

ANTIMIKROBNA AKTIVNOST PETROLETARSKIH I ETILACETATNIH
EKSTRAKATA BILJNIH VRSTA *MELILOTUS OFFICINALIS* (L.) PALL,
MELILOTUS ALBUS MEDIC. I *MELITIS MELISSOPHYLLUM* L.

Gordana Aćamović-Đoković¹, Dragutin Đukić¹, Leka Mandić¹,
Svetlana Kalinić², Tatjana Bošković²

¹Agronomski fakultet, Cara Dušana 34, Čačak

²Zavod za zaštitu zdravlja, Dragiše Mišovića 25, Čačak

IZVOD

Ogled je izvođen u hemijskoj i mikrobiološkim laboratorijama Agronomskog fakulteta i Zavoda za zaštitu zdravlja u Čačku. Kao test organizmi, za ispitivanje antimikrobnog dejstva biljnih ekstrakata *Melilotus officinalis* (L.) Pall (žuti kokotac), *Melilotus albus* Medic. (beli kokotac) i *Melitis melissophyllum* L. (medenika), korišćene su sledeće vrste mikroorganizama: *Escherichia coli*, *Proteus mirabilis*, *Salmonella enteritidis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Streptococcus-haemolyticus* A, *Staphylococcus aureus* i *Candida albicans*. Na površini zasejanog hranljivog agara postavljeni su sterilni filter papiri prečnika 11 mm na koje su pasterovom pipetom nanošeni petroletarski i etilacetatni ekstrakti navedenih biljnih vrsta, kao i samih ekstragenata (petroletra i etilacetata). Antimikrobna aktivnost petroletarskih ekstrakata ispitivanih biljaka nije zapažena, što se ne može reći za etilacetatni ekstrakt žutog kokoca i medenike. Etilacetatni ekstrakt žutog kokoca je delovao na sve ispitivane patogene, osim na *Escherichia coli*, dok je etilacetatni ekstrakt medenike delovao samo na *Salmonella enteritidis*, *Pseudomonas aeruginosa* i *Staphylococcus aureus*.

Ključne reči: *Melilotus officinalis* (L.) Pall, *Melilotus albus* Medic., *Melitis melissophyllum* L., petroletarski ekstrakt, etilacetatni ekstrakt, antimikrobna aktivnost.

UVOD

Sve tri ispitivane biljke [*Melilotus officinalis* (L.) Pall–žuti kokotac, *Melilotus albus* Medic–beli kokotac i *Melitis melissophyllum* L. –medenika], u osušenom stanju, imaju prijatan i aromatičan miris po kumarinu. U Nemačkoj, Švajcarskoj i Engleskoj žuti kokotac u osušenom stanju se upotrebljava kao začim u slatkim jelima, a mladi listovi i

izdanci žutog i belog kokoca dodaju se salatama, varivima i supama¹. Kokotac je veoma medonosna biljka, a njegov med ima izvanredan kvalitet i aromu. Prvi povod za njegovo uvođenje u kulturu bio je proizvodnja meda. Pokazalo se da je izuzetno korisna biljka za popravljjanje nepovoljnih osobina zemljišta, prvenstveno plodnosti. Pored toga, koristi se za zelenu stočnu hranu, seno, ispašu i silažu. Beli kokotac je značajniji za proizvodnju stočne hrane od žutog kokoca, iako žuti ima manje kumarina. Poznato je nepoželjno dejstvo kumarina koji je u novije vreme uvršten u kancerogena jedinjenja. Truli kokotac može kod životinja da izazove tešku bolest "sweet clover disease". Bolest izaziva dikumarol koji nastaje od kumarina pod uticajem gljivične transformacije trulog kokoca². Zato se danas proizvodi oplemenjeni kokotac koji sadrži vrlo malo kumarina.

Za razliku od žutog i belog kokoca medenika nema ovako široku primenu. U narodnoj medicini³ se upotrebljava jer deluje slično drugim kumarinskim biljkama (lazarkinji i kokocu). Zajedno sa matičnjakom i hmeljom koristi se u obliku čaja protiv nesanice, nervoze, histerije i sličnih bolesti.

Žuti i beli kokotac se od najstarijih vremena upotrebljavaju u narodnoj medicini³, posebno žuti kokotac, koji je u narodu poznat pod imenom lekovita ždraljika. Koriste se za ublažavanje bolova i grčeva u želucu i crevima, potstiču izlučivanje znoja i mokraće, zaustavljaju krvarenje iz nosa a i upotrebljavaju se protiv migrene, reume i gihta.

Na osnovu poznatih podataka o upotrebi ovih biljaka i novijih saznanja o mogućim štetnim posledicama njihove duže primene, zaključeno je da bi bilo interesantno utvrditi da li one imaju inhibitorno dejstvo prema nekim patogenim mikroorganizmima.

MATERIJAL I METOD RADA

U istraživanjima su korišćeni ekstrakti sledećih biljnih kultura: žuti kokotac – *Melilotus officinalis* (L.) Pall.; beli kokotac – *Melilotus albus* Medic. i medenika – *Melitis melissophyllum* L. Žuti kokotac i medenika su sakupljeni u okolini Kragujevca u julu 1997. godine, a beli kokotac u okolini Čačka u avgustu 1998. godine, u fazi cvetanja. Nadzemni delovi biljke su osušeni na vazduhu, samleveni i ekstrahovani u Soxlet-ovoj aparaturi. Postupak ekstrakcije za sve tri biljke je bio isti: 30 g osušene biljne mase ekstrahovano je sa 600 cm³ petroletra. Posle uparavanja rastvarača u vakuumu, dobijeni su ekstrakti mrke smolaste mase iz sve tri biljke (iz žutog kokoca 1.2 g, iz belog kokoca 1.0 g, a iz medenike 0.6 g ekstrakta). Biljni materijal, iz koga su ekstrahovani voskovi i masne materije pomoću petroletra, je vraćen u Soxlet-ovu aparaturu i ekstrahovan sa 600 cm³ etilacetata. Posle uklanjanja etilacetata u vakuum uparivaču dobijeni su ekstrakti guste lepljive mase (iz žutog kokoca 0.9 g, iz belog kokoca 0.6 g, a iz medenike 0.5 g ekstrakta).

Za ispitivanje antimikrobne aktivnosti navedenih biljaka uzimano je po 1 mg suvog ekstrakta i rastvarano u 1 ml odgovarajućeg rastvarača, petroletru (ekstrakti dobijeni ekstrakcijom sa petroletrom) i etilacetatu (ekstrakti ostali posle ekstrakcije sa etilacetatom).

Kao test organizmi za praćenje antimikrobnog dejstva ekstrakata navedenih biljnih vrsta korišćeni su sledeći mikroorganizmi: *Escherichia coli*, *Proteus mirabilis*, *Salmonella enteritidis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Streptococcus haemoliticus* A, *Staphylococcus aureus* i *Candida albicans*, dobijeni iz kolekcije mikroorganizama Zavoda za zaštitu zdravlja u Čačku. U Petri šolje su razlivene hranljive podloge za gajenje odgovarajućih

mikroorganizama (Mueller–Hinton za *Escherichia coli*, *Proteus mirabilis*, *Salmonella enteritidis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Streptococcus haemolyticus* A, *Staphylococcus aureus* i Sabouraud–glikozni agar za *Candida albicans*).

Sabouraud agar se sterilizuje u autoklavu 15 minuta na 121°C i podesi pH vrednost na 5,6. U 1 l destilovane vode suspenduje se 38 mg Mueller–Hinton agara, zatim sterilizuje kao i prethodni i pH vrednost podesi na $7,4 \pm 0,2$.

Nakon zasejavanja hranljivih podloga na površinu hranljivog agara svih varijanata postavljeni su sterilni filter papiri prečnika 11 mm na koje je Pasterovom pipetom nanoseno po 10 µl pripremljenog petrolearskog i etilacetatnog ekstrakta ispitivanih lekovitih biljaka, kao i samih rastvarača petroletra i etilacetata.

Inkubacija je vršena u termostatu sedam dana na 22°C za *Candidu albicans* i 24 časa na 37°C za sve ostale mikroorganizme, nakon čega je meren prečnik inhibicije rasta mikroorganizama.

REZULTATI ISTRAŽIVANJA I DISKUSIJA

Za razliku od petrolearskih ekstrakata medenike, žutog i belog kokoca, kod kojih nije uočena inhibicija rasta testiranih grupa mikroorganizama, njihovi etilacetatni ekstrakti su bili veoma aktivni. Izuzev etilacetatnog ekstrakta belog kokoca, čija se antimikrobna aktivnost svela samo na *Staphylococcus aureus*, isti ekstrakti žutog kokoca i medenike su ispoljili široki spektar antimikrobne aktivnosti, što je u skladu sa rezultatima do kojih su došli i drugi autori^{4,5}.

Najveću antimikrobnu aktivnost ispoljio je etilacetatni ekstrakt žutog kokoca [*Melilotus officinalis* (L.) Pall.]. Ovo se posebno odnosi na *Streptococcus β haemolyticus* A i *Proteus mirabilis*, dok je njihovo antimikrobno dejstvo prema ostalim bakterijskim kulturama približno istog nivoa. Za razliku od navedenog, etilacetatni ekstrakt medenike je najveću antimikrobnu aktivnost ostvario prema *Pseudomonas aeruginosa* i *Salmonella enteritidis* ⁶, što se ne može reći za druge proučavane vrste mikroorganizama. Najnižu antimikrobnu aktivnost ispoljio je ekstrakt belog kokoca i ograničio se samo na *Staphylococcus aureus*.

Antifungalni efekat je ispoljio samo etilacetatni ekstrakt žutog kokoca što su utvrdili i drugi istraživači⁵. Rezultati antimikrobne aktivnosti ispitivanih ekstrakata prikazani su u tabeli 1.

ZAKLJUČAK

Na osnovu rezultata ovog istraživanja, kao i sagledanih inostranih i domaćih eksperimentalnih iskustava u ovoj oblasti, mogu se izvesti sledeći zaključci:

- petrolearski ekstrakti medenike, belog i žutog kokoca nisu ispoljili antimikrobnu aktivnost;
- etilacetatni ekstrakti su ispoljili izraženu antimikrobnu aktivnost;
- etilacetatni ekstrakt žutog kokoca i medenike su ispoljili širok spektar antimikrobne aktivnosti, dok je etilacetatni ekstrakt belog kokoca bio aktivan samo u odnosu na *Staphylococcus aureus*;

- najveću antimikrobnu aktivnost ispoljio je etilacetatni ekstrakt žutog kokoca, nešto nižu etilacetatni ekstrakt medenike, a najnižu etilacetatni ekstrakt belog kokoca;
- antifungalni efekat je ispoljio samo etilacetatni ekstrakt žutog kokoca.

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

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

	Senzibilnost na ekstrakte biljaka (prečnik zone inhibicije, mm) Susceptibility to herb extracts (inhibition zone diameter, mm)							
	Žuti kokotac Yellow melilot (PE)	Žuti kokotac Yellow melilot (EtOAc)	Beli kokotac White melilot (PE)	Beli kokotac White melilot (EtOAc)	Mede- nika Honey balm (PE)	Mede- nika Honey balm (EtOAc)	Petrol- Etar Petrol- ether (PE)	Etil- acetat Ethyl- acetate (EtOAc)
<i>Escherichia coli</i>	-	-	-	-	-	16	-	16
<i>Proteus mirabilis</i>	-	21	-	-	-	12	-	13
<i>Salmonella enteritidis</i>	-	15	-	-	-	16	-	12
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	-	19	-	-	-	16	-	12
<i>Streptococcus hemolizniA</i>	-	23	-	-	-	15	-	15
<i>Staphylococcus aureus</i>	-	14	-	11.5	-	14,5	-	12
<i>Candida albicans</i>	-	13	-	-	-	-	-	-

PE – petroletar; EtOAc – etilacetat

LITERATURA

1. Lj.Grlić (1990), Enciklopedija samoniklog jestivog bilja, August Cesarec, Zagreb, 207-208
2. B.Mišković (1986), Krmno bilje, Naučna knjiga, Beograd, 300-305.
3. J.Tucakov (1986), Lečenje biljem-fitoterapija, Izdavačka radna organizacija "Rad", Beograd, 477, 395.
4. F.E.Gonzales, L.M.Garcia, M.A. Storra, A.Otero (1994), Staphylococcal growth and enterotoxins (A-D) and their mononuclease synthesis in the presence of dehydrated garlic, J. Appl.Bacteriol., 77 (5) 549-552.
5. D.Đukić, L.Mandić (1998), Neke prirodne bioaktivne materije u funkciji kontrole mikrobiološke aktivnosti, Dani mikrobiologa Jugoslavije, H.Novi, 184-185.
6. A.A.Sattar, V.Bankova, A.Kujumgijev, 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 THE PETROL-ETHER AND ETHYL-
ACETATE EXTRACTS OF *MELILOTUS OFFICINALIS* (L.) PALL, *MELILOTUS*
ALBUS MEDIC. AND *MELITIS MELISSOPHYLLUM* L.

Gordana Aćamović-Đoković¹, Dragutin Đukić¹, Leka Mandić¹,
Svetlana Kalinić², Tatjana Bošković²

¹Faculty of Agronomy, Čačak, Yugoslavia

²Health Institute Čačak, Yugoslavia

SUMMARY

The experiment was carried out at the chemical and microbiological laboratories of the Faculty of Agronomy and at Health Institute in Čačak. As a test organisms for examination of antimicrobial activity of herb extracts from *Melilotus officinalis* (L.) Pall (yellow melilot), *Melilotus albus* Medic. (white melilot) and *Melitis melissophyllum* L. (honey balm) the following species were used: *Escherichia coli*, *Proteus mirabilis*, *Salmonella enteritidis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Streptococcus haemoliticus* A, *Staphylococcus aureus* and *Candida albicans*. Sterile and clean paper filters 11 mm in diameter were placed over the surface of the nutritional agar, and petrol ether and ethyl acetate extracts of *Melilotus officinalis* (L.) Pall (yellow melilot), *Melilotus albus* Medic. (white melilot) and *Melitis melissophyllum* L. (honey balm) as well as the extragents themselves were applied over these filters by means of Paster's pipette. Antimicrobial activity of the petrol ether extracts from the examined herbs was not noticed, whereas ethyl acetate extracts of the yellow melilot and honey balm was. The ethyl acetate extracts of the yellow melilot affected all the pathogenic microorganisms, with the exception of *Escherichia coli*, whereas those of honey balm affected only *Salmonella enteritidis*, *Pseudomonas aeruginosa* and *Staphylococcus aureus*.