

# Utjecaj ekstrakta grmaste glavulje (*Globularia alypum* L.) na klijavost sjemenki i razinu neenzimskih antioksidansa u klijancima rotkvice (*Raphanus sativus* L.) uzgojenima u prisutnosti suviška iona bakra(II)

---

Babić, Andrea

Master's thesis / Diplomski rad

2022

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Pharmacy and Biochemistry / Sveučilište u Zagrebu, Farmaceutsko-biokemijski fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:163:982227>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-07-12**



Repository / Repozitorij:

[Repository of Faculty of Pharmacy and Biochemistry University of Zagreb](#)



**Andrea Babić**

**Utjecaj ekstrakta grmaste glavulje (*Globularia  
alypum* L.) na klijavost sjemenki i razinu  
neenzimskih antioksidansa u klijancima  
rotkvice (*Raphanus sativus* L.) uzgojenima u  
prisutnosti suviška iona bakra(II)**

**DIPLOMSKI RAD**

Predan Sveučilištu u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskom fakultetu

Zagreb, 2022.

Ovaj diplomski rad je prijavljen na Sveučilištu u Zagrebu, Farmaceutsko-biokemijskom fakultetu, na kolegiju Farmaceutska botanika i izrađen na Zavodu za farmaceutsku botaniku, pod stručnim vodstvom doc. dr. sc. Maje Friščić.

*Zahvaljujem svojoj mentorici doc. dr. sc. Maji Friščić na velikoj pomoći, stručnom vodstvu i savjetima te uloženom trudu pri realizaciji ovoga rada.*

*Hvala mojoj obitelji na bezuvjetnoj podršci i mogućnosti studiranja.*

*Hvala mojim prijateljima i kolegama s fakulteta što su bili kraj mene i učinili mi studiranje najljepšim razdobljem.*

# SADRŽAJ

1. UVOD .....	1
1.1. Razvoj i građa sjemenke .....	2
1.2. Klijanje .....	2
1.2.1. Imbibicija vode .....	3
1.2.2. Lag (plato) faza .....	3
1.2.3. Rast i razvoj klijanca .....	3
1.3. Čimbenici koji utječu na klijanje .....	4
1.3.1. Voda .....	4
1.3.2. Temperatura .....	4
1.3.3. Zrak .....	4
1.3.4. Svjetlost .....	4
1.3.5. Slanost tla .....	5
1.4. Predtretman sjemenki .....	5
1.4.1. Hidriranje .....	5
1.4.2. Osmoprimiranje .....	5
1.4.3. Predtretiranje biološkim i kemijskim sredstvima .....	6
1.4.4. Predtretiranje temperaturom .....	6
1.5. Oksidacijski stres .....	6
1.5.1. Reaktivni kisikovi spojevi .....	6
1.5.2. Obrana od oksidacijskog stresa .....	7
1.5.3. Glutation .....	7
1.5.4. Polifenoli .....	8
1.6. Bakar .....	8
1.7. <i>Globularia alypum</i> L. ....	10
1.7.1. Botanička obilježja .....	10
1.7.2. Etnobotanička i komercijalna primjena .....	10
1.7.3. Biološki učinci .....	11
1.7.3.1. Antioksidativni učinak .....	11
1.8. <i>Raphanus sativus</i> L. ....	12
1.8.1. Botanička obilježja .....	12
2. OBRAZLOŽENJE TEME .....	13
3. MATERIJALI I METODE .....	15
3.1. Materijali .....	16
3.1.1. Biljni materijal .....	16
3.1.2. Kemikalije .....	16

3.1.3. Oprema.....	16
3.2. Metode.....	17
3.2.1. Preliminarni pokus za određivanje prikladnih koncentracija otopine CuSO <sub>4</sub> i otopina ekstrakta <i>G. alypum</i> .....	17
3.2.2. Biološki pokus.....	19
3.2.3. Procjena parametara klijavosti.....	20
3.2.4. Priprema homogenata klijanaca.....	21
3.2.5. Metoda određivanja fenola.....	22
3.2.6. Metoda određivanja glutationa.....	24
3.3. Statistička obrada rezultata.....	25
4. REZULTATI.....	26
4.1. Utjecaj različitih koncentracija otopine CuSO <sub>4</sub> i otopine ekstrakta <i>G. alypum</i> na klijavost.....	27
4.2. Klijavost sjemenki.....	28
4.3. Prosječno vrijeme i brzina klijanja.....	30
4.4. Duljina korjenčića.....	30
4.5. Duljina hipokotila.....	32
4.6. Suha masa klijanaca.....	33
4.7. Sadržaj ukupnih fenola.....	34
4.8. Koncentracija reduciranog glutationa (GSH).....	36
5. RASPRAVA.....	38
6. ZAKLJUČCI.....	42
7. LITERATURA.....	44
8. SAŽETAK / SUMMARY.....	52
9. TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA / BASIC DOCUMENTATION CARD.....	

## **1. UVOD**

## 1.1. Razvoj i građa sjemenke

Sjemenka se razvija iz sjemenog zametka nakon oplodnje, a predstavlja mladu biljku u latentnom stanju. Sastoji se od: klice (embrija), hranjivog osnovnog staničja (endosperma) i sjemene lupine ili ljuske (teste) (Crang i sur., 2018). Klica ili embrij je najvažniji dio sjemenke i nalazi se u endospermu, a razvija se iz oplođene oosfere. Klica se sastoji od jedne ili dviju (i više) supki (kotiledona), klicinog korjenčića i klicinog izdanka na čijem je vrhu klicin pupoljčić. Hipokotil predstavlja donji stabljikasti dio između supki i vrata korjenčića. Dio iznad supki, točnije između supki i prvih listova naziva se epikotil, dok je skup nezrelih, prvih listova klicin pupoljčić (plumula). Endosperm opskrbljuje klicu i mladu biljku hranjivim tvarima, a nastaje spajanjem jezgre spermija sa dvije polarne jezgre u embrijskoj vrećici (Crang i sur., 2018). Hranjive tvari, umjesto u endospermu, mogu kod sjemenki nekih vrsta poput graška biti pohranjene u supkama te endosperma nema (Finch-Savage i Leubner-Metzger, 2006). Sjemenka lupina štiti sjemenku, odnosno klicu, a nastaje iz ovoja sjemenog zametka (integumenta). Unutar sjemene lupine nalaze se pigmenti koji daju karakterističnu boju sjemenkama (Crang i sur., 2018). Također, sjemenka lupina sprječava prerano klijanje sjemenke kontroliranjem ulaska vode u sjemenku, a pri čemu dolazi do njezinog bubrenja i do hidrolize složenih organskih spojeva na jednostavnije spojeve koje klica upija. Upijanjem vode započinje proces klijanja sjemenke, u trenutku kada potencijal rasta klice može savladati otpor koji pruža sjemenka lupina (Debeaujon i sur., 2007).

## 1.2. Klijanje

Klijanje (germinacija) je aktivni rast klice koji, kao što je već rečeno, započinje ulaskom vode u sjemenku, a koja dovodi do hidrolize složenih organskih na jednostavnije spojeve. Svjetlosmeđe sjemenke u usporedbi s tamnosmeđim i crnim sjemenkama propusnije su za vodu, što je povezano i s bržim klijanjem (Debeaujon i sur., 2007). Kada je potencijal rasta klice dovoljan da svlada otpor koju pruža sjemenka lupina, dolazi do njezinog pucanja te izbijanja korjenčića (lat. *radicula*) koji započinje upijati vodu s mineralnim tvarima te se diferencira u glavni korijen. Vanjski uvjeti potrebni da sjemenka proklije jesu zrak, voda, povoljna temperatura, prisutnost ili odsutnost svjetlosti, a unutarnji su zdrava i ne prestara sjemenka (Crang i sur., 2018).

Klijanje se sastoji od tri faze (Finkelstein, 2010):

- Imbibicija vode

- Lag (plato) faza
- Rast i razvoj klijanca

### 1.2.1. Imbibicija vode

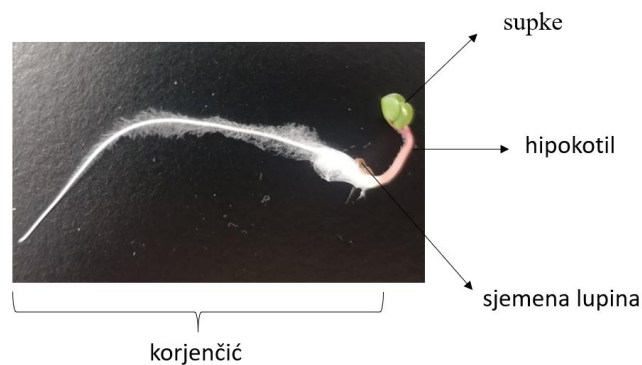
Imbibicija vode je mehanički proces koji podrazumijeva brzi ulazak (apsorpciju) vode u sjemenku odnosno brzo povećanje njezine mase (Finkelstein, 2010). Bez vode proces klijanja nije moguć iako se voda ne raspodjeljuje podjednako kroz sva tkiva sjemenke (Debeaujon i sur., 2007).

### 1.2.2. Lag (plato) faza

U drugoj fazi klijanja dolazi do vrlo malih promjena u masi sjemenke pa se ona zove period platoa ili lag faza. Tijekom ove faze sjemenka se priprema za daljnji rast, dolazi do mobilizacije rezervi hrane, razvijaju se enzimi te metabolički sustav potreban za rast (Finkelstein, 2010).

### 1.2.3. Rast i razvoj klijanca

U trećoj fazi klijanja ponovno dolazi do povećanog ulaska vode u sjemenku pri čemu dolazi do izduživanja klice te do pucanja sjemenne lupine (i endosperma) i izbijanja (protruzije) korjenčića (Finch-Savage i Leubner-Metzger, 2006). Rezervna hrana koja se skladišti u tkivima sjemenke služi za rast mlade biljke (klijanca), a prije nego što se sva pričuvna hrana iscrpi, mlade biljke postaju sposobne same sintetizirati vlastitu hranu. Zadnja faza je kritična faza u razvoju biljke jer različiti čimbenici mogu potaknuti ili spriječiti njezin daljnji razvoj (Finkelstein, 2010). Slika 1 prikazuje dijelove klijanca.



**Slika 1.** Građa klijanca



### **1.3. Čimbenici koji utječu na klijanje**

Čimbenici koji utječu na klijanje sjemenki dijele se na unutrašnje i vanjske. Unutrašnji čimbenici odnose se na karakteristike same sjemenke (npr. dormantnost, vijabilnost), dok su najvažniji vanjski čimbenici voda, temperatura, zrak (kisik), svjetlost te prisutnost soli (npr. nitrata) i spojeva koji mogu imati alelopatski učinak (alelokemikalija) (Finch-Savage i Leubner-Metzger, 2006).

#### **1.3.1. Voda**

Sve sjemenke za imbibiciju i rast zahtijevaju dovoljnu količinu vode te će većina njih dobro klijeti i u uvjetima prekomjerne količine vode, dok je nekim sjemenkama u takvim uvjetima inhibirano klijanje zbog smanjene propusnosti sjemenne ovojnice za kisik. Upijanjem vode sjemenka bubri te savladava prvu prepreku za rast klice (Bradbeer, 1988).

#### **1.3.2. Temperatura**

Za proces klijanja važan čimbenik je i temperatura. Važna su tri osnovna temperaturna praga: minimum, optimum i maksimum. Pri minimumu i maksimumu moguća je imbibicija, ali neće doći do rasta embrija pa se proces klijanja prekida (Bradbeer, 1988).

#### **1.3.3. Zrak**

Kisik je također bitan čimbenik klijanja. Većina vrsta za proces klijanja zahtijeva određenu količinu kisika te će manje sjemenki proklijati pri nedovoljnim količinama kisika. S druge strane, neke sjemenke ipak bolje kliju pri nižim koncentracijama kisika, što se posebno odnosi na sjemenke koje kliju ispod vode. Koncentracija ugljikovog dioksida veća od optimalne smanjuje klijanje sjemenki (Bewley i Black, 1982).

#### **1.3.4. Svjetlost**

Prisutnost svjetlosti može potaknuti ili odgoditi proces klijanja koji započinje prekidom dormantnosti. Dormantnost je osobina sjemenki koja im omogućuje da miruju dok se ne nađu u povoljnim uvjetima za klijanje. Neke biljke mogu proklijati u uvjetima bez svjetlosti uz dovoljnu količinu vode. S druge strane, vrste poput rotkvice uobičajeno nisu osjetljive na svjetlost, ali u stresnim uvjetima kao što su uvjeti osmotskog stresa mogu postati osjetljive na svjetlost i klijanje im se može smanjiti za 10 %. Također, procesom klijanja može se manipulirati duljinom izloženosti svjetlu (Bewley i Black, 1982).

### **1.3.5. Slanost tla**

Soli su također važan čimbenik klijanja čiji utjecaj ovisi o koncentraciji. Niska koncentracija soli (manja od optimalne) produžuje dormantnost sjemenki, dok koncentracija veća od optimalne ometa klijanje i smanjuje klijavost sjemenki zbog posljedičnog gubitka vode uslijed povećanog nakupljanja soli oko korijena biljke (Johnson i Puthur, 2021).

## **1.4. Predtretman sjemenki**

Predtretman sjemenki je tehnika kojom se aktiviraju različiti procesi u sjemenkama, a kako bi se poboljšala njihova klijavost. Primjerice, povećava se sinteza proteina i proizvodnja ATP-a, dolazi do nakupljanja sterola i fosfolipida te aktivacije antioksidativnih mehanizama. Tehnike predtretiranja sjemena su hidriranje, osmokondicioniranje (osmoprimiranje), matrikondicioniranje, predtretiranje biološkim sredstvima, kemijskim sredstvima i temperaturom, a izbor ovisi o biljnoj vrsti, kao i o morfološkim karakteristikama te fiziologiji sjemena (Paparella i sur., 2015).

### **1.4.1. Hidriranje**

Hidriranje je najstarija metoda predtretiranja, a podrazumijeva predtretman sjemenki destiliranom vodom (potapanje sjemenki u vodu s ili bez prozračivanja) pri optimalnoj temperaturi (obično 5 – 20 °C) te se ne koristi toliko često u usporedbi s ostalim metodama (Paparella i sur., 2015).

### **1.4.2. Osmoprimiranje**

Namakanje sjemenki u otopini niskog osmotskog potencijala karakteristika je osmoprimiranja. Cilj ove tehnike je produžiti potrebno vrijeme za usvajanje vode i tako smanjiti progresivno nakupljanje reaktivnih kisikovih spojeva te oksidaciju membranskih lipida, proteina i nukleinskih kiselina. Za provođenje osmoprimiranja najčešće se kao osmotsko sredstvo koristi polietilenglikol (PEG) različitih molekulskih masa, soli natrija, magnezija i kalija te organske molekule poput manitola i glicerola. Nedostaci ove tehnike su visoki troškovi i upitna sigurnost odlaganja osmotskog sredstva pa je kao alternativa razvijeno matrikondicioniranje (engl. *solid matrix priming*). Za ovu tehniku potreban je čvrsti organski ili anorganski materijal prikladnih svojstava kako bi mogao kontrolirati ulaz vode (Paparella i sur., 2015).

### **1.4.3. Predtretiranje biološkim i kemijskim sredstvima**

Bioprimiranje uključuje dodatak bioaktivnih molekula (npr. fitohormona poput salicilne, apscizinske ili giberelinske kiseline) i mikroorganizama (npr. *Trichoderma* spp., *Enterobacter* spp., *Pseudomonas* spp. i *Bacillus* spp.) u tekući ili kruti materijal sa sjemenkama. Dodatak mikroorganizama poboljšava rast i produkciju fitohormona zbog zajedničkog sinergističkog djelovanja. Kako bi se smanjili gubici i zaštitile sjemenke od patogena, u otopinu za predtretiranje dodaje se kao dezinficijens natrijev hipoklorit (NaOCl) ili klorovodična kiselina, te različiti fungicidi i pesticidi (kemoprimiranje). Osim kemijskih spojeva, za dezinfekciju sjemenki koriste se i prirodni spojevi koji posjeduju antimikrobni učinak poput različitih eteričnih ulja, organskih kiselina i biljnih ekstrakata (Paparella i sur., 2015).

### **1.4.4. Predtretiranje temperaturom**

Predtretiranje različitim temperaturama pokazalo se kao učinkovita tehnika budući da poboljšava klijanje u nepovoljnim vremenskim prilikama. U pravilu su bolji rezultati klijanja postignuti pri niskim temperaturama, iako se tretman pri visokim temperaturama pokazao prikladnim za vrste koje inače kliju u toplijim uvjetima (Paparella i sur., 2015).

## **1.5. Oksidacijski stres**

Oksidacijski stres je pojava uzrokovana neravnotežom između nastajanja reaktivnih kisikovih spojeva (engl. *Reactive Oxygen Species*, ROS) i sposobnosti biološkog sustava da ih ukloni. ROS mogu oštetiti makromolekule, proteine, lipide, ugljikohidrate i DNA, što dovodi do mutacija, inaktivacije membranskih enzima i oksidacije lipoproteina (Čepelak i Dodig, 2003).

### **1.5.1. Reaktivni kisikovi spojevi**

U procesu redukcije molekule kisika nastaju ROS koji uključuju slobodne radikale i neradikalne molekule. Slobodni radikali u vanjskoj ljusci imaju jedan ili više nesparenih elektrona te su visoko reaktivni upravo zbog težnje da spare nespareni elektron. Slobodni radikali nastaju fiziološkim procesima kao posljedica enzimskih reakcija u dišnom lancu i fagocitozi te neenzimskih reakcija kisika s organskim spojevima (Lobo i sur., 2010). Osim u fiziološkim procesima, ROS nastaju i potaknuti čimbenicima iz okoliša kao što su dim cigarete, zračenje ili teški metali. Superoksidni anion radikal ( $\bullet\text{O}_2^-$ ), hidroksilni radikal ( $\bullet\text{OH}$ ) i vodikov peroksid ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) su tri glavne vrste ROS (Birben i sur., 2012).

### 1.5.2. Obrana od oksidacijskog stresa

Antioksidansi su molekule koje mogu neutralizirati višak slobodnih radikala i spriječiti njihove lančane reakcije te se na taj način oduprijeti oksidacijskom stresu. Oni mogu biti različite hidrofilne i hidrofobne molekule, a antioksidansi prisutni u biljkama su uglavnom hidrofilni. Antioksidacijski sustav je složen te se može podijeliti na: primarnu antioksidacijsku obranu koja ometa stvaranje ROS, sekundarnu koja nastoji neutralizirati slobodne radikale i spriječiti njihove daljnje lančane reakcije te tercijarnu koja uklanja oštećene makromolekule (Haida i Hakiman, 2019).

Antioksidansi se mogu podijeliti na enzimске i neenzimске antioksidanse. Enzimski antioksidansi imaju točno određeni supstrat na koji djeluju, dok neenzimski nisu toliko specijalizirani. Superoksid dismutaza, katalaza i glutation peroksidaza spadaju u skupinu enzimskih antioksidansa, dok neenzimске čine, primjerice, polifenoli, flavonoidi, vitamin C i  $\alpha$ -lipoična kiselina (hidrofilni) te karotenoidi, tokoferoli, vitamin K, ubikinon i fosfolipidi (hidrofobni) (Haida i Hakiman, 2019).

### 1.5.3. Glutation

Glutation je najvažniji neenzimski antioksidans niske molekulske mase (Forman i sur., 2009) i najzastupljeniji neproteinski tiol u eukariotskim stanicama. On omogućuje detoksifikaciju egzogenih i endogenih tvari, ima ulogu u staničnom rastu i razvoju, održava stanične membrane te je važan u sintezi proteina i nukleinskih kiselina (Świergosz-Kowalewska i sur., 2006). Još jedan način na koji glutacion štiti stanice od oksidansa je recikliranjem antioksidansa dobivenih iz prehrane, vitamina C (askorbinske kiseline) i E ( $\alpha$ -tokoferola).

Glutation je tripeptid koji u svom sastavu sadrži glicin, cistein i glutaminsku kiselinu. Sulfhidrilna skupina ( $-SH$ ) cisteina sudjeluje u reakcijama redukcije i konjugacije koje su važne za uklanjanje peroksida i ksenobiotika (Forman i sur., 2009). Ovisno o njezinoj prisutnosti/odsutnosti, pojavljuje se u dva stanja, reduciranom (GSH) i oksidiranom (GSSG). Oksidirani glutacion su zapravo dvije molekule glutaciona povezane preko atoma sumpora. U stanicama se glutacion uglavnom nalazi u reduciranom obliku, a za održavanje homeostaze bitan je omjer između dva navedena oblika. Omjer GSH/GSSG  $> 100$  prisutan je u zdravim stanicama u mirovanju, a kod oksidacijskog stresa taj omjer pada na 1 do 10 (Pizzorno, 2014). Prilikom doniranja elektrona slobodnim radikalima, sama sulfhidrilna skupina postaje reaktivna te reagira s drugom molekulom GSH pri čemu nastaje GSSG. Enzim glutacion reduktaza uz NADPH omogućuje regeneraciju oksidiranog GSSG u reducirani GSH.

Glutation u biljkama služi kao glavni spremišni i transportni oblik neproteinskog reduciranog sumpora te je ujedno i multifunkcionalni metabolit (Noctor i sur., 2002).

#### **1.5.4. Polifenoli**

Polifenoli su biljni sekundarni metaboliti podijeljeni u četiri glavne skupine: fenolne kiseline, flavonoide, tanine i stilbene. Građeni su od jednog ili više aromatskih prstenova s jednom ili više hidroksilnih skupina. Doprinosu zaštiti biljke od patogena (bakterija, gljivica, insekata) te posjeduju antioksidativni učinak (Leri i sur., 2020).

Flavonoidi su najzastupljeniji metaboliti iz skupine polifenola. Strukturno su građeni od 15 ugljikovih atoma raspoređenih u tri prstena (C6-C3-C6). Kao antioksidansi mogu djelovati na sljedeće načine: hvatanjem slobodnih radikala, keliranjem metalnih katalizatora (Fe, Cu, Zn, Mg), redukcijom alfa-tokoferoksil radikala, aktivacijom antioksidacijskih enzima i inhibicijom oksidaza (Heim i sur., 2002).

#### **1.6. Bakar**

Bakar je mikroelement koji ima značajnu ulogu u biljkama. Pri niskim koncentracijama sudjeluje u procesima metabolizma i rasta stanica, fotosintezi (kao sastavni dio proteina plastocijanina), sintezi klorofila te u biokemijskim procesima kao kofaktor enzima zbog svoje mogućnosti primanja i otpuštanja elektrona, a sudjeluje i u elektronskom transportnom lancu u mitohondrijima te neutralizira oksidacijski stres u biljkama budući da je strukturni element metaloproteina koji sudjeluju u oksidativnom odgovoru. U prirodi se javlja u dva valentna stanja, jednovalentnom (+1) i dvovalentnom (+2). Jednovalentni bakar se veže na molekule s tiolnom ili tioeterskom skupinom, a dvovalentni prvenstveno na one koje u svojoj strukturi imaju kisik ili imidazol (Mir i sur., 2021).

U koncentracijama većim od optimalne bakar je toksičan te može dovesti do nakupljanja reaktivnih kisikovih spojeva (Sharma i sur., 2019). Ovisno o biljci, optimalne koncentracije za rast biljke kreću se od 1 do 5  $\mu\text{g/g}$ , a veće koncentracije od 20 do 30  $\mu\text{g/g}$  mogu biti toksične (Kumar i sur., 2021). Njegov suvišak ometa važne fiziološke procese u biljkama, smanjuje fotosintezu, mijenja membranski integritet i enzimsku aktivnost te tako ometa klijanje i rast biljke (Shabbir i sur., 2020). Uglavnom se nakuplja u korijenu odakle se prenosi u izdanke stoga smanjuje rast korijena i proliferaciju korijenovih dlačica (Kumar i sur., 2021). Zbog dvojne uloge bakra u biljkama ključna je njegova homeostaza. U Tablici 1 sažeto su prikazani učinci bakra na biljku ovisno o njegovoj preniskoj/previsokoj koncentraciji (Mir i sur., 2021). Neki

enzimski i neenzimski antioksidansi kao što su superoksid dismutaza i glutathion peroksidaza odnosno glutathion, askorbinska kiselina, fenoli, tokoferol i fitokelatini mogu neutralizirati ROS izazvane toksičnim dozama bakra (Kumar i sur., 2021).

**Tablica 1.** Učinci nedostatka i suviška bakra na biljku (Mir i sur., 2021)

<b>NEDOSTATAK BAKRA</b>	<b>SUVIŠAK BAKRA</b>
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Usporen razvoj</li> <li>• Smanjen rast korijena</li> <li>• Smanjeno stvaranje plodova</li> <li>• Kloroza i nekroza</li> <li>• Smanjena fotosinteza i aktivnost enzima</li> <li>• Poremećena sinteza plastocijanina</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Smanjen sveukupni rast i razvoj</li> <li>• Smanjen rast korijena</li> <li>• Smanjena apsorpcija nutrijenata</li> <li>• Kloroza i nekroza</li> <li>• Inhibicija fotosinteze i smanjena produkcija pigmenata</li> <li>• Pojačana sinteza sekundarnih metabolita i fitokelatina*</li> <li>• Pojačana antioksidativna aktivnost</li> <li>• Nakupljanje ROS</li> <li>• Pojačana lipidna peroksidacija (povišena razina malondialdehida (MDA) i reaktivnih spojeva tiobarbiturne kiseline (TBARS))</li> </ul>

\* Fitokelatini su peptidi bogati cisteinom koji se sintetiziraju u biljkama iz glutathiona u prisutnosti teških metala poput kadmija, bakra, cinka, žive i olova te sudjeluju u njihovoj kelaciji i detoksifikaciji (Liu i sur., 2015)

## 1.7. *Globularia alypum* L.

### 1.7.1. Botanička obilježja

*Globularia alypum* L. (hrvatski naziv: grmasta glavulja) predstavnica je roda *Globularia* L. (Plantaginaceae), čije su pripadnice rasprostranjene uglavnom u sredozemnom području, području sjeverne Afrike i južne Europe te na Bliskom istoku (Wagenitz, 2004), a rastu najčešće na otvorenim mjestima, točnije u pukotinama vapnenačkih stijena, na kamenjarima i pašnjacima. U Hrvatskoj navedena vrsta raste na konavoskom području i spada u gotovo ugrožene vrste (Kušan, 1943). Biljka je zimzeleni polugrm ili grm visine do 60 cm. Stabljika je svijetlosivosmeđe boje te može biti uspravna ili prilegnuta s brojnim ograncima. Listovi su kožasti, svijetlozelene do plavičasto zelene boje, duguljastog i usko ovalnog oblika. Mogu biti čitavi ili s dva do tri zubića na vrhu (Tutin, 1972). Mirisni plavičasti (rjetko bijeli) cvjetovi smješteni su terminalno u cvatnim glavicama koje su obavijene kožastim, jajolikim braktejama trepavičasto dlakavog ruba. Cvate jednom do dva puta godišnje, u zimu i proljeće (Kušan, 1943). *Globularia alypum* prikazana je na Slici 2.



**Slika 2.** *Globularia alypum* L. (izvor: powo.science.kew.org)

### 1.7.2. Etnobotanička i komercijalna primjena

Biljke se od još od davnih vremena koriste u prehrani i liječenju različitih bolesti pa se tako i danas mnogi okreću tradicionalnim izvorima unatoč razvoju i učinkovitosti moderne medicine. Vrsta *G. alypum* jedna je od najvažnijih ljekovitih biljaka koje se koriste u tradicionalnoj medicini Alžira. Osim kao antidijabetik, laksativ, stomahik i purgativ, koristi se i kod urinarne inkontinencije i problema s kožom (Asraoui i sur., 2021). U Maroku se kao antidijabetik primjenjuje dekoka listova, a njime se liječe i bolesti mokraćnog mjehura te probavne smetnje, dok se eksterno primjenjuje kod opekline i za zacjeljivanje rana u obliku obloga i praha (Saadi i sur., 2013). Također, primjenjuje se kao digestiv, stimulans, antiseptik,

antimikotik, kod čira na želucu i kožnih neoplazmi (Abouri i sur., 2012). U Libiji se primjenjuje kod različitih upalnih stanja poput gastritisa, metritisa, vaginitisa i dermatitisa te psorijaze i ekcema (El-Mokasabi, 2014).

Danas se na tržištu mogu naći kozmetički pripravci koji sadrže ekstrakt listova, a djeluju protuupalno i namijenjeni su osjetljivoj koži (<https://olival.hr>). Osim za osjetljivu, prikladni su za upaljenu kožu i sluznice ([www.lactacyd.eu](http://www.lactacyd.eu); [www.mychelle.com](http://www.mychelle.com)).

### **1.7.3. Biološki učinci**

Friščić i sur. (2022) su ispitali antidijabetički, protuupalni, antioksidativni, antibakterijski i antikancerogeni učinak grmaste glavulje, a dobiveni rezultati podupiru njezinu primjenu u ljekovite i kozmetičke svrhe. Hajji i sur. (2020) pokazali su da grmasta glavulja može imati pozitivno djelovanje na konstipaciju, dok su Khlifi i sur. (2011) zaključili da navedena vrsta posjeduje potencijal u liječenju tuberkuloze, ali potrebna su daljnja istraživanja. Ekstrakti cvjetova i listova vrste *G. alypum* pokazali su inhibitorno djelovanje na ciklooksigenazu-1 i acetilkolinesterazu te antioksidativni učinak (Amessis-Ouchhemoukh i sur., 2014).

#### **1.7.3.1. Antioksidativni učinak**

Vrsta *G. alypum* posjeduje antioksidativni učinak što je i potvrđeno u brojnim *in vitro* istraživanjima. Ova biljka sadrži veliku količinu antioksidansa koji imaju ključnu ulogu u neutralizaciji slobodnih radikala i suzbijanju oksidacijskog stresa. Za navedeni učinak su najviše odgovorni fenolni spojevi. Sadržaj fenolnih spojeva znatno je povišen u grmastoj glavulji u usporedbi s drugim biljkama koje se koriste u narodnoj medicini u istim indikacijama (Amessis-Ouchhemoukh i sur., 2014).

Asraoui i sur. (2021) odredili su antioksidativni potencijal, kao i sadržaj ukupnih fenola i flavonoida etil acetatnih i kloroformskih ekstrakata listova vrste *G. alypum*. Dobiveni rezultati su pokazali da etil acetatni ekstrakti sadrže veći sadržaj ukupnih fenola i flavonoida te veći antioksidativni potencijal od kloroformskih ekstrakata. Friščić i sur. (2022) također su ispitali antioksidativni potencijal navedene vrste, a dobiveni rezultati su potvrdili dobar antioksidativni učinak metanolnih ekstrakata nadzemnih dijelova u DPPH testu ( $IC_{50} = 17,25 \mu\text{g/mL}$ ). Es-Safi i sur. (2007) su također pokazali visoki antioksidativni potencijal metanolnih ekstrakata nadzemnih dijelova vrste *G. alypum* u uvjetima *in vitro*. U provedenom istraživanju, na temelju DPPH testa pokazalo se da najviši antioksidativni potencijal imaju flavonoidi pa zatim feniletanoidi, dok su iridoidi pokazali umjerenu antioksidativnu aktivnost. Antioksidativni



učinak u uvjetima *in vitro* potvrđen je i u biološkim sustavima, na stanicama HeLa (Mansour i sur., 2012) te na plazmi i eritrocitima miševa (Boussoulim i sur., 2016). Zennaki i sur. (2009) ispitivali su hipoglikemijski i antioksidativni učinak vrste *G. alypum* na dijabetičkim štakorima. Uočeno je povećanje reduciranog glutaciona u jetri, mozgu i bubregu štakora. Također, uočeno je i povećanje aktivnosti enzimskih antioksidansa. Konkretnije, uočena je povećana aktivnost superoksid dismutaze u jetri, mišićima i bubregu, glutacion peroksidaze u jetri, srcu i bubregu te glutacion reduktaze i katalaze u jetri i bubregu.

## **1.8. *Raphanus sativus* L.**

### **1.8.1. Botanička obilježja**

Rotkvica (*Raphanus sativus* L.) pripada porodici krstašica (Brassicaceae) te spada u korjenaste biljke čija boja varira ovisno o geografskom području. Na području Azije je uglavnom bijele boje, a u Europi je uobičajeno crvene boje (Gamba i sur., 2021). Ime roda *Raphanus* dolazi od grčkih riječi *ra* (brzo) i *phainomai* (pojaviti se) zbog brze klijavosti. Rotkvica (Slika 3) je jednogodišnja ili dvogodišnja biljka koja ima zadebljani i sočni hipokotil koji prelazi u pravi korijen, a na njemu se nalazi i stabljika s listovima u rozeti. Listovi su nepravilno nazubljeni i podijeljeni na režnjeve. Cvjetovi su sakupljeni u uspravne cvatove visine do 90 cm. Ocvijeće je sastavljeno od četiri zelena lapa i četiri bijele ili ružičaste do svijetloljubičaste laticice. Plod je glatka i mesnata komuška (powo.science.kew.org).

Rotkvica se odlikuje velikim nutritivnim i ljekovitim potencijalom zahvaljujući sekundarnim metabolitima kao što su glukozinolati, polifenoli i izotiocijanati (Manivannan i sur., 2019). Upravo zbog toga se upotrebljava širom svijeta, a dobar je biljni model za pokus klijanja jer njezine sjemenke brzo kliju te ima povećan korijen i hipokotil koji su pogodni za daljnja istraživanja (Kanjevac i sur., 2022).



**Slika 3.** *Raphanus sativus* L. (izvor: <https://commons.wikimedia.org/wiki>)

## **2. OBRAZLOŽENJE TEME**

Grmasta glavulja (*Globularia alypum* L.) je vazdazeleno trajnica koja pripada porodici Plantaginaceae i raširena je na cijelom području Mediterana. Poznata je po svom antidijabetičkom, laksativnom, purgativnom i antioksidativnom djelovanju. Sadrži sekundarne metabolite poput polifenola i flavonoida koji kao antioksidansi mogu neutralizirati štetne učinke slobodnih radikala.

Cilj ovog rada bio je istražiti utjecaj ekstrakta vrste *G. alypum* na parametre klijavosti sjemenki rotkvice (*Raphanus sativus* L.) i razinu neenzimskih antioksidansa, ukupnih fenola i reduciranog glutaciona, u klijancima rotkvice koji su bili izloženi oksidacijskom stresu u prisutnosti suviška iona bakra(II). Pretpostavka je bila da će primijenjene koncentracije ekstrakta vrste *G. alypum* dovesti do povećanja neenzimskih antioksidansa te imati pozitivan učinak na parametre klijavosti rotkvice u uvjetima oksidacijskog stresa.

### **3. MATERIJALI I METODE**

### 3.1. Materijali

#### 3.1.1. Biljni materijal

- liofilizirani metanolni ekstrakt nadzemnih dijelova vrste *Globularia alypum* L. (Konavoske stijene, 29. 03. 2015.) pripremljen Soxhlet ekstrakcijom 21. 09. 2015. i pohranjen na -20 °C
- sjemenke rotkvice (*Raphanus sativus* L.), sorta „Cherry Belle“ (N Sgaravatti & C Sementi SpA, Pergine Valdarno, Italija; distributer M-KOM, Zagreb, Hrvatska)

#### 3.1.2. Kemikalije

- bakrov(II) sulfat,  $\text{CuSO}_4$ , p.a.  $\geq 99.0\%$  (Kemika, Zagreb, Hrvatska)
- destilirana voda
- dikalijev hidrogenfosfat,  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ , p.a. (Lach-Ner, Neratovice, Češka)
- etilendiamintetraoctena kiselina, EDTA (Sigma Chemical Co, St. Louis, SAD)
- Folin-Ciocalteuov reagens (Kemika, Zagreb, Hrvatska)
- galna kiselina, 98 % (Acros Organics, Geel, Belgija)
- kalijev dihidrogenfosfat,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , p.a. (Lach-Ner, Neratovice, Češka)
- metanol,  $\text{CH}_3\text{OH}$ , p.a. (Carlo Erba, Emmendingen, Njemačka)
- natrijev karbonat dekahidrat,  $\text{Na}_2\text{CO}_3 \times 10 \text{H}_2\text{O}$ , p.a. (Kemika, Zagreb, Hrvatska)
- 5,5'-ditiobis-2-nitrobenzojeva kiselina, DTNB (Sigma Chemical Co, St. Louis, SAD)
- trikloroctena kiselina, TCA, p.a. (Lach-Ner, Neratovice, Češka)

#### 3.1.3. Oprema

- automatske mikropipete (Gilson, Middleton, SAD)
- centrifuga, Ohaus Frontier 5706 (Ohaus, Greifensee, Švicarska)
- laboratorijsko posuđe (staklene čaše i odmjerne tikvice različitih volumena, stakleni štapić, epruvete, lijevak i Petrijeve zdjelice, kvarcna kiveta i mikrokiveta, metalna pinceta i špatula, porculanski tarionik s pistilom)
- magnetska miješalica, Hotplate Stirrer (Witeg, Wertheim, Njemačka)
- miješalica (vorteks), Heidolph Reax top (Heidolph Instruments, Schwabach, Njemačka)

- pH metar, Mettler Toledo F20 (Mettler Toledo, Zagreb, Hrvatska)
- potrošni materijal (filter papir, Pasteurove pipete, Eppendorf epruvete, Falcon epruvete, staničevina, parafilm, aluminijska folija)
- precizna analitička vaga, PB303 Delta Range (Mettler Toledo, Columbus, SAD)
- suhi sterilizator, TMA (Termo-medicinski aparati, Dugo selo, Hrvatska)
- UV-Vis spektrofotometar, T70 (PG Instruments Ltd, Lutterworth, UK)

## 3.2. Metode

### 3.2.1. Preliminarni pokus za određivanje prikladnih koncentracija otopine CuSO<sub>4</sub> i otopina ekstrakta *G. alypum*

#### Priprema otopina CuSO<sub>4</sub>

Otopina CuSO<sub>4</sub> pripremljena je vaganjem 0,032 g CuSO<sub>4</sub> u staklenoj čaši i otapanjem u malo destilirane vode uz kratko miješanje na magnetskoj miješalici, a potom je kvantitativno prenesena Pasteurovom pipetom u odmjernu tikvicu od 10 mL. Tikvica je nadopunjena destiliranom vodom do oznake i promućkana, pri čemu je dobivena 0,02 M otopina. Masa odvage CuSO<sub>4</sub> izračunata je preko formule  $m = c \times M \times V$ . Preostale tri koncentracije otopine CuSO<sub>4</sub> (0,01, 0,005, 0,0025 M) pripremljene su kao dvostruka serijska razrjeđenja na način da je uzeto 5 mL prve otopine koja je razrijeđena s vodom do 10 mL i tako još dva puta (Slika 4).



**Slika 4.** Otopine CuSO<sub>4</sub> različitih koncentracija

#### Priprema otopina ekstrakta *G. alypum*

Otopina ekstrakta vrste *G. alypum* pripremljena je vaganjem 250 mg liofiliziranog metanolnog ekstrakta *G. alypum* u epruveti Eppendorf tipa od 2 mL, čemu je dodan 1 mL destilirane vode te je nakon kratkog miješanja na vorteksu otopina kvantitativno prenesena mikropipetom u odmjernu tikvicu od 5 mL kako bi konačna koncentracija bila 50 000 µg/mL.

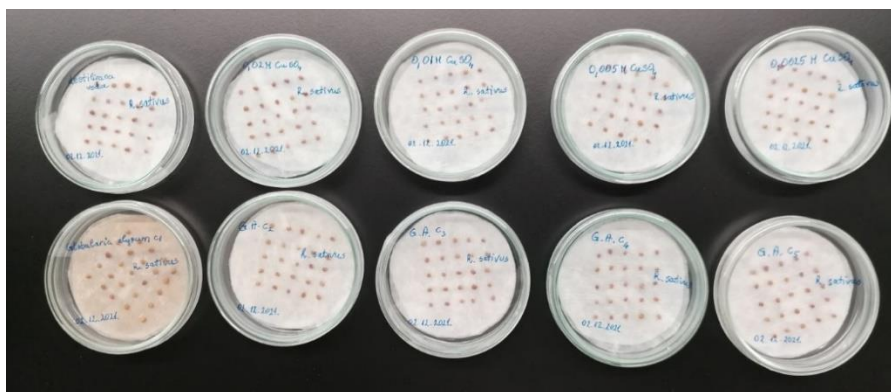
Masa odvage izračunata je preko formule  $m = \gamma \times V$ . Preostale četiri koncentracije otopine ekstrakta vrste *G. alypum* (5 000, 500, 50, 5  $\mu\text{g/mL}$ ) pripremljene su kao deseterostruka serijska razrjeđenja tako da je uzet 1 mL početne otopine koji je razrijeđen destiliranom vodom do oznake u odmjerne tikvici od 10 mL i tako redom još tri puta (Slika 5).



**Slika 5.** Otopine ekstrakta vrste *G. alypum* različitih koncentracija

#### Provođenje preliminarnog pokusa

U 10 Petrijevih zdjelica postavljen je dvostruki filter papir te je u svaku od njih posloženo 25 sjemenki rotkvice na međusobnom razmaku od 1 cm. Tretman je proveden na način da je jedna Petrijeva zdjelica s 25 sjemenki rotkvice bila tretirana s 3,5 mL destilirane vode, četiri su bile tretirane s 3,5 mL otopine  $\text{CuSO}_4$  (0,02, 0,01, 0,005 i 0,0025 M), a preostalih pet s 3,5 mL otopine ekstrakta *G. alypum* (50 000, 5 000, 500, 50 i 5  $\mu\text{g/mL}$ ). Tako pripremljene Petrijeve zdjelice obavijene su parafilmom i postavljene na klijanje na prozor na sobnoj temperaturi od  $24 \pm 2$  °C, a na svaku od njih zapisan je datum postavljanja pokusa, ime biljnog modela i koncentracija primijenjene otopine  $\text{CuSO}_4$  ili ekstrakta vrste *G. alypum* (Slika 6). Sjemenke su ostavljene na klijanju tijekom 3 dana, a nakon toga su pažljivo prenesene s filter papira i izmjerena im je duljina korjenčića i hipokotila te izvagana masa suhih klijanaca nakon 3 dana sušenja na sobnoj temperaturi.



**Slika 6.** Sjemenke rotkvice postavljene na klijanje – preliminarni pokus

### 3.2.2. Biološki pokus

#### Priprema 0,005 M otopine CuSO<sub>4</sub>

Za tretman sjemenki rotkvice korištena je 0,005 M otopina CuSO<sub>4</sub>. Pripremljena je vaganjem 0,08 g CuSO<sub>4</sub> u čaši koji je otopljen u destiliranoj vodi i nakon toga kvantitativno prebačen u odmjernu tikvicu od 100 mL te nadopunjen destiliranom vodom do oznake. Masa odvage CuSO<sub>4</sub> izračunata je preko formule  $m = c \times M \times V$ . Pripremljene otopine bakrovog(II) sulfata ostavljene su u hladnjaku tijekom noći.

#### Priprema otopina ekstrakta *G. alypum*

Za provođenje biološkog pokusa priređene su otopine ekstrakta vrste *G. alypum* koncentracije 5 000 (c1), 500 (c2) i 50 µg/mL (c3). Odvagnuto je 0,125 g ekstrakta *G. alypum* u epruvetu Eppendorf tipa, čemu je dodana destilirana voda te je ekstrakt otopljen uz kratko miješanje na vorteksu. Otopina je potom kvantitativno prenesena automatskom mikropipetom u odmjernu tikvicu od 25 mL te nadopunjena vodom do oznake čime je dobivena primarna otopina koncentracije 5 000 µg/mL. Preostale dvije koncentracije priređene su tako da je uzeto 2,5 mL primarne otopine i razrijeđeno destiliranom vodom do oznake u odmjernoj tikvici od 25 mL. Pripremljene otopine ekstrakta vrste *G. alypum* ostavljene su u hladnjaku tijekom noći.

#### Predtretman sjemenki rotkvice

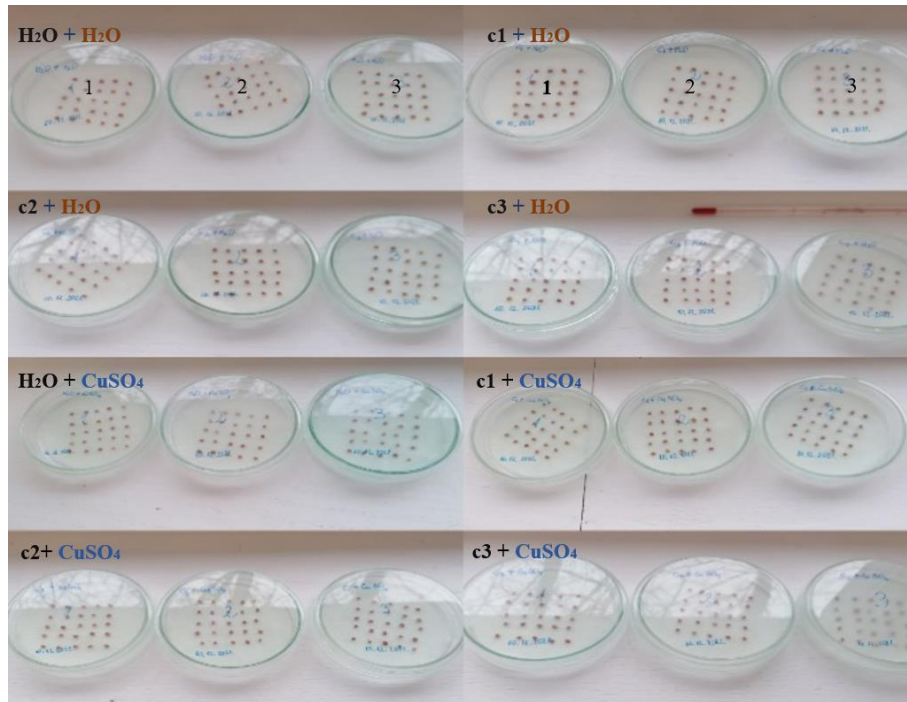
Predtretman sjemenki rotkvice proveden je u staklenim čašama koje su bile prethodno sterilizirane u suhom sterilizatoru na 160 °C tijekom 1 sat. Sjemenke rotkvice (150 – 160 sjemenki) namočene su u 10 mL vode te u tri različite koncentracije ekstrakta *G. alypum* istog volumena. Potom su čaše bile prekrivene aluminijskom folijom te su sjemenke ostavljene da bubre 2 sata na sobnoj temperaturi (21,5 ± 2 °C). Nakon bubrenja sjemenke su osušene na staničevini.

#### Provođenje biološkog pokusa – germinacija

U Petrijeve zdjelice koje su prethodno bile prebrisane etanolom i sterilizirane 1 sat na 160 °C stavljen je dvostruki filter papir, a osušene sjemenke rotkvice (25 sjemenki po Petrijevoj zdjelici) koje su prethodno bile namočene u destiliranoj vodi i različitim koncentracijama ekstrakta *G. alypum* postavljene su na njega u razmaku od 1 cm (5 × 5). Pokus je rađen u tri ponavljanja. Ukupno je trebalo 24 Petrijevih zdjelica budući da je 12 Petrijevih zdjelica istovremeno tretirano s 3,5 mL destilirane vode, a drugih 12 s 3,5 mL 0,005 M otopine CuSO<sub>4</sub>. Petrijeve zdjelice pažljivo su označene tako da je na njih zapisana odgovarajuća kombinacija



predtretmana (H<sub>2</sub>O, c1, c2 ili c3) i tretmana (H<sub>2</sub>O ili CuSO<sub>4</sub>), broj Petrijeve zdjelice (1, 2 ili 3 budući da se radilo u triplikatu) te datum postavljanja sjemenki na klijanje (Slika 7). Radi sprječavanja isparavanja, Petrijeve zdjelice su bile obložene parafilmom te su stavljene na prozor na temperaturu 20 ± 2 °C.



**Slika 7.** Sjemenke rotkvice postavljene na klijanje – biološki pokus

Klijanje je postavljeno te je dnevno praćen broj prokljalih sjemenki, a peti dan nakon postavljanja klijanja (klijanje je trajalo duže u odnosu na preliminarni pokus kako bi se dobili veći klijanca) pokus je prekinut te je mjerena duljina korjenčića i hipokotila klijanaca, kao i masa odvage suhih klijanaca (dva dana nakon sušenja na sobnoj temperaturi).

### 3.2.3. Procjena parametara klijavosti

Osim postotka klijavosti (engl. *germination percentage*, G) matematički su u programu Microsoft Excel izračunati i drugi parametri klijavosti, prosječno vrijeme klijanja izraženo u danima (engl. *mean germination time*, MGT) i prosječna brzina klijanja izražena u danima<sup>-1</sup> (engl. *mean germination rate*, MGR).

$$G = \frac{N}{25} \times 100$$

N – ukupan broj sjemenki koje su prokljale na kraju pokusa

25 – ukupan broj postavljenih sjemenki na početku pokusa

$$\text{MGT} = \frac{\sum n_i \times t_i}{N}$$

$t_i$  – broj proteklih dana od postavljanja pokusa klijanja

$n_i$  – broj sjemenki rotkvice koje su proklijale određeni dan

$N$  – ukupan broj sjemenki koje su proklijale na kraju pokusa

$$\text{MGR} = \frac{1}{\text{MGT}}$$

Prosječna brzina klijanja je prosječan broj proklijalih sjemenki u određenom razdoblju.

### 3.2.4. Priprema homogenata klijanaca

Odvagano je 2,5 g trikloroctene kiseline (TCA) na preciznoj vagi koja je kvantitativno prenesena u odmjernu tikvicu od 50 mL i do oznake nadopunjena destiliranom vodom. Na takav način pripremljena je 5 %-tna otopina TCA.

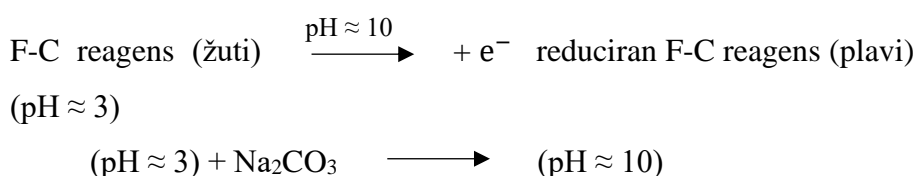
Nakon što je izmjerena masa suhih klijanaca rotkvice, klijanci su prebačeni u tarionik i usitnjeni uz dodatak određenog volumena TCA u manjim obrocima (Slika 8a). Homogenat biljnog tkiva rotkvice pripremljen je tako da je na 100 mg suhe tvari dodan 1 mL 5 %-tne otopine TCA. Pripremljeni homogenat potom je kvantitativno prenesen u epruvetu Falcon tipa. U posljednjem koraku homogenat je centrifugiran 10 minuta na 6 000 okretaja/min (Slika 8b) kako bi se dobio bistar supernatant za određivanje neenzimskih antioksidansa, koji je pipetiranjem prebačen u epruvete Eppendorf tipa (Slika 8c).



**Slika 8.** Koraci pripreme homogenata biljnog tkiva rotkvice: a – homogenizacija, b – centrifugiranje, c – odvajanje supernatanta

### 3.2.5. Metoda određivanja fenola

Za određivanje fenola korištena je spektrofotometrijska Folin-Ciocalteuova metoda. Folin-Ciocalteuov (F-C) reagens je smjesa fosfovolframove i fosfomolibdenske kiseline, a u redoks reakciji dolazi do prijenosa elektrona s fenola na spomenute kiseline i to u lužnatom mediju. Natrijev karbonat osigurava optimalan pH oko 10 za uspješno odvijanje redoks reakcije pri kojoj dolazi do promjene boje reagensa iz žute u plavu budući da u reakciji dolazi do oksidacije fenolnih spojeva te do redukcije F-C reagensa u plavo obojeni volfram- i molibden-oksidi. Mjeri se nastali intenzitet plavog obojenja koji ovisi o broju fenolnih skupina (Carmona-Hernandez i sur., 2021).



#### Priprema otopina reagensa i standarda

Folin-Ciocalteuov reagens razrijeđen je u omjeru 1:10 tako da je u odmjernu tikvicu od 100 mL otpipetirano 10 mL reagensa (2 N) koji je do oznake nadopunjen destiliranom vodom (0,2 N). Na preciznoj vagi izmjereno je 7,5 g natrijevog karbonata dekahidrata u staklenoj čaši. Odvazi je dodano malo destilirane vode te je miješana uz zagrijavanje na magnetskoj miješalici do otapanja. Pripremljena otopina filtrirana je u odmjernu tikvicu od 100 mL i nadopunjena destiliranom vodom do oznake.

Otopina standarda galne kiseline pripremljena je tako da je odvagano 22 mg galne kiseline. Odvaga je otopljena u 1 mL metanola, a potom kvantitativno prenesena u odmjernu tikvicu od 10 mL pri čemu je dobivena otopina početne koncentracije 2200 µg/mL. Razrjeđivanjem navedene otopine galne kiseline metanolom prema formuli  $c_1 \times V_1 = c_2 \times V_2$  do ukupnog volumena od 1 mL pripremljen je koncentracijski niz otopina sljedećih koncentracija: 33, 44, 55, 66, 77, 88, 99 i 110 µg/mL.

Postupak određivanja fenola u ekstraktima klijanaca rotkvice dan je u shematskom prikazu:

SLIJEPA PROBA	UZORAK
2 500 $\mu\text{L}$ destilirane vode	20 $\mu\text{L}$ ekstrakta rotkvice + 230 $\mu\text{L}$ MeOH + 1 250 $\mu\text{L}$ F-C $\xrightarrow{5 \text{ min}}$ 1 mL $\text{Na}_2\text{CO}_3 \times 10 \text{H}_2\text{O}$
<p>Nakon 5 minuta od stavljanja F-C reagensa u prvu epruvetu s uzorkom razrijeđenim 12,5<math>\times</math>, istoj epruveti dodan je 1 mL otopine natrijevog karbonata dekahidrata. Apsorbancija je mjerena na 765 nm na UV-Vis spektrofotometru T70 sat vremena nakon dodatka natrijevog karbonata dekahidrata u prvu epruvetu u programu UVWin5 Software v5.2. Svi uzorci mjereni su u tri ponavljanja s minutom razmaka između pojedinih epruveta (Slika 9).</p> <p>Iz izmjerenih vrijednosti apsorbancija pomoću programa Microsoft Excel nacrtan je baždarni pravac pri čemu su na apscisu bile nanese koncentracije galne kiseline (<math>\mu\text{g}/\text{mL}</math>), a na ordinatu izmjerene vrijednosti apsorbancije pri 765 nm. Koncentracija ukupnih fenola izračunata je prema dobivenoj jednadžbi pravca, a sadržaj fenola izražen je kao mg ekvivalenata galne kiseline (mg EGK)/g suhe tvari.</p>	



**Slika 9.** Pripremljene otopine za određivanje fenola

### 3.2.6. Metoda određivanja glutationa

Spektrofotometrijsko određivanje glutationa temelji se na oksidaciji glutationa u prisutnosti 5,5'-ditiobis-2-nitrobenzojeve kiseline (DTNB) pri čemu DTNB prelazi u spoj žute boje, 2-nitro-5-merkaptobenzojevu kiselinu (TNB) (Ellman, 1959).

#### Priprema 1 M kalij-fosfatnog pufera pH 7,4 i otopine DTNB

Za priređivanje pufera potrebni su  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  i  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ . Masa odvaga potrebnih za pripremu otopina  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  i  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  izračunata je preko formule za množinu tvari ( $n = m/M$ ) kako bi se dobile otopine koncentracije 1 M i volumena 100 mL. Prema izračunu, odvagano je 13,609 g  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  u staklenu čašu. Kako bi se krutina brže otopila, odvaga je miješana magnetskim mješačem u destiliranoj vodi uz zagrijavanje, a dobivena otopina zatim kvantitativno prenesena u odmjernu tikvicu od 100 mL koja je bila do oznake nadopunjena destiliranom vodom. Na isti način pripremljena je i otopina  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ , kojeg je odvagano 17,418 g. Kako bi se priredio 1 M kalij-fosfatni pufer, morale su se pomiješati 1 M otopine  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  i  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  uz korištenje pH metra da bi se dobio pufer pH vrijednosti 7,4. U 100 mL pufera dodana je etilendiamintetraoctena kiselina (EDTA) mase 0,0037 g da bi se spriječila autooksidacija glutationa u uzorku (0,1 mM).

Za priređivanje 1 mM otopine DTNB bilo je potrebno odvagati 0,0396 g. Odvagana masa DTNB-a prenesena je u odmjernu tikvicu od 100 mL te je otopljena uz dodatak pripremljenog 1 M kalij-fosfatnog pufera pH vrijednosti 7,4 i do oznake nadopunjena istim puferom.

Postupak određivanja GSH u ekstraktima klijanaca rotkvice dan je u shematskom prikazu:

SLIJEPA PROBA	UZORAK
100 $\mu\text{L}$ 5 % TCA + 900 $\mu\text{L}$ DTNB (50 $\mu\text{L}$ 5 % TCA + 950 $\mu\text{L}$ DTNB)	100 $\mu\text{L}$ ekstrakta rotkvice + 900 $\mu\text{L}$ DTNB (50 $\mu\text{L}$ ekstrakta rotkvice + 950 $\mu\text{L}$ DTNB)
<p>Na stalak su posložene 72 epruvete tipa Eppendorf te su pripremljene otopine slijepa probe s gore navedenim volumenima. Otopina DTNB dodavana je svake pune minute, a pokus spektrofotometrijskog određivanja sadržaja GSH proveden je u tri ponavljanja. Mjerena je apsorbancija na 412 nm u mikrokiveti 15 minuta nakon dodatka otopine DTNB u prvi uzorak.</p> <p>Dobivene vrijednosti apsorbancije unesene su u program Microsoft Excel te je izračunata koncentracija GSH.</p>	

Koncentracija GSH ( $\mu\text{mol/L}$ ) izračunata je pomoću jednadžbe za Beer-Lambertov zakon

$$A = \varepsilon \times l \times c$$

$$\text{pri čemu je koncentracija GSH} = \frac{\Delta A}{\varepsilon \times l}$$

$\Delta A$  – razlika izmjerene apsorbancije uzorka i slijepe probe na valnoj duljini od 412 nm

$\varepsilon$  – molarni apsorpcijski koeficijent ( $14,15 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ )

$l$  – dužina optičkog puta (1 cm)

### 3.3. Statistička obrada rezultata

Parametri klijavosti i svojstva klijanaca procijenjena su na 25 sjemenki u tri ponavljanja za svaku kombinaciju predtretmana (voda, ekstrakt vrste *G. alypum* u tri različite koncentracije: 5 000, 500 ili 50  $\mu\text{g/mL}$ ) i tretmana (destilirana voda, 0,005 M  $\text{CuSO}_4$ ), a dobiveni rezultati izraženi su kao srednja vrijednost  $\pm$  standardna devijacija. Određivanja sadržaja ukupnih fenola i koncentracije glutaciona provedena su u tri ponavljanja za svaki od 24 pripremljena ekstrakta klijanaca, a dobiveni rezultati izraženi su kao srednja vrijednost  $\pm$  standardna devijacija.

Statistički značajne razlike između uzoraka koji su bili tretirani vodom ili bakrom odnosno predtretirani vodom ili različitim koncentracijama ekstrakta vrste *G. alypum* procijenjene su pomoću jednosmjerne analize varijance (ANOVA), nakon koje je slijedio Dunnetov *post-hoc* test uz razinu značajnosti  $\alpha = 0,05$ . Obrada podataka provedena je pomoću programa GraphPad Prism 6.01 (GraphPad Software, San Diego, SAD) i Excel for Microsoft 365.

## **4. REZULTATI**

Cilj ovog eksperimentalnog rada bio je odrediti utjecaj ekstrakta grmaste glavulje (*Globularia alypum* L.) na klijavost sjemenki i razinu neenzimskih antioksidansa u kljancima rotkvice (*Raphanus sativus* L.) uzgojenima u prisutnosti suviška iona bakra(II). Sjemenke rotkvice prvo su bile predtretirane destiliranom vodom ili različitim koncentracijama otopine ekstrakta grmaste glavulje. Sjemenke su potom bile postavljene u Petrijeve zdjelice na filter papir te tretirane destiliranom vodom (negativna kontrola) ili otopinom 0,005 M CuSO<sub>4</sub>. Nadalje, praćeno je klijanje sjemenki i izračunat % klijavosti te prosječno vrijeme i brzina klijanja, a nakon 5 dana klijanja, izmjerena je duljina korjenčića i hipokotila. Masa suhih kljanaca izvagana je dva dana nakon prekida pokusa klijanja odnosno dva dana nakon sušenja na sobnoj temperaturi te je određen sadržaj ukupnih fenola i koncentracija reduciranog glutaciona u ekstraktima kljanaca rotkvice. Za određivanje fenola korištena je spektrofotometrijska Folin-Ciocalteuova metoda, a za određivanje glutaciona metoda prema Ellmanu. Pokus klijanja proveden je u triplikatu, kao i mjerenja za određivanje parametara oksidacijskog stresa (neenzimskih antioksidansa), a dobiveni rezultati su statistički obrađeni.

#### **4.1. Utjecaj različitih koncentracija otopine CuSO<sub>4</sub> i otopine ekstrakta *G. alypum* na klijavost**

Svi su utvrđeni rezultati duljine korjenčića i hipokotila obrađeni u programu Microsoft Excel, izračunata je srednja vrijednost i standardna devijacija te postotak klijavosti za svaki tretman sjemenki, što je prikazano u Tablici 2, kako bi se mogle odabrati koncentracije otopine ekstrakta *G. alypum* i otopine CuSO<sub>4</sub> za provođenje biološkog pokusa. Izabrana koncentracija CuSO<sub>4</sub> iznosila je 0,005 M, dok su odabrane sljedeće koncentracije otopina ekstrakta vrste *G. alypum*: 5 000, 500 i 50 µg/mL. Odabrana koncentracija CuSO<sub>4</sub> dovela je do djelomične inhibicije rasta korjenčića i hipokotila, ali nije u potpunosti inhibirala klijanje, dok su kao prikladne koncentracije otopine ekstrakta vrste *G. alypum* uzete one koje nisu inhibirale klijavost, a smanjile su negativan učinak bakra(II).

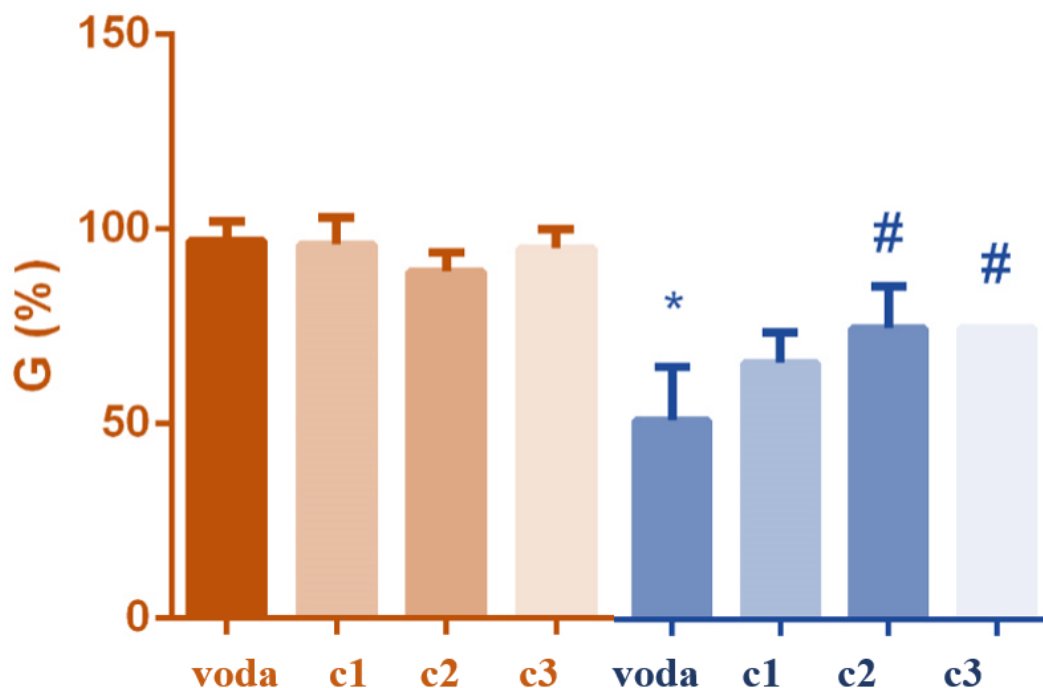


**Tablica 2.** Klijavost sjemenki i svojstva klijanaca rotkvice tri dana nakon postavljanja preliminarnog pokusa

Tretman	Klijavost (%)	Duljina korjenčića (srednja vrijednost ± SD)	Duljina hipokotila (srednja vrijednost ± SD)
50 000 µg/mL <i>G. alypum</i>	40	2 ± 8	4 ± 2
5 000 µg/mL <i>G. alypum</i>	96	26 ± 8	6 ± 1
500 µg/mL <i>G. alypum</i>	96	25 ± 10	6 ± 1
50 µg/mL <i>G. alypum</i>	92	23 ± 8	7 ± 2
5 µg/mL <i>G. alypum</i>	92	20 ± 5	8 ± 1
destilirana voda	92	24 ± 8	5 ± 1
0,02 M CuSO <sub>4</sub>	8	1 ± 0	4 ± 2
0,01 M CuSO <sub>4</sub>	24	2 ± 1	5 ± 2
0,005 M CuSO <sub>4</sub>	72	3 ± 1	6 ± 1
0,0025 M CuSO <sub>4</sub>	88	6 ± 2	6 ± 1

#### 4.2. Klijavost sjemenki

Kao biljni model korištene su sjemenke rotkvice koje su bile predtretirane destiliranom vodom ili različitim koncentracijama ekstrakta vrste *G. alypum* te su bile tretirane destiliranom vodom kao negativnom kontrolom ili otopinom 0,005 M CuSO<sub>4</sub>. Treći dan nakon postavljanja pokusa klijanja promatralo se koliko je sjemenki rotkvice proklijalo i tako naredna dva dana. Slika 8 prikazuje utvrđeni postotak klijavosti sjemenki rotkvice nakon pet dana.



**Slika 10.** Klijavost (%) sjemenki rotkvice koje su bile predtretirane destiliranom vodom ili različitim koncentracijama ekstrakta vrste *G. alypum* (c1 = 5 000 µg/mL, c2 = 500 µg/mL, c3 = 50 µg/mL) te tretirane destiliranom vodom (označeno smeđom bojom) ili otopinom 0,005 M CuSO<sub>4</sub> (označeno plavom bojom) izražena kao srednja vrijednost ± standardna devijacija (n = 3)

Kako je vidljivo na Slici 10, utvrđene su statistički značajne razlike u klijavosti sjemenki rotkvice s obzirom na predtretman (destilirana voda ili različite koncentracije ekstrakta vrste *G. alypum*) i tretman (destilirana voda ili otopina 0,005 M CuSO<sub>4</sub>). Konkretnije, utvrđen je manji postotak klijavosti sjemenki prilikom korištenja tretmana 0,005 M CuSO<sub>4</sub> (52 ± 14 %) u odnosu na tretman destiliranom vodom (97 ± 5 %, p < 0,05). Navedeno upućuje na to kako tretman 0,005 M CuSO<sub>4</sub> smanjuje klijavost sjemenki rotkvice. Nadalje, utvrđene su statistički značajne razlike u klijavosti sjemenki koje su bile predtretirane otopinama ekstrakta vrste *G. alypum* (Ga) koncentracije 500 µg/mL i 50 µg/mL tretirane 0,005 M CuSO<sub>4</sub> (76 ± 11 %, 76 ± 0 %, p < 0,05) u odnosu na predtretman destiliranom vodom, dok statistički značajne razlike u odnosu na negativnu kontrolu nisu bile uočene (89 ± 5 %, 95 ± 5 %, p > 0,05). Rezultati upućuju na to kako navedene koncentracije ekstrakta vrste *G. alypum* povećavaju klijavost sjemenki rotkvice u prisutnosti suviška iona bakra(II). Primjena ekstrakta vrste *G. alypum* koncentracije 5 000 µg/mL nije dovela do statistički značajnog povećanja klijavosti (67 ± 8 %) u tretmanu s bakrom.

### 4.3. Prosječno vrijeme i brzina klijanja

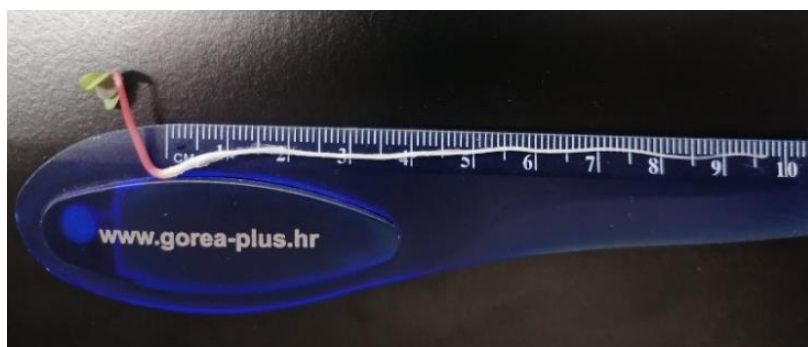
Prosječno vrijeme klijanja (MGT) i prosječna brzina klijanja (MGR) sjemenki rotkvice prikazani su u Tablici 3. Tretman sjemenki rotkvice 0,005 M CuSO<sub>4</sub> statistički značajno je povećao prosječno vrijeme klijanja ( $3,42 \pm 0,28$  dana) u usporedbi s negativnom kontrolom ( $3,09 \pm 0,04$  dana,  $p < 0,05$ ). Predtretman sjemenki različitim koncentracijama ekstrakta vrste *G. alypum* nije statistički značajno skratio prosječno vrijeme klijanja u destiliranoj vodi kao ni u prisutnosti suviška iona bakra(II) ( $p > 0,05$ ). Prosječna brzina klijanja sjemenki rotkvice u prisutnosti 0,005 M CuSO<sub>4</sub> iznosila je  $0,29 \pm 0,02$  dan<sup>-1</sup>, dok je u destiliranoj vodi iznosila  $0,32 \pm 0,00$  dan<sup>-1</sup> ( $p < 0,05$ ).

**Tablica 3.** Prosječno vrijeme klijanja (MGT) i prosječna brzina klijanja (MGR)

	Voda	c1	c2	c3	Voda	c1	c2	c3
<b>MGT</b>	3,09	3,04	3,04	3,00	3,42*	3,33	3,11	3,12
<b>SD</b>	0,04	0,04	0,04	0,00	0,28	0,09	0,06	0,08
<b>MGR</b>	0,32	0,33	0,33	0,33	0,29*	0,30	0,32	0,32
<b>SD</b>	0,00	0,00	0,00	0,00	0,02	0,01	0,01	0,01

### 4.4. Duljina korjenčića

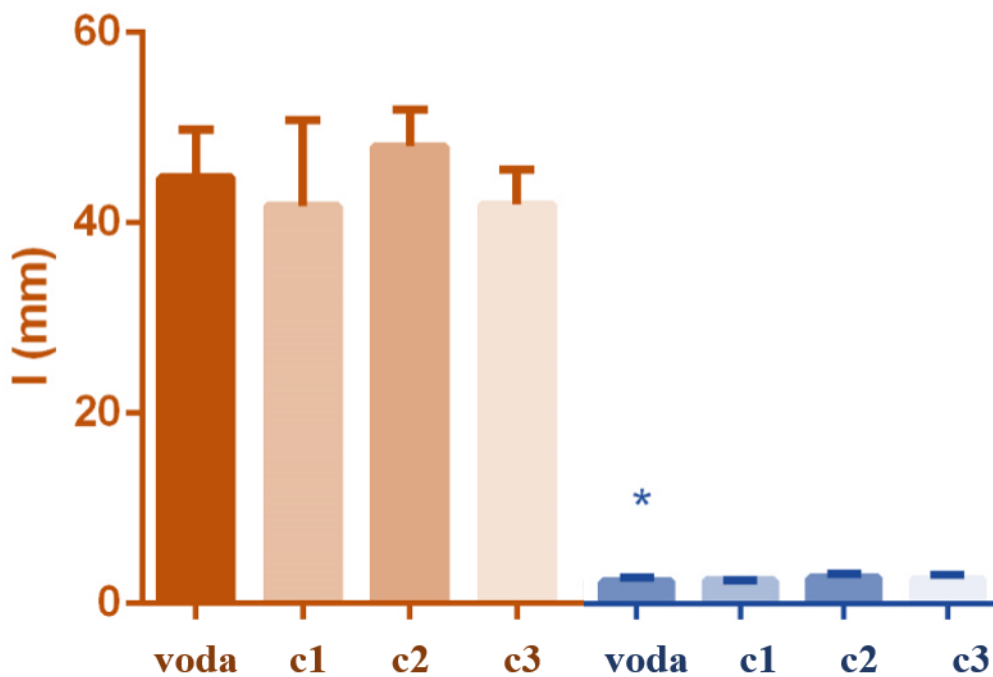
Pet dana nakon postavljanja pokusa klijanja izmjerena je duljina korjenčića klijanaca rotkvice tako da se svaki od njih oprezno izvadio iz Petrijeve zdjelice, pri čemu se odvojio od ljuskica (sjemene lupine) (Slika 11).



**Slika 11.** Mjerenje duljine korjenčića klijanca rotkvice

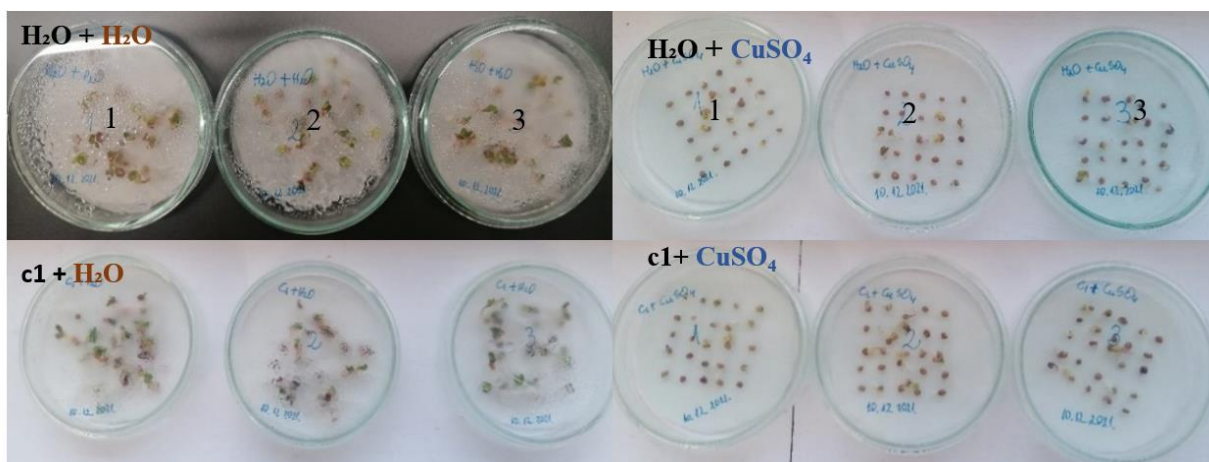
Izmjerene duljine korjenčića prikazane su Slikom 12. Moguće je uočiti kako su najveću duljinu korjenčića imali klijanca rotkvice koji su bili predtretirani ekstraktom grmaste glavulje

koncentracije 500  $\mu\text{g/mL}$  i potom tretirani destiliranom vodom ( $48,04 \pm 3,82$  mm), ali predtretman različitim koncentracijama otopine ekstrakta grmaste glavulje nije doveo do statistički značajnog povećanja vrijednosti duljine korjenčića u odnosu na negativnu kontrolu ( $44,77 \pm 5,03$  mm). Tretman sjemenki 0,005 M otopinom  $\text{CuSO}_4$  značajno je smanjio duljinu korjenčića klijanaca rotkvice ( $2,49 \pm 0,45$  mm) u odnosu na negativnu kontrolu te su kod njega zabilježene najmanje vrijednosti duljine korjenčića koje su bile statistički značajno različite ( $p < 0,05$ ). Uočeno je također da predtretmani primijenjenim koncentracijama otopina ekstrakta grmaste glavulje značajno ne utječu na povećanje vrijednosti duljina korjenčića kod sjemenki rotkvice tretiranih 0,005 M otopinom  $\text{CuSO}_4$ .



**Slika 12.** Duljina korjenčića klijanaca rotkvice (mm) čije su sjemenke bile predtretirane destiliranom vodom ili različitim koncentracijama ekstrakta vrste *G. alypum* (c1 = 5 000  $\mu\text{g/mL}$ , c2 = 500  $\mu\text{g/mL}$ , c3 = 50  $\mu\text{g/mL}$ ) te tretirane destiliranom vodom (označeno smeđom bojom) ili otopinom 0,005 M  $\text{CuSO}_4$  (označeno plavom bojom) izražena kao srednja vrijednost  $\pm$  standardna devijacija ( $n = 3$ )

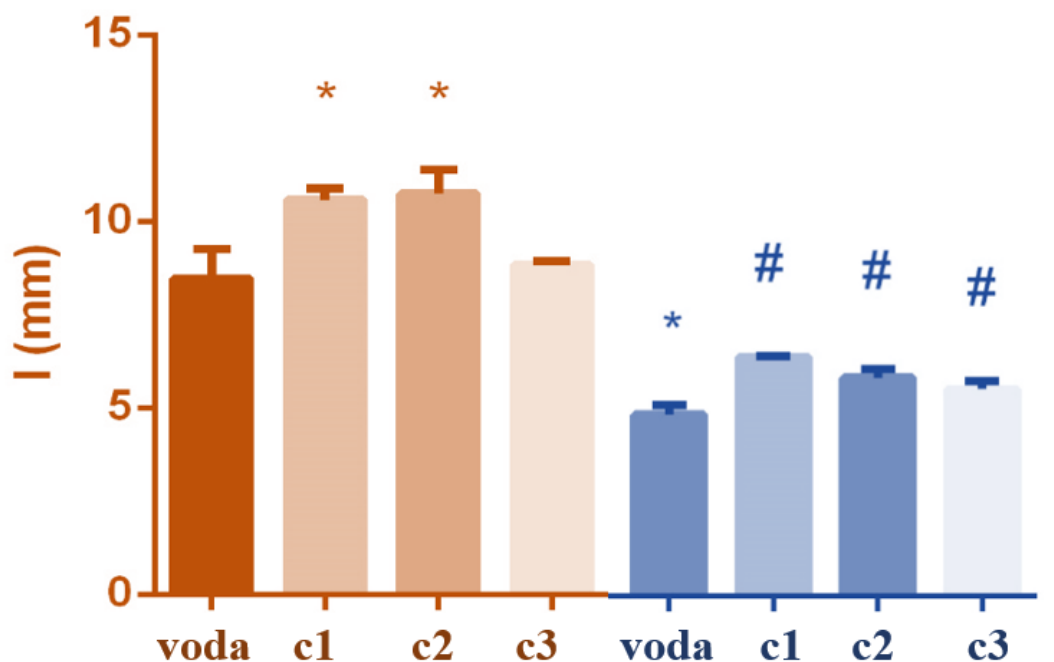
Budući da se pratio proces klijanja uočeno je da su klijanci sjemenki predtretiranih otopinom ekstrakta grmaste glavulje c1 koncentracije i potom tretiranih vodom već treći dan nakon postavljanja pokusa klijanja imali duže i raščupanije korjenčiće u usporedbi s klijancima sjemenki tretiranih otopinom  $\text{CuSO}_4$  (Slika 13).



**Slika 13.** Klijanje rotkvice tri dana nakon postavljanja pokusa klijanja (gore predtretman vodom, dolje predtretman ekstraktom *G. alypum* (c1 = 5 000 µg/mL), lijevo tretman vodom, desno tretman 0,005 M CuSO<sub>4</sub>)

#### 4.5. Duljina hipokotila

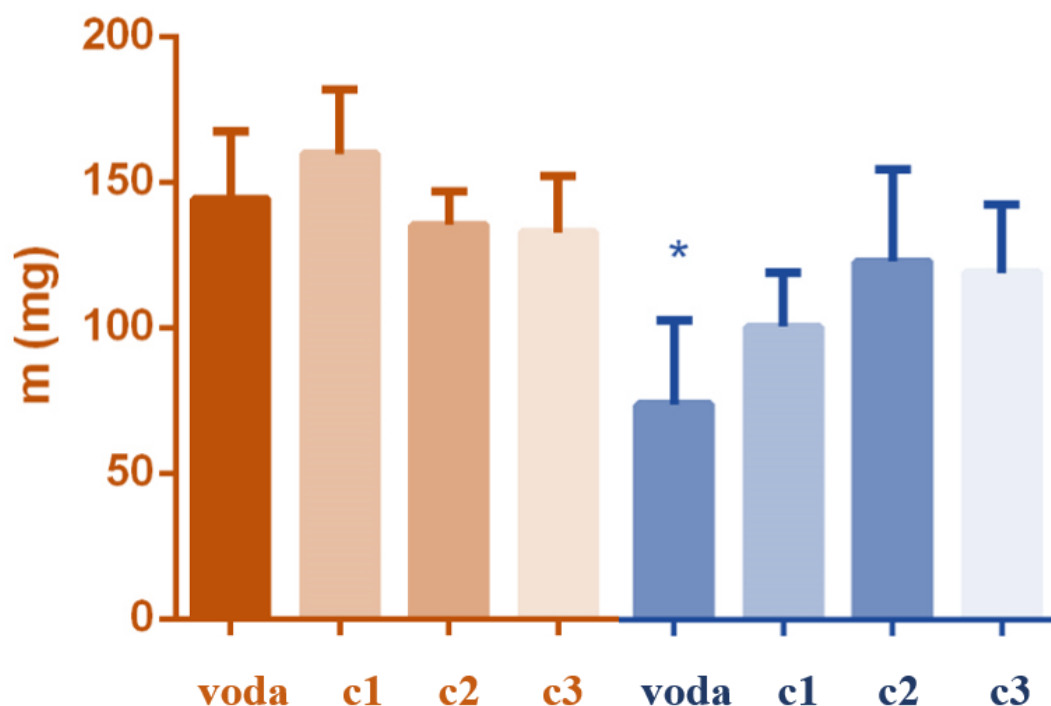
Osim duljine korjenčića mjerila se i duljina hipokotila klijanaca rotkvice, a dobiveni rezultati prikazani su na Slici 14. Moguće je uočiti da su najveću duljinu hipokotila imali klijanje rotkvice čije su sjemenke bile predtretirane dvjema većim koncentracijama otopine ekstrakta *G. alypum* te potom tretirane destiliranom vodom ( $10,58 \pm 0,31$  mm i  $10,75 \pm 0,63$  mm). Nakon petodnevne izloženosti sjemenki rotkvice 0,005 M CuSO<sub>4</sub> došlo je do statistički značajnog smanjenja duljine hipokotila ( $4,90 \pm 0,27$  mm) u odnosu na negativnu kontrolu ( $8,47 \pm 0,78$  mm,  $p < 0,05$ ), a koja je bila statistički značajno veća kod onih sjemenki koje su bile predtretirane svim primijenjenim koncentracijama ekstrakta grmaste glavulje. Uočeno je kako u tretmanu s 0,005 M CuSO<sub>4</sub> najveću duljinu hipokotila imaju klijanje čije su sjemenke prethodno bile uronjene u ekstrakt *G. alypum* 5 000 µg/mL ( $6,46 \pm 0,03$  mm). Takav rezultat se može objasniti smanjenim inhibitornim djelovanjem suviška iona bakra(II) u prisutnosti ekstrakta grmaste glavulje.



**Slika 14.** Duljina hipokotila klijanaca rotkvice (mm) čije su sjemenke bile predtretirane destiliranom vodom ili različitim koncentracijama ekstrakta vrste *G. alypum* (c1 = 5 000 µg/mL, c2 = 500 µg/mL, c3 = 50 µg/mL) te tretirane destiliranom vodom (označeno smeđom bojom) ili otopinom 0,005 M CuSO<sub>4</sub> (označeno plavom bojom) izražena kao srednja vrijednost ± standardna devijacija (n = 3)

#### 4.6. Suha masa klijanaca

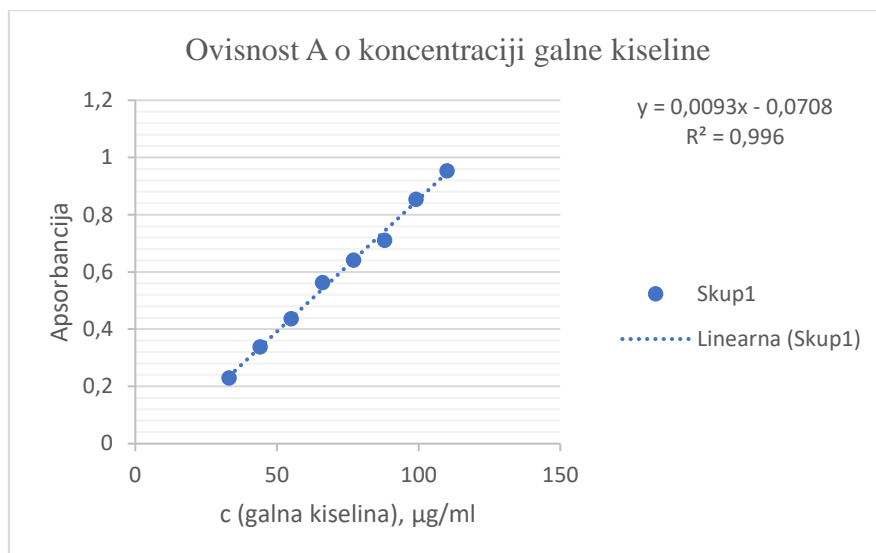
Suha masa klijanaca rotkvice odvagana je nakon određivanja duljine korjenčića i hipokotila, točnije nakon dva dana sušenja na sobnoj temperaturi. Rezultati su prikazani Slikom 15. Iz dobivenih rezultata može se uvidjeti kako kod predtretmana sjemenki rotkvice različitim koncentracijama grmaste glavulje nema statistički značajne razlike u suhoj masi klijanaca u odnosu na negativnu kontrolu (destiliranu vodu) (144,33 ± 23,25 mg). Najveću masu imali su klijanci rotkvice čije su sjemenke bile predtretirane ekstraktom grmaste glavulje koncentracije 5 000 µg/mL te potom tretirane destiliranom vodom (159,67 ± 22,19 mg) ( $p > 0,05$ ). S druge strane, tretman 0,005 M CuSO<sub>4</sub> statistički je značajno smanjio suhu masu klijanaca rotkvice (73,67 ± 28,94 mg). U tretmanu 0,005 M CuSO<sub>4</sub>, kod klijanaca rotkvice čije su sjemenke bile predtretirane ekstraktima grmaste glavulje zabilježena je nešto veća masa, ali navedeno povećanje suhe mase klijanaca nije bilo statistički značajno različito od predtretmana destiliranom vodom.



**Slika 15.** Suha masa klijanaca rotkvice (mg) čije su sjemenke bile predtretirane destiliranom vodom ili različitim koncentracijama ekstrakta vrste *G. alypum* (c1 = 5 000 µg/mL, c2 = 500 µg/mL, c3 = 50 µg/mL) te tretirane destiliranom vodom (označeno smeđom bojom) ili otopinom 0,005 M CuSO<sub>4</sub> (označeno plavom bojom) izražena kao srednja vrijednost ± standardna devijacija (n = 3)

#### 4.7. Sadržaj ukupnih fenola

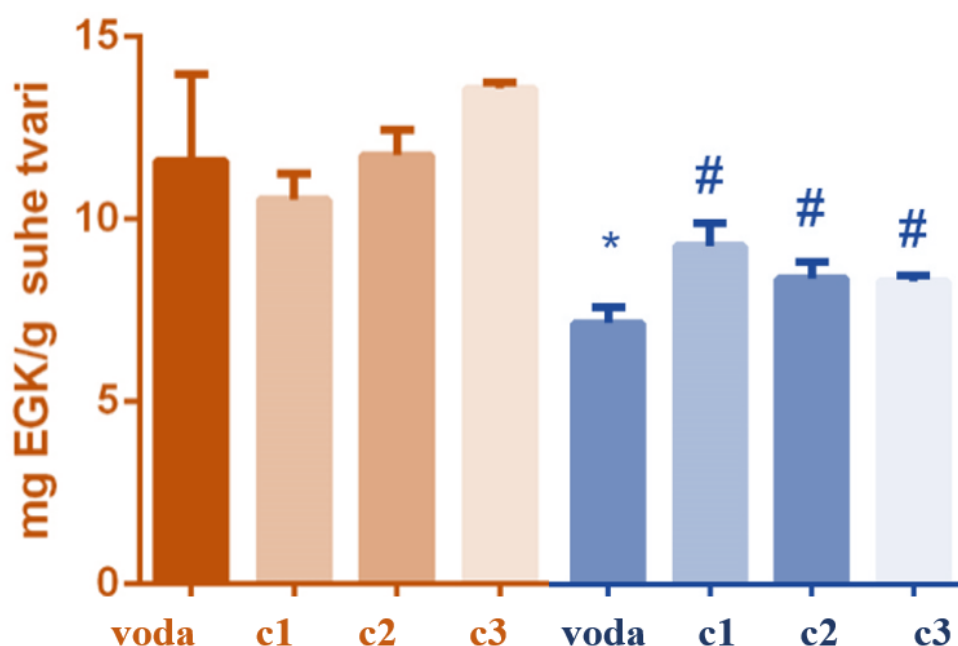
Fenoli posjeduju antioksidativnu aktivnost te mogu djelovati kao reducirajući agensi, donori vodika, hvatači singletnog kisika i kelatori metala (Djeridane i sur., 2006). Da bi se odredio sadržaj ukupnih fenola u ekstraktima rotkvice, bilo je potrebno prvo napraviti baždarni pravac metanolnih otopina standarda galne kiseline u programu Microsoft Excel. Iz pravca jednadžbe  $y = 0,0093x - 0,0708$  pri čemu je  $y$  = apsorbancija pri 765 nm, a  $x$  = koncentracija galne kiseline (Slika 16), dobivena je koncentracija koju je bilo potrebno pomnožiti s razrjeđenjem uzorka, a u zadnjem koraku se sadržaj ukupnih fenola izrazio u miligramima ekvivalenta galne kiseline po gramu suhe mase uzorka (mg EGK/g suhe tvari).



**Slika 16.** Baždarni pravac standarda galne kiseline

Kako je vidljivo na Slici 17, sadržaj ukupnih fenola bio je najveći u ekstraktu rotkvice čije su sjemenke prvobitno bubrile u ekstraktu grmaste glavulje koncentracije 50 µg/mL ( $13,58 \pm 0,16$  mg EGK/g suhe tvari), a potom bile tretirane destiliranom vodom, iako ni kod ove ni kod druge dvije primijenjene koncentracije ekstrakta grmaste glavulje nije primijećena statistički značajna razlika u usporedbi s negativnom kontrolom ( $11,60 \pm 2,37$  mg EGK/g suhe tvari). S druge strane, statistički značajno smanjenje sadržaja ukupnih fenola u usporedbi s negativnom kontrolom zabilježeno je u ekstraktu rotkvice tretiranom 0,005 M CuSO<sub>4</sub>, a u odnosu na koji su sve primijenjene koncentracije ekstrakta grmaste glavulje statistički značajno povisile sadržaj ukupnih fenola. Kod tretmana bakrom, najveći sadržaj fenola uočen je u ekstraktu rotkvice čije su sjemenke prethodno tretirane u ekstraktu grmaste glavulje koncentracije 5 000 µg/mL ( $9,37 \pm 0,62$  mg EGK/G suhe tvari). Dobiveni rezultati se mogu pripisati smanjenom oksidacijskom stresu, koji je bio izazvan suviškom iona bakra(II), u prisutnosti primijenjenih otopina ekstrakta grmaste glavulje.

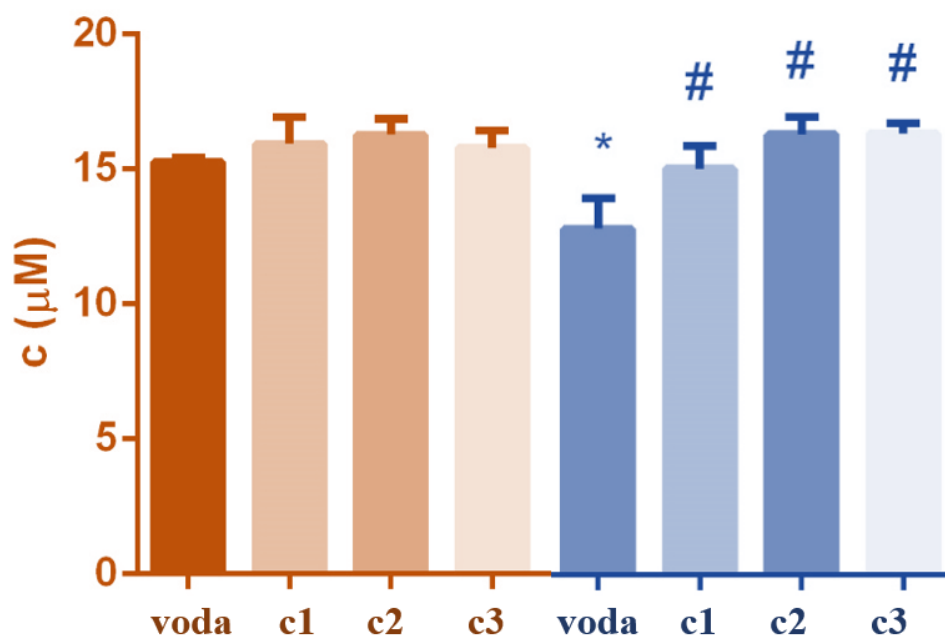




**Slika 17.** Sadržaj ukupnih fenola (mg EGK/g suhe tvari) u ekstraktima klijanaca rotkvice čije su sjemenke bile predtretirane destiliranom vodom ili različitim koncentracijama ekstrakta vrste *G. alypum* (c1 = 5 000 µg/mL, c2 = 500 µg/mL, c3 = 50 µg/mL) te tretirane destiliranom vodom (označeno smeđom bojom) ili otopinom 0,005 M CuSO<sub>4</sub> (označeno plavom bojom) izražen kao srednja vrijednost ± standardna devijacija (n = 3)

#### 4.8. Koncentracija reduciranog glutationa (GSH)

Glutation (GSH) je endogeni tripeptid građen od glutaminske kiseline, cisteina i glicina te je najvažniji antioksidans male molekulske mase budući da sudjeluje u reakcijama konjugacije i redukcije kojima se uklanjaju peroksidi i mnogi ksenobiotici. Uspješno uklanjanje slobodnih radikala ovisi o koncentraciji GSH pa ako je njegova razina preniska može doći do oštećenja stanice slobodnim radikalima (Forman i sur., 2009). Utvrđene koncentracije reduciranog GSH u klijanima rotkvice prikazane su na Slici 18. Prema dobivenim rezultatima, predtretmani različitim koncentracijama ekstrakta grmaste glavulje iza kojeg je slijedio tretman destiliranom vodom nisu statistički značajno povisili koncentraciju GSH u odnosu na negativnu kontrolu ( $15,28 \pm 0,14 \mu\text{M}$ ). Nadalje, tretman 0,005 M CuSO<sub>4</sub> je statistički značajno smanjio koncentraciju GSH ( $12,78 \pm 1,11 \mu\text{M}$ ) u usporedbi s negativnom kontrolom. Sve primijenjene koncentracije ekstrakta grmaste glavulje statistički su značajno povisile koncentraciju reduciranog GSH u tretmanu s 0,005 M CuSO<sub>4</sub> koja se kretala od  $14,99 \pm 0,86$  do  $16,29 \pm 0,39 \mu\text{M}$ .



**Slika 18.** Koncentracija reduciranog glutationa (GSH) ( $\mu\text{M}$ ) u ekstraktima klijanaca rotkvice čije su sjemenke bile predtretirane destiliranom vodom ili različitim koncentracijama ekstrakta vrste *G. alypum* (c1 = 5 000  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , c2 = 500  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , c3 = 50  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) te tretirane destiliranom vodom (označeno smeđom bojom) ili otopinom 0,005 M  $\text{CuSO}_4$  (označeno plavom bojom) izražena kao srednja vrijednost  $\pm$  standardna devijacija ( $n = 3$ )

## **5. RASPRAVA**

*Globularia alypum* L. je mediteranska biljna vrsta rasprostranjena na području južne Europe i sjeverne Afrike. Primjenjuje se za različite indikacije zbog brojnih pozitivnih učinaka na zdravlje. U ovom radu ispitan je njezin utjecaj na neenzimske antioksidanse u klijancima rotkvice koji su bili uzgajani u prisutnosti suviška iona bakra(II), kao i na parametre klijavosti rotkvice u istim uvjetima. U prvom dijelu istraživanja ispitan je utjecaj predtretmana vodenom otopinom metanolnog ekstrakta nadzemnih dijelova vrste *G. alypum* na ukupnu klijavost i ostale parametre klijavosti te je utvrđeno da koncentracije 500 i 50 µg/mL statistički značajno povećavaju klijavost sjemenki rotkvice koja je bila smanjena u prisutnosti suviška iona bakra(II). Nadalje, sve primijenjene koncentracije su statistički značajno povećale duljinu hipokotila u tretmanu s bakrom, pri čemu su prve dvije koncentracije pozitivno utjecale i na duljinu hipokotila u usporedbi s negativnom kontrolom odnosno rast hipokotila bio je potaknut u odnosu na predtretman destiliranom vodom. Međutim, *G. alypum* nije pokazala statistički značajan utjecaj na ostale parametre klijavosti sjemenki rotkvice, prosječno vrijeme i brzinu klijanja, stoga se dobiveni rezultati djelomično podudaraju s početnom pretpostavkom da će primjena ekstrakta vrste *G. alypum* povećati klijavost i ostale parametre klijavosti. Budući da rotkvice inače brzo klija, a vrsta *G. alypum* statistički značajno nije utjecala na prosječno vrijeme i brzinu klijanja, bilo bi zanimljivo istražiti utjecaj navedene vrste na neke druge biljne vrste kojima je potrebno duže vrijeme da prokliju od rotkvice.

U drugom dijelu istraživanja određena je razina neenzimskih antioksidansa (sadržaj fenola i koncentracija reduciranog glutaciona) u supernatatu homogenata rotkvice čije su sjemenke bile uzgojene u prisutnosti suviška iona bakra(II). U tretmanu s bakrom, sve primijenjene koncentracije ekstrakta vrste *G. alypum* dovele su do povećanja koncentracije reduciranog glutaciona (GSH) i sadržaja fenola. Navedeni rezultati upućuju na to da je predtretman ekstraktom vrste *G. alypum* pridonio smanjenju oksidacijskog stresa izazvanog ionima bakra(II). U neprikladnim uvjetima za biljku (npr. solni stres, izloženost visokim temperaturama ili visokoj razini teških metala) povećava se sadržaj GSH, najvažnijeg neenzimskog antioksidansa, kako bi se poboljšala eliminacija ROS (Hasanuzzaman i sur., 2017). Rauser (1987) je istraživao sadržaj glutaciona u kukuruzu čije su sjemenke bile uzgajane u prisutnosti kadmijevih iona te su dobiveni rezultati pokazali kako se sadržaj glutaciona u klijancima, nakon početnog pada, također znatno povećao tijekom tri dana izloženosti teškom metalu. Fenoli u biljkama također mogu smanjiti oksidacijski stres izazvan različitim čimbenicima okoliša kao što je suvišak bakra. Izloženost bakru može potaknuti metabolizam i sintezu fenola koji mogu neutralizirati slobodne radikale i kelirati teške metale te na taj način smanjiti njegove toksične učinke (Janas i sur., 2010). Dobiveni rezultati poklapaju se s

početnom tezom, točnije *G. alypum* je pokazala antioksidativni potencijal i pridonijela povišenju spomenutih neenzimskih antioksidansa.

Antioksidativni učinak ove vrste potvrđen je u brojnim istraživanjima. Friščić i sur. (2022) su ispitivali antioksidativni potencijal vrste *G. alypum*, ali i ostalih vrsta roda *Globularia* s područja Hrvatske spektrofotometrijskim mjerenjem apsorbancije DPPH radikala. Metoda koja koristi navedeni slobodni radikal najčešće je korištena metodom kojom je ispitivan antioksidativni potencijal vrste *G. alypum*, a dobivena vrijednost  $IC_{50}$  iznosila je  $17,25 \mu\text{g/mL}$  za metanolni ekstrakt nadzemnih dijelova pripremljen Soxhlet ekstrakcijom. Athmouni i sur. (2016) su odredili antioksidativni potencijal metanolnog ekstrakta listova vrste *G. alypum* s područja Tunisa pomoću DPPH i ABTS testova. Rezultat DPPH testa prikazan je kao  $IC_{50}$  i iznosio je  $112,32 \pm 1,42 \mu\text{g/mL}$ , dok je rezultat ABTS testa, izražen kao mmol ekvivalenta trolaksa/g suhe tvari, iznosio  $18,65 \pm 1,21$ . Friščić i sur. (2018) također su određivali antioksidativni potencijal metanolnih ekstrakata različitih dijelova vrste *G. alypum* pomoću DPPH testa ( $18,29 \pm 2,64$  i  $20,48 \pm 2,03$  mg EGK/g suhe tvari za list i cvijet) i ABTS testa ( $12,35 \pm 0,81$  i  $14,41 \pm 0,56$  mg EGK/g suhe tvari za list i cvijet). Dobiveni rezultati pokazali su povišeni antioksidativni učinak vrste *G. alypum*. Khantouche i sur. (2015) su također pomoću DPPH testa ispitivali antioksidativni potencijal ekstrakata vrste *G. alypum* pripremljenih korištenjem otapala rastuće polarosti. Utvrđeno je da najveći antioksidativni potencijal ima metanolni ekstrakt listova. Visoka pozitivna povezanost uočena je između antioksidativnog potencijala i sadržaja fenola (Friščić i sur., 2018; Rached i sur., 2010; Djeridane i sur., 2006). Polifenoli ostvaruju različite pozitivne učinke, sprječavaju lipidnu peroksidaciju i pokazuju visoki antioksidativni potencijal (Khlifi i sur., 2005).

Zahvaljujući dugogodišnjoj upotrebi i brojnim istraživanjima koja su potvrdila antioksidativni potencijal vrste *G. alypum* opravdano je i njezino korištenje. Međutim, sva provedena istraživanja su uglavnom bila temeljena na ispitivanju antioksidativnog potencijala same biljke *G. alypum* i njezinog učinka na redoks status u biološkim sustavima poput stanica HeLa (Mansour i sur., 2012) te na plazmi i eritrocitima miševa (Boussoualim i sur., 2016), ali nedostaju istraživanja koja pokazuju zaštitni i antioksidativni učinak vrste *G. alypum* na druge biljne vrste kao što je u ovom radu prikazan učinak na sjemenke rotkvice.

Nadalje, značajnu ulogu u oksidativnom odgovoru biljke ima mikroelement bakar. Njegova uloga u biljci ovisi o koncentraciji. Pri niskim koncentracijama sudjeluje u biokemijskim procesima kao kofaktor enzima, sastavni je dio metaloproteina koji sudjeluju u oksidativnom odgovoru. S druge strane, povišene koncentracije bakra u biljkama mogu imati toksičan učinak (Mir i sur., 2021). U ovom radu sjemenke rotkvice bile su tretirane  $0,005 \text{ M}$

otopinom CuSO<sub>4</sub>. Navedena koncentracija bila je izabrana budući da je dovela do djelomične inhibicije rasta korjenčića i hipokotila, ali nije u potpunosti inhibirala klijanje rotkvice. Nakon petodnevnog pokusa klijanja i mjerenja parametra klijavosti te razine neenzimskih antioksidansa uočeno je da je tretman 0,005 M CuSO<sub>4</sub> statistički značajno smanjio klijavost sjemenki rotkvice, prosječno vrijeme i brzinu klijanja, duljinu korjenčića i hipokotila te suhu masu klijanaca rotkvice, kao i sadržaj neenzimskih antioksidansa, ukupnih fenola i GSH u odnosu na negativnu kontrolu.

Lombardi i Sebastiani (2005) ispitivali su utjecaj različitih koncentracija bakra (10 μM, 50 μM i 100 μM CuSO<sub>4</sub>) na vrsti *Prunus cerasifera* Ehrh. Dobiveni rezultati pokazali su da je koncentracija 100 μM CuSO<sub>4</sub> značajno smanjila relativnu brzinu rasta mladih biljčica s obzirom na masu svježeg i suhog tkiva, ali i povećala enzimsku aktivnost katalaze i superoksid dismutaze. Bakar u povišenim koncentracijama smanjuje rast biljke budući da uzrokuje fiziološke promjene izazvane oksidacijskim stresom. Naime, prekomjerna proizvodnja ROS i nemogućnost njihove neutralizacije rezultira ireverzibilnim oštećivanjem makromolekula (Scandalios, 1990). Khatun i sur. (2008) ispitivali su toksičnost bakra na vrsti *Withania somnifera* L. Primijenili su otopine CuSO<sub>4</sub> u koncentracijama 10, 25, 50, 100 i 200 μM na njezinim eksplantatima, a bakar u koncentracijama 25 μM navise uzrokovao je smanjenje duljine izdanaka i korjenčića, smanjenje mase svježih i suhih listova, kao i smanjeni sadržaj pigmenta (klorofila a i b te karotenoida), što je ukazalo na toksični učinak teškog metala. Vrijednosti pojedinih antioksidativnih enzima poput askorbat peroksidaze i gvajakol peroksidaze također su bile povišene, kao i sadržaj ukupnih fenola. U navedenom ispitivanju izloženost bakru je bila puno duža (30 dana) nego u ispitivanju provedenom u ovom radu (5 dana) te su korištene različite kemikalije i tehnike, ali se rezultati djelomično podudaraju. U brojnim drugim istraživanjima također je prikazan toksičan učinak bakra na druge biljne vrste pri različitim koncentracijama (Gong i sur., 2019; Janas i sur., 2010; Ahsan i sur., 2007; Mihoub i sur., 2005), ali nedostaju istraživanja koja bi pokazala zaštitni učinak neke biljke visokog antioksidativnog potencijala kao što je vrsta *G. alypum* na druge biljne vrste prilikom izloženosti ionima bakra. Primjer jednog takvog istraživanja proveli su nedavno Macar i sur. (2020), koji su ukazali na zaštitni učinak antocijanima-bogatog ekstrakta borovnice (*Vaccinium myrtillus* L.) na bakrom (20 μM CuCl<sub>2</sub>) izazvanu toksičnost kod crvenog luka (*Allium cepa* L.). Primjena navedenog ekstrakta u koncentracijama 50 i 100 μg/mL tijekom tri dana (72 sata) povećala je klijavost luka te srednju dužinu i masu korjenčića koje su pod utjecajem bakra bile snižene kao i u provedenom istraživanju. Također, isti ekstrakt smanjio je povišenu razinu malondialdehida te aktivnost superoksid dismutaze i katalaze.

## **6. ZAKLJUČCI**

Nakon završetka ispitivanja utjecaja ekstrakta vrste *Globularia alypum* na klijavost sjemenki i parametre oksidacijskog stresa (neenzimske antioksidanse) izazvanog 0,005 M CuSO<sub>4</sub> u kljancima rotkvice te obradom dobivenih rezultata može se zaključiti sljedeće:

Nakon petodnevnog pokusa klijanja i mjerenja parametara klijavosti te neenzimskih antioksidansa uočeno je da je tretman 0,005 M CuSO<sub>4</sub> statistički značajno smanjio klijavost sjemenki rotkvice i prosječnu brzinu klijanja, duljinu korjenčića i hipokotila te suhu masu kljanaca rotkvice u odnosu na negativnu kontrolu. Također, smanjio je i sadržaj neenzimskih antioksidansa, sadržaj ukupnih fenola i koncentraciju reduciranog glutaciona.

Koncentracije ekstrakta vrste *G. alypum* od 500 i 50 µg/mL primijenjene u predtretmanu sjemenki rotkvice statistički su značajno povećale klijavost sjemenki uzgajanih tijekom pet dana u prisutnosti suviška iona bakra(II) na sobnoj temperaturi i svjetlosti pri pravilnoj izmjeni dana i noći.

Sve koncentracije ekstrakta vrste *G. alypum* primijenjene u predtretmanu statistički značajno su povećale duljinu hipokotila kod sjemenki tretiranih 0,005 M CuSO<sub>4</sub> odnosno smanjile su inhibitorno djelovanje suviška iona bakra(II) na rast hipokotila. Također, utvrđeno je i da koncentracije 5 000 µg/mL i 500 µg/mL ekstrakta vrste *G. alypum* statistički značajno povećavaju duljinu hipokotila u usporedbi s negativnom kontrolom, destiliranom vodom.

U ekstraktima rotkvice mjereni su i neenzimski antioksidansi, sadržaj ukupnih fenola i koncentracija reduciranog glutaciona. Utvrđeno je da sve primijenjene koncentracije ekstrakta vrste *G. alypum* statistički značajno povećavaju sadržaj ukupnih fenola i koncentraciju reduciranog glutaciona u ekstraktima kljanaca čije su sjemenke bile tretirane 0,005 M otopinom CuSO<sub>4</sub>.

Predtretman sjemenki rotkvice ekstraktom vrste *G. alypum* pridonio je smanjenju oksidacijskog stresa izazvanog klijanjem sjemenki u prisutnosti suviška iona bakra(II).



## **7. LITERATURA**

- Abouri M, El Mousadik A, Msanda F, Boubaker H, Saadi B, Cherifi K. An ethnobotanical survey of medicinal plants used in the Tata Province, Morocco. *Int J Med Plant Res*, 2012, 1, 99–123.
- Ahsan N, Lee DG, Lee SH, Kang KY, Lee JJ, Kim PJ, Yoon HS, Kim JS, Lee BH. Excess copper induced physiological and proteomic changes in germinating rice seeds. *Chemosphere*, 2007, 67, 1182–1193.
- Amessis-Ouchemoukh N, Madani K, Falé PLV, Serralheiro ML, Araújo MEM. Antioxidant capacity and phenolic contents of some Mediterranean medicinal plants and their potential role in the inhibition of cyclooxygenase-1 and acetylcholinesterase activities. *Ind Crop Prod*, 2014, 53, 6–15.
- Asraoui F, Kounoun A, El Cadi H, Cacciola F, El Majdoub YO, Alibrando F, Mandolino F, Dugo P, Mondello L and Louajri A. Phytochemical investigation and antioxidant activity of *Globularia alypum* L. *Molecules*, 2021, 26: 759.
- Athmouni K, Belghith T, El Fek A, Ayadi H. Phytochemical composition and antioxidant activity of extracts of some medicinal plants in Tunisia. *Int J Pharmacol Toxicol*, 2016, 4, 159–168.
- Bewley JD, Black M. Physiology and Biochemistry of Seeds in Relation to Germination, Vol. 2. Viability, Dormancy and Environmental Control. Berlin, Springer, 1982, str. 126, 127, 280, 307.
- Birben E, Sahiner UM, Sackesen C, Erzurum S, Kalayci O. Oxidative stress and antioxidant defense. *World Allergy Organ J*, 2012, 5, 9–19.
- Boussoualim N, Krache I, Baghiani A, Trabsa H, Aouachria S, Arrar L. Human xanthine oxidase inhibitory effect, antioxidant *in vivo* of Algerian extracts (*Globularia alypum* L.). *Int J Pharmacogn Phytochem Res*, 2016, 8, 645–650.
- Bradbeer JW. Seed Dormancy and Germination, New York, Chapman and Hall, 1988, str. 27–30.

- Carmona-Hernandez JC, Taborda-Ocampo G, González-Correa CH. Folin-Ciocalteu reaction alternatives for higher polyphenol quantitation in Colombian passion fruits. *Int J Food Sci*, 2021, 2021, 8871301.
- Crang RFE, Lyons-Sobaski S, Wise R. Fruits, Seeds and Seedlings. U: Plant Anatomy: A Concept-Based Approach to the Structure of Seed Plants. Crang R, Lyons-Sobaski S, Wise R, urednici, Cham, Springer, 2018, str. 664–675.
- Čepelak I, Dodig S. Glutation i oksidacijski stres. *Biochem Med*, 2003, 3-4, 93–100.
- Debeaujon I, Lepiniec L, Pourcel L, Routaboul JM. Seed Coat Development and Dormancy. U: Seed Development, Dormancy and Germination. Annual Plant Reviews, Vol. 27. Bradford K, Nonogaki H, urednici, Oxford, Blackwell Publishing, 2007, str. 29, 30, 41, 60.
- Djeridane A, Yousfi M, Nadjemi B, Boutassouna D, Stocker P, Vidal N. Antioxidant activity of some Algerian medicinal plants extracts containing phenolic compounds. *Food Chem*, 2006, 97, 654–660.
- Ellman GL. Tissue sulfhydryl groups. *Arch Biochem Biophys*, 1959, 82, 70–77.
- El-Mokasabi FM. Floristic composition and traditional uses of plant species at Wadi Alkuf, Al-Jabal, Al-Akhder, Libya. *Am-Eurasian J Agric Environ Sci*, 2014, 14, 685–697.
- Es-Safi NE, Kollmann A, Khelifi S, Ducrot PH. Antioxidative effect of compounds isolated from *Globularia alypum* L. structure-activity relationship. *LWT*, 2007, 40, 1246–1252.
- Finch-Savage WE, Leubner-Metzger G. Seed dormancy and the control of germination. *New Phytol*, 2006, 171, 501–523.
- Finkelstein RR. The Role of Hormones during Seed Development and Germination. U: Plant Hormones – Biosynthesis, Signal Transduction, Action!, 3. izd. Davies PJ, urednik, New York, Springer, 2010, str. 549–573.

- Forman HJ, Zhang H, Rinna A. Glutathione: overview of its protective roles, measurement, and biosynthesis. *Mol Aspects Med*, 2009, 30, 1–12.
- Friščić M, Maslo S, Garić R, Maleš Ž, Hazler Pilepić K. Comparative analysis of specialized metabolites and antioxidant capacity *in vitro* of different natural populations of *Globularia* spp. *Acta Bot Croat*, 2018, 77, 1–9.
- Friščić M, Petlevski R, Kosalec I, Madunić J, Matulić M, Bucar F, Hazler Pilepić K, Maleš Ž. *Globularia alypum* L. and related species: LC-MS profiles and antidiabetic, antioxidant, anti-inflammatory, antibacterial and anticancer potential. *Pharmaceuticals*, 2022, 15: 506.
- Gamba M, Asllanaj E, Raguindin PF, Glisic M, Franco OH, Minder B, Bussler W, Metzger B, Kern H, Muka T. Nutritional and phytochemical characterization of radish (*Raphanus sativus*): A systematic review. *Trends Food Sci Technol*, 2021, 113, 205–218.
- Gong Q, Wang L, Dai T, Zhou J, Kang Q, Chen H, Li K, Li Z. Effects of copper on the growth, antioxidant enzymes and photosynthesis of spinach seedlings. *Ecotox Environ Saf*, 2019, 171, 771–780.
- Haida Z, Hakimian M. A comprehensive review on the determination of enzymatic assay and nonenzymatic antioxidant activities. *Food Sci Nutr*, 2019, 7, 1555–1563.
- Hajji N, Wannes D, Jabri MA, Rtibi K, Tounsi H, Abdellaoui A, Sebai H. Purgative/laxative actions of *Globularia alypum* aqueous extract on gastrointestinal-physiological function and against loperamide-induced constipation coupled to oxidative stress and inflammation in rats. *Neurogastroenterol Motil*, 2020, 32: e13858.
- Hasanuzzaman M, Nahar K, Anee TI, Fujita M. Glutathione in plants: biosynthesis and physiological role in environmental stress tolerance. *Physiol Mol Biol Plants*, 2017, 23, 249–268.
- Heim KE, Tagliaferro AR, Bobilya DJ. Flavonoid antioxidants: chemistry, metabolism and structure-activity relationships. *J Nutr Biochem*, 2002, 13, 572–584.

- Janas KM, Zielińska-Tomaszewska J, Rybaczek D, Maszewski J, Posmyk MM, Amarowicz R, Kosińska A. The impact of copper ions on growth, lipid peroxidation, and phenolic compound accumulation and localization in lentil (*Lens culinaris* Medic.) seedlings. *J Plant Physiol*, 2010, 167, 270–276.
- Johnson R, Puthur JT. Seed priming as a cost effective technique for developing plants with cross tolerance to salinity stress. *Plant Physiol Biochem*, 2021, 162, 247–257.
- Kanjevac M, Jakovljević D, Todorović M, Stanković M, Čurčić S, Bojović B. Improvement of germination and early growth of radish (*Raphanus sativus* L.) through modulation of seed metabolic processes, *Plants*, 2022, 11: 757.
- Khantouche L, Motri S, Mejri M, Ben Abderabba M. Evaluation of polyphenols and antioxidant properties of extracts *Globularia alypum* leaves. *J New Sci*, 2015, 24, 1086–1090.
- Khatun S, Babar Ali M, Hahn EJ, Paek KY. Copper toxicity in *Withania somnifera*: Growth and antioxidant enzymes responses of *in vitro* grown plants, *Environ Experiment Bot*, 2008, 64, 279–285.
- Khelifi D, Hamdi M, El Hayouni A, Cazaux S, Souchard JP, Couderc F, Bouajila J. Global chemical composition and antioxidant and anti-tuberculosis activities of various extracts of *Globularia alypum* L. (Globulariaceae) leaves. *Molecules*, 2011, 16, 10592–10603.
- Khelifi S, El Hachimi Y, Khalil A, Es-Safi N, El Abbouyi A. *In vitro* effect of *Globularia alypum* L. hydromethanolic extract. *Indian J Pharmacol*, 2005, 37: 227–231.
- Kumar V, Pandita S, Sidhu GPS, Sharma A, Khanna K, Kaur P, Bali AS, Setia R. Copper bioavailability, uptake, toxicity and tolerance in plants: A comprehensive review. *Chemosphere*, 2021, 262: 127810.
- Kušan F. Folia Alypi i vrste roda *Globularia* u Hrvatskoj. *Vjestnik Ljekarnika*, 1943, 25, 29–32; 43–46.

- Leri M, Scuto M, Ontario ML, Calabrese V, Calabrese EJ, Bucciantini M, Stefani M. Healthy effects of plant polyphenols: Molecular mechanisms. *Int J Mol Sci*, 2020, 21: 1250.
- Liu W, Zhang X, Liang L, Chen C, Wei S, Zhou Q. Phytochelatin and Oxidative Stress under Heavy Metal Stress Tolerance in Plants. U: Reactive Oxygen Species and Oxidative Damage in Plants Under Stress. Gupta DK, Palma JM, Corpas FJ, urednici, Cham, Springer, 2015, str. 191–217.
- Lobo V, Patil A, Phatak A, Chandra N. Free radicals, antioxidants and functional foods: Impact on human health. *Pharmacogn Rev*, 2010, 4, 118–126.
- Lombardi L, Sebastiani L. Copper toxicity in *Prunus cerasifera*: growth and antioxidant enzymes responses of *in vitro* grown plant, *Plant Sci*, 2005, 168, 797–802.
- Macar O, Macar TK, Çavuşoğlu K, Yalçın E. Protective effects of anthocyanin-rich bilberry (*Vaccinium myrtillus* L.) extract against copper(II) chloride toxicity. *Environ Sci Pollut Res*, 2020, 27, 1428–1435.
- Manivannan A, Kim JH, Kim DS, Lee ES. Deciphering the nutraceutical potential of *Raphanus sativus* – A comprehensive overview. *Nutrients*, 2019, 11: 402.
- Mansour RB, Gargouri B, Gargouri B, Elloumi N, Ben Haj Jilani I, Ghrabi-Grammar Z, Lassoued S. Investigation of antioxidant activity of alcoholic extract of *Globularia alypum* L. *J Med Plants Res*, 2012, 6, 4193–4199.
- Mihoub A, Chaoui A, El Ferjani E. [Biochemical changes associated with cadmium and copper stress in germinating pea seeds (*Pisum sativum* L.)]. *C R Biol*, 2005, 328, 33–41.
- Mir AR, Pichtel J, Hayat S. Copper: uptake, toxicity and tolerance in plants and management of Cu-contaminated soil. *Biometals*, 2021, 34, 737–759.
- Noctor G, Gomez L, Vanacker H, Foyer CH. Interactions between biosynthesis, compartmentation and transport in the control of glutathione homeostasis and signalling. *J Exp Bot*, 2002, 53, 1283–1304.

- Paparella S, Araújo SS, Rossi G, Wijayasinghe M, Carbonera D, Balestrazzi A. Seed priming: state of the art and new perspectives. *Plant Cell Rep*, 2015, 34, 1281–1293.
- Pizzorno J. Glutathione! *Integr Med (Encinitas)*, 2014, 13, 8–12.
- Rached W, Benamar H, Bennaceur M, Marouf A. Screening of the antioxidant potential of some Algerian indigenous plants. *J Biol Sci*, 2010, 10, 316–324.
- Rausser WE. Changes in glutathione content of maize seedlings exposed to cadmium. *Plant Sci*, 1987, 51, 171–175.
- Saadi B, Msanda F, Boubaker H. Contributions of folk medicine knowledge in South-western Morocco: The case of rural communities of Imouzzer Ida Outanane Region. *Int J Med Plant Res*, 2013, 2, 135–145.
- Scandalios JG. Response of plant antioxidant defense genes to environmental stress, *Adv Genet*, 1990, 28, 1–41.
- Shabbir Z, Sardar A, Shabbir A, Abbas G, Shamshad A, Khalid S, Natasha N, Murtaza G, Dumat C, Shahid M. Copper uptake, essentiality, toxicity, detoxification and risk assessment in soil-plant environment. *Chemosphere*, 2020, 259: 127436.
- Sharma R, Bhardwaj R, Thukral AK, Al-Huqail AA, Siddiqui MH, Ahmad P. Oxidative stress mitigation and initiation of antioxidant and osmoprotectant responses mediated by ascorbic acid in *Brassica juncea* L. subjected to copper (II) stress. *Ecotoxicol Environ Saf*, 2019, 182: 109436.
- Świergosz-Kowalewska R, Bednarska A, Kafel A. Glutathione levels and enzyme activity in the tissues of bank vole *Clethrionomys glareolus* chronically exposed to a mixture of metal contaminants. *Chemosphere*, 2006, 65, 963–974.
- Tutin TG. Globulariaceae. U: Flora Europaea, Vol. 3., Tutin TG, Heywood VH, Burges NA, Moore DM, Valentine DH, Walters SM, Webb DA, urednici, Cambridge, Cambridge University Press, 1972, str. 282–283.

Wagenitz G. Globulariaceae. U: The Families and Genera of Vascular Plants, Vol. 7., Kubitzki K, Kadereit JW, urednici, Berlin Heidelberg, Springer, 2004, str. 159–162.

Zennaki S, Krouf D, Taleb-Senouci D, Bouchenak M. *Globularia alypum* L. lyophilized methanolic extract decreases hyperglycemia and improves antioxidant status in various tissues of streptozotocin-induced diabetic rats. *J Complement Integr Med*, 2009, 6: 34.

*Globularia alypum*, 2017., [www.lactacyd.eu](http://www.lactacyd.eu), pristupljeno 01. 07. 2022.

*Globularia alypum*, 2022., [www.mychelle.com](http://www.mychelle.com), pristupljeno 01. 07. 2022.

*Globularia alypum*, 2022., <https://olival.hr>, pristupljeno 30. 06. 2022.

*Globularia alypum*, 2022., [powo.science.kew.org](http://powo.science.kew.org), pristupljeno 15. 07. 2022.

*Raphanus raphanistrum* subsp. *sativus*, 2022., [powo.science.kew.org](http://powo.science.kew.org), pristupljeno 15. 07. 2022.

*Raphanus sativus*, 2019., <https://commons.wikimedia.org/wiki>, pristupljeno 15. 07. 2022.



## **8. SAŽETAK / SUMMARY**

Cilj ovog rada bio je ispitati učinak različitih koncentracija metanolnog ekstrakta grmaste glavulje (*Globularia alypum* L., Plantaginaceae) na klijavost sjemenki i razinu neenzimskih antioksidansa u klijanacima rotkvice (*Raphanus sativus* L., Brassicaceae) koji su bili izloženi oksidacijskom stresu izazvanom suviškom iona bakra(II). Sjemenke su bile predtretirane dva sata destiliranom vodom i odabranim koncentracijama ekstrakta grmaste glavulje otopljenog u destiliranoj vodi (50, 500 i 5 000 µg/mL), a nakon toga tretirane su s 3,5 mL 0,005 M CuSO<sub>4</sub> ili destilirane vode (negativna kontrola). Nakon 5 dana klijanja na dnevnoj svjetlosti pri temperaturi 20 ± 2 °C, izračunati su parametri klijavosti (ukupna klijavost, prosječno vrijeme klijanja i prosječna brzina klijanja), izmjerena duljina korjenčića i hipokotila te izvagana masa suhих klijanaca. Nakon toga su pripremljeni homogenati klijanaca rotkvice u 5%-tnoj (w/v) trikloroctenoj kiselini. Nakon centrifugiranja i odvajanja supernatanta, određen je sadržaj ukupnih fenola i koncentracija reduciranog glutationa.

Tretman 0,005 M CuSO<sub>4</sub> statistički je značajno smanjio klijavost sjemenki, duljinu korjenčića i hipokotila te suhu masu klijanaca rotkvice u odnosu na negativnu kontrolu. Također, smanjio je i razinu neenzimskih antioksidansa u klijanacima rotkvice, sadržaj ukupnih fenola i koncentraciju reduciranog glutationa. Dvije primijenjene koncentracije ekstrakta grmaste glavulje (50 i 500 µg/mL) statistički su značajno povećale klijavost sjemenki rotkvice u tretmanu s bakrom (p < 0,05). U istom tretmanu, sve su koncentracije ekstrakta statistički značajno povećale duljinu hipokotila klijanaca, dok su dvije koncentracije (500 i 5 000 µg/mL) povećale duljinu hipokotila i u usporedbi s negativnom kontrolom. Nadalje, sve su koncentracije ekstrakta povećale razinu neenzimskih antioksidansa, ali nisu imale utjecaj na duljinu korjenčića i suhu masu klijanaca. Dobiveni rezultati ukazuju na to da vrsta *G. alypum* može smanjiti negativne učinke oksidacijskog stresa izazvanog suviškom iona bakra(II) te potaknuti rast rotkvice.

The aim of this study was to explore the effects of different concentrations of *Globularia alypum* L. (Plantaginaceae) methanolic extract on radish (*Raphanus sativus* L.) seed germination and on the level of non-enzymatic antioxidants in radish seedlings which were exposed to oxidative stress in the presence of excess copper(II) ions. Seeds were pre-treated for two hours with distilled water and chosen concentration of *G. alypum* extract dissolved in distilled water (50, 500 and 5000 µg/mL) and afterwards treated with 3.5 mL of 0.005 M CuSO<sub>4</sub> or distilled water (negative control). After five days of germination in daylight at 20 ± 2 °C, germination parameters (total germination, mean germination time and mean germination rate) were assessed, the root and hypocotyl lengths measured, and the dry masses of radish seedlings weighed. Afterwards, seedling homogenates were prepared using 5% (w/v) trichloroacetic acid. After centrifugation and separation of supernatant, total phenolic content and reduced glutathione concentration were determined.

Treatment with 0.005 M CuSO<sub>4</sub> significantly decreased seed germination, the root and hypocotyl lengths, and dry mass of radish seedlings compared to negative control. It also decreased the level of non-enzymatic antioxidants in radish seedlings, total phenolic content and reduced glutathione concentration. Two applied concentrations of *G. alypum* extract (50 and 500 µg/mL) significantly increased germination percentages of radish seeds in the copper treatment ( $p < 0.05$ ). In the same treatment, all extract concentrations significantly increased hypocotyl lengths, while two concentrations (500 and 5000 µg/mL) increased hypocotyl lengths also compared to negative control. Furthermore, all extract concentrations significantly increased the level of non-enzymatic antioxidants but had no effect on root length and seedling dry mass. Obtained results indicate that *G. alypum* may reduce the negative effects of oxidative stress induced by excess of copper(II) ions and promote radish growth.

**9. TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA / BASIC  
DOCUMENTATION CARD**

## Temeljna dokumentacijska kartica

Sveučilište u Zagrebu  
Farmaceutsko-biokemijski fakultet  
Studij: Farmacija  
Zavod za farmaceutsku botaniku  
Schrottova 39, 10000 Zagreb, Hrvatska

Diplomski rad

### UTJECAJ EKSTRAKTA GRMASTE GLAVULJE (*GLOBULARIA ALYPUM* L.) NA KLIJAVOST SJEMENKI I RAZINU NEENZIMSKIH ANTIOKSIDANSA U KLIJANCIMA ROTKVICE (*RAPHANUS SATIVUS* L.) UZGOJENIMA U PRISUTNOSTI SUVIŠKA IONA BAKRA(II)

Andrea Babić

#### SAŽETAK

Cilj ovog rada bio je ispitati učinak različitih koncentracija metanolnog ekstrakta grmaste glavulje (*Globularia alypum* L., Plantaginaceae) na klijavost sjemenki i razinu neenzimskih antioksidansa u klijancima rotkvice (*Raphanus sativus* L., Brassicaceae) koji su bili izloženi oksidacijskom stresu izazvanom suviškom iona bakra(II). Sjemenke su bile predtretirane dva sata destiliranom vodom i odabranim koncentracijama ekstrakta grmaste glavulje otopljenog u destiliranoj vodi (50, 500 i 5 000 µg/mL), a nakon toga tretirane su s 3,5 mL 0,005 M CuSO<sub>4</sub> ili destilirane vode (negativna kontrola). Nakon 5 dana klijanja na dnevnoj svjetlosti pri temperaturi 20 ± 2 °C, izračunati su parametri klijavosti (ukupna klijavost, prosječno vrijeme klijanja i prosječna brzina klijanja), izmjerena duljina korjenčića i hipokotila te izvagana masa suhих klijanaca. Nakon toga su pripremljeni homogenati klijanaca rotkvice u 5%-tnoj (w/v) trikloroetenoj kiselini. Nakon centrifugiranja i odvajanja supernatanta, određen je sadržaj ukupnih fenola i koncentracija reduciranog glutationa. Tretman 0,005 M CuSO<sub>4</sub> statistički je značajno smanjio klijavost sjemenki, duljinu korjenčića i hipokotila te suhu masu klijanaca rotkvice u odnosu na negativnu kontrolu. Također, smanjio je i razinu neenzimskih antioksidansa u klijancima rotkvice, sadržaj ukupnih fenola i koncentraciju reduciranog glutationa. Dvije primijenjene koncentracije ekstrakta grmaste glavulje (50 i 500 µg/mL) statistički su značajno povećale klijavost sjemenki rotkvice u tretmanu s bakrom (p < 0,05). U istom tretmanu, sve su koncentracije ekstrakta statistički značajno povećale duljinu hipokotila klijanaca, dok su dvije koncentracije (500 i 5 000 µg/mL) povećale duljinu hipokotila i u usporedbi s negativnom kontrolom. Nadalje, sve su koncentracije ekstrakta povećale razinu neenzimskih antioksidansa, ali nisu imale utjecaj na duljinu korjenčića i suhu masu klijanaca. Dobiveni rezultati ukazuju na to da vrsta *G. alypum* može smanjiti negativne učinke oksidacijskog stresa izazvanog suviškom iona bakra(II) te potaknuti rast rotkvice.

Rad je pohranjen u Središnjoj knjižnici Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.

Rad sadrži: 54 stranice, 18 grafičkih prikaza, 3 tablice i 65 literaturnih navoda. Izvornik je na hrvatskom jeziku.

Ključne riječi: *Globularia alypum*, bakar, oksidacijski stres, antioksidativni potencijal, rotkvice

Mentor: **Dr. sc. Maja Friščić**, docentica Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.

Ocjenjivači: **Dr. sc. Maja Friščić**, docentica Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.

**Dr. sc. Ana-Marija Domijan**, redovita profesorica Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.

**Dr. sc. Miranda Sertić**, izvanredna profesorica Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutskog-biokemijskog fakulteta.

Rad prihvaćen: srpanj 2022.

## Basic documentation card

University of Zagreb  
Faculty of Pharmacy and Biochemistry  
Study: Pharmacy  
Department of Pharmaceutical Botany  
Schrottova 39, 10000 Zagreb, Croatia

Diploma thesis

### **THE EFFECTS OF *GLOBULARIA ALYPUM* L. ON RADISH (*RAPHANUS SATIVUS* L.) SEED GERMINATION AND ON THE LEVEL OF NON-ENZYMATIC ANTIOXIDANTS IN RADISH SEEDLINGS GROWN IN THE PRESENCE OF EXCESS COPPER(II) IONS**

**Andrea Babić**

#### **SUMMARY**

The aim of this study was to explore the effects of different concentrations of *Globularia alypum* L. (Plantaginaceae) methanolic extract on radish (*Raphanus sativus* L.) seed germination and on the level of non-enzymatic antioxidants in radish seedlings which were exposed to oxidative stress in the presence of excess copper(II) ions. Seeds were pre-treated for two hours with distilled water and chosen concentration of *G. alypum* extract dissolved in distilled water (50, 500 and 5000 µg/mL) and afterwards treated with 3.5 mL of 0.005 M CuSO<sub>4</sub> or distilled water (negative control). After five days of germination in daylight at 20 ± 2 °C, germination parameters (total germination, mean germination time and mean germination rate) were assessed, the root and hypocotyl lengths measured, and the dry masses of radish seedlings weighed. Afterwards, seedling homogenates were prepared using 5% (w/v) trichloroacetic acid. After centrifugation and separation of supernatant, total phenolic content and reduced glutathione concentration were determined. Treatment with 0.005 M CuSO<sub>4</sub> significantly decreased seed germination, the root and hypocotyl lengths, and dry mass of radish seedlings compared to negative control. It also decreased the level of non-enzymatic antioxidants in radish seedlings, total phenolic content and reduced glutathione concentration. Two applied concentrations of *G. alypum* extract (50 and 500 µg/mL) significantly increased germination percentages of radish seeds in the copper treatment (p < 0.05). In the same treatment, all extract concentrations significantly increased hypocotyl lengths, while two concentrations (500 and 5000 µg/mL) increased hypocotyl lengths also compared to negative control. Furthermore, all extract concentrations significantly increased the level of non-enzymatic antioxidants but had no effect on root length and seedling dry mass. Obtained results indicate that *G. alypum* may reduce the negative effects of oxidative stress induced by excess of copper(II) ions and promote radish growth.

The thesis is deposited in the Central Library of the University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry.

Thesis includes: 54 pages, 18 figures, 3 tables and 65 references. Original is in Croatian language.

Keywords: *Globularia alypum*, copper, oxidative stress, antioxidant potential, radish

Mentor: **Maja Friščić, Ph.D.** Assistant Professor, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry

Reviewers: **Maja Friščić, Ph.D.** Assistant Professor, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry  
**Ana-Marija Domijan, Ph.D.** Full Professor, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry  
**Miranda Sertić Ph.D.** Associate Professor, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry

The thesis was accepted: July 2022