

## МЕТОДОЛОГИЈА ОДРЕЂИВАЊА АНТИБАКТЕРИЈСКЕ АКТИВНОСТИ БИЉНИХ ЕКСТРАКТА ДИСК-ДИФУЗИОНОМ МЕТОДОМ *IN VITRO*

Милан Новаковић<sup>1</sup>, Слободан Јанковић<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup> Медицински факултет Универзитета у Крагујевцу

<sup>2</sup> Служба за Клиничку фармакологију, Клинички центар Крагујевац

## THE METHODOLOGY OF DETERMINING ANTIBACTERIAL ACTIVITY OF PLANT EXTRACTS WITH DISK-DIFFUSION METHOD *IN VITRO*

Milan Novaković<sup>1</sup>, Slobodan Janković<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup> Medical Faculty, University of Kragujevac

<sup>2</sup> Clinical Pharmacology Department, Clinical Center Kragujevac

Примљен/Received: 18.7.2011.

Прихваћен/Accepted: 8.8.2011.

### СКРАЋЕНИЦЕ

CLSI - Clinical and Laboratory Standards Institute

MH – Mueller Hinton

MIC - Минимална инхибиторна концентрација

ATTC - American Type Culture Collection

### САЖЕТАК

У развоју лековитих препарата са анти-микробним дејством биљног порекла, једна од најзначајнијих фаза је испитивање анти-микробног ефекта *in vitro*. Диск-дифузиони поступак се изводи у Петријевој кутији на чврстој хранљивој подлози. Дискови са одређеним концентрацијама антибиотика, чистим супстанцама или екстрактима биљака се стављају на површину подлоге која је претходно засејана чистом бактеријском културом. Способност раста и размножавања соја засејаног на подлози зависи од његове осетљивости на примењену супстанцу, тако да се око диска гради бистра провидна зона кружног облика у којој нема раста бактерија, уколико ефекат постоји. Минимална инхибиторна концентрација (MIC) се одређује екстраполацијом ре-

г्रेसионе линије концентрација активне суп-станце/полу-пречник или површина где постоји инхибиција раста микроорганизама. Оваква метода испитивања осетљивости микроорганизама на антибиотике, чисте суп-станце или биљне екстракте је веома осетљива и специфична.

**Кључне речи:** биљни екстракти, анти-биотици, диск-дифузиони метод, одређивање антимикробне осетљивости

### ABSTRACT

During the process of developing herbal drugs with antimicrobial action, one of the most important phases is testing of antimicrobial activity *in vitro*. The disk-diffusion method is performed in Petri dish, on solid feeding surface. The disks with definite concentrations of antibiotics, pure substances or plant extracts are placed on the top of feeding plates previously inoculated with pure bacterial culture. Growth of the bacterial culture depends on its susceptibility to a tested substance; if the substance has antibacterial effect, a clear zone free of bacteria will form around the disk. Minimal inhibitory concentration (MIC) of the tested substance is determined

**Контакт:** Милан Новаковић

Медицински факултет Универзитета у Крагујевцу, Светозара Марковића 69  
e-mail: milan.novakovic@medf.kg.ac.rs

by extrapolation of the regression line: concentration of the tested substance/radius or surface of area where growth of bacteria was inhibited. This method of testing microbial susceptibility to antibiotics, pure substances or plant extracts is highly sensitive and specific.

**Кључне речи:** herbal extracts, antibiotics, disk diffusion, the determination of antimicrobial susceptibility

## УВОД

Различити делови лековитих биљака (корен, лист, цвет, плод, стабљика, кора) се користе за израду лековитих препарата. Један део лековитих биљака садржи активне принципе са антимикуробним дејством, који тек треба да нађу право место у лечењу и превенцији инфекција. Употреба биљака у медицини и фармацији, уместо синтетичких лекова, значајно је порасла током последњих година<sup>1</sup>. Фитотерапија је данас најзаступљенија у најразвијенијим земљама, па се тако процењује да се између 60% и 80% укупне светске популације ослања на употребу лековитог биља, због чега оно представља веома значајан извор лекова и лековитих сировина<sup>2</sup>. Све више се истражује лековито деловање биљака коришћених у традиционалној медицини, посебно оних које су према предању имале добар ефекат у лечењу инфекција<sup>3</sup>. Ако се узму у обзир сви лекови који се у свету данас користе за лечење заразних болести, чак 65% има биљно порекло<sup>4</sup>. У развоју оваквих лековитих препарата, једна од најзначајнијих фаза је испитивање антимикуробног ефекта *in vitro*.

За одређивање *in vitro* осетљивости бактерија на антибиотике, чисте супстанце и екстракте биљака најчешће се користи диск-дифузиона метода. Поступак је познат и као Кирбу-Бауеров тест у којој је Mueller Hinton (МН) агар изабран као подлога за тестирање<sup>5</sup>. Ова метода се дуго користи у микробиолошким лабораторијама и релативно брзо даје резултате (18-24 часова након расејавања бактерија и постављања дискова на подлогу), што омогућује испитивање осетљивости бактерија на више антибиотика, супстанци или екстраката биљака истовремено. Диск-дифузиони поступак се изводи у Петријевој кутији на чврстој хранљивој подлози одређеног састава – МН агар. Дискови са одређеним концентрацијама антибиотика, чистим супстанцама или екстрактима биљака се стављају на површину подлоге која је претходно засејана чистом бактеријском културом. Будући да де-

бљина и састав хранљиве подлоге могу утицати на резултате, оне морају бити увек исте. Након инкубације мери се полупречник зоне инхибиције, односно површина зоне инхибиције раста бактерија, па се према стандарду CLSI<sup>6</sup> испитивани сој сврстава у категорије осетљив, умерено осетљив и отпоран<sup>7</sup>. Различити чиниоци могу утицати на резултате испитивања осетљивости бактерије на антибиотике, чисте супстанце или екстракте биљака, тако да у току поступка мерења сви параметри морају бити константни. Величина зоне инхибиције, односно њен полупречник и површина су променљиве варијабле. Антибактеријска активност тестираних антибиотика, чистих супстанци или екстраката биљака зависи од: температуре, дужине инкубације бактерија, дебљине хранљиве подлоге, рН вредности подлоге, протеклог временског периода од када су антибиотици или екстракти произведени односно добијени, начина добијања биљних екстраката итд<sup>7</sup>.

Циљ овог рада је да се прикаже методологија одређивања антибактеријске активности чистих супстанци и биљних екстраката диск-дифузионом методом *in vitro* и њиховог упоређења са активностима стандардних антибиотика који се користе у клиничкој пракси.

## ОДРЕЂИВАЊЕ БИЉНОГ МАТЕРИЈАЛА И ДОБИЈАЊЕ ЕКСТРАКТА БИЉАКА

Биљни материјал се сакупља са различитих локалитета у фази развоја биљке у којој се она иначе користи у исхрани или за медицинске сврхе. Узорци биљака који су сакупљени одређују се на нивоу врсте, подврсте или варијетета помоћу дихотомних кључева за детерминацију у зависности од таксона<sup>8</sup>. Називи таксона усклађени су са таксономском поделом датом у Бечком коду<sup>9</sup> и депонују се у хербаријуму одговарајућег универзитетског одека. Сви узорци биљног материјала (целе биљке или делови) се чувају у двоструким папирним џаковима на тамном и сувом месту да не би дошло до губитка испарљивих једињења до момента екстракције (не дуже од 30 дана).

Сушење се обавља на природан начин, тако што се биљке простиру у танком слоју, на промајном месту, заштићеном од светлости, уз свакодневно превртање. Након сушења биљке, врши се екстракција са дестилованом водом коју прописује фармакопеја<sup>10</sup>. Након тога се приступа филтрацији и цеђењу. Водени екстракт се добија после упаравања

на ротационом вакуум упаривачу (нпр. Ика RV 10D, Немачка) на температури од 40°C и са подпритиском од 300 mbar. Узорак се потом преноси у вакуум екдикатор ради сушења на собној температури до константне масе. Добијени екстракт се мери на ваги и на тај начин се добија принос које се изражава процентуално у односу на суву масу.

## СУПСТАНЦЕ И БАКТЕРИЈСКИ СОЈЕВИ

Супстанце високе чистоће које се користе у испитивањима се набављају од специјализованих светских произвођача са добром произвођачком праксом (нпр. од компаније Sigma Aldrich, USA). Бактеријски сојеви који се користе морају бити стандардизовани, са одређеним АТТС (American Type Culture Collection) кодом (нпр. сојеви компаније MicroBioLogics, Maryland, USA). Референтне бактеријске културе од произвођача долазе у тзв. KWIK-STIK™ паковању, у лиофилизованом форми. KWIK-STIK™ се припрема у суспендујућем медијуму који се састоји од желатина, обраног млека, аскорбинске киселине, декстрозе и угља. Желатин је носач за микроорганизме. Обрано млеко, аскорбинска киселина и декстроза штите интегритет ћелијског зида микроорганизма током процеса лиофилизације и чувања. Угаљ неутралише токсине који се могу формирати током лиофилизације. Свака KWIK-STIK™ јединица садржи лиофилизовану пелету једног соја микроорганизма, резервоар са флуидом за хидрацију и брис за инокулацију. Сваки комплет се налази у фолији која садржи и десикант да би се спречило накупљање влаге. Бактерије су намењене за *in vitro* употребу.

## ПОСТУПАК ОТВАРАЊА KWIK-STIK™ ЈЕДИНИЦЕ И ДОБИЈАЊЕ ПРИМАРНЕ КУЛТУРЕ

KWIK-STIK™ јединица се изводи из фрижидера (чува се на температури од 2-8°C) и нестворена се остави да достигне собну температуру. Затим се асептичном техником отвори фолија и скине налепница. Након тога се ослободи средство за хидрацију ломљењем ампуле и остави да оно дође до дна брис-система у коме се налази желатинозни диск. Стиском два прста поломи се пелета у доњем делу система и мућка све док се не постигне униформна величина честица. Затим се бактерије пренесу на адекватни, неселективни, хранљиви или обогаћени агар. Уз примену притиска, јединица се затим ротира и иноку-

лише кружна површина подлоге (дијаметра 10-20 mm). Истом KWIK-STIK™ јединицом се настави такво засејавање на преосталом делу подлоге. Инокулисана подлога се затим инкубира на одговарајућој температури и при условима који одговарају датом микроорганизму. На тај начин се добија примарна култура, која се даље користи за добијање субкултура. Када се добије примарна култура, помоћу езе и у стерилним условима врши се пресејавање на МН коси агар. Затим се култура инкубира на температури од 37 °C у сушници (нпр. E28; BINDER, Немачка) у току 24 сата.

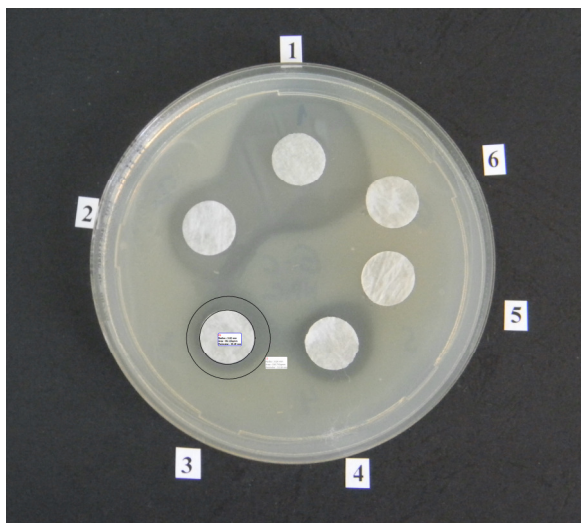
## ПРИПРЕМАЊЕ СУСПЕНЗИЈЕ И ЗАСЕЈАВАЊЕ БАКТЕРИЈА

На већ засејаном косом агару, где је култура стара 24 сата, помоћу стерилне езе и у стерилним условима узимамо узорак културе и спремамо суспензију бактерија. Затим хранљиву подлогу засејавамо са 1 ml суспензије бактерија густине 10<sup>5</sup>-10<sup>6</sup> cfu/ml (јединица која формира колонију; од *eng. colony forming unit*) бактеријских ћелија чисте културе испитиваног соја (инокулама). рН вредност подлоге је неутрална. Све Петри кутије (нпр. од произвођача Liofilchem, Италија) са МН агар плочом су димензија 90 mm и дебљине од 4 mm.

## ОДРЕЂИВАЊЕ АНТИБАКТЕРИЈСКОГ ЕФЕКТА

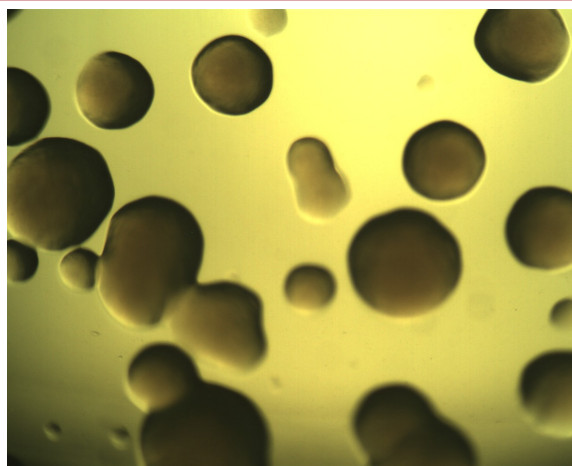
У раду користимо дискове од филтер хартије (произвођач Wathman, USA) димензија пречника 11 mm на које се наноси тачно одређена количина екстраката, испитиваних супстанци или антибиотика различитих концентрација. Инкубација бактерија траје од 18 до 24 сати на температури 35-37°C. Као слепу пробу употребљавамо диск са растварачем. Испитивана супстанца или екстракт дифундује из диска у хранљиву подлогу. Способност раста и размножавања соја засејаног на МН агар плочи зависи од његове осетљивости, тако да се око диска гради бистра провидна зона кружног облика у којој нема раста бактерија, уколико ефекат постоји. Кружно око диска настаје опадајући градијент концентрације активног принципа, који зависи од коефицијента дифузије, растојања од диска као и од укупне количине супстанце у диску. Величина зоне инхибиције је сразмерна осетљивости микроорганизма. Ако су сви услови стандардизовани (густина инокулама, састав

и дебљина подлоге, рН подлоге, време инкубације), онда је површина зоне инхибиције изражена у процентима пропорционална концентрацији антибактеријске супстанце. Код неосетљивих сојева бактерија зоне инхибиције су мале или их уопште нема, тако да оне расту непосредно поред диска. Минимална инхибиторна концентрација (МИС) се одређује екстраполацијом регресионе линије концентрација активне супстанце/полу-пречник или површина инхибиције раста микроорганизама. Преглед и читавање површина и полупречника зоне инхибиције се обавља светлосним микроскопом (нпр. Motiс SFC 28, са камером Motiсam 1000, 1.3MP Live Resolution - произвођач компанија Motiс, Канада), уз употребу фотоапарата (нпр. Nikon Coolpix L110, који има објектив величине 16 x 20 инча, 15 X оптички зум и 12,1 мегапиксела). У току испитивања, фотографише се свака Петри кутија са инокулираним бактеријама (слика 1). Свако тестирање се понавља осам пута а затим се читавају полупречници и површине евентуалне зоне инхибиције око дискова са испитиваном супстанцом или екстрактом (слика 2).



Слика 1. Приказ Петријеве кутије са узорком од шест различитих концентрација (диск бр. 3 је означен са софтвером Motiсam 1000, 1.3MP Live Resolution)

Концентрације екстраката биљака, супстанци и антибиотика које се користе у овим испитивањима започињу од нанограмских концентрација по милилитру, а затим се повећавају са милтипликативним фактором 3 све до микрограмских концентрација по милилитру.



Слика 2. Бактеријски сој АТТС 10536 *Escherichia coli* снимљен са микроскопом Motiс SFC 28 (објектив x4)

### СТАТИСТИЧКА ОБРАДА ДОБИЈЕНИХ ПОДАТАКА

Коришћене концентрације супстанци се логаритамски трансформишу за основу 10, а затим се израчунава линеарна регресија за тако трансформисане концентрације и полу-пречнике инхибиције раста микроорганизама, односно површине без раста микроорганизама. Значајност линеарне регресије се проверава анализом варијансе, а потом се израчунава коефицијент корелације. Линеарном интраполацијом и екстраполацијом се одређују минимална инхибиторна концентрација и концентрација која изазива 50 % максималне инхибиције ( $EC_{50}$ ) са интервалом поверења 1.96 \*стандардна грешка. Вероватноћа нулте хипотезе која представља граничну вредност за њено одбацивање је  $\leq 0,05$ .

### РЕФЕРЕНЦЕ

1. Al-Bakri GA, Afifi UF. Evaluation of antimicrobial activity of selected plant extracts by rapid XTT colorimetry and bacterial enumeration. *J Microbiol Meth* 2007; 68: 19–25.
2. Harvey A. Strategies for discovering drugs from previously unexplored natural products. *Drug Disc. Today* 2000; 5: 294-300.
3. Blumenthal M, Busse WR, Goldberg A, et al.. *The Complete German Commission E Monographs. American Botanical Council, Austin.* 1999.
4. Newman DJ, Cragg GM, Snader KM. *J Nat Prod* 2003; 66: 1022.
5. Bauer AW, Kirby WM, Sherris JC, Turck M. Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method. *Am J Clin Pathol* 1966; 45: 493-6.
6. Clinical and Laboratory Standards Institute (formerly National Committee for Clinical Laboratory Standards). 2005. Performance standards for antimicrobial

- 
- susceptibility testing; Fifteenth Informational Supplement, M100- S15., Wayne, PA.
7. Jorgensen JH, Turnidge JD. Susceptibility test methods: dilution and disc diffusion methods. In: Murray PR, Baron E J, Jorgensen JH, Pfaller MA, Tenover FC, Tenover FC (eds). *Manual of Clinical Microbiology*, 8th Edition. Washington DC: ASM Press, 2003; 1119-25.
  8. Sanderson MJ, Driskell AC. The challenge of constructing large phylogenetic trees. *Trends Plant Sci* 2003; 8: 374-9.
  9. McNeill J, Barrie FR, Burdet HM, et al. *International Code of Botanical Nomenclature (Vienna Code)*. *Regnum Vegetabile* 146. A.R.G. Gantner Verlag KG, 2006.
  10. *Jugoslovenska farmakopeja*. 5. издање. Beograd: Savezni zavod za zaštitu i unapređenje zdravlja, 2000.