode

bušenjem kanalića u agaru i time dokazali kako agar dilucijska metoda pokazuje najmanji opseg unutar biljnog ekstrakta *Lavandula* ssp. Antibakterijsku aktivnost različitih vrsta meda prema bakterijama *S. aureus* i *E. coli,* ispitano je prema radu Gobin i sur. (2014) uz pomoć difuzijske metode bušenjem kanalića na agaru čime se potvrdilo variranje potencijala antibakterijske aktivnosti.

Koristeći disk difuzijske metode i metode difuzije bušenjem kanalića te metodu bioautografije Valgas i sur. (2007) utvrđivali su aktivnosti sedam frakcija biljnih ekstrakata (rod *Baccharis, Eugenia, Polygala, Ganoderma* te vrste *Croton celtidifolius, Cyathea phalerata, Lippia alba, Rottboelia cochinchinensis*) nad bakterijama *S. aureus* te *E. coli.* Ukazali su kako je difuzijska metoda bušenjem kanalića osjetljivija od disk difuzijske metode, dok je izravna bioautografska metoda osjetljivija od neizravne bioautografske metode, stoga bioautografske metode i difuzijske metode smatraju jednako osjetljivima i pouzdanima.

Ispitujući antibakterijske vrijednosti različitih ekstrakata biljnih vrsta, Parekh i sur. (2005) poslužili su se disk difuzijskom metodom (za vodene ekstrakte) i difuzijskom metodom bušenjem kanalića u agaru (za metanolne ekstrakte) nad pet bakterijskih kultura, čime su pokazali izrazito velik antibakterijski potencijal biljnog ekstrakta *Caesaplina pulcerrima* ispitanog objema metodama, no važno je napomenuti kako difuzijskom metodom bušenja kanalića u agaru ekstrakt ima najveću zonu inhibicije.

Ogata i sur. (2014) u svojem su radu usporedili efikasnost E-testa, agar dilucijske metode i disk difuzijske metode nad bakterijom *Helicobacter pylori* te su zaključili kako je disk difuzijska metoda vrlo jednostavna, laboratorijski pristupačna i ekonomična; agar dilucijska metoda je prigodna za mali broj bakterijskih sojeva te postaje nepraktična, dok je E-test statistički najtočniji te pogodan za rutinsko ispitivanje osjetljivosti *Helicobacter pylori* .

Prema radu Hammer i sur. (1999) izvršena je usporedna analiza antibakterijske djelotvornosti više od pedeset eteričnih ulja i biljnih ekstrakata s područja Australije, nad bakterijama *E. coli, S. aureus*, koristeći dilucijske metode. Zaključeno je kako su različiti rezultati minimalne inhibicijske vrijednosti mogli biti posljedica raznih faktora kao što su rast mikroorganizma, topljivost uljnih komponenata ili izlaganje mikroorganizama eteričnom ulju/ biljnom ekstaktu, no i dalje ih smatraju pogodnima za ovakvu vrstu ispitivanja antibakterijske djelotvornosti.

Učestala, pa tako najjednostavnija i jeftina metoda za ispitivanje antibakterijskih svojstava kojom se koriste brojni laboratoriji su difuzijske metode. Međutim, važno je

koristiti nekoliko metoda kako bi se što točnije prikazala učinkovitost nekog biljnog ekstrakta ili eteričnog ulja.

4. ZAKLJUČAK

Uslijed prekomjerne i često neracionalne upotrebe sintetičkih antibiotika, došlo je do razvoja rezistencije bakterija na antibiotike, stoga su potrebna znanstvena istraživanja koja će različitim metodama provjeravati i otkrivati nova antibakterijska svojstva biljnih ekstrakata. Dosadašnja znanstvena ispitivanja nisu pronašla jedinstvenu metodu ispitivanja antibakterijskih djelovanja, no razvojem tehnologije dolazi se i do novih metoda ispitivanja koje daju valjane i prihvatljive učinke. Kako bi se dobili što precizniji i točniji rezultati, neizbježno je koristiti nekoliko metoda za ispitivanje antibakterijskih svojstava.

Važnost ispitivanja antibakterijskih svojstava biljnih ekstrakata leži u novim načinima liječenja i suzbijanja širenja bolesti.

5. LITERATURA

Ahmad, S., AbdEl-Salam, N.M., Ullah., R. (2016) In vitro Antimicrobial Bioassays, DPPH Radical Scavenging Activity and FTIR Spectroscopy Analysis of *Heliotropium bacciferum*. BioMed Research International; 2016, 12

Abdul-Awal, S.M., Nazimir, S., Nasrin, S., Nurunnavi, T.R., Uddin, S.J. (2016) Evaluation of pharmacological activiti of *Hibiscus tiliaceus*. SpringerPlus 5:1209

Balouri, M., Sadiki, M., Koraichi Ibnsouda, S. (2016) Methods for *in vitro* evaluating antimicrobial activity: A review. Journal of Pharmaceutic Analysis; 71-79

Bashir Dar, K., Bhat, A.H:, Amin, S., Anees, S., Masood, A., Zargar, M. I., GAnie, S.A. (2016) Efficacy of aquaeous and methanolic extracts of Rheum spiciformis against pathogenic bacterial and fungal strains. Journal of Clinical and Diagnostic Research; 10(9): BC18-BC22

Bauer, A.W., Kirby, W.M., Sherris, J.C., Turck, M. (1966) Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method. American Journal of Clinical Pathology; 45(4):493-6.

Bubonja M., Mesarić M., Miše A.; Jakovac M., Abram M, (2008) Utjecaj različitih čimbenika na rezultate testiranja osjetljivosti bakterija disk difuzijskom metodom. Medicina Fluminensis 44:280-284

Chu, D.T.W., Plattner, J.J., Katz, L. (1996) New directions in antibacterial research. Journal of Medicinal Chemistry 39: 3853-3874

Cosentino, S., Tuberoso, CIG, Pisano, B. (1999) In-vitro antimicrobial activity and chemical composition of Sardinian Thymus essential oils. Letters in Applied Microbiology; 29:130–135

Coudron, P.E., Stratton, C.W. (1994) Utilization of Time-Kill Kinetic Methodologies for Assessing the Bactericidal Activities of Ampicillin and Bismuth, Alone and in Combination,

against Helicobacter pylori in Stationary and Logarithmic Growth Phases. Antimicrobial agents and Chemotherapy; 39(1): 66-69

Ćerić, J., (2015) Kemijski sastav i antimikrobno djelovanje eteričnih ulja iz biljnih vrsta rodova *Salvia* L. i *Thymus* L. Specijalistički rad. Sveučilište u Zagrebu, Farmaceutsko biokemijski fakultet, Zagreb

da Silva, A.P.S.A., da Silva, L.C.N., da Fonseca, C.S.M., de Araujo, J.M., dos Santos Correia, M.T., da Silva Cavalcanti, M., de Menezes Lima, V.L. (2016) Antimicrobial Activity and Phytochemical Analysis of Organic Extracts from *Cleome spinosa* Jaqc. Journal Frontiers in Microbiology 7:963

Dorman, H.J.D., Deans, S.G. (2000) Antimicrobial agents from plants: antibacterial activity of plant voatile oils. Journal of Applied Microbiology; 308-316

Dewanjeea, S., Gangopadhyayb, M., Bhattacharyaa, N., Khanraa, R., Duaa, T.K. (2014) Bioautography and its scope in the field of natural product chemistry. Journal of Pharmaceutical Analysis; 5(2):75-84

Gobin, I., Vučković, D., Lušić, D. (2014) Antibakterijska svojstva meda. Medicina fluminensis, 50:150-157

Hamburger, M., Cordell, G.A. (1987) A direct bioautographic assay for compunds possessing antibacterial activity. Journal of Natural Products 50:19-22

Hammer, K.A., Carson, C.F., Riley, T.V. (1999) Antibacterial activity of essential oils and other plant extracts. Journal of Applied Microbiology 86: 985-990

Hoffman, C., Evans, A.C. (1911) The uses of spices as preservatives. Journal of Indian Engineering and Chemistry 3, 835– 838

Huang, M.B., Baker, C.N., Banerjee, S., Tenover, F.C. (1992) Accuracy of the E test for determining antimicrobial susceptibilities of staphylococci, enterococci, *Campylobacter*

jejuni, and gram-negative bacteria resistant to antimicrobial agents. Journal of Clinical Microbiology 30:3243–3248.

Irshad, S.,Mahmood, M., Perveen, F. (2012) In-Vitro Anti-Bacterial Activities of Three Medicinal Plants Using Agar Well Diffusion Method. Research Journal of Biology 2:1-8

Jahangirian, H., Jelas Horon, M.D., Shah Ismail, M.H., Rafiee-Moghaddam, R., Afsah-Hejri, L., Abdollahi, Y., Rezeyi, M., Vafei, N. (2013) Well diffusion method for evaluation of antibacterial activity of copper phenyl fatty hydroxamate synthesized from canola and palm karnel. Digest Journal of Nanomaterials and Biostructures l8: 1263-1270

Janssen, A.M., Scheffer, J.J., Baerheim Svendsen, A. (1987) Antimicrobial activity of essential oils: a 1976–86 literature review. Aspects of the test methods. Planta Medica 53, 395–398

Jorgensen, J.H, Turnidge, J.D. (2003) Susceptibility test methods: dilution and disc diffusion methods, U: Murray, P.R.., Baron, E.J., Jorgensen, J.H., Pfaller, M.A., Yolken, R.H. Manual of Clinical Microbiology, ASM Press, Washington DC, 1119-25

Kalenić, S., Bedenić, B. (2013) Antibakterijski lijekovi(Antibacterial agents). U: Kalenić, S. Medicinska mikrobiologija. Medicinska naklada, Zagreb, 97-116

Kelmanson, J. E., Jäger, A.K., Van Staden, J. (1999) Zulu medical plants with antibacterial activity. Journal of Ethnopharmacology. 69: 241-246

Kohanski, M.A., DePristo, M.A., Collins, J.J. (2010) Suptential antibiotic leads to multidrug resistence via eadical-induced mutagenesis. Molecular Cell (3):311-320

Kronja, O., Borčić, S. (2004) Praktikum preparativne organske kemije, Školska knjiga, Zagreb.

Madhyastha, M.S., Marquardt, R.R., Masi, A., Borsa, J., Frohlich, A.A. (1994) Comparison of toxicity of different mycotoxins to several species of bacteria and yeasts: use of *Bacillus brevis* in a disc diffusion assay. Jorunal of Food Protection 57:48-53

Martindale, W.H. (1910) Essential oils in relation to their antiseptic powers as determined by their carbolic coefficients. Perfumery and Essential Oil Research 1, 266–296

Matysik, E., Wofniak, A., Peduch, R., Rejdak, R., Polak, B., Donica, H. (2016) The new method for separation and determination of multicomponent mixtures of plant extract. Journal of Analytical Methods in Chemistry, 2016, 1-6

Meltzer, C.M., DeHaan, R.M. (1974) Susceptibility teste of anaerobic bacteria: statistical and clinical considerations. The Journal of Infectious Diseases 130(6):588-94

Mohr, K.I., (2016) History of antibiotics research. U: Stadler, M., Deresch, P. How to Overcome the Antibiotic Crisis. Springer International Publishing, Switzerland, 237-272

Nachnani, S., Scuteri, A., Newman, M.G., Avanessian A.B., Lomeli, S.L. (1992) E-test: a new tehnique for antimicrobial susceptibility testing for periodontal microorganisms. Journal of Periodontology; 63(7):576-83

Nascimento, G.G.F., Locatelli, J., Freitas, P.C., Silva, G.L. (2000) Antibacterial activity of plant extracts and phytochemicals on antibiotic-resistant bacteria. Brazilian Journal of Microbiology 31:247-256

Nostro, A. Germano, M.P., D'Angelo, V., Marino, A:, Cannatelli, M.A. (2000) Extracts methods and bioautography for evaluation of medical plant antimivrobial activity. Letters in Applied Microbiology 30, 379-384

Ogata, S.K., Gales, A.C., Kawakami, E. (2014) Antimicrobial susceptibility testing for Helicobacter pylori isolates from Brazilian children and adolescents: Comparing agar dilution, E-test, and disk diffusion. Brazilian Journal of Microbiology.; 45(4): 1439–1448

Oses S.M., Pascual-Maté, A., de la Fuente, D., de Pablo, A., Fernández-Muino, M.A., Sancho, M.T. (2015) Comparison of methods to determine antibacterial activity of honeys against *Staphylococcus aureus*. NJAS - Wageningen Journal of Life Sciences 78, 29- 33

Parekh, J., Jedeja, D., Chanda, S. (2005) Efficacy of aqueous and methanol extracts of some medical plants for potential antibacterial activity. Turkish Journal of Biology 29;203-210

Penzes, L.P., Oertel, G.W. (1970) Direct bioautography on thin-layer chromatograms as a method for detecting fungitoxic substances. Journal of.Chromatography 51; 325-327

Petersen, P.J., Labthavikul, P., Hal Jones, C., Bradford, P.A. (2006) In vitro antibacterial activities of tigercycline in combination with other antimicrobial agents determined by chequerboard and time-kill kinestic analysis. Journal of Antimicrobial Chemotherapy 57: 573-576

Prabuseenivasan, S., Jayakumar, M., Ignacimuthu,S. (2006) In vitro antibacterial activity of some plant essential oils. International Society for Complementary Medicine Research 6:39

Ramezanali F., Samimi, S., Kharazifard, M., Afkhami, F. (2016) The in vitro antibacterial effecacy of persian green tea extract as an intracanal irrigant on *Entorcoccus faecalis* Biofilm. Iranian Endodontic Journal 11(4):304-308

Rios, J.L., Recio, M.C., Villar, A. (1988) Screening methods for natural antimicrobial products with antimicrobial activity: a review of the literature, Journal of Ethnopharmacology 23; 127–149

Rios, J.L., Recio, M.C. (2005) Medical plants andantimicrobial activity. Journal of Ethnopharmacology 100; 80-84

Sadiq, A., Ahmad, S., Ali, R., Ahmad, F., Ahmad, S., Zeb, A., Ayaz, M., Ullah, F., Siddique, A.N. (2016) Antibacterial and antifungal potentials of the solvents extracts for *Eryngium caeruleum*, *Notholirion thomsonianum* and *Allium consanguineum*. BMC Complementary and Alternative Medicine 16:478

Sasidharan, S., Chen, Y., Saravanan, D., Sundram, KM., Yoga Latha, L. (2011) Extraction, isolation and characterization of bioactive compounds from plants' extracts. African Journal of Traditional, Complementary and Alternative Medicines 8 (1):1-10

Shahverdi, A.R., Abdolpour, F., Monsef-Esfahani, H.R. and Farsam, H.A. (2007) TLC bioautographic assay for the detection of nitrofurantoin resistance reversal compound. Journal of Chromatography 850:528–530

Tendencia, E. A. (2004) Disk diffusion method. U: Ruangpan, L., Tendencia, E.A. Laboratory manual of standardized methods for antimicrobial sensitivity tests for bacteria isolated from aquatic animals and environment. Aquaculture Department, Southeast Asian Fisheries Development Center, Tigbauan, Iloilo, Philippines, 13-29

Valgas, C., Machado de Souza, S., Smânia, E.F.A.; Smânia Jr., A. (2007) Screening methods to determine antibacterial activity of natural products. Brazilian Journal of Microbiology 38:369-380

Wiegand, I., Hilpert, K., Hancock, R.E.W. (2008) Agar and broth dilution methods to determine the minimal inhibitory concentration (MIC) of antimicrobial substances. Nature Protocols Journal 3, 163-175

Wilkins, T.D., Appleman, M.D. (1976) Review of methods for antibacterial susceptibility testing of anaerobic bacteria. Laboratory Medicine 7:12-19.

White, R.L., Burgess, D.S., Manduru, M., (1996) Comparison of three different in vitro methods of detecting synergy : time-kill, checkerboard, and E test, Antimicrobial Agents and Chemotheraphy 40: 1914–1918

Zaidan, M.R., Noor Rain, A., Badrul, A.R., Norazah, A., Zakiah, I. (2005) In vitro screening of local medicinal plants for antibacterial activity using disc diffusion method. Tropical Biomedicine 22(2):165-70

Živković, N., (2015) Antimikrobni učinak odabranih eteričnih ulja primorske Hrvatske na bakteriju *Acinetobacter baumanni*. Završni rad. Sveučilište u Rijeci, Medicinski fakultet, Rijeka

Mrežne stranice

Web 1. The Germ Guy: Confessions of a mercurial microbiologist. Zone inhibition. https://germguy.wordpress.com/2017/02/26/are-cell-phones-bringing-us-closer-to-the-post-antibiotic-era/zone-inhibition/ (11.7.2018.)

Web 2. Prince George's Community college: Direct Methods http://academic.pgcc.edu/~kroberts/Lecture/Chapter%206/counting.html (5.7.2018.)

Web 3. Antimicrobial resistance learning site: Examples of antibiotic sensitivity testing methods. https://amrls.cvm.msu.edu/microbiology/detecting-antimicrobial-resistance/test-methods/examples-of-antibiotic-sensitivity-tesing-methods (5.7.2018.)

Web 4. https://twitter.com/mdmicrobiology/status/690759347840876545 (15.7.2018.)