

»Mladi za napredek Maribora 2018«

35. srečanje

Primerjava antimikrobne učinkovitosti eteričnega olja črne kumine (*Nigella sativa* L.) z aktivnimi učinkovinami in eteričnim oljem navadne kumine (*Carum carvi* L.)

Področje: ZDRAVSTVO

Raziskovalna naloga

Avtor: LANA KRMELJ, NUŠA KOS THALER
Mentor: ZDENKA KEUC, TAMARA ŠIŠKO
Šola: II. GIMNAZIJA MARIBOR

Maribor, januar 2018

»Mladi za napredek Maribora 2018«

35. srečanje

Primerjava antimikrobne učinkovitosti eteričnega olja črne kumine (*Nigella sativa* L.) z aktivnimi učinkovinami in eteričnim oljem navadne kumine (*Carum carvi* L.)

Področje: ZDRAVSTVO

Raziskovalna naloga

Maribor, januar 2018

KAZALO VSEBINE

POVZETEK	7
ZAHVALA	8
1 UVOD	9
1.1 CILJI RAZISKAVE	9
1.2 RAZISKOVALNO VPRAŠANJE	10
1.3 HIPOTEZE IN NJIHOVE RAZLAGE	10
1.4 METODE DELA	12
2 PREGLED LITERATURE	14
2.1 NAVADNA KUMINA, NJENO PRIDELOVANJE IN UPORABA	14
2.2 ZGODOVINA UPORABE NAVADNE KUMINE V MEDICINI	14
2.2.1 HIPOGLIKEMIČNA AKTIVNOST OLJA NAVADNE KUMINE	15
2.2.2 HIPOLIPIDIČNI UČINKI	16
2.2.3 ANTIKANCEROGENI IN ANTIMUTAGENI UČINEK	16
2.2.4 DIURETIČNI UČINEK	16
2.2.5 UČINEK NA FARMAKOLOŠKE LASTNOSTI ANTIBAKTERIJSKIH ZDRAVIL	16
2.3 FARMAKOLOŠKI UČINKI ETERIČNEGA OLJA ČRNE KUMINE (<i>N. sativa</i> L.)	17
2.4 KEMIJSKA SESTAVA SEMEN NAVADNE KUMINE (<i>Carum carvi</i> L.)	18
2.5 KEMIJSKA SESTAVA SEMEN ČRNE KUMINE (<i>Nigella sativa</i> L.)	19
2.6 EKSTRAKCIJA ETERIČNIH OLJ	21
2.7 ANTIOKSIDATIVNI POTENCIAL EKSTRAKTOV	21
3 PRAKTIČNO DELO - KEMIJA	23
3.1 OPIS VZORCA ČRNE KUMINE	24
3.2 EKSTRAKCIJA SEMEN ČRNE KUMINE Z ORGANSKIMI TOPILI IN DESTILIRANO VODO	25
3.3 EKSTRAKCIJA Z VODNO PARO	26
3.4 TLC ALANIZA – VSEBNOST KARVONA IN LIMONENA V VZORCIH EKSTRAKTOV	26
3.5 ATR-FTIR SPEKTROSKOPIJA	27
3.6 DPPH TESTI	27
3.7 REZULTATI	28
3.7.1 OCENA USTREZNOSTI TOPILA IN IZKORISTKI EKSTRAKCIJ	28
3.7.2 IZKORISTEK EKSTRAKCIJE S SOXHLETOVIM APARATOM (PRIDOBITEV PARNEGA EKSTRAKTA)	29
3.7.3 TLC ANALIZA EKSTRAKTOV ČRNE KUMINE	30
3.7.4 ATR-FTIR ANALIZA EKSTRAKTOV PO ODSTRANITVI TOPILA	31

3.7.5 ANALIZA TESTA DPPH.....	35
4 PRAKTIČNO DELO - MIKROBIOLOGIJA.....	39
4.1 SEZNAM MATERIALOV.....	39
4.1.1 DELOVNI MIKROORGANIZMI.....	39
4.1.2 ZAŠČITNA OPREMA.....	39
4.1.3 KEMIKAJIJE.....	39
4.1.4 LABORATORIJSKI PRIBOR.....	39
4.1.5 LABORATORIJSKE APARATURE.....	40
4.2 OPISI MIKROORGANIZMOV.....	40
4.2.1 <i>E. COLI</i>	40
4.2.2 <i>BACILLUS CEREUS</i>	41
4.2.3 GLIVE KVASOVKE (<i>Saccharomyces cerevisiae</i>).....	42
4.3 PRIPRAVA GOJIŠČ.....	43
4.4 PRIPRAVA PREKONOČNIH KULTUR.....	44
4.5 DIFUZIJSKI ANTIBIOGRAMI Z DISKI.....	45
4.6 REZULTATI MIKROBIOLOŠKEGA DELA.....	46
4.6.1 <i>E. COLI</i>	46
4.6.2 <i>BACILLUS CEREUS</i>	48
4.6.3 GLIVE KVASOVKE (<i>Saccharomyces cerevisiae</i>).....	49
5 RAZPRAVA.....	54
6 ZAKLJUČEK.....	61
7 DRUŽBENA ODGOVORNOST.....	63
8 VIRI IN LITERATURA.....	64
9 PRILOGE.....	67
PRILOGA 1 – ATR-FTIR SPEKTRI EKSTRAKTOV.....	67
PRILOGA 2 – MERITVE INHIBICIJSKIH CON.....	70
PRILOGA 3 – FOTOGRAFIJE INHIBICIJSKIH CON.....	75

KAZALO SLIK:

SLIKA 1: Kinonski derivati eteričnega olja črne kumine (Kokoska s sod., 2008).....	11
SLIKA 2: Strukturne formule aktivnih preučevanih učinkovin v ekstraktih črne kumine.....	12
SLIKA 3: <i>Carum carvi</i> L.; (navadna kumina), <i>Cuminum cyminum</i> L. (kumin) in <i>Nigella sativa</i> L. (črna kumina) (vir: https://goo.gl/k714za (25.1. 2018)).....	14
SLIKA 4: Aktivne učinkovine v črni kumini (<i>N. sativa</i> L) (Kooti s sod.,2016).....	20
SLIKA 5: Aktivne učinkovine in eterična olja ter ekstrakti, preučevani v tej raziskavi (lasten vir).....	24
SLIKA 6: Vzorec črne kumine uporabljen v raziskavah (lasten vir).....	24

SLIKA 7: Ekstrakti črne kumine po centrifugiranju (lasten vir).....	25
SLIKA 8: Soxhletova aparatura (levo) in ločevanje vodne in organske faze z lijem ločnikom (desno) (lasten vir) ..	26
SLIKA 9: Strukturna formula DPPH (vir: https://goo.gl/abghtz)	28
SLIKA 10: Razvit kromatogram pri uporabi etanola kot topila za ekstrakcijo (lasten vir)	31
SLIKA 11: Strukturna formula timokinona (Khan s sod., 2017) in njegov Atr-FTIR spekter	35
SLIKA 12: Barve raztopin DPPH po 30 min (lasten vir).....	38
SLIKA 13: Bakterija <i>E. coli</i> pod mikroskopom (vir: https://goo.gl/sybb5v) (1. 2. 2018).....	41
SLIKA 14: <i>B.cereus</i> pod mikroskopom (vir: https://goo.gl/v3bawf) (1. 2. 2018).....	42
SLIKA 15: Glive kvasovke pod mikroskopom (vir: https://goo.gl/kqyrdd) (1. 2. 2018)	43
SLIKA 16: Kolonije znotraj inhibicijskih con pri <i>E. coli</i> (sintetično olje navadne kumine) (lasten vir)	47
SLIKA 17: Inhibicijske cone učinkovine (S)-(+)-karvon na petrijevki s kulturo <i>B. cereus</i> (lasten vir).....	49
SLIKI 18 in 19: Nepravilne oblike inhibicijskih con (levo) in popolnoma preraščeno gojišče (desno) (lasten vir) ..	50
SLIKA 20: Inhibicijske cone na petrijevkah s čistim parnim ekstraktom črn ekumine pri <i>E. coli</i> po petih dneh (lasten vir).....	51
SLIKA 21: Inhibicijske cone na <i>E. coli</i> po 24 urah	75
SLIKA 22: Inhibicijske cone na <i>E. coli</i> po 48 urah	76
SLIKA 23: Inhibicijske cone na <i>E. coli</i> po 120 urah	77
SLIKA 24: Inhibicijske cone na glivah kvasovkah po 48 urah	78
SLIKA 25: Inhibicijske cone na <i>B. cereus</i> po 24 urah	79

KAZALO TABEL:

TABELA 1: Pet glavnih sestavin navadne kumine (<i>Carum carvi</i> L.), njihove strukturne formule in deleži v semenih	19
TABELA 2: Aktivne učinkovine prisotne v <i>C. carvi</i> in <i>N. sativa</i>	20
TABELA 3: Mase vzorca črne kumine.....	25
TABELA 4: Izkoristki ekstrakcij z uporabo različnih topil	29
TABELA 5: Prisotnost karvona in limonena v vzorcih ekstraktov	30
TABELA 6: Značilne vezi v spojinah, ki so skupne črni in navadni kumini.....	33
TABELA 7: Analiza IR spektrov ekstrahiranih eteričnih olj.....	34
TABELA 8: Absorbanca preučevanih učinkovin po določenem času	35
TABELA 9: Odstotek inhibicije aktivnih učinkovin olja črne kumine po določenem času.....	36
TABELA 10: Odstotek inhibicije ostalih učinkovin po določenem času	37
TABELA 11: Snovi, potrebne za pripravo gojišča LB, in njihove količine.....	44
TABELA 12: Snovi, potrebne za pripravo gojišča LB, in njihove količine.....	44
TABELA 13: Povprečne vrednosti premera inhibicijskih con pri testih na <i>E. coli</i> po določenem času.....	46
TABELA 14: Povprečni premer inhibicijskih con čistih snovi pri <i>B. cereus</i>	49
TABELA 15: Povprečni premeri inhibicijskih con pri glivah kvasovkah po 48 urah	49
TABELA 16: Premeri inhibicijskih con na <i>E. coli</i> v mm po 24 urah	70
TABELA 17: Premeri inhibicijskih con na <i>E. coli</i> v mm po 48 urah	71
TABELA 18: Premeri inhibicijskih con na <i>E. coli</i> v mm po 120 urah	72
TABELA 19: Premeri inhibicijskih con na <i>B. cereus</i> v mm po 24 urah	73
TABELA 20: Premeri inhibicijskih con na glivah kvasovkah v mm po 48 urah	74

KAZALO GRAFOV:

GRAF 1: Primerjava IR spektrov ekstrakta pridobljenega z etanolom in IR spektra metilnega estra linolenske kisline.....	32
---	----

GRAF 2: ATR-FTIR spekter olja črne kumine, pridobljen z uporabo superkritičnega CO ₂ v primerjavi s hladno stiskanim oljem črne kumine (Mohammed s sod., 2016).....	32
GRAF 3: ATR-FTIR spekter ekstrakta, pridobljenega z etrom kot topilom.....	33
GRAF 4: Odstotek inhibicije DPPH aktivnih učinkovin olja v odvisnosti od časa.....	36
GRAF 5: Odstotek inhibicije DPPH preostalih učinkovin v odvisnosti od časa.....	37
GRAF 6: Povprečni premer inhibicijskih con čistih učinkovin pri <i>E. coli</i>	47
GRAF 7: Povprečni premer inhibicijskih con nečistih učinkovin pri <i>B. cereus</i> po 24 urah.....	48
GRAF 8: Primerjava povprečnih premerov inhibicijskih con najboljših učinkovin na glive kvasovke.....	50
GRAF 9: Primerjava povprečnih premerov inhibicijskih con čistega in surovega parnega ekstrakta pri vseh testiranih mikroorganizmih.....	51
GRAF 10: Povprečni premeri inhibicijskih con posamezne učinkovine pri <i>E. coli</i>	52
GRAF 11: Povprečni premeri inhibicijskih con posamezne učinkovine pri glivah kvasovkah.....	52
GRAF 12: Povprečni premeri inhibicijskih con posamezne učinkovine pri <i>B. cereus</i>	53
GRAF 13: IR spekter ekstrakta pridobljenega s petroletrom.....	67
GRAF 14: IR spekter ekstrakta pridobljenega s heksanom.....	67
GRAF 15: IR spekter ekstrakta pridobljenega z destilirano vodo.....	68
GRAF 16: IR spekter (R)-(+)-limonena.....	68
GRAF 17: IR spekter (R)-(-)-karvona.....	69
GRAF 18: IR spekter (S)-(+)-karvona.....	69

UPORABLJENE KRAJŠAVE:

TLC – »Thin Layer Chromatography«; tankoplastna kromatografija

DPPH – 2,2-difenil-1-pikrilhidrazil (ali 1,1-difenil-2-pikrilhidrazil)

ATR-FTIR – »Attenuated Total Reflectance-Fourier Transform Infrared«; Fourierovo Transformirana IR svetloba z oslavljenim popolnim odbojem

IR – infrardeča (spektroskopija)

BDA – »Broth Dilution Assay«

UV/Vis – »ultraviolet visible«; ultravijolična vidna (spektroskopija)

STZ – streptozotocin

MIC – minimalna koncentracija, ki vidno učinkuje (zavira rast) na bakterije

AUC – površina pod krivuljo, ki prikazuje odvisnost plazemske koncentracije od časa

SFE – »Supercritical Fluid Extraction«; ekstrakcija s superkritičnimi fluidi

FID – »Flame Ionization Detector«; plamensko ionizacijski detektor

ABTS – 2,2'-azobis-3-etilbenzotiazolin-6-sulfonska kislina

PAH – policiklični aromatski ogljikovodiki

HPLC – »High-Performance Liquid Chromatography«; tekočinska kromatografija visoke ločljivosti

POVZETEK

Kumina že od nekdaj velja za zdravilno rastlino, ki preprečuje napenjanje, pomirja, deluje protibolečinsko in antihistaminčno. V raziskovalni nalogi smo želeli ugotoviti, katera izmed komponent v navadni in črni kumini je odgovorna za njune zdravstvene učinke. Iz semen črne kumine smo z različnimi topili pridobili eterična olja, izračunali izkoristke ter s pomočjo tankoplastne kromatografije ugotavljali, ali ekstrakti vsebujejo tudi dve glavni komponenti navadne kumine, to sta (S)-(+)-karvon in (R)-(+)-limonen. Preko ATR-FTIR spektrov smo določali čistost ekstraktov oz. prisotnost značilnih vezi za tiste spojine, katerih antimikrobni učinek smo preučevali v drugem delu naloge. S testom DPPH smo preverjali antioksidativno učinkovitost ekstraktov in jo primerjali z antioksidativno učinkovitostjo čistih spojin ter komercialnimi olji navadne kumine (naravnimi in sintetičnimi).

Ugotovili smo, da pridobljen parni ekstrakt črne kumine vsebuje komponenti (S)-(+)-karvon in limonen. S testom DPPH smo ugotovili, da je (S)-(+)-karvon tista komponenta, ki ima najboljši antioksidativni učinek (največji odstotek inhibicije). Rezultati ostalih čistih učinkovin ((R)-(-)-karvona, limonena in kuminaldehida) so bili med slabšimi. Učinka čistega in surovega parnega ekstrakta črne kumine sta bila med seboj primerljiva. Enantiomera karvona sta med čistimi snovmi tisti učinkovini, ki imata najmočnejši antibakterijski učinek. Na bakterijo *E. coli* sta dobro delovala oba (razlika med povprečnimi vrednostmi njunih inhibicijskih con je bila minimalna), na *B. cereus* pa je bolje deloval (R)-(-)-karvon. Ostale preizkušene snovi so kazale raznolike antimikrobne učinke; na *E. coli* je najbolje delovalo naravno olje navadne kumine, na glive kvasovke sintetično olje navadne kumine, na *B. cereus* pa čisti parni ekstrakt črne kumine. Teste smo naredili *in vitro*, zato je težko govoriti o tem, kako bi naše učinkovine delovale *in vivo*, kjer moramo upoštevati še fiziološke in nefiziološke dejavnike, ki vplivajo na resorpcijo učinkovin. Ravno to je razlog za spodbuditev nadaljnjih raziskav na tem področju.

Ključne besede: ekstrakt črne kumine in navadne kumine, antioksidacijska učinkovitost, antimikrobna učinkovitost

ZAHVALA

Iskreno se zahvaljujema mentoricama za stalno pomoč, spodbudo in nasvete pri delu. Zahvaljujema se tudi biološkemu in kemijskemu aktivu najine šole za omogočeno delo v laboratoriju, kjer sva imeli na voljo vse, kar sva potrebovali, ter aktivu fizikov za možnost izposoje digitalnega kaliperja, ki je pripomogel k bolj natančnim rezultatom meritev.

1 UVOD

Že tisočletja preden se je začel uporabljati izraz antioksidant in preden se je začelo preučevati zelišča zaradi njihovih antioksidativnih lastnosti, se je navadna kumina (*Carum carvi* L.), zaradi svojih zdravilnih lastnosti, uporabljala v medicinske namene. Različni avtorji (Agrahari in Singh, 2014; Abdalaziz s sod., 2017; Al-Snafi, 2015) navajajo, da imajo semena navadne kumine številne ugodne biološke lastnosti, kot so antimikrobne in antioksidativne lastnosti. Slednje danes pripisujejo predvsem terpenoidom in polifenolom, ki so prisotni v kumini. Raziskovalci poročajo, da ima navadna kumina tudi antimutagene, hipoglikemične, hipolipidične in druge lastnosti (Abdalaziz s sod., 2017; Agrahari in Singh, 2014; Al-Snafi, 2015). Njeno antioksidativno delovanje je posledica visoke aktivnosti pri lovljenju prostih radikalov in inhibicije prooksidativnih encimov ter peroksidacije lipidov. Antimikrobni potencial ekstraktov kumine se izkazuje v njenih antivirusnih, antibakterijskih in antimikotičnih učinkih. Novejše *in vitro* ter *in vivo* študije poročajo tudi o visokem antikarcinogenem potencialu ekstraktov navadne kumine, saj številne v ekstraktih vsebovane naravne spojine delujejo kot lovilci kemijskih karcinogenov in tako zmanjšujejo njihovo genotoksičnost, sočasno pa inhibirajo še proliferacijo malignih celic, zaustavljajo njihovo migracijo in nižajo njihovo invazivnost ter potencial za tvorjenje metastaz. Biološki učinki večine v kuminah ekstraktih vsebovanih naravnih molekul so zaradi njihove številčnosti in posledično raznolikosti slabo poznani in razumljeni ter si zanesljivo zaslužijo pozornejšo raziskovalno obravnavo.

Ker je v Sloveniji zelo popularna tudi črna kumina (*Nigella sativa* L.), bomo eksperimentalno pozornost usmerili predvsem v vodni ekstrakt semen te rastline. Tako navadna kot črna kumina predstavljata rastlini visokega pomena za farmacevtsko, kozmetično in prehransko industrijo, zato je bil cilj naše naloge poiskati odgovor na vprašanje: *Ali lahko s preučevanjem kemijske sestave in opazovanjem antimikrobnih učinkov pridobimo podatke, katere aktivne snovi v ekstraktih črne in navadne kumine so odgovorne za njune terapevtske učinke in kombinacija česa daje največje sinergistične učinke?*

1.1 CILJI RAZISKAVE

V raziskavi bomo ocenili in primerjali antioksidativni ter antimikrobni potencial parnega ekstrakta črne kumine s čistimi aktivnimi učinkovinami. To so: kuminaldehid, (*R*)-(-)-karvon, (*S*)-(+)-karvon in (*R*)-(+)-limonen). Parni ekstrakt bomo primerjali še komercialno dostopnim naravnim oljem navadne kumine (*Carum carvi* L.) ter sintetiziranim oljem navadne kumine. Ugotavljali bomo tudi, kako izbrane učinkovine in ekstrakti vplivajo na bakterije in glive.

1.2 RAZISKOVALNO VPRAŠANJE

Zastavljeno je bilo naslednje raziskovalno vprašanje: *Kolikšen je antioksidacijski in antimikrobni potencial aktivnih učinkovin, ki so skupne tako črni kumini kot navadni kumini (kuminaldehid, (R)-(-)-karvon, (S)-(+)-karvon in (R)-(+)-limonen), v primerjavi z antioksidacijskim in antimikrobnim potencialom naravnega olja navadne kumine, sintetičnega olja navadne kumine ter čistega parnega ekstrakta črne kumine?*

1.3 HIPOTEZE IN NJIHOVE RAZLAGE

H1: Oljni ekstrakt, pridobljen s parno destilacijo semen črne kumine (čisti parni ekstrakt), ima primerljiv antioksidativni in antimikrobni potencial kot naravno olje navadne kumine.

H2: Vse preučevane aktivne učinkovine (kuminaldehid, (R)-(-)-karvon, (S)-(+)-karvon in (R)-(+)-limonen) bodo izkazovale antioksidativne in antimikrobne učinke, ki izhajajo iz njihove zgradbe.

H3: (R)-(-) enantiomer karvona, ki je prisoten v olju navadne kumine, ima močnejši antimikrobni učinek kot (S)-(+)-karvon (prav tako prisoten v olju navadne kumine). Spojini sta enantiomera in nimata enakega učinka na bakterije in glive.

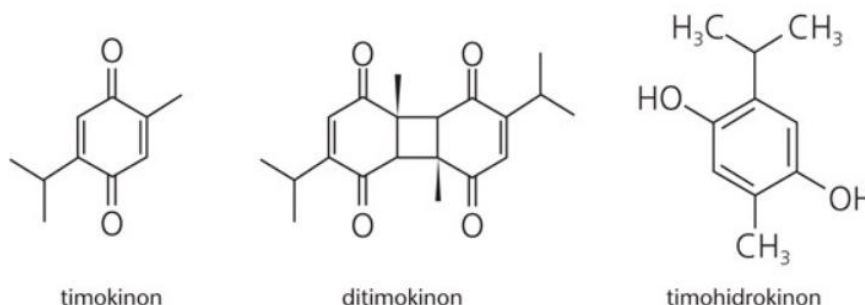
H4: Antioksidativni in antimikrobni učinek parnih ekstraktov črne kumine bo primerljiv z antioksidativnim in antimikrobnim potencialom vsaj ene od aktivnih učinkovin (kuminaldehid, (R)-(-)-karvon, (S)-(+)-karvon in (R)-(+)-limonen). Slednje pripisujemo sinergističnemu učinku različnih aktivnih snovi v ekstraktu.

Razlaga hipotez

Semena črne kumine, *N. sativa* L., vsebujejo proteine (20-30 %), ogljikove hidrate (30 % ali več) in farmakološko pomembne lipide (olja) (30-35 %), med katerimi prevladujejo nevtralni lipidi in manjše količine glikolipidov ter fosfolipidov.

Med maščobnimi kislinami prevladujejo linolna kislina (>50 %), oleinska (>20 %), palmitinska (12,5 %) ter posebnost črne kumine: dihomolinolna kislina (11- *cis*,14-*cis* eikozadienska kislina), ki je v jedilnih oljih ne najdemo in je značilna za rod *Nigella*. V olju je te kisline običajno od 2-5 % in bi lahko služila kot ocena avtentičnosti proizvoda. Med 15 steroli, ki jih navaja literatura (Kokoska s sod., 2008), je tudi tokoferol, ki je verjetno tista snov, ki inhibira peroksidacijo nenasičenih maščobnih kislin in najbolj doprinese k stabilnosti olja črne kumine.

Olje črne kumine vsebuje od 0,4 – 2,5 biološko aktivnega eteričnega olja, med katerimi so najpomembnejši kinonski derivati: timokinon, ditimokinon, timohidrokinon in nigelon (Kokoska s sod., 2008). Slednjim se pripisujejo številne lastnosti, uporabne pri zdravljenju različnih bolezni. Strukturne formule derivatov so prikazane na Sliki 1.



SLIKA 1: Kinonski derivati eteričnega olja črne kumine (Kokoska s sod., 2008)

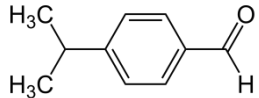
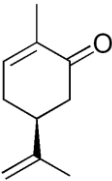
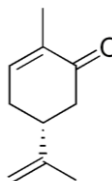
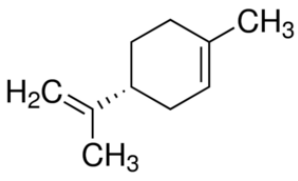
Preostale aktivne snovi so še: p-cimen, karvon, limonen, α -pinen, β -mircen (Agrahari in Singh, 2014; Al-Snafi, 2015) in v sledovih ali manj kot 1 % kuminaldehid, (*R*)-(-)-karvon, (*S*)-(+)-karvon in (*R*)-(+)-limonen) (Kokoska s sod., 2008).

Timokinon in ditimokinon sta v zadnjih 30 letih predmet številnih raziskav povezanih z antikancerogenimi učinki (Badary s sod., 2001). Antagonistično delovanje olja črne kumine na Gram-pozitivne bakterije se povezuje z biološkimi aktivnostmi timohidrokinona (El-Fataty, 1975). Antioksidativne lastnosti se v največji meri pripisujejo timokinonu, ki deluje zaščitno za celice proti nekaterim toksinom, lahko pa deluje tudi kot citostatik (Houghton s sod., 1995; Burits in Bucar, 2000). Timokinon ima pomembno vlogo pri ustvarjanju antihistaminskega učinka olja črne kumine, čeprav znanstveniki menijo, da tukaj ključno vlogo igra polimerna oblika timokinona, to je nigelon (Al-Sawaf in Al-Bekairy, 1999). Nigelon je pokazal močno delovanje v profilaksi bronhijalne astme in astmatičnega bronhitisa (Chakravarty, 1993). Tudi gastroprotektivno delovanje črne kumine temelji na aktivnosti timokinona (Dehkordi s sod., 2008; Mehmet Kanter s sod., 2005).

Timokinona bi naj bilo v eteričnem olju črne kumine od 0,1 - 2,5 %, vendar večina raziskovalcev navaja vrednosti pod 1 % (Chakravarty, 1993; Al-Sawaf in Al-Bekairy, 1999; Dehkordi s sod., 2008). Vodilna analitska metoda za določanje timokinona v olju črne kumine je tekočinska kromatografija visoke ločljivosti (HPLC) (Papič, 2017).

Učinkovine, ki so predmet naše raziskave - kuminaldehid, (*R*)-(-)-karvon, (*S*)-(+)-karvon in (*R*)-(+)-limonen – se v veliko večji meri pojavljajo v olju navadne kumine (*Carum carvi* L.).

Tisto, kar preseneča, je dejstvo, da so zdravilni učinki obeh kumin (ki ne izhajata niti iz iste vrste) podobni, zato naša raziskava ni usmerjena v aktivne učinkovine, ki so v strokovni literaturi za črno kumino že zelo dobro opisane, ampak v tiste, ki so skupne obema rastlinama in deloma tudi kuminu (*Cuminum cyminum*), ki ga velikokrat zamenjujemo z navadno kumino. Med njimi so tri optično aktivne snovi: (*R*)-(-)-karvon, (*S*)-(+)-karvon in (*R*)-(+)-limonen ter kuminaldehid, katerih strukturne formule so prikazane na Sliki 2. Obe obliki karvona bi glede na funkcionalne skupine morali imeti antioksidativno delovanje, enako velja tudi za kuminaldehid in limonen. Ker bodo v parnih ekstraktih črne kumine koncentracije aktivnih učinkovin nizke, predvidevamo, da bo sinergistični učinek vseh aktivnih učinkovin primerljiv z učinkom posamezne komponente.

			
kuminaldehid	(<i>S</i>)-(+)- karvon	(<i>R</i>)-(-)- karvon	(<i>R</i>)-(+)-limonen

SLIKA 2: Strukturne formule aktivnih preučevanih učinkovin v ekstraktih črne kumine

1.4 METODE DELA

Na področju izolacije bioaktivnih komponent iz črne kumine bomo uporabili klasične ekstrakcijske tehnike (Soxhlet, ekstrakcija z vodno paro in organskimi topili). V skladu z zmožnostmi šolskega laboratorija bomo ekstrakte kumine kemijsko okarakterizirali (tankoplastna kromatografija, IR spektri in organoleptične lastnosti), jim določili vrednost antioksidativnega potenciala (metoda DPPH) ter preko tehnike difuzijskega antibiograma določili antimikrobni potencial parnih ekstraktov kumine, komercialnih naravnih in sintetičnih olj kumine ter izbranih čistih aktivnih učinkovin (kuminaldehid, (*R*)-(-)-karvon, (*S*)-(+)-karvon in (*R*)-(+)-limonen).

V prvi fazi bomo na dobljenih ekstraktih kumine izvedli spektrofotometrični test lovljenja prostega radikala DPPH (2,2-difenil-1-pikrilhidrazil). Svoje izsledke bomo korelirali s kemijsko sestavo teh ekstraktov (IR analiza in TLC analiza), s čimer bomo odgovorili na pomembno raziskovalno vprašanje; kateri predstavniki iz družine polifenolov ali terpenov, prisotni v ekstraktu črne kumine, predstavljajo spojine z najvišjim antioksidativnim potencialom.

Antimikrobni potencial ekstraktov na različne Gram-pozitivne in Gram-negativne bakterije ter plesni se tradicionalno določa s pomočjo metode *Broth Dilution Assay* (BDA).

Detekcijo izvedemo s pomočjo spektrofotometra UV/Vis pri karakteristični valovni dolžini 550 nm. Druga tehnika je metoda pretočne citometrije, ki na osnovi sipanja monokromatske laserske svetlobe in sledeče fluorescence poleg podatka o številu mikrobnih celic v suspenziji nudi tudi vpogled v njihovo velikost, zrnatost in celo biokemijske ter morfološke lastnosti. Ker to v šolskem laboratoriju ni na voljo, bomo antimikrobni potencial preizkušali z difuzijskim antibiogramom na agarju.

2 PREGLED LITERATURE

2.1 NAVADNA KUMINA, NJENO PRIDELOVANJE IN UPORABA

Navadna kumina, lat. *Carum Carvi* L., pripada družini *Apiaceae* (kobulnice), redu *Apiales*, razredu *Magnoliopsida* (cvetnice) in poddeblu *Magnoliophyta* (kritosemenke). Je dvoletnica, visoka od 30 do 100 cm (Al-Snafi, 2015), z vretenastimi koreninami. Njeno deblo je votlo, lahko je gladko ali rahlo nagubano. Listi so mehki, po obliki podobni listom praproti. Cvet kumine je lahko bele, roza ali rdeče barve. Sadeži, ki so velikokrat zamenjani s semeni, so majhni, rjave barve in imajo elipsasto obliko. Semena so gladka, rahlo zavita (Agrahari in Singh, 2014). Velikokrat jo zamenjujemo s kuminom in črno kumino (Slika 3), ki sodita v povsem druge rastlinske vrste (črna kumina (*Nigella sativa* L. – *Ranunculaceae*)).



SLIKA 3: *Carum carvi* L.; (navadna kumina), *Cuminum cyminum* L. (kumin) in *Nigella sativa* L. (črna kumina) (vir: <https://goo.gl/k714za> (25.1. 2018))

Najpogostejše uporabljeni del navadne kumine so semena in iz njih pridobljeno eterično olje (Al-Snafi, 2015)¹.

2.2 ZGODOVINA UPORABE NAVADNE KUMINE V MEDICINI

Navadna kumina je bila ena izmed prvih kultiviranih rastlin v Aziji, Evropi in severni Afriki (Agrahari in Singh, 2014). V tradicionalni kitajski medicini je bila kumina uporabljena predvsem za preprečevanje napenjanja, v ljudski maroški medicini pa kot sredstvo za povečanje spolnega poželenja.

¹ Kumina najbolje uspeva na toplih, sončnih lokacijah, kjer je prst vlažna in bogata z organskimi snovmi. Bolj je lokacija izpostavljena soncu, močnejša je aroma eteričnega olja, pridobljenega iz semen (Agrahari in Singh, 2014). Podobno velja tudi za kumin in črno kumino. Navadna kumina se po svetu največkrat uporablja kot začimba, prvoten namen njene uporabe (že od časa antike) pa je bil medicinski. Poleg vseh zdravilnih učinkov, ki jih ima, se njeni listi uporabljajo za pripravo juh, solat in omak. V kmetijstvu je največkrat uporabljena kot »sosedna« rastlina, saj lahko skriva vonj ostalih poljščin in jih s tem obvaruje pred škodljivci ter hkrati privlači koristne insekte (Agrahari in Singh, 2014). Zanimivo je, da tudi za črno kumino raziskovalci navajajo zelo podobne lastnosti (Paarakh, 2010; Sultana s sod., 2015).

Navedena je tudi uporaba kumine kot karminativ² (Agrahari in Singh, 2014; Abdalaziz s sod., 2017). Kumina se pogosto omenja pri lajšanju gastrointestinalnih krčev in občutka napihnjenosti. Al-Snafi (2015) navaja njeno uporabo za blaženje vnetja želodčne sluznice, proti pomanjkanju apetita, kot zdravilo proti dispepsiji³ pri odraslih in črvičenja pri dojenčkih. Abdalaziz s sod. (2017) navaja, da je kumina diuretik⁴, sredstvo proti glavobolu, jutranji slabosti, kašlju (dodatek pri otroških zdravilih), srbečici. Meshkatsadat s sod. (2012) navaja njeno uporabo kot analgetik⁵, antiseptik, anestetik, uspavalno, galaktagog⁶ in sredstvo za lajšanje revmatizma (hlapi); pozitivno vpliva na nastajanje materinega mleka, izboljša delovanje jeter in lajša kronični bronhitis (semena). Za skoraj takojšen učinek proti prebavnim motnjam lahko kumino žvečimo surovo, obstaja pa tudi možnost uporabe v obliki infuzije. Čaj, narejen iz semen, se uporablja predvsem za zdravljenje kolik⁷ (Abdalaziz s sod., 2017). Semena navadne kumine se uporabljajo tudi v tradicionalni tibetanski medicini za zdravljenje in preprečevanje halucinacij in prividov ter za povečanje apetita (Abdalaziz s sodel., 2017).

Poleg že navedenih zdravilnih učinkov raziskovalci trdijo, da lahko imajo semena kumine antimikroben, antibakterijski in anti-hiperglikemični učinek. Delujejo lahko proti glivičnim okužbam in antikancerogeno (Agrahari in Singh, 2014). Cvet kumine je v »Unani« (perzijsko-arabski) medicini uporabljen tudi za zmanjšanje telesne teže in za preprečevanje raznih gastrointestinalnih motenj (proti pekočemu mehurju in bolečemu uriniranju ter vnetju testisov) (Agrahari in Singh, 2014).

2.2.1 HIPOGLIKEMIČNA AKTIVNOST OLJA NAVADNE KUMINE

Eterično olje navadne kumine je pokazalo hipoglikemično aktivnost pri poskusih na podganah, ki so imele diabetes zaradi umetno uničenih beta celic (»*alloxan-induced*« metoda), je pa hkrati povečalo njihovo telesno težo. V drugem primeru, kjer so z zdravilom STZ (streptozotocin) spremenili dedni zapis podgan in je bil diabetes rezultat umetne mutacije, je bil učinek podoben, s to razliko, da pri teh podganah niso zaznali sprememb v bazalni koncentraciji inzulina (Agrahari in Singh, 2014).

Na tej osnovi so sklepali, da so farmakološki učinki do neke mere neodvisni od izločanja inzulina. Eidi s sod. (2010) poroča, da ima raztopina semen kumine in etanola potencialni anti-hiperglikemični učinek pri STZ podganah (Agrahari in Singh, 2014).

² Prepreči nastajanje oz. olajša in pospešuje izločanje črevesnih plinov; uporabljamo ga pri napenjanju (flatulenci).

³ Občasna ali stalna bolečina v predelu zgornjega dela trebuha in spodnjega dela prsnega koša.

⁴ Sredstvo, ki povečuje količino nastalega oz. izločenega urina.

⁵ Sredstvo, ki blaži ali popolnoma odstrani bolečino, pri tem pa ne vpliva na občutljivost in zavest.

⁶ Sredstvo, ki pri doječih materah pospeši nastajanje in izločanje mleka, kot hormonsko sredstvo pa tudi spodbudi menstruacijo, olajša porod in ublaži težave v menopavzi.

⁷ Krčevita bolečina v trebuhu, ki jo povzročajo krči gladkega mišičja (pogosta je pri dojenčkih do tretjega meseca starosti).

2.2.2 HIPOLIPIDIČNI UČINKI

Hiperlipidemija je največkrat vzrok za razvoj kardiovaskularnih bolezni. Komponente kumine (predvsem flavonoidi in karvoni) imajo močan antioksidativen učinek, ki bi lahko bil vključen v preprečevanje prevelike vsebnosti lipidov. Vodni ekstrakt kumine je pri testiranju podgan z diabetesom in podgan, ki imajo hiperlipidemijo povzročeno z dieto, pokazal močno aktivnost pri zniževanju koncentracije lipidov. Prav tako je bil hipotrigliceridni in hipo-holesterolni učinek pri oralnem vnosu viden pri normalnih podganah in podganah z diabetesom (Agrahari in Singh, 2014). Tudi Saghir s sodel. (2012) je pri raziskovanju in poskusih na podganah ugotovil, da ekstrakt semen kumine znižuje nivo lipidov pri podganah s povečano koncentracijo lipidov zaradi diete (Agrahari in Singh, 2014). Pred kratkim so bile opravljene tudi raziskave učinka metanolnega ekstrakta sadežev kumine na s holesterolom in tritonom hranjene podgane. Rezultati so pokazali, da je učinek na koncentracijo lipidov odvisen od koncentracije ali odmerka; večji kot je bil odmerek, večji je bil učinek (Agrahari in Singh, 2014).

2.2.3 ANTIKANCEROGENI IN ANTIMUTAGENI UČINEK

Za raka na črevesju in rektalni odprtini je značilno, da sta posledica mutacij v epitelih celicah črevesja. Na podganah je bilo dokazano, da navadna kumina v tem primeru deluje kot preventiva. Agrahari in Singh (2014) omenjata tudi dokazano zaviranje levkemije in raka na želodcu. Vodni in drugi ekstrakti kumine so se pokazali kot učinkovita zaščita proti nekaterim mutagenim snovem.

2.2.4 DIURETIČNI UČINEK

Pri poskusih na podganah je vodni ekstrakt navadne kumine, doziran peroralno, povečal izločanje urina po 24 urah. Ugotovili so, da sta se v urinu povečali vsebnosti kalija in natrija. Ekstrakt ni povzročil nikakršnih okužb ledvic ali drugih negativnih učinkov (Agrahari in Singh, 2014).

2.2.5 UČINEK NA FARMAKOLOŠKE LASTNOSTI ANTIBAKTERIJSKIH ZDRAVIL

Učinek ekstrakta navadne kumine je bil preučevan na 20 zdravih prostovoljcih. Preučevali so učinek na zdravila: rifampicin, izoniazid in pirazinamid v stalni kombinirani dozi. Dodatek kumine je povečal količino omenjenih zdravil v krvi. Izkazalo se je tudi, da se je najvišja koncentracija zdravila v telesu po prejemu prve in pred prejemom druge doze (C_{max}) ob dodani kumini pri vseh zdravilih povečala; v primeru rifampicina iz 4,57 na 5,95; izoniazida iz 2,66 na 3,62 in pirazinamida iz 18,81 na 25,06.

Razen C_{max} se je povečala tudi AUC (površina pod krivuljo, ki prikazuje odvisnost plazemske koncentracije od časa); pri rifampcinu iz 40,11 na 53,01, pri izoniazidu iz 17,72 na 22,87 in pri pirazinamidu iz 107,65 na 137,71. Rezultati so torej pokazali, da kumina spreminja kinetiko delovanja (preučevanih) zdravil in izboljšuje njihove zdravilne učinke (Al-Snafi, 2015).

2.3 FARMAKOLOŠKI UČINKI ETERIČNEGA OLJA ČRNE KUMINE (*N. SATIVA L.*)

Črna kumina (*Nigella sativa L.*) je ena izmed rastlin z najširšim spektrom zdravilnega delovanja opisana v literaturi zdravilnih zelišč, vendar je na tem mestu potrebno poudariti, da botanično ni v sorodu ne z navadno kumino in ne s kuminom. Semena črne kumine vsebujejo eterično olje (35–38 %), ogljikove hidrate (35 %) in beljakovine (21 %), kar je zelo primerljivo s sestavo semen navadne kumine (poglavje 2.4). Olje je bogat vir esencialnih maščobnih kislin, od katerih sta najpomembnejša linolna oz. omega 6 (50,2 %) in gama-linolenska maščobna kislina oz. omega 3 (0,4 %). Poleg omenjenih je prisotna še oleinska kislina (19,9 %) in eterična olja, ki dajejo značilen okus. Glavne sestavine eteričnega olja so timokinon (28–57 %), p-cimen (do 40 %) in karvakrol (do 12 %) (Khader in Eckl, 2014).

Najbolj pomembna učinkovina z izrazitim terapevtskim delovanjem je timokinon, ki je antioksidant in hkrati deluje kot analgetik (lajša bolečino), antihistaminik (protialergijsko delovanje) in antiepileptik (prepreči epileptične napade). Ob timokinonu so pomembne učinkovine tudi nigelon (ditimokinon), nigelin in melantin. Nigelon, podobno kot timokinon, deluje kot antihistaminik, skupaj z melantinom pa spodbuja čiščenje črevesja (Khader in Eckl, 2014).

V bibliografski zbirki Medline je bilo konec leta 2017 objavljenih 1022 strokovnih člankov o zdravilnih učinkih črne kumine (*Nigella sativa L.*). Kljub številnim objavam zanimanje ne poneha in število znanstvenih člankov vztrajno raste. V zvezi s črno kumino je odobrenih tudi nekaj patentov, ki se nanašajo predvsem na povečanje delovanja imunskega sistema (US Patent 5482711), zdravljenje raka in preprečevanje neželenih učinkov kemoterapije (US Patent 5653981), zdravljenje alergij in astme (EP Patent 1709995), zdravljenje glivičnih in bakterijskih okužb, kožnih vnetij, ran in hemeroidov (US Patent 7722906). Največkrat citiran članek govori o pozitivnih učinkih na *Salmonello enterica* (*in vitro* aktivnost), *Cronobacter sakazakii* in številne druge bakterije (Asharf, 2017).

Čeprav črna kumina, kot že omenjeno, botanično ni v sorodu s kumino (*Carum Carvi L.*) ali kuminom (*Cuminum cyminum L.*), so zdravilni učinki zelo primerljivi. Tudi črna kumina deluje protibolečinsko, protivnetno, protibakterijsko, protivirusno in protiglivično, antihistaminčno (proti alergiji), antioksidativno, je imuno stimulant (spodbuja imunsko odzivnost), lajša astmo ter znižuje visok tlak (Randawa in

Alghamdu, 2011). Te zdravilne lastnosti pripisujejo predvsem učinkovinama timokinon in nigelon (Khan s sod., 2017; Wienkötter s sod., 2008).

Timokinon protivnetno deluje na levkotriene (v telesu so odgovorni za nastanek in razvoj vnetnih procesov in delujejo kot mediatorji v alergijskih in vnetnih reakcijah), nigelon pa preprečuje izločanje histamina iz krvnih celic (Shuid s sod., 2012).

Amin in sod. (2017) so opravili klinično študijo na 118 bolnikih in ugotovili, da olje črne kumine izjemno lajša tudi na najhujše oblike alergičnega rinitisa (alergična reakcija nosnih poti na alergene). Študija srbskih znanstvenikov (Ivanković s sod., 2006) poroča o protirakavem učinku olja črne kumine. V poskusu razsoja metastaz so ugotovili, da je eterično olje črne kumine preprečilo razvoj metastaz v jetrih. Cheng s sod. (2014) poroča o podobnih zaključkih pri uporabi olja črne kumine pri raku na dojkah, Ichwan s sod. (2014) pa pri zdravljenju raka materničnega vratu.

2.4 KEMIJSKA SESTAVA SEMEN NAVADNE KUMINE (*CARUM CARVI* L.)

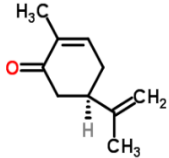
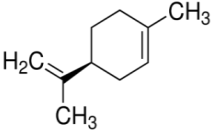
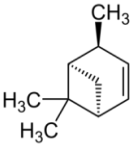
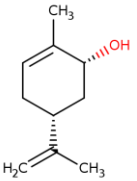
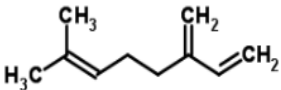
Abdalaziz s sod. (2017) navaja, da se v navadni kumini nahaja vsaj 30 aktivnih učinkovin, kar predstavlja 97,58 % celotnega eteričnega olja navadne kumine. Glavne fitokemične snovi, ki jih navajata Agrahari in Singh (2014), njihove strukturne formule in masni deleži⁸ so navedene v Tabeli 1. Karvon in limonen kot glavni komponenti navaja tudi Abdalaziz s sod. (2017). Navedbe se razlikujejo pri deležih ostalih glavnih komponent, saj Abdalaziz s sod. (2017) in Al-Snafi (2015) navajata, da je alfa-pinena 0,1 % in beta mircena prav tako okoli 0,1 %, kar je bistveno manj kot navajata Agrahari in Singh (2014). *Cis*-karvola ne omenjata, navajata pa 12,6 % delež *gamma*-terpinena, ki je pri Agrahari in Singhu (2014) opredeljen kot stranska komponenta. Ostale sestavine se v vseh preučenih virih skladajo. Eterično olje vsebuje tudi oksigenirane monoterpeni, monoterpeni, nasičene in nenasičene maščobne kisline, ketone, aldehide in estre (Al-Snafi, 2015). Večja kot je vsebnost limonena in karvona, večja je tudi vsebnost monoterpenov in oksigeniranih monoterpenov (Agrahari in Singh, 2014)⁹. Enake komponente omenja tudi Abdalaziz s sod. (2017) s to razliko, da ne ločuje (*R*)- in (*S*)-karvona, ampak omenja le vsebnost karvona (70,1 %). Glavna maščobna kislina, ki je v semenih, je petroselinjska kislina. Zaznani so bili tudi razni triacilgliceroli (estri) in polisaharidi ter lignin (Agrahari in Singh, 2014). Semena kumine vsebujejo vitamin A, B-kompleks, vitamin C in vitamin E. V semenih je tudi znatna količina kalcija, magnezija, bakra, železa, cinka, selena, mangana in kalija ter vlaknin (Agrahari in Singh, 2014).

⁸ Navedeni deleži so zaokroženi glede na: Agrahari in Singh (2014).

⁹ Ostale komponente, najdene v semenih, so še: acetaldehid, kuminaldehid, furfural, dihidrokarvol, beta-pinen, tujon, linalol, timol in druge (Agrahari in Singh, 2014).

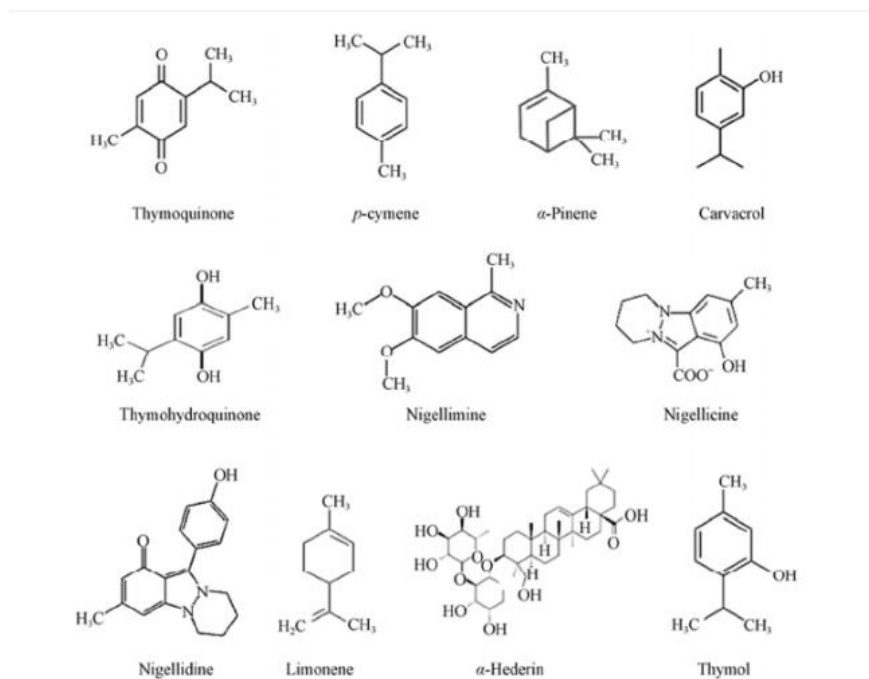
Hranilna vrednost semen kumine na 100 g je 333 kcal, od tega 19,77 g beljakovin, 14,59 g maščob, 49,90 g ogljikovih hidratov (od tega 0,64 g sladkorja). Poleg vode preostanek mase zavzemajo vlaknine, vitamini in minerali (kalcij, železo, magnezij, cink idr.) (Al-Snafi, 2015).

TABELA 1: Pet glavnih sestavin navadne kumine (*Carum carvi* L.), njihove strukturne formule in deleži v semenih

Ime sestavine	Strukturna formula	Delež (%)	Vir slike (povzeto 1.1. 2018)
(R)-(-)-karvon		38	https://goo.gl/a2ycwG
D-limonen		27	https://goo.gl/RjMu4w
α -pinen		5	https://goo.gl/5fWAiz
(-)-cis-karvakol		5	https://goo.gl/UxCa1a
β -mircen		5	https://goo.gl/TgMQhy

2.5 KEMIJSKA SESTAVA SEMEN ČRNE KUMINE (*Nigella sativa* L.)

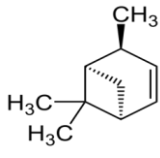
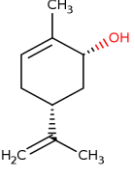
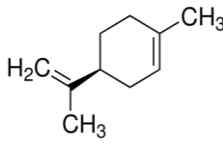
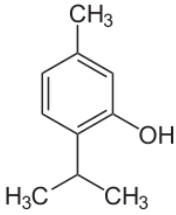
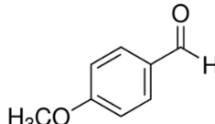
Črna kumina (*Nigella sativa* L.) je znana je kot vir timokinona, timohidrokinona, ditimokinona, p-cimena, karvakrola, 4-terpineola, α -pinena, timola in številnih drugih aktivnih učinkovin (Slika 4). Nekatere od teh učinkovin najdemo tudi v navadni kumini. Kooti s sod. (2016) navaja, da so glavne aktivne učinkovine v olju črne kumine zelo podobne tistim v eteričnem olju navadne kumine, vendar je v črni kumini glavna učinkovina timokinon.



SLIKA 4: Aktivne učinkovine v črni kumini (*N. Sativa* L) (Kooti s sod.,2016)

Aktivne učinkovine, ki so prisotne v obeh vrstah kumine, so prikazane v Tabeli 2.

TABELA 2: Aktivne učinkovine prisotne v *C. carvi* in *N. sativa*

Ime učinkovine	Strukturna formula
α-pinen	 https://goo.gl/5fWAiz
karvakol	 https://goo.gl/UxCa1a
D-limonen	 https://goo.gl/RjMu4w
timol	
Kuminaldehyd	 https://www.sigmaaldrich.com

V raziskavo smo zajeli oba enantiomera karvona, D-limonen in kuminaldehid.

2.6 EKSTRAKCIJA ETERIČNIH OLJ

Ekstrakcije eteričnih olj največkrat zajemajo ekstrakcijo s superkritičnim fluidi (npr. CO₂), s Soxhletovim aparatom in parno destilacijo. V literaturi najdemo še druge načine ekstrakcij, kot sta mikrovalovna ekstrakcija in ultrazvočna ekstrakcija (Azvanida, 2015).

Superkritična ekstrakcija (SFE – Supercritical Fluid Extraction) je ekstrakcija, pri kateri s pomočjo topil v superkritičnem stanju ločimo eno komponento od ostalih (Sapkale s sod., 2010). SFE je ena izmed najuspešnejših metod ekstrakcije naravnih učinkovin. Tekočina, ki je v superkritičnem stanju, ima hkrati lastnosti tekočih in plinastih snovi, kar povzroči, da je ekstrakcija hitrejša in učinkovitejša. Za ekstrakcijo se zaradi nizke vnetljivosti in majhne možnosti zastrupitve velikokrat uporablja CO₂. Superkritična temperatura za CO₂ ni visoka, tako da lahko z njim iz snovi ekstrahiramo tudi temperaturno občutljive komponente (Waksmundzka-Hajnos s sod., 2008)¹⁰. CO₂ brez večjih težav odstranimo, prav tako pa ga lahko zaznamo z detektorji (UV, IR, FID). S spreminjanjem tlaka in temperature dosežemo selektivno ekstrakcijo in ločitev raznih učinkovin. Pod dobro izbranimi pogoji lahko pričakujemo visok izkoristek. Kritična temperatura za ekstrakcijo s CO₂ je 304.1 K (30.6°C), kritičen tlak pa 73.8 bar (7.38 MPa). Prednosti SFE ekstrakcije v primerjavi z ekstrakcijo s Soxhletovim aparatom so: skrajšan čas ekstrakcije (SFE ekstrakcija poteka od 10 do 60 minut (Sapkale s sod., 2010), za ekstrakcijo s Soxhletovim aparatom pa potrebujemo od 4 do 6 ur), večja čistoča ekstrakta in možnost hkratnega dela z raznimi detektorji (Waksmundzka-Hajnos s sod., 2008; Clifford, 2000). Slabost SFE je, da potrebujemo velike količine snovi (Waksmundzka-Hajnos s sod., 2008; Sapkale s sod., 2010) in tudi, da so aparature precej dražje kot običajni Soxhletov aparat.

Ker v šolskem laboratoriju možnosti dela s SFE nimamo, bova uporabili ekstrakcijo po Soxhletu in ekstrakcijo z organskimi topili.

2.7 ANTIOKSIDATIVNI POTENCIAL EKSTRAKTOV

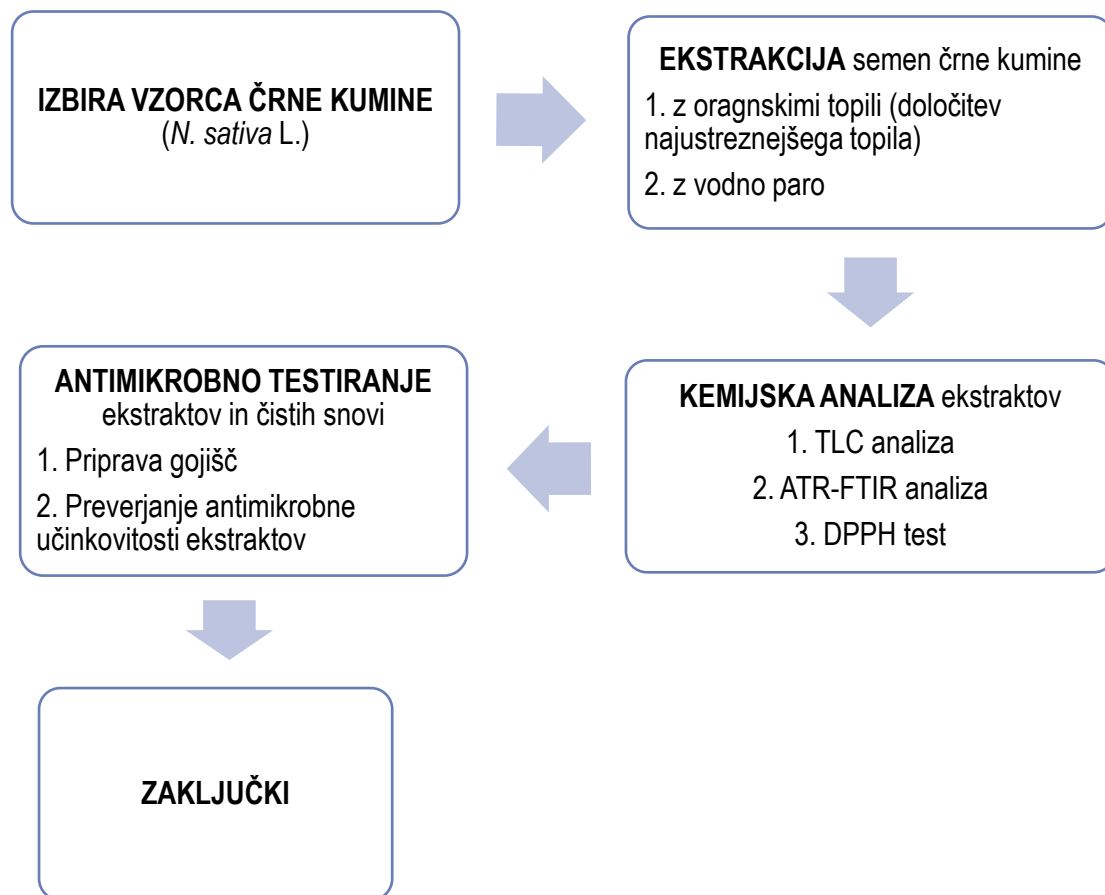
Za namen določevanja antioksidativnega potenciala rastlinskih ekstraktov so bili razviti različni spektrofotometrični testi. V zadnjih letih se najpogosteje uporablja test lovljenja prostega radikala 2,2-difenil-1-pikrilhidrazila (DPPH), ki kaže karakteristični UV/Vis spekter z absorpcijskim vrhom pri 515 nm.

¹⁰ Voda v superkritičnem stanju ima sicer boljše zmožnosti za ekstrakcijo polarnih snovi, po drugi strani pa ni primerna za ekstrakcijo temperaturno občutljivih komponent (Waksmundzka-Hajnos, Sherma, Kowalska, 2008).

Znižanje absorbance pri navedeni valovni dolžini je sorazmerno s koncentracijo ter antioksidativnim potencialom antioksidantov. Alternativne metode predstavljajo še testi lovljenja prostega radikala 2,2'-azino-bis-3-etilbenzotiazolin-6-sulfonske kisline (ABTS test), redukcije superoksidnega iona, inhibicija peroksidacije lipidov ter uporaba oscilacijskih reakcij (npr. Briggs-Rauschevea reakcija).

Glavne prednosti DPPH spektrofotometričnega testa so hitrost in enostavnost izvedbe (test poteka pri sobni temperaturi, ki preprečuje oksidativni razpad vzorca (pri višjih temperaturah)) ter visoka ponovljivost dobljenih rezultatov. Zato smo se odločili za uporabo tega testa.

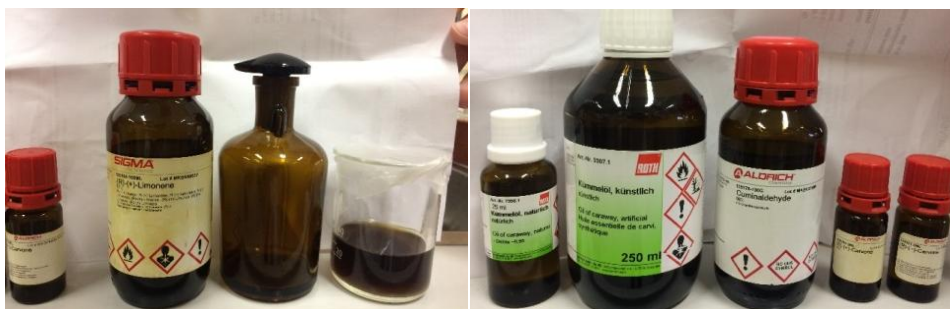
3 PRAKTIČNO DELO - KEMIJA



ORGANIGRAM 1 – Praktični del raziskave

Olje, pridobljeno s hladnim stiskanjem semen črne kumine (*N. sativa* L.), je na slovenskem trgu lahko dostopno, vendar kljub oglaševanju, da gre za ekološko proizvodnjo, je kakovost teh olj vprašljiva. Zadnji primer je odpoklic iz leta 2017, kjer so ugotovili, da olja črne kumine vsebujejo previsoke vrednosti policikličnih aromatskih ogljikovodikov (PAH), ki nastajajo predvsem pri sušenju, dimljenju ali prekomernem segrevanju živil (Zveza potrošnikov RS, 2017). Zato smo se odločili, da pridobimo olje črne kumine sami in lastnosti tega olja primerjamo z učinki sintetičnega olja navadne kumine (proiz. Carl Roth), naravnega olja navadne kumine (proiz. Carl Roth) ter aktivnimi učinkovinami, ki smo jih izbrali za raziskavo (Slika 5). To so (v oklepajih je naveden proizvajalec in čistoča snovi):

- (*R*)-(-)-karvon (Sigma-Aldrich, 98 %)
- (*S*)-(+)-karvon (Sigma-Aldrich, 96 %)
- (*R*)-(+)-limonen (Sigma-Aldrich, 97 %)
- kuminaldehid (Sigma-Aldrich, 98 %)



SLIKA 5: Aktivne učinkovine in eterična olja ter ekstrakti, preučevani v tej raziskavi (lasten vir)

Sedlakova s sod. (2003) je opravila raziskave vplivov časa žetve kumine¹¹, velikosti semen in načina mletja na količino olja, pridobljenega iz semen črne kumine. Rezultati so pokazali, da je izkoristek večji, če so semena zmleta oz. največji, če so zmleta z mlinčkom za fino mletje, vendar to slabo vpliva na delež lahko hlapnih spojin v eteričnem olju (npr. karvona in limonena). Na osnovi teh informacij smo se odločili, da skrbno izberemo semena črne kumine v času njihove polne zrelosti, naravno sušena (bio pridelava), in jih pred uporabo ne meljemo, temveč s pomočjo terilnice in pestila le zdrobimo v manjše delce.

3.1 OPIS VZORCA ČRNE KUMINE

Proizvajalec: Narayan (Healthy food products) - BIO Črna kumina (Semena črne kumine iz kontroliranega ekološkega kmetijstva), 2017. Izvajalec BIO nadzora: SI-EKO-002. Država porekla: Egipt (Pakiranje: Narajan d.o.o, Zbure 19, 8220 Šmarješke toplice). Neto količina: 50g. Rok uporabe: 01.02.2020 (Serija: L 010220-201). Na Sliki 6 je prikazana embalaža uporabljenih semen črne kumine.



SLIKA 6: Vzorec črne kumine uporabljen v raziskavah (lasten vir)

¹¹ Primerjali so izkoristek iz semen, pobranih pred dozoritvijo in semen, pobranih takrat, ko so že popolnoma dozorela. Ugotovili so, da je vsebnost eteričnih olj večja pri tistih, pobranih ob popolni zrelosti.

3.2 EKSTRAKCIJA SEMEN ČRNE KUMINE Z ORGANSKIMI TOPILI IN DESTILIRANO VODO

Za ekstrakcijo olja črne kumine smo preučili pet različnih topil, ki se med seboj razlikujejo po polarnosti. V oklepajih so navedene vrednosti njihovih dipolnih momentov (D) pri določeni temperaturi.

Topila so: etanol (1,69 D pri 78°C), dietileter (0,15 D pri 25°C), petroleter (0,1 D pri 25°C), destilirana voda (1,85 D pri 100°C) in heksan (0,08 D pri 25°C).

Opis dela

1. V terilnici smo s pestilom zdrobili kumino in za vsako od preučevanih topil natehtali ≈ 2 g semen črne kumine (Tabela 3).

TABELA 3: Mase vzorca črne kumine

Številka poskusa	Masa kumine (+/- 0,0001) g	Topilo (proizvajalec; čistoča)
1	2,0050	Etanol (Honeywell; >99.8 %)
2	2,0035	Eter (Sigma Aldrich; >99,9 %)
3	1,9991	Petroleter (Fluka analytical)
4	2,0028	Destilirana voda (prevodnost <8 μ S/cm)
5	2,0029	Heksan (Honeywell; >99 %)

2. Natehtanemu vzorcu kumine smo z merilno pipeto dodali 10.00 (± 0.06) mL ustreznega topila in na magnetnem mešalu pri 250 vrtljajih/min in 25°C pustili, da ekstrakcija poteka 30,0 ($\pm 0,5$) min. Raztopino smo potem prelili v centrifugirke in vsebino 10 min centrifugirali pri 2200 obratih na minuto (rpm). Po centrifugiranju smo najprej analizirali barvo ekstrakta, pomešanega s topilom. V vseh primerih smo dobili svetlo rumeno raztopino; izstopala je raztopina, kjer smo kot topilo uporabili destilirano vodo (Slika 7). Le-ta je bila temno rjave barve.



SLIKA 7: Ekstrakti črne kumine po centrifugiranju (lasten vir)

3. Raztopine olja in topila smo nato prenesli v označene in stehtane petrijevke. Postavili smo jih v digestorij in tam pustili čez noč, da so topila povsem izhlapela. Naslednji dan smo petrijevke ponovno stehtali in na osnovi razlik v masi izračunali izkoristek ekstrakcije.

Po odstranitvi topila smo opazili, da so v petrijevkah ostala olja, ki so bila prijetnega vonja, brezbarvna, zelo viskozna in vendar tekoča. V petrijevki, kjer je bilo topilo destilirana voda, se je olje strdilo in bilo rjavkaste barve.

3.3 EKSTRAKCIJA Z VODNO PARO

Soxhletovo aparaturo sestavljajo: hladilnik (kondenzator), Soxhletov nastavek, celulozni tulec, kamor damo vzorec, ki ga ekstrahiramo, bučka, sifon in grelno telo (v našem primeru električna grelna plošča) (Slika 8). V bučko smo nalili 100 mL destilirane vode in v celulozni tulec dodali 5,07019 ($\pm 0,0001$) g strtih semen črne kumine. Da bi izboljšali pogoje ekstrakcije in preprečili izhlapevanje eteričnih olj smo Soxhletovo aparaturo ovili z ALU-folijo. Po 10 h smo ekstrakt prenesli v lij ločnik, kjer sta se vodna in organska faza ločili (Slika 8). Oljno (organsko) fazo smo ločili od vodne in ta ekstrakt označili kot **čisti parni ekstrakt**. Preostanku smo dodali 10 mL heksana (Honeywell, 99 %) in stresali. Organsko fazo smo ponovno ločili od vodne in postopek ponovili še 2-krat. Ta ekstrakt smo potem prenesli na rotavapor in pri znižanem tlaku in temperaturi 40°C odstranili heksan. Ta ekstrakt smo označili kot **surovi parni ekstrakt**.



SLIKA 8: Soxhletova aparatura (levo) in ločevanje vodne in organske faze z lijem ločnikom (desno) (lasten vir)

Analizirali smo vsebnost karvona in limonena (TLC analiza) v pridobljenih ekstraktih ter posneli IR spektre. Rezultati obeh analiz so prikazani v poglavju 3.7.

3.4 TLC ALANIZA – VSEBNOST KARVONA IN LIMONENA V VZORCIH EKSTRAKTOV

Pri TLC (tankoplastni kromatografiji) analizi smo kot stacionarno fazo uporabili Al_2O_3 na Al nosilcu (proiz. Macherey-Nagel). Kot mobilno fazo smo uporabili 20 % raztopino etilacetata ($\text{C}_4\text{H}_8\text{O}_2$) v heksanu (C_6H_{14}).

Na TLC ploščo smo z grafitnim svinčnikom približno 1,5 cm od spodnjega roba plošče narisali startno črto. Na njej smo označili 3 mesta:

- V (vzorec – ekstrakti različnih topil),
- L ((R)-(+)-limonen) in
- C ((R)-(-)-karvon).

S kapilarami smo na označene točke nanegli komponente in jih sproti sušili s sušilcem.

V kromatografsko komoro smo približno do višine 1 cm nalili mobilno fazo in pokrili s pokrovom, da smo v komori ustvarili nasičene pogoje. Nato smo TLC ploščo postavili v kromatografsko komoro in jo tam pustili tako dolgo, da se je mobilna faza približala 1 cm do zgornjega roba plošče. TLC ploščo smo s pinceto vzeli iz čaše in jo posušili s sušilnikom za lase. Predhodno smo z grafitnim svinčnikom označili, do kod je pripotovala mobilna faza. Vizualizacijo ločenih komponent eteričnih olj smo poskušali ustvariti na tri načine:

a) z uporabo KMnO_4 (aq)

b) z uporabo kuminaldehida ($\text{C}_8\text{H}_8\text{O}_2$)

c) z uporabo sublimiranega I_2 (s)

Izkazalo se je, da je najuspešnejša metoda sublimiran jod, ki je ob kontroliranem segrevanju v digestoriju jasno obarval ločene komponente v zmesi. Jod je TLC plošče obarval rumeno-rjavo. Z izračunom retencijskih faktorjev smo ugotavljali prisotnost čistih komponent v pridobljenih ekstraktih (poglavje 3.7.3).

3.5 ATR-FTIR SPEKTROSKOPIJA

FTIR (Fourier-transform infrared spectroscopy) spektroskopske meritve smo izvajali s PerkinElmer Spectrum Two aparaturo, ki ima diamant kot sredstvo za lomljenje žarka, ki penetrira v vzorec. Instrument je povezan s programom Spectrum. Spektre smo posneli v mid IR območju, in sicer ($4000\text{--}400\text{ cm}^{-1}$), z uporabo 4 skenov in resolucijo 4 cm^{-1} . Spektri so bili odšteti od ozadja, ki je bilo posneto v naprej. Meritve so zabeležene kot transmitance (%T) proti določenemu valovnemu številu (cm^{-1}).

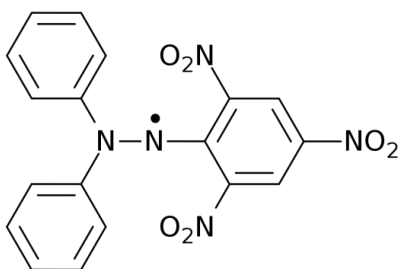
3.6 DPPH TESTI

DPPH (2,2-difenil-1-pikrilhidrazil) je stabilni radikal, ki se v prisotnosti reducentov (antioksidantov) reducira v DPPH_2 . Strukturna formula DPPH je prikazana na Sliki 9. Z merjenjem absorbance raztopine DPPH pri njegovi λ_{max} lahko ugotavljamo antioksidativni potencial preučevanih ekstraktov.

Antioksidativno učinkovitost smo testirali za naslednje snovi: (*R*)-(-)-karvon (Sigma-Aldrich, 98 %), (*S*)-(+)-karvon (Sigma-Aldrich, 96 %), (*R*)-(+)-limonen (Sigma-Aldrich, 97 %), naravno olje kumine (Carl Roth), sintetično olje kumine (Carl Roth), kuminaldehid (Sigma Aldrich) in čisti parni ekstrakt.

Za pripravo raztopine DPPH smo z analitsko tehtnico (Kern) tehtali 0,0225g DPPH in ga v 100 mL merilni bučki raztopili v metanolu (Honeywell, 99.8 %). Dobili smo temno vijolično obarvano raztopino, ki smo ji najprej določili valovno dolžino, kjer je absorbanca najvišja. Ker je absorbanca presegla zgornjo vrednost spektrofotometra, smo raztopino DPPH 10-krat redčili, tako da je imela končna raztopina, s katero smo testirali vzorce, koncentracijo 0,0225 g/L (0,0114 M). Valovna dolžina z maksimalno absorbanco je bila izmerjena pri 515 nm.

V kivete smo odpipetirali 3,00 ($\pm 0,06$) mL raztopine DPPH in s pomočjo avtomatske pipete dodali še 0,100 mL ekstrakta. Vsakih 5 min smo izmerili spremembo absorbance pri 515 nm. Kot kontrolo smo uporabili metanol.



SLIKA 9: Strukturna formula DPPH (vir: <https://goo.gl/abqhtz>)

3.7 REZULTATI

3.7.1 OCENA USTREZNOSTI TOPILA IN IZKORISTKI EKSTRAKCIJ

S pomočjo enačbe: $m(\text{petrijevke in olja}) - m(\text{petrijevke}) = m(\text{olja})$ smo izračunali maso olja črne kumine, pridobljenega z enostavno tekočinsko ekstrakcijo. Kot vidimo iz Tabele 4, smo največ eteričnega olja kumine pridobili pri uporabi dveh ekstrakcijskih topil: etra in petroletra.

Sledil je izračun izkoristkov ekstrakcije:

$$\text{Izkoristek (\%)} = \frac{\text{masa olja (g)}}{m(\text{vzorca črne kumine})} \times 100$$

$$\text{Izkoristek (\%)} = \frac{0,1577}{2,0050} \times 100 = 7,86\%$$

TABELA 4: Izkoristki ekstrakcij z uporabo različnih topil

Vrsta topila	masa petrijevke/g (±0.0001)	masa petrijevke in olja/g (±0.0001)	Masa olja/g (±0.0001)	Izkoristek ekstrakcije (%)/±1,1%
Etanol	61,7094	61,8671	0,1577	7,9
Eter	45,0571	45,3149	0,2578	12,9
Petroleter	49,4031	49,6645	0,2614	13,1
Destilirana voda	48,8944	49,0514	0,1570	7,8
Heksan	47,8758	47,6387	0,1800	9,0

Ocena napake meritev:

$$\text{Tehtanje: } \frac{0,0001}{0,1577} \times 100 + \frac{0,0001}{2,0050} \times 100 = 0,063 + 0,005 = 0,068 \%$$

$$\text{Merjenje prostornine: } \frac{0,1}{10,0} \times 100 = 1,0 \% \quad \text{Skupna napaka meritev: } \approx 1,1 \%$$

Zaključimo lahko, da so nizko polarna topila precej bolj uspešna pri ekstrakciji eteričnega olja iz semen črne kumine kot polarna topila (alkohol in voda). Ker pa je kumina začinba, ki jo dnevno uporabljamo predvsem v vodnih raztopinah, nas je bolj zanimal praktični vidik uporabe ekstraktov kumine. Zato smo ekstrakcijo opravili tudi z vodno paro. Ker klasične aparature s parorazvijalcem v šoli nimamo, smo sestavili improvizirano aparatur, ki pa je slabo tesnila. Pri ekstrakciji so nastajale snovi, ki so imele visok parni tlak (vključno s samo vodno paro), zato smo sestavili Soxhletovo aparatur in pustili, da je ekstrakcija potekla 10 ur pri temperaturi $\approx 95^{\circ}\text{C}$.

3.7.2 IZKORISTEK EKSTRAKCIJE S SOXHLETOVIM APARATOM (PRIDOBITEV PARNEGA EKSTRAKTA)

Izkoristek ekstrakcije s Soxhletovim aparatom:

$$\text{Masa (čistega eteričnega olja)} = 0,1950 \text{ g } (\pm 0,0001) \rightarrow \text{Izkoristek ekstrakcije} = \frac{0,1950}{5,07019} \times 100 = 3,8 \%$$

$$\text{Masa (surovega eteričnega olja)} = 0,0298 \text{ g } (\pm 0,0001) \rightarrow \text{Izkoristek ekstrakcije} = \frac{0,0298}{5,07019} \times 100 = 0,6 \%$$

Če primerjamo naše izkoristke z izkoristki, navedenimi v strokovni literaturi, ugotavljamo, da so primerljivi. Abdalaziz s sod. (2017) pri ekstrakciji s petroleterom, ki je potekla pri 60-80°C in trajala 6 ur, navaja izkoristek ekstrakcije 4,5 %¹². Ostali avtorji navajajo izkoristke ekstrakcij med 1,3 % in 4 % (Engelhardt s sod., 1988; Kallio s sod., 1994; Sedlakova s sod., 2003).

3.7.3 TLC ANALIZA EKSTRAKTOV ČRNE KUMINE

Retencijske faktorje (R_f) smo izračunali po enačbi:

$$R_f = \frac{\text{pot komponente}}{\text{pot topila}}$$

Za aktivne učinkovine, ki smo jih uporabili kot standarde, smo ugotovili naslednje:

$$R_f ((S)-(+)\text{-karvon}) = 0,96 \quad R_f (D\text{-limonen}) = 0,77$$

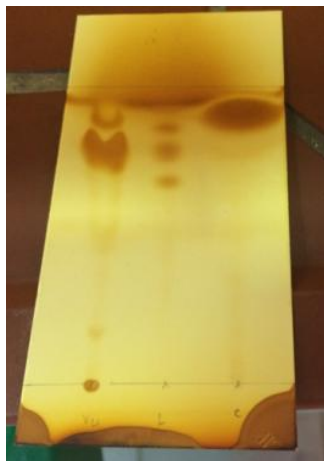
V Tabeli 5 je prikazano, ali sta (S)-(+)-karvon in D-limonen prisotna v testiranih ekstraktih ali ne.

TABELA 5: Prisotnost karvona in limonena v vzorcih ekstraktov

	Ekstrakt pridobljen s topilom						
	dietileter (V1)	petroleter (V2)	heksan (V3)	etanol (V4)	destilirana voda (V5)	surov parni ekstrakt	čisti parni ekstrakt
(S)-(+)- karvon	da	da	ne	da	da	da	da
D-limonen	da	ne	da	da	da	da	da

Izračun retencijskih faktorjev je potrdil predvidevanje (zaznava vonja), da se v oljih, pridobljenih s heksanom, etanolom in destilirano vodo, res nahaja limonen. V vseh ekstraktih, razen v ekstraktu petroletra, smo potrdili tudi prisotnost (S)-(+)-karvona. Na Sliki 12 je prikazan razvit kromatogram ekstrakta, pridobljenega z etanolom, in čistih učinkovin (karvona in limonena).

¹²V podatke Abdalaziz s sod. (2017) smo tudi nekoliko podvomili, saj ima petroleter vrelišče¹² med 41°C in 62°C, kar pomeni, da je ekstrakcijo v Soxhletu težko vzdrževali med 60 in 80°C, kot navaja avtor.

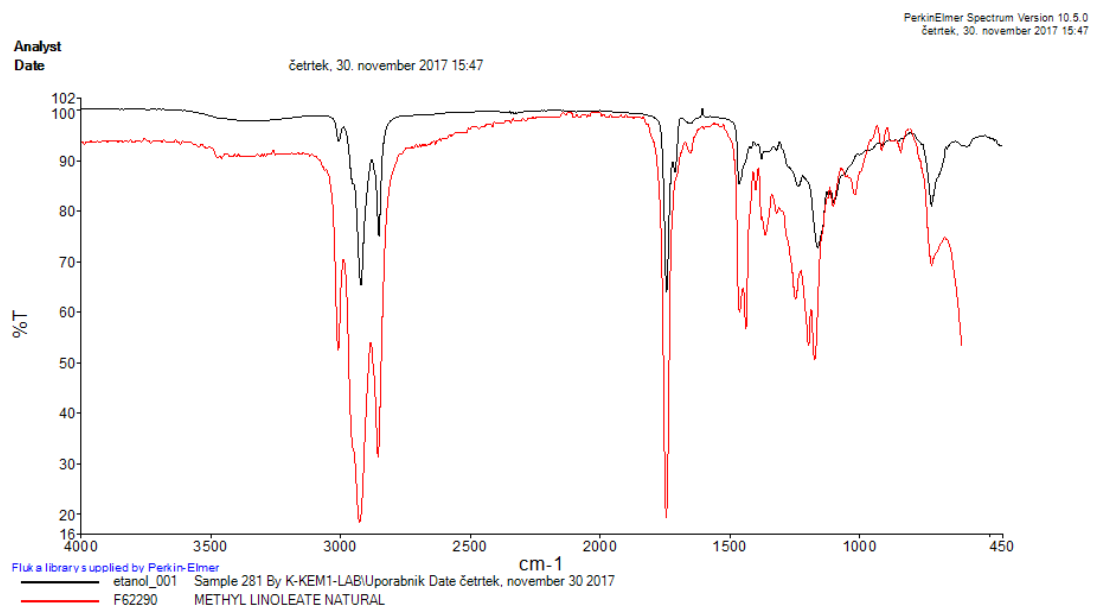


SLIKA 10: Razvit kromatogram pri uporabi etanola kot topila za ekstrakcijo (lasten vir)

Literatura (S)-(+)-karvon v črni kumini navaja kot komponento, ki je v eteričnem olju prisotna v zelo nizkih koncentracijah, limonen v nekoliko večjih. Obratno velja za eterična olja navadne kumine (*Carum carvi* L.) (Sedlakova s sod., 2003).

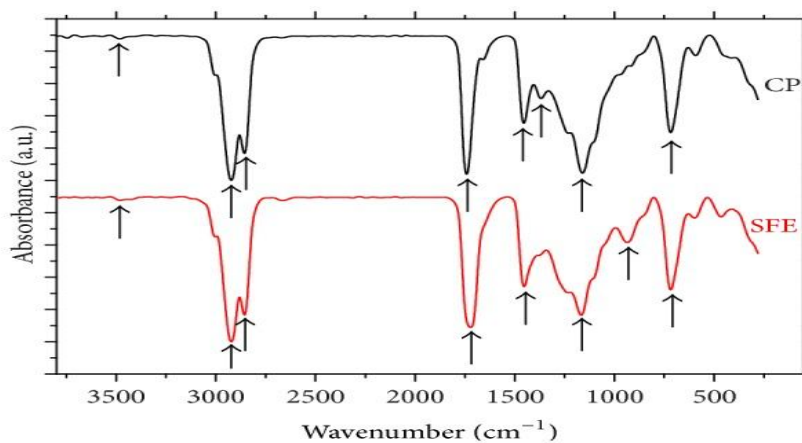
3.7.4 ATR-FTIR ANALIZA EKSTRAKTOV PO ODSTRANITVI TOPILA

Na prvem spektru (Graf 1) vidimo, da je računalniški program iz baze podatkov največje ujemanje našel z metilnim estrom linolenske kisline, kar je potrditev, da smo uspeli pridobiti precej čist ekstrakt, saj linolenska kislina predstavlja velik delež eteričnega olja črne kumine. Če primerjamo spekter s spektri čistega karvona ali limonena (Priloga 1; Grafi 16, 17 in 18), opazimo, da se pojavljajo skupni vrhovi le pri valovnih številih, kjer opazujemo vibracije *C-H* vezi (2923 cm^{-1} , 2854 cm^{-1} , 1367 cm^{-1}), ne pa tudi pri drugih valovnih številih. Sklepamo lahko, da je eterično olje mešanica različnih spojin. Če spektre, ki so predstavljeni v nadaljevanju, primerjamo s spektri, ki jih je posnel Mohammed s sod. (2016) (Graf 2), ki je olje kumine pridobil z uporabo supekritičnega CO_2 in hladnim stiskanjem semen črne kumine, opazimo, da so pri karakterističnih valovnih dolžinah, ki so navedene v Tabeli 6, naši ekstrakti odstopali za $\pm 4\text{ cm}^{-1}$. V vodnem ekstraktu so prisotni tudi vodotopni amini. Sklepali smo, da so pridobljeni ekstrakti dobre kakovosti in precej visoke čistoče.



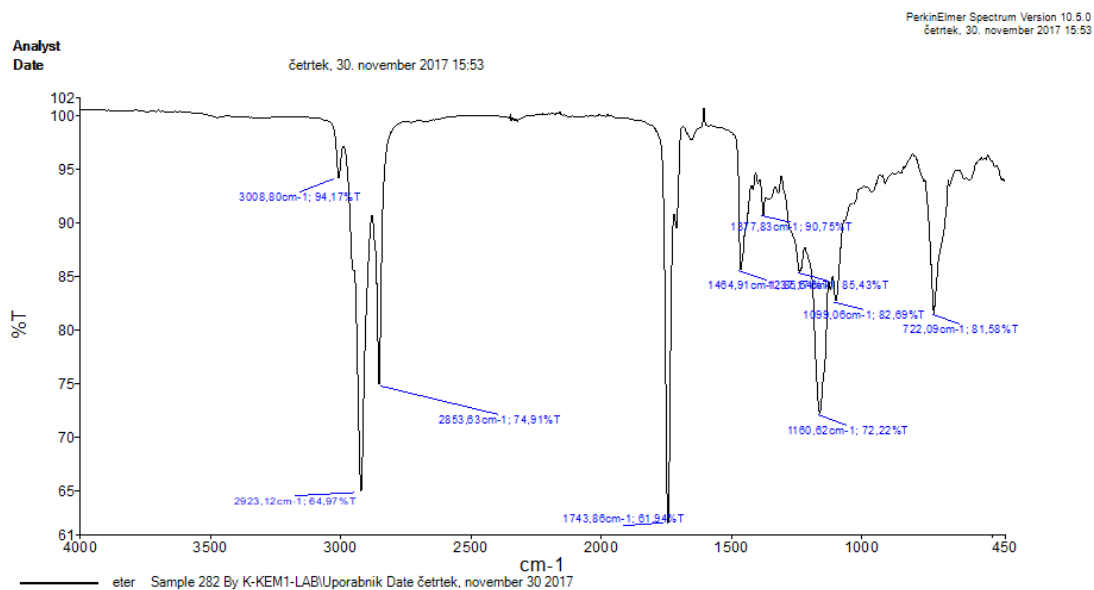
Source Spectra		
Sample Name	Search Best Hit	Search Best Hit Description
etanol_001	F62290	METHYL LINOLEATE NATURAL

GRAF 1: Primerjava IR spektrov ekstrakta pridobljenega z etanolom in IR spektra metilnega estra linolenske kisline



GRAF 2: ATR-FTIR spekter olja črne kumine, pridobljen z uporabo superkričnega CO₂ V primerjavi s hladno stiskanim oljem črne kumine (Mohammed s sod., 2016)

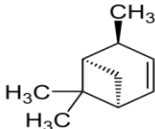
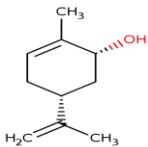
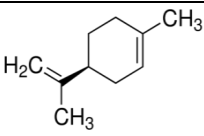
V Grafu 3 je prikazan ATR-FTIR spekter ekstrakta, pridobljenega z etrom.



GRAF 3: ATR-FTIR spekter ekstrakta, pridobljenega z etrom kot topilom

ATR-FTIR spektri drugih ekstraktov so v Prilogi 1. Ker smo v raziskavi pozorni predvsem na spojine, ki so skupne tako navadni kumini kot črni kumini, smo bili pozorni predvsem na vrhove, ki so značilni za vezi v teh spojinah (Tabela 6).

TABELA 6: Značilne vezi v spojinah, ki so skupne črni in navadni kumini

Strukturna formula	Značilne vezi	Valovno število (cm ⁻¹)
 https://goo.gl/5fWAiz Alfa-pinen	C-H =C-H Metil: asimetrično C-H upogibanje C-H (m) raztezanje	1377 1465 2923 2854
 https://goo.gl/UxCa1a karvakol	C=C raztezanje O-H raztezanje C-H =C-H	1678 3408 1377 1416
 https://goo.gl/RjMu4w D-limonen	C-H =C-H Metil: asimetrično C-H upogibanje	1377 1416 1465

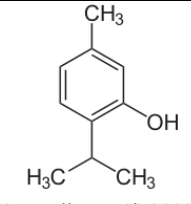
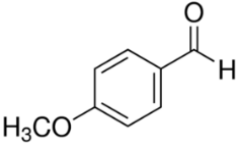
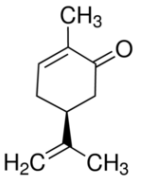
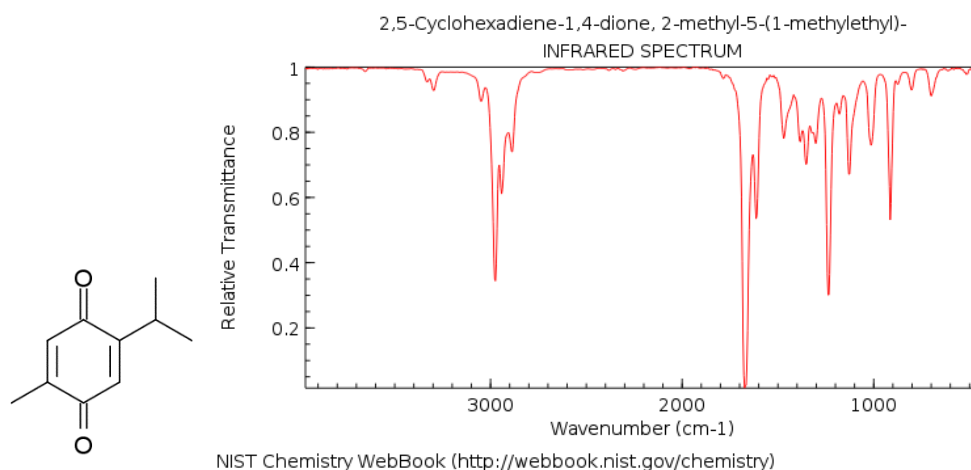
 https://goo.gl/ipVrUj timol	C-H raztezanje O-H raztezanje (fenoli) C-C raztezanje (v obroču)	3192.3 3482 1465
 https://goo.gl/qWERUD kuminaldehid	Aromatsko C-O raztezanje C-C raztezanje (v obroču) O-H upogibanjev benzenovem obroču C=O raztezanje C-O-C raztezanje	1302 1444 722 1744 1160
 https://goo.gl/azBesx karvon	Aromatic C-O raztezanje C-C raztezanje (v obroču) C=O raztezanje C-O-C raztezanje	1302 1444 1744 1160

TABELA 7: Analiza IR spektrov ekstrahiranih eteričnih olj

Vibracija vezi	Valovno število (cm ⁻¹)	Prisotnost vrha v IR spektru				
		V1	V2	V3	V4	V5
-OH fenoli	3482-3400	NE	NE	NE	NE	DA
C-H (alifatski), CH₃	2923, 2854	DA,DA	DA,DA	DA,DA	DA,DA	DA,DA
C=O raztezanje	1744	DA	DA	DA	DA	DA
C-H (CH₂)	1465,1377	DA, DA	DA, DA	DA, DA	DA, DA	DA, DA
C-O	1160	DA	DA	DA	DA	DA
-CH=CH-(benzen v obroču)	722, 1300	DA, DA	DA, DA	DA, DA	DA, DA	DA, DA

Legenda: topilo V1 = eter, V2 = petroleter, V3 = heksan, V4 = etanol, V5 = destilirana voda.

Glede na rezultate ATR-FTIR spektralne analize smo sklepali, da je v naših ekstraktih največ spojin z C=O vezjo, aromatskih spojin in samo v vodnem ekstraktu tudi timol, vendar bi to lahko bil tudi preostanek vode. Predvidevamo, da je v vzorcih tudi velik delež timokinona, ki s svojim ATR-FTIR spektrom in strukturno formulo (Slika 11), ustreza vrhovom v vseh preučevanih spektrih.



SLIKA 11: Strukturna formula timokinona (Khan s sod., 2017) in njegov ATR-FTIR spekter

3.7.5 ANALIZA TESTA DPPH

Med testom DPPH smo merili absorbanco posameznih učinkovin, nato pa nas je zanimalo, kakšen je odstotek inhibicije DPPH, ki smo ga izračunali kot:

$$\frac{\text{absorbanca kontrole} - \text{absorbanca vzorca (ekstrakta)}}{\text{absorbanca kontrole}} \times 100 = \% \text{ inhibicije}$$

Absorbanco učinkovin smo primerjali z absorbanco kontrole, ki je bila ves čas med 1,08 in 1,10 (Tabela 8). V Tabeli 9 so prikazani odstotki inhibicije DPPH aktivnih učinkovin.

TABELA 8: Absorbanca preučevanih učinkovin po določenem času

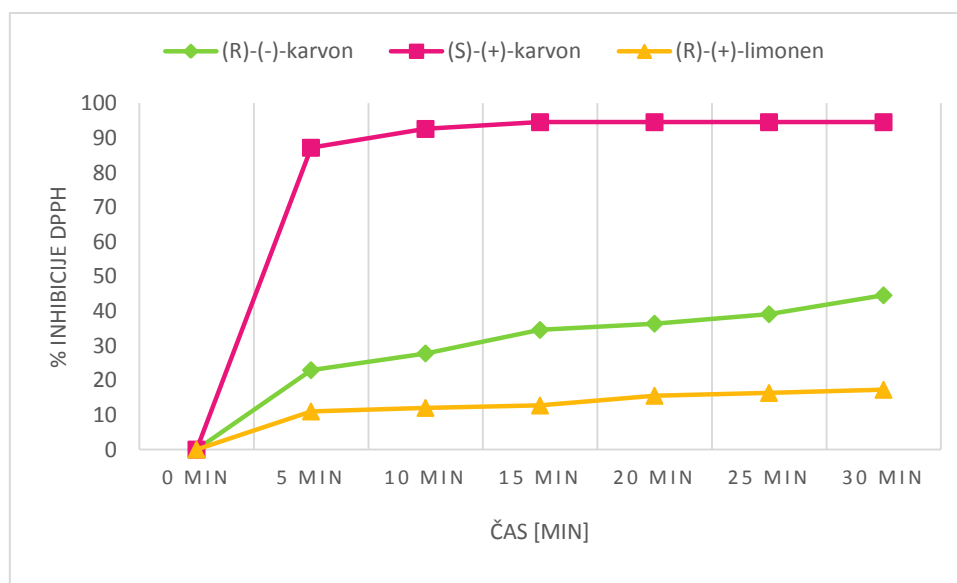
Učinkovina	Absorbanca po določenem času						
	0 min	5 min	10 min	15 min	20 min	25 min	30 min
(R)-(-)-karvon	1,10	0,84	0,78	0,72	0,7	0,67	0,61
(S)-(+)-karvon	1,10	0,14	0,08	0,06	0,06	0,06	0,06
(R)-(+)-limonen	1,10	0,97	0,95	0,96	0,93	0,92	0,91
čisti parni ekstrakt črne kumine	1,10	0,76	0,65	0,61	0,56	0,52	0,49
naravno olje navadne kumine	1,10	0,84	0,78	0,74	0,68	0,64	0,59
sintetično olje navadne kumine	1,10	0,95	0,92	0,9	0,87	0,85	0,85
kuminadehid	1,10	0,97	0,96	0,94	0,93	0,92	0,91
surov parni ekstrakt črne kumine	1,10	0,67	0,6	0,56	0,51	0,48	0,46
kontrola	1,10	1,09	1,08	1,10	1,10	1,10	1,10

TABELA 9: Odstotek inhibicije aktivnih učinkovin olja črne kumine po določenem času

	Odstotek inhibicije po času ($\pm 0,1$ min)						
Učinkovina	0 min	5,0 min	10,0 min	15,0 min	20,0 min	25,0 min	30,0 min
(R)-(-)-karvon	0	22,94	27,78	34,55	36,36	39,09	44,55
(S)-(+)-karvon	0	87,16	92,59	94,55	94,55	94,55	94,55
(R)-(+)-limonen	0	11,01	12,04	12,73	15,54	16,36	17,27

Ugotovili smo, da je med vsemi preučevanimi snovmi najboljši antioksidant (S)-(+)-karvon, saj je bil njegov odstotek inhibicije že po petih minutah 87,16 %, po 15 minutah pa kar 94,55 %, kar je razvidno iz Tabele 9. Opazili smo, da se je tudi barva raztopine (S)-(+)-karvona že v manj kot petih minutah spremenila iz vijolične v svetlo rumeno, kar pomeni, da je izjemno močen reducent. Če primerjamo odstotek inhibicije obeh karvonov, lahko ugotovimo, da so razlike velike, saj je (R)-(-)-karvon dosegel največji odstotek inhibicije po 30 minutah, a le 44,55 %. Glede na to, da je ta razlika tako velika (50 %), lahko potrdimo trditev, da so antioksidativne lastnosti (R)- in (S)-karvona zelo različne, kljub temu, da imata enako strukturno formulo.

Pri primerjanju vseh treh glavnih učinkovin (limonena, obeh karvonov) (Graf 4) lahko ugotovimo, da je limonen tista učinkovina, ki najmanj prispeva k antioksidativni učinkovitosti kumine. Njegov odstotek inhibicije je bil 17,27 %.



GRAF 4: Odstotek inhibicije DPPH aktivnih učinkovin olja v odvisnosti od časa

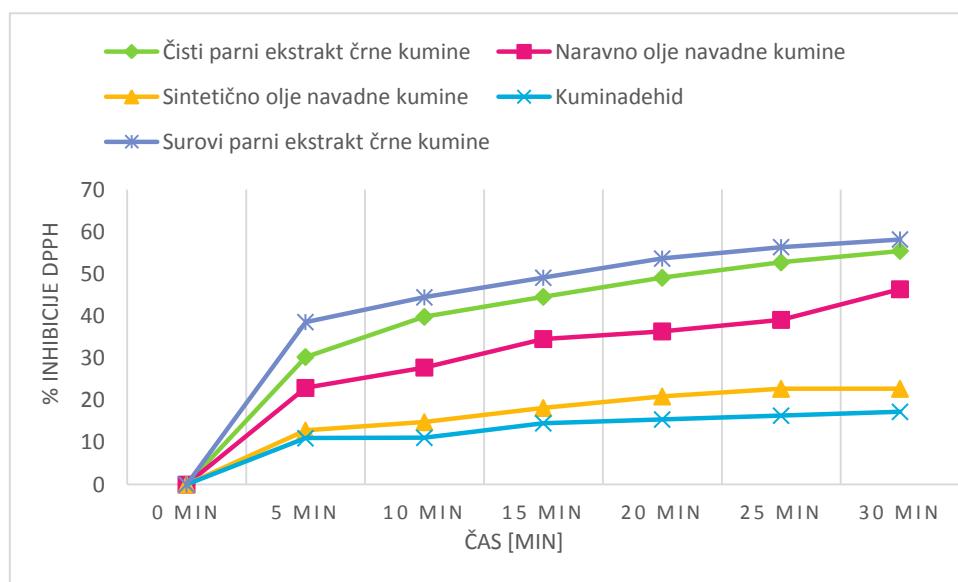
Med seboj smo primerjali ostale vzorce: čisti parni ekstrakt črne kumine, naravno olje navadne kumine, sintetično olje navadne kumine, kuminaldehid in surov parni ekstrakt črne kumine (Tabela 10, Graf 5).

TABELA 10: Odstotek inhibicije ostalih učinkovin po določenem času

Vzorec	Odstotek inhibicije po času ($\pm 0,1$ min)						
	0 min	5,0 min	10,0 min	15,0 min	20,0 min	25,0 min	30,0 min
čisti parni ekstrakt črne kumine	0	30,28	39,81	44,55	49,09	52,73	55,45
naravno olje navadne kumine	0	22,94	27,78	34,55	36,36	39,09	46,36
sintetično olje navadne kumine	0	12,84	14,81	18,19	20,91	22,73	22,73
kuminadehid	0	11,01	11,11	14,55	15,45	16,36	17,27
surovi parni ekstrakt črne kumine	0	38,57	44,44	49,09	53,64	56,36	58,18

Vidimo, da je med njimi najboljši antioksidant surov parni ekstrakt črne kumine - 58,18 %, ki je zelo primerljiv s čistim parnim ekstraktom - 55,45 %.

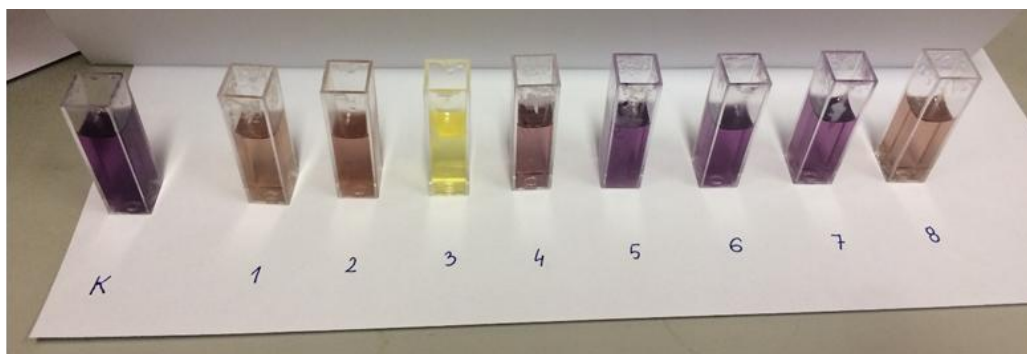
Če primerjamo naravno in sintetično olje navadne kumine, lahko ugotovimo, da je odstotek inhibicije večji pri naravnem (največji: 44,55 %) in se od največjega odstotka inhibicije sintetičnega olja razlikuje za 21,82 %. Najslabši antioksidant je kuminaldehid - 17,27 %, ki je glede na to lastnost primerljiv z limonenom.



GRAF 5: Odstotek inhibicije DPPH preostalih učinkovin v odvisnosti od časa

Primerjali smo barve raztopin DPPH po 30 min. Barva raztopine kontrole je ostala temno vijolična, barva DPPH (S)-(+)-karvona po 30 min pa je bila rumena, kot je razvidno iz Slike 13. Večji kot je bil odstotek inhibicije DPPH, svetlejša je bila raztopina oz. manjši kot je bil odstotek inhibicije, bolj je bila barva raztopine podobna barvi kontrole.

Na Sliki 13 lahko vidimo različne barve raztopin – kiveta, v kateri je kontrolna raztopina, je označena s črko K, kiveta, v kateri je (S)-(+)-karvon, pa je označena s številko 3. Vidimo lahko veliko razliko med kontrolno raztopino in ostalimi raztopinami. Kiveta 1 – čisti parni ekstrakt, kiveta 2 – (R)-(-)-karvon, kiveta 4 – naravno olje navadne kumine, kiveta 5 – limonen, kiveta 6 – kuminaldehid, kiveta 7 – sintetično olje navadne kumine in kiveta 8 – surovi parni ekstrakt.



SLIKA 12: Barve raztopin DPPH po 30 min (lasten vir)

4 PRAKTIČNO DELO - MIKROBIOLOGIJA

4.1 SEZNAM MATERIALOV

4.1.1 DELOVNI MIKROORGANIZMI

Uporabili smo nepatogeni sev *Escherichie coli*, mešano kulturo gliv kvasovk (*Saccharomyces cerevisiae*) in nepatogeni sev *Bacillus cereus*.

4.1.2 ZAŠČITNA OPREMA

- zaščitna halja
- zaščitna očala
- zaščitne rokavice
- sterilizacijsko sredstvo za razkužitev rok

4.1.3 KEMIČALIJE

V oklepajih je naveden proizvajalec (in čistoča).

- destilirana voda (prevodnost $<5\mu\text{S}/\text{cm}$)
- kuhinjska sol (NaCl)
- agar (Biolife)
- tripton (bioMérieux)
- kvasni ekstrakt (Fluka Analytical)
- pepton
- D-glukoza (Sigma-Aldrich)
- (R)-(-)-karvon (Sigma-Aldrich, 98 %)
- (S)-(+)-karvon (Sigma-Aldrich, 96 %)
- (R)-(+)-limonen (Sigma-Aldrich, 97 %)
- kuminaldehid (Sigma-Aldrich, 98 %)
- sintetično olje navadne kumine (Carl Roth)
- naravno olje navadne kumine (Carl Roth)
- 70 % etanol
- etanol (Honeywell, 99,8 %)

4.1.4 LABORATORIJSKI PRIBOR

- čaša (900 mL)
- merilni valj (1000 mL)
- kovinska spatula
- steklena palčka
- aluminijasta (ALU) folija

- plastične petrijevke (v izmerah 90 x 15 mm)
- 5 mm diski iz filtrirnega papirja
- avtomatska pipeta (LLG-Labware, 10-100 µL in 100-1000 µL)
- tipsi
- epruveta
- spatula drigalski
- gorilnik (Campingaz)
- kovinska pinceta

4.1.5 LABORATORIJSKE APARATURE

- avtoklav (CertoClav)
- tehtnica (Kern, natančnost: 0,01 g)
- laminarij – mikrobiološka zaščitna komora (MC 12-1, Iskra PIO)
- kaliper (Mister Tool in Powerfix)
- grelna plošča (Ciatronic)
- inkubator (Binder)
- stresalnik za epruvete (Starlab)

4.2 OPISI MIKROORGANIZMOV

4.2.1 *E. COLI*

Bakterija *Escherichia coli* je del normalne črevesne flore pri človeku in tudi pri ostalih sesalcih, lahko pa je patogena tako znotraj kot tudi izven gastrointestinalnega trakta. Spada v red *Escherichia* (ešerihij), družino *Enterobacteriaceae* (enterobakterije), red *Enterobacteriales* in razred *Gammaproteobacteria*. Enterobakterije so Gram-negativne, gibljive in nesporogene bakterije (Schlegel, Zaborosch, 1993). *E. coli* je kratka bakterija z bički po celotni površini in se pojavlja samostojno ali v parih v hitro rastočih tekočih kulturah (Macone s sodel., 1981). Bakterija *E. coli* ima pile oz. fimbrije, s katerimi se lahko oprime in zaradi tega tudi naseli v sluzastem okolju. Lahko se premika samostojno ali ne, odvisno od seva. Večina sevov je zmožna fermentirati laktozo, pri fermentaciji ogljikovih hidratov pa *E. coli* ustvarja kislino in pline.

Kot vse enterobakterije je tudi *E. coli* oksidaza-negativna, Gram-negativna, katalaza-pozitivna fakultativno anaerobna bakterija (Harvey, 2007), kar pomeni, da načeloma živi v okolju brez kisika, ampak se v okolju s kisikom vede kot aerobna bakterija (Enterobakterije, 2017), fermentira glukozo in lahko sprošča energijo z reduciranjem nitratov in nitritov. Raste lahko na preprostem sintetičnem mediju, ki mora vsebovati mineralne soli, ogljikove hidrate in amonijeve soli (Schlegel, Zaborosch, 1993).

Poznamo več različnih patogenih sevov *E. coli*. Pri okužbi povzročajo različne simptome in se tudi zdravijo z različnimi metodami. To so: enterotoksigenirani sev *E. coli* (ETEC), ki povzroča drisko in se zdravi z antibiotiki, enteropatogeni sev *E. coli* (EPEC), ki povzroča dolgo trajajočo drisko, predvsem pri dojenčkih, zdravi se z antibiotiki in je pogosta predvsem v državah v razvoju, enterohemoragični sev *E. coli* (EHEC), ki povzroča drisko s krvavitvami, hemoragični kolitis¹³ in hemolitični uremični sindrom¹⁴ (HUS). Ta sev se ne zdravi z antibiotiki, saj lahko še poveča možnost HUS. Naslednji sev je enteroinvazivni sev *E. coli* (EIEC), ki povzroča drisko s krvavitvami, pri zdravljenju pa je pomembno, da telesu povrnemo tekočino in uravnotežimo elektrolite. Najdemo ga le pri človeku. Enteroadherentni sev *E. coli* (EAEC) povzroča dolgotrajno drisko pri otrocih in bolnikih okuženih z virusom HIV. Zdravljenje je enako kot pri sevu EIEC (Harvey, 2007).

Ugodno gojišče za *E. coli* je glukozno ali laktozno-peptonsko. *E. coli* začne rasti po tem, ko je bila v inkubatorju 24 ur pri temperaturi 37°C (Schlegel, Zaborsch, 1993). Bakterijo *E. coli* pod mikroskopom lahko vidimo na Sliki 13.



SLIKA 13: Bakterija *E. coli* pod mikroskopom (vir: <https://goo.gl/sybb5v>) (1. 2. 2018)

4.2.2 BACILLUS CEREUS

Bacillus cereus je sporogena, Gram-pozitivna, gibljiva, paličasta bakterija, ki pripada rodu *Bacillus*, družini *Bacillaceae*, redu *Bacillales* in razredu *Bacilli* (Bacillus, 2017). Bakterija *Bacillus cereus* je široko razširjena v naravi, predvsem v prsti, kjer živi kot saprofit (Food Standards Australia New Zealand, 2013), najdemo pa jo tudi v prahu in v nekaterih rastlinah (Savini, 2016) ter v različnih ekstremnih življenjskih okoljih, kot so: morski mulj in gejzirji, pa tudi človeški in živalski iztrebki (NIJZ, 2013). Njen življenjski cikel sestavljajo doba kalitve, doba rasti in doba sporulacije (Food Standards Australia New Zealand, 2013). *Bacillus cereus* je fakultativno aerobna bakterija. Velikokrat je vzrok za zastrupitev s prekomerno okuženim živlom, lahko pa povzroči tudi smrtno nevarne neintestinalne infekcije.

¹³ Vnetje debelega črevesa z značilnimi poškodbami črevesne sluznice

¹⁴ Sindrom, pri katerem nastajajo strdki v malih žilah, kot simptom se pojavi tudi hemolitična anemija, pomanjkanje trombocitov, v zadnji fazi pa tudi odpoved ledvic

Med drugim je lahko *Bacillus cereus* povzročiteljica pljučnice, obolenj centralnega živčevja, infekcij ran po operacijah in gangren (Savini, 2016), drugi viri navajajo, da se lahko z njo okužijo predvsem posamezniki, ki so slabše odporni; pri le-teh lahko povzroči septikemijo oz. sepsa¹⁵ in meningitis¹⁶, tudi očesna vnetja (Food Standards Australia New Zealand, 2013).

B. cereus tvori dva različna strupa oz. enterotoksina - emetičnega, ki povzroča bruhanje, in diarealnega, ki povzroča drisko (Nacionalni inštitut za javno zdravje Slovenije, 2013). Emetični strup bakterije proizvedejo v fazi rasti, ko se še nahajajo v hrani, diarealnega pa proizvajajo med svojo rastjo, ko se že nahajajo v človekovem tankem črevesju (Food Standards Australia New Zealand, 2013). Skupine ljudi, pri katerih je možnost za okužbo z *B. cereus* večja, so: nosečnice, novorojenčki in otroci, starostniki, kronični bolniki in, kot že omenjeno, imunsko oslABLJENE osebe (Nacionalni inštitut za javno zdravje Slovenije, 2013).

Sevi bakterije so lahko mezofitski ali fiziotropski. Optimalna temperatura za mezofitske seve je 37°C, ne rastejo pa pri temperaturi, ki je nižja od 10°C; pri fiziotropskih sevih je ravno obratno, saj le-ti pri temperaturi 37°C rastejo najslabše. Maksimalna koncentracija fiziološke raztopine, pri kateri *B. cereus* še raste, je 7,5 %. Optimalni pogoj, ki ga potrebuje za svojo rast, je med drugim aerobno okolje, ker pa je *B. cereus* fakultativno aerobna bakterija, lahko raste tudi v anaerobnem okolju (Food Standards Australia New Zealand, 2013). Na Sliki 14 je prikazana bakterija *B. cereus* pod mikroskopom.



SLIKA 14: *B.cereus* pod mikroskopom (vir: <https://goo.gl/v3bawf>) (1. 2. 2018)

4.2.3 GLIVE KVASOVKE (*SACCHAROMYCES CEREVISIAE*)

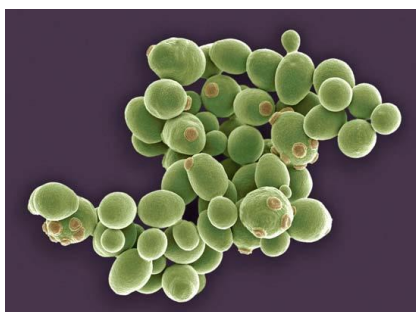
Kvasovke (*Saccharomyces cerevisiae*) so nesporogene enocelične glive, ki pripadajo vrsti *Cerevisiae*, rodu *Saccharomyces*, družini *Saccharomycetaceae*, redu *Endomycetales*, deblu *Ascomycota* in kraljestvu *Fungi* (glive) (Schaechter, 2009). So aerobni organizmi okrogle oblike in na površju ustvarjajo t.i. popke (Money, 2016). Njihova velikost je odvisna od vrste in od pogojev, pri katerih živijo. Tako so ene izmed vrst velike od 2-3 μm, druge pa od 20-50 μm.

¹⁵ Zastrupitev krvi

¹⁶ Vnetje ovojnic (mening) možganov in/ali hrbtenjače

Poznanih in opisanih je približno 1000 vrst, med katerimi so najbolj poznane kvasovke vrste *Saccharomyces cerevisiae* (kvasovke, ki se uporabljajo v gospodinjstvu (Encyclopedia of Microbiology, 2009), za peko in pridelavo vina ter piva (Money, 2016)). Kljub temu, da je poznanih vrst že veliko, znanstveniki sproti odkrivajo nove in pri tem predvidevajo, da je veliko vrst kvasovk še neodkritih. Glive kvasovke najdemo predvsem v prsti, vodi, rastlinah (v njihovih listih, cvetovih in sadežih), živalih in insektih, lahko pa živijo tudi pri ekstremnih pogojih, na primer pri nizkih temperaturah (na polarnih območjih), v anaerobnem okolju (prebavni trakti nekaterih živali) ali v okolju z visoko koncentracijo sladkorja ali soli. Nekatere izmed vrst so paraziti za živali, kvasovka *Candida albicans* pa je lahko tudi človeški patogen (Encyclopedia of Microbiology, 2009).

Za gojitev kultur gliv kvasovk v laboratoriju moramo ustvariti medij YEPD, ki vsebuje pepton, dekstrozo, agar in kvasni ekstrakt. Optimalni pogoj za njihovo rast je toplo, sladko, aerobno okolje, v katerem je temperatura med 20 in 30°C (Encyclopedia of Microbiology, 2009; Money, 2016). Minimalna temperatura, pri kateri glive kvasovke še rastejo, je 20°C, najvišja pa približno 50°C. Najbolje je, da je pH okolja, v katerem rastejo, med 4,5 in 6,5. Čeprav nekatere kvasovke uspevajo v okolju z malo vode, je za njihovo rast in metabolizem boljše okolje, v katerem je vode veliko (Encyclopedia of Microbiology, 2009). Pri temperaturi 30°C se celice delijo vsako 1-2 uri, tako da v enem dnevu iz vsake kvasovke nastane približno 4000 novih celic (Money, 2016). Glive kvasovke pod mikroskopom vidimo na Sliki 15.



SLIKA 15: Glive kvasovke pod mikroskopom (vir: <https://goo.gl/kqyrdd>) (1. 2. 2018)

4.3 PRIPRAVA GOJIŠČ

Sestavine so podane za pripravo 600 mL gojišča. Gojišče LB smo uporabili za *E. coli* in *B. cereus*, gojišče YEPD pa za glive kvasovke. V Tabeli 11 in 12 so prikazane sestavine, ki jih potrebujemo, če želimo pripraviti gojišča LB oz. YEPD, in njihove količine.

GOJIŠČE LB (*Lysogeny Broth*):

TABELA 11: Snovi, potrebne za pripravo gojišča LB, in njihove količine

Agar	9 g
Tripton	6 g
Kvasni ekstrakt	3 g
Kuhinjska sol (NaCl)	3 g
Destilirana voda	600 mL

GOJIŠČE YEPD (*Yeast extract peptone dextroze*):

TABELA 12: Snovi, potrebne za pripravo gojišča LB, in njihove količine

Agar	9 g
Pepton	12 g
Kvasni ekstrakt	6 g
D-glukoza	12 g
Destilirana voda	600 mL

Vsa gojišča smo pripravili po enakem postopku. Najprej smo stehali sestavine in jih dali v 900 mL čašo. Dolili smo 600 mL destilirane vode in mešali s stekleno palčko, da so se sestavine raztopile. Čašo smo postavili na grelnik in ob neprestanem mešanju s stekleno palčko počakali, da je raztopina zavrela. Po zavretju smo jo razdelili v dve čaši in ju prekrili z ALU folijo. Gojišča smo avtoklavirali 15 min pri temperaturi 121°C. Ko so se ohladila, smo jih enakomerno nalili v petrijevke (v vsako petrijevko približno 20 mL – imeli smo 60 petrijev za gojišče LB in 20 za gojišče YEPD).

4.4 PRIPRAVA PREKONOČNIH KULTUR

Prekonočne kulture obeh bakterij smo pripravili en dan pred uporabo na antibiogramu. Čisto kulturo *E. coli* v glicerolu smo aseptično prenesli v tekoči LB medij, dobro premešali na stresalniku in nato zmes preko noči (24 ur) inkubirali pri 37°C.

Čisto kulturo *B. cereus* smo z mikrobiološko zanko prenesli iz trdnega gojišča v tekoče LB gojišče in dobro premešano inkubirali 24 ur pri 37°C.

Prekonočno kulturo gliv kvasovk *Saccharomyces cerevisiae* smo pripravili tako, da smo v sterilno tekoče gojišče YEPD aseptično nasuli za konico ozke spatule suhih kvasovk, dobro pretresli in inkubirali preko noči pri 30°C.

4.5 DIFUZIJSKI ANTIBIOGRAMI Z DISKI

Difuzijski antibiogram je metoda, pri kateri opazujemo občutljivost in odpornost seva bakterije na antibiotike. Bakterije na tem antibiogramu rastejo konfluentno, kar pomeni, da kultura raste enakomerno po vsej površini in ni mogoče prepoznati ali prešteti posameznih kolonij. Sev je lahko na antibiotik odporen, intermediaren ali občutljiv. Če je bakterija odporna, ne bo zrastle v določeni coni od diska, kjer je antibiotik. Področje brez bakterij imenujemo cona inhibicije (Turk in Zalar, 2008; Dogša s sod., 2008).

Raziskave moramo izvajati aseptično, kar pomeni, da s kulturo mikroorganizmov ravnamo tako, da bakterij ne prenašamo nase ali na delovne površine in pazimo, da v stik z našo kulturo ne pridejo drugi mikroorganizmi, ki bi našo kulturo kontaminirali (Turk in Zalar, 2008).

Pred začetkom priprave difuzijskih antibiogramov smo sterilizirali laminarij in pripomočke. Na površino LB gojišča smo z avtomatsko pipeto nanašali 100 μ L prekonočne bakterijske kulture *E. coli* (oz. *B. cereus*). Kulturo smo s spatulo drigalski, ki smo jo pred tem sterilizirali s 70 % etanolom in obžigom nad gorilnikom, razmazali po površini gojišča v vseh smereh. Enak postopek smo ponovili pri pripravi antibiogramov s kulturo gliv kvasovk, s to razliko, da smo pri glivah kvasovkah uporabljali gojišče YEPD.

Kemična sredstva (npr. etanol), iz katerih so sestavljena razkužila, mikroorganizme ubijejo (baktericiden učinek), inhibirajo rast (bakteriostatičen učinek) ali ubijajo celice z lizo (bakteriolitičen učinek) (Turk in Zalar, 2008).

Na razmazano bakterijsko kulturo v petrijevki smo s sterilno pinceto položili po 4 diske iz filtrirnega papirja s premerom 5 mm. Nato smo z avtomatsko pipeto na vsakega od diskov natančno nanesti 10 μ L učinkovine. Petrijevke smo za tem inkubirali 24 h pri temperaturi 37°C (*E. coli* in *B. cereus*) oz. 48 h pri temperaturi 30°C (kvasovke).

Pri *E. coli* smo pripravili 3 paralelne petrijevke s 4 diski za vsako testno učinkovino (skupaj 24 petrijevk), pri glivah prav tako 3 paralele s 4 diski za vsako učinkovino (skupaj 24 petrijevk) in pri *B. cereus* 2 paraleli s 4 diski za vsako učinkovino (skupaj 16 petrijevk).

Naredili smo tudi pozitivni kontroli, za kateri smo uporabili antibiotika penicilin in amikacin. Inhibicijski coni pri amikacinu sta bili 17,71 mm (*E. coli*) in 22,20 mm (*B. cereus*), pri penicilinu pa 17,83 mm pri obeh bakterijah. S tem smo potrdili, da so bila gojišča pripravljena pri ugodnih pogojih in na ustrezen način.

4.6 REZULTATI MIKROBIOLOŠKEGA DELA

4.6.1 *E. COLI*

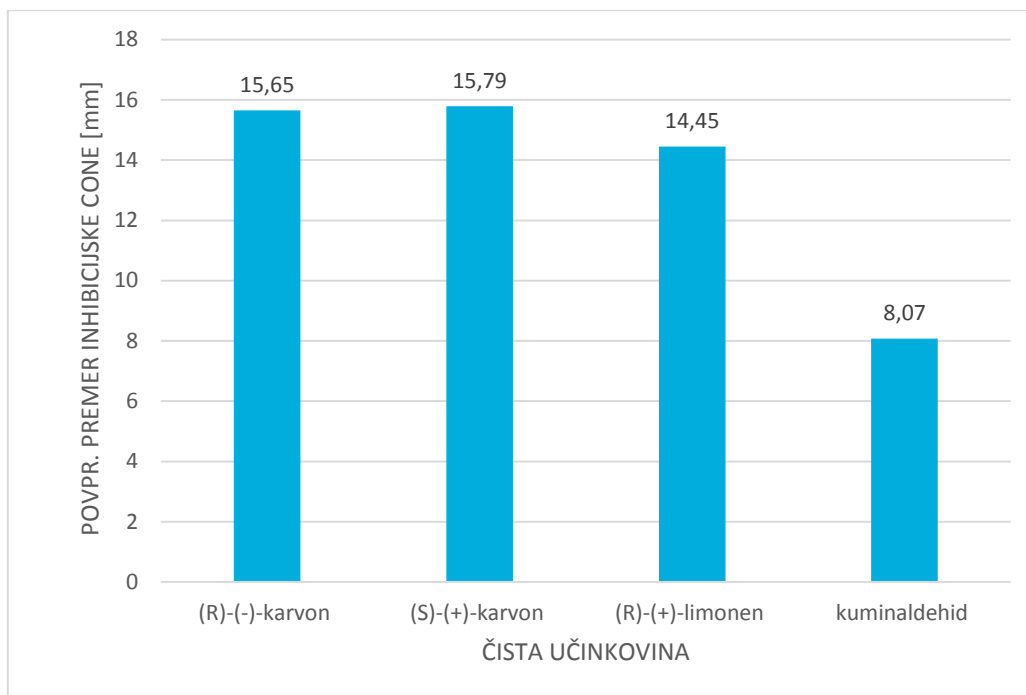
Premere inhibicijskih con na petrijevkah, kamor je bila nanescena kultura bakterije *E. coli*, smo merili trikrat; po 24 urah (1 dnevu), po 48 urah (2 dnevih) in po 120 urah (5 dneh). Ko smo merili inhibicijske cone po 24 urah, smo ugotovili, da sta premer in s tem tudi antibakterijska učinkovitost največja pri uporabi naravnega olja navadne kumine. Povprečna vrednost inhibicijskih con je bila 18,71 mm.

Antibakterijski učinki so bili vidni tudi pri (*R*)-(-)-karvonu, (*S*)-(+)-karvonu, sintetičnem olju navadne kumine, čistem parnem ekstraktu črne kumine in (*R*)-(+)-limonenu. V Tabeli 13 so prikazane povprečne vrednosti premera inhibicijskih con za posamezne učinkovine in njihovo spreminjanje glede na ure, pretekle od nanosa bakterijske kulture.

TABELA 13: Povprečne vrednosti premera inhibicijskih con pri testih na *E. coli* po določenem času

UČNIKOVINA	POVPREČNI PREMER INHIBICIJSKE CONE/ mm		
	24 UR	48 UR	120 UR
(<i>R</i>)-(-)-karvon	15,65	17,25	18,06
(<i>S</i>)-(+)-karvon	15,79	16,70	17,86
(<i>R</i>)-(+)-limonen	14,45	15,23	14,41
kuminaldehid	8,07	7,66	0
čisti parni ekstrakt črne kumine	17,40	16,01	17,14
surovi parni ekstrakt črne kumine	6,81	6,70	6,44
sintetično olje navadne kumine	17,12	14,71	15,75
naravno olje navadne kumine	18,71	19,8	12,18

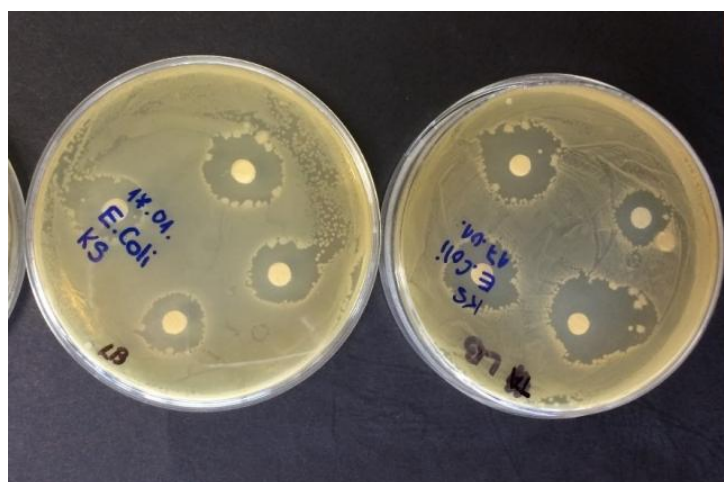
Če med seboj primerjamo učinke čistih snovi ((*S*)-(+)-karvona, (*R*)-(-)-karvona, (*R*)-(+)-limonena in kuminaldehida) 24 ur po nanosu (Graf 6), ugotavljamo, da se rezultati prvih treh skoraj ne razlikujejo. Največje premere smo izmerili pri (*S*)-(+)-karvonu (povprečna vrednost 15,79 mm). Povprečni premer se je od povprečnega premera (*R*)-(-)-karvona razlikoval za 0,14 mm, od povprečnega premera (*R*)-(+)-limonena pa za 1,34 mm (pri tem nismo upoštevali rezultatov tretje paralele, saj so bile inhibicijske cone slabo vidne). Čista učinkovina, ki je prisotna bolj ali manj v sledovih, je kuminaldehid. Pri uporabi kuminaldehida so se premeri inhibicijskih con le za malo razlikovali od premera diskov. Premer diska je bil 5 mm, premeri inhibicijskih con pa največ 9,40 mm (v povprečju 8,07 mm).



GRAF 6: Povprečni premer inhibicijskih con čistih učinkovin pri *E. coli*

Rezultati surovega parnega ekstrakta so primerljivi z rezultati kuminaldehida. Inhibicijske cone so bile v povprečju velike 6,81 mm. Iz Tabele 13 je razvidno, da je povprečni premer inhibicijske cone čistega parnega ekstrakta večji kot premer posameznih čistih učinkovin.

Rezultate meritev prvega dne smo nato primerjali z rezultati meritev drugega dne. Ugotovili smo, da so vrednosti premerov inhibicijskih con v kar nekaj primerih ostale skoraj enake. Opazili smo razlike na petrijevkah, kjer je bilo sintetično olje navadne kumine. Znotraj inhibicijskih con so nastale posamezne kolonije (skupki novih celic, ki so nastale z deljenjem ene celice na trdnem gojišču (Turk in Zalar, 2008)) bakterije *E. coli* (Slika 16).

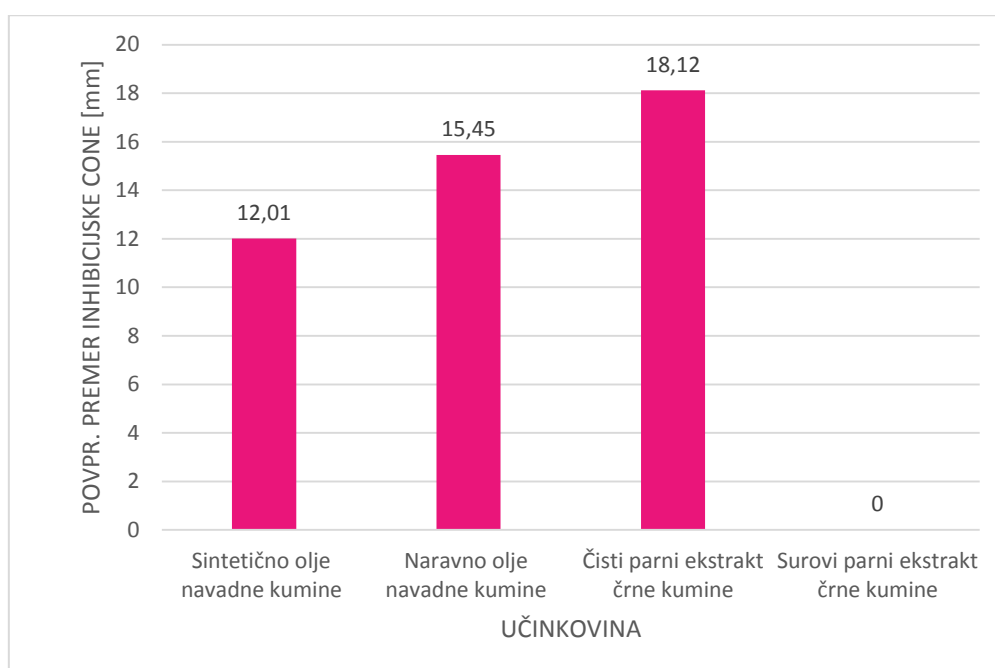


SLIKA 16: Kolonije znotraj inhibicijskih con pri *E. coli* (sintetično olje navadne kumine) (lasten vir)

Po petih dneh smo največje razlike opazili pri kuminaldehidu (Tabela 13), saj je bakterijska kultura popolnoma prerastla inhibicijske cone prvega dne, motno pa so se videle lise inhibicijskih con drugega dne. Velike razlike smo opazili tudi pri naravnem olju navadne kumine, ki smo ga po 24 urah opredelili kot najboljšo učinkovino. V tem primeru so se premeri inhibicijskih con bistveno zmanjšali.

4.6.2 BACILLUS CEREUS

Premere inhibicijskih con na gojiščih s kulturo bakterije *Bacillus cereus* smo merili po 24 urah. V Grafu 7 so prikazani povprečni premeri inhibicijskih con za sintetično in naravno olje navadne kumine ter za čisti in surovi parni ekstrakt črne kumine.



GRAF 7: Povprečni premer inhibicijskih con nečistih učinkovin pri *B. cereus* po 24 urah

Če primerjamo učinek surovega parnega ekstrakta črne kumine z učinkom čistega, lahko ugotovimo, da je antibakterijska učinkovitost čistega ekstrakta veliko večja (premeri inhibicijskih con so bili v povprečju 18,12 mm) (Graf 7).

Ponovno smo med seboj primerjali čiste učinkovine. Povprečne vrednosti inhibicijskih con za oba karvona so bile podobne vrednostim pri *E. coli*. Pri (S)-(+)-karvonu smo opazili, da so bile inhibicijske cone na prvi petrijevki zelo pravilnih (okroglih) oblik, na drugi petrijevki pa nepravilnih. Pri drugi petrijevki so se inhibicijske cone tudi zlivale ena v drugo. Veliko razliko smo opazili na petrijevkah z (R)-(+)-limonenom. Premeri inhibicijskih con so bili skoraj enako veliki kot diski (v povprečju so bili veliki 6,65 mm). V Tabeli 14 so prikazani povprečni premeri inhibicijskih con za čiste snovi.

TABELA 14: Povprečni premer inhibicijskih con čistih snovi pri *B. cereus*

UČINKOVINA	POVPREČNI PREMER INHIBICIJSKE CONE v mm
(R)-(-)-karvon	16,95
(S)-(+)-karvon	15,45
(R)-(+)-limonen	6,65
kuminaldehid	0

Na Sliki 17 so prikazane inhibicijske cone pravih oblik (pri uporabi (S)-(+)-karvona).

SLIKA 17: Inhibicijske cone učinkovine (S)-(+)-karvon na petrijevki s kulturo *B. cereus* (lasten vir)

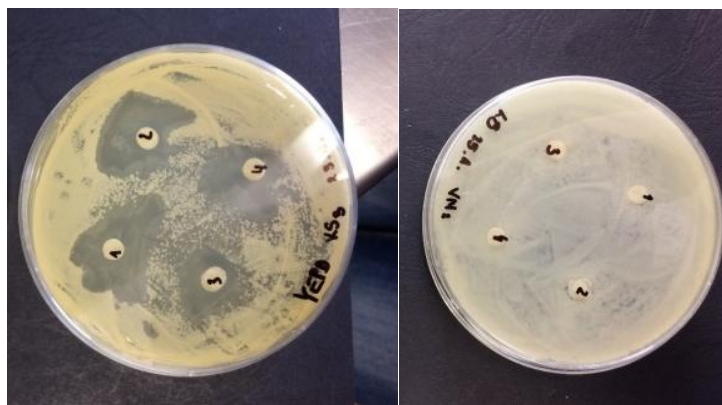
4.6.3 GLIVE KVASOVKE (*SACCHAROMYCES CEREVISIAE*)

Cone inhibicije na gojiščih gliv kvasov smo merili po 48 urah. Njihovi povprečni premeri so prikazani v Tabeli 15.

TABELA 15: Povprečni premeri inhibicijskih con pri glivah kvasovkah po 48 urah

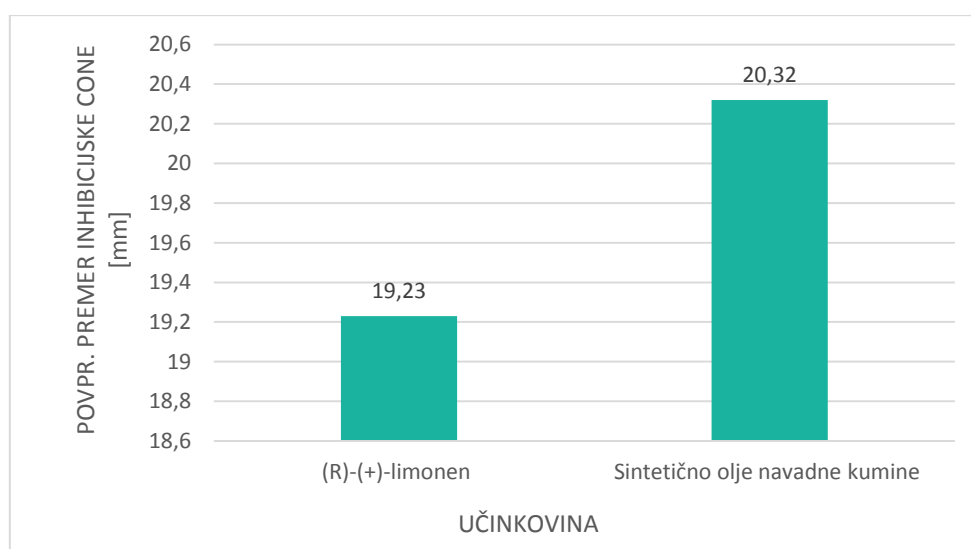
UČINKOVINA	POVPREČNI PREMER INHIBICIJSKE CONE v mm
(R)-(-)-karvon	0
(S)-(+)-karvon	0
(R)-(+)-limonen	19,23
kuminaldehid	0
sinetično olje navadne kumine	20,32
naravno olje navadne kumine	10,93
čisti parni ekstrakt črne kumine	10,04
surovi parni ekstrakt črne kumine	8,22

Veliko petrijevk je bilo popolnoma preraslih z glivami ali pa so bile inhibicijske cone, katerih oblika in velikost ni odvisna le od učinkovine, ampak tudi od nekaterih drugih dejavnikov (npr. debeline agarja) (Turk in Zalar, 2008) zelo nepravilnih oblik (Sliki 18 in 19).



SLIKI 18 IN 19: Nepravilne oblike inhibicijskih con (levo) in popolnoma preraščeno gojišče (desno) (lasten vir)

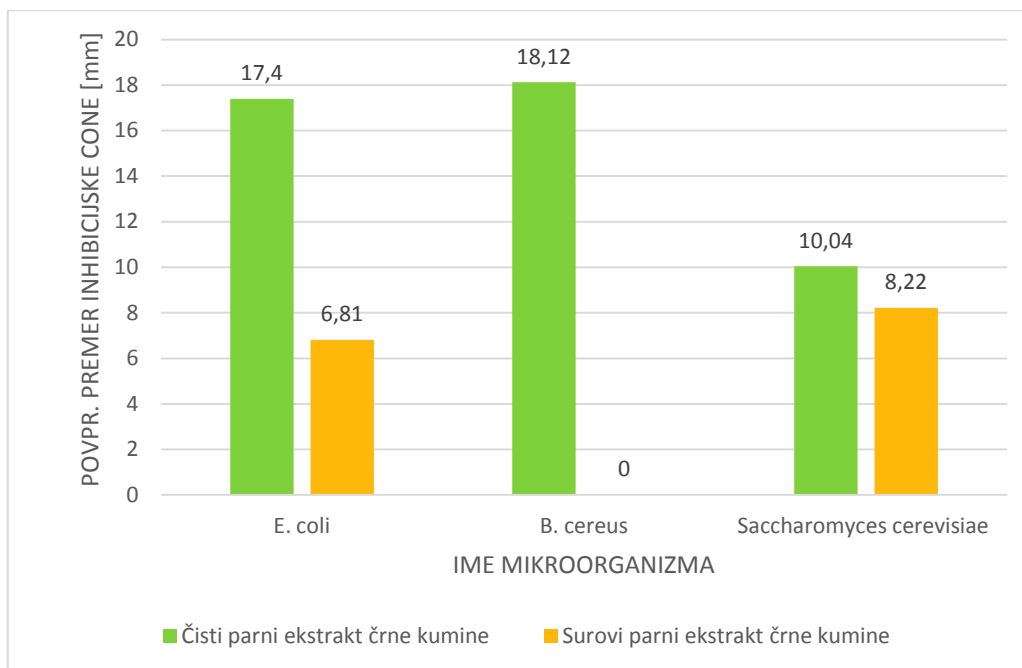
V primerih, kjer so bile inhibicijske cone nepravilnih oblik, smo izmerili najdaljši diagonalni inhibicijske cone¹⁷. Gliva kvasovka je bila najbolj občutljiva na sintetično olje navadne kumine in (*R*)-(+)-limonen. Povprečna premera njunih inhibicijskih con sta prikazana v Grafu 8.



GRAF 8: Primerjava povprečnih premerov inhibicijskih con najboljših učinkovin na glive kvasovke

V Grafu 9 je prikazana primerjava med antimikrobno učinkovitostjo čistega in surovega parnega ekstrakta črne kumine. Razvidno je, da je učinkovitost čistega ekstrakta veliko boljša.

¹⁷ Inhibicijske cone so bile okroglih (pravilnih) oblik le pri naravnem olju navadne kumine in čistem parnem ekstraktu.

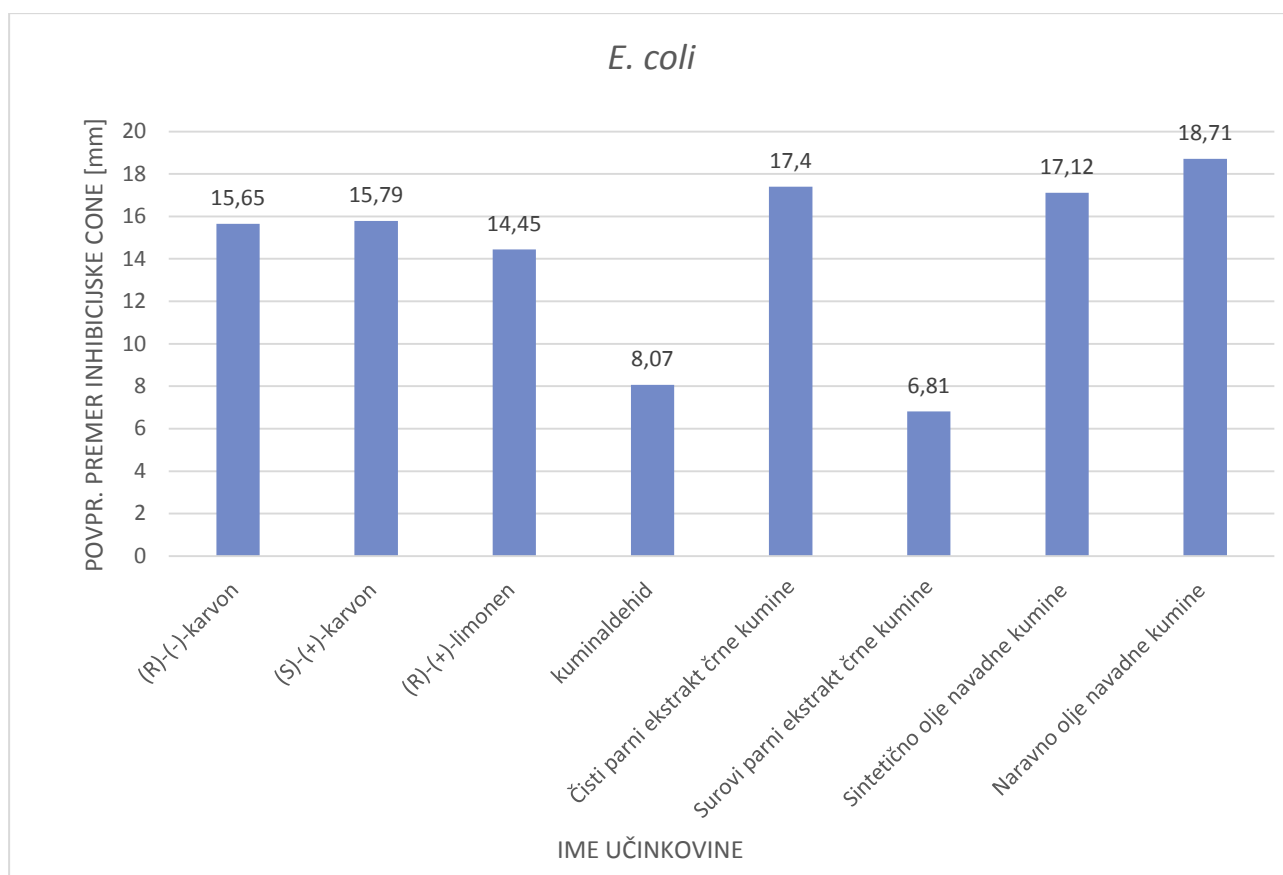


GRAF 9: Primerjava povprečnih premerov inhibicijskih con čistega in surovega parnega ekstrakta pri vseh testiranih mikroorganizmih

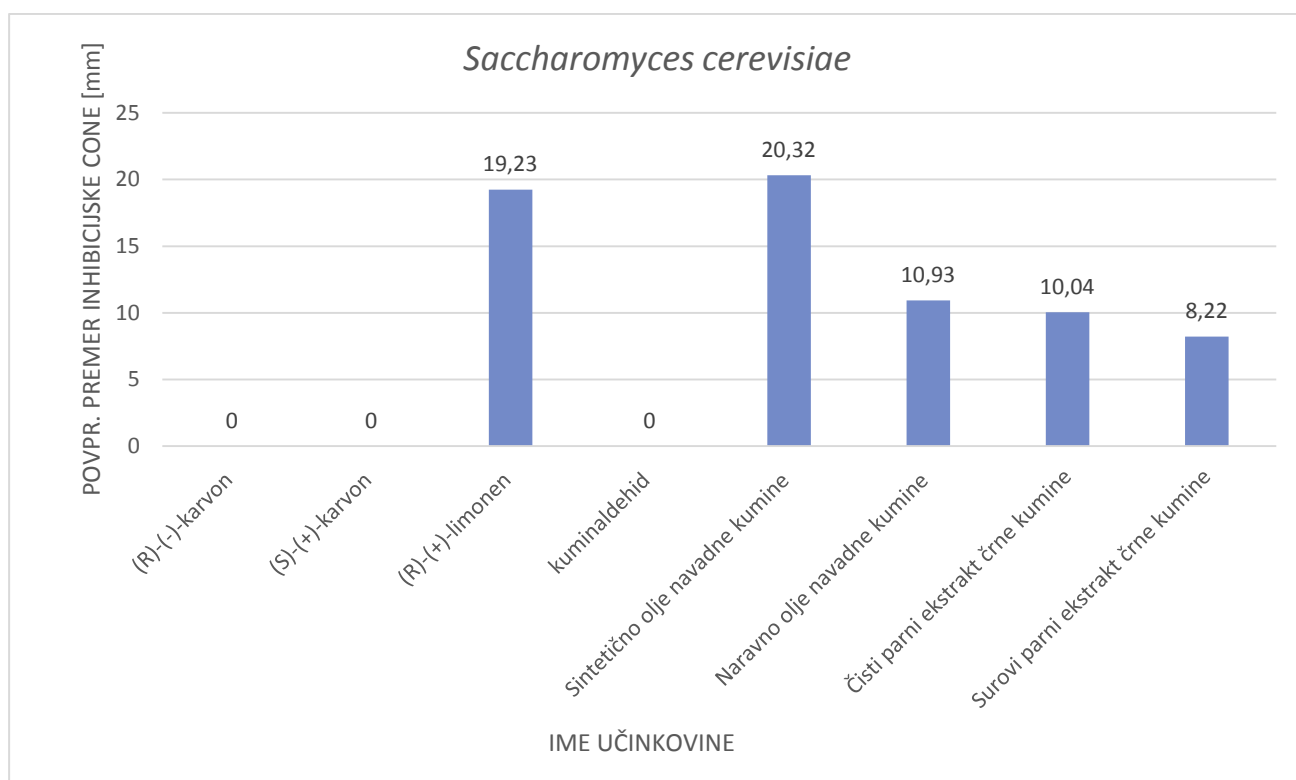
V Grafih 10, 11 in 12 so prikazani povprečni premeri inhibicijskih con pri testu na posamezni mikroorganizem za vse snovi. Vidimo lahko, da je na *E. coli* najbolje delovalo naravno olje navadne kumine, na glive kvasovke (*Saccharomyces cerevisiae*) je najbolje delovalo sintetično olje navadne kumine, na *B. cereus* pa čisti parni ekstrakt črne kumine. Ker nas je zanimalo predvsem delovanje našega vzorca – čistega parnega ekstrakta črne kumine, smo prikazali še inhibicijske cone petega dne *E. coli* (Slika 20).



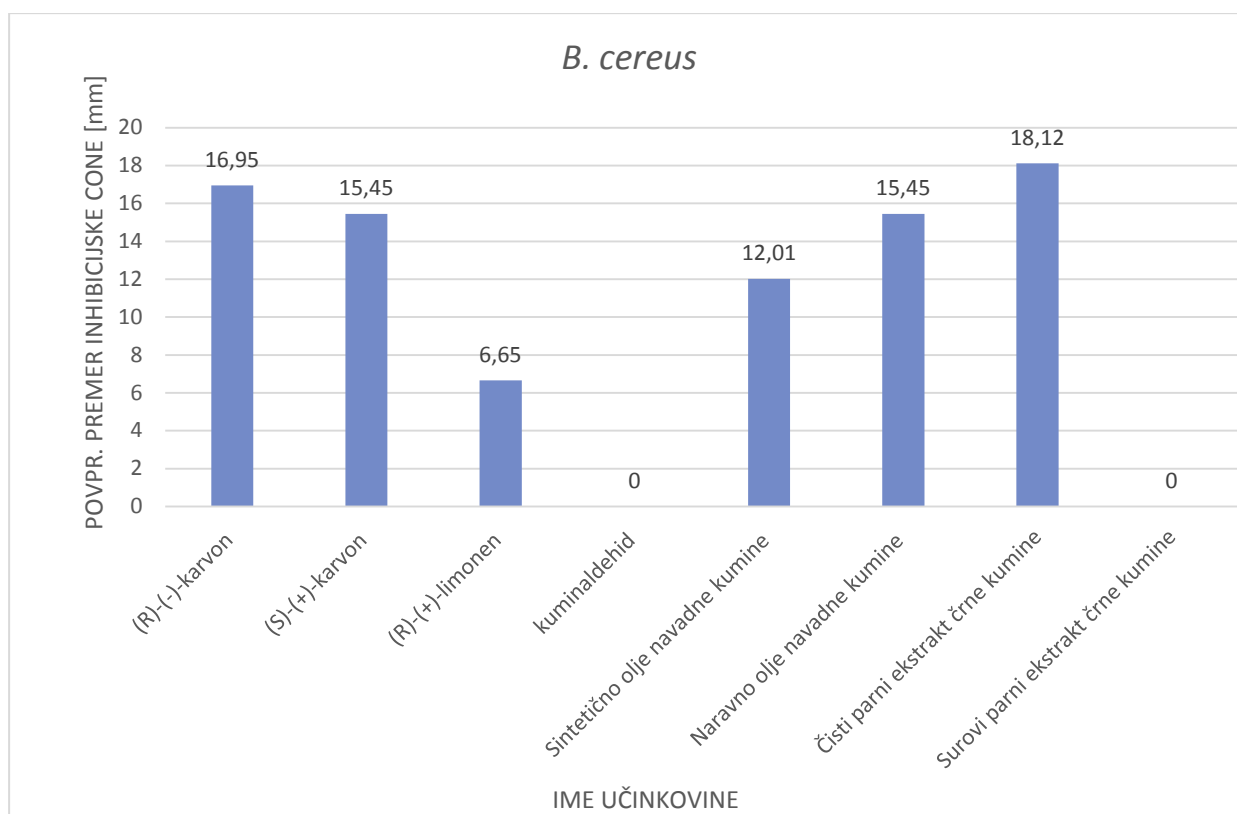
SLIKA 20: Inhibicijske cone na petrijevkah s čistim parnim ekstraktom črn ekumine pri *E. coli* po petih dneh (lasten vir)



GRAF 10: Povprečni premeri inhibicijskih con posamezne učinkovine pri *E. coli*



GRAF 11: Povprečni premeri inhibicijskih con posamezne učinkovine pri glivah kvasovkah



GRAF 12: Povprečni premeri inhibicijskih con posamezne učinkovine pri *B. cereus*

5 RAZPRAVA

Da bi lahko bolje ovrednotili rezultate, smo antibakterijsko učinkovitost (premere inhibicijskih con) vseh uporabljenih snovi primerjali z učinki antibiotikov. Po pregledu literature (Brock, 2012) smo ugotovili, da so rezultati naše raziskave primerljivi.¹⁸ Povprečni premeri inhibicijskih con pri našem testu (če ne upoštevamo rezultatov, ki močno odstopajo) so bili podobni premerom pri uporabi antibiotika ampicilina (vmesna vrednost med 14 in 16 mm), penicilina G (14-15 mm), vankomicina (15-16 mm) in gentamicina (13-14 mm). Vsi navedeni antibiotiki se uporabljajo pri zdravljenju bakterijskih okužb in tudi nanese na količina je bila enaka kot v naših poskusih (10 µL). Iz navedenega lahko sklepamo, da so naši rezultati dovolj zanesljivi, da lahko trdimo, da imajo določene učinkovine (predvsem čisti parni ekstrakt črne kumine, naravno olje navadne kumine in enantiomera karvona) antibakterijski potencial. Rezultati meritev so primerljivi z navedbami Gupte s sod. (2011), ki je raziskoval antibiotično delovanje alkoholnega in vodnega ekstrakta navadne kumine na *Escherichia coli* z metodo difuznih diskov, in Roya s sod. (2010), ki je raziskoval antibakterijsko aktivnost hlapnih olj izoliranih iz črne kumine. Vplive različnih koncentracij tega olja je preizkušal na bakteriji *Pseudomonas Aeruginosa* – bakteriji, ki je običajna pri bolnišničnih okužbah, in jih primerjal z antibiotikom streptomycinom. Dokazal je, da ima olje kumine antibakterijski učinek in da zavira rast tako škodljivih kot koristnih Gram-pozitivnih in Gram-negativnih bakterij. Agrahari in Singh (2014) sta preučevala etanolne ekstrakte navadne kumine in potrdila učinkovitost na *Lactobacillus paracasei*, *L. plantarum*, *L. casei*, *Lactococcus cremoris* in *L. lactis*. Najmanjša koncentracija, ki je še uničila njihovo rast, je bila med 44,8 – 11,6 mg/mL. Ekstrakt so preizkusili tudi na bakterijah *Staphylococcus aureus* in *E. coli* ter ugotovili, da ima nanju močan antibiotičen učinek. Ta učinek so preverili tudi z drugimi metodami in dobili enake rezultate (minimalna koncentracija olja, ki je še imela učinek na *E. coli*, je bila 1 %). Al-Snafi (2015) omenja tudi učinek metanolnega ekstrakta kumine na 15 sevov *Helicobacter pylori*. MIC je bila v primeru *H. Pylori* 100 µg/mL.

Če primerjamo antibakterijski učinek naravnega olja navadne kumine na *E. coli* in *B. cereus*, ugotavljamo, da je učinek primerljiv. Povprečni premeri inhibicijskih con pri testu na *B. cereus* so manjši, a menimo, da razlika ni tako velika, da bi lahko govorili o zmanjšanem učinku; lahko je posledica drugačnega (manjšega) nanosa učinkovin, slabše pripravljenega gojišča ali merske napake.

¹⁸ V določenih primerih so se sicer razlikovali, ampak menimo, da razlika ni bila tako velika, da bi lahko govorili o drugačnem učinku, ampak se je ta razlika verjetno pojavila zaradi našega manj natančnega merjenja ali zaradi manj natančnih merskih pripomočkov.

Ker so bile določene inhibicijske cone nepravilnih oblik, nekatere niso bile vidne, spet druge so bile vidne le motno (gojišče gliv kvasovk), zaključujemo, da na velikost inhibicijskih con ne vpliva le nanesena učinkovina, ampak tudi ostali dejavniki, ki jih velikokrat težko nadzorujemo ali pa jih spregledamo. Sklepali smo, da je prišlo pri rezultatih, ki močno odstopajo od povprečja, do napak. Pri glivah kvasovkah so bili nenavadni rezultati pogosti in predvidevamo, da smo pustili kulturo gliv predolgo rasti. V dveh dneh so glive verjetno spremenile svoje delovanje, se prilagodile okolju, v katerem rastejo, in postale na učinkovine odporne, pa čeprav jih prvi dan še niso mogle predelati. Morda bi bila v primeru kvasovk metoda merjenja optične gostote v tekočem mediju z odmerjeno koncentracijo vsake učinkovine primernejša in zanesljivejša.

Rezultati čistega in surovega parnega ekstrakta črne kumine pri testih na *E. coli* kažejo, da je učinek čistega ekstrakta primerljiv z učinki čistih snovi. Sklepali smo, da čisti parni ekstrakt črne kumine (kljub drugačnim podatkom iz različnih virov) vsebuje določeno koncentracijo karvona in limonena (ki sta pokazala močno antibakterijsko dejavnost na *E. coli*). V pregledanih virih je karvon sicer naveden kot komponenta v sledovih, a menimo, da znatno pripomore k antibakterijskemu učinku čistega parnega ekstrakta. Obstaja pa možnost, da samostojno pridobljen ekstrakt vsebuje še druge učinkovine, ki bi lahko dodatno pripomogle k takšnemu učinku.

Če primerjamo antioksidativno učinkovitost čistega parnega ekstrakta črne kumine in naravnega olja navadne kumine, opazimo, da je razlika med njima majhna. Odstotek inhibicije je bil pri čistem parnem ekstraktu črne kumine po 30 min 55,45 %, pri navadnem olju kumine pa za 9,09 % manjši (46,36 %). Na podlagi tega sklepamo, da je antioksidativna učinkovitost čistega parnega ekstrakta črne kumine nekoliko boljša od naravnega olja navadne kumine. Zato lahko prvo hipotezo, da imata čisti parni ekstrakt črne kumine in naravno olje navadne kumine primerljiv antioksidativni učinek, potrdimo.

Antimikotičen učinek čistega parnega ekstrakta črne kumine in naravnega olja navadne kumine je zelo podoben, saj sta se povprečni vrednosti premera inhibicijskih con razlikovali le za 0,89 mm (10,04 mm pri čistem parnem ekstraktu in 10,93 mm pri naravnem olju navadne kumine). Inhibicijske cone so majhne oz. manjše kot pri testih na *E. coli* (povprečni premer za čisti parni ekstrakt je bil 17,40 mm, za naravno olje kumine pa 18,71 mm), kar pomeni, da antimikotičen učinek ni velik, sta pa obe vrednosti povprečnih premerov podobni, kar pomeni, da lahko hipotezo, da imata primerjani snovi podoben antimikotičen učinek, potrdimo.

Pri *B. cereus* je bil povprečen premer inhibicijskih con pri čistem parnem ekstraktu črne kumine za 3 mm večji kot pri naravnem olju navadne kumine.

Rezultati testov na *E. coli* po 24 urah so bili ravno nasprotni. Povprečen premer inhibicijskih con je bil večji pri naravnem olju navadne kumine (za 1,31 mm). Po 120 urah se je povprečni premer inhibicijske cone pri naravnem olju navadne kumine zmanjšal za 6,53 mm, premer pri čistem parnem ekstraktu črne kumine pa samo za 0,26 mm. Sklepamo, da imata ekstrakta sicer podobne učinke, a se učinkovitost naravnega olja navadne kumine hitreje zmanjšuje kot učinkovitost čistega parnega ekstrakta črne kumine. Na podlagi teh ugotovitev lahko prav tako potrdimo prvo hipotezo.

Primerjali smo učinek naravnega in sintetičnega olja navadne kumine. Sklepali smo, da obe olji vsebujeta enake komponente in da so te v oljih prisotne v približno enakih deležih. Če predpostavimo, da pri meritvah ni prišlo do napake, lahko na podlagi rezultatov zaključimo, da je delež karvona in limonena v naravnem olju kumine večji kot v sintetičnem, saj je bila antibakterijska učinkovitost naravnega olja na *E. coli* večja od učinkovitosti sintetičnega.

V drugi hipotezi smo raziskovali učinke čistih snovi (kuminaldehid, (S)-(+)-karvon, (R)-(-)-karvon in (R)-(+)-limonen). Zanimalo nas je, če imajo vse čiste učinkovine protimikrobni in protioksidativni učinek.

Protioksidativni učinki so se med seboj zelo razlikovali. (S)-(+)-karvon je imel odstotek inhibicije po 30 min najvišji, to je 94,55 %, iz česar sklepamo, da je izmed vseh preizkušenih ekstraktov najboljši protioksidant. Že pri drugem enantiomeru karvona ((R)-(-)-karvon) lahko opazimo razliko. Odstotek inhibicije po 30 min je bil 44,55 %, kar je 50 % manj. Izmed vseh učinkovin sta najslabša protioksidanta limonen in kuminaldehid, katerih odstotek inhibicije je bil po 30 min 17,27 %. Ker je karvon tista učinkovina, ki je, sodeč po različnih virih, v črni kumini prisotna le v sledovih, lahko zaključimo, da ima navadna kumina svoj visok protioksidativni učinek prav zaradi (S)-(+)-karvona. Vse učinkovine so izkazale protioksidativni učinek, ampak so se vrednosti inhibicije DPPH močno razlikovale. S tem lahko potrdimo prve del druge hipoteze. Če naše izsledke primerjamo s podatki v literaturi, opazimo, da Robards in Antolovič (1997), Najda s sod. (2008) in Saleh (2010) v svojih raziskavah navajajo, da imajo bioflavonoidi v kumini dober protioksidativni učinek, ki pa je pogojen s sestavo. Tudi Satyanarayana s sod. (2004) je potrdil močan protioksidativen učinek, ki je močnejši od splošno znanih protioksidantov (npr. askorbinske kisline) in navaja podatke o 90 % redukciji DPPH. Na tej osnovi zaključujemo, da so podatki, pridobljeni z raziskavo, relevantni in točni.

Pri primerjanju protimikrobnih učinkov so opazne še večje razlike. Obe enantiomeri karvona sta zelo dobro antibakterijsko učinkovali, nobena pa ni delovala protimikotično. Limonen je deloval tako na bakterije (če izvajamo 3 paralele pri testu na *E. coli*, saj inhibicijske cone niso bile vidne), kot tudi na glive kvasovke. Cone inhibicije limonena in karvona na *B. cereus* so se zelo razlikovale.

Pri limonenu so bile malo večje od premera diskov (povprečno 6,65 mm), cone pri obeh karvonih pa so se gibale med 15,5 in 17 mm. Opažamo, da je učinek limonena bistveno manjši. Zadnja čista učinkovina, kuminaldehid, ni pokazala antibakterijskega učinka na *B. cereus* in antimikotičnega učinka na glive kvasovke, je pa delovala na *E. coli*, a je tudi tam po 120 urah izgubila učinek. Sklepamo lahko, da slednja nima antimikrobnega učinka. Enantiomeri karvona sta delovali samo na bakterije. Pri limonenu smo v vseh treh primerih opazili inhibicijske cone, a so bile pri *B. cereus* premajhne, da bi lahko trdili, da ima antibakterijski učinek. Na podlagi rezultatov ne moremo trditi, da ima kuminaldehid antimikotični ali antibakterijski učinek. Čeprav so bile inhibicijske cone opazne pri testu na *E. coli*, so bile le za nekaj mm večje od premera diska. Zato smo drugi del druge hipoteze, ki govori o tem, da imajo vse preučevane snovi antimikrobne učinke na podlagi rezultatov ovrgli.

S tretjo hipotezo smo predvidevali, da ima (*R*)-(-) enantiomer karvona močnejši antimikrobni učinek kot (*S*)-(+)-karvon in da oba enantiomera nimata enakega učinka na bakterije in glive.

Primerjali smo antibakterijske učinke obeh enantiomerov na bakterijo *E. coli* in prišli do zaključka, da je bil po 24 urah (*S*)-(+)-karvon tisti, katerega učinek je bil močnejši, po 48 in 120 urah pa je imel močnejši učinek (*R*)-(-)-karvon. Povprečni premer cone inhibicije (*R*)-(-) enantiomera je bil 15,65 mm prvi in 17,25 mm drugi dan, povprečni premer (*S*)-(+) enantiomera pa 15,79 mm prvi in 16,70 mm drugi dan. Peti dan je bil povprečni premer (*S*)-(+) enantiomera 17,86 mm, (*R*)-(-) enantiomera pa 18,06 mm. Razlika med vrednostmi je minimalna, tako da lahko rečemo, da sta učinka zelo primerljiva, vendar je učinek (*R*)-(-)-karvona nekoliko močnejši. Pri učinku na *B. cereus* je bil ponovno (*R*)-(-)-karvon tisti, katerega učinek je bil za nekoliko večji (razlika med povprečnima premeroma inhibicijskih con (*S*)-(+) in (*R*)-(-) enantiomerov je bila 1,50 mm). Nobeden od karvonov ni deloval antimikotično, kar pomeni, da sta bila njuna učinka enaka. Glede na rezultate lahko potrdimo, da enantiomera nimata enakega učinka na glive in na bakterije – na glive sploh ne učinkujeta, njun antibakterijski učinek pa je velik. Tretjo zastavljeno hipotezo smo potrdili, saj ima (*R*)-(-) enantiomer v treh od petih primerov (učinek na *E. coli* po 48 in 120 urah ter učinek na *B. cereus*) večji učinek kot (*S*)-(+) enantiomer. Učinek (*S*)-(+)-karvona je večji le v enem primeru, pri antimikotičnem učinkovanju pa sta enantiomera enakovredna.

Četrta postavljena hipoteza pravi, da bo antioksidacijski in antimikrobni učinek parnih ekstraktov črne kumine primerljiv z antioksidacijskim in antimikrobnim potencialom vsaj ene od aktivnih učinkovin (kuminaldehid, (*R*)-(-)-karvon, (*S*)-(+)-karvon in (*R*)-(+)-limonen). Predvidevali smo tudi, da je razlog za to sinergistični učinek različnih aktivnih snovi v ekstraktu.

Antioksidacijski učinek čistega parnega ekstrakta črne kumine je bil najbolj primerljiv z (*R*)-(-)-karvonom. Odstotek inhibicije DPPH čistega parnega ekstrakta je bil po 5 min 30,30 %, odstotek inhibicije (*R*)-(-)-karvona pa 22,94 %. Po 30 min (ob koncu merjenja) je bil odstotek inhibicije (*R*)-(-)-karvona 44,55 %, čistega parnega ekstrakta črne kumine pa 55,50 %. V obeh primerih se je odstotek povečal za približno 20 % (za 21,61 pri karvonu in za 25,2 pri čistem parnem ekstraktu). Če primerjamo antioksidativno učinkovitost s preostalimi čistimi snovmi ((*S*)-(+)-karvon, (*R*)-(+)-limonen in kuminaldehid), opazamo, da so vrednosti zelo različne. Največji odstotek inhibicije (*S*)-(+)-karvona je bil 94,55 % (kar je za 39,05 % več od največje vrednosti čistega parnega ekstrakta), pri limonenu je bil ta odstotek 17,27 % (za 38,23 % manj od čistega parnega ekstrakta), pri kuminaldehidu pa 17,30 % (za 38,2 % manjši). Če torej primerjamo vse razlike, je razlika med čistim parnim ekstraktom in (*R*)-(-)-karvonom res najmanjša – 10,95 %.

Enaka ugotovitev velja za surovi parni ekstrakt črne kumine, katerega odstotek inhibicije je bil na začetku 38,6 %, po 30 min pa 58,3 %. Od čistega parnega ekstrakta se razlikuje le za 2,7 %. Pri primerjanju največjega odstotka inhibicije surovega parnega ekstrakta z največjim odstotkom inhibicije čistih snovi ponovno opazamo največje ujemanje z (*R*)-(-)-karvonom.

Zanimivo je, da imata parna ekstrakta črne kumine primerljiv učinek s čisto snovjo (karvonom), ki je v njuni sestavi ni veliko. Predvidevali bi, da bi bil učinek bolj podoben limonenu, saj je tega v črni kumini več, ampak vseeno ne toliko kot ga je v navadni kumini. Glede na omenjeno sklepamo, da je vzrok za dober antioksidativni učinek čistega in surovega parnega ekstrakta črne kumine medsebojni učinek več komponent. Presenetljivo je tudi to, da imata ta ekstrakta boljši antioksidativni učinek kot naravno in sintetično olje navadne kumine, ki vsebuje tako več karvona kot tudi limonena (skupaj predstavljata 65 % delež semen kumine (Agrahari in Singh, 2014)).

Antimikrobna učinka čistega in surovega parnega ekstrakta črne kumine se močno razlikujeta. Antibakterijska učinkovitost čistega parnega ekstrakta je bila velika (povprečna velikost premera inhibicijskih con po 24 urah je bila pri testu na *E. coli* 17,40 mm, pri testu na *B. cereus* pa 18,12 mm), učinkovitost surovega parnega ekstrakta pa veliko manjša (povprečni premer 6,81 mm pri *E. coli*; na *B. cereus* surovi ekstrakt ni deloval). Antibakterijska učinkovitost surovega parnega ekstrakta je najbolj primerljiva z učinkom kuminaldehida, ki na *B. cereus* prav tako ni deloval, povprečni premer inhibicijskih con pri *E. coli* pa je bil 8,07 mm (po 24 urah). Tudi po dveh dneh sta učinka med seboj najbolj primerljiva (razlikujeta se za 0,96 mm), po petih dneh kuminaldehid sploh ni več deloval, povprečni premer inhibicijskih con pri surovem parnem ekstraktu pa se je zmanjšal na 6,44 mm.

Pri antimikotični učinkovitosti težko rečemo, s katero čisto učinkovino ga lahko najbolj primerjamo, saj razen limonena, pri katerem je bil povprečni premer 20,05 mm, ni delovala nobena druga čista učinkovina. Povprečni primer surovega parnega ekstrakta je bil 8,22 mm, kar pomeni, da je glede na razlike med povprečnimi premeri bolj podoben kuminaldehidu in obema karvonoma (razlika 8,22 mm), kot pa limonenu (razlika 11,83 mm). Kljub temu pa je razlika tako velika, da ne moremo reči, da gre za primerljiv učinek, saj je bil učinek parnega ekstrakta majhen, učinek limonena velik, učinek ostalih čistih snovi pa nič.

Če rezultate antibakterijske učinkovitosti surovega parnega ekstrakta črne kumine primerjamo z rezultati čistega parnega ekstrakta, opazimo, da so razlike med njimi velike, kar ni presenetljivo, saj se je večina snovi izločenih s parno ekstrakcijo izločila v t.i. čistem parnem ekstraktu, v surovem pa je ostala manjša količina tistih aktivnih učinkovin, ki so v vodi nekoliko boljše topne in smo jih naknadno ekstrahirali iz vode. Prav tako pa smo s tankoplastno kromatografijo ugotovili, da ekstrakt, pridobljen z destilirano vodo, vsebuje karvon in limonen (ki sta, glede na velike premere inhibicijskih con, tisti učinkovini, ki v največji meri prispevata k antibakterijski učinkovitosti).

Antibakterijska učinkovitost čistega parnega ekstrakta črne kumine na *E. coli* je bila po 24 urah najbolj podobna učinkom obeh karvonov, po 48 urah (*R*)-(-)- in (*S*)-(+)-karvonu ter limonenu, po 120 urah pa (*S*)-(+)-karvonu. Učinek na *B. cereus* je najbolj primerljiv z učinkom (*R*)-(-)-karvona. Po primerjanju vseh rezultatov smo ugotovili, da lahko antibakterijsko učinkovitost najbolj primerjamo z obema karvonoma. Premeri inhibicijskih con so se razlikovali za najmanj 0,92 mm in največ 2,67 mm. Sklepali smo, da sta obe enantiomeri prisotni v čistem ekstraktu in da prav tako delujeta sinergistično. Antimikotična primerjava je podobna kot pri surovem parnem ekstraktu črne kumine. Glede na to, da nima niti čisti niti surovi parni ekstrakt črne kumine primerljivega antimikotičnega učinka s preverjenimi čistimi učinkovinami, smo sklepali, da vsebujeta ostale snovi, ki bi lahko pripomogle k majhnemu antimikotičnemu učinku, ali pa je koncentracija limonena v teh dveh ekstraktih dovolj velika, da se lahko delovanje opazi, vseeno pa ne tako velika, da bi lahko rekli, da je limonen tisti, ki je pri tem učinku ključen.

Ker smo s tankoplastno kromatografijo in IR spektroskopijo ugotovili, da oba ekstrakta vsebujeta karvon in limonen, sklepamo na dve možnosti: delež karvona in limonena je v pridobljenih ekstraktih večji kot je naveden v virih ali pa je sinergistični učinek obeh komponent večji kot učinek vsake komponente posamezno.

Zato smo četrto hipotezo le delno potrdili, saj lahko potrdimo, da imata čisti in surovi parni ekstrakt črne kumine primerljiv antibakterijski in antioksidativni učinek z vsaj eno čisto učinkovino, nimata pa podobnega oz. primerljivega antimikotičnega učinka.

6 ZAKLJUČEK

Namen raziskovalne naloge je bil preveriti, ali imajo eterična olja črne in navadne kumine ter komponente, ki se v njih nahajajo, antimikrobni in antioksidativni potencial ter ugotoviti, ali je sinergistični učinek teh komponent večji kot učinek vsake komponente olj posamezno.

V prvem delu raziskovalne naloge smo z različnimi metodami (TLC in ATR-FTIR) dokazali, da pridobljen parni ekstrakt vsebuje komponenti (S)-(+)-karvon in limonen, ki sta glavni komponenti navadne kumine. Zaradi te ugotovitve smo lahko v nadaljevanju primerjali učinke obeh kumin.

S testom DPPH smo ugotovili, da je (S)-(+)-karvon tista komponenta, ki ima najboljši antioksidativni učinek (največji odstotek inhibicije DPPH). Rezultati ostalih čistih učinkovin ((R)-(-)-karvona, limonena in kuminaldehida) so pokazali slabše delovanje. Učinka čistega in surovega parnega ekstrakta sta bila med seboj primerljiva.

Enantomeri karvona sta med čistimi snovmi tisti učinkovini, ki imata najmočnejši antibakterijski učinek. Na bakterijo *E. coli* sta dobro delovala oba (razlika med povprečnimi vrednostmi njunih inhibicijskih con je bila minimalna), na *B. cereus* pa je bolje deloval (R)-(-)-karvon, na glive kvasovke nista delovala. Pri tem testu se je (R)-(+)-limonen izkazal za najbolj antimikotično čisto snov. Ostale preizkušene snovi so kazale raznolike antimikrobne učinke; na *E. coli* je najbolje delovalo naravno olje navadne kumine, na glive kvasovke sintetično olje navadne kumine, na *B. cereus* pa čisti parni ekstrakt črne kumine. Ker smo teste naredili *in vitro*, nas zanima tudi, kako bi naše učinkovine delovale *in vivo*, kjer moramo upoštevati še fiziološke in nefiziološke dejavnike, ki vplivajo na resorpcijo učinkovin. Ravno to je razlog za spodbuditev nadaljnjih raziskav na tem področju.

Na spletu lahko najdemo mnogo člankov, ki na poljuden način opisujejo zdravilne učinke črne in navadne kumine. Oblak (2015) v svojem (ne znanstvenem) članku navaja, da črna kumina ugodno vpliva na prebavni trakt, niža holesterol, blaži prebavne krče, pri doječih materah bi naj povečala količino mleka, zavira različne vrste raka, pomaga pri zdravljenju glivičnih in bakterijskih okužb ter preprečuje razvoj metastaz v jetrih. Glede na to, da smo dokazali antimikotično in antibakterijsko delovanje eteričnih olj in se s pomočjo strokovne literature prepričali, da navedene lastnosti v veliki meri držijo, lahko rečemo, da so spletni viri, s katerimi pridemo večkrat in tudi hitreje v stik, dovolj zanesljivi in jim lahko zaupamo.

Čisti parni ekstrakt črne kumine je imel pri *E. coli* primerljiv učinek z naravnim oljem navadne kumine, kar potrjuje, da so črni in navadni kumini določene komponente skupne.

Ker črna kumina vsebuje še mnoge druge snovi (npr. timokinon, nigelon, ...) in znanstveniki v glavnem njim pripisujejo antibakterijske (ter antioksidativne) učinke, razširitev in nadaljevanje te raziskave vidimo predvsem v smeri primerjanja učinkovitosti teh snovi s snovmi, ki so bile predmet naše raziskave. S temi poskusi bi lahko bolje primerjali učinek obeh kumin, lažje ugotovili, zakaj smo dobili takšne rezultate in jih tudi bolj kritično ovrednotili.

7 DRUŽBENA ODGOVORNOST

Črna in navadna kumina sta dostopni v skoraj vseh samopostrežnih trgovinah. Vsak lahko brez večjih težav pride v stik z njima, če si tega želi. Veliko eteričnih olj kumine v Sloveniji je uvoženih. V takšnih primerih ne moremo zanesljivo trditi, kakšna je kakovost kuminih semen, pri kakšnih pogojih je bilo olje izdelano in ali so podatki, zapisani na etiketi resnični. Za izdelavo čistega ekstrakta črne kumine smo uporabili vodo, saj je ta najbolj razširjeno topilo na Zemlji in uporabno v vsakdanjem življenju.

Z raziskavo smo dokazali, da je možno s pomočjo vodne pare doma pripraviti učinkovit ekstrakt črne kumine, ki ima antibakterijski učinek primerljiv s kupljenimi naravnimi in sintetičnimi olji navadne kumine ter celo nekaterimi antibiotiki. Menimo, da je to spoznanje pomembno in ima tudi širši družbeni pomen. Z raziskovalno nalogo smo želeli spodbuditi nadaljnje raziskave na tem področju.

8 VIRI IN LITERATURA

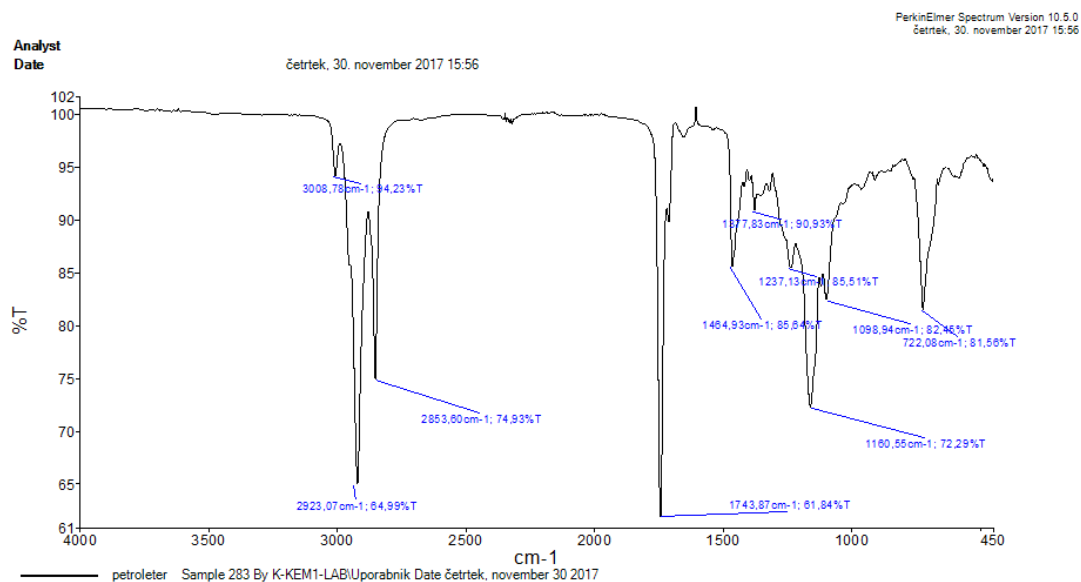
1. Abdalaziz, M. N., Ali, M. M., Dafallah Gahallah, M., Garbi, M. I., Kabbashi, A. S. (2017). Evaluation of Fixed Oil, Seed Extracts, of *Carum carvi* L. *International Journal of Computational and Theoretical Chemistry*, Vol. 5, pp. (1-8).
2. Agrahari, P., Singh, D. K. (2014). A review on the pharmacological aspects of *Carum carvi*, *Journal of Biology and Earth Sciences*, Vol. 4, Issue 1, pp. (1-9).
3. Al-Ali, A., Alkhawajah, A. A., Randhawa, M. A., Shaikh, N. A. (2008). Oral and intraperitoneal LD50 of thymoquinone, an active principle of *Nigella sativa*, in mice and rats. *J Ayub Med Coll Abbottabad*, Vol. 20, Issue 2, pp. (25-27).
4. Al-Snafi, A. E. (2015). The chemical constituents and pharmacological effects of *Carum carvi* – a review. *Indian Journal of Pharmaceutical Science and Research*, Vol. 5, Issue 2, pp. (72-82).
5. Asharf, S. s sod. (2017). *In vitro* activity od *Nigella sativa* against antibiotic resistant *Salmonella enterica* [on-line]. Dostopno na: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29289818>. [08.01.2018].
6. Azwanida, N. N. (2015). A Review on the extraction Methods Use in Medicinal Plants, Principle, Strength and Limitation, Vol. 4, Issue 3, pp. (1-4).
7. *Bacillus cereus*. (2017). [on-line]. Dostopno na: https://en.wikipedia.org/wiki/Bacillus_cereus. [20.01.2018].
8. *Bacillus cereus* - Food Standars for Australia and New Zealand. (2013). pp. (1-2). [on-line]. Dostopno na: <https://www.foodstandards.gov.au/publications/Documents/Bacillus%20cereus.pdf>. [20. 1. 2018].
9. *Bacilus cereus (Bacillus cereus, B. cereus)* v živilih - Nacionalni inštitut za javno zdravje republike Slovenije. (2013). pp. (1). [on-line]. Dostopno na: http://www.nijz.si/sites/www.nijz.si/files/uploaded/bcereus_04082015.pdf. [20. 1. 2018].
10. Badary, O. A., Nagi, M. N., Al-Shabanah, O. A., Al-sawaf, H. A., Al-Sohaibani, M. O., Al-Bekairi, A. M. (1997). Thymoquinone ameliorates the nephrotoxicity induced by cisplatin in rodents and potentiates itd antitumor activity, Vol. 75.
11. Beattie, P. J. (2005). »Petroleum ether«, *Encyclopedia of Toxicology*, 3 (second ed.), pp.(375-376).
12. Burits, M., Bucar, F. (2000). Antioxidant activity of *Nigella sativa* essential oil, Vol. 14, Issue 5.
13. Caltest standard operating procedure, Soxhlet extraction method EPA 3540C, California. (2009), pp. (1-11).
14. Chakravaatry, N. (1993). Inhibition of histamine release from mast cells by nigelone, Vol. 70, pp. (237-242).
15. Cheng, L., Xia, T. S., Wang, Y. F., Zhou, W., Liang, X. Q., Xue, J. Q. (2014). The anticancer effect and mechanism of α -hederin on breast cancer cells, Vol. 45, Issue 22, pp. (757-763).
16. Clifford, A. A. (2000). *Supercritical Fluid Extraction*, University of Leeds, UK, pp. (1-7).
17. Dehkordi, F., R., Kamkhah, A., F. (2008). Antihypertensive effect of *Nigella sativa* seed extract in patients with mild hypertension, Vol. 22, Issue 4.
18. Dogša, I., Danevčič, T., Stres, B., Höfferle, Š., Mandič Mulec, I. (2008). *Mikrobiološko-molekularni praktikum - laboratorijske vaje za biotehnologe*. Ljubljana: Univerza v Ljubljani, biotehniška fakulteta oddelek za živilstvo.
19. El-Fataty. (1975). Isolation and structure of an anti-microbial principle from the volatile oil of *Nigella sativa* L. seeds, Vol. 30, Issue 2.
20. *Encyclopedia of Microbiology*, Academic Press. (2009). pp. (479-486).
21. Engelhardt, H., Gross, A. (1988). Extraction and separation by supercritical chromatograph with packed columns, Vol. 11, pp. (38-42).

22. Enterobakterije, ki proizvajajo ESBL in so odporne proti karbapenemu. (2017). [on-line]. Dostopno na: http://wiki.fkkt.uni-lj.si/index.php/Enterobakterije%2C_ki_proizvajajo_ESBL_in_so_odporne_proti_karbapenemu. [17.01.2018].
23. Harvey, A. R. (2007). Microbiology, pp. (111-112).
24. Houghton, P. J., Zarka, R., de las Heras, B., S. Hoult, J. R. (1995). Fixed Oil of *Nigella sativa* and Derived Thymoquinone Inhibit Eicosanoid Generation in Leukocytes and Membrane Lipid Peroxidation, Vol. 61, Issue 1, pp. (33-36).
25. Ichwan, S. J., Al-Ani, I. M., Bilal, H. G., Suriyah, W. H., Taher, M., Ikeda, M. A. (2014). Apoptotic activities of thymoquinone, an active ingredient of black seed (*Nigella sativa*), in cervical cancer cell lines, Vol. 57, Issue 5, pp. (249-255).
26. Ivankovič, S., Stojkovič, R., Jukic, M., Miloš, M. (2006). The antitumor activity of thymoquinone and thymohydroquinone *in vitro* and *in vivo*, Vol. 28, Issue 3.
27. Kallio, H., Kerrola, K., Alhonmaki, P. (1994). Carvone and limonene in caraway fruits (*Carum carvi* L.) analyzed by supercritical carbon dioxide extraction – gas chromatography, Vol. 42, pp. (2478-2485).
28. Kanter, M., Demir, H., Karakaya, C., Ozbek, H. (2005). Gastroprotective activity of *Nigella sativa* L. oil and its constituent, thymoquinone against acute alcohol-induced gastric mucosal injury in rats.
29. Khader, M., Eckl, P. M. (2014). Thymoquinone: an emerging natural drug with a wide range of medical applications, Vol. 17, Issue 12.
30. Khan, M. A., Tania, M., Fu, S., Fu, J. (2017). Thymoquinone, as an anticancer molecule: from basic research to clinical investigation, Vol. 8, Issue 31.
31. Kokoska, L., Havlik, J., Valterova, I., Sovova, H., Sajfrtova, M., Jankovska I. (2008). Comparison of Chemical Composition and Antibacterial Activity of *Nigella sativa* Seed Essential Oils Obtained by Different Extraction Methods, Vol. 71, Issue 12, pp. (2475-2480).
32. Kooti, W., Hasanzadeh-Noohi, Z., Ashtary-Larky, D., Sharafi-Ahvazi, N. (2016). Phytochemistry, pharmacology, and therapeutic uses of black seed (*Nigella sativa*).
33. Madigan, M. T., Martinko, J. M., Bender, K. S., Buckley, D. H., Stahl, D. A. (2011). Brock Biology of Microorganisms: Global edition.
34. Majdalawieh, A. F., Fayyad, M. W. (2016). Recent advances on the anti-cancer properties of *Nigella sativa*, a widely used food additive, Vol. 7, Issue 3, pp. (173-180).
35. Molyneux, P. (2004). The use of the stable free radical diphenylpicrylhydrazyl (DPPH) for estimating antioxidant activity, Vol. 26, Issue 2, pp. (211-219).
36. Money, N. P. (2016). Fungi: A Very Short Introduction, pp. (11-13; 39-41).
37. Morsi, N. M. (2000). Antimicrobial effect of crude extracts of *Nigella sativa* on multiple antibiotics-resistant bacteria, Vol. 49, Issue 1, pp. (63-74).
38. Oblak, T. (2015). Črna kumina, neskončni vir zdravja. [on-line] Dostopno na: <https://www.bodieko.si/crna-kumina>. [04.02.2018].
39. Paarakh, P. *Nigella sativa* L., A comprehensive review. Indian Journal of Natural products. (2010). Vol. 1, Issue 4, pp. (409-429).
40. Papić, J. Crni kim: suvremeni čuvar zdravlja. [on-line]. Dostopno na: <http://www.inpharma.hr/index.php/news/152/22/Crni-kim-suvremeni-cuvar-zdravlja>. [10. 1. 2018].
41. Randhawa, M. A., Alghamdi, M. S. (2011). Anticancer activity of *Nigella sativa* (black seed) – a review, Vol. 39, Issue 6.

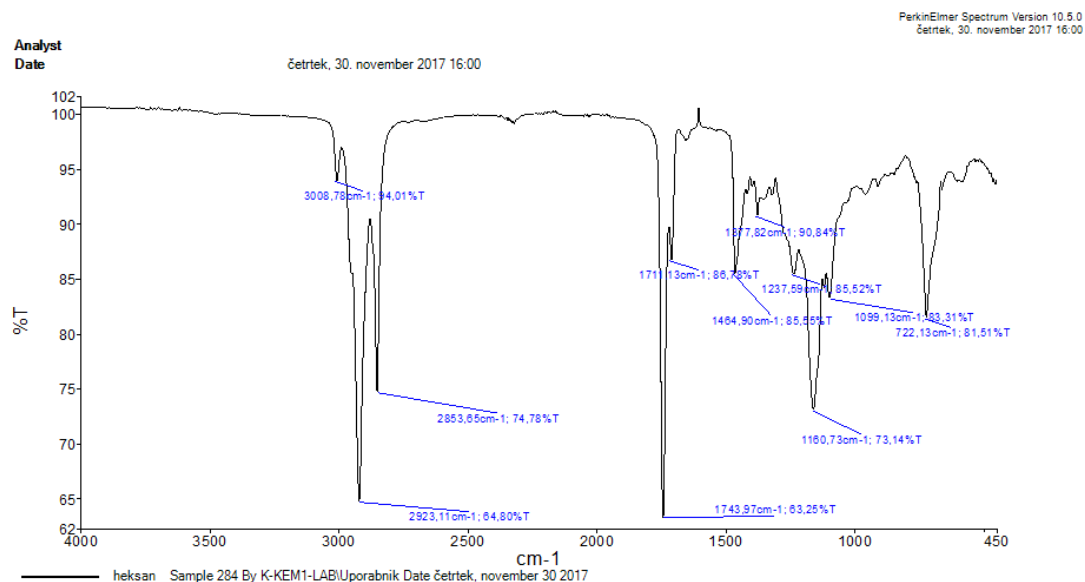
42. Rogozhin, E. A., Oshchepkova, Y. I., Odintsova, T. I., Khadeeva, N. V., Veshkurova, O. N., Egorov, T. A. (2011). Novel antifungal defensins from *Nigella sativa* L. seeds, Vol. 49, Issue 2, pp. (131-137).
43. Salem, E. M., Yar, T., Bamosa, A. O., Al-Quorain, A., Yasawy, M. I., Alsulaiman, R.M. (2010). Comparative study of *Nigella sativa* and triple therapy in eradication of *Helicobacter Pylori* in patients with non-ulcer dyspepsia, Vol. 16, Issue 3, pp. (207-214).
44. Sapkale, G. N., Patil, S. M., Surwase U. S., Bhatbhage, P. K. (2010). Supercritical fluid extraction – a review. Department of Pharmacognosy, College of Pharmacy, India, Vol. 8, Issue 2, pp. (729-743).
45. Savini, V. (2016). The Diverse Faces of *Bacillus cereus*, pp. (4-5).
46. Schlegel G., H., Zaborosch, C. (1993). General Microbiology, pp. (312-318).
47. Shuid, A. N., Norazlina, M., Mohamed, I. N., Othman, F., Fuhaimi, F., Mohd Ramli, E. S., Muhammad, N., Soelaiman, I. N. (2012). *Nigella sativa*: A Potential Antiosteoporotic Agent.
48. Sedlakova, J., Kocourkova, B., Lojkova, L., Kuban, V. (2003). Determination of essential oil content in caraway (*Carum carvi* L.) species by means of cupercritical fluid extraction. Mendel university of Agriculture and firestry in Brno, Vol. 6, pp. (277-282).
49. Substances & Technologies, Knowledge source on Materials Engineering. (2012). [on-line]. Dostopno na: <http://www.substech.com/dokuwiki/doku.php?id=hexane>. [14. 1. 2018].
50. Sussman, M. (1997). *Escherichia coli*: Mechanisms of Virulence, pp. (3-5).
51. Turk, M., Zalar, P. (2012). Mikrobiologija - praktikum (Gradivo za vaje). Ljubljana: Univerza v Ljubljani; biotehniška fakulteta, oddelek za biologijo.
52. Waksmundzka-Hajnos, M., Sherma, J., Kowalska T. (2008). Thin Layer Chromatography in Phytochemistry, pp. (22-25).
53. Wienkötter, N., Höpner, D., Schütte, U., Bauer, K., Begrow, F., El-Dakhakhny, M., Verspohl, E. J. (2008). The effect on nigellone and thymoquinone on inhibiting trachea contraction and mucociliary clearance, Vol. 74, Issue 2, pp. (8-105).
54. Yarnell, E., Abascal, K. (2011). *Nigella sativa* holy herb of the Middle East, Vol. 17, Issue 2, pp. (99-105).
55. Zveza potrošnikov Slovenije, odpoklic - ekološko in hladno stiskano olje črne kumine. (2017). [on-line]. Dostopno na: <https://www.zps.si/index.php/hrana-in-pijaa-topmenu-327/odpoklici-2017/8550-odpoklic-ekolosko-in-hladno-stiskano-olje-crne-kumine>. [05.01.2018].

9 PRILOGE

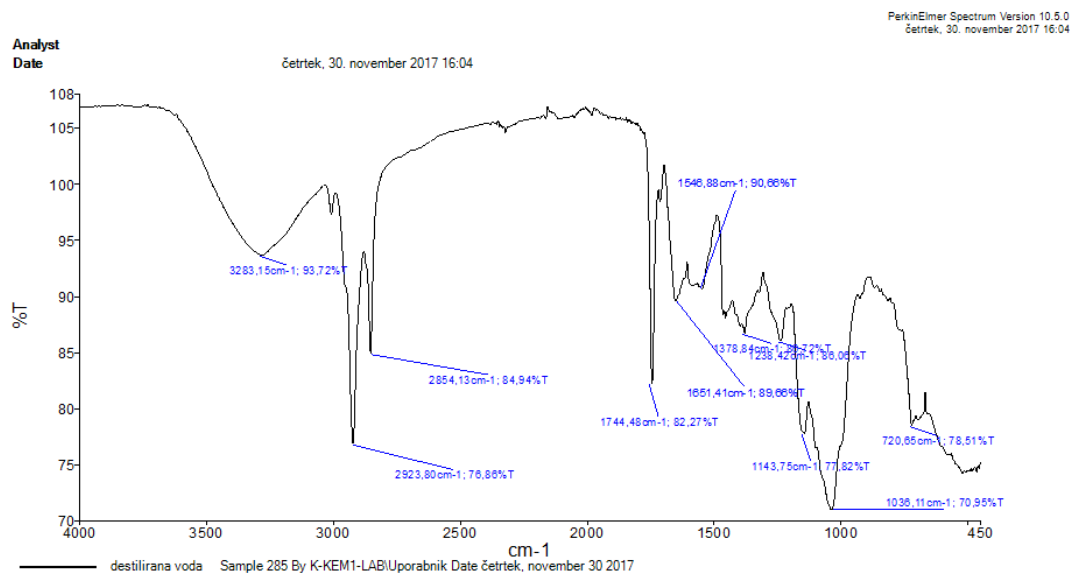
PRILOGA 1 – ATR-FTIR SPEKTRI EKSTRAKTOV



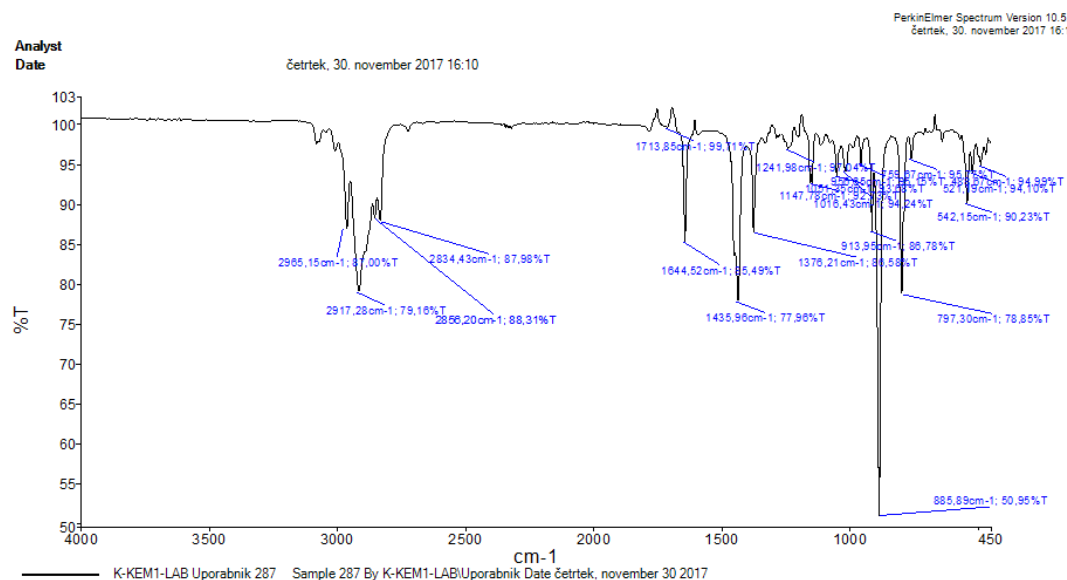
GRAF 13: IR spekter ekstrakta pridobljenega s petroletrrom



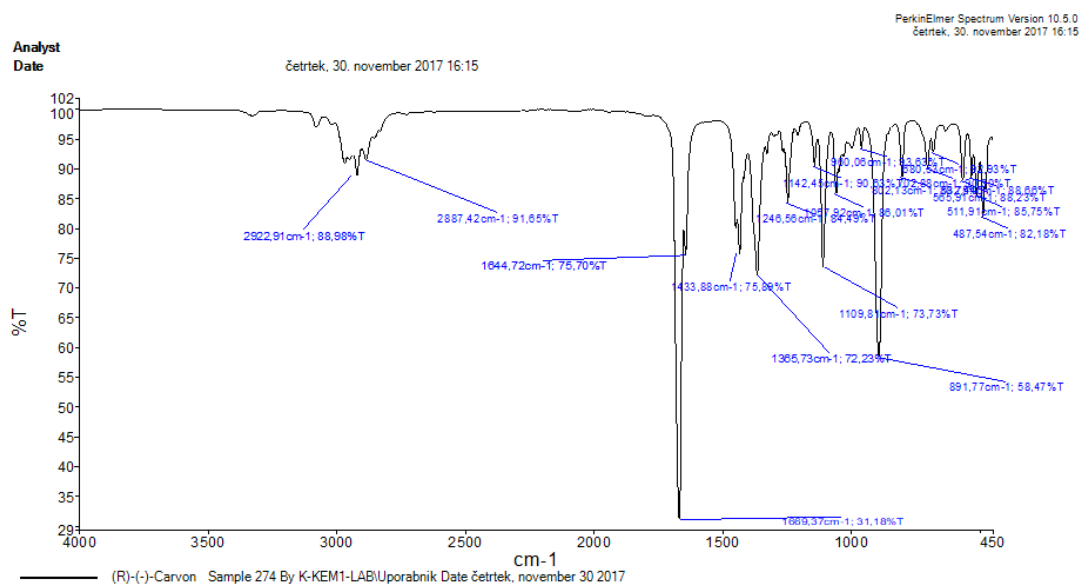
GRAF 14: IR spekter ekstrakta pridobljenega s heksanom



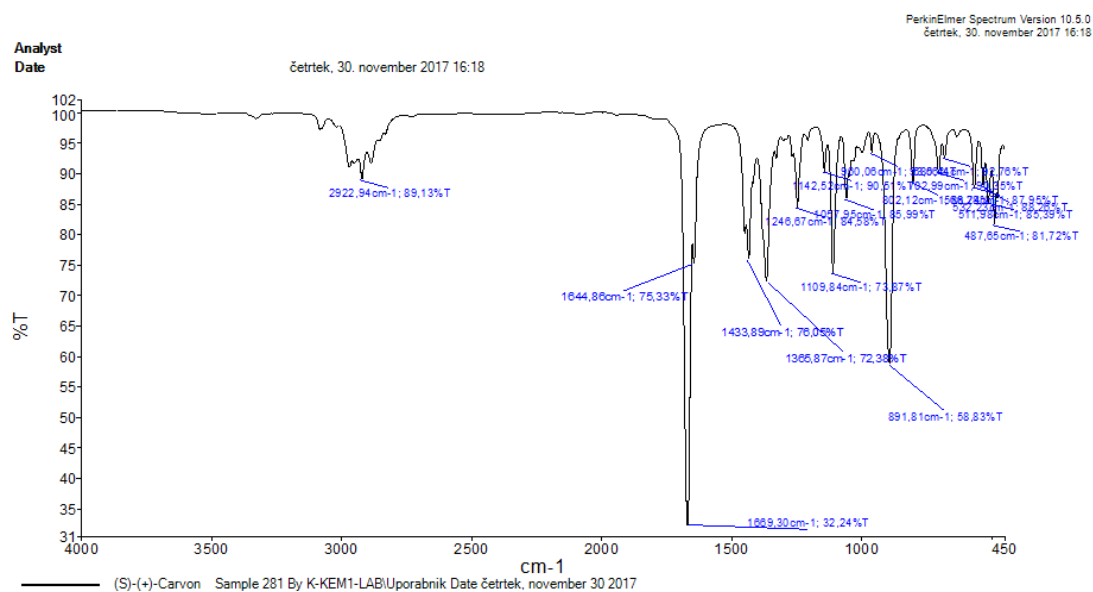
GRAF 15: IR spekter ekstrakta pridobljenega z destilirano vodo



GRAF 16: IR spekter (R)-(+)-limonena



GRAF 17: IR spekter (R)-(-)-karvona



GRAF 18: IR spekter (S)-(+)-karvona

PRILOGA 2 – MERITVE INHIBICIJSKIH CON

TABELA 16: Premeri inhibicijskih con na *E. coli* v mm po 24 urah

UČINKOVINA	ŠTEVILKA DISKA	ŠTEVILO PETRIJEVKE		
		1	2	3
LN – čisti parni ekstrakt črne kumine	1	16,93	16,02	16,42
	2	18,45	14,55	16,01
	3	16,77	15,62	16,73
	4	16,65	14,56	13,39
CR – (R)-(-)-karvon	1	17,55	17,47	18,25
	2	16,4	18,54	16,83
	3	16,02	18,56	16,66
	4	15,76	18,6	16,35
CS – (S)-(+)-karvon	1	16,44	18,21	15,8
	2	16,3	17,63	15,46
	3	17,01	16,23	15,46
	4	17,4	16,62	17,84
LR – (R)-(+)-Limonen	1	17,03	16,87	0
	2	16,43	12,51	0
	3	17,26	12,51	0
	4	17,81	11,4	0
CA – kuminaldehid	1	6,59	7,34	7,95
	2	7,27	8,34	6,83
	3	7,44	8,35	8,11
	4	7,4	7,57	8,69
KS – sintetično olje navadne kumine	1	18,63	14,4	15,09
	2	18,05	16,72	13
	3	14,76	14,83	10,45
	4	14,81	14,09	11,71
KN – naravno olje navadne kumine	1	18,44	20,24	17,48
	2	22,14	20,09	19,02
	3	22,9	17,83	19,74
	4	21,36	18,64	19,74
VN – surov parni ekstrakt črne kumine	1	7,85	6,04	8,18
	2	7,85	6	6,74
	3	7,13	6,07	6,32
	4	6,24	5,89	6,13

TABELA 17: Premeri inhibicijskih con na *E. coli* v mm po 48 urah

UČINKOVINA	ŠTEVILO DISKA	ŠTEVILO PETRIJEVKE		
		1	2	3
LN – čisti parni ekstrakt črne kumine	1	18,07	16,81	18,8
	2	18,47	14,9	17,66
	3	19,42	16,28	14,47
	4	17,05	17,79	19,09
CR – (R)-(-)-karvon	1	15,97	15,85	16,58
	2	14,31	16,6	15,48
	3	15,26	14,79	14,42
	4	14,44	17,8	16,26
CS – (S)-(+)-karvon	1	16,35	15,85	14,78
	2	16,22	16,51	14,93
	3	14,28	15,62	14,93
	4	16,97	15,27	17,71
LR – (R)-(+)-Limonen	1	17,31	15,05	0
	2	17,67	10,69	0
	3	15,64	11,86	0
	4	14,62	12,73	0
CA – kuminaldehid	1	7,53	8,22	8,18
	2	7,24	7,1	8,22
	3	8	8,53	8,17
	4	7,45	9,4	8,78
KS – sintetično olje navadne kumine	1	20,34	20,37	16,05
	2	12,97	11,22	17,53
	3	21,2	18,17	16,09
	4	17,2	13,49	20,81
KN – naravno olje navadne kumine	1	20,82	17,96	20,38
	2	19,54	20,04	17,77
	3	16,33	20,03	15,7
	4	20,63	17,24	18,04
VN – surov parni ekstrakt črne kumine	1	7,63	6,44	6,64
	2	7,43	6,06	5,94
	3	6,93	6,15	6,29
	4	6,94	6,9	8,33

TABELA 18: Premeri inhibicijskih con na *E. coli* v mm po 120 urah

UČINKOVINA	ŠTEVILO DISKA	ŠTEVILO PETRIJEVKE		
		1	2	3
LN – čisti parni ekstrakt črne kumine	1	17,63	15,14	17,11
	2	19,08	16,63	15,98
	3	19,08	16,6	16,37
	4	16,72	16,94	18,45
CR – (R)-(-)-karvon	1	17,53	18,79	18,35
	2	19,91	18,05	18,87
	3	17,12	17,14	17,07
	4	18,74	16,76	18,38
CS – (S)-(+)-karvon	1	19,86	15,7	18,43
	2	19,29	15,22	18,59
	3	17,25	16,42	18,75
	4	18,66	18,31	17,81
LR – (R)-(+)-Limonen	1	14,01	17,27	0
	2	11,56	16,19	0
	3	12,92	16,63	0
	4	12,06	14,64	0
CA – kuminaldehid	1	0	0	0
	2	0	0	0
	3	0	0	0
	4	0	0	0
KS – sintetično olje navadne kumine	1	1,59	18,34	16,03
	2	19,57	20,89	14,76
	3	13,14	14,6	15,3
	4	17,44	20,71	16,65
KN – naravno olje navadne kumine	1	18,75	6,83	12,2
	2	16,71	6,97	12,83
	3	18,97	9,03	9,04
	4	17,56	7,25	10,01
VN – surov parni ekstrakt črne kumine	1	6,41	7,41	6,43
	2	5,4	6,67	5,91
	3	6,09	6,77	6,21
	4	7,13	7,11	5,72

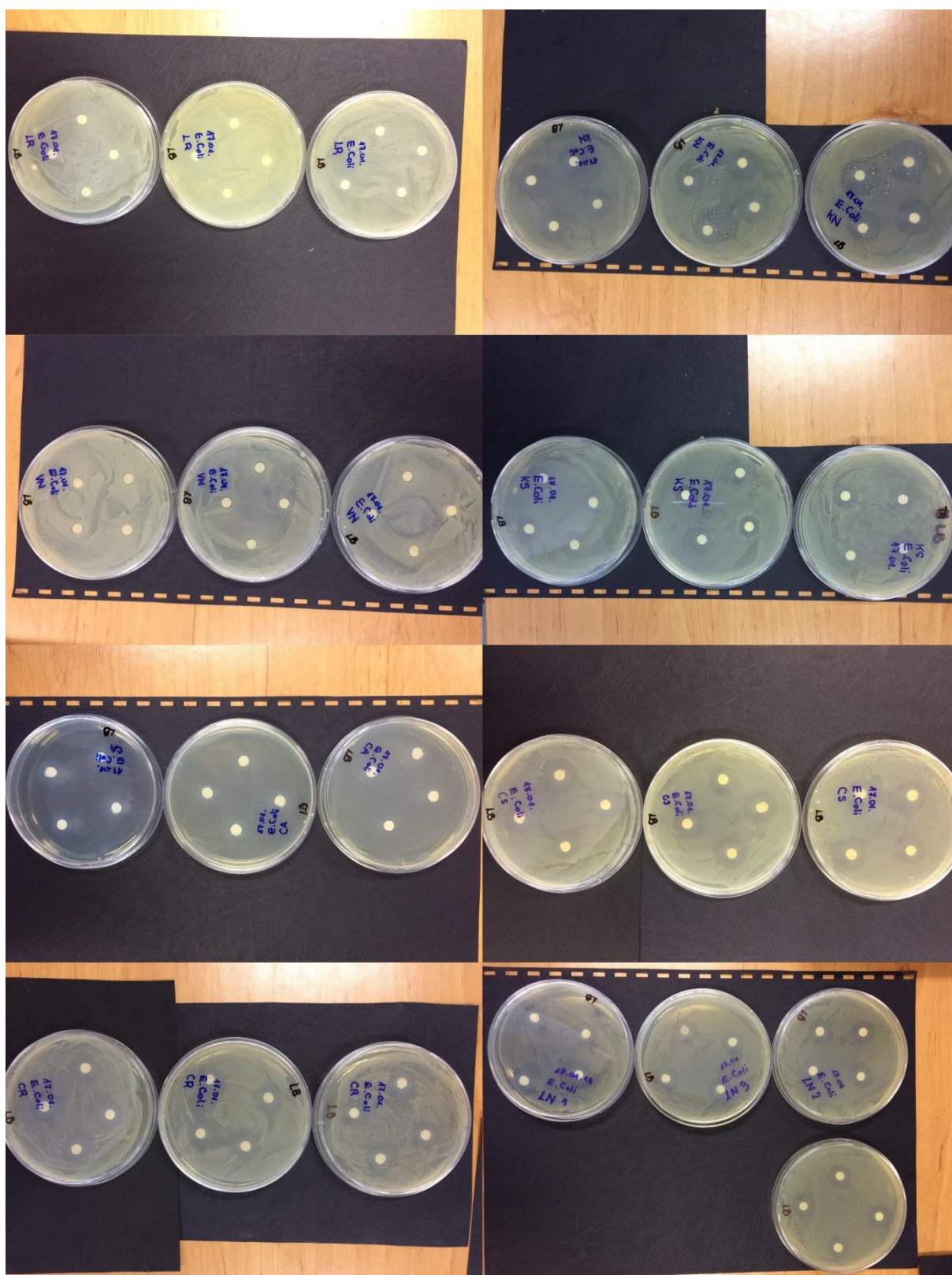
TABELA 19: Premeri inhibicijskih con na *B. cereus* v mm po 24 urah

UČINKOVINA	ŠTEVILO DISKA	ŠTEVILO PETRIJEVKE	
		1	2
LN – čisti parni ekstrakt črne kumine	1	18,52	14,15
	2	19,62	15,73
	3	19,24	20,72
	4	20,72	16,27
CR – (R)-(-)-karvon	1	16,61	17,24
	2	16,38	17,18
	3	15,36	17,94
	4	16,52	18,39
CS – (S)-(+)-karvon	1	15,27	13,25
	2	15,04	14,05
	3	15,94	16,7
	4	18,91	14,4
LR – (R)-(+)-Limonen	1	6,51	7,73
	2	8,41	10,67
	3	8,82	6,5
	4	7,82	10,04
CA – kuminaldehid	1	0	0
	2	0	0
	3	0	0
	4	0	0
KS – sintetično olje navadne kumine	1	9,93	9,26
	2	12,99	11,99
	3	12,53	14,56; 10,03
	4	15,05	9,74
KN – naravno olje navadne kumine	1	16,35	13,6
	2	15,01	13,69
	3	21,91	12,36
	4	16,99	13,68
VN – surov parni ekstrakt črne kumine	1	0	0
	2	0	0
	3	0	0
	4	0	0

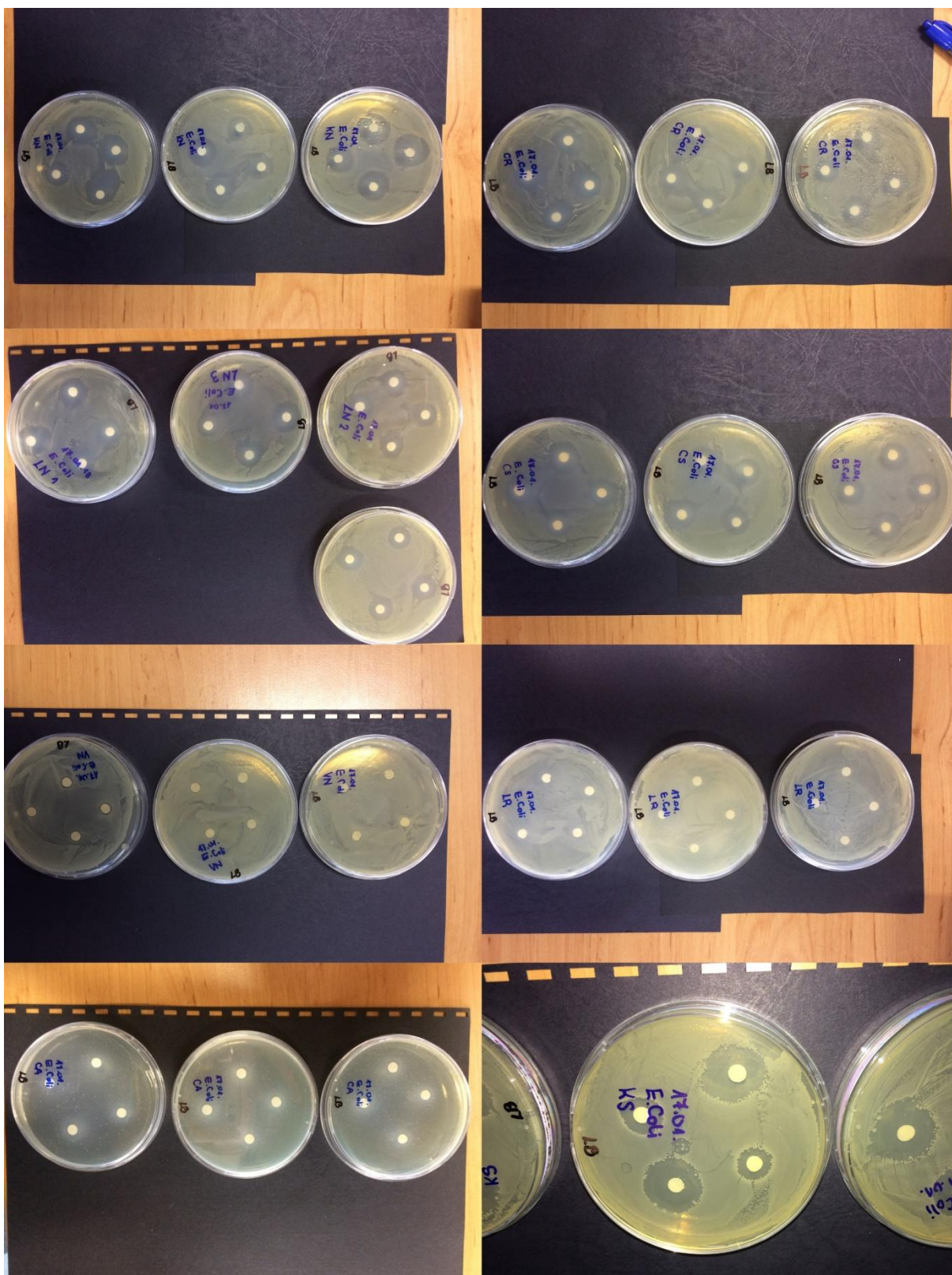
TABELA 20: Premeri inhibicijskih con na glivah kvasovkah v mm po 48 urah

UČINKOVINA	ŠTEVILO DISKA	ŠTEVILO PETRIJEVKE		
		1	2	3
LN – čisti parni ekstrakt črne kumine	1	9,55	9,08	9,7
	2	10,03	14,79	7,8
	3	11,91	9,08	9,28
	4	8,56	11,33	9,35
CR – (R)-(-)-karvon	1	0	0	0
	2	0	0	0
	3	0	0	0
	4	0	0	0
CS – (S)-(+)-karvon	1	0	0	0
	2	0	0	0
	3	0	0	0
	4	0	0	0
LR – (R)-(+)-Limonen	1	15,16	13,83	22,65; 28,08
	2	15,73; 20,46	27,28; 19	15,57
	3	25,46; 19	21,36; 17,87	24,22; 14,98
	4	23,74; 16,51	15,94	23,52; 20,66
CA – kuminaldehid	1	0	0	0
	2	0	0	0
	3	0	0	0
	4	0	0	0
KS – sintetično olje navadne kumine	1	20,3; 18,76	20,99; 20,12	21,10; 17,79
	2	18,25; 20,82	22,02; 23,36	18,8; 21,76
	3	23,19; 18,35	18,03; 19,88	14,98; 17,9
	4	23,13; 24,17	20,14; 19,59	20,82; 18,29
KN – naravno olje navadne kumine	1	8,75	12,03	12,33
	2	8,32	13,33	8,56
	3	11,78	11,92	9,5
	4	11	12,84	10,85
VN – surov parni ekstrakt črne kumine	1	9,03	8,4	8,41
	2	8,37	6,98	7,92
	3	8,31	7,4	8,31
	4	8,61	7,87	9,08

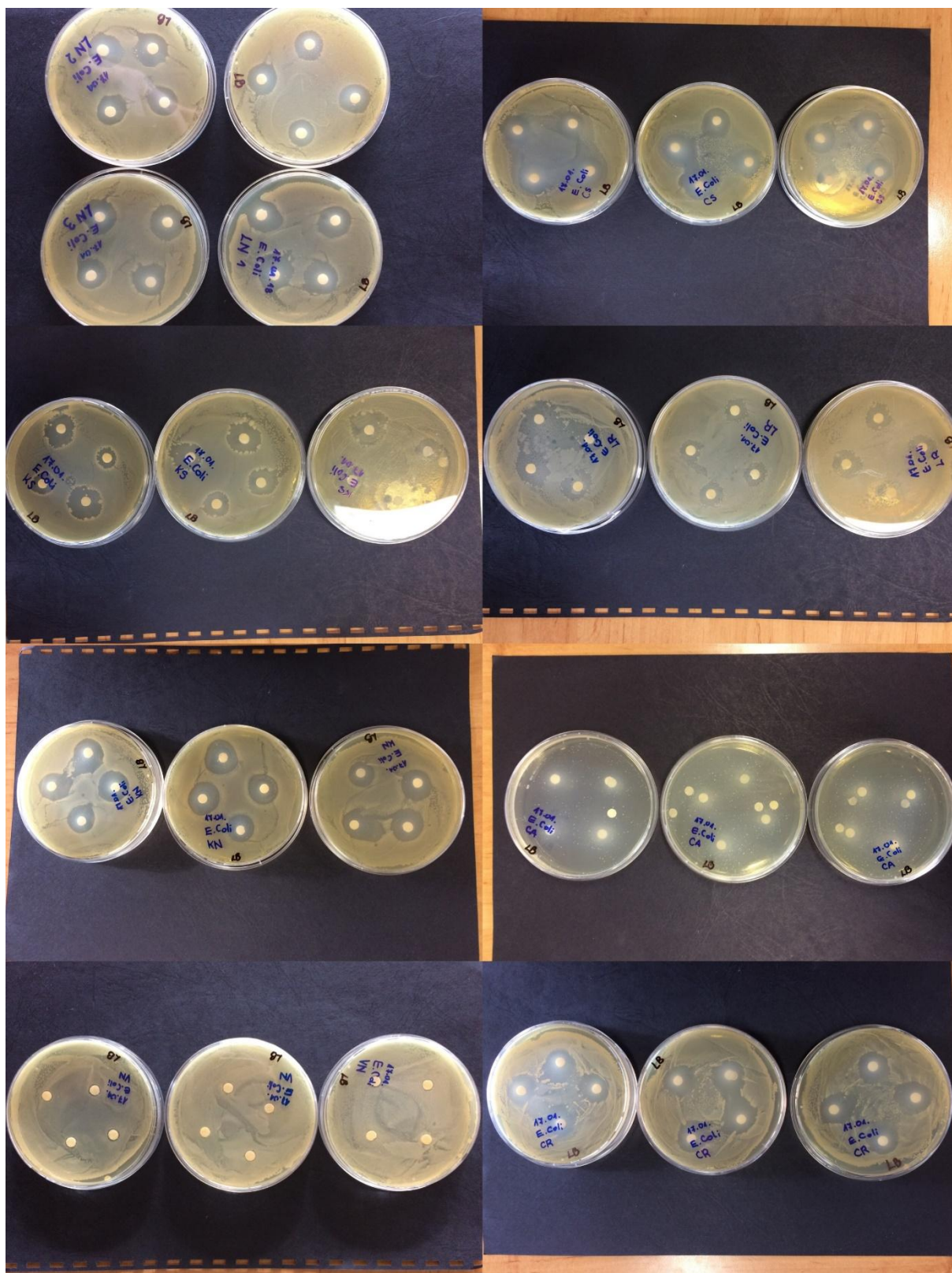
PRILOGA 3 – FOTOGRAFIJE INHIBICIJSKIH CON



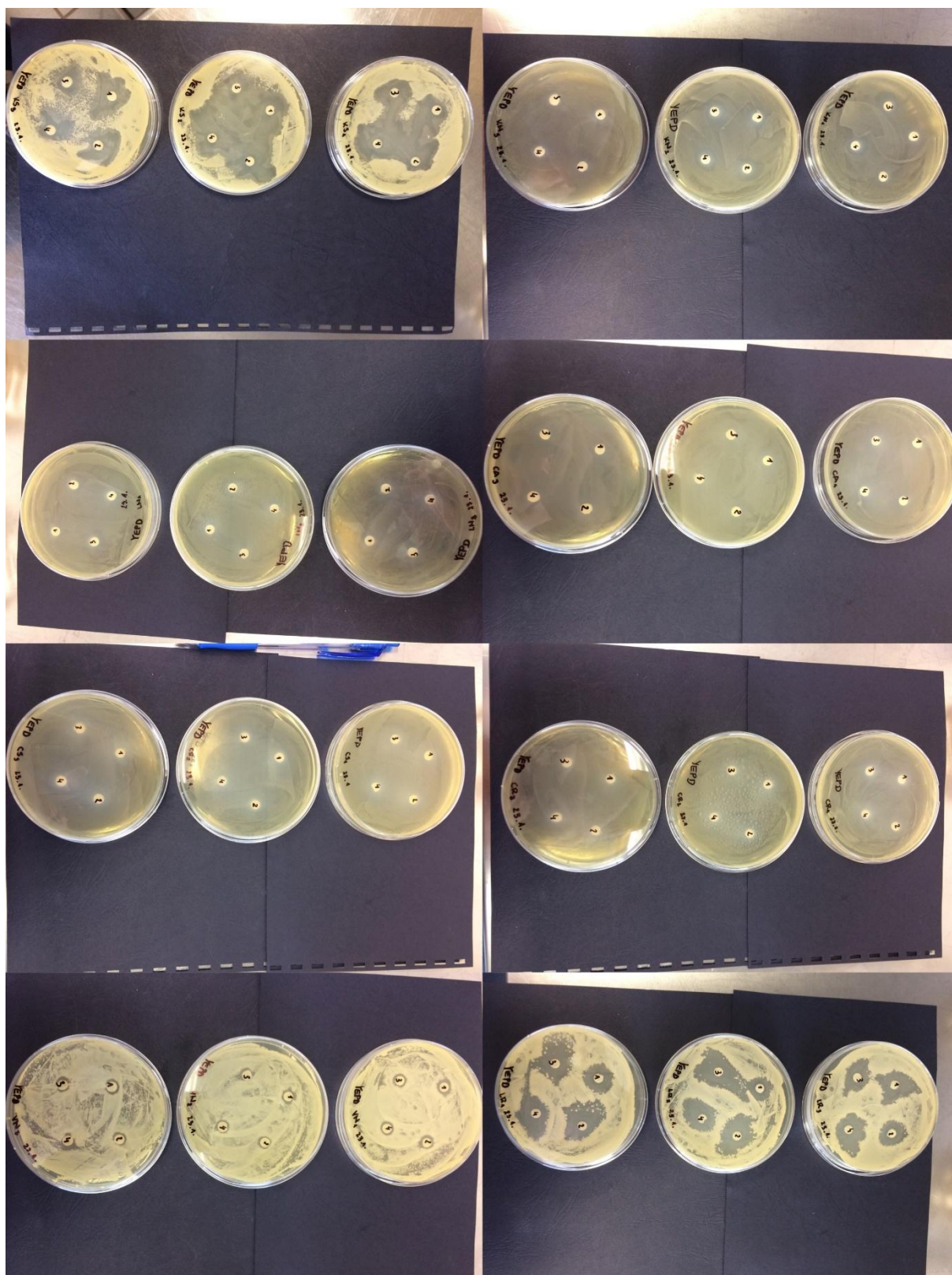
SLIKA 21: Inhibicijske cone na *E. coli* po 24 urah



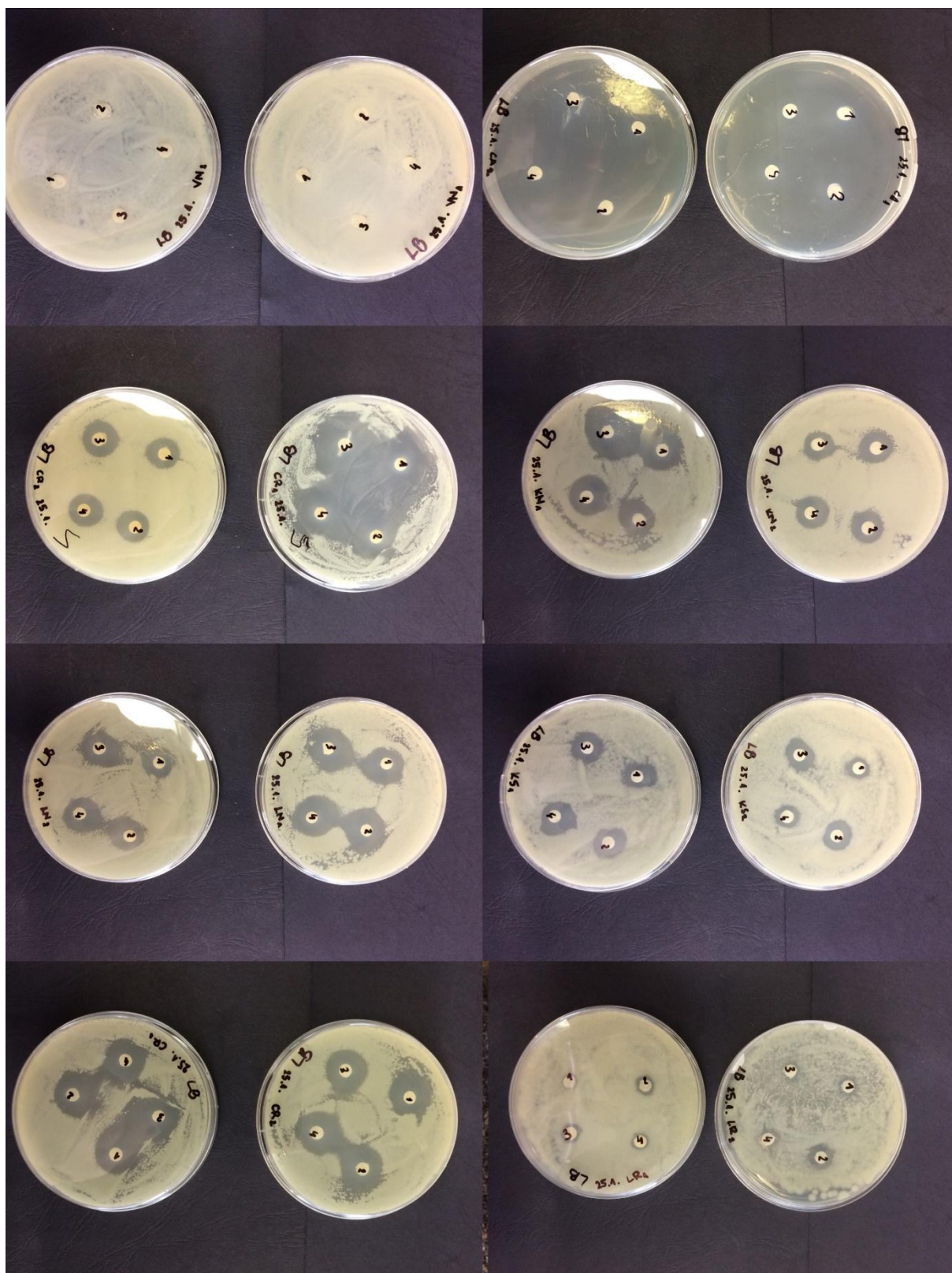
SLIKA 22: Inhibicijske cone na *E. coli* po 48 urah



SLIKA 23: Inhibicijske cone na *E. coli* po 120 urah



SLIKA 24: Inhibicijske cone na glivah kvasovkah po 48 urah



SLIKA 25: Inhibicijske cone na *B. cereus* po 24 urah