

Utjecaj ekstrakata aromatskog bilja Dalmacije na patogene bakterije iz hrane životinjskog podrijetla

Klanac, Lucija

Master's thesis / Diplomski rad

2021

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Veterinary Medicine / Sveučilište u Zagrebu, Veterinarski fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:178:260461>

Rights / Prava: [In copyright](#) / [Zaštićeno autorskim pravom.](#)

Download date / Datum preuzimanja: **2024-07-10**



Repository / Repozitorij:

[Repository of Faculty of Veterinary Medicine -
Repository of PHD, master's thesis](#)



**SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
VETERINARSKI FAKULTET**

Lucija Klanac

**UTJECAJ EKSTRAKATA AROMATSKOG BILJA DALMACIJE NA
PATOGENE BAKTERIJE IZ HRANE ŽIVOTINJSKOG PODRIJETLA**

DIPLOMSKI RAD

Zagreb, 2021.

VETERINARSKI FAKULTET SVEUČILIŠTA U ZAGREBU
ZAVOD ZA HIGIJENU, TEHNOLOGIJU I SIGURNOST HRANE

Predstojnik:

Izv. prof. dr. sc. Nevijo Zdolec

Mentor:

Izv. prof. dr. sc. Nevijo Zdolec

Članovi povjerenstva:

1. Prof. dr. sc. Vesna Dobranić
2. Prof. dr. sc. Željka Cvrtila
3. Izv. prof. dr. sc. Nevijo Zdolec
4. Prof. dr. sc. Lidija Kozačinski (zamjena)

*Ovaj diplomski rad izrađen je u okviru projekta K.K.01.2.2.03.0017, CEKOM 3LJ financiran iz Fonda za regionalni razvoj EU.

ZAHVALA

Zahvalu primarno dugujem svome mentoru izv. prof. dr. sc. Neviju Zdolecu koji je svojim znanjem i strpljenjem izradu ovog diplomskog rada učinio bezbolnom.

Također želim zahvaliti Zavodu za higijenu, tehnologiju i sigurnost hrane i Zavodu za javno zdravstvo Zadar, koji su svojim angažmanom omogućili nastajanje ovog rada.

Zahvaljujem se prijateljima, a posebno mojim curama Ivani, Sari i Josipi koje su ovih šest godina ispunile smijehom i zabavom.

Veliko hvala dugujem svojoj obitelji, primarno svojoj sestri i bratu koji su proživljavali sa mnom svaku suzu i svaki smijeh, te me svojim postojanjem učinili osobom kakva jesam.

Posebno se zahvaljujem svojim roditeljima čiji su mi ponos i podrška konstantni suputnik kroz život.

HVALA VAM SVIMA!

POPIS PRILOGA

Popis slika

Slika 1. Bosiljak

Slika 2. Kadulja

Slika 3. Lavanda

Slika 4. Ružmarin

Slika 5. Smilje

Slika 6. Ekstrakcija u Soxhlet aparatu

Slika 7. Filtracija

Slika 8. Rotacijski evaporator

Slika 9. Alkoholni ekstrakti

Slika 10. Bakterijske kulture

Slika 11. Raspored diskova natopljenih ekstraktima bilja na petrijevoj zdjelici

Slika 12. Raspored diskova natopljenih različitim koncentracijama ekstrakta na petrijevoj zdjelici

Slika 13. Prikaz zona inhibicije rasta indikatorskih bakterija primjenom alkoholnih ekstrakata biljaka

Popis tablica

Tablica 1. Promjeri inhibicije rasta bakterija oko diskova natopljenih alkoholnim ekstraktima (19. lipnja 2020.)

Tablica 2. Promjeri inhibicije rasta bakterija oko diskova natopljenih alkoholnim ekstraktima (25. rujna 2020.)

SADRŽAJ:

1. UVOD	1
2. PREGLED REZULTATA DOSADAŠNJIH ISTRAŽIVANJA	2
2.1. Aromatsko i ljekovito bilje Dalmacije	2
2.2. Bosiljak (<i>Ocimum basilicum</i> L.)	2
2.3. Kadulja (<i>Salvia officinalis</i>)	3
2.4. Lavanda (<i>Lavandula officinalis</i>)	4
2.5. Ružmarin (<i>Rosemarinus officinalis</i> L.)	5
2.6. Smilje (<i>Helichrysum italicum</i>)	6
2.7. Ekstrakcija	8
2.8. Antimikrobni učinak aromatskog i ljekovitog bilja	9
2.9. Primjena biljnih ekstrakata u proizvodnji hrane	13
3. MATERIJALI I METODE	14
3.1 Ekstrakcija i maceracija	14
3.1.1. Uljni ekstrakti	14
3.1.2. Alkoholni ekstrakti	15
3.2. Priprema indikatorskih bakterija	17
3.3 Ispitivanje antimikrobne aktivnosti ekstrakata (alkoholni i uljni ekstrakti)	18
3.4. Određivanje MIC (minimum inhibitory concentration) ekstrakata	18
4. REZULTATI	20
5. RASPRAVA	23
6. ZAKLJUČAK	25
7. LITERATURA	26
8. SAŽETAK	33
9. SUMMARY	34
10. ŽIVOTOPIS	35

1. UVOD

Svojstva aromatskog i ljekovitog bilja dugo su poznata ljudima te se ono koristi u razne svrhe. Upotreba ovih biljaka zbog njihova ljekovitog učinka i zaštitne uloge poznata je na području Srednjeg Istoka i do 5000 godina prije nove ere (PICCAGLIA i sur., 1993.). Snaga ljekovitog bilja opisivana je također i u grčkoj i rimskoj literaturi, dok je za vrijeme srednjeg vijeka aromatsko i ljekovito bilje bilo promatrano kroz praznovjerje, pa su ga ljudi smatrali čudotvornim i mističnim (PAHLOW, 1989.). U posljednje vrijeme ljudi sve češće posežu za biljkama u svrhu liječenja unatoč suvremenoj medicini, a znanje o korištenju bilja u svrhu liječenja prenosilo se usmenom i pismenom predajom (ORLIĆ, 2015.).

Biljke korištene u ovom diplomskom radu su bosiljak, kadulja, lavanda, ružmarin i smilje. ORLIĆ (2015.) u svom radu navodi stanja u kojima ljudi s područja Krka koriste ovo bilje. Lavandu koriste za smirenje, kod grčeva i migrena ili za tjeranje insekata. Ružmarin je upotrebljavan za jačanje kostiju i zglobova, bolesti bubrega i jetre, te za cirkulaciju. Kadulju ljudi koriste kao aperitiv, kod upala desni i grla, te kao antiseptik. U svom radu CRNIĆ (2016.) navodi da se bosiljak koristi kod gihta, upala bubrega i mokraćnog mjehura. MUCALO (2015.) navodi da se macerat od smilja u Hrvatskoj koristio kod oštećenja kože ili tromboze vena na nogama. Osim tradicionalnog korištenja ovog bilja mnogim istraživanjima dokazalo se da ove biljke imaju i jaki antimikrobni učinak, te da mogu djelovati kao antioksidansi.

U ovom diplomskom radu istraženi su ekstrakti navedenih biljaka u smislu sposobnosti inhibicije rasta patogenih bakterija izoliranih iz hrane životinjskog podrijetla. Cilj je ovog istraživanja bio odrediti antimikrobni potencijal odabranog sezonskog aromatičnog i ljekovitog bilja s područja Dalmacije, te pretpostaviti njegovu moguću upotrebu u prehrambenim proizvodima životinjskog podrijetla u svrhu produljenja održivosti hrane i zaštite zdravlja ljudi.

2. PREGLED REZULTATA DOSADAŠNJIH ISTRAŽIVANJA

2.1. Aromatsko i ljekovito bilje Dalmacije

U ljekovite biljke ubrajaju se one biljne vrste koje u sebi sadrže jednu ili više aktivnih tvari koje imaju ljekovita svojstva te se mogu upotrijebiti za terapiju ili za sintezu farmakoloških pripravaka. Aromatskim biljkama se smatraju one vrste koje u jednom ili više svojih dijelova sadrže tvar specifičnog mirisa ili okusa, te se takve biljke većinom koriste u proizvodnji hrane kao začini, u kozmetičkoj industriji, stvaranju mirisa i sl. Na području Republike Hrvatske nalazi se više od 500 biljaka čija se ljekovita svojstva mogu koristiti, a od prilike 160 do 170 vrsta su autohtone vrste s naših prostora (ŠILJEŠ i sur., 1992.).

2.2. Bosiljak (*Ocimum basilicum* L.)

Bosiljak je biljka roda *Ocimum* koji je dio porodice *Lamiaceae*. Biljke ovog roda mogu se naći po cijelom svijetu, a najveći broj vrsta nalazi se u Africi. Najpoznatije vrste iz roda *Ocimum* su *O. basilicum* ili tajlandski bosiljak, *O. gratissimum* ili afrički boiljak i *O. tenuiflorum* koji se još naziva i sveti bosiljak (DZOYEM i sur., 2017.). Bosiljak može rasti u različitim klimama i na različitim tlima, no najviše mu odgovara tlo sa dobrom drenažom. Odgovaraju mu vlažni uvjeti sa višim temperaturama i duljim danima, tako da najbolje napreduje u tropskim i sub-tropskim klimama (PUSHPANGADAN i GEORGE, 2012.).

Bosiljak je biljka sa srednje razvijenim korijenom i razgranatom, zeljastom stabiljikom koja je visoka do 60 cm. Ima nasuprotne, zelene, mekane listove koji su oblika jajeta. Rubovi listova mogu biti ravni, no najčešće su nazubljeni. Cvat se sastoji od 17 do 18 bijelih do svijetlo ružičastih sitnih cvjetića koji se nalaze na vrhu stabljike. Bosiljak sadrži eterična ulja vitamin B1, vitamin C i karotin. Eterično ulje se sastoji od metilkavikola, estragola i eugenola koji je zaslužan za karakterističan miris i okus bosiljka (ŠILJEŠ i sur., 1992.).

Najčešća uporaba bosiljka u današnje vrijeme je u obliku začina ili kao hrana (salate od listova, sjemenke i sl.). No, osim toga korišten je i u tradicionalnoj medicini kao što su Ayurveda, tradicionalna kineska i afrička medicina kod poremećaja u probavnom traktu, upala ili kašlja. Prilikom raznih istraživanja, vrste iz roda *Ocimum* pokazale su protuupalna i analgetska svojstva (DZOYEM i sur., 2017.).



Slika 1. Bosiljak

2.3. Kadulja (*Salvia officinalis*)

Kadulja spada u rod *Salvia* iz porodice *Labiatae*, te potječe s Mediterana. To je grmolika biljka koja se može javiti u jednogodišnjem, no češće u višegodišnjem obliku. Listovi su joj ovalni s ravnim rubovima i sivozelene boje. Cvjetovi kadulje ljubičaste su boje i nalaze se u nakupinama od 2-10, a moguće, iako rijetko, i do 40 cvjetova (ALTINDAL i ALTINDAL, 2016.).

Najčešće se koristi u obliku eteričnog ulja koje upotrebljava u farmaceutskoj, kozmetičkoj i prehrambenoj industriji zbog svojih ljekovitih i začinskih svojstava. Od kadulje se radi i čaj koji služi kao otopina za ispiranje i dezinfekciju usta, te kao oblog za rane. Ova je biljka također upotrebljavana za zaustavljanje krvarenja i smanjivanje znojenja, no veće količine konzumirane kadulje mogu dovesti do poremećaja vitalnih organa, npr. zatajenja srca, pa se njezina upotreba ne preporučuje bez liječničkog nadzora zbog snažnog utjecaja koje ima na unutarnje organe. Eterično ulje se nalazi u svim djelovima kadulje osim u korijenu. Najznačajnije tvari koje se nalaze u eteričnom ulju su tujon 1,8-cineol, kamfor i borneol (ŠILJEŠ i sur., 1992.).

Kadulja je korištena kroz stoljeća u raznim kulturama zbog njezinih ljekovitih svojstava. Upotrebljavala se u grčkoj i kineskoj tradicionalnoj medicini, te u Ayurvedi (SCHOLEY i sur., 2011.).



Slika 2. Kadulja

2.4. Lavanda (*Lavandula officinalis*)

Lavanda je biljka roda *Lavandula* iz porodice *Lamiaceae*. Ona se prirodno nalazi na zapadnom dijelu Sredozemlja, no uzgaja se na području cijele Europe. Uz uzgoj prave lavande, bitan je uzgoj hibridne lavande (*Lavandula hybrida*) čije se eterično ulje koristi u izradi sapuna. *L. officinalis* raste do 1700 m nadmorske visine, dok hibridna lavanda raste na područjima od 700 do 1000 m nadmorske visine. Lavanda se uzgaja se plantažno, no koristi se i kao ukrasna biljka. Služi kao dobra paša za pčele, a s obzirom na to da nema velikih zahtjeva po pitanju tla njezin je uzgoj vrlo ekonomičan (ŠILJEŠ i sur., 1992.).

Lavanda je grm polukuglastog oblika koji naraste do 60 cm u visinu i do 120cm u širinu. Stabljike koje nose cvat karakteristične ljubičasto-plave boje su jednostavne. Listovi su sivo-zeleni, nasuprotni, sa dlačicama na naličju i ravnih rubova. Grm hibridne lavande je gušći i veći od grma prave lavande sa razgranatijim cvijetnim stabljikama. Promjer hibridne lavande može doći i do 150 cm, a njezina visina i do 1 m. Listovi su zelene boje i imaju manje dlačica.

Lavandu osim izgleda karakterizira i specifičan, jaki miris koji dolazi od eteričnog ulja koje se nalazi u samom cvijetu (ŠILJEŠ i sur., 1992.).

Najvažnije tvari u eteričnom ulju lavande su linalol i linalilacetat. Ostale tvari koje se mogu naći u eteričnom ulju su 1,8-cineol, borneol, citonelal, kamfor, geranid i dr. Eterično ulje lavande najčešće se koristi u proizvodnji parfema ili kolonjske vode. No osim aromatičnih, lavanda ima i ljekovita svojstva, pa tako djeluje smirujuće kod migrena ili neuralgija, smanjuje grčeve i ubrzava cijeljenje rana (ŠILJEŠ i sur., 1992.).



Slika 3. Lavanda

2.5. Ružmarin (*Rosemarinus officinalis* L.)

Ružmarin (*Rosemarinus officinalis* L.) spada u porodicu *Laminaceae*. To je biljka koja raste endemski na području Mediterana, i tamo se uzgaja od davnina. Javlja se u višegodišnjem zimzelenom obliku koji cvjetati počinje u kasno proljeće, a cvjeta kroz cijelo ljeto (SIMON i sur, 1984.).

Ružmarin je biljka koja raste u obliku grma. Ima male, izdužene, igličaste listiće kojima je naličje bijelkasto, a lice tamno zelene boje, te su prisuti kroz cijelu godinu. Tokom cvjetanja na grmu se pojavljuju cvjetići koji su najčešće plave boje, no mogući su sojevi sa bijelim ili rozim cvjetovima (SIMON i sur., 1984.). Cvjetići su aromatični pa su zbog toga jako privlačni pčelama, koje su oprašivači. Ružmarin je prilično rezistentan na biljne bolesti i štetočine, no u

vlažnim klimama moguća su gljivična oboljenja biljke (ENCYCLOPAEDIA BRITANNICA {EB}, 2020.).

U drevnim vremenima smatralo se da ružmarin poboljšava memoriju, a u narodu je bio simbol sjećanja i vjernosti. U tradicionalnoj medicini bio je korišten kao aromatični satojak u tonicima i mastima (EB, 2020.). Listići ružmarina koriste se kao začini u kulinarstvu, a ulje dobiveno iz lišća i cvjetnih izdanaka se koristi u medicini i farmaceutskoj industriji (HYDE BAILEY, 1976.). Eterično ulje ružmarina sadrži terpene i kamfor, te je ono glavna aktivna tvar ove biljke. Osim toga ružmarin još sadrži i glikozide, saponin i kolin koji pridonose povišenju krvnog tlaka (MILENKOVICS, 2005.). U istraživanju oksidativne stabilnosti kojeg je izvodio CORDEIRO i sur. (2013.) utvrđeno je da ružmarin ima veću učinkovitost kao antioksidans od nekih sintetskih antioksidansa, pa tako ružmarin predstavlja njihov prirodni izvor.



Slika 4. Ružmarin

2.6. Smilje (*Helichrysum italicum*)

Smilje je biljka iz roda *Helichrysum* porodice *Asteraceae*. Smilje je poznato od davnih dana. Grci su ga koristili za liječenje rana, a zbog svoga izgleda, mirisa i ljekovitih svojstava bilo je opjevano u raznim narodnim pjesmama. Smilje je biljka koja se može naći u umjerenim

i subtropskim područjima (ŠODIĆ, 2016.). Raste na području Male Azije, južne Europe i sjeverozapadne Afrike (MUCALO, 2015.). Odgovaraju mu suha i kamenita područja, pa se tako u Hrvatskoj može naći diljem Jadranske obale. Raste na nadmorskim visinama od 0 do 2200 m. (ŠODIĆ, 2016.).

To je višegodišnja biljka koja raste u obliku grma visine do 40cm. Ima razgranatu stabljiku koja je pri dnu biljke drvenasta i čvrste zelenkasto sive listove koji su posuti dlačicama. Listići su šiljasti i uski, a na dnu stabljike oblikuju rozetu (ŠODIĆ, 2016.). Cvat koji se nalazi na vrhovima stabljika oblikuje štit koji može biti promjera do 8 cm. Cvijetici su mali, cjevasti i zlatnožute boje, a smilje cvate u razdoblju od travnja do srpnja (MUCALO, 2015.).

Smilje se kroz povijest koristilo kao diuretik, kod urinarnih poremećaja, išijasa, zmijskih ugriza (QUER, 1993.). Koristilo se, također, zbog njegovih antiupalnih svojstava i za sprječavanje grušanja krvi. Za vrijeme renesanse zabilježeno je da se smilje koristilo u sprječavanju nervoze i hysterije (LOURENS i sur., 2008.). Za vrijeme epidemije Španjolske gripe smilje je korišteno kao baktericid i osvježivač zraka. Ono se i danas koristi u tradicionalnoj medicini. Najviše se iskorištavaju cvijetovi i listovi, a koriste se kod poremećaja kao što su kašalj, prehlade, alergije, kožna, žučna i jetrena oboljenja (MUCALO, 2015.). Eterično ulje smilja sadrži spojeve od kojih je α -pinen u najvećoj koncentraciji. Osim njega sadrži i neril-acetat, 2-metilcikloheksil-pentanoat, α -cedren, kariofilen, limonen, nerol i dr. (MUCALO, 2015.).



Slika 5. Smilje

2.7. Ekstrakcija

U farmakološkom smislu ekstrakcija je odvajanje medicinski aktivnih tvari iz biljke ili životinje koristeći otapala. Prilikom ekstrakcije odvajaju se topivi metaboliti biljke od netopivih, balastnih tvari (HANDA, 2008.).

Da bi ekstrakcija bila uspješna vrlo je bitan odabir otapala, koji se treba temeljiti na njegovoj polarnosti, kao i na polarnosti tvari koja se želi ekstrahirati. Otapala koja se mogu koristiti u ekstrakciji su voda, etanol, metanol, aceton, etil-acetat, biljna ulja i n-heksan. Voda je otapalo koje ima veliku polarnost, dok je n-heksan otapalo koje je vrlo slabo polarno. Neka otapala kao što su metanol i aceton su izrazito toksična, tako da se ona ne koriste kao dio konačnog ekstrakta, već samo kao međuproizvod. Farmakopeja otapala razvrstava u nekoliko kategorija ovisno o njihovoj toksičnosti. Otapala prve kategorije su ona otapala koja bi se trebala u potpunosti izbjegavati. U tu skupinu spadaju aromatska (benzen) i halogena otapala (tetraklormetan). U drugu kategoriju spadaju toksična otapala koja imaju svoje granične vrijednosti, a ograničena su na dva načina. Prvi način je propisana granična vrijednost za dnevnu dozu, a drugi je granična vrijednost u konačnom proizvodu (ekstraktu). Treća kategorija otapala ima veću dozvoljenu graničnu vrijednost i tu spadaju otapala s niskom toksičnošću kao što je npr. etanol, dok za četvrtu kategoriju otapala ne postoji granična vrijednost, no ona se većinom ne koriste u proizvodnji biljnih ekstrakata (PLANTAGEA, 2020.).

Metoda ekstrakcije može biti različita ovisno o situaciji i ekonomskoj izvedivosti. Metode koje se mogu koristiti su maceracija, infuzija, digestija, dekokcija (prokuhavanje), perkolacija, vruća kontinuirana ekstrakcija u Soxhlet aparatu, i dr. (HANDA, 2008.).

Maceracija je proces u kojem su sirova biljka i otapalo stavljeni u zatvorenu posudu i ostavljeni najmanje 3 dana uz povremeno mućkanje. Nakon određenog vremena sadržaj posude se profiltrira, a ostatak biljke iscijedi. Nakon toga moguće je provesti filtraciju ili dekantaciju kako bi otopina dobila bistrinu (HANDA, 2008.).

Infuzija se izvodi na način da se sirova biljka prelije vrućom ili hladnom vodom, te se pusti da kratkotrajno odstoji. Na ovaj se način u ekstraktu se dobivaju lako topive tvari iz biljke (HANDA, 2008.).

Digestija je u suštini proces maceracije uz dodatak topline. Na taj način se povećava učinkovitost otapala u izvlačenju aktivnih tvari iz biljke (HANDA, 2008.).

Dekokcija je metoda koja je dobra za ekstrakciju termostabilnih spojeva koji u dobro topivi u vodi. U ovom se procesu sirova biljka stavlja u određenu količinu vode i ostavlja se da prokuha određeni vremenski period. Tokom ekstrakcije dio vode ispari, pa se dobije koncentrirani ekstrakt koji se potom profiltrira i koristi ili se može i dalje prerađivati (HANDA, 2008.).

Perkolacija je tehnika koja je najčešće korištena kod ekstrakcije tinktura i tekućih ekstrakata. Za ovu metodu se koristi perkolator koji je zapravo ravna cijev oblika stošca s otvorima na obje strane. Biljka od koje se želi napraviti ekstrakt se treba navlažiti određenom količinom odabranog otapala, te se ostavlja u zatvorenom perkolatoru do 4 sata. Nakon toga u perkolator se doda još biljne mase i otapala na način da perkolator bude napunjen biljkama iznad kojih se može vidjeti tanak sloj otapala, te se ostavlja 24 sata da odstoji. Nakon 24 sata donji ispušni otvor perkolatora se otvori, a otapalo s otopljenim aktivnim tvarima se pusti da lagano kapa. Ostatak biljaka u perkolatoru se iscijedi, te se ta tekućina doda dobivenom ekstraktu, kojeg je potrebno profiltrirati (HANDA, 2008.).

Vruća kontinuirana ekstrakcija je postupak koji se izvodi u Soxhlet aparatu. Prednost ove metode je korištenje vrlo male količine otapala. Smrvljena biljka stavlja se u propusni tuljak koji se onda smiješta u komoricu Soxhlet aparata iznad koje se nalazi hladilo. Ispod komorice stavlja se tikvica s odabranim otapalom koje se zagrijava, isparava, zatim kondenzira iznad tuljka s biljkom, te kapa po njoj izvlačeći aktivne tvari iz same biljke. Nakon što se tekućina u komorici napuni do određene razine, prelijeva se ponovno u tikvicu s otapalom, te se proces ponavlja (HANDA, 2008.).

2.8. Antimikrobni učinak aromatskog i ljekovitog bilja

U posljednje vrijeme potražnja za biljem je porasla zbog toga što se one smatraju prirodnim i sigurnim proizvodima. Aromatsko i ljekovito bilje korišteno je od davnih vremena u narodnoj medicini i kao konzervansi u hrani. Aromatske biljke sadrže više aktivnih tvari koje posjeduju antimikrobna, antifungalna, antiparazitarna, protuupalna i druga svojstva, a najpoznatije takve biljke potječu s Mediterana (CHRISTAKI, 2012.).

Nakon zabrane korištenja antibiotika u prehrani životinja u zemljama Europske Unije 2006. godine, porastao je interes za biljke i začine koji bi se mogli koristiti zbog svojih antimikrobnih i antikokcidijalnih svojstava (BARTON, 1999.; GREATHEAD, 2003.).

Antimikrobna svojstva najčešće su vezana za esencijalna ulja tih biljaka (SVOBODA i sur., 1999.; GIANNENAS i KYRIAZAKIS, 2009.). Trenutno se ova esencijalna ulja koriste se u prehrambenoj industriji u svrhu sprječavanja kvarenja hrane, produživanja roka trajanja, a mogu se koristiti i za umanjivanje nuspojava korištenja kemijskih konzervansa (SHARAFI, 2010.).

Proveden je niz istraživanja o antimikrobnim svojstvima bosiljka. U istraživanju MOGHADDAM i sur. (2011.) uzeta su dva uzorka bosiljka u periodu cvjetanja i to u vremenskom razmaku od 10 dana, a oba uzorka su pokazala antimikrobna svojstva i to pretežno za Gram-negativne bakterije, dok je istraživanje koje je proveo PRASAD i sur. (1986.) pokazalo veći učinak na Gram-pozitivne bakterije. ADIGUZEL i sur. (2005.) navode da bosiljek nije pokazao antifungalnu aktivnost, ali je djelovao protiv kvasaca roda *Candida*, a također je imao i antibakterijski efekt. U ovom je istraživanju također navedeno da je aktivnost bosiljka ovisila i o otapalu s kojim je proizveden ekstrakt, tako da je ekstrakt pripremljen s heksanom imao širi spektar djelovanja u usporedbi s ekstraktom pripremljenim s metanolom, dok ekstrakti pripremljeni s etanolom nisu pokazali učinak. U istraživanju koje je proveo KAYA i sur. (2008.) dokazano je da bosiljak ima antibakterijsku aktivnost i to na način da degenerira staničnu stijenku, te tako uzrokuje lizu bakterije. Također SILVA i sur. (2016.) ispitivali su sinergijsko djelovanje ekstrakta bosiljka sa postojećim standardnim antibioticima, te je tim istraživanjem dokazano da ekstrakt bosiljka može pojačati djelovanje antibiotika. BEATOVIĆ i sur. (2015.) navode da bosiljak ima i jak antifungalni i antioksidativni učinak, te da je linalol, jedna od dominantnih tvari u biljci bosiljka, zaslužan za njegovu cjelokupnu antimikrobnu aktivnost.

Mnoga istraživanja o kadulji pokazala su njezinu iznimnu antimikrobnu i antioksidativnu aktivnost. ALBAYRAK i sur. (2013.) navode da kadulja, uz ostale pripadnike roda *Laminaceae*, može biti korištena u sprječavanju organske deterioracije u hrani. Dokazano je da kadulja ima jak bakteriostatski i baktericidni učinak (LONGARAY DELAMARE, 2007.). POP i sur. (2013.) ističu kako eterično ulje kadulje ima jak antibakterijski učinak na bakterije kao što su *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*, te da je zapaženo i virucidno djelovanje na *Herpesvirus simplex*. Istraživanje koje je proveo FARAHPOUR i sur. (2020.) pokazalo je da kadulja ubrzava i zacjeljivanje rana na način da je inhibirala kolonizaciju rane bakterijama, potakla angiogenezu i migraciju fibroblasta, ubrzala sintezu kolagena i ponovnu epitelizaciju i ubrzala proliferaciju stanica. U posljednje vrijeme provedeno je više istraživanja o učinku kadulje gdje su osim tradicionalne

upotrebe pronađena i nova svojstva kadulje kao što su antimikrobna, antikancerogena, antiinflamatorna, antinociceptivna svojstva, a dokazan je i njen učinak protiv demencije (GHORBANI, 2017.) Kadulja je također prepoznata i kao biljka koja ima jak učinak kod pacijenata koji boluju od dijabetesa. Nakon uzimanja kadulje, kolesterol i šećer u krvi koji je mjereno 2 sata nakon jela su bili drastično smanjeni u istraživanju koje je proveo BEHRADMANESH i sur. (2013.).

U današnje vrijeme lavanda se uglavnom koristi u aromaterapiji ili masažama zbog svojeg snažnog mirisa koje potiče relaksaciju. 1993. godine u Irskoj provedena su istraživanja gdje se pokazalo da mješavina esencijalnih ulja aromatičnog bilja, među kojima je bila i lavanda, potpomaže san kod starijih ljudi (GRAHAM, 1995.). Dokazano je da lavanda također ima i učinak u suzbijanju akutne i kronične boli (CHING, 1999.) U istraživanju koje je proveo ALTAEI (2012.) ispitivao se učinak ulja lavande na rekurentne ulcerozne afte, te se pokazalo da lavanda olakšava bol, smanjuje veličinu afte, te ubrzava njezino cijeljenje. U istraživanju BULFON i sur. (2014.), lavanda je uz ostale pripadnike roda *Labiatae* pokazala antimikrobnu sposobnost, te je svojim jakim baktericidnim učinkom djelovala na Gram-pozitivne i Gram-negativne bakterije. NELSON (1997.) je proveo istraživanje u kojem je zaključio da lavanda djeluje baktericidno i bakteriostatski protiv rezistentnih sojeva bakterija kao što je MRSA. U više istraživanja potvrđeno je i antifungalno djelovanje lavande. LARRONDO i sur. (1995.) zaključili su da lavanda usporava sporulaciju gljivica, a rast *T. mentagrophytes* potpuno inhibira. Istraživanje koje je proveo ADAM i sur. (1998.) pokazalo je jaki fungistatski i fungicidni učinak ekstrakta lavande, dok je lavanda u istraživanju PERRUCCI i sur. (1994.) pokazala fungistatski učinak samo u visokim dozama. Lavanda se može koristiti i kao insekticid, a u istraživanju HINK i LIBERATI (1988.) je pokazala da ima snažan učinak protiv buha kod mačaka. Također lavanda se može koristiti kao angioprotektant, ekspektorans, spazmolitik glatkog mišićja, sedativ, anksiolitik, analgetik, antioksidans i dr. (CHU i KEMPER, 2001.).

Napravljen je velik broj istraživanja u kojima su ispitivana svojstva ružmarina. Većina njih se dotiče njegove antimikrobne i antioksidativne sposobnosti. GOUVEIA i sur. (2016.) proveli su istraživanje o učinku esencijalnih ulja u hrani, gdje je ružmarinovo antimikrobno djelovanje na *L. monocytogenes* trajalo do 14 dana. EMAEL i sur. (2020.) proveli su istraživanje o učinku esencijalnih ulja na skupinu bakterija koje induciraju stvaranje akni, kao što su *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis* i *Cutibacterium acnes*. Ulje ružmarina je pokazalo jak antibakterijski učinak, te se smatra da bi mogao biti dobra zamjena

antibioticima u borbi protiv akni. Istraživanje koje su proveli SIENKIEWICZ i sur. (2013.) pokazalo je da ekstrakt ružmarina ima antibakterijski učinak protiv svih kliničkih sojeva *E.coli*. Aktivne tvari u ekstraktu ružmarina interferiraju sa staničnom membranom bakterija, remete transport elektrona i uzrokuju gubitak staničnih elemenata (FUNG i sur., 1977.). NIETO i sur. (2018.) u svom radu navode da antioksidativna i antimikrobna svojstva ružmarina ovise o stadiju cvijetanja biljke, vrsti ekstrakta, načinu ekstrakcije, prisutnosti tvari koje djeluju sinergistički ili inhibitorno na aktivne tvari, koncentraciji ekstrakta i sl. ALTINIER i sur. (2007.) proveli su istraživanje na miševima u kojem se pokazalo da ružmarin ima protuupalnu sposobnost koja ovisi o apliciranoj dozi ekstrakta. Ružmarin je u istraživanju koje su proveli KONGOIANNI i sur. (2013.) pokazao antikancerogena svojstva. Osim svog jakog citotoksičnog djelovanja, pokazao je i izrazitu antioksidativnu sposobnost, što u isto vrijeme uništava stanice karcinoma i štiti zdrave stanice domaćina.

Smilje je u mnogim istraživanjima pokazalo razne sposobnosti. U istraživanju koje je provela MALENICA STAVAR i sur. (2018.) ispitivan je antimikrobni učinak smilja. Ekstrakt je pokazao umjeren učinak na bakterije roda *Acinetobacter*, dok slabije djeluje na Gram-pozitivne *S. aureus* i *S. epidermidis*, te *C. albicans*. U ovom istraživanju ekstrakt nije pokazao učinak protiv *E.coli* i *P. aeruginosa* koje su Gram-negativne. Osim antimikrobne sposobnosti proučavano je i njegovo antiproliferativno djelovanje. Antiproliferativna aktivnost esencijalnog ulja smilja posebno je bila uočljiva na Hela i MCF-7 staničnim linijama na kojima je inducirala apoptozu, dok je na staničnoj liniji MIA PaCa2 potakla starenje stanica i njihovu nekrozu. NOSTRO i sur. (2001.) u svom istraživanju ispitivali su utjecaj smilja na *Staphylococcus aureus* i to na MRSA i MSSA izolate. U ovom je istraživanju smilje pokazalo inhibitorni učinak na bakterije. Ekstrakt smilja remetio je rast bakterija, povećavao permeabilnost njihove membrane i interferirao s enzimima bakterija kao što su DNA-za, koagulaza, termonukleaza i lipaza. Neka istraživanja dokazala su insekticidni učinak smilja iako se u narodu koristio kao repelent za vanjske parazite kod životinja (BARBER i sur., 2005., RIVIERA i sur., 2008.). Najčešće proučavano svojstvo smilja je njegovo protuupalno djelovanje. U *in vivo* istraživanjima pri topikalnoj aplikaciji smilje je djelovalo na učinkovitije zarastanje rana, a pokazalo se dobro i u zaštiti kože (VIEGAS i sur., 2013.). BAUER i sur. (2011.) istraživali su svojstva arzanola, jedne od aktivnih tvari smilja, te su došli do zaključka da arzanol djeluje inhibitorno na sintezu medijatora upale, te na taj način djeluje protuupalno. U istraživanju koje je proveo APPENDINO i sur. (2007.) dokazano je antiviralno djelovanje arzanola koji je inhibirao sintezu HIV-1.

2.9. Primjena biljnih ekstrakata u proizvodnji hrane

Primjena biljaka i njihovih ekstrakata koristi se sve više i u proizvodnji hrane životinjskog podrijetla. Osim svojih zaštitnih i antimikrobnih svojstava poželjno je i zbog svoga doprinosa u vidu poboljšanja mirisa i okusa hrane, te njezinog izgleda. ŠOJIĆ i sur. (2018.) navode da se dodavanjem esencijalnog ulja ili ekstrakta kadulje u proizvodnju kobasica od svinjskog mesa poboljšala senzorna svojstva kobasica, a primjećena su i antioksidativna i antimikrobna svojstva kadulje koja povećavaju sigurnost i stabilnost kobasica.

GAMMARIELLO i sur. (2008.) dodavali su kadulju, zajedno sa limunom i timijanom u *Fior di Latte* sir i dokazali da se smanjuje broj bakterija kvarenja i produžuje rok trajanja sira, bez utjecaja na korisne mikroorganizme. Esencijalna ulja ružmarina i origana pokazala su se dobra u sprječavanju lipidne oksidacije i fermentacije u siru kojem je baza bila krem sir (OLMEDO i sur. 2013.) HALA i sur. (2010.) dodavali su ekstrakt ružmarina u meki sir i zabilježili da se tekstura i izgled sira nisu značajno promijenili, ali da je ekstrakt povećao antioksidativnu aktivnost u siru, koju je pasterizacija dodatno pojačala. BOUTOIAL i sur. (2013.) napravili su istraživanje u kojem su koze uzgajane za mlijeko bile hranjene ružmarinom, a mlijeko koje se dobilo pokazalo se zdravije i tehnološki pogodnije za stvaranje sira. RIBEIRO i sur. (2016.) stavljali su slobodne i mikroinkapsulirane oblike ružmarina u zrnati sir, gdje je ružmarin djelovao kao antioksidans, dok nutritivna vrijednost sira nije narušena. Ružmarin, također, sprječava razvoj bakterija iz roda *Clostridium* (MORO i sur. 2015). Mnogi sirevi tradicionalno se proizvode sa dodatkom začinskog bilja koje osim što poboljšava senzorička svojstva sira djeluje i antimikrobno i antioksidativno. SwissAlp Panorama i SwissAlp Bellevue sirevi koji se proizvode u Švicarskoj sadrže začine kao što su kadulja, bosiljak, origano, timijan i peršen. U Hrvatskoj se tradicionalno proizvodi krčki sir u koji se u fazi zrenja dodaju začini kao što su ružmarin, smilje, kadulja i list oraha (JOSIPOVIĆ i sur. 2016.). U mekom buffalo siru sa dodatkom esencijalnog ulja bosiljka spriječen je razvoj kvasaca i plijesni, te potaknut rast starter kultura, a senzorička svojstva sira su poboljšana (ABBAS i sur. 2018.). Bosiljak u sirevima pokazuje antioksidativnu aktivnost i antimikrobni potencijal (CAROCHO i sur. 2016.).

3. MATERIJALI I METODE

3.1 Ekstrakcija i maceracija

Za potrebe ovog diplomskog rada odabrani su alkoholni i uljni ekstrakti. Uljni ekstrakti dobiveni su postupkom maceracije u kućanstvu, dok je za dobivanje alkoholnih ekstrakata bio korišten Soxhlet aparat na odjelu ekologije Zavoda za javno zdravstvo Zadar, te se na njemu provodila vruća kontinuirana ekstrakcija. Svi uzorci biljaka uzeti su iz vlastitog dvorišta.

3.1.1. Uljni ekstrakti

Za macerat bosiljka uzeti su usitnjeni svježi listovi. Biljka je stavljena u staklenku volumena 500 ml do njezine polovice, te prelivena suncokretovim uljem. Nakon zatvaranja i označavanja staklenke, staklenka je stavljena na sunce, te ostavljena četiri tjedna uz povremeno mućkanje. Nakon četiri tjedna sadržaj staklenke procijeđen je kroz gazu, te ostavljen u tamnoj bočici na hladnom mjestu.

Za uljni ekstrakt kadulje uzeto je lišće koje je bilo nasjeckano i ostavljeno da se potpuno osuši na suncu. Nakon usitnjavanja i sušenja lišće je stavljeno u staklenku volumena 500 ml. Količina biljke u staklenci je bila do polovice njezinog ukupnog volumena. Potom je staklenka napunjena suncokretovim uljem do vrha, dobro zatvorena, označena i postavljena na sunce gdje je stajala mjesec dana uz svakodnevno protresanje. Nakon mjesec dana maceracije sadržaj je procijeđen kroz gazu, te pohranjen u tamnu bočicu.

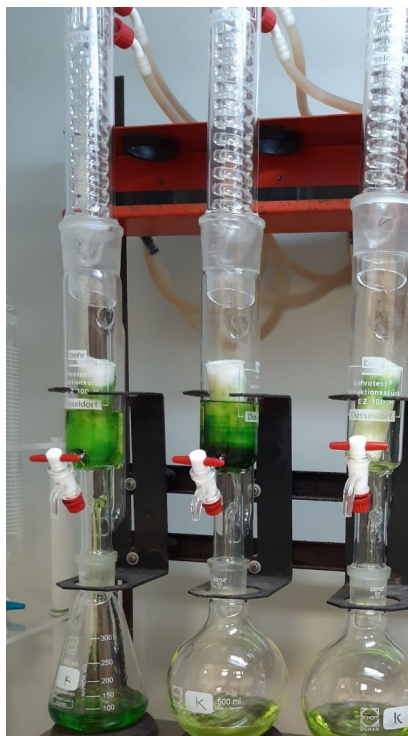
Za uljni ekstrakt lavande koristili su se samo cvijetovi koji su prethodno bili kratko prosušeni na suncu. Cvijetovi su potom rahlo posloženi u staklenku volumena 500 ml, te je staklenka napunjena suncokretovim uljem do 2 prsta iznad razine cvijetova. Staklenka je zatvorena, označena i ostavljena na suncu tri tjedna uz mješanje 2-3 puta tjedno. Nakon tri tjedna macerat je procijeđen kroz gazu te smješten na hladno mjesto u tamnoj bočici.

Od ružmarina su za njegov uljni ekstrakt uzeti njegovi igličasti listići koji su prije toga osušeni na suncu. Listićima je napunjena polovina staklenke volumena 500 ml nakon čega je u staklenku uliveno suncokretovo ulje do vrha. Staklenka je dobro zatvorena, označena i ostavljena na suncu četrdeset pet dana, uz svakodnevno protresanje. Nakon četrdeset pet dana sadržaj je procijeđen kroz gazu i pohranjen u tamnoj bočici na hladnom mjestu.

Za pripravljanje uljnog ekstrakta smilja korišteni su samo njegovi svježi cvjetići. Cvjetići su rahlo posloženi u staklenku volumena 500 ml, preliveni suncokretovim uljem do vrha staklenke, te nakon zatvaranja i označavanja staklenke ostavljeni na suncu dvadeset jedan dan uz mješanje nekoliko puta tjedno. Nakon dvadeset jednog dana sadržaj staklenke je procijeđen kroz gazu i ostavljen na hladnom mjestu u tamnoj bočici.

3.1.2. Alkoholni ekstrakti

Pripravljanje alkoholnih ekstrakata izvodilo se u vremenskom periodu od 08.06.2020. do 12.06.2020. Za dobivanje ovih ekstrakata korišten je Soxhlet aparat. Sve biljke su prethodno usitnjene i posušene na suncu. Nakon sušenja od svake biljke uzeto je 30g koji su podjeljeni u 4 tuljka. Svaki tuljak smješten je u svoju komoricu Soxhlet aparata. Ispod komorica postavljene su tikvice sa 150 ml 70% etanola zagrijavanog na 80°C. Iznad komorica u kojima su tuljci sa osušenim biljkama nalaze se hladila u kojima se ispareni etanol kondenzira. Nakon kondenzacije etanol kapa po tuljku sa osušenom biljkom, te se skuplja u komorici. Kada količina etanola dosegne određenu razinu u komorici on se prelijeva natrag u tikvicu, te ponovno isparava. Ekstrakcija je nastavljena dok etanol koji se skuplja u komorici nije postao potpuno proziran.



Slika 6. Ekstrakcija u Soxhlet aparatu

Nakon toga, tikvice s nakupljenim alkoholnim ekstraktom skinute su sa Soxhlet aparata i filtrirane kroz filter papir.



Slika 7. Filtracija

Dobivena tekućina je stavljena na uparavanje na rotacijskom evaporatoru, gdje je temperatura kupelji bila 27°C. Tlak u evaporatoru je postavljen na 58 mbar, a rotacija se odvijala brzinom od 40 okretaja u minuti. Nakon uparavanja ekstrakti su ponovno profiltrirani, još jednom stavljeni na rotacijski evaporator, te su uparavani do količine od 120 ml.



Slika 8. Rotacijski evaporator

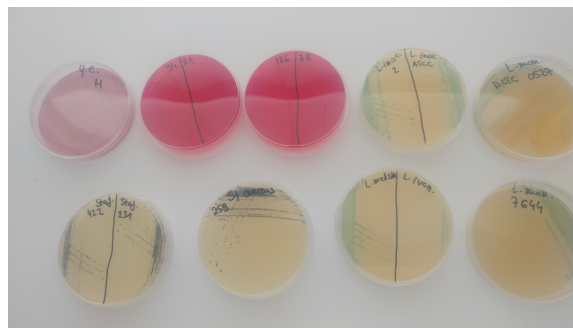
Nakon toga obavljena je još jedna filtracija, te su ekstrakti pohranjeni na hladno mjesto u tamnim bočicama.



Slika 9. Alkoholni ekstrakti

3.2. Priprema indikatorskih bakterija

Antimikrobni učinak ekstrakata testiran je prema bakterijskim izolatima iz kolekcije Zavoda za higijenu, tehnologiju i sigurnost hrane Veterinarskog fakuleta u Zagrebu, i to četiri soja bakterije *Salmonella* Infantis (iz mesa peradi), ermA+ *Staphylococcus haemolyticus* 231 (Veterinary Research Institute, Brno, Češka), ermC+ *Staphylococcus haemolyticus* 422 (Veterinary Research Institute, Brno, Češka), *Staphylococcus aureus* (iz mlijeka), *Yersinia enterocolitica* (biotip 4, serotip O:3), *Listeria innocua* i *L. innocua* ATCC 33090, *Listeria welshimeri*, *Listeria ivanovii* ATCC 19111, *Listeria monocytogenes* NCTC 10527 i *L. monocytogenes* ATCC 7644. Sojevi su namnažani 24 h (37/30 °C) u tekućim hranilištima ovisno o bakterijskoj vrsti: *Salmonella* Infantis u puferiranoj peptonskoj vodi (Merck, Darmstadt, Njemačka), *Y. enterocolitica* u pepton sorbitol žućnom bujonu (Sigma Aldrich, St. Louis, SAD), a stafilokoki i *Listeria* spp. u moždano-srčanom bujonu (Biolife, Milano, Italija). Potom su precijepljene na selektivne hranjive podloge (slika 10).

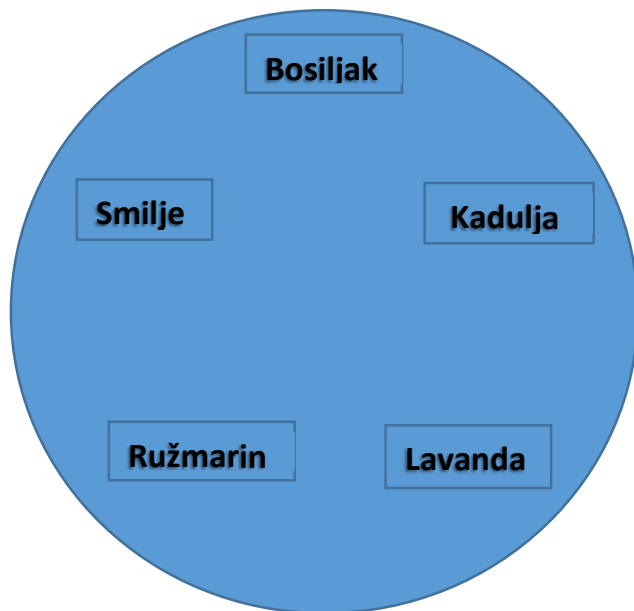


Slika 10. Bakterijske kulture

3.3. Ispitivanje antimikrobne aktivnosti ekstrakata (alkoholni i uljni ekstrakti)

Ispitivanje antimikrobne aktivnosti biljnih ekstrakata provedeno je disk difuzijskim postupkom, u dva navrata, u lipnju i rujnu 2020. godine. Otopina indikatorskih bakterija pripravljena je u sterilnoj destiliranoj vodi do gustoće 0,5 McFarlanda (Densimat, bioMerieux, Francuska). Otopina stanica je potom nanošena troslojno u tri smjera na površinu Muller-Hinton agara (Bio-Rad, Hercules, SAD).

Nakon nasađivanja bakterija pripravljeni su sterilni diskovi (6 mm) koji su natopljeni ekstraktima. Na svaku petrijevu zdjelicu postavljeno je šest diskova, od kojih je svaki bio natopljen u svoj ekstrakt. Pet diskova smješteni su periferno dok je centralno bio smješten disk natopljen nadtalogom kulture *E. faecalis* EF-101 koja sintetizira bakteriocin. Diskovi su smiještani abecednim redoslijedom u smjeru kazaljke na satu. Nakon toga petrijeve zdjelice su poklopljene i stavljene na inkubaciju 24 sata na 37°C.

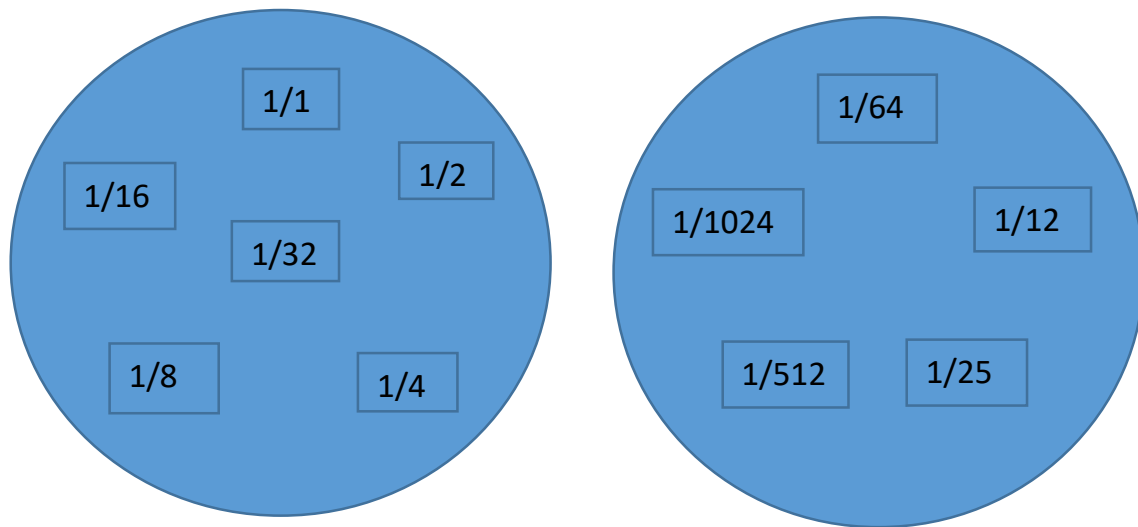


Slika 11. Raspored diskova natopljenih ekstraktima bilja na petrijevoj zdjelici

3.4. Određivanje MIC (minimum inhibitory concentration) ekstrakata

Za pripremanje razrijeđenja ekstrakata koristile su se miktotitracijske pločice. U prvu jažicu stavljeno je 100 µl ekstrakta. U sljedeće jažice stavljeno je po 50 µl destilirane vode. Iz

prve jažice s ekstraktom preneseno je 50 μ l ekstrakta u drugu, iz druge je ponovno preneseno 50 μ l u treću, te se tim slijedom nastavilo do jedanaeste jažice u kojoj je razrijeđenje bilo 1/1024. Razrijeđeni ekstrakti iz jažica nakapani su na diskove koji su poslagani na petrijeve zdjelice na kojima je prije toga nasadena kultura bakterija, te su petrijeve zdjelice stavljene na inkubaciju 24 sata na 37°C.



Slika 12. Raspored diskova natopljenih različitim koncentracijama ekstrakta na petrijevoj zdjelici

4. REZULTATI

Rezultati djelovanja alkoholnih ekstrakata prema indikatorskim bakterijama prikazani su u tablici 1.

Tablica 1. Promjeri (mm) inhibicije rasta bakterija oko diskova natopljenih alkoholnim ekstraktima (19. lipnja 2020.)

	Bosiljak	Kadulja	Lavanda	Ružmarin	Smilje	Enterocin
<i>Salmonella</i> Infantis 78	-	-	-	9mm	-	-
<i>Salmonella</i> Infantis 186	-	-	-	-	-	-
<i>Salmonella</i> Infantis 81	-	-	-	-	-	-
<i>Salmonella</i> Infantis 94	-	7mm	-	-	-	-
<i>Staphylococcus haemolyticus</i> 422	8mm	18mm	-	13mm	24mm	-
<i>Staphylococcus haemolyticus</i> 231	12mm	19mm	9mm	24mm	28mm	-
<i>Staphylococcus aureus</i>	19mm	22mm	11mm	20mm	36mm	-
<i>Yersinia enterocolitica</i> 4:O3	10mm	14mm	-	10mm	13mm	-
<i>Listeria innocua</i>	-	-	-	-	-	-
<i>Listeria welshimeri</i>	-	-	-	7mm	-	-
<i>Listeria ivanovii</i> ATCC 19111	-	-	-	-	-	-
<i>Listeria innocua</i> ATCC 33090	-	-	-	7mm	-	-
<i>Listeria monocytogenes</i> NCTC 10527	-	-	7mm	-	-	10mm
<i>Listeria monocytogenes</i> ATCC 7644	-	-	-	-	-	-

Rezultati su procjenjivani mjerenjem zone inhibicije rasta bakterija oko diska natopljenog ekstraktom. Alkoholni ekstrakti pokazali su dobru sposobnost inhibicije rasta bakterija. Očitavanje rezultata djelovanja uljnih ekstrakata izvodilo se dana 24. lipnja 2020., no nakon inkubacije uljni ekstrakti nisu pokazali djelovanje na indikatorske bakterije.

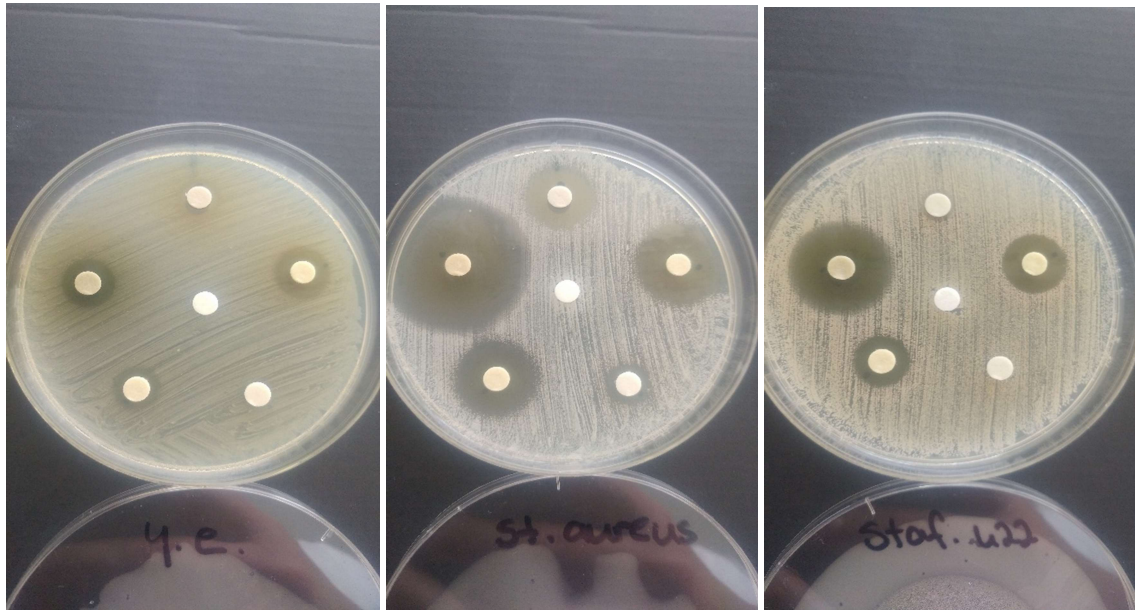
Dana 24. rujna 2020. pristupilo se očitavanju rezultata mjerenja MIC-a alkoholnih ekstrakata. Ekstrakti nisu pokazali djelovanje nakon razrijeđivanja, pa je zbog sumnje na gubitak svojstava ekstrakata ponovljena disk difuzijska metoda s koncentriranim oblicima.

Nakon nasadivanja bakterija, postavljanja diskova natopljenih alkoholnim ekstraktima i inkubacije od 24 sata na 37 °C, očitavani su rezultati.

Tablica 2. Promjeri inhibicije rasta bakterija oko diskova natopljenih alkoholnim ekstraktima (25. rujna 2020.)

	Bosiljak	Kadulja	Lavanda	Ružmarin	Smilje
<i>Salmonella</i> Infantis 78	-	-	-	-	-
<i>Salmonella</i> Infantis 186	-	-	-	-	-
<i>Salmonella</i> Infantis 81	-	-	-	-	-
<i>Salmonella</i> Infantis 94	-	-	-	-	-
<i>Staphylococcus haemolyticus</i> 422	-	13mm	-	9mm	22mm
<i>Staphylococcus haemolyticus</i> 231	-	9mm	-	6mm	23mm
<i>Staphylococcus aureus</i>	-	14mm	-	10mm	23mm
<i>Yersinia enterocolitica</i> 4:O3	-	-	-	-	-
<i>Listeria innocua</i>	-	-	-	-	-
<i>Listeria welshimeri</i>	-	12mm	-	10mm	30mm
<i>Listeria ivanovii</i> ATCC 19111	-	-	-	-	-
<i>Listeria innocua</i> ATCC 33090	-	-	-	-	-
<i>Listeria monocytogenes</i> NCTC 10527	-	-	-	-	-
<i>Listeria monocytogenes</i> ATCC 7644	-	-	-	-	-

Nakon ponovljenog testa alkoholni ekstrakti kadulje, ružmarina i smija pokazali su smanjenu mogućnost inhibicije rasta bakterija, dok su alkoholni ekstrakti bosiljka i lavande potpuno izgubili djelovanje na sve indikatorske bakterije.



Slika 13. Prikaz zona inhibicije rasta indikatorskih bakterija primjenom alkoholnih ekstrakata biljaka

5. RASPRAVA

U ovom radu alkoholni ekstrakti pokazali su jače djelovanje na indikatorske bakterije od uljnih ekstrakata. Najosjetljivije bakterije bile su iz roda *Staphylococcus* i *Yersinia enterocolitica*.

Bosiljak je najbolje djelovao na stafilokoke što je sukladno s rezultatima istraživanja PRASADA i sur. (1986.) gdje je bosiljak pokazao bolje djelovanje protiv Gram-pozitivnih bakterija. No, osim stafilokoka osjetljiva na bosiljak pokazala se i bakterija *Y. enterocolitica*, što je sukladno s rezultatima istraživanja koje su proveli MOGHADDAM i sur. (2011.). HOSSAIN i sur. (2010.) u svom istraživanju navode da ekstrakt bosiljka djeluje na *Bacillus cereus*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus megaterium*, *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes*, *Escherichia coli*, *Shigella boydii*, *Shigella dysenteriae*, *Vibrio parahaemolyticus*, *Vibrio mimicus* i *Salmonella typhi*, no u ovom istraživanju bosiljak je pokazao djelovanje samo na stafilokoke i bakteriju *Y. enterocolitica*.

U ovom istraživanju na ekstrakt kadulje pokazale su se osjetljivima bakterije *Salmonella* Infantis 94, ermC+ *Staphylococcus haemolyticus* 422, ermA+ *Staphylococcus haemolyticus* 231, *S. aureus* i *Y. enterocolitica*. U radu koji su proveli MOSAFA i sur (2013.) korištene bakterije bile su *S. aureus*, *E. coli*, *Pseudomonas aeruginosa* i *Klebsiella pneumoniae*, a najosjetljivija na ekstrakt kadulje bila je bakterija *S. aureus*, što je sukladno rezultatima u ovom istraživanju (najšira zona inhibicije od 22 mm).

Alkoholni ekstrakt lavande pokazao je najslabiji učinak, te je djelovao stvaranjem zone inhibicije rasta samo na bakterije ermA+ *Staphylococcus haemolyticus* 231, i to zonom promjera od 9 mm, na *S. aureus* zonom promjera 11 mm, te na *L. monocytogenes* NCTC 10527 zonom pomjera od 7 mm. ROLLER i sur. (2009.) su primjenom ekstrakta lavande utvrdili inhibicijsko djelovanje prema meticilin rezistentnom i meticilin osjetljivom soju *S. aureus*, sa zonom inhibicije rasta od 8-30 mm što je sukladno rezultatima u ovom istraživanju.

Ekstrakt ružmarina pokazao je djelovanje na najveći broj bakterija. Djelovao je na bakterije *Salmonella* Infantis 78, ermC+ *Staphylococcus haemolyticus* 422, ermA+ *Staphylococcus haemolyticus* 231, *S. aureus*, *Y. enterocolitica*, *L. welshimeri* i *L. innocua* ATCC 33090. U istraživanju koje su provli GOUVEIA i sur. (2016.) dokazano je djelovanje ružmarina na bakteriju *L. monocytogenes*, što u ovom radu nije utvrđeno. Sukladno s istraživanjem ISSABEAGLOO i suradnika (2012.), ovim radom dokazana je osjetljivost *Staphylococcus* spp. na ekstrakt ružmarina.

Najširu zonu inhibicije imao je ekstrakt smilja i to na rezistentne bakterije ermC+ *Staphylococcus haemolyticus* 422 (24 mm), ermA+ *Staphylococcus haemolyticus* 231 (28 mm), te *S. aureus* (36 mm). Zona inhibicije rasta bakterije *Y. enterocolitica* iznosila je 13 mm. Najširi promjer zone inhibicije bio je, dakle, kod bakterije *S. aureus*, što je sukladno rezultatima istraživanja koje je provela STOJČEVIĆ (2015.).

Ponavljanjem testiranja učinkovitosti alkoholnih ekstrakata biljaka nakon 90 dana (rujan, 2020.) utvrđena je njihova smanjena aktivnost. Alkoholni ekstrakt bosiljka nije djelovao ni na jednu indikatorsku bakteriju, za razliku od prvog testiranja. Ekstrakt kadulje inhibirao je rast bakterija manjim intenzitetom (smanjena zona inhibicije), a na bakteriju *S. Infantis* 94 nije imao nikakav učinak. Lavanda kao ni bosiljak nije stvorila zonu inhibicije ni kod jedne bakterijske kulture. Djelovanje ružmarina u ponovljenom testiranju bilo je vidljivo samo kod bakterija iz roda *Staphylococcus* i to smanjenom zonom inhibicije rasta bakterija u usporedbi sa rezultatima u lipnju 2020. Smilje je u rujnu ponovno pokazalo najširu zonu inhibicije od svih ekstrakata, no manju od one koja je bila vidljiva u lipnju. U ponovljenom testiranju pojavila se inhibicija bakterije *L. welshimeri* primjenom ekstrakata kadulje i smilja, što nije bio slučaj u početnom testiranju. Razlozi ove naknadne aktivnosti prema tom soju trebaju se detaljnije istražiti ponovljenim ispitivanjima.

6. ZAKLJUČAK

Aromatsko i ljekovito bilje Dalmacije pokazalo je sposobnost inhibicije rasta nekih indikatorskih patogenih bakterija. Djelovanje na najveći broj bakterija pokazao je ekstrakt ružmarina dok je najjače djelovalo smilje. S obzirom na razliku u rezultatima dobivenim u lipnju i rujnu nije isključeno da ekstrakti stajanjem gube sposobnost inhibicije rasta bakterija. Uz to što se ove biljke već koriste kao začini, njihovo dodavanje u hranu moglo bi biti od značaja u vidu poboljšavanja mikrobiološke ispravnosti hrane i produljivanja roka trajanja.

7. LITERATURA

1. ABBAS, H.M., J.M. KASSEM, S.H.S. MOHAMED, W.M. ZAKY (2018.): Quality appraisal of ultra-filtered soft buffalo cheese using basil essential oil. *Acta Sci. Pol. Technol. Aliment.* 17, 305–312.
2. ADAM, K., A. SIVROPOULOU, S. KOKKINI, T. LANARAS, M. ARSENAKIS (1998.): Antifungal activities of *Origanum vulgare* subsp. *hirtum*, *Mentha spicata*, *Lavandula angustifolia*, and *Salvia fruticosa* essential oils against human pathogenic fungi. *J. Agr. Food Chem.* 46, 1739-1745.
3. ADIGUZEL, A., M. GULLUCE, M. SENGUL, H. OGUTCU, F. SAHIN, I. KARAMAN (2005.): Antimicrobial effects of *Ocimum basilicum* (Labiatae) extract. *Turk. J. Biol.* 155–160.
4. ALBAYRAK, S., A. AKSOY, S. ALBAYRAK, O. SAGDIC (2013.): In vitro antioxidant and antimicrobial activity of some Lamiaceae species, *IJST*, 1-9.
5. ALTAEI, D.T. (2012.): Topical lavender oil for the treatment of recurrent aphthous ulceration. *Am. J. Dent.* 25, 39–43.
6. ALTINDAL, D., ALTINDAL N. (2016.): Sage (*Salvia officinalis*) Oils. U: *Essential Oils in Food Preservation Flavor and Safety*. (Preedy, V.R., ur.), Academic Press, Elsevier, str. 715-721.
7. ALTINIER, G., S. SOSA, R.P. AQUINO, T. MENCHERINI, R. DELLA LOGGIA, A. TUBARO (2007.): Characterization of Topical Antiinflammatory Compounds in *Rosmarinus officinalis* L. *J. Agric. Food Chem.* 55, 1718–1723.
8. APPENDINO, G., M. OTTINO, N. MARQUEZ, F. BIANCHI, A. GIANA, M. BALLERO, O. STERNER, B.L. FIEBICH, E. MUNOZ (2007.): Arzanol, an anti-inflammatory and anti-HIV-1 phloroglucinol alpha-Pyrone from *Helichrysum italicum* ssp. *microphyllum*. *J. Nat. Prod.* 70, 608–612.
9. ARAÚJO SILVA, V., J. PEREIRA DA SOUSA, H. DE LUNA FREIRE PESSÔA, A.F. RAMOS DE FREITAS, H.D. MELO COUTINHO, L. BEUTTENMULLER NOGUEIRA ALVES, E.O. LIMA (2016.): *Ocimum basilicum*: Antibacterial activity and association study with antibiotics against bacteria of clinical importance. *Pharm. Biol.* 54, 863-867.
10. BARBER, A., S. RENDERO, M. CORBI, B. ALBA, D. MOLINA, J.X. BARBER (2005.): Aproximación al conocimiento etnobiológico y etnoecológico de Ibi (Foia de Castalla-L'Alcoià, Alicante). Identia Institute, Spain.

11. BARTON, M.D. (1999.): The down-side of antibiotic use in pig production: The effect of antibiotic resistance of enteric bacteria. U: Manipulating Pig Production. (Carnwell, P.D., ur.), Australasian Pig Science Association, Victoria, Australia.
12. BAUER, J., A. KOEBERLE, F. DEHM, F. POLLASTRO, G. APPENDINO, H. NORTHOFF, A. ROSSI, L. SAUTEBIN, O. WERZ (2011.): Arzanol, a prenylated heterodimeric phloroglucinylnpyrone, inhibits eicosanoid biosynthesis and exhibits anti-inflammatory efficacy in vivo. *Biochem. Pharmacol.* 81, 259–268.
13. BEATOVIĆ, D., D. KRSTIĆ-MILOŠEVIĆ, S. TRIFUNOVIĆ, J. ŠILJEGOVIĆ, J. GLAMOČLIJA, M. RISTIĆ, S. JELAČIĆ (2015.): Chemical composition, antioxidant and antimicrobial activities of the essential oils of twelve *Ocimum basilicum* L. cultivars grown in Serbia, *Rec. Nat. Prod.* 9, 62-75.
14. BEHRADMANESH, S., F. DEREES, M. RAFIEIAN-KOPAEI (2013.): Effect of *Salvia officinalis* on diabetic patients. *J. Renal Inj. Prev.* 2, 51–54.
15. BOUTOIAL, K., E. FERRANDINI, S. ROVIRA, V. GARCÍA, M.B. LÓPEZ (2013.): Effect of feeding goats with rosemary (*Rosmarinus officinalis* spp.) by-product on milk and cheese properties. *Small Rum. Res.* 112, 147-153.
16. BULFON, C., D. VOLPATTI, M. GALEOTTI (2014.): In vitro antibacterial activity of plant ethanolic extracts against fish pathogens. *J. World Aquaculture Soc.* 45, 545-557, doi: 10.1111/jwas.12151.
17. CAROCHO, M., L. BARROS, J.C.M. BARREIRA, R.C. CALHELHA, M. SOKOVIĆ, V. FERNÁNDEZ-RUIZ, C. SANTOS BUELGA, P. MORALES, I.C.F.R. FERREIRA (2016.): Basil as functional and preserving ingredient in “Serra da Estrela” cheese. *Food Chem.* 207, 51-59.
18. CHING, M. (1999.): Contemporary therapy: aromatherapy in the management of acute pain? *Contemporary Nurse* 8, 146–151.
19. CHRISTAKI, E., E. BONOS, I. GIANNENAS, P. FLOROU-PANERI (2012.): Aromatic Plants as a Source of Bioactive Compounds. *Agriculture* 2, 228-243.
20. CHU, C.J., K.J. KEMPER (2001.): Lavender (*Lavandula* spp.), The Longwood Herbal Task Force and The Center for Holistic Pediatric Education and Research. http://blog.vanhove.fr/wp-content/uploads/2014/12/Chu_Lavender_Pediatric_Education_and_Research_2001.pdf
21. CORDEIRO, A., M. MEDEIROS, N. SANTOS, L. SOLEDADE, L. PONTES, A. SOUZA, N. QUEIROZ, A. SOUZA (2013.): Rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.) extract: Thermal

- study and evaluation of the antioxidant effect on vegetable oils. *J. Therm. Anal. Calorim.* 113, 889-895.
22. DZOYEM, J.P. , L.J. MCGAW, V. KUETE, U. BAKOWSKY (2017.): Medicinal Spices and Vegetables from Africa, Chapter 9 - Anti-inflammatory and Anti-nociceptive Activities of African Medicinal Spices and Vegetables, str. 239-270.
 23. EB (2020.): Encyclopaedia Britannica, <<https://www.britannica.com/plant/rosemary>> . Pristupljeno 13. studenog 2020.
 24. ESMAEL, A., M. G.HASSAN, M. M.AMER, S. ABDELRAHMAN, A. M.HAMED, H. A. ABD-RABOH, M. F. FODAAE (2020.): Antimicrobial activity of certain natural-based plant oils against the antibiotic-resistant acne bacteria. *Saudi J. Biol. Sci.* 27, 448-455.
 25. FARAHPOURA, R., E. PIRKHEZRB, A. ASHRAFIANC, A. SONBOLID (2020.): Accelerated healing by topical administration of *Salvia officinalis* essential oil on *Pseudomonas aeruginosa* and *Staphylococcus aureus* infected wound model. *Biomed. Pharmacother.* 128, 110120.
 26. FUNG, D.Y.C., S. TAYLOR, J. KAHAN (1977.): Effect of butylated hydroxyanisole (BHA) and buthylated hydroxytoluebe (BHT) on growth and aflatoxin production of *Aspergillus flavus*. *J. Food Saf.* 1, 39–51.
 27. GAMMARIELLO, D., S. DI GIULIO, A. CONTE, M.A. DEL NOBILE (2008.): Effects of Natural Compounds on Microbial Safety and Sensory Quality of Fior di Latte Cheese, a Typical Italian Cheese. *J. Dairy Sci.* 91, 4138-4146.
 28. GHORBANI, A., M. ESMAEILIZADEH (2017.): Pharmacological properties of *Salvia officinalis* and its components, *J. Tradit. Complement. Med.* 7, 433-440.
 29. GIANNENAS, I., I. KYRIAZAKIS (2009.): Phytobased production for the control of intestinal diseases in chicken in the post antibiotic era. U: *Phytogenics in Animals Nutrition. Natural Concepts to Optimize Gut Health and Performance.* (Steiner, T., ur.), Nottingham University Press, Nottingham, UK, str. 61–85.
 30. GOUVEIA, A.R., M. ALVES, J.A. SILVA, C. SARAIVA (2016.): The Antimicrobial Effect of Rosemary and Thyme Essential Oils Against *Listeria Monocytogenes* in Sous Vide Cook-chill Beef During Storage. *Procedia Food Sci.* 7, 173-176.
 31. GRAHAM C. (1995.): Complementary therapies: In the scent of a good night's sleep. *Nurs. Stand.* 9, 21.
 32. GREATHEAD, H. (2003.): Plants and plant extracts for improving animal productivity. *Proc. Nutr. Soc.* 62, 279–290.

33. HALA, M.F.E.D., I.G. EBTISAM, M.A.B. SANAA, A.S. GAD, M.E.S. MARWA (2010.):
Manufacture of Low Fat UF-Soft Cheese Supplemented with Rosemary Extract (as Natural Antioxidant). Dairy Science Department, National Research Centre, Dairy Science Department, Faculty of Agriculture, Cairo University, Cairo, Egypt
34. HANDA, S.S. (2008.): An Overview of Extraction Techniques for Medicinal and Aromatic Plants. U: Extraction Technologies for Medicinal and Aromatic Plants. (Handa, S.S., S. P.S. Khanuja, G. Longo, D. D. Rakesh, ur.), United Nations Industrial Development Organization and the International Centre for Science and High Technology, Trieste, Italy, str. 21-54.
35. HINK, W., T. LIBERATI (1988.): Toxicity of linalool to life stages of the cat flea, *Ctenocephalides felis* (Siphonaptera Pulicidae) and its efficacy in capres and on animals. *J. Med. Entomol.* 25, 1-4.
36. HOSSAIN, M.A., M. J. KABIR, S. M. SALEHUDDIN, S. M. MIZANUR RAHMAN, A. K. DAS, S.K. SINGHA, K. ALAM, A. RAHMAN (2010.): Antibacterial properties of essential oils and methanol extracts of sweet basil *Ocimum basilicum* occurring in Bangladesh. *Pharm. Biol.* 48, 504-511.
37. HYDE BAILEY, L. (1976.): *Hortus third: A concise dictionary of plants cultivated in the United States and Canada.* 3rd ed. Macmillan, New York.
38. ISSABEAGLOO, E., P. KERMANIZADEH, M. TAGHIZADIEH, R. FORUGHI (2012.): Antimicrobial effects of rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.) essential oils against *Staphylococcus* spp. *Afr. J. Microbiol. Res.* 6, 5039-5042.
39. KAYA, I., N. YIGIT, M. BENLI (2008.): Antimicrobial Activity of Various Extracts of *Ocimum Basilicum* L. and Observation of the Inhibition Effect on Bacterial Cells by Use of Scanning Electron Microscopy. *Afr. J. Tradit. Complement. Altern. Med.* 5, 363–369.
40. KONTOGIANNI, V.K., G. TOMIC, I. NIKOLIC, A.A. NERANTZAKI, N. SAYYAD, S. STOSIC-GRUJICIC, I. STOJANOVIC, I. P. GEROTHANASSIS, A. G. TZAKOS (2013.): Phytochemical profile of *Rosmarinus officinalis* and *Salvia officinalis* extracts and correlation to their antioxidant and anti-proliferative activity. *Food Chem.* 136, 120–129.
41. LARRONDO, J.V., M. AGUT, M.A. CALVO-TORRAS (1995): Antimicrobial activity of essences from labiates. *Microbios.* 82, 171-172.
42. LONGARAY DELAMARE, A.P., I. T. MOSCHEN-PISTORELLO, L. ARTICO, L. ATTI-SERAFINI, S. ECHEVERRIGARAY (2007.): Antibacterial activity of the essential oils of *Salvia officinalis* L. and *Salvia triloba* L. cultivated in South Brazil. *Food Chem.* 100, 603-608.

43. LOURENS A.C., A.M. VILJOEN, F.R. VAN HEERDEN (2008.): South African *Helichrysum* species: a review of the traditional uses, biological activity and phytochemistry. *J. Ethnopharmacol.* 119, 630–652.
44. MALENICA STAVAR, M., I. GOBIN, I. RATKAJ, M. PETROVIC, A. VULINOVIC, M. DINARINA-SABLIC, D. BROZNIC (2018.): In vitro Antiproliferative and Antimicrobial Activity of the Essential Oil from the Flowers and Leaves of *Helichrysum italicum* (Roth) G. Don Growing in Central Dalmatia (Croatia). *J. Essent. Oil Bear Pl.* 21, 77-91.
45. MILENKOVICS, B. (2005.): *Ljekovito bilje; ljekarna iz prirode*, Zagreb, Večernjakova knjiga, str. 44.
46. MORO, A., C.M. LIBRÁN, M.I. BERRUGA, M. CARMONA, A. ZALACAIN (2015.): Dairy matrix effect on the transference of rosemary (*Rosmarinus officinalis*) essential oil compounds during cheese making. *J. Sci. Food Agric.* 95, 1507-1513.
47. MOSAFA, E., S. YAHYAABADI, M. DOUDI (2013.): In vitro antibacterial properties of sage (*Salvia officinalis*) ethanol extracts against multidrug resistant *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* and *Klebsiella pneumoniae*. *Zahedan J. Res. Med. Sci.* 16, 42-46.
48. MUCALO, Z. (2015.): *Smilje (Helichrysum italicum /Roth/ G.Don): od tradicionalne uporabe do znanstvenih istraživanja*. Diplomski rad, Agronomski fakultet, Zagreb.
49. NELSON, R.R.S (1997.): In -vitro activities of five plant essential oils against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and vancomycin-resistant *Enterococcus faecium*. *J. Antimicrob. Chemother.* 40, 305-306.
50. NIETO, G., G. ROS, J. CASTILLO (2018.): Antioxidant and Antimicrobial Properties of Rosemary (*Rosmarinus officinalis*, L.): A Review. *Medicines*, 5, 98.
51. NOSTRO, A., G. BISIGNANO, M.A. CANNATELLI, G. CRISAFI, M.P. GERMANÒ, V. ALONZO (2001.): Effects of *Helichrysum italicum* extract on growth and enzymatic activity of *Staphylococcus aureus*, *Int. J. Antimicrob. Agents* 17, 517-520.
52. OLMEDO, R.H., V. NEPOTE, N. R. GROSSO (2013.): Preservation of sensory and chemical properties in flavoured cheese prepared with cream cheese base using oregano and rosemary essential oils. *LWT - Food Sci. Technol.* 53, 409-417.
53. ORLIĆ, P. (2015.): *Tradicionalna primjena samoniklog ljekovitog i jestivog bilja otoka Krka*. Diplomski rad. Sveučilište u Zagrebu, Farmaceutskobiokemijski fakultet.
54. PAHLOW, M. (1989.): *Velika knjiga ljekovitog bilja*, Cankarjeva založba, Ljubljana-Zagreb.

55. PERRUCCI, S., F. MANCIANTI, P.L. CIONI, G. FLAMINI, I. MORELLI, G. MACCHIONI (1994.): In vitro antifungal activity of essential oils against some isolates of *Microsporum canis* and *Microsporum gypseum*. *Planta Med.* 60, 184-186.
56. PICCAGLIA, R., M. MAROTTI, E. GIOVANELLI, S.G. DEANS, E. EAGLESHAM (1993.): Antibacterial and antioxidant properties of mediterranean aromatic plants. *Ind. Crops Prod.* 2, 47–50.
57. PLANTAGEA (2020.): <<https://www.plantagea.hr/fitoterapija/ekstrakti-iscrpine-biljaka>> . *Pristupljeno 16. studenog 2020.*
58. POP, A., S. MUSTE, C. MURESAN, C. POP, L. SALANTA (2013.): Comparative study regarding the importance of sage (*Salvia officinalis L.*) In terms of antioxidant capacity and antimicrobial activities. *Hop and medicinal plants*, 21, 66-74.
59. PRASAD, G., A. KUMAR, A.K. SINGH, A.K. BHATTACHARYA, K. SINGH, V.D. SHARMA (1986.): Antimicrobial activity of essential oils of some *Ocimum* species and clove oil. *Fitoterapia* 57, 429-432.
60. PUSHPANGADAN, P., V. GEORGE (2012.): *Handbook of Herbs and Spices (Second edition), Volume 1*, Woodhead Publishing Series in Food Science, Technology and Nutrition, str. 55-72.
61. QUER P. F. (1993.): *Plantas Medicinales, El Dioscórides Renovado*, 14th ed. Editorial Labor, S. A., Barcelona.
62. RIBEIRO, A., C. CALEJA, L. BARROS, C. SANTOS-BUELGA, M.F. BARREIRO, I.C.F.R. FERREIRA (2016.): Rosemary extracts in functional foods: extraction, chemical characterization and incorporation of free and microencapsulated forms in cottage cheese. *Food Funct.* 7, 2185-2196.
63. RIVERA, D., F. ALCARAZ, A. VERDE, J. FAJARDO, C. OBÓN (2008.): Las plantas en la cultura popular. *Enciclopedia Divulgativa de la Historia Natural de Jumilla-Yecla. Vol. 9.* Sociedad Mediterránea de Historia Natural, Jumilla.
64. SCHOLEY, A., D. CAMFIELD, L. OWEN, A. PIPINGAS, C. STOUGH (2011.): *Functional Foods (Second edition). Concept to Product.* Woodhead Publishing Series in Food Science, Technology and Nutrition, str. 277-308.
65. SHARAFI, S.M., I. RASOOLI, P. OWLIA, M. TAGHIZADEH, S.D. ASTANEH (2010.): Protective effects of bioactive phytochemicals from *Mentha piperita* with multiple health potentials. *Pharmacogn. Mag.* 6, 147–153.

66. SIENKIEWICZ, M., M. LYSAKOWSKA, M. PASTUSZKA, W. BIENIAS, E. KOWALCZYK (2013.): The potential of use Basil and Rosemary essential oils as effective antibacterial agents. *Molecules* 18, 9334–9351.
67. SIMON, J.E., A.F. CHADWICK, L.E. CRAKER (1984.): Herbs: an indexed bibliography, 1971-1980. The scientific literature on selected herbs and aromatic and medicinal plants of the temperate zone. Archon, Hamden, Corm.
68. STOJČEVIĆ, I. (2015): Antimikrobna svojstva eteričnih ulja primorske Hrvatske na stafilokoke. Završni rad, Sveučilište u Rijeci, Medicinski fakultet.
69. SVOBODA, K.A., J.B. HAMPSON (1999.): Bioactivity of essential oils of selected temperate aromatic plants: Antibacterial, antioxidant, antiinflammatory and other related pharmacological activities. *Proceedings of NAHA, St. Louis, MO, USA*, str. 105–127.
70. ŠILJEŠ, I., Đ. GROZDANIĆ, I. GRGESINA (1992.): Poznavanje, uzgoj i prerada ljekovitog bilja, Zagreb, Školska knjiga.
71. ŠODIĆ N. (2016.): Zahtjevi smilja (*helichrysum italicum* lat.) prema vodi u plantažnom uzgoju. Završni rad, Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku, Fakultet agrobiotehničkih znanosti Osijek.
72. ŠOJIĆ, B., B. PAVLIĆ, Z. ZEKOVIĆ, V. TOMOVIĆ, P. IKONIĆ, S. KOCIĆ-TANACKOV, N. DŽINIĆ (2018.): The effect of essential oil and extract from sage (*Salvia officinalis* L.) herbal dust (food industry by-product) on the oxidative and microbiological stability of fresh pork sausages. *LWT - Food Sci. Technol.* 89, 749-755.
73. VIEGAS, D.A., A. PALMEIRA DE OLIVEIRA, L. SALGUEIRO, J. MARTINEZ DE OLIVEIRA, R. PALMEIRA DE OLIVEIRA (2013.): *Helichrysum italicum*: From traditional use to scientific data. *J. Ethnopharmacol.* 151, 54-65.

8. SAŽETAK

U ovom diplomskom radu cilj je bio istražiti antimikrobni potencijal alkoholnih i uljnih ekstrakata sezonskog ljekovitog i aromatičnog bilja s područja Dalmacije - bosiljka, kadulje, lavande, ružmarina i smilja. Antimikrobni potencijal procijenjen je disk difuzijskim testom prema patogenim bakterijama značajnima u sigurnosti hrane: *Salmonella* Infantis, ermA+ *Staphylococcus haemolyticus*, ermC+ *Staphylococcus haemolyticus*, *Staphylococcus aureus*, *Yersinia enterocolitica*, *Listeria innocua*, *Listeria welshimeri*, *Listeria ivanovii* i *Listeria monocytogenes*. Uljni ekstrakti nisu uzrokovali inhibiciju rasta, dok su alkoholni ekstrakti pokazali učinak na devet od 14 testiranih sojeva. Najosjetljivijima su se pokazali stafilokoki i *Y. enterocolitica* koji su bili inhibirani svim ekstraktima. Ekstrakt ružmarina je inhibirao najširi spektar, odnosno sedam indikatorskih bakterija, a najmanje lavanda, njih troje. Ekstrakt smilja je pokazao najsnažniju inhibicijsku aktivnost u vidu najširih zona inhibicije prema ermA+ *Staphylococcus haemolyticus*, ermC+ *Staphylococcus haemolyticus*, *Staphylococcus aureus*. Nakon tri mjeseca pohrane, antimikrobnu aktivnost, iako oslabljenu, zadržali su ekstrakti kadulje, ružmarina i smilja.

Ključne riječi: aromatsko i ljekovito bilje, antimikrobna aktivnost, patogene bakterije iz hrane

9. SUMMARY

THE EFFECT OF DALMATIAN AROMATIC HERBS EXTRACTS ON PATHOGENIC BACTERIA FROM FOOD OF ANIMAL ORIGIN

In this work, the aim was to investigate the antimicrobial potential of alcoholic and oil extracts of seasonal medicinal and aromatic plants from Dalmatia - basil, sage, lavender, rosemary and immortelle. Antimicrobial potential was evaluated by disk diffusion test against pathogenic bacteria important for food safety: *Salmonella* Infantis, ermA+ *Staphylococcus haemolyticus*, ermC+ *Staphylococcus haemolyticus*, *Staphylococcus aureus*, *Yersinia enterocolitica*, *Listeria innocua*, *Listeria welshimeri*, *Listeria ivanovii* and *Listeria monocytogenes*. Oil extracts caused no growth inhibition while alcoholic extracts showed effect on nine of the 14 strains tested. Staphylococci and *Y. enterocolitica*, which were inhibited by all extracts, were found to be the most sensitive. Rosemary extract inhibited the broadest spectrum, i.e. seven indicator bacteria, and lavender the least, i.e. three of them. Immortelle extract showed the strongest inhibitory activity in terms of broadest zones of inhibition toward ermA + *Staphylococcus haemolyticus*, ermC + *Staphylococcus haemolyticus* and *Staphylococcus aureus*. After three months of storage, the antimicrobial activity, although impaired, of sage, rosemary and immortelle extracts was maintained.

Ključne riječi: aromatic herbs, antimicrobial activity, foodborne pathogens

10. ŽIVOTOPIS

Rođena sam 26.12.1995. godine u Zadru. Osnovnu školu Smiljevac završila sam 2010. godine, te sam upisala Poljoprivrednu, prehrambenu i veterinarsku školu Stanka Ožanića u Zadru. Nakon završene srednje škole 2014. godine upisala sam integrirani preddiplomski i diplomski studij na Veterinarskom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu. Tijekom studija obavljala sam poslove preko Studentskog servisa, a terensko-stručnu praksu odradila sam u Veterinarskoj ambulanti Puntamika.