

# Antimikrobna aktivnost eteričnog ulja mirte

---

Kralj, Jadranka

Undergraduate thesis / Završni rad

2022

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Food Technology and Biotechnology / Sveučilište u Zagrebu, Prehrambeno-biotehnološki fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:159:349144>

Rights / Prava: [Attribution-NoDerivatives 4.0 International](#)/[Imenovanje-Bez prerada 4.0 međunarodna](#)

Download date / Datum preuzimanja: **2024-07-19**



Repository / Repozitorij:

[Repository of the Faculty of Food Technology and Biotechnology](#)



**Sveučilište u Zagrebu**  
**Prehrambeno-biotehnološki fakultet**  
**Preddiplomski studij Prehrambena tehnologija**

**Jadranka Kralj**

0058215147

**ANTIMIKROBNA AKTIVNOST ETERIČNOG ULJA**  
**MIRTE**

**ZAVRŠNI RAD**

**Predmet:** Proizvodnja jakih alkoholnih pića

**Mentor:** prof. dr. sc. Jasna Mrvčić

**Zagreb, 2022.**

## TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Završni rad

Sveučilište u Zagrebu  
Prehrambeno-biotehnološki fakultet  
Preddiplomski sveučilišni studij Biotehnologija

Zavod za prehrambeno-tehnološko inženjerstvo  
Laboratorij za tehnologiju vrenja i kvasaca

Znanstveno područje: Biotehničke znanosti  
Znanstveno polje: Prehrambena tehnologija

### Antimikrobna aktivnost eteričnog ulja mirte

Jadranka Kralj, 0058215147

**Sažetak:** Mirta (*Myrtus communis* L.) je samonikla aromatična biljka koja se godinama koristi u narodnoj medicini za ublažavanje zdravstvenih tegoba, a dosadašnja laboratorijska istraživanja dokazala su njeno insekticidno, antioksidativno, protuupalno i antimikrobno djelovanje. Vodeno-alkoholnom ekstrakcijom i superkritičnom fluidnom ekstrakcijom pripremljena su tri ekstrakta plodova i listova mirte. Za određivanje antimikrobne aktivnosti pripremljenih ekstrakata eteričnog ulja mirte korištena je disk-difuzijska metoda. Ekstrakti su ispitivani na gram-pozitivnim i gram-negativnim bakterijama, bakterijama mliječne kiseline te na kvascima. Dokazana je antimikrobna aktivnost ekstrakata kod svih testiranih mikroorganizama, osim kod bakterija mliječne kiseline. Najveća zona inhibicije zabilježena je kod bakterije *Listeria monocytogenes*. Rezultati pokazuju značajno antimikrobno djelovanje ekstrakata mirte, a antimikrobna aktivnost ovisi i o dijelu biljke iz kojeg se ekstrakt proizvodi kao i o načinu ekstrakcije.

**Ključne riječi:** mirta, eterično ulje, antimikrobno djelovanje, inhibicija, mikroorganizmi

**Rad sadrži:** 31 stranicu, 4 slike, 10 tablica, 39 literaturnih navoda

**Jezik izvornika:** hrvatski

Rad je u tiskanom i elektroničkom obliku pohranjen u knjižnici Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu, Kačićeva 23, 10 000 Zagreb

**Mentor:** prof. dr. sc. Jasna Mrvčić

**Datum obrane:** 18.07.2022.

## BASIC DOCUMENTATION CARD

Bachelor thesis

University of Zagreb  
Faculty of Food technology and Biotechnology  
University undergraduate study Biotechnology

Department of Food Engineering  
Laboratory for Fermentation and Yeast Technology

Scientific area: Biotechnical Sciences  
Scientific field: Food technology  
Antimicrobial activity of myrtle essential oil

Antimicrobial activity of myrtle essential oil

Jadranka Kralj, 0058215147

**Abstract:** Myrtle (*Myrtus communis* L.) is an aromatic wild plant that has been used for years in folk medicine to alleviate health problems, and previous laboratory studies have demonstrated its insecticidal, antioxidant, anti-inflammatory, and antimicrobial effects. Three extracts of myrtle fruits and leaves were prepared by water-alcohol extraction and supercritical fluid extraction. The antimicrobial activity of the prepared myrtle essential oil extracts was determined by the disc diffusion method. The extracts were tested on Gramme-positive and Gramme-negative bacteria, lactic acid bacteria and yeasts. The antimicrobial activity of the extracts was demonstrated against all tested microorganisms except lactic acid bacteria. The largest zone of inhibition was found for the bacterium *Listeria monocytogenes*. The results show a significant antimicrobial activity of myrtle extracts, and that the antimicrobial activity depends on the part of the plant from which the extract is obtained and on the extraction method.

**Keywords:** myrtle, essential oil, antimicrobial action, inhibition, microorganisms

**Thesis contains:** 31 pages, 4 figures, 10 tables, 39 references

**Original in:** Croatian

Thesis is deposited in printed and electronic form in the Library of the Faculty of Food Technology and Biotechnology, University of Zagreb, Kačićeva 23, 10 000 Zagreb

**Mentor:** Jasna Mrvčić, PhD, Full Professor

**Thesis defended:** 18.07.2022.

## Sadržaj

1. UVOD.....	1
2. TEORIJSKI DIO.....	2
2.1. Eterična ulja.....	2
2.1.1. Kemijski sastav eteričnih ulja.....	4
2.1.2. Antimikrobno djelovanje eteričnih ulja .....	5
2.2. Mirta ( <i>Myrtus communis</i> L.).....	6
2.2.1. Kemijski sastav eteričnog ulja mirte.....	6
2.2.2. Tradicionalna primjena i antimikrobno djelovanje eteričnog ulja mirte.....	7
3. EKSPERIMENTALNI DIO .....	9
3.1. Materijali .....	9
3.1.1. Ekstrakti mirte korišteni za određivanje antimikrobne aktivnosti.....	9
3.1.2. Test mikroorganizmi.....	11
3.1.3. Hranjive podloge.....	12
3.1.4. Kemikalije .....	14
3.1.5. Uređaji.....	14
3.1.6. Pribor.....	15
3.2. Metode.....	15
3.2.1. Čuvanje mikroorganizama .....	15
3.2.2. Priprava prekonoćnih kultura mikroorganizama .....	15
3.2.3. Priprava suspenzije test mikroorganizama.....	16
3.2.4. Određivanje antimikrobne aktivnosti disk difuzijskom metodom.....	16
4. REZULTATI I RASPRAVA.....	19
5. ZAKLJUČAK .....	27
6. LITERATURA.....	28

## 1. UVOD

Prekomjerna i kontinuirana upotreba antibiotika djeluje štetno na ljudsko zdravlje, ekosustav te bi također moglo povećati učestalost pojave patogena rezistentnih na lijekove. Otpornost na antibiotike glavni je rastući svjetski problem jer zahvaća upotrebu antibiotika u medicini, kao i u pakiranju i preradi hrane, a najznačajniji je rizik za javno zdravlje jer potiče nastanak i širenje bakterija otpornih na antibiotike. Gotovo kod svih patogenih bakterija uočeno je da su u stanju brzo razviti faktor rezistencije na antimikrobne lijekove, iz tog razloga su bakterije otporne na više lijekova uzrokovale glavni neuspjeh u liječenju zaraznih bolesti (Mill Robertson, 2015). Stoga su brojne biotehnoške i farmaceutske tvrtke u potrazi za novim inhibitornim spojevima koji se mogu razviti u nove antimikrobne lijekove. Posljednjih godina istraživane su biljke s velikim brojem sekundarnih spojeva koji bi mogli biti potencijalni izvor različitih antimikrobnih agenasa. Takve biljke sadrže brojne strukturno jedinstvene bioaktivne spojeve koji su dobar izvor za dobivanje prirodnih antimikrobnih lijekova (Mahmoud, 2004).

Među različitim spojevima na biljnoj bazi, resveratrol (3,5,4-trihidroksistilben), spoj prisutan u kožici grožđa, vinu i komini grožđa, čini se vrlo obećavajućim za terapijsku primjenu, među ostalim pokazuje i antimikrobno djelovanje. Nadalje, kurkumin, fitokemikalija dobivena iz kurkume, pokazuje antimikrobno djelovanje protiv brojnih bakterija. Korijander (*Coriandrum sativum* L.) je bogat vitaminima, dekanalom, nonanalom, linalolom i mnogim korisnim tvarima te djeluje protiv gotovo svih gram pozitivnih i negativnih bakterija. Listovi aloe vere (*Aloe vera* L.) su izvor sjajnih biološki aktivnih spojeva, poput antrona, antrakinona i raznih lektina te pokazuje potencijalno antifungalno, antivirusno i antibakterijsko djelovanje protiv kožnih infekcija, kao što su akne, herpes i svraba (Irshad, 2011).

Cilj ovog rada bio je procijeniti antimikrobno djelovanje eteričnog ulja mirte. Antimikrobna aktivnost je određena prema četrnaest test mikroorganizama i to sedam gram pozitivnih i gram negativnih bakterija, tri bakterije iz grupe bakterija mliječne kiseline (BMK) te četiri vrste kvasaca.

## 2. TEORIJSKI DIO

### 2.1. Eterična ulja

Eterična ulja su prirodni produkti koji se mogu opisati kao hlapljive smjese različitih spojeva, najčešće su to hlapljivi terpenški ugljikovodici (alifatskih i cikličkih) i odgovarajući izoprenoidni derivati s kisikom, alifatski i fenilpropanski spojevi, a nešto rjeđe i heterociklički spojevi sa sumporom i/ili dušikom te druge manje zastupljene supstancije (Miletić, 2020). Dobivaju se iz biljnih sirovina te su karakterističnog mirisa i okusa, uljne konzistencije pa samim time i teško topivi u vodi, no dobro su topivi u voskovima, biljnim uljima, koncentriranom etanolu i sličnim otapalima. Sposobnost stvaranja eteričnih ulja tipična je uglavnom za sjemenjače dok predstavnici nižih biljaka (talofita) nemaju to svojstvo. Fiziološka uloga eteričnog ulja je stvaranje mirisa koji privlači oprašivače te služi kao obrana od ostalih životinja. Isto tako smatra se da eterično ulje djeluje u smjeru smanjenja transpiracije jer se većina biljaka koje imaju sposobnost njegova stvaranja nalaze u tropskim krajevima. Najvažnije biljne porodice koje proizvode eterično ulje su: *Pinaceae*, *Lauraceae*, *Myrtaceae*, *Rutaceae*, *Lamiaceae*, *Apiaceae*, *Zingiberaceae*, *Piperaceae* i *Brassicaceae*. Najčešće sadrže najmanje 0,1 % eteričnog ulja, no te vrijednosti se najčešće kreću između 1 i 2 %, ali u nekim slučajevima sadržaj eteričnog ulja može biti čak do 20 % (Wagner, 1993). Od oko 300 dosad ispitanih biljnih porodica, više od 30 % sadrži eterično ulje. Istraživanja su pokazala da eterična ulja nastaju u biljnoj protoplazmi te spadaju pod biljne eksekrete, odnosno produkte desimilacije, a u samoj biljci su pohranjeni u cvjetovima, plodovima, listovima, korijenju, kori i podancima. Eterična ulja su smještena u posebnim morfološki diferenciranim spremnicima, histološki su lako prepoznatljiva za cijeli rod, pa čak i porodicu te se koriste kao pomoćno i dijagnostičko sredstvo u mikroskopskim istraživanjima pojedinih vrsta. Kao što je već navedeno, za dobivanje eteričnih ulja upotrebljavaju se različiti biljni dijelovi te kao takvi mogu se obrađivati u svježem, polusvježem i osušeno obliku, a to ovisi o kvaliteti, količini i vrsti eteričnog ulja te promjenama koje nastaju sušenjem i starenjem biljnog materijala.

Metode dobivanja eteričnih ulja ovise o vrsti biljnog materijala te isto tako i o svojstvima eteričnog ulja koje želimo dobiti. Prilikom izolacije potrebno je postići što veće iskorištenje, a dobiveni uzorak ne smije sadržavati nepoželjne primjese kao ni nečistoće iz otapala.

Postupci izdvajanja eteričnog ulja mogu se podijeliti u tri grupe:

1. Tiješnjenje - metoda koja je najpogodnija za izolaciju eteričnog ulja vrsta koje su iz roda *Citrus* zato što takva ulja gube na vrijednosti i kakvoći primjenom topline. Postupak se sastoji od bušenja biljke sitnim iglicama ili prešanja kako bi se mehanički razorio vanjski sloj epiderme ploda. Prilikom prešanja prvo izlazi voda, a zatim određeni udio ulja te je na taj način nemoguće postići potpuno iskorištenje. Dobiveni ekstrakt sadrži vodu i ulje te u prisutnosti onečišćenja i pektinskih tvari stvara rijetku emulziju, a sastoji se od hlapive i nehlapive faze (Kalodera i sur., 1998). Hlapiva faza je dominantna te sadrži spojeve kao što su esteri, monoterpeni i aldehidi, dok nehlapiva faza sadrži flavonoide, neke furanokumarine, masne kiseline, di-, tri- i tetraterpene. (Marković, 2005). Odvajanje ulja iz takve emulzije provodi se destilacijom vodenom parom, centrifugiranjem, dekantiranjem ili filtriranjem.
2. Destilacija - metoda koja se najčešće primjenjuje za izolaciju eteričnih ulja te se provodi vodom, vodenom parom ili pod vakuumom. Kod izolacije eteričnih ulja iz biljnih materijala kao što su listovi, cvjetovi, pupoljci i sl. nije potrebna predobrada, no kod materijala kao što su kora, korijenje i stabljika potrebno je prethodno usitniti materijal kako bi se skratio put izlaženja ulja. Dobiveni destilati sadrže samo hlapljive tvari te je na ovaj način moguće potpuno odjeljivanje hlapive od nehlapivih tvari koje mogu interferirati u kromatografskoj analizi (Petričić, 1983).
3. Ekstrakcija - primjenjuje se za izolaciju eteričnog ulja izravno iz biljnih materijala ili za njihovo odvajanje iz razrijeđene vodene otopine dobivene destilacijskom separacijom. Metoda se zasniva na odabiru pogodnog otapala koje se odabire na temelju polarnosti i vrelišta. Otapala koja se često upotrebljavaju za ekstrakcije su petroleter, heksan, toluol, metanol, etanol, a primjenjuju se i plinovi, npr. butan i ugljični dioksid, koji se pod tlakom daju prevesti u tekućinu. Ekstrakcija se primjenjuje najčešće za izolaciju eteričnih ulja iz biljnog materijala koji bi destilacija uništila, na primjer iz cvjetova te za izolaciju ulja koje je prisutno u materijalu u maloj količini. Postupak se provodi pri nižim temperaturama u odnosu na destilaciju te je zbog toga mogućnost promjene kemijskog sastava ulja znatno umanjena ili potpuno isključena. Sam miris eteričnog ulja dobivenog ekstrakcijom najbliži je prirodnom mirisu (Kalodera i sur., 1998).



Obzirom na samu složenost dobivanja eteričnih ulja te toga da se iz velike količine biljnog materijala dobiva tek neznatna količina eteričnog ulja ona se izdvajaju od ostalih biljnih ekstrakata prvenstveno po mirisnim osobinama te cijeni. Eterična ulja koja se koriste u aromaterapiji moraju biti kemijski i botanički definirana. Kemijska definicija podrazumijeva točno naveden udio određenih molekula u eteričnom ulju izražen u postocima, koji je prethodno određen kemijskom analizom. Botanički definirana ulja podrazumijevaju točno određenu vrstu, eventualno i podvrstu te dio biljke iz kojega su dobivena jer botaničke karakteristike imaju veliki utjecaj na kemijski sastav ulja (Marković, 2005).

### 2.1.1. Kemijski sastav eteričnih ulja

Utvrđeno je da u sastav različitih eteričnih ulja ulazi više od 500 kemijskih spojeva dok pojedina mogu sadržavati i više od 50 spojeva. No, u većini eteričnih ulja prevladava jedna komponenta u tolikoj mjeri da određuje njegova fizikalna i kemijska svojstva te farmakološko djelovanje. Sastav eteričnih ulja čine različite grupe organskih spojeva: ugljikovodici, alkoholi, fenoli, aldehidi, ketoni, karboksilne kiseline, esteri, eteri, laktoni i dr. (Petričić, 1983).

Većina eteričnih ulja kao glavne sastavnice koje mu daju miris sadrži terpene. Terpeni su polimeri nastali kondenzacijom izoprenskih jedinica ( $C_5H_8$ ). Biosinteza terpena u biljci je stereoselektivna pa su takva eterična ulja optički aktivna dok kod kemijski doradivanih ulja to nije slučaj. U sastav eteričnih ulja ulaze monoterpeni ( $C_{10}$ ) i seskviterpeni ( $C_{15}$ ) te uz njih se također nalaze i diterpeni ( $C_{20}$ ), triterpeni ( $C_{30}$ ) i tetraterpeni ( $C_{40}$ ). Monoterpeni su nezasićeni kondenzacijski produkt dviju izoprenskih jedinica te sadrže 10 ugljikovih atoma. Za eterična ulja specifično je 150 različitih monoterpena koji mogu biti aciklički (npr. linalol), monociklički (npr. timol, limonen) ili biciklički (npr. kamfen). Seskviterpeni se sastoje od triju izoprenskih jedinica i 15 ugljikovih atoma, a to su primjerice aciklički seskviterpen farnezol, monociklički bisabolen te biciklički  $\alpha$ - kadinen (Kuštrak, 2005).

### 2.1.2. Antimikrobno djelovanje eteričnih ulja

Primjena eteričnih ulja prije se temeljila isključivo na tradiciji i iskustvima narodne medicine, no u današnje vrijeme za mnoga eterična ulja postoje i znanstvena istraživanja koja potvrđuju njihovo djelovanje (Amensour i sur., 2010). Većina eteričnih ulja primijenjenih u odgovarajućim koncentracijama djeluje inhibitorno na mikroorganizme. Poznato je njihovo antibakterijsko, antifungalno, a uočeno je i antivirusno djelovanje.

Općenito, postoji šest mogućih mehanizama antimikrobnog djelovanja, koji uključuju: dezintegraciju citoplazmatske membrane, interakciju s membranskim proteinima (ATPaze i drugi), poremećaj vanjske membrane gram negativnih bakterija s oslobađanjem lipopolisaharida, destabilizaciju protonske pokretačke sile, koagulaciju staničnog sadržaja i inhibiciju sinteze enzima (Amensour i sur., 2010; Burt, 2004)

Fenoli u eteričnim uljima se smatraju odgovornim za antibakterijsko djelovanje eteričnih ulja koje je između ostalog i najpoznatije antimikrobno svojstvo. Djelovanje fenola ovisi o primijenjenoj koncentraciji, pa tako pri nižim djeluje na enzime uključene u proizvodnju energije, a pri višim denaturiraju proteine. Gram-negativne bakterije su zbog posjedovanja hidrofilnog lipopolisaharidnog omotača manje osjetljive na djelovanje eteričnih ulja u odnosu na gram-pozitivne bakterije (Burt, 2004).

Za antifungalnu aktivnost signifikantan je utjecaj na strukturu stanične membrane, blokiranje njezine izgradnje, inhibiranja klijanja spora, rasta micelija te staničnog disanja što konačno za posljedicu ima smrt stanice mikroorganizma (Harris i sur., 2002).

Osim toga, eterična ulja denaturiraju virusne strukturne proteine ili glikoproteine. Pretpostavka je da eterična ulja interferiraju s virusnom ovojnicom, inhibiraju specifične faze replikacije ili da sprječavaju difuziju virusa u stanicu domaćina tako što djeluju na virusne sastojke potrebne za apsorpciju i ulazak u stanicu (Saddi i sur., 2007).

Osim komponenti prisutnih u najvećoj koncentraciji pri antibakterijskom djelovanju svoju važnost su pokazale i sastavnice prisutne u tragovima zbog mogućeg sinergističkog učinka s ostalim komponentama. Iz tog razloga eterična ulja u svom punom sastavu imaju izraženija antimikrobna svojstva u odnosu na pojedinačne glavne komponente. Eterična ulja dobra su zamjena sintetskim konzervansima upravo zato što se sastoje od mnogo komponenata koje imaju različite mehanizme djelovanja, dok antibiotici imaju jednu aktivnu tvar na kojoj se

temelji njihov mehanizam djelovanja. Zbog toga je bakterijama teško razviti rezistenciju na eterična ulja (Burt, 2004).

## 2.2. Mirta (*Myrtus communis* L.)

Mirta (*Myrtus communis* L.) je ljekovita endemska vrsta porodice *Myrtaceae* porijeklom je iz južne Europe, sjeverne Afrike i zapadne Azije, a rasprostranjena je i u Južnoj Americi, sjeverozapadnoj Himalaji, Australiji, cijelom mediteranskom području te se uzgaja u vrtovima posebice u sjeverozapadnoj indijskoj regiji zbog svojih mirisnih cvjetova. Raste kao zimzelena sklerofilna grm ili malo stablo, visine 1,8 - 2,4 m, s malim lišćem i ispucanom korom (Mendes i sur., 2001). Karakteriziraju je grane koje tvore blisku punu glavicu, gusto prekrivenu jajolikim ili kopljastim zimzelenim listovima dugim 3-5 cm koji sadrže tanine, flavonoide i hlapljiva ulja (Baytop, 1999). Ova vrsta je vrlo aromatična zbog visokog sadržaja eteričnog ulja u žlijezdama lišća, cvjetova i ploda. Ima pojedinačne pazušne bijele ili ružičaste cvjetove zvjezdastog oblika s pet latica i mnoštvom prašnika. Plod je u obliku bobice s više sjemenki koja je kuglastog oblika tamnocrvene do ljubičaste boje (Mahmoud i sur., 2010).

### 2.2.1. Kemijski sastav eteričnog ulja mirte

Sastav eteričnog ulja *Myrtus communis* L. i koncentracija prisutnih komponenata ovisi o dijelovima biljke koji se koriste za pripremu te fazi zrenja kao i o primijenjenoj metodi dobivanja eteričnog ulja iz biljke. Spojevi eteričnog ulja mirte mogu se klasificirati u tri glavne kategorije: terpeni (monoterpeni ugljikovodici i seskviterpeni ugljikovodici), terpenoidi (oksigenirani monoterpeni i oksigenirani seskviterpeni) i fenilpropanoidi (Andrade i sur., 2011), ali i u ugljikovodike i oksigenirane spojeve. Iako su monoterpeni dominantni u eteričnim uljima (70-90 %), raspodjela oksigeniranih monoterpena i monoterpenih ugljikovodika varira. Wannes i suradnici (2010) pokazali su da u listovima dominiraju monoterpeni ugljikovodici, a slijede oksigenirani monoterpeni. U stabljikama dominiraju oksigenirani monoterpeni, zatim monoterpeni ugljikovodici i seskviterpeni ugljikovodici. Prema njima, cvijet karakterizira visoka razina monoterpenih ugljikovodika i oksigeniranih monoterpena sa znatnim postotkom fenilpropanoida. Glavne komponente eteričnog ulja iz listova su  $\alpha$ -pinen,

1,8-cineol i  $\beta$ -pinen, a iz cvjetova isto tako  $\alpha$ -pinen i 1,8-cineol te uz njih i druge komponente uključujući limonen, eugenol,  $\alpha$ -terpineol, linalol i metil eugenol. 1,8-cineol je dominantna komponenta u eteričnom ulju stabljike, a slijede ga  $\alpha$ -pinen, E- $\beta$ -ocimen i linalol (Wannes i sur., 2010). Analiza eteričnog ulja ploda mirte pokazala je da su glavni monoterpenski spojevi 1,8-cineol, geranil acetat, linalol i  $\alpha$ -pinen (Wannes i sur., 2009). Fenilpropeni čine relativno mali dio eteričnih ulja mirte, a oni koji su najdublje istraženi su eugenol, izoeugenol, vanilin, safrol i cinamaldehyd.

Kao što je opisano sastav spojeva varira, no glavni konstituenti eteričnog ulja mirte su terpenoidi: mirtenol, mirtenol acetat, limonen, linalol,  $\alpha$ -pinen, 1,8-cineol,  $\alpha$ -kariofilenin, kao i p-cimen, geraniol, nerol te fenilpropanoid metileugenol (Messaoud i sur., 2012; Wannes i sur., 2009).

## 2.2.2. Tradicionalna primjena i antimikrobno djelovanje eteričnog ulja mirte

Mirta se tradicionalno koristila kao začim i ljekovito sredstvo. Zbog svoje gorčine i intenzivnog okusa, unatoč ugodnom mirisu kulinarska primjena ograničena je na regije podrijetla poput Italije gdje se hrana začinjava dimom mirte (Gortzi i sur., 2008), a u Sardiniji se koristi za proizvodnju dobro poznatih likera Mirto Rosso i Mirto Bianco (Messaoud i sur., 2012). U prehrambenoj industriji mirta je svoju primjenu pronašla u aromatiziranju mesa i umaka (Chalchat i sur., 1998), a bobice i lišće koristi se uglavnom za industrijsku formulaciju slatkih pića s reklamiranim probavnim svojstvima. Kao ljekovito sredstvo mirta se tradicionalno u Turskoj koristila kao antiseptik i protuupalno sredstvo (Baytop, 1999), a slično i u talijanskoj narodnoj medicini plodovi su se koristili u liječenju mnogih vrsta zaraznih bolesti uključujući proljev i dizenteriju te kao tekućina za ispiranje usta i u liječenju kandidijaze (Gortzi i sur., 2008). Infuzije od lišća i mladih grana smatraju se zdravstvenim lijekom za astmu, ekcem, psorijazu, proljev, gastrointestinalne smetnje i mokraćne infekcije (Ziyyat i sur. 1997). Čajevi od lišća koriste se za pranje rodnice, klistire i protiv bolesti dišnih puteva, dok se čaj od plodova koristi kao sredstvo protiv proljeva, hemoroida i u liječenju bolesti usta i očiju (Ziyyat i sur. 1997). Cvijeće se tradicionalno koristi za pripremu losiona protiv proširenih vena.

Upravo zbog svojih ljekovitih svojstava eterična ulja *Myrtus communis* L. istraživana su kako bi se procijenila njihova sposobnost inhibicije rasta različitih patogenih mikroorganizama te u konačnici poslužila kao alternativa konvencionalnim antibioticima.

Amensour i suradnici su 2010. godine zaključili da eterična ulja i ekstrakti mirte utječu na propusnost bakterijske stanične stijenke i stanične membrane, što dovodi do oslobađanja unutarstaničnog sadržaja izvan stanice te to može biti popraćeno poremećajem u funkciji membrane kao što je prijenos elektrona, aktivnost enzima ili apsorpcija hranjivih tvari. Isto tako pokazalo se da komponente eteričnih ulja (eugenol,  $\alpha$ -terpineol i  $\gamma$ -terpinen) imaju baktericidni učinak na gram-pozitivne i gram-negativne bakterije narušavajući njihov membranski sustav. Hidrofobnost, koja je bitna karakteristika eteričnih ulja, omogućuje razgradnju lipida stanične membrane bakterije, remeteći staničnu strukturu i čineći ih propusnijima. Općenito, kao što vrijedi i za većinu eteričnih ulja, navodi se da su gram-negativne bakterije otpornije na ekstrakte i eterična ulja mirte od gram-pozitivnih. Ova otpornost se povezuje s činjenicom da gram-negativne bakterije imaju peptidoglikanski sloj povezan s vanjskom kompleksnom membranom, što usporava prolazak hidrofobnih spojeva eteričnih ulja. Smatra se da flavonoidi imaju sposobnost stvaranja kompleksa s izvanstaničnim topivim proteinima i staničnom stijenkom bakterija (Amensour i sur., 2010). Katehini imaju antibakterijsko djelovanje koje djeluje preko inhibicije DNA-giraze. Stvarno je dokazano specifično vezanje odabranih katehina za N-terminalni fragment giraze B (Gradisar i sur., 2007). Nadalje, katehini mogu obnoviti osjetljivost bakterija na antibiotike kao što su tetraciklin, beta-laktami i inhibitori beta-laktamaze.

Liječenje gljivičnih infekcija je dosta problematično zato što postoji ograničen broj antifungalnih lijekova te je na njih već razvijena otpornost, značajan je rizik infekcija i skupo je (Khan i sur., 2010, 2003). Stoga je potrebno otkriti nova antifungalna sredstva za suzbijanje sojeva koji izražavaju rezistenciju na dostupne antifungalne lijekove. Upravo jedan od prirodnih proizvoda koji se koristi kao terapeutsko sredstvo protiv kvasaca je mirta. Antifungalna aktivnost eteričnog ulja mirte testirana je protiv različitih *Candida* vrsta, a minimalne inhibitorne koncentracije bile su u rasponu od 2-4  $\mu\text{l ml}^{-1}$  (Cannas i sur., 2013). Antifungalni učinak mirte može se pripisati fenolnim spojevima za koje je poznato da uzrokuju oštećenje staničnih membrana, uzrokujući curenje staničnog materijala i na kraju smrt mikroorganizama. Nagađa se da je antifungalno svojstvo mirte povezano s visokim sadržajem polifenola i oksigeniranih monoterpena. Načini antifungalnog djelovanja prilično su slični

onima koji su opisani za bakterije, u pogledu nepovratnog oštećenja stanične membrane i koagulacije staničnog sadržaja, a osim toga postoje i dodatne pojave koje su također važne kada se u obzir uzmu kvasci. To su uspostavljanje pH gradijenta preko citoplazmatske membrane te blokiranje proizvodnje energije kvasca što dovodi do poremećaja stanične membrane (Cox i sur. 2001).

Najpoznatiji antivirusni spoj koji proizvode mnoge biljke uključujući *Myrtus communis* L. je  $\alpha$ -kariofilen. Smatra se da će daljnja karakterizacija aktivnih sastojaka otkriti više korisnih antivirusnih spojeva (Djilani i Dicko, 2012).

### **3. EKSPERIMENTALNI DIO**

#### **3.1. Materijali**

##### **3.1.1. Ekstrakti mirte korišteni za određivanje antimikrobne aktivnosti**

U radu je provedeno *in vitro* određivanje antimikrobne aktivnosti tri ekstrakta mirte disk-difuzijskom metodom. Ekstrakti su pripremljeni u suradnji s Kabinetom za projektiranje, Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu. Listovi i plodovi mirte (*Myrtus communis* L.) nasumično su sakupljeni u veljači 2021. s biljaka koje rastu u divljem i ekološki čistom okruženju na otoku Mljetu. Sušeni su na sobnoj temperaturi do konstantne težine te nakon toga lagano izmljeveni u laboratorijskom mlinu s električnim noževima i propušteni kroz sito od 5 mm. Sastav ekstrakata i način njihove pripreme ukratko su opisani u Tablici 1.

**Tablica 1.** Opis ekstrakata

<b>Redni broj ekstrakta</b>	<b>Dio biljke uzet za pripremu ekstrakta</b>	<b>Metoda pripreme ekstrakta</b>	<b>Kratak opis metode pripreme</b>
1	Listovi	Hidrodestilacija	Eterično ulje dobiveno je hidrodestilacijom 20 g samljevenog lišća mirte s 200 mL vode u aparaturi tipa Clevenger prema Europskoj farmakopeji. Vrijeme destilacije je 90 minuta. Nakon mjerenja volumena, eterično ulje je sakupljeno u bočicu, osušeno bezvodnim natrijevim sulfatom, prebačeno u drugu bočicu i pohranjeno na -18 °C do analize.
3	Plodovi	Superkrična fluidna ekstrakcija	Uz korištenje ugljikovog dioksida kao nepolarnog otapala na superkričnom fluidnom ekstraktoru (SFE 100 mL, Extratex, Francuska) proizveden je lipofilni ekstrakt bobica mirte pri uvjetima: tlak 340 bara, protok plina 20 g/min i temperatura 41 °C; vrijeme ekstrakcije iznosilo je 2 h.
4	Listovi	Vodeno-alkoholna ekstrakcija	Vodeni ekstrakt lista mirte se proizveo u vakuum ekstraktoru (Pilotech, YC-05 5 L, Kina) pri 60 °C u trajanju od 30 min. 300 g osušenog i samljevenog biljnog materijala ekstrahirano je s 3 L 30 %-tnog etanola. Dobiveni ekstrakt je profiltriran i centrifugiran na 5000 o/min u trajanju od 10 min (Hettich, Tuttlingen, Njemačka). Kako bi se uklonio etanol, ekstrakt je uparen (Heidolph Instruments GmbH & Co. KG, Schwabach, Njemačka) do udjela suhe tvari od 5 %.

### 3.1.2. Test mikroorganizmi

U svrhu određivanja antimikrobne aktivnosti ekstrakata mirte odabrano je 14 mikrobnih vrsta - test mikroorganizama od toga sedam gram pozitivnih i gram negativnih bakterija, tri bakterije iz grupe bakterija mliječne kiseline (BMK) te četiri vrste kvasaca (Tablica 2).

**Tablica 2.** Test mikroorganizmi i njihove vrste

<b>Gram pozitivne bakterije</b>	<i>Staphylococcus aureus</i>
	<i>Bacillus subtilis</i>
	<i>Enterococcus faecium</i>
	<i>Listeria monocytogenes</i>
<b>Gram negativne bakterije</b>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
	<i>Escherichia coli</i>
	<i>Salmonella enterica</i> s. Typhimurium
<b>Bakterije mliječne kiseline</b>	<i>Lactobacillus brevis</i> - 62
	<i>Lactobacillus plantarum</i> -73
	<i>Lactobacillus kimchi</i> 12
<b>Kvasci</b>	<i>Candida albicans</i>
	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
	<i>Candida utilis</i>
	<i>Rhodotorula</i> sp.

Korištene bakterijske i kvaščeve kulture pripadaju Zbirci mikroorganizama Laboratorija za tehnologiju vrenja i kvasca Zavoda za prehrambeno tehnološko inženjerstvo Prehrambeno–biotehnološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu, a kao trajne kulture čuvaju se u Laboratoriju za opću mikrobiologiju i mikrobiologiju namirnica istog fakulteta. Gram-pozitivne i gram-negativne bakterijske vrste imaju optimalnu temperaturu rasta pri temperaturi 37 °C, dok je optimalna temperatura rasta bakterija mliječne kiseline 32 °C i kvasaca 28 °C.



### 3.1.3. Hranjive podloge

Pri određivanju antimikrobne aktivnosti u ovom radu korištene su sljedeće hranjive podloge: hranjive podloge za održavanje i uzgoj bakterija te hranjive podloge za održavanje i uzgoj kvasaca.

#### 1) Hranjive podloge za održavanje i uzgoj bakterija:

1. Mueller-Hinton agar, MHA (Biolife, Milano, Italija) čiji je sastav definiran tablicom 3:

**Tablica 3.** Sastav Mueller-Hinton agara

Sastojci	g L <sup>-1</sup> destilirane vode
Mesni ekstrakt	2,0
Kiseli hidrolizat kazeina	17,5
Škrob	1,5
Agar	17,0

Priprema hranjive podloge: 38 g MHA otopi se u 1 L destilirane vode, otopina se zagrije do potpunog otapanja te se sterilizira u autoklavu pri 121 °C tijekom 15 minuta. Nakon sterilizacije, MHA ohlađen na temperaturu oko 55 °C razlije se u sterilne Petrijeve zdjelice. Tako pripremljene i ohlađene Petrijeve zdjelice čuvaju se do korištenja u hladnjaku pri +4 °C.

2. Mueller-Hinton bujon (MHB) istog sastava kao MHA samo bez dodatka agara
3. MRS (Man – Rogosa – Sharpe) podloga čiji je sastav definiran tablicom 4:

**Tablica 4.** Sastav MRS podloge

Sastojci	g L <sup>-1</sup> destilirane vode
Glukoza	20
Mesni ekstrakt	10
Kazein hidrolat	10
Kvašćev ekstrakt	10
Kalijev hidrogenfosfat	5
Amonijev citrat	2
Natrijev acetat	2
MnSO <sub>4</sub> × 4 H <sub>2</sub> O	0,05
MgSO <sub>4</sub> × 7 H <sub>2</sub> O	0,1
Tween 80	1
Agar	20

Priprema hranjive podloge: sastojci se pomiješaju u navedenim količinama u 1 L destilirane vode, otopina se zagrije do potpunog otapanja te se sterilizira u autoklavu pri 121 °C tijekom 15 minuta. Nakon sterilizacije, MRS agar ohlađen na temperaturu oko 55 °C razlije se u sterilne Petrijeve zdjelice. Tako pripremljene i ohlađene Petrijeve zdjelice čuvaju se do korištenja u hladnjaku pri +4 °C.

## 2) Hranjive podloge za održavanje i uzgoj kvasaca:

1. Mueller-Hinton agar, MHA (Biolife, Milano, Italija) čiji je sastav defitniran tablicom 5:

**Tablica 5.** Sastav Mueller-Hinton agara za kvasce

Sastojci	g L <sup>-1</sup> destilirane vode
Mesni ekstrakt	2,0
Kiseli hidrolizat kazeina	17,5
Škrob	1,5
Agar	17,0
Glukoza	20,0

Priprema hranjive podloge: 38 g MHA otopi se u 1 L destilirane vode, otopina se zagrije do potpunog otapanja te se sterilizira u autoklavu pri 121 °C tijekom 15 minuta. Nakon sterilizacije, MHA ohlađen na temperaturu od oko 55 °C razlije se u sterilne Petrijeve zdjelice. Tako pripremljene i ohlađene Petrijeve zdjelice čuvaju se do korištenja u hladnjaku pri +4 °C.

#### 3.1.4. Kemikalije

Sve kemikalije korištene pri radu bile su visoke analitičke (p.a.) čistoće.

1) Kemikalije korištene za određivanje antimikrobne aktivnosti:

- antimikrobni disk papirići s kanamicinom 50 µg (Biolab Inc., Budimpešta, Mađarska)
- antimikrobni disk papirići s nistatinom 100 µg (Biolab Inc., Budimpešta, Mađarska)
- Cycloheximide (Actidione) solution (Fluka, Sigma-Aldrich, Njemačka)
- DMSO, dimetilsulfoksid, (Lach-Ner, s.r.o., Továrni, Češka)
- sterilna voda
- destilirana voda

#### 3.1.5. Uređaji

- autoklav (Sutjeska, Jugoslavija)
- termostat (Termo medicinski aparati Bodalec, Republika Hrvatska)
- vibromješač, MS 3 digital (IKA, SAD)
- analitička vaga, Mettler (E. Mettler Zürich, Švicarska)
- spektrofotometar, Specord 50 plus (Analytik Jena, Njemačka)
- mikrobiološki zaštitni kabinet (Klimaoprema, Zagreb, Republika Hrvatska)
- hladnjak sa zamrzivačem (Končar, Republika Hrvatska)

### 3.1.6. Pribor

- automatske pipete (Eppendorf, Hamburg, Njemačka)
- trbušaste pipete
- plastična posuda za odlaganje otpadnog materijala
- mikrobiološka ušica
- Erlenmeyerove tikvice
- mikrobiološke epruvete (16x160 mm, 18x180 mm)
- mikroepuvete (2 mL)
- Petrijeve zdjelice (Ø 90 mm)
- laboratorijske čaše
- laboratorijski stalci
- kivete za spektrofotometrijsko mjerenje
- odmjerne tikvice

## 3.2. Metode

### 3.2.1. Čuvanje mikroorganizama

Test mikroorganizmi se čuvaju na odgovarajućem kosom agaru pri +4 °C. Sve vrste test mikroorganizama trajno su pohranjene pri - 70°C uz dodatak 50% (v/v) glicerola.

### 3.2.2. Priprava prekonoćnih kultura mikroorganizama

Pri izradi ovog rada koriste se revitalizirane i identificirane čiste kulture bakterija i kvasaca koje se aseptičnim postupkom s hranjivog agara precijepe pomoću mikrobiološke ušice u 5 mL odgovarajućeg hranjivog bujona. Tako pripremljene kulture inkubiraju se u termostatu tijekom 24 h pri 37 °C odnosno 32 °C za bakterije, te 28 °C za kvasce.

### 3.2.3. Priprava suspenzije test mikroorganizama

U epruvete u koje je prethodno dodano 5 mL sterilne vode prenese se 500  $\mu$ L pripremljenih prekonoćnih kultura test mikroorganizama. Sadržaj u epruvetama zatim se homogenizira i odredi mu se vrijednost optičke gustoće pri valnoj duljini od 550 nm. Ciljana vrijednost apsorbancije bakterijskih i kvašćevih suspenzija pri 550 nm jest 0,125 što, prema McFarland standardu prikazanom u tablici 6, odgovara koncentraciji oko  $1,5 \times 10^8$  st/mL.

**Tablica 6.** McFarlandova ljestvica i njezini standardi

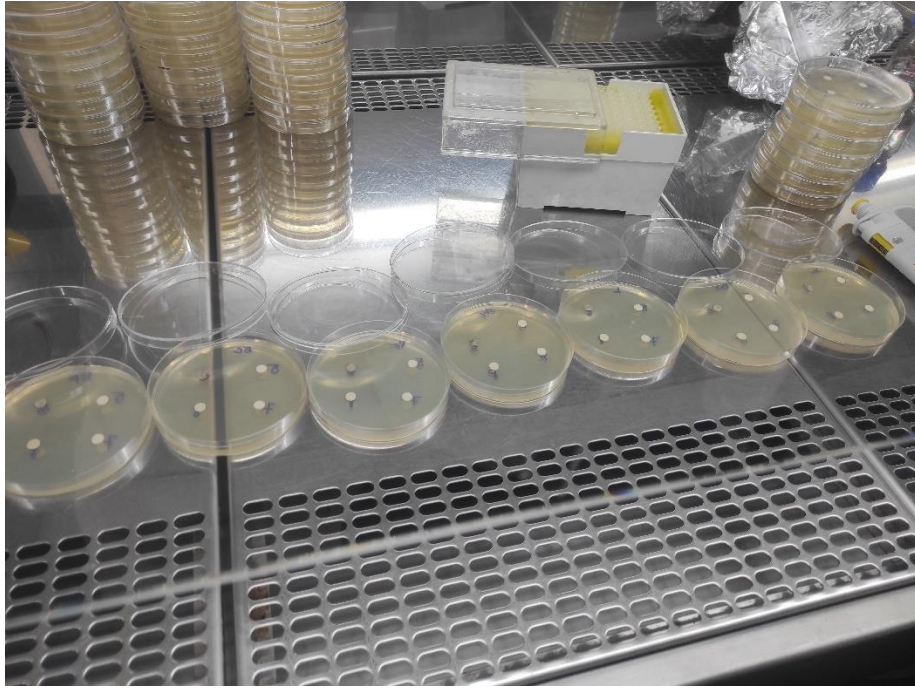
<b>Standard</b>	<b>Koncentracija mikrobnih stanica* (<math>\times 10^8</math> st <math>\text{ml}^{-1}</math>)</b>	<b>Teorijska optička gustoća ** pri 550 nm</b>
0,5	1,5	0,125
1	3	0,25
2	6	0,5
3	9	0,75
4	12	1,00
5	15	1,25

\*Koncentracija mikroorganizama ovisi o njihovoj veličini, a brojevi prikazuju prosječnu vrijednost.

\*\*Vrijednosti odgovaraju optičkoj gustoći suspenzije mikroorganizama.

### 3.2.4. Određivanje antimikrobne aktivnosti disk difuzijskom metodom

Antimikrobna aktivnost ekstrakata mirte određivana je disk difuzijskom metodom. Disk difuzijska metoda pouzdana je te uobičajeno korištena metoda određivanja antimikrobne aktivnosti spojeva (Balouiri i sur., 2016). Omogućuje utvrđivanje osjetljivosti mikroorganizama na više agenasa ili istovremeno na više različitih koncentracija istog agensa te je jednostavna, jeftina i brza metoda. Otopine, pribor i posuđe korišteno pri određivanju antimikrobnih svojstava prethodno je sterilizirano te su svi postupci određivanja provedeni u mikrobiološkom zaštitnom kabinetu (slika 1.)



**Slika 1.** Priprema ploča za određivanje antimikrobne aktivnosti tj. aplikacija diskova na površinu agara prethodno nacijepljenu test mikroorganizmom (vlastita fotografija)

#### Princip metode:

Disk difuzijska metoda određivanja antimikrobne aktivnosti službena je metoda određivanja antimikrobne osjetljivosti u mnogim kliničkim mikrobiološkim laboratorijima (Balouiri i sur., 2016). Ova metoda temelji se na određivanju promjera zone inhibicije koja se pojavljuje oko diska natopljenog ispitivanim spojem koji je postavljen na čvrstu hranjivu podlogu prethodno inokuliranu test mikroorganizmom. Medij u kojem rastu patogeni, temperatura, vrijeme inkubacije i koncentracija mikroorganizama određeni su prema CLSI (engl. The Clinical & Laboratory Standards Institute) standardima. Prednosti ove metode su jednostavnost pri izvođenju, mogućnost istovremenog ispitivanja većeg broja uzoraka, ekonomska isplativost i relativno jednostavno očitavanje rezultata. Rezultati ove metode su kvalitativni i omogućavaju razvrstavanje test mikroorganizama na osjetljive, umjereno osjetljive ili rezistentne u odnosu na korišteno antimikrobno sredstvo (Balouiri i sur., 2016). Međutim, ovom metodom ne mogu se odrediti bakteriostatski ili baktericidni učinka kao ni minimalne inhibitorne koncentracije (MIC).

Na promjer zone inhibicije osim osjetljivosti mikroorganizama na ispitivani spoj utječe i niz drugih faktora:

- izbor podloge i njezina debljina
- sastav podloge - sastav mineralnih tvari, koji može varirati u podlogama.
- količina inokuluma i rast mikroorganizama - idealna količina inokuluma je ona koja daje jednoličan i gust rast bez prerastanja podloge mikroorganizmima.
- difuzijska svojstva ispitivanih spojeva - na stupanj difuzije pojedinog agensa utječe njegova koncentracija, molekulska masa, pH, ionizacija i vezanje na podlogu.

#### Postupak određivanja:

Pripremljene homogenizirane suspenzije čiste mikrobne kulture test mikroorganizma naciepljuje se na prethodno nanešeni sloj Mueller - Hintonovog agara, odnosno Man – Rogosa – Sharpe agara (debljine 4 mm) u Petrijevoj zdjelici pomoću vatenog štapića namočenog u suspenziju test mikroorganizma. Kulture se naciepljuju unutar 15 minuta od pripreme bakterijske suspenzije. Potrebno je ravnomjerno nanijeti inokulom na površinu agara, razmazivanjem u tri smjera. Zatim se na agar pomoću sterilne pincete postavljaju 4 dijagnostička filter diska promjera 6 mm. Diskove treba postaviti na površinu agara unutar 15 minuta od inokulacije te disk mora jednakomjerno, cijelom površinom prijanjati uz agar, a njihov raspored mora osiguravati dobro vidljive zone inhibicije, jasne za očitavanje i bez preklapanja zona inhibicije. Na diskove se zatim aplicira 10  $\mu$ L jednog od pripremljenih ekstrakata mirte te pozitivna kontrola (kanamicin ili nistatin). Nakon postavljanja diskova, Petrijeva zdjelica se stavlja u hladnjak na 20 minuta kako bi antimikrobne tvari počele difundirati u hranjivu podlogu i potom se inkubira u termostatu pri 37 °C, 32 °C odnosno 28 °C, ovisno o vrsti test mikroorganizma. Nakon završetka inkubacije, rezultati se očitavaju mjerenjem inhibicijske zone izražene u mm oko svakog diska. Za svaki spoj i test mikroorganizam provedene su analize u paralelama.

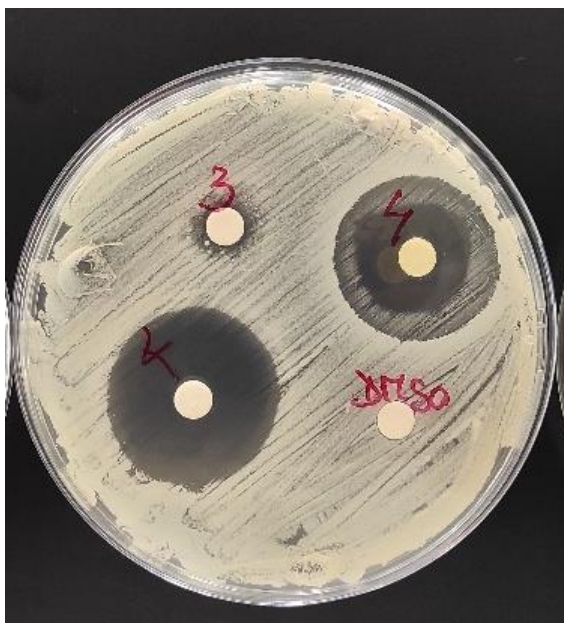
#### 4. REZULTATI I RASPRAVA

Svrha provedenog istraživanja je bila odrediti imaju li i u kojoj mjeri ekstrakti eteričnog ulja *Myrtus communis* L. navedenih u tablici 1 antimikrobnu aktivnost. Za ispitivanje antimikrobne aktivnosti *in vitro* odabrana je disk-difuzijska metoda mjerenjem zona inhibicije rasta test mikroorganizama, na način kako je opisano u metodama rada. Rezultati su prikazani u tablicama 7-10 te slikama 2 i 3.

**Tablica 7.** Promjer (mm) zona inhibicije rasta gram-pozitivnih bakterija antimikrobnom aktivnošću ekstrakata eteričnog ulja mirte u usporedbi sa zonama inhibicije negativne kontrole DMSO te pozitivne kontrole otopine kanamicina ( $10 \text{ mg L}^{-1}$ )

TEST MIKRO- ORGANIZAM	Ekstrakti eteričnog ulja mirte/ $10 \mu\text{L}$			DMSO/ $10 \mu\text{L}$	Kanamicin otopina ( $10 \text{ mg L}^{-1}$ )/ $5 \mu\text{L}$
	1	3	4		
<i>Staphylococcus aureus</i>	$18,75 \pm 0,35$	$12,25 \pm 0,35$	$19,75 \pm 3,18$	nd	$30,25 \pm 1,77$
<i>Bacillus subtilis</i>	$12 \pm 2,12$	$8,75 \pm 0,35$	$11,5 \pm 4,94$	nd	$22,25 \pm 11,67$
<i>Enterococcus faecium</i>	$9,75 \pm 0,35$	$10 \pm 4,24$	$25 \pm 2,12$	nd	$21,5 \pm 2,83$
<i>Listeria monocytogenes</i>	$20,75 \pm 4,60$	$7,75 \pm 1,77$	$35,25 \pm 0,35$	nd	$32,5 \pm 4,95$





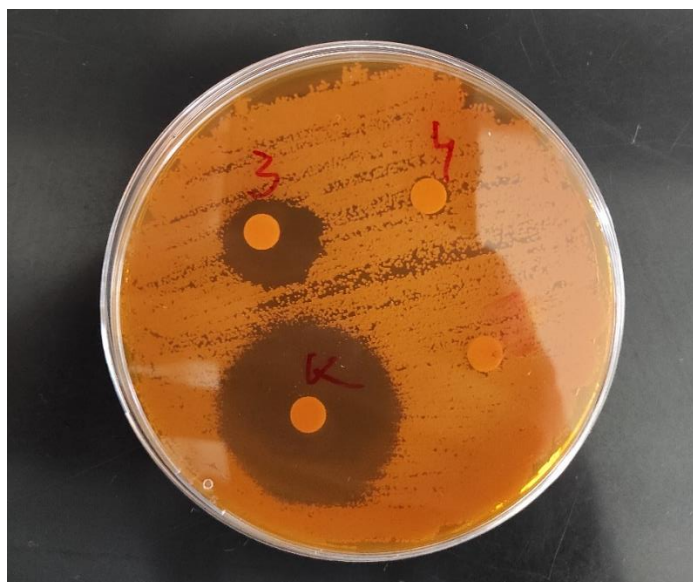
**Slika 2.** Prikaz zona inhibicije rasta bakterije *Staphylococcus aureus* primjenom ekstrakata 3 i 4 eteričnog ulja mirte u usporedbi sa zonama inhibicije negativne kontrole DMSO te pozitivne kontrole otopine kanamicina ( $10 \text{ mg L}^{-1}$ )

**Tablica 8.** Promjer (mm) zona inhibicije rasta gram-negativnih bakterija antimikrobnom aktivnošću ekstrakata eteričnog ulja mirte u usporedbi sa zonama inhibicije negativne kontrole DMSO te pozitivne kontrole otopine kanamicina ( $10 \text{ mg L}^{-1}$ )

TEST MIKRO- ORGANIZAM	Ekstrakti eteričnog ulja mirte/ $10 \mu\text{L}$			DMSO/ $10 \mu\text{L}$	Kanamicin otopina ( $10 \text{ mg L}^{-1}$ )/ $5 \mu\text{L}$
	1	3	4		
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	$16 \pm 5,65$	$8 \pm 2,83$	$8,75 \pm 3,18$	nd	$32 \pm 4,24$
<i>Escherichia coli</i>	$28 \pm 2,83$	$9,5 \pm 0,71$	$35,75 \pm 8,13$	nd	$40,5 \pm 0,71$
<i>Salmonella enterica s. Typhimurium</i>	$8,5 \pm 0,71$	$8 \pm 1,41$	$6,5 \pm 0,71$	nd	$23,25 \pm 2,47$

**Tablica 9.** Promjer (mm) zona inhibicije rasta kvasaca antimikrobnom aktivnošću ekstrakata eteričnog ulja mirte u usporedbi sa zonama inhibicije negativne kontrole DMSO te pozitivne kontrole nistatina (5 mg mL<sup>-1</sup>)

TEST MIKRO- ORGANIZAM	Ekstrakti eteričnog ulja mirte/ 10 µL			DMSO/ 10 µL	Nistatin (5 mg mL <sup>-1</sup> )/ 10 µL
	1	3	4		
<i>Candida albicans</i>	15,25 ± 4,60	19,5 ± 3,54	nd	nd	17 ± 0,00
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	18 ± 11,31	11,25 ± 3,18	23,75 ± 25,10	nd	25 ± 22,63
<i>Candida utilis</i>	20,5 ± 2,12	20 ± 0,00	nd	nd	25 ± 0,00
<i>Rhodotorula sp.</i>	10,25 ± 6,01	21,25 ± 3,89	nd	nd	21 ± 0,00



**Slika 3.** Prikaz zona inhibicije rasta kvasca *Rhodotorula sp.* primjenom ekstrakata broj 3 i 4 eteričnog ulja mirte u usporedbi sa zonama inhibicije negativne kontrole DMSO te pozitivne kontrole nistatina (5 mg mL<sup>-1</sup>)

**Tablica 10.** Promjer (mm) zona inhibicije rasta bakterija mliječne kiseline antimikrobnom aktivnošću ekstrakata eteričnog ulja mirte u usporedbi sa zonama inhibicije negativne kontrole DMSO te pozitivne kontrole otopine kanamicina (10 mg L<sup>-1</sup>)

TEST MIKRO- ORGANIZAM	Ekstrakti eteričnog ulja mirte/ 10 μL			DMSO/ 10 μL	Kanamicin otopina (50 mg L <sup>-1</sup> )/ 5 μL
	1	3	4		
<i>Lactobacillus brevis</i> - 62	nd	9	nd	nd	17
<i>Lactobacillus plantarum</i> - 73	nd	nd	nd	nd	10
<i>Lactobacillus kimchi</i> - 12	nd	nd	nd	nd	nd

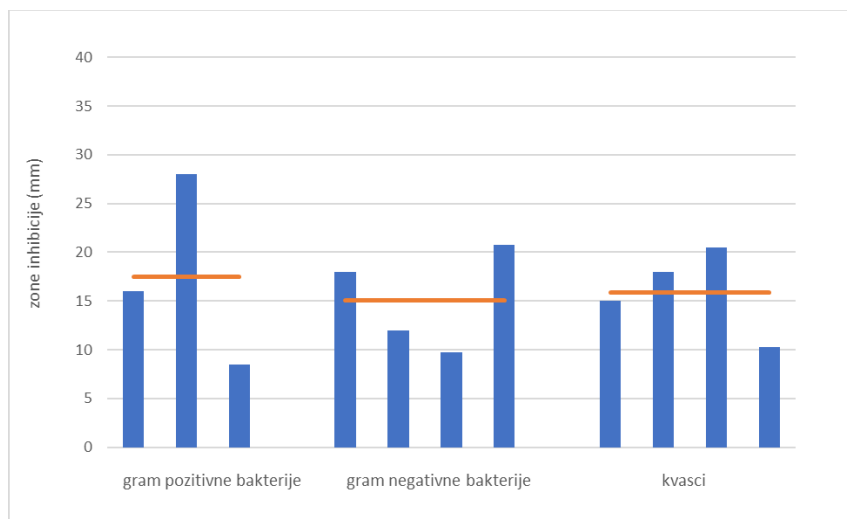
Ekstrakti eteričnog ulja *M. communis* pokazali su različitu antibakterijsku aktivnost kod svih testiranih gram-pozitivnih i gram-negativnih bakterija sa zonama inhibicije u rasponu  $8 \pm 1,41$  mm do  $35,75 \pm 8,13$  mm. Za razliku od njih kod bakterija mliječne kiseline nema značajnih zona inhibicije, odnosno nema antibakterijske aktivnosti osim kod ekstrakta broj 3 koji je uzrokovao blagu inhibiciju *Lactobacillus brevis* (9 mm). Kod ekstrakta broj 1 među gram-pozitivnim bakterijama najveća zona inhibicije zabilježena je kod *Listeria monocytogenes* ( $20,75 \pm 4,60$  mm), a najmanja zona inhibicije je kod *Enterococcus faecium* ( $9,75 \pm 0,35$  mm). Među gram-negativnim bakterijama ekstrakt broj 1 imao je najveću zonu inhibicije kod *Escherichia coli*, a slijede *Pseudomonas aeruginosa* i *Salmonella enterica* s. Typhimurium. Ekstrakt broj 3 je kod gram-pozitivnih bakterija najveću antibakterijsku aktivnost pokazao kod *Staphylococcus aureus*, a među gram-negativnim najveća antibakterijska aktivnost zabilježena je kod *Escherichia coli*, a kod *Pseudomonas aeruginosa* i *Salmonella enterica* s. Typhimurium zabilježene su podjednake zone inhibicije. Kod ekstrakta broj 4 među gram-pozitivnim bakterijama najveća antibakterijska aktivnost zabilježena je kod *Listeria monocytogenes* te među gram-negativnim kod *Escherichia coli*. Zona inhibicije za otopinu kanamicina (10 mg L<sup>-1</sup>), koja je služila kao pozitivna kontrola jer dokazano djeluje protiv bakterija, je iznosila od

21,5 ± 2,83 mm do 40,5 ± 0,71 mm. Negativna kontrola, odnosno dimetilsulfoksid nije pokazao inhibitorno djelovanje protiv testiranih bakterija.

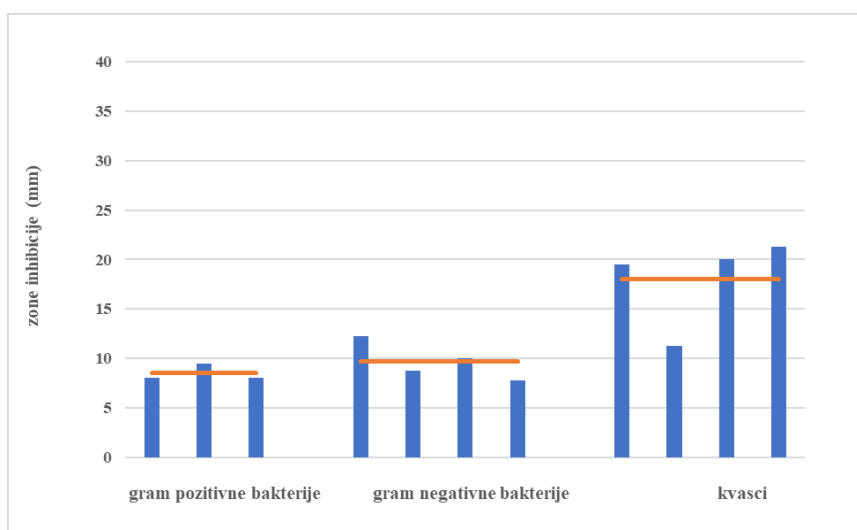
Antifungalna aktivnost ekstrakata eteričnog ulja mirte proučavana je na četiri kvasca: *Candida albicans*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Candida utilis* i *Rhodotorula sp.* te su zabilježene zone inhibicije u rasponu 10,25 ± 6,01 do 23,75 ± 25,10 mm. Ekstrakt broj 1 najveću inhibiciju je pokazao kod *Candida utilis*, ekstrakt broj 3 kod *Rhodotorula sp.*, a ekstrakt broj 4 pokazao je antifungalnu aktivnost samo kod *Saccharomyces cerevisiae*. Kao pozitivna kontrola korištena je otopina nistatina (5 mg mL<sup>-1</sup>) sa zonama inhibicije u rasponu 25 ± 22,63 do 17 ± 0,00 mm te je u slučaju *Saccharomyces cerevisiae* korištena i otopina Cycloheximide (Actidione) sa zonom inhibicije od 31 ± 0,00 mm.

Na slici 4 prikazana je usporedba srednjih vrijednosti zona inhibicije za testirane mikroorganizme nastalih djelovanjem ispitivanih ekstrakata.

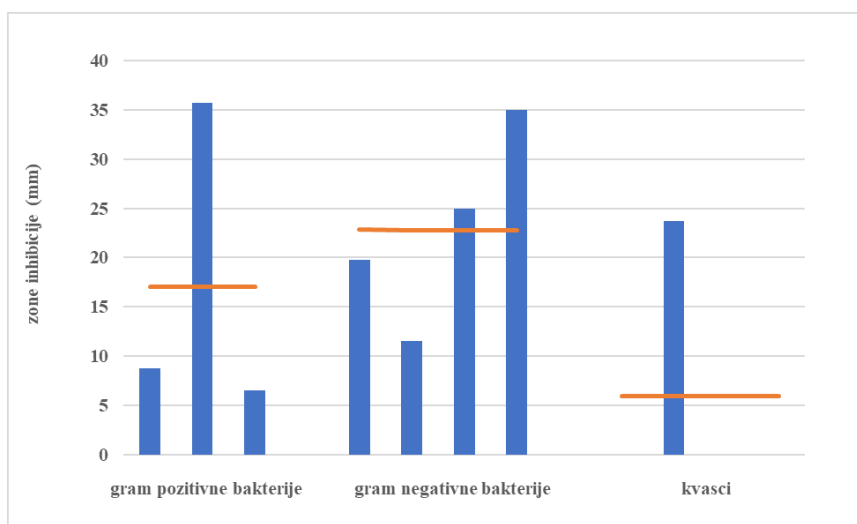
1



3



4



**Slika 4.** Usporedba srednjih vrijednosti zona inhibicije za gram pozitivne i gram negativne bakterije te kvasce, nastalih djelovanjem ispitivanih ekstrakata 1, 3 i 4

Rezultati pokazuju da ekstrakt 1 ekstrahiran iz listova ima podjednaki antimikrobni učinak protiv gram pozitivnih i gram negativnih bakterija te kvasaca. Srednje vrijednosti zona inhibicije su oko 15 mm. Ekstrakt 3, dobiven iz plodova superkričnom fluidnom ekstrakcijom pokazao je slabije inhibitorno djelovanje prema bakterijama, ali značajno inhibitorno djelovanje prema kvascima i to u rangu ekstrakta 1. Ekstrakt 4, ekstrahiran iz listova pomoću vodeno alkoholne baze imao je najveću antimikrobnu aktivnost prema bakterijama, ali je inhibirao rast samo kvasca *S. cerevisiae*. Ovi rezultati pokazuju značajno antimikrobno djelovanje ekstrakata mirte, a antimikrobna aktivnost ovisi i o dijelu biljke iz kojeg se ekstrakt proizvodi kao i o načinu ekstrakcije.

Ben Hsouna i suradnici su 2014. godine testirali sastav i antimikrobno djelovanje eteričnog ulja mirte ekstrahiranog destilacijom vodenom parom. Antimikrobna aktivnost procijenjena je mjerenjem zona inhibicije pomoću disk-difuzijske metode te određivanjem MIC (minimalna inhibitorna koncentracija) vrijednosti. Test mikroorganizmi korišteni u ovom istraživanju su gram-pozitivne bakterije: *Bacillus subtilis*, *Bacillus cereus*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermis*, *Enterococcus faecalis*, *Micrococcus luteus* i *Listeria monocytogenes*, gram-negativne bakterije: *Salmonella enteritidis*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* i *Klebsiella pneumoniae* te gljive: *Aspergillus niger*, *Aspergillus flavus*, *Aspergillus nidulans*, *Aspergillus fumigatus*, *Fusarium graminearum*, *Fusarium oxysporum*, *Fusarium culmorum* i *Alternaria alternata*. Odabrali su baš te mikroorganizme zato što su među najvažnijim ljudskim patogenima te uzrokuju kontaminaciju i kvarenje hrane. Zone inhibicije kod bakterija bile su od 16 do 28 mm. Među gram-pozitivnim bakterijama, najveća inhibicijska zona je uočena kod *L. monocytogenes* (28 mm) što se može usporediti s rezultatim dobivenim za ekstrakt 1 i ekstrakt 4 kod kojih je isto tako najveća zona inhibicije uočena kod *L. monocytogenes*, a zatim slijedi *B. cereus* (26 mm) i *S. aureus* (25 mm). Među gram-negativnim bakterijama, uočena je najveća inhibitorna zona kod *P. aeruginosa* (20 mm) dok je kod ekstrakta 1 i 4 uočena kod *E. coli*. Zona inhibicije gentamicina, koji je korišten kao pozitivna kontrola za bakterije, kretala se od 12 do 25 mm. Dobiveni rezultati su od velike važnosti, posebice u slučaju *B. cereus* i *S. aureus*, koji su poznati po svojoj otpornosti na brojne fitokemijske spojeve, te po proizvodnji nekoliko vrsta enterotoksina koji uzrokuju gastroenteritis. Hazzit i sur. (2009) su izvijestili da je *S. aureus* otporan na eterično ulje iz *Timus* vrste, dok rezultati dobiveni istraživanjem Hsouna i suradnika (2014) pokazuju da je eterično ulje *M. communis* pokazalo svoju djelotvornost i potencijalno bi moglo biti korisno u

konzerviranju hrane. Što se tiče antifungalne aktivnosti rezultati su pokazali jake inhibitorne učinke eteričnog ulja mirte kod rasta *A. niger* i *A. flavus* s promjerom zone inhibicije od 30 mm i MIC vrijednosti od 0,078 mg ml<sup>-1</sup>. Također, dokazana je antifungalna aktivnosti protiv *Fusarium sp.* i *Aspergillus sp.*. Maksimalni promjer zone inhibicije iznosio je 20 – 22 mm, a MIC vrijednosti su se kretale od 0,156 do 1,25 mg/ml. Antifungalnu aktivnost prvenstveno su pripisali visokom udjelu oksigeniranih monoterpena u eteričnom ulju.

Dobiveni rezultati za ekstrakt 3, koji je dobiven ekstrakcijom uz korištenje ugljikovog dioksida kao nepolarnog otapala na superkričnom fluidnom ekstraktoru, u skladu su s rezultatima koje su dobili Pereira i suradnici (2013). Testirali su antioksidativnu i antimikrobnu aktivnost ekstrakta listova *Myrtus communis* L. isto tako dobivenog ekstrakcijom pomoću superkričnog CO<sub>2</sub>. Rezultati disk-difuzijske metode pokazuju da je ekstrakt mirte učinkovito inhibirao rast *S. aureus*, *S. epidermidis* i *B. subtilis*, a nije inhibirao rast *E. coli* i *P. aeruginosa*. Najbolji rezultati inhibicije su bili kod *S. aureus* i *S. epidermidis*, oba sa zonama inhibicije od 22,0 ± 0,7 mm. *B. subtilis* pokazuju nižu vrijednost od 15,0 ± 2,0 mm. Ekstrakt je pokazao značajno antibakterijsko djelovanje protiv Gram-pozitivnih bakterija koje su proučavane, pokazujući najbolja inhibitorna svojstva protiv *S. aureus* i *S. epidermidis*, sa sličnim MIC-om (0,195 mg ml<sup>-1</sup>), a protiv *B. subtilis* nešto manje djelovanje s MIC-om vrijednost 1,56 mg ml<sup>-1</sup>. Rezultati su pokazali da ekstrakt nema djelovanje protiv gram-negativnih bakterija *E. coli* i *P. aeruginosa* (MIC ≥ 6,25 mg ml<sup>-1</sup>). Zaključili su da je razlog vidljive razlike u osjetljivosti gram-negativnih i gram-pozitivnih bakterija na ekstrakt vezan uz različitu građu i sastav staničnih membrana. Isto tako obzirom da su *S. epidermidis* i *S. aureus* obično uključeni u infekcije kože, zaključili su da bi ovaj ekstrakt mirte imao potencijalnu upotrebu kao funkcionalni sastojak u proizvodima koji se koriste za vanjsku zaštitu kože od mikroorganizama. Slični rezultati dobiveni su i za ekstrakt 3, no on je učinkovito inhibirao i gram-negativne bakterije. Rezultati dobiveni za ekstrakt 4, koji je dobiven vodeno-alkoholnom ekstrakcijom, su u skladu s onima koje su dobili Mert i suradnici (2008) koji su izvijestili o inhibiciji rasta *S. aureus* etanolnim ekstraktom *Myrtus communis* L. te rezultatima Gortzi i suradnika (2008) koji su također izvijestili da je metanolni ekstrakt *Myrtus communis* L. inhibirao rast *S. aureus*, *S. epidermidis* i *P. aeruginosa*.

## 5. ZAKLJUČAK

1. Svi ekstrakti eteričnog ulja mirte (*Myrtus communis* L.) pokazali su inhibitorno djelovanje prema svim testiranim gram-pozitivnim i gram-negativnim bakterijama i kvascima.
2. Antimikrobna aktivnost ovisi i o dijelu biljke iz kojeg se ekstrakt proizvodi kao i o načinu ekstrakcije.
3. Ekstrakt 1 ekstrahiran iz listova ima podjednaki antimikrobni učinak protiv gram-pozitivnih i gram-negativnih bakterija te kvasaca. Ekstrakt 3 dobiven iz plodova superkritičnom fluidnom ekstrakcijom pokazao je dobar antimikrobni učinak protiv kvasaca i to u rangu s ekstraktom 1, no lošije djeluje na bakterije. Ekstrakt lista dobiven ekstrakcijom vodeno-alkoholnom bazom (ekstrakt 4) pokazao je najveće antimikrobno djelovanje kod bakterija, a samo je inhibirao rast kvasca *Saccharomyces cerevisiae*.
4. U odnosu na pozitivnu kontrolu odnosno antibiotik kanamicin ( $10 \text{ mg L}^{-1}$ ) zone inhibicije kod ispitanih ekstrakata su nešto niže.
5. Nije zabilježena značajna antimikrobna aktivnost testiranih ekstrakata na bakterije mliječne kiseline.



## 6. LITERATURA

- Amensour M, Bouhdid S, Fernández-López J, Idaomar M, Senhaji NS, Abrini J (2010) Antibacterial activity of extracts of *Myrtus communis* against food-borne pathogenic and spoilage bacteria. *Int J Food Prop* **13**, 1215-1224. <https://doi.org/10.1080/10942910903013399>
- Andrade EHA, Alves CN, Guimarães EF, Carreira LMM, Maia JGS (2011) Variability in essential oil composition of *Piper dilatatum* LC Rich. *Biochem Syst Ecol* **39**, 669–675. <https://doi.org/10.1016/j.bse.2011.05.021>
- Balouiri M, Sadiki M, Ibsouda S K (2016) Methods for in vitro evaluating antimicrobial activity: A review. *J Pharm Anal* **6**, 71-79. <https://doi.org/10.1016/j.jpha.2015.11.005>
- Baytop T (1999) Therapy with medicinal plants in Turkey (past and present). Publication of the Istanbul University, Istanbul, str. 312.
- Burt S (2004) Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods. *Int J Food Microbiol* **94**, 223-253. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2004.03.022>
- Cannas S, Mollicotti P, Ruggeri M, Cubeddu M, Sanguinetti M, Marongiu B, Zanetti S (2013) Antimycotic activity of *Myrtus communis* L. towards *Candida* spp. from clinical isolates. *J Infect Dev Ctries* **7**, 295–8. <https://doi.org/10.3855/jidc.2799>
- Chalchat JC, Garry RF, Michet A (1998) Essential oils of Myrtle (*Myrtus communis* L.) of the Mediterranean littoral. *J Essential Oil Res* **10**, 613–7. <https://doi.org/10.1080/10412905.1998.9700988>
- Cox SD, Mann CM, Markham JL (2001) Interactions between components of the essential oil of *Melaleuca alternifolia*. *J Appl Microbiol* **91**, 7-492. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2672.2001.01406.x>
- Djilani A, Dicko A (2012) The therapeutic benefits of essential oils. U: Bouayed J, Bohn T (ured.) Nutrition, well-being and health. 1. izd., BoD–Books on Demand, str. 78-155.
- Gortzi O, Lalas S, Chinou I, Tsaknis J (2008) Reevaluation of bioactivity and antioxidant activity of *Myrtus communis* extract before and after encapsulation in liposomes. *Eur Food Res Technol* **226**, 90-583. <https://doi.org/10.1007/s00217-007-0592-1>

- Gradisar H, Pristovsek P, Plaper A, Jerala R (2007) Green tea catechins inhibit bacterial DNA gyrase by interaction with its ATP binding site. *J Med Chem* **50**, 71-264. <https://doi.org/10.1021/jm060817o>
- Hazzit M, Baaliouamer A, Veríssimo AR, Faleiro ML, Miguel MG (2009) Chemical composition and biological activities of Algerian *Thymus* oils. *Food Chem* **116**, 714-721. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2009.03.018>
- Harris R (2002) Progress with superficial mycoses using essential oils. *Int J Aromather* **12**, 83-91. [https://doi.org/10.1016/S0962-4562\(02\)00032-2](https://doi.org/10.1016/S0962-4562(02)00032-2)
- Hsouna A, Hamdi N, Miladi R, Abdelkafi S (2014) *Myrtus communis* essential oil: chemical composition and antimicrobial activities against food spoilage pathogens. *Chem Biodivers* **11**, 571-580. <https://doi.org/10.1002/cbdv.201300153>
- Irshad S, Butt M, Younus H (2011) In vitro antibacterial activity of *Aloe barbadensis* Miller, (*Aloe vera*). *Int Res J Pharm* **1**, 59–64. ISSN: 2048-4143
- Kalođera Z, Blažević N, Salopek N, Jurišić R (1998) Eterična ulja (aetherolea). *Farm Glas*, **54**, 195-210. <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:163:821146>
- Khan R, Zakir M, Afaq SH, Latif A, Khan AU (2010) Activity of solvent extracts of *Prosopis spicigera* Zingiber officinale and *Trachyspermum ammi* against multidrug resistant bacterial and fungal strains. *J Infect Dev Ctries* **4**, 292–300. <https://doi.org/10.3855/jidc.621>
- Khan ZU, Chandy R, Metwali KE (2003) *Candida albicans* strain carriage in patients and nursing staff of an intensive care unit: a study of morphotypes and resistotypes. *Mycoses* **46**, 86-476. <https://doi.org/10.1046/j.0933-7407.2003.00929.x>
- Kuštrak D (2005) Farmakognozija fitofarmacija. Golden marketing-Tehnička knjiga, Zagreb, str. 343-345.
- Mahmoud YA, Ebrahium MK, Aly MM (2004) Influence of some plant extracts and microbioagents on some physiological traits of faba bean infected with *Botrytis faba*. *Turkish J Bot* **7**, 21–30. <https://journals.tubitak.gov.tr/botany/vol28/iss6/1>
- Mahmoud IN, El-Sayed AA, Rania FA, Ezzel-Din A, El-Khrisy Khaled MI, Amany AS (2010) Secondary metabolites and bioactivities of *Myrtus communis*. *Pharmacognosy Res* **2**, 9-325. DOI: 10.4103/0974-8490.75449

Marković S (2005) Fitoaromaterapija, Centar Cedrus, Zagreb

Mendes MM, Gazarini LC, Rodrigues ML (2001) Acclimation of *Myrtus communis* to contrasting Mediterranean light environments—effects on structure and chemical composition of foliage and plant water relations. *Environ Exp Bot* **45**, 165-178. [https://doi.org/10.1016/S0098-8472\(01\)00073-9](https://doi.org/10.1016/S0098-8472(01)00073-9)

Messaoud C, Laabidi A, Boussaid M (2012) *Myrtus communis* L. infusions: the effect of infusion time on phytochemical composition, antioxidant and antimicrobial activities. *J Food Sci* **77**, 7-941. <https://doi.org/10.1111/j.1750-3841.2012.02849.x>

Miletić L (2020) Antimikrobna aktivnost eteričnih ulja i hidrolata izabranih vrsta biljaka (doktorska disertacija), Prehrambeno-biotehnološki fakultet, Sveučilište u Zagrebu, Zagreb.

Mill Robertson FC, Onyeka CI, Tay SCK, Walana W (2015) In vitro antimicrobial activity of antibact, and herbal medicinal productt against standard and clonicalbacterila isolates. *J Med Plants Res* **9**, 370-8. <https://doi.org/10.5897/JMPR2015.5758>

Petričić J, Farmakognozija (Farmaceutska biologija), I dio, Zagreb, Sveučilišna naklada Liber, 1983, 80-108.

Pereira P, Bernardo-Gil MG, Cebola MJ, Mauricio E, Romano A (2013) Supercritical fluid extracts with antioxidant and antimicrobial activities from myrtle (*Myrtus communis* L.) leaves. Response surface optimization. *J Supercrit Fluids* **83**, 57-64. <https://doi.org/10.1016/j.supflu.2013.08.010>

Saddi M, Sanna A, Cottiglia F, Chisu L, Casu L, Bonsignore L, De Logu A (2007) Antiherpevirus activity of *Artemisia arborescens* essential oil and inhibition of lateral diffusion in vero cells – research. *Ann Clin Microbiol* **6**. <https://doi.org/10.1186/1476-0711-6-10>

Wagner M, Amann R, Lemmer H, Schleifer KH (1993) Probing activated sludge with oligonucleotides specific for proteobacteria: inadequacy of culture-dependent methods for describing microbial community structure. *Appl Environl Microbiol* **59**, 1520-1525. <https://doi.org/10.1128/aem.59.5.1520-1525.1993>

Wannes A, Mhamdi B, Marzouk B (2009) Variations in essential oil and fatty acid composition during *Myrtus communis* var. *italica* fruit maturation. *Food Chem* **112**, 6-621. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2008.06.018>

Wannes A, Mhamdi B, Sriti J, Ben JM, Ouchikh O, Hamdaoui G, Kchouk ME, Marzouk B (2010) Antioxidant activities of the essential oils and methanol extracts from myrtle (*Myrtus communis* var. *italica* L.) leaf, stem and flower. *Food Chem* **48**, 1362–1370. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2010.03.002>

Ziyyat A, Legssyer A, Mekhfi H, Dassouli A, Serhrouchni M, Benjelloun W (1997) Phytotherapy of hypertension and diabetes in oriental Morocco. *J Ethnopharmacol* **58**, 45–54. [https://doi.org/10.1016/S0378-8741\(97\)00077-9](https://doi.org/10.1016/S0378-8741(97)00077-9)

## Izjava o izvornosti

Ja Jadranka Kralj izjavljujem da je ovaj završni rad izvorni rezultat mojeg rada te da se u njegovoj izradi nisam koristio/la drugim izvorima, osim onih koji su u njemu navedeni.

A handwritten signature in blue ink, reading "Jadranka Kralj", is written over a horizontal line. The signature is cursive and includes a small flourish at the end.

Vlastoručni potpis