

ANTIMIKROBNA AKTIVNOST I FENOLNISTASTAV EKSTRAKTA BILJKE *SALVIA VERTICILLATA* L.

Nikola Srećković¹, Jelena Katanić¹, Violeta Ninković², Vladimir Mihailović¹

Izvod: Cilj ovog rada je bio određivanje ukupne količine fenolnih jedinjenja, flavonoida i fenolnih kiselina, ispitivanje antimikrobne aktivnosti metanolnog ekstrakta nadzemnog dela biljke *S. verticillata*, kao i dokazivanje prisustva ruzmarinske kiseline. Ekstrakt je sadržao značajnu količinu ukupnih fenolnih jedinjenja, pri čemu se izdvojio po visokom sadržaju flavonoida. TLC hromatografijom pokazano je prisustvo ruzmarinske kiseline u ovom ekstraktu. Ekstrakt je pokazao umerenu do slabu antibakterijsku aktivnost sa MIK vrednostima od 1,25 do 20 mg/mL i znatno slabiju antifungalnu aktivnost. Dobijeni rezultati sugerišu da se mogu nastaviti dalja ispitivanja farmakološkog potencijala biljke *S. verticillata*.

Gljučne reči: *Salvia verticillata* L., antimikrobna aktivnost, ruzmarinska kiselina, fenolna jedinjenja, tankoslojna hromatografija

Uvod

S. verticillata, poznata pod narodnim nazivom sjeruša ili pršljenasta žalfija, je višegodišnja zeljasta biljka iz roda žalfija (*Salvia*), porodica usnatica (Lamiaceae). Biljke roda *Salvia* imaju mnogostruku tradicionalnu upotrebu, pre svega kao biljni čajevi, stimulišu apetit, ublažavaju gastrointestinalne tegobe, koriste se kod prehlade i abdominalnih bolova (Zengin i sar., 2018). Pojedine vrste žalfija primenjuju se u prehrambenoj, parfimerijskoj i farmaceutskoj industriji, zbog visokog sadržaja različitih terpena i flavonoida. Upotreba nekoliko vrsta žalfija u kulinarstvu i u medicinske svrhe datira još iz vremena Antičke Grčke, međutim, i danas postoji veliko interesovanje za ispitivanje ovih biljaka, naročito njihovog polifenolnog sastava (Šulnute i sar., 2017).

S. verticillata je poreklom mediteranska biljka, a veoma je rasprostranjena i u unutrašnjosti kontinenta. Smatra se korovskom biljkom i zbog vrlo razvijenog korena teško se iskorenjava (Umeljić, 2003). Sa druge strane, veoma je korisna kao medonosna biljka i veoma je cenjena od strane pčelara. Med poreklom od nektara ove biljke je veoma dobrog kvaliteta, pri čemu ukupna produktivnost meda iznosi 900 kg po hektaru zasada sjeruše (Chopik i sar., 1983). U narodu se smatra da etanolni ekstrakt blagotvorno deluje protiv mioma, tumora i drugih izraslina. I pored velike upotrebe u tradicionalnoj medicini, dejstvo biljke *S. verticillata* nije dovoljno proučeno.

Brojna ispitivanja hemijskog sastava biljaka roda *Salvia* pokazala su da su ove biljke bogate u sadržaju fenolnih kiselina i flavonoida. Najviše proučavana biljka ovog roda je *S. officinalis* (žalfija), za koju je poznato da poseduje jedinjenja dobro antioksidativne aktivnosti poput ruzmarinske kiseline i fenolnih diterpena. Prisustvo

¹Institut za hemiju, Prirodno-matematički fakultet, Univerzitet u Kragujevcu, Radoja Domanovića 12, 34000 Kragujevac, Srbija (nikola.sreckovic@pmf.kg.ac.rs)

²Institut za javno zdravlje Kragujevac, Nikole Pašića 1, 34000 Kragujevac, Srbija

ruzmarianske pokazano je u mnogim biljakama ovog roda uključujući i *S. verticillata* (Bandoniene i sar., 2005; Zengin i sar., 2018). Bez obzira na mnoga ispitivanja biljaka roda *Salvia*, literaturni podaci o vrsti *S. verticillata* su veoma oskudni. U tom smislu, cilj ovog rada je da se ispita fenolni sastav i antimikrobna aktivnost metanolnog ekstrakta biljke *S. verticillata*, kako bi se ispitala mogućnost primene ove biljke u različitim biljnim formulacijama koje mogu ispoljiti pozitivan uticaj na zdravlje čoveka.

Materijal i metode

Biljni materijal i priprema ekstrakta: Nadzemni deo biljke *S. verticillata* je sakupljenu Ovčarsko-Kablarskoj klisuri (selo Prijedor) u Srbiji, u julu 2016. godine. Sušenje biljke je obavljeno na vazduhu, u dobro provetrenoj i mračnoj prostoriji, na sobnoj temperaturi. Osušen i usitnjen nadzemni deo biljke (130 g) ekstrahovan je sa trostrukom većom zapreminom metanola, postupkom maceracije. Dobijeni ekstrakt je filtriran i koncentrovan uparavanjem rastvarača pod vakuumom.

Određivanje sadržaja ukupnih fenola, flavonoida i fenolnih kiselina: Ukupna fenolna jedinjenja određuju se spektrofotometrijskom metodom po Folin-Ciocalteu (Singleton i sar, 1999.) pri čemu je rezultat izražen u ekvivalentima galne kiseline (mg GA/g ekstrakta). Ukupna količina flavonoida određena je primenom $AlCl_3$ kao regensa spektrofotometrijskom metodom (Brighente i sar., 2007) i izražena je u ekvivalentima kvercetina (mg QE/g ekstrakta). Količina ukupnih fenolnih kiselina određivana je po metodi iz Poljske Farmakopeje (Polish Pharmacopoeia, 2005) i izražena u ekvivalentima kafeinske kiseline (mg KK/g ekstrakta).

Određivanje antimikrobne aktivnosti ekstrakata (MIC): Antimikrobna aktivnost ekstrakta nadzemnog dela biljke *S. verticillata* određivana je mikrodulicionom metodom u cilju određivanja minimalne inhibitorne koncentracije – MIK (najniža koncentracija ekstrakta koja inhibira vidljivi rast testiranih sojeva mikroorganizama). Korišćeni su sledeći mikroorganizmi: 8 bakterijskih vrsta *Micrococcus lysodeikticus* ATCC 4698, *Enterococcus faecalis* ATCC 29212, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Klebsiella pneumoniae* ATCC 70063, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 10145, *Bacillus cereus* ATCC 10876, *Bacillus mycoides* FSB 1 i *Azobacter chroococcum* FSB 14; i 8 vrsta gljiva i to *Fusarium oxysporum* FSB 91, *Alternaria alternata* FSB 51, *Aspergillus brasiliensis* ATCC 16404, *Aureobasidium pullulans* FSB 61, *Trichoderma harzianum* FSB 12, *Penicillium canescens* FSB 24, *Doratomyces stemonitis* FSB 41 i *Candida albicans* ATCC 10259. Ova metoda koristi mikrotitarske ploče sa 96 konusnih udubljenja zapremine 200 μ L. Za određivanje MIK kod ispitivanja antibakterijske aktivnosti koristi se redoks indikator rezaurin koji u toku rasta mikroorganizama prelazi u roze obojen redukovan oblik rezorufin (Sarker i sar., 2007). Kao referentni antibiotik je korišćen hloramfenikol. Za određivanje MIK ekstrakta u ispitivanju sa gljivama primenjena je ista metoda samo bez upotrebe rezaurina. Kao referentni antimikotik korišćen je nistatin.

TLC hromatografija: Standardizacija, odnosno utvrđivanje prisustva referentnih jedinjenja u ekstraktu biljke *S. verticillata* sprovedena je korišćenjem metode tankoslojne hromatografije. Rastvor ekstrakta nanosi se kapilarnom u obliku mrlje na pločicu od silika gela. Na istoj ploči nanete su mrlje rastvora standarda galne i

ruzmarinske kiseline. Za razvijanje hromatograma korišćen je sistem rastvarača hloroform:etilacetat:mravlja kiselina = 45:45:10. Nakon derivatizacije hromatograma sa NPR/PEG reagensom (prirodni proizvodi-polietilen glikol reagens) za detekciju fenolnih jedinjenja, a potom sušenja ploče, vršena je detekcija pomoću UV-lampe na talasnoj dužini 365 nm.

Rezultati istraživanja i diskusija

Ukupan sadržaj fenola, flavonoida i fenolnih kiselina metanolnog ekstrakta nadzemnog dela biljke *S. verticillata* predstavljen je u Tabeli 1. Sadržaj ovih prirodnih aromatičnih jedinjenja u ekstraktu je od izuzetnog značaja jer može ukazivati na obim antioksidativne, antimikrobne i antiinflamatorne aktivnosti (Farhat i sar., 2013). Na osnovu dobijenih rezultata može se zaključiti da je metanolni ekstrakt nadzemnog dela biljke *S. Verticillata* bogat u sadržaju svih ispitivanih jedinjenja, a naročito u sadržaju flavonoida. Ne treba zanemariti ni količinu fenolnih kiselina (41,95 mgKK/g), od kojih jedan deo predstavlja ruzmarinsku kiselinu, što je potvrđeno na osnovu TLC hromatografije. Na osnovu dobijenih R_f vrednosti za ruzmarinsku kiselinu (R_f ~ 0.735), galnu kiselinu (R_f ~ 0.765) i ekstrakt (R_f ~ 0.735) sa sigurnošću se može zaključiti da je u ekstraktu prisutna ruzmarinska kiselina. TLC hromatografijom potvrđeno je prisustvo i nekih drugih fenolnih jedinjenja u ekstraktu, ali je količina ovih jedinjenja znatno niža u odnosu na sadržaj ruzmarinske kiseline.

Tabela 1. Sadržaj ukupnih fenola, flavonoida i fenolnih kiselina
Table 1. The content of total phenols, flavonoids and phenolic acids

Biljni materijal <i>Plant material</i>	Ukupna fenolna jedinjenja (mgGK/gekstrakta) <i>Total phenolic content (mgGA/g extract)</i>	Ukupni flavonoidi (mgKV/gekstrakta) <i>Total flavonoid (mgQU/g extract)</i>	Ukupne fenolne kiseline (mgKK/gekstrakta) <i>Total phenolic acid (mgCA/g extract)</i>
Metanolni ekstrakt <i>S. verticillata</i>	175,56±16,27	244,36±4,69	41,95±5,38

Rezultati određivanja antibakterijske aktivnosti ekstrakta izraženi su kao minimalna inhibitorna koncentracija (MIK) u mg/mL prikazani su u Tabeli 2.

Na osnovu dobijenih rezultata, umerenu osetljivost na delovanje ispitivanog ekstrakta ispoljile su bakterije *A. chroococcum*, *B. mycooides*, *M. lysodeikticus* sa MIK 10 mg/mL, dok je vrsta *B. cereus* (MIK 1,25 mg/mL) je pokazala najveću osetljivost na dejstvo ekstrakta biljke *S. verticillata*. Ostale ispitivane bakterijske vrste pokazale suznatno slabiju osetljivost na antibakterijsko dejstvo ispitivanog ekstrakta sa MIK vrednostima od 20 mg/mL. Referentni antibiotik hloramfenikol zaustavio je rast ispitivanih bakterija u mnogostruko nižim koncentracijama.

Tabela 2. MIK vrednosti za antibakterijsku aktivnost ekstrakta biljke *S. Verticillata* (mg/mL)

Table 2. MIC values for antibacterial activity of *S. verticillata* extract(mg/mL)

Vrste bakterija <i>Bacterial strains</i>		MIK MIC	
		<i>Salvia verticillata</i> (mg/mL)	Hloramfenikol (µg/mL) <i>Chloramphenicol</i> (µg/mL)
<i>Micrococcus lysodeikticus</i>	ATCC 4698	10	1.25
<i>Enterococcus faecalis</i>	ATCC 29212	20	10
<i>Escherichia coli</i>	ATCC 25922	20	2,5
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	ATCC 70063	20	2,5
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	ATCC 10145	20	40
<i>Bacillus cereus</i>	ATCC 10876	1.25	2.5
<i>Bacillus mycoides</i>	FSB 1	10	10
<i>Azobacter chroococcum</i>	FSB 14	10	10

Tabela 3. MIK vrednosti za antifungalnu aktivnost ekstrakta biljke *S. verticillata* (mg/mL)

Tabela 3. MIC values for antifungal activity of *S. verticillata* extract(mg/mL)

Vrste gljiva <i>Fungal strains</i>		MIK MIC	
		<i>Salvia verticillata</i> (mg/mL)	Nystatin µg/mL
<i>Fusarium oxysporum</i>	FSB 91	20	20
<i>Alternaria alternata</i>	FSB 51	>20	40
<i>Aspergillus brasiliensis</i>	ATCC16404	>20	40
<i>Aureobasidium pullulans</i>	FSB 61	>20	> 40
<i>Trichoderma harzianum</i>	FSB 12	>20	> 40
<i>Penicillium canescens</i>	FSB 24	5	10
<i>Doratomyces stemonitis</i>	FSB 41	> 20	> 40
<i>Candidaalbicans</i>	ATCC 10259	10	5

Rezultati antifungalne aktivnosti ekstrakta *S. verticillata* za ispitivane gljive dati su u Tabeli 3. Za većinu ispitivanih gljiva, ekstrakt u koncentracijama do 20 mg/mL nije pokazao sposobnost zaustavljanja njihovog rasta. Među ispitivanimi gljivama, MIK vrednosti su jedino zabeležene za gljive *F. oxysporum*, *C. albicans* i *P.canescens*. U poređenju sa nistatinom, dobro poznatim antimikotikom, ispitivani ekstrakt nije pokazao značajnu antifungalnu aktivnost.

Zaključak

Ispitivanjem metanolnog ekstrakta nadzemnog dela biljke *S. verticillata* utvrđeno je da ekstrakt poseduje prilično visok sadržaj fenolnih jedinjenja, pri čemu dominiraju flavonoidi i fenolne kiseline. Utvrđeno je da je ekstrakt pokazao najveće antimikrobno

dejstvo na bakteriji *B. cereus* (MIK 1,25 mg/mL) i gljivi *P. Canescens* sa MIK 5 mg/mL, dok prema ostalim mikrobima nije pokazao značajniju aktivnost. Pomoću hromatografije na tankom sloju utvrđeno je da je ekstrakt ove biljke bogat u sadržaju ruzmarinske kiseline, jedinjenja poznatog po višestrukim benefitima za zdravlje čoveka i izuzetnim antioksidativnim osobinama. Sadržaj ruzmarinske kiseline u ekstraktu može biti jedan od razloga za tradicionalnu upotrebu ove biljke.

Napomena

Istraživanja u ovom radu deo su projekta broj III 43004, koji finansira Ministarstvo prosvete, nauke i tehnološkog razvoja Republike Srbije.

Literatura

- Bandoniene D., Murkovic M., Venskutonis P. R. (2005). Determination of rosmarinic acid in sage and Borage leaves by high-performance liquid chromatography with different detection methods. *Journal of Chromatographic Science* 43(7), 372–376.
- [Chopik V.I.](#), [Dudchenko L.G.](#), [Krasnov A.N.](#) (1983). [Wildlife useful plants of Ukraine](#). Kiev, Ukraine: Naukova Dumka 304.
- Polish Pharmacopoeia (2005) (6th ed), Polish Pharmaceutical Society, Warsaw, Poland, 896.
- Sarker S. D., Nahar L. and Kumarasamy Y. (2007). Microtitre plate-based antibacterial assay incorporating resazurin as an indicator of cell growth, and its application in the *in vitro* antibacterial screening of phytochemicals. *Methods* 42, 321–324.
- Šulniute V., Pukalskas A., Venskutonis P.R. (2017). Phytochemical composition of fractions isolated from ten *Salvia* species by supercritical carbon dioxide and pressurized liquid extraction methods, *Food Chemistry* 224, 37–47.
- Umeljić V. (2003). U svetu cveća i pčela: atlas medonosnog bilja. Umeljić V., 508-509
- Zengin G., Llorent-Martínez E.J., Fernández-de Córdova M.L., Bahadori M.B., Mocan A., Locatelli M., Aktumsek A. (2018). Chemical composition and biological activities of extracts from three *Salvia* species: *S. blepharochlaena*, *S. euphratica* var. *leiocalycina*, and *S. verticillata* subsp. *amasiaca*, *Industrial Crops & Products* 111, 11–21.
- [Farhat, M.B.](#), [Landoulsi, A.](#), [Chaouch-Hamada, R.](#), [Sotomayor, J.A.](#), [Jordán, M.J.](#), (2013). Characterization and quantification of phenolic compounds and antioxidant properties of *Salvia* species growing in different habitats. *Industrial Crops & Products* 49, 904-914

ANTIMICROBIALACTIVITY AND PHENOLIC COMPOSITION OF THE SALVIA VERTICILLATA L.PLANT EXTRACT

Nikola Srećković¹, Jelena Katanić¹, Violeta Ninković², VladimirMihailović¹

Abstract

The aim of this study was to investigate the total content of phenolic compounds, flavonoids and phenolic acids, examine the antimicrobial activity of the methanolic extract of *S. verticillata* aerial part, and demonstrate the presence of rosmarinic acid. The extract was rich in total phenolic content, especially in the total flavonoids content. Using the thin layer chromatography method, rosmarinic acid was identified in the extract. The extract showed moderate to weak antibacterial activity with MIC values of 1.25 to 20 mg/mL and significantly lower antifungal activity. The obtained results suggest that *S. verticillata* could be subjected to further studies of its pharmacological potential.

Key words: *Salvia verticillata* L., antimicrobial activity, rosmarinic acid, phenolic compounds, thin layer chromatography

¹Department of Chemistry, Faculty of Science, University of Kragujevac, Radoja Domanovića 12, 34000 Kragujevac, Serbia (nikola.sreckovic@pmf.kg.ac.rs)

²Institute for public health Kragujevac, Nikole Pašića 1, 34000 Kragujevac, Serbia