

MINERALNI SASTAV I ANTIMIKROBNA AKTIVNOST ETANOLSKOG EKSTRAKTA ŽUTOG ZVEZDANA

*Dragutin Đukić¹, Milica Zelenika¹, Leka Mandić¹, Vladeta Stevović¹,
Vladimir Pavlović², Pavle Mašković¹*

Izvod: Rad je koncipiran sa ciljem da se utvrdi mineralni sastav i antimikrobna aktivnost etanolskog ekstrakta žutog zvezdana, a u smislu potencijalne upotrebe u proizvodnji hrane. Minimalna inhibitorna koncentracija (MIC) ispitivana je mikrodilucionom metodom u funkciji ekstrakta i vremena razvoja mikroorganizama. Sa stanovišta antimikrobnog delovanja, ispitivanjem je ustanovljeno da ekstrakt biljke *Lotus corniculatus* L. ispoljava najjaču antimikrobnu aktivnost u odnosu na bakteriju *Escherichia coli*, a najmanju u odnosu na bakteriju *Proteus hauseri*. Mineralni sastav ekstrakta biljne vrste *Lotus corniculatus* L. određen je primenom metode ICP-MS. Ispitivanje je pokazalo da je ekstrakt žutog zvezdana bogatog mineralnog sastava.

Ključne reči: *Lotus corniculatus* L., biljni ekstrakt, antimikrobna aktivnost, mineralni sastav

Uvod

Uzorci biljnog porekla nekada sadrže malu količinu sekundarnih metabolita koji mogu posedovati jaku antimikrobnu aktivnost. Mnoge biljne vrste se odavnina koriste kao lekovite (za pripremanje čajeva, napitaka, krema...), kao i u ljudskoj ishrani [1]. Primenom najsavremenijih instrumentalnih metoda, moguća je kvalitativna i kvantitativna analiza, izolovanje i ispitivanje čak i tragova supstanci prisutnih u biljnim tkivima [2]. Poslednjih godina sve veći broj istraživanja usmeren je na ispitivanje mogućnosti primene ekstrakata biljaka i etarskih ulja, izolovanih iz lekovitog i začinskog bilja u prehrambenoj industriji, u cilju produženja roka trajanja životnih namirnica, odnosno, usporavanja ili sprečavanja razvoja patogenih bakterija i poboljšavanja kvaliteta prehrambenih proizvoda [3, 4].

Hemijska jedinjenja, izolovana iz biljaka, koja imaju antimikrobnu aktivnost su: fenolne kiseline, hinoni, flavoni i flavonoidi, tanini, kumarini, terpenoidi, alkaloidi [5, 6]. Zbog porasta rezistencije bakterija na veliki broj antibiotika, biljni ekstrakti i jedinjenja izolovana iz biljnih sirovina dospela su u žižu interesovanja kao alternativni antiseptici i antimikrobni agensi [7]. Prirodna jedinjenja deluju na bakterijsku ćeliju tako što dovode do narušavanja citoplazmatične membrane. Vezujući se za lipide membrane, ova jedinjenja dovode do povećanja njene propustljivosti [8].

Mnogi elementi utiču na sekundarni metabolizam biljaka i na produkciju biološki aktivnih jedinjenja [9]. Esencijalni elementi su neophodni za kompletiranje životnog ciklusa biljke, i direktno učestvuju u metabolizmu biljke [10]. Pri niskim koncentracijama nutrijenata (nedovoljna ishrana) biljka ne postiže optimalan rast.

¹ University of Kragujevac, Faculty of Agronomy, Cara Dušana 34, Čačak, Serbia (pavlem@kg.ac.rs);

² University of Belgrade, Faculty of Agriculture, Nemanjina 6, 11000 Beograd, Serbia.

Materijal i metode rada

Priprema biljnog ekstrakta

Uzorak biljke *Lotus corniculatus* L. sakupljen je početkom decembra meseca 2014. godine. Uzorkovanje je izvršeno u mestu Trbušani (43°54'39.06" N, 20°19'10,21" E, 246 m a.s.l), koj se nalazi u okolini Čačka.

Biljka *Lotus corniculatus* L. je osušena na vazduhu u dobro provetrenoj i zamračenju prostoriji, na sobnoj temperaturi, u cilju sprečavanja razgradnje aktivnih sastojaka. Sasušeni delovi biljke žutog zvezdana (10,0041 g) su usitnjeni pomoću blendera i tako dobijeni biljni materijal ekstrahovan u Soxhlet-ovom aparatu.

Određivanje antimikrobne aktivnosti ekstrakta

Za određivanje antimikrobne aktivnosti određena je minimalna inhibitorna koncentracija ispitivanih uzoraka. Minimalna inhibitorna koncentracija (MIC) ekstrakta na testirane bakterije je određena mikrodilucionom metodom koje sadrže 96 jamica [11]. Za svaki soj provereni su uslovi rasta i sterilnost medijuma. Standardni antibiotik amracin korišćen je za kontrolu osetljivosti testiranih bakterija, dok je ketokonazol korišćen za kontrolu gljiva. Ploče su ostavljene u termostatu na 37° C na 24h za bakterije i 48h za gljive. Nakon toga promena boje se ocenjuje vizuelno. Svaka promena boje od ljubičaste, roze ili bezbojne zabeležena je kao pozitivna promena.

Određivanje mineralnog sastava ekstrakta.

U poslednje vreme se kod ispitivanja mineralnog sastava biljaka sve češće koristi indukovano spregnuta plazma – ICP (Inductively Coupled Plasma). Alikvoti od 0,3 mL su prebačeni u teflonske sudove i dodato je 5 mL azotne kiseline i 1,5 mL vodonik-peroksida (30%). Mikrotalasni program je sastavljen od tri etape: 5 minuta na sobnoj temperaturi do 180° C, zatim 10 minuta zadržavanje na 180° C i 20 minuta na otvorenom.

Posle hlađenja na sobnoj temperaturi, uzorci rastvora su kvantitativno preneti u balonima za jednokratnu upotrebu i razblaženi dejonizovanom vodom do 100 mL [12]. Za kvalitativne analize uzorka, kalibraciona kriva sa pet tačaka (uključujući nultu) je konstruisana za svaki izotop u koncentracionom opsegu od 0.1-2.0 mg/L.

Koncentracija svakog izmerenog izotopa je korigovana za faktore visokog i niskog unutrašnjeg masenog standarda, korišćenjem interpolacione metode. Kvalitet analitičkog procesa je kontrolisan analizom standardnog referentnog materijala NIST SRM 1577c. Izmerene koncentracije bile su u okviru opsega sertifikovanih vrednosti za ispitivane izotope.

Rezultati istraživanja i diskusija

Ekstrakcijom u Soxhlet-ovom aparatu, iz ispitivane biljke dobijen je etanolski ekstrakt. Vrednost masenog udela etanolskog ekstrakta biljne vrste *Lotus corniculatus* L. dobijenog u Soxhlet-ovom aparatu je 4.5261%.

U tabeli 1. prikazani su rezultati dobijeni određivanjem antimikrobne aktivnosti etanolskog ekstrakta biljne vrste *Lotus corniculatus* L. Rezultati dobijeni mikrodilucionom metodom pokazuju značajnu inhibitornu aktivnost ekstrakta pri čemu MIC vrednosti iznose od 7.8125 µg/mL do 125.00 µg/mL.

Ekstrakt izolovan iz biljke *Lotus corniculatus* L. pokazuje inhibitornu aktivnost prema šest bakterijskih i dva gljivična soja. Najrezistentniji bakterijski sojevi, čiji su rast inhibirale koncentracije od 125 µg/mL i 62.5 µg/mL su gram negativne bakterije *Proteus hauseri* odnosno *Proteus mirabilis*. Ekstrakt biljke *Lotus corniculatus* L. ispoljava najjaču antimikrobnu aktivnost u odnosu na bakteriju *Escherichia coli* - 7.8125, a najmanju antimikrobnu aktivnost biljni ekstrakt ispoljava u odnosu na bakteriju *Proteus hauseri* - 125.00. Kod ispitivanja antimikrobne aktivnosti, koju biljni ekstrakt ispoljava u odnosu na gljive, iz dobijenih rezultata (tabela 1), se vidi da biljni ekstrakt pokazuje jaču antimikrobnu aktivnost u odnosu na gljivu *Candida albicans* - 7.8125 µg/mL nego u odnosu na *Aspergillus niger* 15.825 µg/mL. Očitana minimalna inhibitorna koncentracija za antibiotike (amracin i ketokonazol) kreće se u opsegu 0.24 – 1.95 µg/mL. Antibiotik amracin ispoljava najjaču antimikrobnu aktivnost u odnosu na bakteriju *Bacillus subtilis* – 0.24 µg/mL, a najmanju antimikrobnu aktivnost ispoljava u odnosu na *Staphylococcus aureus* – 0.97 µg/mL i *Escherichia coli*– 0.97 µg/mL. Antibiotik ketokonazol ispoljava najjaču antimikrobnu aktivnost u odnosu na gljivu *Aspergillus niger* – 0.97 µg/mL, a najmanju u odnosu na gljivu *Candida albicans* – 1.95 µg/mL. U poređenju sa standardnim antibioticima (MIC vrednosti od 0.24 do 1.95 µg/mL), etanolni ekstrakt ispitivanje biljne vrste ispoljava umereno jaku antimikrobnu aktivnost sa MIC vrednostima u intervalu od 7.8125 µg/mL do 125 µg/mL za izabrane ATCC sojeve.

Tabela 1. Minimalna inhibitorna koncentracija (MIC) etanolnog ekstrakta biljne vrste *Lotus corniculatus* L.

Table 1. Minimal inhibitory concentration (MIC) ethanol extract of plant species *Lotus corniculatus* L.

Mikroorganizmi	MIC µg/mL		
	Etanolni ekstrakt <i>Lotus corniculatus</i> L.	Amaracin	Ketokonazol
<i>Proteus hauseri</i> ATCC 13315	125.00	0.49	/
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	15.825	0.97	/
<i>Klebsiella pneumoniae</i> ATCC 13883	31.25	0.49	/
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	7.8125	0.97	/
<i>Proteus mirabilis</i> ATCC 14153	62.5	0.49	/
<i>Bacillus subtilis</i> ATCC 6633	31.25	0.24	/
<i>Candida albicans</i> ATCC 10231	7.8125	/	1.95
<i>Aspergillus niger</i> ATCC 16404	15.825	/	0.97

Mineralni sastav ekstrakta biljne vrste *Lotus corniculatus* L. određen je primenom metode ICP-MS. Dobijen je sadržaj elemenata: ²³Na, ²⁴Mg, ³⁹K, ⁴⁴Ca, ⁵²Cr, ⁵⁵Mn, ⁵⁷Fe,

⁵⁹Co, ⁶⁰Ni, ⁶³Cu, ⁶⁶Zn, ⁷⁵As, ⁷⁷Se, ¹¹¹Cd, ¹¹⁸Sn, ²⁰²Hg i ²⁰⁸Pb. U tabeli 2. prikazani su rezultati određivanja ekstrakta ICP – MS metodom.

Tabela 2. Mineralni sastav ekstrakta žutog zvezdana određen ICP metodom
Table 2. Mineral composition of the extract birdsfoot trefoil determined by ICP method

Ispitivani elementi	Ekstrakt žutog zvezdana µg/mL (ppm)
²³ Na	43.062
²⁴ Mg	1698.60
³⁹ K	7030.09
⁴⁴ Ca	5029.52
⁵² Cr	12.41
⁵⁵ Mn	143.531
⁵⁷ Fe	2322.92
⁵⁹ Co	2.551
⁶⁰ Ni	21.567
⁶³ Cu	7.718
⁶⁶ Zn	21.407
⁷⁵ As	1.27415
⁷⁷ Se	2.548
¹¹¹ Cd	0.081499
¹¹⁸ Sn	nd
²⁰² Hg	0.014705
²⁰⁸ Pb	4.61708

nd-nije detektovan

Ispitivanje je pokazalo da je ekstrakt žutog zvezdana bogatog mineralnog sastava. Prisutni su kako makro-, tako i mikroelementi. Od ispitivanih 17 elemenata, potvrđeno je prisustvo 16 elemenata, a jedan element nije detektovan.

Kalijum, kalcijum i magnezijum su mineralni nutrijenti koje većina biljaka zahteva u velikim količinama i zato se nazivaju makronutrijentima [13]. Zato ne iznenađuje činjenica da su upravo oni nađeni u najvećim koncentracijama u ispitivanom uzorku. Svi mikronutrijenti, osim gvožđa, nalaze se u nižim koncentracijama u ispitivanom ekstraktu. Pretpostavlja se da je povećana koncentracija gvožđa u ekstraktu posledica akumulacije iz zemljišta.

Neki elementi su svrstani u neesencijalne i toksične, sa štetnim uticajem na ekosistem i ljudsko zdravlje, poput arsena, kadmijuma, žive i olova. Njihovo prisustvo u biljnom tkivu može značiti zagađenje zemljišta. Dobijene vrednosti navedenih

elementa u ispitivanom uzorku su ispod odgovarajućeg limita maksimalno dozvoljenih koncentracija po preporuci Svetske zdravstvene organizacije.

Zaključak

Ispitivanja su pokazala da je biljna vrsta *Lotus corniculatus* L. bogatog mineralnog sastava. Odlikuje se visokim sadržajem kalijuma, kalcijuma i magnezijuma, kao mikronutrijentima i gvožđem – kao makronutrijentom. Debijene vrednosti za neesencijalne (toksične) elemente kao što su: arsen, kadmijum, živa i olovo u ispitivanom uzorku su ispod odgovarajućeg limita maksimalno dozvoljene koncentracije po preporuci Svetske zdravstvene organizacije.

Sa stanovišta antimikrobnog delovanja, ispitivanjem je ustanovljeno da biljni ekstrakt poseduje antimikrobnu aktivnost. U poređenju sa standardnim antibioticima (MIC vrednosti od 0.24 do 1.95 µg/mL do 125 µg/mL) etanolni ekstrakt ispitivane biljne vrste ispoljava jaku do umereno jaku antimikrobnu aktivnost sa MIC vrednostima u intervalu od 7.8125 µg/mL do 125 µg/mL za izabrane ATCC sojeve.

Na osnovu svega navedenog, ispitivana biljna vrsta, zbog svog bogatog mineralnog sastava i posedovanja antimikrobne aktivnosti, može biti veoma zanimljiva sa stanovišta njene primene u prehrambenoj industriji, za produženje roka trajanja životnih namirnica, odnosno, usporavanje ili sprečavanje razvoja patogenih bakterija i poboljšavanja kvaliteta prehrambenih proizvoda.

Napomena

Istraživanja u ovom radu deo su projekta “Poboljšanje genetičkog potencijala i tehnologija proizvodnje krmnog bilja u funkciji održivog stočarstva” – TR 31057 koji finansira Ministarstvo prosvete, nauke i tehnološkog razvoja Republike Srbije.

Literatura

- Newman DJ, Cragg, GM, Natural Products as Sources of New Drugs over the Last 25 Years, *Journal of Natural Products*, 2007, 70, 461-477.
- Harvey AL, Natural products in drug discovery, *Drug Discovery Today*, 2008, 13, 894-901.
- Bakkali, F., Averbeck, S., Averbeck, D., Idaomar, M., Biological effects of essential oils-a review, *Food and Chemical Toxicology* 46 (2008) 446-475.
- Davidson, P.M. (2006). Food antimicrobials: Back to Nature, *ISHS Acta Horticulturæ* 709: HI International Symposium on Natural Preservatives in Food SystemsH, 29-33.
- Cowan, M.M. (1999). Plant products as antimicrobial agents. *Clinical Microbiology Reviews* 12: 564-568.
- Knobloch, K., Pauli, A., Iberl, B. (1989). Antibacterial and antifungal properties of essential oil components, *Journal of Essential Oil Research*, 1(3): 119-28.
- Austin, M., Hoch, Y., *Phytotherapie bei Hauterkrankungen*, Urban and Fischer, München)2004= 1-7

- Burt, S. (2004). Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods- a review. *International Journal of Food Microbiology*, 94(3): 233-253.
- Sykorova M., Janošova, V., Štroffekova, D., Havranek, E., Račkova, L.)2009=. Determination of selected elements by XRF and total phenolics in leaves and crude methanol extract of leaves of *arctostaphylos uva-ursi*. *Acta Facultatis Pharmaceuticae Universitatis Comenianae*, 136-145.
- Aron DI, Stout PR, The essentiality of certain elements in minute quantity for plants with special reference to copper, *plant Physiology*, 1939, 14, 371-375.
- Satyajit, D., Sarker, L. N., Kumarasamy, Y., 2007. Microtitre plate based antibacterial assay incorporating resazur in as indicator of cell growth, and its application in the in vitro antibacterial screening of phytochemicals. *Methods* 42, 321–324.
- Sandrine Millour, Laurent Noel, Ali Kadar, Rachida Chekri, Christelle Vastel, Thierry Guerin, Simultaneous analysis of 21 elements in foodstuffs by ICP-MS after closed-vessel microwave digestion: Method validation, *Journal of Food Composition and Analysis* 24 (2011) 111-120.
- Wiedenhoeft Ac, *Plant Nutrition*, Chelsea House Pub, New York, 1 edition, 2006.

MINERAL COMPOSITION AND ANTIMICROBIAL ACTIVITY OF ETHANOL EXTRACT BIRDSFOOT TREFOIL

*Dragutin Đukić¹, Milica Zelenika¹, Leka Mandić¹, Vladeta Stevović¹,
Vladimir Pavlović², Pavle Mašković¹*

Abstract

In order to study and find plant species that possess antimicrobial activity, this work was carried out testing of plant species *Lotus corniculatus* L. (birdsfoot trefoil). The work was conceived with the aim to determine the mineral composition and antimicrobial activity of ethanol extract birdsfoot trefoil, and in terms of potential use in food production. The minimum inhibitory concentration (MIC) was tested in microdilution method in a function of time of the extract and the growth of microorganisms. From the point of antimicrobial activity, by testing it was found that extract of *Lotus corniculatus* L. manifest the strongest antimicrobial activity against *Escherichia coli*, and the lowest to the bacterium *Proteus hauseri*. Mineral composition of the extract plant species *Lotus corniculatus* L. was determined by ICP-MS. The study showed that the extract birdsfoot trefoil is rich by mineral composition.

Key words: *Lotus corniculatus* L., plant extract, antimicrobial activity, mineral composition

¹ University of Kragujevac, Faculty of Agronomy, Cara Dušana 34, Čačak, Serbia (pavlem@kg.ac.rs);

² University of Belgrade, Faculty of Agriculture, Nemanjina 6, 11000 Beograd, Serbia.