

UDC 615:633

YU ISSN 0455-6224

INSTITUT ZA PROUČAVANJE LEKOVITOG BILJA  
„Dr JOSIF PANČIĆ“ U BEOGRADU

INSTITUTE DE RESEARCH DES PLANTES MÉDICINALES  
„Dr JOSIF PANČIĆ“ À BELGRADE

---

# LEKOVITE SIROVINE

ZBORNIK RADOVA

# MATIÈRES MÉDICALES

RECUEIL DES TRAVAUX

XIX

BEOGRAD

LEK. SIROV.	God. XIX	BROJ 19	Str.	3-104	Beograd 1999.
LEK. SIROV	Vol. XIX	No. 19	PP.	3-104	Belgrade 1999.

LEK. SIROV.	God. XIX	BROJ 19	Str. 37-42	Beograd 1999.
LEK. SIROV	Vol. XIX	No. 19	PP. 37-42	Belgrade 1999.

Kratko saopštenje - Short Communicaton  
UDC 615.322.07

ANTIMIKROBNA AKTIVNOST ETANOLNO-VODENIH EKSTRAKATA  
NEKOLIKO *Achillea*, *Teucrium*, *Salvia*, *Tragopogon* i *Linum* VRSTA

Biljana Mirković<sup>1</sup>, Tatjana Kundaković<sup>2</sup>, Branislava Lakušić<sup>2</sup>, Nada Kovačević<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Zavod za farmaciju Srbije, Vojvode Stepe 452, Beograd

<sup>2</sup>Farmaceutski fakultet, Vojvode Stepe 450, Beograd

APSTRAKT

Ispitivana je antimikrobna aktivnost etanolno-vodenih ekstrakata herbe sledećih biljnih vrsta: *Achillea alexandri-regis* Bornm&Rudski, *A. lingulata* W.K., *A. chrysocoma* Friv., *A. tanacetifolia* All., *A. millefolium* L., *A. clavenae* L., *A. abrotanoides* Vis., *Linum capitatum* Kit., *Salvia ringens* Sibth.et Sm., *Tragopogon pratensis* Garcke., *Teucrium montanum* L., *T. polium* L., *T. arduini* L. i *T. chamaedrys* L. Primenjena je metoda difuzije, tehnika rupa prečnika 8 mm. Korišćene su radne kulture referentnih sojeva mikroorganizmi iz American Type Culture Collection i National Collection of Type Cultures, gustine inokuluma  $10^6$ - $10^8$  CFU/ml.

Svi ispitivani ekstrakti su ispoljili antimikrobnu aktivnost na pet sojeva testiranih Gram pozitivnih bakterija, osim na *Micrococcus luteus* ATCC 9341. Takođe, bez dejstva su na rast Gram negativnih bakterija i gljivica.

Po širini spektra izdvojili su se ekstrakti *Achillea* vrsta i *Teucrium polium*. Po intenzitetu dejstva, približne efekte su pokazali ekstrakti *Achillea millefolium* i *Teucrium polium*. Ovi ekstrakti su pokazali izrazitu aktivnost prema sledećim mikroorganizmima: *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Staphylococcus epidermidis* ATCC 12228, *Micrococcus flavus* ATCC 10240, *Bacillus subtilis* ATCC 6633 i *Bacillus pumilus* NCTC 8241.

Ključne reči: *Achillea* spp., *Teucrium* spp., *Salvia ringens*, *Linum capitatum*, *Tragopogon pratense*, etanolno-vodeni ekstrakti, droga/ekstrakt 1:2, antimikrobna aktivnost

## UVOD

Stalna potreba za nalaženjem novih hemijskih struktura koje ispoljavaju delovanje na mikroorganizme, uslovala je, u celom svetu, obimna ispitivanja ekstrakata pojedinih biljaka. Kasnije, ako je antimikrobno delovanje potvrđeno, radi se izolacija i hemijska karakterizacija sastojaka ekstrakta, odgovornih za ovakvu njegovu aktivnost.

Poznato je da mnogi sastojci biljaka poseduju antimikrobnu aktivnost. Do sada je potvrđeno da dejstvo na odgovarajuće patogene bakterije, gljivice i viruse ispoljavaju sastojci biljaka iz grupe alkaloida, različitih polifenola, terpenoida i poliacetilena (1-8).

U ovom radu su predstavljeni rezultati preliminarnih ispitivanja ekstrakata nekoliko biljaka, koje su trenutno, sa različitih aspekata, predmet proučavanja u Institutu za farmakognoziju i Institutu za Botaniku Farmaceutskog fakulteta.

## MATERIJAL I METODE

### Biljni materijal:

*Achillea alexandri-regis*, lokalitet: Ošljak, vreme prikupljanja: jul 1996  
*Achillea lingulata*, lokalitet: Kopaonik, vreme prikupljanja: jul 1996  
*Achillea chrysocoma*, lokalitet: Lavlja vrata, vreme prikupljanja: jul 1997  
*Achillea tanacetifolia*, lokalitet: Lavlja vrata, vreme prikupljanja: jul 1997  
*Achillea millefolium*, lokalitet: Bašaid, vreme prikupljanja: jul 1997  
*Achillea clavенаe*, lokalitet: Durmitor, vreme prikupljanja: jul 1997;  
*Achillea abrotanoides*, lokalitet: Durmitor, vreme prikupljanja: jul 1997  
*Linum flavum*, lokalitet: Durmitor, vreme prikupljanja: jul 1997  
*Tragopogon pratensis*, lokalitet: Brezovica, vreme prikupljanja: jul 1997  
*Salvia ringens*, lokalitet: Duvska klisura, vreme prikupljanja: jul 1997  
*Teucrium montanum*, lokalitet: Orjen, vreme prikupljanja: jul 1996  
*Teucrium polium*, lokalitet: Kanjon Cijevne, vreme prikupljanja: jul 1996  
*Teucrium arduini*, lokalitet: Lovćen, vreme prikupljanja: jul 1996  
*Teucrium chamaedrys*, lokalitet: Orjen, vreme prikupljanja: jul 1996

### Ispitivani ekstrakt:

Suva herba ispitivanih biljaka je samlevana (0.30 mm) i prelivena etanolom (70 vol%). Uz povremeno mešanje, ekstrakcija je rađena hladnom maceracijom tokom 24h. Filtrat je uparen do određene mase u vakuumu na temperaturi od 45°C. Svi ispitivani ekstrakti su svedni na odnos droga/ekstrakt 1:2. Spakovani su u staklene teglice i čuvani u frižideru (+ 4°C) do analize. Ispitivana je antimikrobna aktivnost nerazblaženih ekstrakata.

### Test organizmi:

*Staphylococcus aureus* ATCC 25923 (SA)  
*Staphylococcus epidermidis* ATCC 12228 (SE)  
*Bacillus subtilis* ATCC 6633 (BS)  
*Bacillus pumilus* NCTC 8241 (BP)  
*Micrococcus flavus* ATCC 10240 (MF)<sup>1</sup>

1 *Micrococcus flavus* je pod tim imenom deponovan u kolekciji, ali je kasnije primenovan u *Micrococcus luteus* (primedba recenzenta).

*Micrococcus luteus* ATCC 9341 (ML)  
*Escherichia coli* ATCC 25922 (EC)  
*Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 (PA)  
*Candida albicans* ATCC 10259 (CA)  
*Candida albicans* ATCC 24433 (CA)  
*Saccharomyces cerevisiae* ATCC 9763 (SC)

**Poreklo kultura mikroorganizama:**

American Type Culture Collection i National Collection of Type Cultures, dobijeni od Zavoda za serume i vakcine i dijagnostičke preparate „Torlak“ - Beograd.

**Gustina suspenzije mikroorganizama:**

$10^6$ - $10^8$  CFU/ml (9).

**Hranljiva podloga:**

1% agar Muller-Hinton agar i Sabraud dekstrozni agar;  
Proizvođač: Zavod za serume i vakcine i dijagnostičke preparate „Torlak“ - Beograd.

**Aktivnost rastvora standardnog preparata antibiotika koji služe za kontrolu mikrobiološke reakcije je sledeća:**

Bacitracin; 0.02 i.j. / 0.1 ml; za kontrolu osetljivosti MF;  
Gentamicin; 1 i.j./ 0.1 ml; za kontrolu osetljivosti SE;  
Linkomicin 0.5 µg / 0.1 ml; za kontrolu osetljivosti ML;  
Nistatin 10 i.j. / 0.1 ml; za kontrolu osetljivosti CA i SC.  
Streptomycin; 10 µg / 0.1 ml; za kontrolu osetljivosti SA, EC, PA, BC;  
Tetraciklin hlorid; 1 i.j. / 0.1 ml; za kontrolu osetljivosti BP;

**Dizajn ogleda:**

Ispitivanje antimikrobne aktivnosti etanolnih ekstrakata biljaka, je izvedeno metodom difuzije, tehnikom rupa (prečnik 8 mm) (10). Korišćene su četvrtaste posude, takozvane ploče. Dimenzije stakla su 17.5 x 17.5 cm, a dimenzije rama su 16 x 16 cm. Svaka ploča je sadržala po 16 rupa. Biljni ekstrakti i rastvor standardnog preparata antibiotika su naneti u količini od 0.1 ml u svaki otvor, metodom slučajnog izbora. Svaki rastvor je nanet u tri rupe. Predifuzija je trajala 1h na sobnoj temperaturi. Vreme inkubacije za bakterije je bilo 20h na 35 °C, odnosno 24h na 25 °C za gljivice.

Prečnici zona inhibicije su mereni milimetarskim meračem sa preciznošću od 0.1 mm.

**REZULTATI I DISKUSIJA**

Etanolni ekstrakti (droga/ekstrakt 1:2) svih ispitivanih biljaka su pokazali antimikrobnu aktivnost. rezultati su prikazani u Tabeli 1. Kao što se vidi, delovanje je ispoljeno na Gram pozitivne bakterije osim na *Micrococcus luteus*. Svi ekstrakti su bez efekta na rast testiranih Gram negativnih bakterija i gljivica.

Tabela 1. Antimikrobna aktivnost biljnih ekstrakata, izraženi veličinom zone inhibicije u milimetrima

Table 1. Antimicrobial activity of herb extracts represented as diameter of inhibition zone in mm

	SA ATCC 25923	SE ATCC 12228	MF ATCC 10240	ML ATCC 1341	BS ATCC 6633	BP NCTC 8421	PA ATCC 27853	EC ATCC 25922	CA ATCC 10259	CA ATCC 24433	SC ATCC 9763
<i>Achillea alexandri-regis</i>	0	0	12,8	0	11,2	11,7	0	0	0	0	0
<i>Achillea lingulata</i>	14,5	15,0	13,0	0	13,3	14,9	0	0	0	0	0
<i>Achillea chrysocoma</i>	13,3	15,5	13,1	0	13,2	14,1	0	0	0	0	0
<i>Achillea tanacetifolium</i>	14,7	16,0	15,0	0	14,3	15,0	0	0	0	0	0
<i>Achillea millefolium</i>	17,8	18,0	15,0	0	14,8	18,6	0	0	0	0	0
<i>Achillea clavene</i>	13,7	11,1	15,1	0	13,8	15,7	0	0	0	0	0
<i>Achillea abrotanoides</i>	14,6	13,0	15,8	0	13,7	15,1	0	0	0	0	0
<i>Linum flavum</i>	0	0	11,3	0	10,8	11,1	0	0	0	0	0
<i>Tragopogon pratense</i>	0	0	11,5	0	11,1	11,1	0	0	0	0	0
<i>Salvia ringens</i>	0	0	12,4	0	11,0*	12,2	0	0	0	0	0
<i>Teucrium montanum</i>	0	0	11,0	0	10,5	11,9	0	0	0	0	0
<i>Teucrium polium</i>	16,8	16,5	15,4	0	16,7	14,8	0	0	0	0	0
<i>Teucrium arduini</i>	0	0	11,2	0	13,0	12,9	0	0	0	0	0
<i>Teucrium chamaedrys</i>	0	14,0	11,3	0	13,2	12,6	0	0	0	0	0
<i>Bacitracin</i>	R	R	24,5	R	R	R	R	R	R	R	R
<i>Gentamicin</i>	R	25,5	R	R	R	R	R	R	R	R	R
<i>Linkomicin</i>	R	R	R	24,6	R	R	R	R	R	R	R
<i>Nistatin</i>	R	R	R	R	R	R	R	R	21,0	18,4	15,3
<i>Streptomycin</i>	18,1	R	R	R	31,1	R	17,6	19,6	R	R	R
<i>Tetraciklin hlorid</i>	R	R	R	R	R	24,1	R	R	R	R	R

\*Rezultati predstavljaju srednju vrednost tri određivanja

\*\* Oznaka „O“ znači bez efekta

\*\*\* Oznaka „R“ znači da antibiotik nije ispitivan

Po širini spektra dejstva izdvojili su se ekstrakti ispitivanih *Achillea vrsta* i to *A. clavenae*, *A. abrotanoides*, *A. lingulata*, *A. millefolium*, *A. tanacetifolium* i *A. chrysocoma*. Njima je po intenzitetu delovanja i širini spektra dejstva sličan *Teucrium polium*. Ekstrakti ovih biljaka su zaustavili rast pet sojeva testiranih bakterija.

Po intenzitetu dejstva, slični rezultati su dobijeni sa ekstraktima *A. millefolium* i *Teucrium polium*. Inhibicija rasta *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 koju su pokazali ovi ekstrakti, odgovara 90% aktivnosti streptomicina (0.1 mg / 0.1 ml). Pri dodatku ova dva ekstrakta, postignuta je inhibicija rasta *Staphylococcus epidermidis* ATCC 12228, koja odgovara 60-70% aktivnosti gentamicina u korišćenoj koncentraciji (1 i.j. / 0.1 ml). Slične procenete inhibicije u odnosu na paralelno korišćene antibiotike, ekstrakti *A. millefolium* i *T. polium* su pokazali i na *Micrococcus flavus*, *Bacillus subtilis* i *Bacillus pumilus*.

Ovakvi rezultati su očekivani jer je poznato da *Achillea* vrste zbog sadržaja etarskog ulja, flavonoida i seskviterpenskih laktona (odnosno poliacetilena u podzemnim delovima), pokazuju značajnu antimikrobnu aktivnost (6, 11, 12). Od svih testiranih vrsta ovog roda, najbolji rezultati su dobijeni sa već proverenom drogom, herbom hajdučke trave, *A. millefolium*. Zbog sličnih sastojaka i druge biljne vrste familije Lamiaceae, pokazuju ovakvu aktivnost (13). Od ispitivanih *Teucrium* vrsta, najbolji rezultati su dobijeni sa ekstraktima herbe *T. polium* i *T. chamaedrys*. O antimikrobnoj aktivnosti ovih biljaka postoje i literaturni podaci. U ovom testu, ekstrakt herbe endemične vrste *Salvia ringens*, nije pokazao izrazitu aktivnost, koju inače poseduje dobro poznata droga *Salviae folium* (*Salvia officinalis*) (6). Takođe, očekivanja da će zbog sadržaja flavonoida, ekstrakt cveta lana, *Linum capitatum*, pokazati značajnu antimikrobnu aktivnost, se nisu ostvarila. Slično, samo ograničenu aktivnost je pokazao ekstrakt herbe *Tragopogon pratensis*, biljke koja pored ostalih sastojaka sadrži i alkalioide.

#### LITERATURA:

1. M.F. Roberts, M. Wink (1998) Alkaloids: Biochemistry, Ecology and Medicinal Applications, Plenum Press, New York and London
2. W.C. Evans (1996) Trease and Evans' Pharmacognosy, Saunders, London-Philadelphia-Toronto-Sydney-Tokyo
3. Gábor (1988), The Pharmacology of Benzopyrone Derivatives and Related Compounds, Akadémiai Kiadó, Budapest
4. D. Antić-Runjaić, N., Kovačević, M. Aleksić (1989) Biljne sirovine i preparati sa antimikrobnim delovanjem, Arhiv za farmaciju, Vol. 39, No. 6, 219-226
5. R. Jančić, D. Stošić, N. Mimica Dukić, B. Lakušić (1995) Aromatične biljke Srbije, Dečje novine, Gornji Milanovac
6. N.G. Bisset (ed.) (1994), Herbal Drugs and Phytopharmaceuticals, Medpharm Sci. Pub., Stuttgart, 342-344
7. F. Bohlmann, T. Burkhardt, C. Zdero (1973), Naturally Occuring Acetylenes, Accademic Press, London and New York
8. T. Kundaković, N. Kovačević (1999), Poliacetileni prirodnog porekla, Arhiv za farmaciju, No. 3-4, 347-360.
9. D. Branson (1972), Methods in Clinical Bacteriology (A Manual of Tests and Procedures), Charles C Thomas Publisher, Illinois, USA
10. IV Jugoslovenska Farmakopeja (1984), Savezni zavod za zaštitu zdravlja, Beograd

11. I. Aljančić, V. Vajs, N. Menković, I. Karadžić, N. Juranić, S. Milosavljević, S. Macura (1999), Flavones and Sesquiterpene Lactones from *Achillea atrata* subsp. *multifida*: Antimicrobial Activity, Journal of Natural Products, vol. 62, 909-911
12. R. De la Puerta, M.T. Sáenz, M.D. Garcia (1996), Antibacterial Activity and composition of the Volatile Oli from *Achillea ageratum* L., Phytotherapy Research, vol. 10, 248-250.
13. A.A. Sattar, V. Bankova, A. Kujumgiev, A. Galabov, A. Ignatova, C. Todorova, S. Popov (1995), Chemical Composition and Biological activity of leaf exudates from some *Lamiaceae* Plants, Pharmazie, vol. 50, 62-65.

#### ANTIMICROBIAL ACTIVITY OF HERB EXTRACTS OF SOME *Achillea*, *Teucrium*, *Salvia*, *Tragopogon* and *Linum* SPECIES

Biljana Mirković<sup>1</sup>, Tatjana Kundaković<sup>2</sup>, Branislava Lakušić<sup>2</sup>, Nada Kovačević<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Institute of Pharmacy of Serbia, Vojvode Stepe 452, Belgrade

<sup>2</sup>Faculty of Pharmacy, Vojvode Stepe 450, Belgrade

##### Summary

The ethanol-water extracts of the herbs of *Achillea alexandri-regis*, *A. lingulata*, *A. chrysocoma*, *A. tanacetifolia*, *A. millefolium*, *A. clavenae*, *A. abrotanoides*, *Linum flavum*, *Salvia ringens*, *Tragopogon pratense*, *Teucrium montanum*, *T. polium*, *T. arduini* i *T. chamaedrys* were tested against eleven microorganisms using agar diffusion assay (the hole diffusion technique, diameter 8 mm). The inoculum size was  $10^6$ - $10^8$  CFU/ml. The American Type Culture Collection and National Collection of Type Cultures of the microbial organisms was used for the test.

The extracts showed significant zones of inhibition against the Gram-positive bacteria except *Micrococcus luteus* ATCC 9341 but no activity against the Gram-negative bacteria and yeast.

The greatest spectrum of activity showed the extracts of *Achillea species* and *Teucrium polium*. If comparing intensity of activity, the extracts of *Achillea millefolium* and *T. polium* showed similar effects. These extracts showed significant activity against *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Staphylococcus epidermidis* ATCC 12228, *Micrococcus flavus* ATCC 10240, *Bacillus subtilis* ATCC 6623 and *Bacillus pumilus* ATCC 8241.