

SVJETLANA S. PAVIČIĆ
ZORAN Z. KUKRIĆ
LJILJANA N.
TOPALIĆ-TRIVUNOVIĆ
ASIMA N. DAVIDOVIĆ
MIRJANA M. ŽABIĆ

Univerzitet u Banja Luci,
Tehnološki fakultet, Banja Luka

NAUČNI RAD

UDK 66.09.58:615.282

DOI: 10.2298/HEMIND0904427P

ANTIOKSIDATIVNA I ANTIMIKROBNA AKTIVNOST EKSTRAKTA *Reynoutria japonica*

Pripremljen je etanolni (50%;v/v) ekstrakt rizoma *Reynoutria japonica* Houtt. sa područja Banje Luke. Suvi ekstrakt je rastvoren u metanolu i određen je sadržaj ukupnih fenola, kao i antimikrobna i antioksidativna aktivnost. Ukupni fenoli su određeni modifikovanom metodom Folin–Ciocalteu, antimikrobna aktivnost metodom praćenja optičke gustoće u funkciji vremena, a antioksidativno djelovanje metodom gašenja stabilnih slobodnih 2,2-difenil-1-pikrilhidrazil (DPPH) radikala FRAP i ABTS metodom. Dobijeni rezultati za antioksidativnu aktivnost su upoređeni sa kontrolnim antioksidantima: vitaminom C, BHA i BHT. Za određivanje antimikrobne aktivnosti ekstrakta kao test mikroorganizmi korištene su čiste kulture: *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* i *Bacillus cereus*, izolovane iz namirnica. U radu su diskutovani rezultati antimikrobnog i antioksidativnog djelovanja ekstrakta rizoma biljke *Reynoutria japonica* u odnosu na sadržaj ukupnih fenola.

Različiti dijelovi biljaka (korijen, list, cvijet, plod, stabljika, kora) uspješno se koriste za liječenje mnogih bolesti. Oni svojim antioksidativnim i antimikrobnim djelovanjem utiču na mnoge fiziološke procese u organizmu, te na taj način štite od slobodnih radikala i razvoja nepoželjnih mikroorganizama.

Slobodni radikali kao izrazito reaktivni intermedijeri dovode do oksidativnog oštećenja tkiva. Svaki tip molekula može biti oštećen ovim procesom. Slobodni radikali u ćeliji mogu nastati usljed različitih vanjskih faktora kao što su ultravioletno i radijaciono zračenje, hemijske reakcije i neki metabolički procesi. Nakupljanje ovih specija uzrokuje značajna oboljenja kao što su kardiovaskularna oboljenja, starenje, kancer, upalna oboljenja i dr. [1–6].

Međutim, za sintetske antioksidanse, kao što su butilirani hidroksitoluen (BHT) i butilirani hidroksianizol (BHA), koji su poznati po svojoj sposobnosti da zaustavljaju lančanu reakciju lipidne peroksidacije, dokazano je da su karcinogeni i da izazivaju oštećenje jetre [7].

Zbog rezistentnosti bakterija na veliki broj antibiotika, ali i sposobnosti biljaka da sintetišu biološki aktivne materije, sve veći značaj dobija primjena preparata biljnog porijekla u kontroli i suzbijanju bakterija. Upotreba biljaka u prehrambenoj industriji, umjesto sintetskih konzervanasa, antioksidanasa ili drugih prehrambenih aditiva, značajno je porasla zadnjih godina [8].

U kineskoj tradicionalnoj medicini *Reynoutria japonica* Houtt. (japanski troskot, rejnutrija) koristi se u tretmanu različitih inflamatornih bolesti, hepatitisa, tumora i diareje [9]. Nedavno je nađeno da ovaj ekstrakt posjeduje antiviralnu aktivnost u odnosu na virus hepatitisa B [10], inhibira bakterijsku DNK polimerazu [11], inhibira aktivnost acil-koenzim A-holesterol-acil transferaze [12].

U ovom radu je ispitan etanolni ekstrakt biljke *R. japonica* i određeno je njegovo antioksidativno i antimikrobno djelovanje.

EKSPERIMENTALNI DIO

Hemikalije

Sve hemikalije koje su korištene u radu bile su čistoće p.a. i nabavljene su od Sigma Chemical Co. (St. Luis, USA), Acros (New Jersey, USA), Aldrich Chemical Co. (Steineheim, Germany), Merck (Darmstadt, Germany), Kemika (Zagreb, Hrvatska).

Hranjivi agar (HA) i hranjivi bujon (HB) nabavljeni su u Institutu za virusologiju, vakcine i serume Torlak, Beograd. Čiste kulture *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* i *Bacillus cereus* su izolovane iz namirnica u Veterinarskom institutu Vaso Butozan, Banja Luka.

Spektrofotometrijsko mjerenje je vršeno na spektrofotometru Jenway 6305.

Priprema biljnog materijala

R. japonica (*Polygonum cuspidatum* Siebold & Zucc.) jeste invazivna alohtona vrsta koja na području Banja Luke raste u velikim, skoro monodominantnim sastojinama na zapuštenim površinama, pored potoka i rijeka, na deponijama i utrinama. To je višegodišnja biljka koja naraste preko tri metra, a pod zemljom formira snažan rizom. Za eksperimente u ovom radu je prikupljen rizom sa područja Banje Luke iz populacije koja se razvija kod Venecija mosta na lijevoj obali Vrbasa. Prikupljeni dijelovi rizoma, promjera do 3 cm, isječeni su na tanke uzdužne trake i sušeni na sobnoj temperaturi, na promaji, 10 dana, zatim su samljeveni u prah i čuvani na suvom i tamnom mjestu do dalje upotrebe.

Priprema ekstrakta

Osušeni biljni prah (5 g) ekstrahuje se sa 50 mL 50% (v/v) etanola na 25 °C tokom 30 min uz snažno miješanje [13]. Nakon toga se ekstrakt centrifugira na 15000 o/min u trajanju od 3 min. Supernatant se sakuplja i uparava do suha na rotacionom vakuum uparivaču na temperaturi 40 °C.

Autor za prepisku: Z. Kukrić, Univerzitet u Banja Luci, Tehnološki fakultet, Stepe Stepanovića 73, 78000 Banja Luka, Bosna i Hercegovina.

E-pošta: zorank@urc.bl.ac.yu

Rad primljen: 13. jul 2009.

Rad prihvaćen: 28. septembar 2009.

Određivanje ukupnih fenola

Ukupni fenoli određuju se modifikovanom metodom Folin–Ciocalteu [14]. Za određivanje su potrebni reagensi: osnovni rastvor Folin–Ciocalteu, radni rastvor Folin–Ciocalteu (osnovni rastvor Folin–Ciocalteu, razrijeđen vodom u omjeru 1:10), NaHCO_3 7,5% (v/v), standardni rastvori galne kiseline u smješi metanol:voda = 50:50 (v/v), koncentracije 50–250 mg/mL.

Mjerenje se vrši tako što se pomiješa 0,75 mL radnog rastvora Folin–Ciocalteu i 0,75 mL NaHCO_3 i 100 μL uzorka rastvorenog u metanolu. Apsorpcija se mjeri nakon 30 min na 765 nm uz slijepu probu (0,75 mL radnog rastvora Folin–Ciocalteu + 0,75 mL NaHCO_3 + 100 μL metanola).

Standardni dijagram se pravi tako što se umjesto 100 μL uzorka u reakcionu smjesu unosi po 100 μL galne kiseline različite koncentracije. Određena je zavisnost za određivanje sadržaja ukupnih fenola, $y = 0,2775x + 0,2752$; $R^2 = 0,9875$; gdje su y apsorpcija i x sadržaj galne kiseline (mmol/g suhog ekstrakta).

Rezultati se izražavaju kao fenoli ekvivalentni galnoj kiselini, GAE, mmol GAE/g suhog ekstrakta, ili kao mg/g suhog ekstrakta.

Određivanje antioksidativne aktivnosti

DPPH metoda

Efekat ekstrakta na DPPH radikal određuje se metodom Liyana-Pathiranan i Shaidi [15]. Pripremi se rastvor 0,135 mM DPPH u metanolu, a zatim se 1 mL ovog rastvora pomiješa sa 1 mL ekstrakta u metanolu (koncentracije ekstrakata 0,02–0,1 mg/mL). Reakciona smješa se nakon miješanja ostavi na tamnom mjestu pri sobnoj temperaturi 30 min. Apsorpcija reakcione smješe mjeri se uz metanol kao slijepu probu na 517 nm.

Antiradikalna aktivnost, AA , je:

$$AA = ((A_{\text{kontrol}} - A_{\text{uzorak}})/A_{\text{kontrol}}) \times 100 \quad (1)$$

gdje je: A_{kontrol} apsorbanca DPPH radnog rastvora + metanol, A_{uzorak} apsorbanca DPPH radnog rastvora + uzorak (ili standardni rastvor).

Rezultati se predstavljaju kao IC_{50} (koncentracija ekstrakta ili referentne supstance koja je potrebna za inhibiranje 50% DPPH radikala).

Dobijena vrijednost AA rastvora ekstrakta se poredi sa referentnim supstancama: BHA i vitamin C.

Totalna antioksidativna aktivnost (FRAP metoda)

Metoda FRAP (Ferric Reducing Antioxidant Power) [16] temelji se na redukciji Fe^{3+} u Fe^{2+} u prisustvu antioksidansa. Nastali Fe^{2+} u prisustvu TPTZ reagensa (2,4,6 tri(2-piridil)-*S*-triazin) stvaraju obojeni kompleks, koji dostiže apsorpcijski maksimum pri 593 nm. Reakcija protiče u kiselom medijumu.

Pripreme se rastvori 300 mM acetatnog pufera pH 3,6 (3,1 g CH_3COONa i 16 mL CH_3COOH se rastvori u

1 dm³ destilovane vode), 10 mM TPTZ reagensa u 40 mM HCl i 20 mM $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$. Svježi radni rastvor se priprema miješanjem 25 mL acetatnog pufera, 2,5 mL TPTZ i 2,5 mL $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$. FRAP radni reagens se mora pripremati uvijek svježi i do upotrebe se čuva u vodenom kupatilu na 37 °C. Uzorka zapremine 200 μL pomiješa se sa 1,8 mL FRAP radnog reagensa, inkubira 10 min na 37 °C i mjeri se apsorbanca na 593 nm.

Standardni dijagram se dobija tako što se pripreme standardni rastvori FeSO_4 , u koncentracijama od 0,1 do 1 mM (zavisnost je linearna u opsegu koncentracija 0,2–1,0 mM FeSO_4). Rezultati se predstavljaju kao mM Fe(II) /g suhog ekstrakta i poredi se sa standardnim jedinjenjima ko što su: vitamin C, BHA i BHT.

ABTS metoda

Za ABTS određivanje koristi se modifikovana metoda Re i saradnika [17]. Pripreme se osnovni rastvori: 7mM ABTS reagensa (2,2-azino-bis-(3-etil-benzotiazolin-6-sulfonska kiselina) diamonium so) i 2,4 mM rastvor K-persulfata. Radni rastvor se priprema tako što se miješaju osnovni rastvori u jednakim zapreminama i ostave da reaguju na sobnoj temperaturi u tamnom 12 h. Nakon toga se 1 mL radnog rastvora ABTS razblaži sa 60 mL metanola dok se ne dobije ABTS rastvor čija je apsorpcija 0,706±0,001 na 734 nm. Radni rastvor ABTS se priprema svježi za svako mjerenje. Mjerenje se vrši tako što se pomiješaju 1 mL ABTS rastvora i 1 mL ekstrakta, i nakon 7 min se izmjeri apsorpcija na 734 nm.

Postotak inhibicije, I , računa se prema sljedećoj jednačini:

$$I = ((A_{\text{kontrol}} - A_{\text{uzorak}})/A_{\text{kontrol}}) \times 100 \quad (2)$$

gdje je: A_{kontrol} apsorbanca ABTS rastvora + metanol, A_{uzorak} apsorbanca ABTS rastvora + uzorak (odnosno standardni rastvor).

Dobijena vrijednost I za ispitivani ekstrakt se poredi sa referentnim supstancama: BHT, BHA i vitamin C.

Priprema kultura i određivanje antimikrobne aktivnosti

Za određivanje antimikrobnog djelovanja ekstrakta rizoma *R. japonica* korištene su čiste kulture: *E. coli*, *S. aureus* i *B. cereus*, koje su izolovane iz namirnica i uzgajane na hranjivom agaru. Da bi se dobio homogen inokulum, vršeno je dvostepeno precjepljivanje. U prvoj fazi je ezom, sa kosog agara, dio kulture prenesen u 10 mL hranjivog bujona, sadržaj u epruveti je homogenizovan i ostavljen na inkubaciju 24 h, na temperaturi od 37 °C. Nakon inkubacije iz homogenizovane tečne kulture pipetom je prenesen 1 mL u 10 mL hranjivog bujona i ponovo inkubiran 24 h na 37 °C.

Određivanje antimikrobnog dejstva metanolnog rastvora ekstrakta rizoma *R. japonica* vršeno je mjerenjem optičke gustoće bakterijske suspenzije na 600 nm. Funkcionalna zavisnost apsorbanacije od logaritma broja

mikroorganizama, N , dobijena je izradom standardnog dijagrama. Za mjerenje apsorbancije i određivanje broja bakterija napravljena je serija razrjeđenja, u kojoj je svaka sljedeća epruveta sadržavala pola prethodne bakterijske suspenzije. Razrjeđenja su pravljena u hranjivom bujonu, pa je kao slijepa proba u mjerenju apsorbancije korišten sterilni hranjivi bujon. Za svako razrjeđenje je istovremeno mjerena apsorbancija i pravljena serija razrjeđenja za nacjepljivanje na hranjivi agar i određivanje broja bakterija u mL odgovarajuće suspenzije, odnosno broja izraslih kolonija na agarnoj ploči (colony forming units, CFU). Na taj način su određene zavisnosti za svaku kulturu i iznose za *E. coli*: $y = 9,2049x + 5,1975$; $R^2 = 0,9629$; *S. aureus*: $y = 4,0391x + 6,9824$; $R^2 = 0,9716$; *B. cereus*: $y = 7,8857x + 5,5788$, $R^2 = 0,9038$, gdje je $y \log N$, N – ukupan broj bakterija, a x apsorbancija bakterijske suspenzije.

Mjerenje apsorbancije je vršeno tako što su pripremane po dvije serije epruveta. Prva serija za određivanje uticaja biljnog ekstrakta na mikroorganizam sadržavala je 5 mL hranjivog bujona, 0,5 mL određene bakterijske kulture i 0,5 mL metanolnog rastvora ekstrakta rizoma *R. japonica* koncentracije 10 mg/mL (konačna koncentracija 0,83 mg/mL). Kao slijepa proba za ovu seriju korištena je epruveta sa 5,5 mL hranjivog bujona i 0,5 mL rastvora ekstrakta. Druga serija epruveta sadržavala je 5,5 mL hranjivog bujona i 0,5 mL bakterijske kulture, a slijepa proba za ovu seriju je sterilni hranjivi bujon. Kultura koja je korištena u obje serije je poticala iz istog početnog precjepljivanja. Početni broj mikroorganizma je bio oko 10^6 /mL. Sve epruvete su stavljene u inkubator na 37 °C, a apsorbancija je mjerena svaki sat u ukupnom trajanju od 6 sati.

Računanje se vrši dvojako. Iz eksponencijalne faze koja predstavlja rast mikroorganizama, koji se podvrgava zakonu kinetike prvog reda [18], može se izračunati specifična brzina rasta mikroorganizama, kao i poluvrijeme reakcije, tzv. generacijsko vrijeme. Odnos generacijskih vremena rasta mikroorganizama sa prisustvom i bez prisustva ekstrakta govori o uticaju ekstrakta na brzinu rasta mikroorganizama.

Drugi način je da se računa odnos ukupnog broja mikroorganizama sa i bez prisustva ekstrakta.

REZULTATI

Određivanje ukupnih fenola

Određen je sadržaj ukupnih fenola u etanolnom ekstraktu *R. japonica* koji iznosi 664 ± 15 mg GAE/g ekstrakta (srednja vrijednost 5 mjerenja).

Ispitivanje antioksidativne aktivnosti (DPPH metod)

Poredeći rezultate iz tabele 1 može se vidjeti da je djelovanje ekstrakta rizoma *R. japonica* oko 2 puta manje u odnosu na vitamin C, odnosno oko 1,5 puta manje

od BHA, dva jedinjenja koji su izraziti i veoma upotrebjavani antioksidansi.

Tabela 1. IC_{50} vrijednost ispitivanih uzoraka
Table 1. IC_{50} values of tested samples

Uzorak	IC_{50} / μ g/mL
Vitamin C	$6,25 \pm 0,3^a$
BHA	$9,39 \pm 0,5$
Ekstrakt <i>R. japonica</i>	$13,68 \pm 0,8$

^aSrednja vrijednost 5 mjerenja \pm SD (standardna devijacija)

FRAP metoda

Rezultati iz tabele 2 ukazuju na značajnu ukupnu antioksidativnu aktivnost ekstrakta rizoma *R. japonica*.

Tabela 2. Vrijednosti ukupne antioksidativne aktivnosti ispitivanih uzoraka
Table 2. Total antioxidative activity values of tested samples

Uzorak	mM (FeII)/g ekstrakta
Vitamin C	$71,54 \pm 0,07^a$
BHA	$73,64 \pm 0,05$
BHT	$8,32 \pm 0,44$
Ekstrakt <i>R. japonica</i>	$29,84 \pm 0,51$

^aSrednja vrijednost 5 mjerenja \pm SD (standardna devijacija)

ABTS⁺ metoda

Iz tabele 3 vidi se da ekstrakt rizoma *R. japonica* ima sličnu aktivnost na ABTS⁺ radikale kao standardni antioksidansi BHA i BHT, a znatno veću u odnosu na vitamin C.

Tabela 3. Vrijednosti inhibicije, I, ispitivanih uzoraka
Table 3. Inhibition, I, values of tested samples

Uzorak (15 μ g/mL)	I / %
Vitamin C	$74,75 \pm 4,98^b$
BHA	$98,76 \pm 0,73$
BHT	$93,37 \pm 4,61$
<i>R. japonica</i>	$98,09 \pm 0,77$

^aSrednja vrijednost 5 mjerenja \pm SD (standardna devijacija)

Antimikrobna aktivnost

Mjerenjem optičke gustoće bakterijskih suspenzija odabranih test mikroorganizama sa i bez dodatka ekstrakta dobijene su odgovarajuće krive rasta bakterija na osnovu kojih je izračunat uticaj rastvora suhog ekstrakta na: a) brzinu rasta bakterija i b) ukupan broj bakterija. Način računanja je prikazan na primjeru uticaja rastvora suhog ekstrakta *R. japonica* u metanolu, koncentracije 0,83 mg/mL (slika 1) na *E. coli*.

Računanje antimikrobne aktivnosti

a) Uticaj ekstrakta rizoma *R. japonica* na brzinu rasta bakterija je:

$$L = (1 - T_{1/2}/T_{1/2E}) \times 100 \quad (3)$$

gdje su: $T_{1/2}$ generacijsko vrijeme rasta mikroorganizma:

$$T_{1/2} = 0,693/k$$

k : specifična brzina rasta bakterija (h^{-1}), E : ekstrakt.

b) Uticaj ekstrakta rizoma *R. japonica* na ukupan broj bakterija, M , je:

$$M (\%) = (1 - a/b) \times 100 \quad (4)$$

gdje su: a i $b = (\log N_{\text{stac. faza}} - \log N_{\text{lag. faza}})$, za slučaj sa ekstraktom i bez ekstrakta, redom.

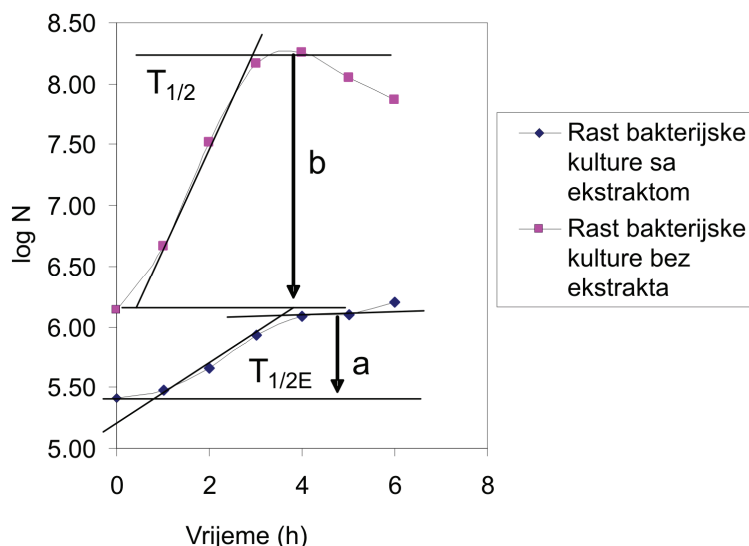
Rezultati iz tabele 4 govore da je uticaj ekstrakta rizoma *R. japonica* na brzinu rasta kulture *S. aureus* najmanji, ali je njegov uticaj na ukupan broj mikroorganizama iste kulture najveći. Takođe, ovi eksperimenti su pokazali da ovaj ekstrakt ima određeni inhibitorski učinak na rast bakterijske kulture i u znatno nižim koncentracijama nego što su minimalne inhibitorne koncentracije (MIC), dobijene za istu vrstu [19].

DISKUSIJA

Antioksidativni potencijal ekstrakta *R. japonica* određen je na osnovu sposobnosti da redukuje Fe^{3+} u Fe^{2+} uz TPTZ reagens. Ukupna antioksidativna aktivnost suhog ekstrakta rizoma *R. japonica* iznosi 29,84

mM (FeII)/g ekstrakta i manja je od vrijednosti za standardna jedinjenja (za vitamin C je 71,54 mM (FeII)/g ekstrakta, za BHA iznosi 73,64 mM (FeII)/g ekstrakta), a veća je od vrijednosti za BHT koja iznosi 8,32 mM (FeII)/g ekstrakta, što ukazuju na značajnu ukupnu antioksidativnu aktivnost ekstrakta rizoma *R. japonica*. DPPH je stabilni radikal koji se često koristi za procjenu antioksidativne aktivnosti prirodnih produkata [20], pa je ova metoda korištena i u ovom radu za određivanje antioksidativne aktivnosti ekstrakta rizoma *R. japonica*. IC_{50} ekstrakta (tabela 1) iznosi 13,68 $\mu\text{g/mL}$, dok za vitamin C i BHA ova vrijednost je 6,25 i 9,39 $\mu\text{g/mL}$. Takođe, vrijednost IC_{50} ekstrakta rizoma *R. japonica* je nešto veća od ekstrakta *Acacia confusa* (5 $\mu\text{g/mL}$) [21], a manja od *Uncaria tomentosa* (18 $\mu\text{g/mL}$) [22], *Anthriscus cerefolium* (45 $\mu\text{g/mL}$) [23] i *Polygonum aviculare* (50 $\mu\text{g/mL}$) [24].

ABTS, protonirani radikal, ima karakterističan maksimum apsorpcije na 734 nm čija se vrijednost smanjuje njegovim gašenjem [25]. Rezultati dati u tabeli 3 ukazuju da ekstrakt rizoma *R. japonica* ima veliki (99,1%) uticaj na ABTS^+ radikale koji je sličan uticaju BHA na taj isti radikal (98,7%), nešto veći od BHT (93,4%) i znatno veći nego vitamin C (74,8%). Iz tabele 1 i 3 vidi se da je uticaj ekstrakta na ABTS^+ radikal veći nego na DPPH radikal. Nedavno je utvrđeno [26] da različiti faktori, kao što su stereoselektivnost slobodnih radikala ili



Slika 1. Uticaj ekstrakta rizoma *R. japonica* na rast *E. coli*.

Figure 1. Influence of the *R. japonica* extract on the *E. coli* growth.

Tabela 4. Uticaj ekstrakta rizoma *R. japonica* na brzinu rasta, L , i na ukupan broj bakterija, M

Table 4. Influence of *R. japonica* extract on the growth rate, L , and the total number of bacteria, M

Bakterija	$T_{1/2}$ bez ekstrakta, h	$T_{1/2E}$ sa ekstraktom, h	L / %	a	b	M / %
<i>E. coli</i>	0,92	2,26	59,3	1,07	2,12	49,6
<i>B. cereus</i>	0,48	1,85	73,6	1,12	2,24	50,1
<i>S. aureus</i>	3,16	6,64	52,1	6,34	1,21	71,9

rastvorljivost ekstrakata u različitim testiranim sistemima, mogu uticati na učinak tih ekstrakata na gašenje slobodnih radikala. Wang i saradnici [27] pokazali su da neka jedinjenja koja pokazuju antioksidativnu aktivnost prema ABTS⁺ radikalima ne pokazuju tu aktivnost prema DPPH radikalima. U našem radu to nije slučaj, jer ekstrakt rizoma *R. japonica* pokazuje istovremeno i ukupnu antioksidativnu aktivnost i visoku aktivnost prema gašenju ABTS⁺ i DPPH radikala. Poredeći generacijska vremena test mikroorganizama (tabela 4) bez prisustva ekstrakta može se vidjeti da najsporije raste *S. aureus*, *E. coli*, te *B. cereus*. Ekstrakt rizoma *R. japonica* najviše utiče na smanjenje brzine rasta kod *B. cereus*, *E. coli*, pa na *S. aureus*, odnosno izraženo u procentima *L* iznosi 73,6, 59,3 i 52,1%. Što se tiče ukupnog broja bakterija najveće smanjenje *M* je kod *S. aureus* (71,9%), dok je to smanjenje kod *E. coli* i *B. cereus* približno jednako (oko 50%). Fenoli su veoma zastupljeni u biljnom svijetu i dokazano je da imaju veliki broj bioloških funkcija, uključujući i antioksidativnu aktivnost [27,28] i antimikrobno djelovanje [19]. Iz prikazanih rezultata se vidi da ekstrakt rizoma *R. japonica* ima visok sadržaj ukupnih fenola, izraženih kao mg ekvivalenti galne kiseline/g ekstrakta (664±15). Vrsta *A. confusa* takođe ima visok sadržaj ukupnih fenola u ekstraktima kore, 471±44 mg/g, srčike, 530 ± 14 mg/g, a sadržaj fenola u ekstraktu *P. aviculare* je 677±63 mg/g [24].

Izražena antioksidativna aktivnost ekstrakata kod *E. ulmoides*, *A. confusa* i *P. aviculare* dovodi se u vezu sa visokim sadržajem ukupnih fenola [21,24]. Takođe se smatra da je visok sadržaj fenola u ekstraktu rizoma *P. cuspidatum* (*R. japonica*) odgovoran za značajnu antimikrobnu aktivnost [19]. Na osnovu navedenog, može se pretpostaviti da je visoka antioksidativna i značajna antimikrobna aktivnost ekstrakta utvrđena u ovom radu direktno povezana sa izuzetno visokim sadržajem ukupnih fenola.

ZAKLJUČAK

Ekstrakt rizoma *Reynoutria japonica* Houtt. pokazuje značajno antioksidativno i antimikrobno djelovanje. Ovo je u saglasnosti sa detektovanim sadržajem ukupnih fenola u biljnom materijalu koji iznosi 664±15 mg GEA/g ekstrakta.

Zahvalnost

Rad je dio rezultata istraživanja na projektu Antioksidativna i antimikrobna aktivnost odabranih biljnih vrsta sa područja Republike Srpske, kojeg finansira Ministarstvo nauke i tehnologije Republike Srpske u 2008. godini.

LITERATURA

- [1] K. Bauerova, A. Bezek, A role of reactive oxygen and nitrogen species in pathogenesis of rheumatoid disease, *Gen. Physiol. Biophys.* **18** (1999) 15–20.
- [2] T. Finkel, N.J. Holbrook, Oxidants, oxidative stress and biology of ageing, *Nature* **408** (2000) 239–2479.
- [3] B. Halliwell, J.M.C. Gutteridge, Cross CE free-radicals, antioxidants and human diseases: Where are we now?, *J. Lab. Clin. Med.* **119** (1992) 598–620.
- [4] J.A. Knight, Diseases related to oxygen-derived free radicals, *Ann. Clin. Lab. Sci.* **25** (1995) 111–121.
- [5] W.F. Petrone, D.K. English, K. Wong, J.M. Mccord, Free-radicals and inflammation: superoxide dependent activation of a neutrophil activating factor in plasma, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* **77** (1980)1159–1163.
- [6] F. Visioli, J.F. Kearey, B. Halliwell, Antioxidants and cardiovascular diseases: panaceas or tonics for tired sheep?, *Cardiovasc. Res.* **47** (2000) 409.
- [7] I. Nobuyuki, F. Shoji, T. Hiroyuki, Carcinogenicity and Modification of the Carcinogenic Response by BHA, BHT and Other Antioxidants, *Crit. Rev. Toxicol.* **15** (1985) 109–150.
- [8] G.A. Al-Bakri, U.F. Affi, Evaluation of antimicrobial activity of selected plant extracts by rapid XTT colorimetry and bacterial enumeration, *J. Microbiol. Meth.* **68** (2007)19–25.
- [9] J. Choi, C.C. Conrad, C.A. Malakowsky, J.M. Talent, C.S. Yuan, R.W. Gracy, Flavones from *Scutellaria baicalensis* Georgi attenuate apoptosis and protein oxidation in neuronal cell lines, *Biochim. Biophys. Acta* **1571** (2002) 201–210.
- [10] J.S. Chang, H.W. Liu, K.C. Wang, M.C. Chen, L.C. Chiang, Y.C. Hua, C.C. Lin, Ethanol extract of *Polygonum cuspidatum* inhibits hepatitis B virus in a stable HBV-producing cell line, *Antiviral Res.* **66** (2005) 29–34.
- [11] V.R. Hegde, H. Pu, M. Patel, T. Black, A. Soriano, W. Zhao, V.P. Gullo, T.M. Chan, Two new bacterial DNA primase inhibitors from the plant *Polygonum cuspidatum*, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **14** (2004) 2275–2277.
- [12] C.S. Park, Y.C. Lee, J.D. Kim, H.M. Kim, C.H. Kim, Inhibitory effects of *Polygonum cuspidatum* water extract (PCWE) and its component rasveratrol on acyl-coenzyme A-cholesterol acyltransferase activity for cholesterol ester synthesis in HepG2 cells, *Vasc. Pharmacol.* **40** (2004) 279–284.
- [13] S.T. Chang, J.H. Wu, S.Z.Z. Wang, P.L. Kang, N.S. Yang, L.F. Shyur, Antioxidant activity of extracts from *Acacia confuse* bark and heartwood, *J.Agric. Food Chem.* **49** (2001) 3420–3424.
- [14] K. Wolfe, X. Wu, R.H. Liu, Antioxidant activity of apple peels, *J. Agric. Food Chem.* **51** (2003) 609–614.
- [15] C.M. Liyana-Pathiranan, F. Shahidi, Antioxidant activity of commercial soft and hard wheat (*Triticum aestivum* L) as affected by gastric pH conditions, *J. Agric. Food Chem.* **53** (2005) 2433–2440.
- [16] I.F. Benzie, J.J. Strain, The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of “antioxidant power”: The FRAP assay, *Anal. Biochem.* **239** (1996) 70–76.
- [17] R. Re, N. Pellegrini, A. Proteggente, A. Pannala, M. Yang, C. Rice-Evans, Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay, *Free Radical Biol. Med.* **26** (1999) 1231–1237.

- [18] E.A. Daawes, Quantitative Problems in Biochemistry, 5th ed., Churchill Livingstone, Edinburgh & London, 1972, p. 312.
- [19] B. Shan, Y.Z. Cai, J.D. Brooks, H. Corke, Antibacterial properties of *Polygonum cuspidatum* roots and their major bioactive constituents, *Food Chem.* **109** (2008) 530–537.
- [20] C. Hu, D.D. Kitts, Studies on the antioxidant activity of *Echinacea* root extract, *J. Agric. Food Chem.* **48** (2000) 1466–1472.
- [21] S.T. Chang, J.H. Wu, S.Y. Wang, P.L. Kang, N.S. Yang, L.F. Shyur, Antioxidant activity of extracts from *Acacia confuse* bark and heartwood, *J. Agric. Food Chem.* **49** (2001) 3420–3424.
- [22] S. Fejes, A. Blazovics, A. Lugasi, E. Lemberkovic, G. Petri, A. Kery, *In vitro* antioxidant activity of *Anthriscus cerefolium* L. (Hoffm.) extracts, *J. Ethnopharmacol.* **69** (2000) 259–265.
- [23] M. Sandoval, R.M. Charbonnet, N.N. Okuhama, J. Roberts, Z. Krenova, A.M. Trentacosti, M.J. Miller, Cat's claw inhibits TNF α production and scavenges free radicals: Role in cytoprotection, *Free Radical Biol. Med.* **29** (2000) 71–78.
- [24] C.Y. Hsu, Antioxidant activity of extract from *Polygonum aviculare* L., *Biol. Res.* **39** (2006) 281–288.
- [25] S. Mathew, T.E. Abraham, *In vitro* antioxidant activity and scavenging effects of *Cinnamomum verum* leaf extract assayed by different methodologies, *Food Chem. Toxicol.* **44** (2006) 198–206.
- [26] L. Yu, S. Haley, J. Perret, M. Harris, J. Wilson, M. Qian, Free radical scavenging properties of wheat extracts, *J. Agric. Food Chem.* **50** (2002) 1619–1624.
- [27] M. Wang, J. Li, M. Rangarajan, Y. Shao, E.J. La Voie, T. Huang, C. Ho, Antioxidative phenolic compounds from Sage (*Salvia officinalis*), *J. Agric. Food Chem.* **46** (1998) 4869–4873.
- [28] G.C. Yen, C.L. Hsieh, Antioxidant activity of extracts from Du-zhong (*Eucommia ulmoides*) toward various lipid peroxidation models *in vitro*, *J. Agric. Food Chem.* **46** (1998) 3952–3957.

SUMMARY

ANTIOXIDATIVE AND ANTIMICROBIAL ACTIVITY OF *Reynoutria Japonica* EXTRACTS

Svetlana S. Pavičić, Zoran Z. Kukrić, Ljiljana N. Topalić-Trivunović, Asima N. Davidović, Mirjana M. Žabić

University of Banja Luka, Faculty of Technology, Stepe Stepanovića 73, 78000 Banja Luka, Bosnia and Herzegovina

(Scientific paper)

Ethanollic (50%, v/v) extract of *Reynoutria japonica* Houtt. rhizome from the Banja Luka region was prepared. The dry extract was dissolved in methanol, and total phenols content, antimicrobial and antioxidative activities were determined. The total phenols content was determined using modified Folin–Ciocalteu method, the antimicrobial activity by monitoring the optical density, and antioxidative activity by the method of quenching stable free 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) radicals by FRAP and ABTS methods. The antioxidative activity results were compared with control antioxidants: vitamin C, BHA and BHT. In order to determine the antimicrobial extract activity, *E. coli*, *S. aureus* and *B. cereus* were used as test microorganisms. The paper discusses the results of antimicrobial and antioxidative activities of the *R. japonica* extract with respect to extract concentration as well as to total phenols content. The extract of *R. japonica* rhizome shows both, a significant overall antioxidant activity (29.84 mM (FeII)/g of extract) and high activity in quenching DPPH ($IC_{50} = 13.68 \mu\text{g/mL}$) and ABTS⁺ (99.1%) radicals. It was found that the *R. Japonica* extract had greater impact on growth rate reduction of *B. cereus*, *E. coli*, than *S. aureus*, expressed in percentages of growth rate, *L*, 73.6, 59.3 and 52.1% respectively. The greatest decrease in total bacterial count, *M*, was observed in *S. aureus* (71.9%), while the decrease in *E. coli* and *B. cereus* was approximately equal (about 50%). The total phenols content, expressed as mg of galic acid equivalents/g of extract was 664±15. The high antioxidant and significant antimicrobial activity of the *R. japonica* extract determined in this work is associated with extremely high total phenols content.

Ključne reči: *Reynoutria japonica* • Rizom • Antimikrobno djelovanje • Antioksidansi
Key words: *Reynoutria japonica* • Rhizome • Antimicrobial activity • Antioxidants