

Antibakterijski potencijal etarskog ulja *Sideritis montana* L. (Lamiaceae)

Dragoljub L. Miladinović¹, Budimir S. Ilić¹, Tatjana M. Mihajlov-Krstev², Nikola D. Nikolić³,
Violeta N. Milosavljević⁴, Dejan M. Nikolić⁵

¹Univerzitet u Nišu, Medicinski fakultet, Odsek za farmaciju, Niš, Srbija

²Univerzitet u Nišu, Prirodno-matematički fakultet, Departman za biologiju i ekologiju, Niš, Srbija

³Univerzitet u Nišu, Laboratorija za geochemiju, kosmohemiju i astrohemiju, Niš, Srbija

⁴Osnovna škola „Desanka Maksimović“, Čokot, Srbija

⁵Odsek za sanitarnu hemiju, Institut javnog zdravlja, Niš, Srbija

Izvod

U radu su prikazani rezultati proučavanja hemijskog sastava i antibakterijskog potencijala etarskog ulja *Sideritis montana* L. (Lamiaceae) iz Srbije. Heminska analiza etarskog ulja je izvršena primenom GC i GC-MS metoda, dok je antibakterijska aktivnost ispitivana mikrodilucionom metodom na četiri referentna bakterijska soja: *Escherichia coli* ATCC 13706, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Salmonella enteritidis* ATCC 13076 i *Staphylococcus aureus* ATCC 29213. Najzastupljenija klasa jedinjenja u ispitivanom uzorku etarskog ulja su ugljovodonični seskviterpeni. Dominantne komponente etarskog ulja su germakren D (37,9%) i trans-geraniol (26,1%). Etarsko ulje je delovalo na sve testirane sojeve inhibitorno u intervalu od 0,03–0,06 µl/ml i baktericidno u intervalu od 0,06–0,12 µl/ml.

Ključne reči: *Sideritis montana*, etarsko ulje, antibakterijska aktivnost.

Dostupno na Internetu sa adresu časopisa: <http://www.ache.org.rs/HI/>

Lečenje infektivnih bolesti u svetu se poslednjih decenija sve više komplikuje, zbog razvijene rezistencije bakterija na sintetičke antibiotike [1]. Poznati su u istoči slučajevi rezistencnosti *Escherichia coli* na treću generaciju cefalosporina, zatim pojava vankomicin-rezistentnih *Staphylococcus aureus* i multirezistentne *Pseudomonas aeruginosa* [2]. Zbog toga postoji stalna potreba za novim antibakterijskim agensima. Poznato je da terpenoidi, konstituenti etarskih ulja delimično ili potpuno inhibiraju rast bakterija [3].

Biljne vrste roda *Sideritis* su u upotrebi u mnogim zemljama kao fitopreparati [4]. Vekovima se koriste zbog antiinflamatornih [5], antimikrobnih [6] i gastroprotektivnih svojstava [7]. Najnovija istraživanja ukazuju da neka jedinjenja izolovana iz vrsta roda *Sideritis* ispoljavaju anti-HIV i antiproliferativne aktivnosti [8].

Rod *Sideritis* (Lamiaceae) obuhvata 140 vrsta, koje su rasprostranjene uglavnom na Mediteranu i nekim regionima Azije. U flori Srbije je opisana samo vrsta *Sideritis montana* [9].

Pregledom dostupnih literaturnih podataka, nismo našli potvrdu da je do sada ispitivana antibakterijska aktivnost etarskog ulja *S. montana*. Stoga je etarsko ulje ove vrste ušlo u fokus našeg naučnog interesovanja.

NAUČNI RAD

UDK 547.913:543.544:615.281:58

Hem. Ind. 66 (4) 541–545 (2012)

doi: 10.2298/HEMIND111003001M

EKSPERIMENTALNI DEO

Biljni materijal

Nadzemni delovi *S. montana* sakupljeni su u junu 2011. godine u fazi cvetanja u selu Kravlje, jugoistočna Srbija. Taksonomsku pripadnost populacije je determinisao prof. dr Novica Randelić sa Odseka za biologiju i ekologiju, Prirodno-matematičkog fakulteta u Nišu, gde je herbarijumski uzorak deponovan.

Izolovanje etarskog ulja

Sprašena herba podvrgнутa je procesu hidrodestilacije na Clavenger aparatu u trajanju od 4 sata. Izolovano etarsko ulje je osušeno anhidrovanim natrijum-sulfatom i čuvano na temperaturi od 4 °C.

Gasna hromatografija (GC)

GC analiza etarskog ulja je urađena na gasnom hromatografu HP-5890 Series II, opremljenim split-splitless injektorom, kapilarnom kolonom sa HP-5MS stacionarnom fazom (30 m×0,25 mm; debljina filma 0,25 µm), helijumom kao nosećim gasom (1 ml/min) i plameno-jonizujućim detektorom (FID). Temperatura injektora iznosila je 250, a detektora 280 °C, dok je temperatura kolone linearno povećavana od 50 do 250 °C (3 °C/min).

Gasna hromatografija/masena spektrometrija (GC-MS)

GC-MS analiza je urađena na Agilent Technologies aparatu, model GS 6890N pri 70 eV, sa detektorom tipa MSD 5975C, pod istim gasno-hromatografskim uslovima.

Prepiska: D.L. Miladinović, Odsek za farmaciju, Medicinski fakultet, Univerzitet u Nišu, Bulevar dr Zorana Đindjića 81, 18000 Niš, Srbija.

E-pošta: dragoljubm@gmail.com

Rad primljen: 3. oktobar, 2011

Rad prihvaćen: 16. januar, 2012

Identifikacija komponenti

Identifikacija komponenti ulja vršena je masenospektrometrijski, poređenjem retencionih vremena i masenih spektara komponenti sa referentnim supstancama i/ili jedinjenjima iz raspoložive baze podataka (Wiley 275, NIST/NBS). Eksperimentalno dobivene vrednosti Kovačevih indeksa, I_K , primenom programa AMDIS (ver. 2.64), u saglasnosti su sa literaturnim podacima [10].

Bakterijski sojevi

Antibakterijska aktivnost etarskog ulja je ispitivana na četiri laboratorijska referentna soja iz American Type Culture Collection (ATCC). Iz grupe Gram-negativnih bakterija: *Escherichia coli* ATCC 13706, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 i *Salmonella enteritidis* ATCC 13076. Iz grupe Gram-pozitivnih bakterija: *Staphylococcus aureus* ATCC 29213. Od prekonoćnih kulturna bakterijskih sojeva su pripremljene suspenzije turbiditeta 0,5 McFarlanda (gustine 10^7 – 10^8 CFU/ml), zavisno od soja – propisano od strane *Clinical and Laboratory Standards Institute*, CLSI [11].

Mikrodilucionna metoda

Upotrebom mikrodilucionne metode određena je minimalna inhibitorna koncentracija (MIC) i minimalna baktericidna koncentracija etarskog ulja (MBC) [11]. U etanolu (70%) napravljene su serije duplih razblaženja ulja i zatim je unešeno u mikrotitar ploče sa 96 udubljenja, po 10 µl u 90 µl inokulisane tečne podloge (Mueller–Hinton bujon). Finalna zapremina u svakom udubljenju je bila 100 µl, finalna gustina bakterijskih ćelija 10^6 CFU/ml, a koncentracije proučavanog ulja su bile u opsegu 0,025–50,0 µl/ml. Mikrotitar ploče su inkubirane 24 h na 37 °C. Svi eksperimeni su urađeni u tri ponavljanja. Korišćene su dve kontrole, hranljivi medijum sa rastvaračem etanolom (negativna kontrola) i antibiotik tetraciklin (pozitivna kontrola). Bakterijski rast je detektovan dodavanjem po 20 µl 0,5% vodenog rastvora trifenil-tetrazolium-hlorida (TTC). MIC je definisana kao najniža koncentracija etarskog ulja pri kojoj nema vidljivog rasta bakterija, crveno obojenih kolonija na dnu udubljenja mikrotitar ploče nakon dodavanja TTC-a. Da bi se odredila MBC, sadržaj udubljenja u kojima nije bilo vidljivog rasta je prenešen na petri ploče sa Mueller–Hinton agarom (MHA) i inkubiran 24 h na 37 °C, nakon čega su brojane porasle kolonije. MBC je ona koncentracija ulja pri kojoj je ubijeno 99,9% od početnog broja bakterijskih ćelija.

Statistička obrada podataka

Rezultati su statistički obrađeni analizom varijanse (ANOVA) sa sigurnošću od 95% ($p \leq 0,05$), primenom programa SPSS Statistics.

REZULTATI I DISKUSIJA

Prinos etarskog ulja *S. montana* iznosio je 0,03% (w/w), što odgovara podacima u literaturi za biljnu vrstu *S. montana* podvrsta *montana* iz Turske [12]. Na osnovu GC i GC–MS analize etarskog ulja identifikovano je 8 komponenata, koje predstavljaju 100% ukupno detektovanih komponenata (tabela 1).

*Tabela 1. Hemski sastav etarskog ulja biljne vrste *S. montana*; RT – retenciono vreme, min; I_K – Kovačev indeks (eksperimentalno utvrđeni retencioni indeksi koiniciranjem sa homologom serijom n-alkana)*

*Table 1. Essential oil composition of *S. montana**

Komponenta	RT / min	I_K	Sadržaj, %
1-Okten-3-ol	9,997	969	2,8
trans-Geraniol	19,748	1228	26,1
Timol	21,108	1270	10,3
trans-Geranil acetat	23,998	1363	7,6
β -Kariofilen	25,339	1414	8,1
(E)- β -Farnezen	26,366	1440	3,0
Germakren D	27,312	1472	37,9
Biciklogermakren	27,712	1497	4,2
Ukupno			100

Seskviterpeni su dominantna klasa jedinjenja etarskog ulja sa glavnom komponentom germakrenom D (37,9%). Sledeća klasa jedinjenja po zastupljenosti su oksidovani monoterpeni, sa geraniolom (26,1%), kao dominantnom komponentom. Timol (10,3%), predstavnik fenolnih jedinjenja, treće je jedinjenje po zastupljenosti. Ovakav sastav etarskog ulja *S. montane* iz Srbije je sličan ulju iste biljne vrste iz Bugarske [13], dok u etarskom ulju *S. montana* iz Irana dominantna komponenta je geraniol [14]. Na osnovu višegodišnjih proučavanja hemijskog sastava etarskog ulja roda *Sideritis* u Turskoj, Kirimer i sar. [12] klasifikovali su ulja u šest glavnih grupa: ulja bogata ugljovodoničnim monoterpenima, ulja bogata oksidovanim monoterpenima, ulja bogata ugljovodoničnim seskviterpenima, ulja bogata oksidovanim seskviterpenima, ulja bogata diterpenima i ostala ulja. Od ukupnog broja vrsta roda *Sideritis* u Turskoj, 57% pripada grupi ulja bogatih ugljovodoničnim monoterpenima. Dve podvrste *S. montana* se svrstavaju u grupu ulja bogatih ugljovodoničnim seskviterpenima, u koju se može uvrstiti i etarsko ulje *S. montana* iz Srbije.

U tabeli 2 prikazani su rezultati antibakterijske aktivnosti etarskog ulja. Rezultati pokazuju izraženu antibakterijsku aktivnost ulja na sve proučavane bakterijske sojeve. Etarsko ulje je delovalo na sve testirane sojeve inhibitorno u intervalu 0,03–0,06 µl/ml i baktericidno u opsegu 0,06–0,12 µl/ml. Referentni antibiotik tetraciklin je delovao inhibitorno u intervalu 0,025–0,10 µl/ml i baktericidno u opsegu 0,025–0,1 µl/ml.

U literaturi ne postoje podaci o antimikrobnom delovanju etarskog ulja *S. montana*. Iscan i sar. [15] mikrodilucionom metodom su proučavali antibakterijsko delovanje etarskih ulja biljnih vrsta *Sideritis cilicica* i *Sideritis bilgerana* na sojevima Gram-negativnih bakterija (*Salmonella typhimurium* i *Escherichia coli*) i Gram-po-positivnih bakterija (*Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus* i *Staphylococcus epidermidis*). Zabeležene su MIC vrednosti u opsegu 0,125–0,50 µg/ml. Pretpostavljeno je da su nosioci ove aktivnosti α -pinen i β -pinen, dominantni konstituenti etarskih ulja obe biljne vrste. U studiji pročavanja antibakterijskog delovanja etarskog ulja *Sideritis italica* utvrđene su MBC vrednosti u intervalu 62,6–125 µg/ml. Takođe je zabeležena veća antibakterijska aktivnost na Gram-negativne bakterije [7].

Tabela 2. Antibakterijska aktivnost (µl/ml) etarskog ulja biljne vrste *S. montana* i tetraciklina (µg/ml)

Table 2. Antibacterial activity (µl/ml) of *S. montana* essential oil and tetracycline (µg/ml)

Bakterijski soj	<i>S. montana</i> L.		Tetraciklin	
	MIC	MBC	MIC	MBC
<i>E. coli</i> ATCC 13706	0,060	0,120	0,100	0,100
<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853	0,030	0,120	0,025	0,025
<i>S. enteritidis</i> ATCC 13076	0,030	0,060	0,025	0,025
<i>S. aureus</i> ATCC 29213	0,060	0,060	0,025	0,025

Mehanizam delovanja terpenoida se intenzivno proučava, ali još uvek u potpunosti nije objašnjena veza između njihove antibiotske aktivnosti i hemijske strukture. Mnoga hemijska jedinjenja u sastavu etarskih ulja reaguju sa proteinima ćelijske membrane. Dokazano je da ciklični ugljovodonici reaguju sa ATPazom, enzimom smeštenim na ćelijskoj membrani koji je okružen molekulima lipida. Takođe ugljovodonici mogu uticati na distorziju proteina u lipidnoj membrani što može dovesti do direktnе interakcije lipofilne komponente sa hidrofobnim delom proteina [16]. Najjače inhibitorno dejstvo na rast bakterija ispoljavaju fenoli i alkoholi, zatim slede aldehidi i ketoni, dok je inhibitorna aktivnost ugljovodoničnih monoterpena najslabija. Slobodna hidroksilna grupa fenola i alkohola je uzrok njihove aktivnosti. Takođe je potvrđeno da terpenoidi imaju različitu antiseptičku moć, zavisno od njihove rastvorljivosti u vodi. Međutim, uočene su i neke anomalije u vezi timola i karvakrola koji i pored slabe rastvorljivosti u vodi ispoljavaju izrazito antiseptičko dejstvo [3]. Mehanički delovanja timola se zasniva na povećanju permeabilnosti ćelijske membrane. Molekul timola može da razori spoljašnju membranu Gram-negativnih bakterija, oslobađajući lipopolisaharide i povećavajući propustljivost ćelijske membrane [17].

Bez obzira na najveću zastupljenost ugljovodoničnih seskviterpena, geraniol i timol, sa zastupljenosti od 36,4% u etarskom ulju *S. montana* su nosioci antibak-

terijske aktivnosti. U studiji koja se bavila proučavanjem odnosa hemijskog sastava i antibakterijske aktivnosti etarskog ulja *Sideritis sipylea* izведен je sličan zaključak [18]. Eksperimentalno utvrđene vrednosti MIC i MBC za sve testirane bakterije bile su niže u odnosu na literaturne podatke. Za razliku od Gram-po-positivnih bakterija, Gram-negativne bakterije se odlikuju većom rezistentnošću prema antisepticima i antibioticima upravo zbog spoljašnje membrane koja deluje kao barijera za ulazak antibakterijskih agenasa [19]. U našem istraživanju odabrane Gram-negativne bakterije nisu ispoljile značajniju rezistentnost. Ovo je naročito značajno kada se radi o soju *P. aeruginosa*, zbog hidrofilnog karaktera površine njegovih ćelija, većina etarskih ulja pokazuje slabiju aktivnost. Evidentna je visoka osetljivost *Escherichia coli*, za koju je zabeležena znatno niža MIC vrednost etarskog ulja u poređenju sa tetraciklinom (tabela 2).

ZAKLJUČAK

Antibiotička rezistencija humanih patogena na brojne komercijalne antibiotike je realnost. Stoga je neophodno razviti prirođeni i bezbedan način za kontrolu infektivnih bolesti, uzrokovanih bakterijama. Cilj ovog rada bio je ispitivanje hemijskog sastava etarskog ulja *S. montana* i njegovog antibakterijskog potencijala. Dominantna klasa jedinjenja etarskog ulja su ugljovodonični seskviterpeni sa glavnom komponentom germakrenom D (37,9%). Geraniol i timol, nosioci anbakterijske aktivnosti, zastupljeni su 36,4%. Relativno niske koncentracije etarskog ulja su ispoljile antimikrobnu aktivnost prema svim ispitanim bakterijama. Rast *Escherichia coli* je značajnije inhibiran etarskim uljem u poređenju sa referentnim antibiotikom. Na osnovu iznetog se može zaključiti da etarsko ulje *S. montana* poseduje visok antibakterijski potencijal i treba ga dalje proučavati.

Zahvalnica

Ovo istraživanje je realizovano u okviru projekta Ministarstva za prosvetu i nauku Republike Srbije (br. 171025).

LITERATURA

- [1] A.D. Russell, Biocide use and antibiotic resistance: The relevance of laboratory findings to clinical and environmental situations, *Lancet Infect. Dis.* **3** (2003) 794–803.
- [2] F.C. Tenover, Mechanisms of antimicrobial resistance in bacteria, *Am. J. Med.* **119** (2006) 62–70.
- [3] S.G. Griffin, S.G. Wyllie, J.L. Markham, D.N. Leach, The role of structure and molecular properties of terpenoids in determining their antimicrobial activity, *Flavour Frag. J.* **14** (1999) 322–332.
- [4] E. González-Burgos, M.E. Carretero, M.P. Gómez-Seranillos, *Sideritis spp.*: uses, chemical composition and

- pharmacological activities – A review, *J. Ethnopharmacol.* **135** (2011) 209–225.
- [5] E. Küpeli, F.P. Sahin, I. Calış, E. Yeşilada, N. Ezer, Phenolic compounds of *Sideritis ozturkii* and their *in vivo* anti-inflammatory and antinociceptive activities, *J. Ethnopharmacol.* **112** (2007) 356–360.
- [6] E.O. Köse, I.G. Deniz, C. Sarıkürkçü, Ö. Aktaş, M. Yavuz, Chemical composition, antimicrobial and antioxidant activities of the essential oils of *Sideritis erythrantha* Boiss. and Heldr. (var. *erythrantha* and var. *cedretorum* P.H. Davis) endemic in Turkey, *Food Chem. Toxicol.* **48** (2010) 2960–2965.
- [7] A. Basile, F. Senatore, R. Gargano, S. Sorbo, M. Del Pezzo, A. Lavitola, A. Ritieni, M. Bruno, D. Spatuzzi, D. Rigano, M.L. Vuotto, Antibacterial and antioxidant activities in *Sideritis italica* (Miller) Greuter et Burdet essential oils, *J. Ethnopharmacol.* **107** (2006) 240–248.
- [8] E. González-Burgos, M.P. Gómez-Serranillos, O.M. Palomino, M.E. Carretero, Aspectos botánicos y farmacológicos del género *Sideritis*, *Rev. Fitoterapia* **9** (2009) 133–145.
- [9] N. Diklić, in: Flora of Serbia, M. Josifović, Ed., Serbian Academy of Sciences and Arts, Belgrade, 1974, pp. 371–372.
- [10] R.P. Adams, Identification of essential oil components by gas chromatography/mass spectroscopy, Allured Publishing Corporation, Carol Stream, 2007.
- [11] CLSI M07-A08, Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically, Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, 2009.
- [12] N. Kirimer, N. Tabanca, T. Özak, G. Tümen, K.H.C. Baser, Essential oils of annual *Sideritis* species growing in Turkey, *Pharm. Biol.* **38** (2000) 106–111.
- [13] M.N. Todorova, R.C. Christov, L.N. Evstatieva, Essential oil composition of three *Sideritis* species from Bulgaria, *J. Ess. Oil Res.* **12** (2000) 418–420.
- [14] M.H. Meshkalsadat, R.S. Sarabi, N. Akbari, M. Pireai, Composition of Essential Oils from *Sideritis montana* of Iran, *Asian J. Chem.* **19** (2007) 5769–5771.
- [15] G. Iscan, N. Kirimer, M. Kurkcuoglu, K.H.C. Baser, Composition and antimicrobial activity of the essential oils of two endemic species from Turkey: *Sideritis cilicica* and *Sideritis bilgerana*. *Chem. Nat. Comp.* **41** (2005) 679–682.
- [16] J. Sikkema, J.A. De Bont, B. Poolman, Mechanisms of membrane toxicity of hydrocarbons, *Microbiol. Rev.* **59** (1995) 201–222.
- [17] S. Burt, Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods - A review, *Int. J. Food Microbiol.* **94** (2004) 223–253.
- [18] V. Gergis, V. Spiliotis, N. Argyriadou, C. Poulos, Relation between the antimicrobial activity and the chemical composition of the essential oil of *Sideritis sspylea* boiss. (Iabiatae), *Flavour Frag. J.* **6** (1991) 93–95.
- [19] G. McDonnell, A. Denver-Russell, Antiseptics and disinfectants: activity, action and resistance, *Clin. Microbiol. Rev.* **12** (1999) 147–179.

SUMMARY**ANTIBACTERIAL POTENTIAL OF THE ESSENTIAL OIL FROM *Sideritis montana* L. (*Lamiaceae*)**

Dragoljub L. Miladinović¹, Budimir S. Ilić¹, Tatjana M. Mihajilov-Krstev², Nikola D. Nikolić³, Violeta N. Milosavljević⁴, Dejan M. Nikolić⁵

¹University of Niš, Faculty of Medicine, Department of Pharmacy, Niš, Serbia

²University of Niš, Faculty of Science and Mathematics, Department of Biology and Ecology, Niš, Serbia

³University of Niš, Laboratory for Geochemistry, Cosmochemistry and Astrochemistry, Niš, Serbia

⁴Elementary school "Desanka Maksimović", Čokot, Serbia

⁵Department of Sanitary Chemistry, Institute of Public Health, Niš, Serbia

(Scientific paper)

The antibacterial potential of essential oil from Serbian *Sideritis montana* L. (*Lamiaceae*) on different bacteria was investigated. The essential oil was obtained from air dried aerial parts of the plant with 0.03% (w/w) yield by hydrodistillation for 4 h using a Clevenger-type apparatus. The essential oil analyses were performed simultaneously by gas chromatography (GC) and gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS) systems. Dominant compounds class is sesquiterpene hydrocarbons. The main constituents of oil were germacrene D (37,9%) and trans-geraniol (26,1%). The antibacterial activity of the essential oil was tested towards 4 different bacteria, laboratory control strain obtained from the American Type Culture Collection (ATCC). Gram negative bacteria were represented by *Escherichia coli* ATCC 13706, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Salmonella enteritidis* ATCC 13076 while researched Gram positive strain was *Staphylococcus aureus* ATCC 29213. Broth microdilution method was used to determine the minimum inhibitory concentration (MIC) and minimum bactericidal concentration (MBC). Essential oil has been found to have antibacterial activity against all tested bacteria, with a MIC values ranging from 0.03 to 0.06 µl/ml and MBC values from 0.06 to 0.12 µl/ml. Reference antibiotic tetracycline was active in concentrations between 0.025 to 0.1 µg/ml. Essential oil from Serbian *S. montana* has high antibacterial potential which should be studied further.

Keywords: *Sideritis montana* • Essential oil • Antibacterial activity