

# Antimikrobna aktivnost vodenog ekstrakta kadulje na odabrane mikroorganizme uzročnike dentooralnih oboljenja

---

**Spitek, Andreja**

**Undergraduate thesis / Završni rad**

**2020**

*Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj:* **University of Zagreb, Faculty of Food Technology and Biotechnology / Sveučilište u Zagrebu, Prehrambeno-biotehnološki fakultet**

*Permanent link / Trajna poveznica:* <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:159:587661>

*Rights / Prava:* [Attribution-NoDerivatives 4.0 International/Imenovanje-Bez prerada 4.0 međunarodna](#)

*Download date / Datum preuzimanja:* **2024-07-20**



*Repository / Repozitorij:*

[Repository of the Faculty of Food Technology and Biotechnology](#)



**Sveučilište u Zagrebu  
Prehrambeno-biotehnološki fakultet**

**Preddiplomski studij Prehrambena tehnologija**

**Andreja Spitek**

7488/PT

**Antimikrobna aktivnost vodenog ekstrakta kadulje na odabrane  
mikroorganizme uzročnike dentooralnih oboljenja**

**ZAVRŠNI RAD**

**Predmet:** Mikrobiologija namirnica

**Mentor:** Prof. dr. sc. Jadranka Frece

**Zagreb, 2020.**

# TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Završni rad

Sveučilište u Zagrebu  
Prehrambeno-biotehnološki fakultet  
Preddiplomski sveučilišni studij Prehrambena tehnologija

Zavod za biokemijsko inženjerstvo  
Laboratorij za opću mikrobiologiju i mikrobiologiju namirnica

Znanstveno područje: Biotehničke znanosti  
Znanstveno polje: Prehrambena tehnologija

**Antimikrobna aktivnost vodenog ekstrakta kadulje na odabrane mikroorganizme  
uzročnike dentooralnih oboljenja**

**Andreja Spitek, 0058211800**

## **Sažetak:**

Dentooralno zdravlje kao dio općeg zdravlja predstavlja važan čimbenik kvalitete života. Unatoč naporima izražen je negativan trend kvalitete dentooralnog zdravlja u Republici Hrvatskoj te su bolesti usne šupljine u porastu. Jedan od ciljeva nacionalnog programa za preventivu i zaštitu oralnog zdravlja jest prevencija razvoja takvih oboljenja. Patogeni mikroorganizmi imaju značajnu ulogu u nastanku oboljenja u usnoj šupljini. Mnoga istraživanja upućuju na djelotvornost prirodnih spojeva u poboljšanju dentooralnog zdravlja. Jedan od primjera su različiti proizvodi dobiveni preradom kadulje. U ovom radu pripremljen je vodeni ekstrakt kadulje *Salvia officinalis* L. te su dobiveni ekstrakti u različitim koncentracijama aplicirani na odabrane dentalne patogene, *Streptococcus mutans* DSM 20523, *Streptococcus intermedius* DSM 20573, *Streptococcus sanguinis* DSM 20068 i *Candida albicans* 8 i određena je antimikrobna aktivnost koja se pokazala značajnom na sve testirane patogene.

**Ključne riječi:** antimikrobna aktivnost, dentalni patogeni, dentooralno zdravlje, kadulja

**Rad sadrži:** 20 stranica, 4 slike, 0 tablica, 39 literaturnih navoda, 0 priloga

**Jezik izvornika:** hrvatski

**Rad je u tiskanom i elektroničkom obliku pohranjen u knjižnici Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu, Kačićeva 23, 10 000 Zagreb**

**Mentor:** prof. dr. sc. Jadranka Frece

**Pomoć pri izradi:** Deni Kostelac, mag.ing.

**Datum obrane:** srpanj, 2020.

## BASIC DOCUMENTATION CARD

Bachelor thesis

**University of Zagreb**  
**Faculty of Food Technology and Biotechnology**  
**University undergraduate study Food Technology**

**Department of Biochemical Engineering**  
**Laboratory for General Microbiology and Food Microbiology**

**Scientific area: Biotechnical Sciences**  
**Scientific field: Food Technology**

### **Antimicrobial activity of aqueous sage extract on selected microorganisms causing dental and oral diseases**

**Andreja Spitek, 0058211800**

#### **Abstract:**

Dental and oral health as part of general health is an important factor in quality of life. Despite the efforts, a negative trend in the quality of dental health in the Republic of Croatia has been detected, and diseases of the oral cavity are on the rise. One of the goals of National program for the prevention and protection of oral health is to prevent the development of such diseases. Pathogenic microorganisms play a significant role in development of diseases in oral cavity. Many studies point to the effectiveness of natural compounds in improving dental and oral health. Examples are various products obtained by processing sage. In this study aqueous extract of sage *Salvia officinalis* L. was prepared and the obtained extracts in different concentrations were applied to selected dental pathogens, *Streptococcus mutans* DSM 20523, *Streptococcus intermedius* DSM 20573, *Streptococcus sanguinis* DSM 20068 and *Candida albicans* 8; antimicrobial activity was determined and was significant on all tested pathogens.

**Keywords:** antimicrobial activity, dental health, dental pathogens, sage

**Thesis contains:** 20 pages, 4 figures, 0 tables, 39 references, 0 supplements

**Original in:** Croatian

**Thesis is in printed and electronic form deposited in the library of the Faculty of Food Technology and Biotechnology, University of Zagreb, Kačićeva 23, 10 000 Zagreb**

**Mentor:** PhD. Jadranka Frece, Full professor

**Technical support and assistance:** Deni Kostelac, MSc

**Defence date:** July, 2020

# SADRŽAJ

<b>1. UVOD .....</b>	<b>1</b>
<b>2. TEORIJSKI DIO .....</b>	<b>2</b>
2.1 Dentooralno zdravlje .....	2
2.2. Usna šupljina .....	3
2.3. Zubni karijes .....	3
2.2. Rod <i>Streptococcus</i> .....	4
2.2.1. <i>Streptococcus mutans</i> .....	5
2.2.2. <i>Streptococcus intermedius</i> .....	5
2.2.3. <i>Streptococcus sanguinis</i> .....	5
2.3. Rod <i>Candida</i> .....	6
2.3.1. <i>Candida albicans</i> .....	6
2.4. Kadulja .....	7
<b>3. MATERIJALI I METODE .....</b>	<b>9</b>
3.1 Materijali .....	9
3.1.1. Mikroorganizmi .....	9
3.1.2. Podloge za uzgoj mikroorganizama .....	9
3.1.3. Kemikalije .....	9
3.1.4. Aparatura i pribor .....	9
3.2. Metode .....	10
3.2.1. Uzgoj mikroorganizama .....	10
3.2.2. Vodena ekstrakcija kadulje .....	10
3.2.3. Spektrofotometrijsko određivanje ukupnih fenola: .....	10
3.2.4. Određivanje antimikrobne aktivnosti ekstrakta kadulje turbidimetrijskom metodom .....	11
<b>4. REZULTATI I RASPRAVA .....</b>	<b>12</b>
<b>5. ZAKLJUČAK .....</b>	<b>16</b>
<b>6. POPIS LITERATURE .....</b>	<b>17</b>

## 1. UVOD

Usna šupljina je jedinstveni ekosustav koji koloniziraju stotine raznovrsnih bakterija od kojih je većina komenzalna i nužna za održavanje mikrobne ravnoteže (Belda-Ferre i sur., 2011). Međutim, u navedenom sustavu se nalaze i patogene bakterije koje imaju značajnu ulogu u nastanku raznih dentooralnih bolesti među kojima su najčešće zubni karijes i parodontalna bolest. Zubni karijes poznatiji kao propadanje zuba, jedna je od najraširenijih kroničnih bolesti ljudi (Selwitz i sur., 2007), a istaknuti uzročnik je bakterija *Streptococcus mutans* koja se smatra najkariogenijim oralnim mikroorganizmom (Struzycka, 2014). Najčešći dentalni oportunistički patogeni su pripadnici roda *Streptococcus* (Hardie i Whiley, 1997). Osim dentalnih bolesti streptokoki su uzročnici i mnogih drugih, čak i po život opasnih bolesti, a neki od mnogobrojnih primjera su *Streptococcus intermedius* koji je, uz zubni karijes, uzročnik i meningitisa (upale moždane ovojnice) (Mishra i Fournier, 2013) te *Streptococcus sanguinis* glavni uzročnik infektivnog endokarditisa (upale unutarnjeg dijela srca) (Xu i sur., 2007). Osim bakterijskog roda *Streptococcus*, oralne patogene pronalazimo i u fungima roda *Candida*. Medicinski značaj ima sedam vrsta ovog roda od kojih je najvažnija i najznačajnija *Candida albicans* (McCullough i sur., 1996). Mnogi faktori utječu na formiranje karijesa od nedovoljne informiranosti, loše oralne higijene, siromaštva i nedovoljne izloženosti fluoru do ostalih fizičkih, bioloških, okolišnih i bihevioralnih čimbenika (Marsh, 2010). Tradicionalno je poznato da u prirodi možemo pronaći biološki aktivne supstance koje pozitivno djeluju na brojne bolesti, tako je otkriveno i da alkoholni ekstrakt kadulje, kao sredstvo za ispiranje usta, uvelike pomaže kod sprječavanja nastanka mnogih bolesti usne šupljine (Narayanan i Thangavelu, 2015). Kadulja je višegodišnji polugrm s drvenastom stabljikom i korijenom, pripada rodu *Salvia*, a najpoznatija i najkorištenija je ljekovita kadulja (*Salvia officinalis* L.). Istraživanja pokazuju da *S. officinalis* ima brojne pozitivne učinke na ljudsko zdravlje. Kemijski sastav eteričnog ulja ove biljke je raznolik. Posebno se ističu spojevi poput flavonoida i polifenola koji posjeduju jaka antioksidativna i antibakterijska svojstva pa samim time služe za uklanjanje slobodnih radikala (Hamidpour i sur., 2014). Ekstrakcije kadulje se najčešće provode koristeći smjesu vode i etanola (Durling i sur., 2007). Ekstrakt kadulje sprječava nastanak karijesa u usnoj šupljini, a smatra se i dobrom, prirodnom, zamjenom za konzervanse koji se koriste u prehrambenoj industriji (Hayouni i sur., 2008). Cilj ovoga rada bio je provesti ekstrakciju ukupnih polifenola iz kadulje *Salvia officinalis* L. u vodeni ekstrakt, te testirati različite koncentracije vodenog ekstrakta ukupnih polifenola na rast četiri bakterijska uzročnika dentalnih oboljenja: *Streptococcus mutans* DSM 20523, *Streptococcus sanguinis* DSM 20068, *Streptococcus intermedius* DSM 20573 te *Candida albicans* 8.

## 2. TEORIJSKI DIO

### 2.1 Dentooralno zdravlje

Dentalno zdravlje ljudi jedno od javnozdravstvenih problema širom svijeta. Neke od najčešćih bolesti izazvane oralnim bakterijama su zubni karijes i parodontalna bolest, no zbog istih bakterijskih uzročnika može doći i do upale mozga, crijeva ili jetre, vaginitisa i ostalih takozvanih „polimikrobnih“ bolesti (Kreth i sur., 2005). Karijes u ranom djetinjstvu dobije 600 milijuna djece na globalnoj razini što je itekako zabrinjavajuće s obzirom na činjenicu da je to moguće spriječiti (Ramos-Gomez i sur., 2020). Pravilna dentalna higijena i redovit odlazak stomatologu ključni su kod sprječavanja nastanka zubnog karijesa i istovremeno omogućavaju rano otkrivanje bilo kakvih drugih nepravilnosti dok su još u ranim fazama. Salama i sur. (2020) te Ramos-Gomez i sur. (2020) u svom istraživanju navode da karijes kod djece, ako se ne liječi na vrijeme, može rezultirati jakim bolovima, infekcijom i drugim problemima koji imaju negativan i dugotrajan učinak na kognitivni razvoj. Ljudi su skloni dobivanju karijesa i ostalih bolesti usne šupljine tijekom cijelog životnog vijeka (Selwitz i sur., 2007). Postoje dokazi koji ukazuju da su žene sklonije dobivanju karijesa u odnosu na muškarce što je povezano sa sastavom sline, količinom izlučene sline i hormonalnom fluktuacijom (Martinez-Mier i Zandona, 2013). Uočeno je da se u razvijenim zemljama smanjuje učestalost pojave ove bolesti (Struzycka, 2014; Ramos-Gomez i sur., 2020). Neki od razloga poboljšanja oralnog zdravlja u tim zemljama je zdrava i uravnotežena prehrana koja ima smanjen udio saharoze, fluoriranje vode, upotreba paste za zube s fluoridom i intenzivna edukacija ljudi o važnosti oralnog zdravlja (Struzycka, 2014). Znanstveno je dokazano da fluor sprječava nastanak karijesa (Martinez-Mier i Zandona, 2013) zbog čega se svakodnevna upotreba fluoridne paste za zube smatra glavnim razlogom smanjenja pojave karijesa u svijetu u posljednjim desetljećima (Pitts i sur., 2017). Ova neravnomjerno raspoređena bolest, kao i ostale dentalne bolesti mogu se spriječiti i s poboljšanjem kvalitete života uključujući i financijske čimbenike života (Pitts i sur., 2017).

Postoje mnogi mikroorganizmi koji su prirodno prisutni u mikroflori zdravih ljudi i životinja te su uključeni u njihov metabolizam. Na površini ljudske sluznice prirodno je prisutna autohtona mikroflora koja održava ekološku ravnotežu između različitih vrsta mikroorganizama. U ravnotežnom stanju autohtona mikroflora ima važnu ulogu u zaštiti domaćina od raznih vanjskih patogena. Navedena ravnoteža uvjetovana je nizom čimbenika poput onih okolišnih i bioloških. Ako dođe do promjena kod nekih od čimbenika, prirodno uspostavljena ravnoteža se narušava te postaje temelj razvoja mnogih zdravstvenih poremećaja, nerijetko opasnih po život.

## **2.2. Usna šupljina**

Mikroorganizme koji se nalaze u ljudskoj usnoj šupljini nazivamo oralnom mikroflorom, oralnom mikrobiotom, a u posljednje vrijeme oralnim mikrobiomom (Dewhirst i sur., 2010). Usna šupljina je glavni ulaz mikroorganizmima u ljudsko tijelo. Hrana ulazi kroz usta gdje se miješa sa slinom i odlazi do gastrointestinalnog trakta. Na putu do pluća zrak prolazi kroz nos i usta. Sve navedeno povećava vjerojatnost da će se mikroorganizmi koji su kolonizirali usnu šupljinu proširiti i na ostale dijelove tijela (Dewhirst i sur., 2010). Oralni patogeni mogu prouzročiti niz raznovrsnih bolesti od karijesa, paradontitisa (upala desni), tonzilitisa i endodontske infekcije (upala korijena zuba) do brojnih sistemskih bolesti poput upale pluća, moždanog udara i kardiovaskularnih bolesti (Dewhirst i sur., 2010).

Sama usna šupljina uključuje nekoliko različitih mikrobnih staništa uključujući zube, jezik, usne, obraz, tvrdo i meko nepce, priloženu gingivu (zubno meso) te gingivalni sulkus (Dewhirst i sur., 2010). Sastav oralne mikroflore značajno varira na različitim površinama unutar usne šupljine (Marsh, 2010). Usna šupljina predstavlja dinamičan i raznolik ekosustav ljudskog tijela za koji je karakteristična česta promjena okolišnih uvjeta poput promjene pH vrijednosti ili dostupnosti hranjivih tvari mikroorganizmima (Struzycka, 2014). Ispunjena je žlijezdama slinovnicama koje luče slinu. S obzirom na to da slina predstavlja glavni izvor hranjivih tvari za mikroorganizme, njen sastav je izuzetno važan jer o njemu ovisi količina mikroorganizama prisutnih u usnoj šupljini (Nasidze i sur., 2009; Selwitz i sur., 2007). Slina ima važnu ulogu i u održavanju oralnog pH na neutralnoj razini što je optimalno za rast većine mikroorganizama povezanih s oralnim zdravljem (Marsh, 2010). Slina se prvenstveno luči u svrhu zaštite tijela od prodora mikroorganizama jer ima antifungalno, antibakterijsko i antivirusno djelovanje. Kod osoba koje imaju izrazito smanjenu funkciju lučenja sline dolazi do povećanja razvoja karijesa (Ten Cate, 2001; Martinez-Mier i Zandona, 2013).

## **2.3. Zubni karijes**

Zubni karijes je mikrobna bolest koju karakterizira otapanje i dekalifikacija strukture zuba odnosno propadanje zuba. Nastaje kada bakterije u plaku, razgrađujući šećere iz hrane, proizvode kiseline koje dalje mogu uzrokovati demineralizaciju površine zuba (Struzycka, 2014). Najčešći je uzrok gubitka zuba i boli u usnoj šupljini, a nastaje stvaranjem biofilмова na površini zuba. Biofilmovi su definirani kao polimikrobne zajednice u kojima se raznovrsne bakterijske vrste natječu za ograničen prostor i hranjive tvari (Kreth i sur., 2005). Tijekom formiranja biofilмова dolazi i do proizvodnje izvanstaničnih polisaharida što je izuzetno važno jer izvanstanični polisaharidi imaju najvažniju ulogu u zaštiti biofilma od obrambenog sustava



domaćina. Hidrofilne je prirode pa štiti bakterije od fagocitoze (Strużycka, 2014). Iako mnoge vrste sudjeluju u proizvodnji izvanstaničnih polisaharida ključnu ulogu ipak ima poznati oralni kariogeni patogen *Streptococcus mutans*. Današnja istraživanja temelje se na otkrivanju i razumijevanju rada molekularnih mehanizama koji omogućavaju homeostazu odnosno suživot različitih mikroorganizama u istom staništu. Kad bi se to u potpunosti razjasnilo, otkrio bi se i najefikasniji način liječenja polimikrobnih bolesti. Najbolji model za proučavanje interakcija među mikroorganizmima koji rezultiraju njihovim suživotom je proučavanje zubnog biofilma (Marsh, 2010) jer ga karakterizira velika mikrobna raznolikost (500 bakterijskih vrsta), visoka gustoća stanica (10<sup>11</sup> stanica/g [mokra težina]) i jer je usna šupljina pristupačno mjesto uzimanja uzoraka (Kreth i sur., 2005). Zubni plak je među prvima opisan kao biofilm (Strużycka, 2014).

## **2.2. Rod *Streptococcus***

Rod *Streptococcus* karakteriziraju Gram-pozitivne vrste, okruglih stanica koje se grupiraju u parove ili tvore lance. Nesorogene su, fakultativno anaerobne, katalaza negativne, homofermentativne i imaju složene prehrabene potrebe (Hardie i Whiley, 1997). Prije se smatralo da vrste roda *Streptococcus* i *Enterococcus* pripadaju istom rodu, ali je sada jasno da su to dva različita roda, različitih karakteristika koje spadaju u skupinu bakterija mliječne kiseline. Rod *Streptococcus* podijeljen je na 49 vrsta i 8 podvrsta, od kojih je čak 35 identificirano kao uzročnik opasnih infekcija kod ljudi (Krzyściak i sur., 2013). Streptokoki su rasprostranjeni uglavnom na mukoznim površinama čovjeka i životinja, ali može ih se naći i u vodi, tlu te na biljkama.

Mnoge su vrste u određenim okolnostima sposobne prouzročiti razne bolesti zbog čega su poznate kao oportunistički patogeni, najpoznatiji primjer su *Streptococcus pyogenes* i *Streptococcus pneumoniae* (Hardie i Whiley, 1997). Infekcije izazvane streptokokima predstavljaju jedan od važnih problema s kojima se suočava suvremena medicina, jer se javlja sve veća rezistentnost vrsta na postojeće antibiotike. Patogenost bakterija roda *Streptococcus* povezana je i s vrstama za koje se smatra da su prirodno prisutne kao dio mikroflore kod ljudi i životinja (Krzyściak i sur., 2013). Patogeni streptokoki su podijeljeni u tri skupine. Prvu skupinu predstavljaju vrste koje uobičajeno izazivaju infekcije kod ljudi, u drugu skupinu spadaju komenzalne, a u treću epizootske vrste koje samo u određenim uvjetima uzrokuju bolesti (Krzyściak i sur., 2013). Neke od bolesti koje uzrokuju streptokoki su upala pluća, mozga ili grla, sepsa, endokarditis i mnoge druge. Između svih bolesti uzrokovanih streptokokima karijes je ona koja je najčešća kod djece, a javlja se čak do pet puta češće od

sljedeće najrasprostranjenije bolesti odnosno astme (Krzyściak i sur., 2013; Peterson i sur., 2013).

### 2.2.1. *Streptococcus mutans*

Bakterijski patogen koji je visoko specijaliziran za određenu nišu okoliša – usnu šupljinu. Prirodno je prisutan u zubnom biofilmu i autohtonj mikroflori usne šupljine, međutim u određenim uvjetima ispoljava patogenost i uzrokuje štetu domaćinu (Kreth i sur., 2005). Navedenim ispoljavanjem patogenosti postaje primarni uzročnik karijesa zuba (propadanje zuba) te se smatra najkariogenijim oralnim streptokokom (Ajdic i sur., 2002; Ahn i sur., 2008). Patogenost *S. mutans* prvenstveno je povezana sa sposobnošću adhezije na stanice domaćina (Krzyściak i sur., 2013). Posebno je učinkovit u stvaranju biofilma na tvrdim tkivima usne šupljine, a da bi uzrokovao karijes potrebna je prisutnost i drugih bakterijskih vrsta. Formiranje biofilma je složen proces koji uključuje brojne bjelančevine. Prvi korak je prijanjanje *S. mutans* na zubne površine, a posredovan je mehanizmima ovisnim o saharozi ili pak mehanizmima koji su neovisni o prisutnosti saharoze u usnoj šupljini (Ahn i sur., 2008).

### 2.2.2. *Streptococcus intermedius*

Komenzalni mikroorganizam koji pripada skupini „*Streptococcus milleri group*“ (SMG) (Mishra i Fournier, 2013). Navedena grupa je u prošlosti nosila razne nazive i bila je smatrana jednom vrstom. Danas su pripadnici SMG razdvojeni u 3 različite vrste točnije na *Streptococcus intermedius*, *Streptococcus constellatus* i *Streptococcus anginosus* (Clarridge i sur., 2001). Jedna od najupečatljivijih karakteristika vrsta SMG je njihova sklonost izazivanju lokalnih gnojnih upala u potkožnom tkivu, ali i u dubokim tkivima i organima.

*S. intermedius* je fakultativno anaerobna patogena bakterija koja asimptomatski kolonizira dio tijela (Fei i sur., 2016). Obično se povezuje s raznim infekcijama glave, vrata, usne šupljine i dišnih puteva (Clarridge i sur., 2001; Mishra i Fournier, 2013). Najčešće bolesti izazvane ovom bakterijom su upala jetre, dišnih puteva ili pluća te meningitis.

### 2.2.3. *Streptococcus sanguinis*

*Streptococcus sanguinis* je Gram-pozitivna bakterija koja je prirodno prisutna u autohtonj mikroflori usne šupljine (Xu i sur., 2007). Primijećeno je da kolonizira usnu šupljinu tek rođene djece i na taj način sprječava kolonizaciju *Streptococcus mutans* (Kreth i sur., 2005). Zbog

toga se čak smatra korisnom bakterijom koja sudjeluje u zaštiti domaćina. Uočeno je da se izravno veže na zube obložene slinom, a smatra se da to radi raznovrsnim mehanizama. Svojim vezanjem na zube olakšava vezanje drugih oralnih mikroorganizama (osim spomenutog *Streptococcus mutans*) koji također koloniziraju površinu zuba formirajući zubni plak što doprinosi razvoju karijesa i parodontalne bolesti (Xu i sur., 2007). Kao većina dentooralnih streptokoka i ova bakterija pokazuje sposobnost alfa-hemolize (razgrađuje hemoglobin, dok eritrocit ostaje cijeli) na krvnom agaru (Xu i sur., 2007). Navedena karakteristika je povezana sa sposobnošću viridans streptokoka da oksidiraju hemoglobin u eritrocitima izlučivanjem H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Xu i sur., 2007; Kreth i sur., 2005).

Osim u usnoj šupljini *Streptococcus sanguinis* može prouzročiti probleme i u ostalim dijelovima tijela. Najčešći je uzročnik infektivnog endokarditisa (upale unutarnjeg dijela srca) koji predstavlja opasnost po život, a poznat je i kao jedan od patogena krvožilnog sustava općenito (Xu i sur., 2007). Opasnost koju predstavlja ovaj patogen svakim je danom sve veća jer je sve izraženija otpornost bakterija na antibiotike.

### **2.3. Rod *Candida***

Rod *Candida* uključuje karakteristično bijele asporogene kvasce sposobne formirati pseudohife. Medicinski značaj ima sedam vrsta ovog roda *C. tropicalis*, *C. glabrata*, *C. parapsilosis*, *C. stellatoidea*, *C. krusei*, *C. kyfer* te najvažnija i najznačajnija *C. albicans* (McCullough i sur., 1996). Uglavnom su komenzalne gljivice koje se prirodno nalaze na površinama sluznice gastrointestinalnog i genitourinarnog trakta (Finkel i Mitchell, 2010). Ako dođe do slabljenja imunološkog sustava domaćina navedeni organizmi mogu uzrokovati razne infekcije. Zbog sve veće otpornosti patogena na lijekove, danas postoji potreba za novim antifungalnim agensima za učinkovito liječenje infekcijama izazvanih gljivičnim patogenom *C. albicans* (Zida i sur., 2017).

#### **2.3.1. *Candida albicans***

*Candida albicans* je dimorfni kvasac prepoznat kao ljudski patogen čija važnost raste iz godine u godinu. Najpoznatiji je član i najčešće izolirana vrsta roda *Candida*. Bolesti čiji je uzročnik *Candida albicans* kreću se u rasponu od relativno slabijih stanja bolesti, kao što su oralna i genitalna kandidijaza, do sistemskih infekcija kod već bolesnih ljudi koje mogu biti opasne po život (McCullough i sur., 1996). Bolesti nastaju kao rezultat sposobnosti *C. albicans* da stvara biofilm (Finkel i Mitchell, 2010). U istraživanju koje su proveli Xiao i sur., 2017 dokazano je da

je učestalost pojave oralnog *C. albicans* značajno veća kod djece koja imaju karijes nego kod djece bez karijesa. Isto tako dokazali su da djeca s oralnim *C. albicans* imaju veće izgleda za dobivanje karijesa u usporedbi s djecom bez *C. albicans*.

## 2.4. Kadulja

Kadulja pripada rodu *Salvia*, koji je najveći iz porodice *Lamiaceae*. Rod *Salvia* uključuje oko 900 vrsta rasprostranjenih u cijelom svijetu (Hamidpour i sur., 2014). Neke vrste su ekonomski izrazito važne pošto se koriste kao začini te arome u parfumerijskoj i kozmetičkoj industriji. Osim najpoznatije i najkorištenije ljekovite kadulje (*Salvia officinalis* L.), ističu se i livadna kadulja (*Salvia pratensis* L.), stepska kadulja (*Salvia nemorosa* L.) te pršljenasta kadulja (*Salvia verticillata* L.). Mnoge vrste *Salvia*, uključujući *Salvia officinalis* (uobičajena kadulja), porijeklom su iz mediteranskih zemalja, najčešće oko područja Sredozemnog mora, ali se uzgajaju širom Europe. Kadulja (*Salvia officinalis*) je višegodišnji polugrm s drvenastom stabljikom i korijenom. Raste do visine od 30 do 70 cm. Karakterizira je sivozelena boja koja je posljedica gustog sloja dlaka kojima je prekrivena površina cijele biljke.

Kadulja je dobro poznata biljka, samo ime govori koliku je važnost stoljećima imala u narodnoj medicini. Naime, latinski naziv *Salvia* nastao je od latinske riječi „salvare“ što znači „spasiti“ (Moreira i sur., 2013; Durling i sur., 2007). Raznim istraživanjima dokazano je da su, od svih korištenih začina, oni iz porodice *Lamiaceae* najmoćniji prirodni antioksidansi (Lu i Yeap Foo, 2001). Pripada skupini aromatičnih biljaka koje se u današnje vrijeme smatraju najvažnijim izvorom za ekstrakciju spojeva snažnog antioksidativnog djelovanja (Bozin i sur., 2007). Zbog otpornosti na antibiotike, koje su neki mikroorganizmi stekli, raste zabrinutost potrošača o sigurnosti hrane i utjecaju sintetičkih aditiva na zdravlje. To je dovelo do velike zainteresiranosti javnosti i znanstvenika za antimikrobne biljne proizvode. Smatra se da su eterična ulja ljekovitih biljaka najvažnija antimikrobna sredstva koje biljke posjeduju, a mogu imati i antioksidativno te protuupalno djelovanje (Longaray Delamare i sur., 2005). Istraživanja pokazuju da *S. officinalis* poboljšava pamćenje, kao i kognitivne sposobnosti općenito. S povećanjem doze utječe na raspoloženje pri čemu se povećava budnost te rastu osjećaji smirenosti i zadovoljstva (Hamidpour i sur., 2014). Razna istraživanja sugeriraju da vrste *Salvia*, pored liječenja manjih uobičajenih bolesti, mogu potencijalno poslužiti za nove prirodne tretmane koji olakšavaju ili liječe mnoge ozbiljne i po život opasne bolesti poput depresije, demencije (Durling i sur., 2007), pretilosti, dijabetesa, srčanih bolesti pa čak i raka (Hamidpour i sur., 2014).

Kemijski sastav eteričnih ulja biljaka roda *Salvia* je raznolik, a ovisi o genetskim, klimatskim, sezonskim i okolišnim faktorima. Unatoč kemijskoj raznolikosti neki kemijski spojevi poput flavonoida, terpenoida i esencijalnih masnih kiselina su prisutni u ulju (Hamidpour i sur., 2014). Kadulja je također prirodni izvor flavonoida i polifenolnih spojeva (karboksilna kiselina, rosmarinska kiselina i kofeinska kiselina) koji posjeduju antioksidativna i antibakterijska svojstva te služe za uklanjanje slobodnih radikala (Hamidpour i sur., 2014). U ulju obične kadulje (*S. officinalis*) identificirano je 28 komponenti od kojih su u najvećoj mjeri prisutni 1,8-cineol, kamfor,  $\alpha$ -tujon,  $\beta$ -tujon, borneol i viridiflorol (Longaray Delamare i sur., 2005; Hamidpour i sur., 2014). U istraživanju koje su proveli Longaray Delamare i sur., (2005) potvrđeno je da je antimikrobna aktivnost ispitivanih ulja izraženija protiv Gram-pozitivnih nego protiv Gram-negativnih bakterija. Gram-negativne bakterije pružaju veću otpornost zbog prisutnosti vanjske fosfolipidne membrane koja je gotovo nepropusna za lipofilne spojeve. Fenolne kiseline koje su prisutne u *S. officinalis* imaju posebno snažno djelovanje protiv bakterijske vrste *Streptococcus aureus* (Narayanan i Thangavelu, 2015). Ulje obične kadulje odlikuje i antikandidalno djelovanje uz inhibiciju adhezije *Candida albicans* na površine (Narayanan i Thangavelu, 2015).

Beheshti-Rouy i sur. 2015. godine proveli su istraživanje kojim su dokazali da se ispiranjem usne šupljine tekućinom koja sadrži ekstrakt kadulje sprječava nastanak plaka, a samim time i karijesa. Koristeći alkoholni ekstrakt kadulje kao sredstvo za ispiranje usta također dolazi do smanjenja infekcija grla, upale desni i ostalih upalnih procesa u usnoj šupljini (Narayanan i Thangavelu, 2015). Istraživanjem koje su proveli Moreira i sur. (2013) analitički je potvrđeno da se ekstrakt *S. Officinalis* može koristiti kao aktivna supstanca u proizvodima za njegu oralne higijene kao što su paste za zube i vodice za ispiranje usta. Na taj bi se način razvila nova, ali učinkovita antimikrobna sredstva. S obzirom na antimikrobna svojstva alkohola u ovom istraživanju pozornost je usmjerena na aktivne supstance iz kadulje, stoga je rađen vodeni ekstrakt kako bi se eliminirala antimikrobna aktivnost samog otapala.

### 3. MATERIJALI I METODE

#### 3.1 Materijali

##### 3.1.1. Mikroorganizmi

Za potrebe rada korištena su četiri soja patogenih mikroorganizama *Streptococcus mutans* DSM 20523, *Streptococcus intermedius* DSM 20573, *Streptococcus sanguinis* DSM 20068 te *Candida albicans* 8. Svi navedeni sojevi mikroorganizama pohranjeni su u Zbirci mikroorganizama Laboratorija za opću mikrobiologiju i mikrobiologiju namirnica, Zavoda za biokemijsko inženjerstvo, Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta, Sveučilišta u Zagrebu.

##### 3.1.2. Podloge za uzgoj mikroorganizama

Za uzgoj mikroorganizama: *Streptococcus mutans* DSM 20523, *Streptococcus intermedius* DSM 20573 i *Streptococcus sanguinis* DSM 20068 korišten je M-17 bujon (M17-broth; Biolife, Milano, Italija). Dok je za uzgoj gljivice *Candida albicans* 8 korišten sladni bujon (Malt extract broth; Biolife, Milano, Italija).

##### 3.1.3. Kemikalije

- Folin Ciocalteu reagens (Merck, Darmstadt, Njemačka)
- M-17 bujon (M17-broth; Biolife, Milano, Italija)
- *Salvia officinalis* L. (dobavljač: SUBAN, Samobor, RH)
- sladni bujon (Malt extract broth; Biolife, Milano, Italija)
- zasićena otopina Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>

##### 3.1.4. Aparatura i pribor

- automatske pipete (Eppendorf, Hamburg, Njemačka)
- Bunsenov plamenik
- čitač mikrotitarskih pločica Sunrise (Tecan, Grödig, Austrija)
- ekstraktor ASE Dionex© 350 (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, SAD)
- polistirenske mikrotitarske pločice (Falcon, Amsterdam, Nizozemska)
- vibromješač EV-102 (Tehtnica, Železniki, Slovenija)
- 0,22 µm filter (Sartorius, Goettingen, Njemačka)

## 3.2. Metode

### 3.2.1. Uzgoj mikroorganizama

- Uzgoj bakterijskih sojeva *Streptococcus mutans* DSM 20523, *Streptococcus intermedius* DSM 20573 i *Streptococcus sanguinis* DSM 20068 proveden je sterilnim naciepljivanjem u 5 ml M-17 bujona te inkubacijom u termostatu na 37°C kroz 24 - 48h.
- Uzgoj *Candida albicans* 8 proveden je sterilnim naciepljivanjem u 5 ml tekućeg sladnog bujona te inkubacijom u termostatu na 30°C kroz 24-48 sati.

### 3.2.2. Vodena ekstrakcija kadulje

Uzorak kadulje (*Salvia officinalis* L.) ekstrahiran je pomoću vode kao otapala. Ekstrakcija je provedena u ekstraktoru ASE Dionex© 350 pri temperaturi od 80°C i statičkom vremenu ekstrakcije od 5 minuta. Opisani postupak je ponovljen dva puta odnosno ekstrakcija je napravljena u 2 ciklusa.

### 3.2.3. Spektrofotometrijsko određivanje ukupnih fenola:

Postupak spektrofotometrijskog određivanja ukupnih fenola u vodenom ekstraktu kadulje napravljen je na sljedeći način: U staklenu epruvetu otpipetirano je redom 100 µL ekstrakta, 200 µL Folin Ciocalteu reagensa i na kraju 2 mL destilirane vode. Nakon 3 minute dodan je 1 mL zasićene otopine natrijeva karbonata te je sve zajedno promiješano. Uzorci su potom termostatorani u kupelji od rotavapora kroz 25 minuta na temperaturi od 50°C. Nakon toga izmjerena je apsorbancija odnosno optička gustoća otopine pri valnoj duljini od 765 nm. Na isti je način pripremljena i slijepa proba kod koje je, umjesto ekstrakta, dodano otapalo za ekstrakciju odnosno destilirana voda (Shortle i sur., 2014). Koncentracija ukupnih fenola izračunava se prema jednadžbi baždarnog pravca [1].

$$Y (\text{apsorbancija pri } 765 \text{ nm}) = 0,0035 \times X (\text{koncentracija galne kiseline u mg/L}) \quad [1]$$

### 3.2.4. Određivanje antimikrobne aktivnosti ekstrakta kadulje turbidimetrijskom metodom

Testirane su 4 koncentracije ukupnih fenola (20 mg/ml, 80 mg/ml, 200 mg/ml i 300 mg/ml) vodenog ekstrakta kadulje na 4 soja patogena: *Streptococcus mutans* DSM 20523, *Streptococcus intermedius* DSM 20573, *Streptococcus sanguinis* DSM 20068 te *Candida albicans* 8. Vodeni ekstrakt kadulje je prije postavljanja pokusa filtriran kroz 0,22 µm filtere (Sartorius) kako bi se uklonila eventualna kontaminacija.

Za određivanje antimikrobne aktivnosti prema patogenima roda *Streptococcus* u jažice mikrotitarske pločice dodano je 160 µL medija za uzgoj patogena, 80 µL vodenog ekstrakta kadulje (razrijeđeni ekstrakti pripremljeni su kako bi raspon koncentracija odgovarao ukupnom volumenu jažice) i 10 µL suspenzije prethodno uzgojenih patogena.

Za određivanje antimikrobne aktivnosti prema *Candida albicans* 8 u jažice mikrotitarske pločice dodano je 160 µL medija za uzgoj patogena, 80 µL vodenog ekstrakta kadulje. Kontrole su činili uzorci pripremljeni bez dodatka ekstrakta kadulje tj. zamijenjeni sterilnom vodom koja je otapalo ekstrakta kadulje, a slijepe probe su bili uzorci bez dodanih mikroorganizama. Postavljena mikrotitarska ploča s uzorcima inkubirana je na 37°C kroz 48h, te je mjerena apsorbancija pri valnoj duljini od 620 nm pomoću čitača mikrotitarskih pločica (Sunrise, Tecan) u vremenskim intervalima 0 h, 4h, 24h i 48h.

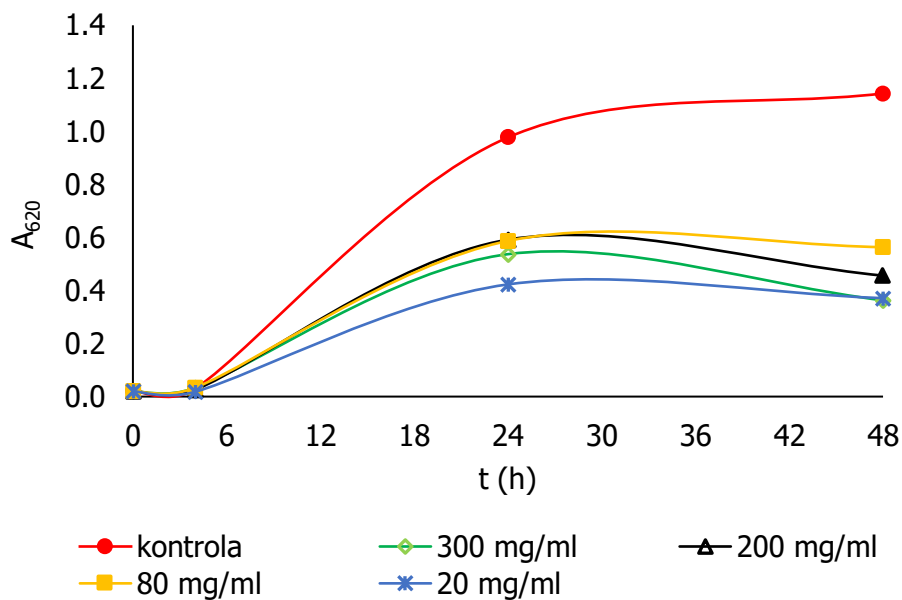
Postotak inhibicije rasta patogena izračunao se prema jednadžbi [2].

$$\%inhb = \left(1 - \frac{A1 \text{ (apsorbancija uzorka)}}{A0 \text{ (apsorbancija kontrole)}}\right) \times 100 \quad [2]$$

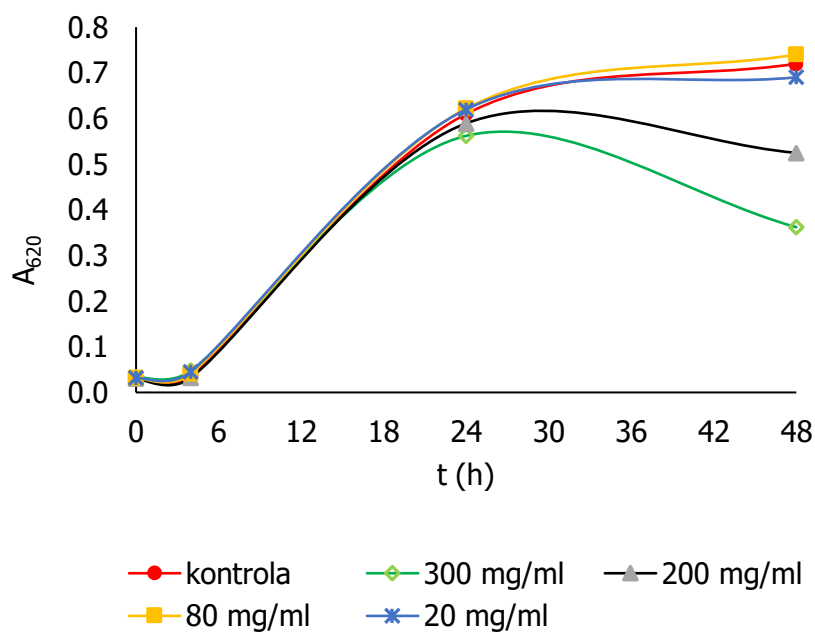


#### 4. REZULTATI I RASPRAVA

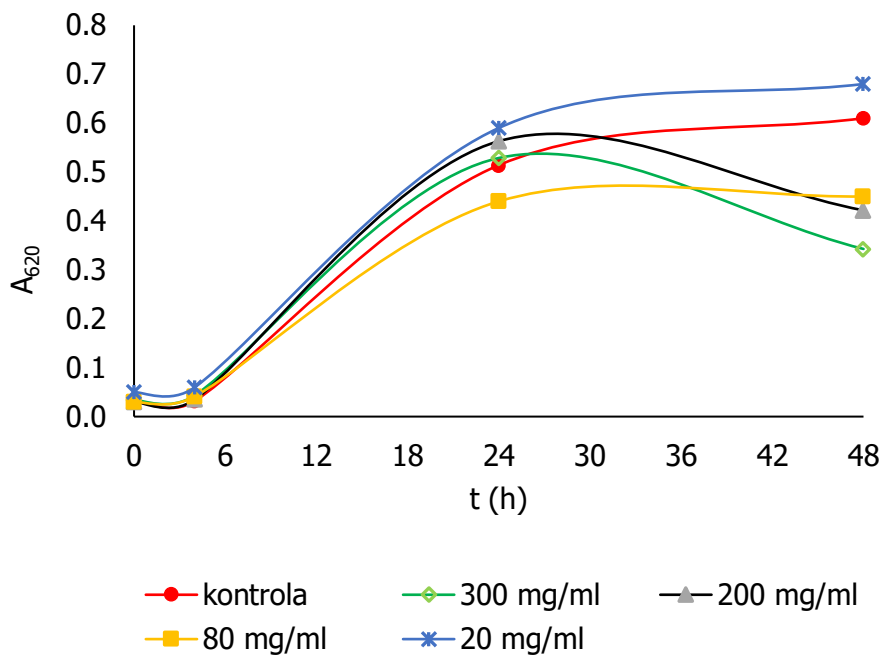
Provedena je vodena ekstrakcija kadulje i dobiven je ekstrakt kojem je spektrofotometrijski određena ukupna koncentracija fenola koja je iznosila 497,79 mg/L. Proveden je uzgoj čestih dentalnih patogena: *Streptococcus mutans* DSM 20523, *Streptococcus intermedius* DSM 20573, *Streptococcus sanguinis* DSM 20068 i *Candida albicans* 8. Određena je ukupna antimikrobna aktivnost različitih koncentracija vodenog ekstrakta kadulje (20 mg/ml, 80 mg/ml, 200 mg/ml i 300 mg/ml) na rast spomenutih dentalnih patogena. Rezultati inhibicije različitih koncentracija ekstrakta kadulje na *Streptococcus intermedius* DSM 20573 prikazan je na slici 1. Rezultati ukazuju da je došlo do inhibicije rasta tijekom 48h uzgoja koja je u 48. satu bila između 53,11% i 67,54%. Ovisnost koncentracije ekstrakta kadulje o inhibiciji kod ovog mikroorganizma prema dobivenim rezultatima nije linearna. Rezultati inhibicije *Streptococcus mutans* DSM 20523 prikazani su na slici 2. Inhibicija je najveća pri najvišoj koncentraciji polifenola od 300 mg/ml i iznosi 49,72% u 48h mjerenja. Značajna inhibicija je i pri koncentraciji od 200 mg/ml i iznosila je 27,08%. Ostale, niže koncentracije nisu značajno inhibirale rast ovog soja. Slika 3. prikazuje stupanj inhibicije rasta dentalnog patogena *Streptococcus sanguinis* DSM 20068 u prisutnosti vodenog ekstrakta kadulje. Rezultati prikazuju da je inhibicija ovisna o koncentraciji polifenola i značajna inhibicija je prikazana kod najviše koncentracije polifenola od 300 mg/ml, dok je pri najnižoj koncentraciji suprotno inhibiciji prikazan i porast broja patogena što sugerira da u odsutnosti inhibicije čak može doći i do stimulacije rasta testiranog patogena. Inhibicija rasta *Candida albicans* 8 prikazana je na slici 4. Iz rezultata je vidljivo da je inhibicija ovisna o koncentraciji ukupnih polifenola pa je pri najvećoj koncentraciji inhibicija maksimalna i u 48h iznosi 85.07%, dok pri najnižoj koncentraciji od 20 mg/ml inhibicija nije zabilježena.



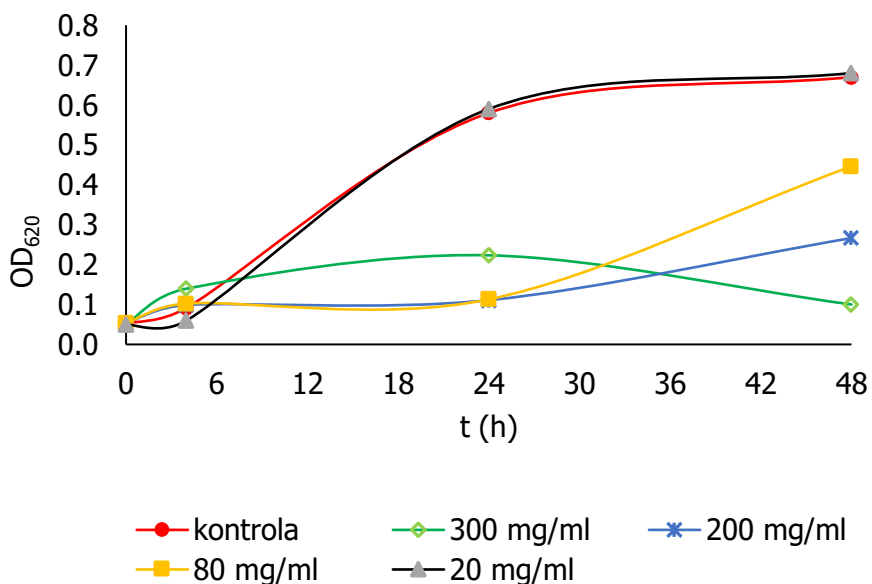
**Slika 1.** Krivulja rasta dentalnog patogena *Streptococcus intermedius* DSM 20573 u prisutnosti različitih koncentracija vodenog ekstrakta kadulje.



**Slika 2.** Krivulja rasta dentalnog patogena *Streptococcus mutans* DSM 20523 u prisutnosti različitih koncentracija vodenog ekstrakta kadulje.



**Slika 3.** Krivulja rasta dentalnog patogena *Streptococcus sanguinis* DSM 20068 u prisutnosti različitih koncentracija vodenog ekstrakta kadulje.



**Slika 4.** Krivulja rasta dentalnog patogena *Candida albicans* 8 u prisutnosti različitih koncentracija vodenog ekstrakta kadulje.

Uspješno je provedena vodena ekstrakcija polifenola iz kadulje te se korištenjem vodenog ekstrakta osiguralo uklanjanje antimikrobne aktivnosti organskih otapala što je omogućilo mjerenje antimikrobne aktivnosti prirodno prisutnih spojeva bez interferenata. Dobiveni rezultati ukazuju na inhibitorni potencijal vodenog ekstrakta kadulje na dentalne streptokoke i *Candidu albicans*. Rezultati se mogu usporediti s rezultatima Mitić-Ćulafić i sur. (2005) koji su demonstrirali izraženu antimikrobnu aktivnost hlapljivih komponenata dobivenih iz kadulje na *S. mutans* te smatraju da ulje kadulje ili frakcije od kojih se sastoji imaju potencijal u primjeni kontrole kontaminacije hrane. Također, istraživanje Beheshti-Rouy i sur. (2015) potvrđuje takvu aktivnost na humanim ispitanicima gdje je korištena vodica za usta koja je sadržavala ekstrakt kadulje te je značajno inhibirala uzročnika karijesa *S. mutans*. Studije antimikrobnog potencijala roda *Salvia* ukazuju na veliku varijabilnost, ovisno o osjetljivosti mikroorganizama i učinkovitosti ispitivanih spojeva. *S. officinalis* ima visok udio esencijalnih ulja, a značajno zastupljeni hlapljivi monoterpenoidi imaju dokazanu antibakterijsku aktivnost (Nadir i sur., 2013). Dosadašnja istraživanja su demonstrirala veću osjetljivost Gram pozitivnih bakterija na prisutna esencijalna ulja kadulje (Kamatou i sur., 2005) što ukazuje da je građa stanične membrane povezana s mehanizmima antimikrobne aktivnosti. Istraživanja biljnih ekstrakta koja povezuju antimikrobnu aktivnost na streptokoke i *Candidu albicans* proveli su Jebashree i sur. (2011) te pokazali antimikrobnu aktivnost ekstrakta biljaka *P. guajava* i *M. elengi* na navedene patogene. Istraživana aktivnost ovisila je o korištenom otapalu. Utjecaj otapala je vrlo važan faktor kod proučavanja inhibitorne aktivnosti na mikroorganizme jer značajno utječe na mikrobnu fiziologiju te otežava proučavanje testiranih komponenata jer je u ponekim slučajevima nemoguće isključiti utjecaj otapala čak niti korištenjem kontrolnog uzorka. Iz navedenih razloga u ovom radu korišten je vodeni ekstrakt kadulje stoga je kao kontrola korištena voda koja je omogućila promatranje utjecaja ekstrakta kadulje bez interferencije otapala. Rezultati ovog rada ukazuju da je kod većine ispitivanih mikroorganizama inhibicija ovisila o koncentraciji ukupnih polifenola u ekstraktu, no s obzirom na iznimku otvorena je mogućnost kompleksnijih utjecaja. Obzirom na nedostatak literature o utjecaju vodenog ekstrakta kadulje na dentalne patogene nije moguće procijeniti mehanizam djelovanja na mikroorganizme kao ni pretpostaviti sličnosti u tom mehanizmu koje bi jednoznačno objasnile djelovanje na streptokoke i funge korištene u ovom radu. Također, potrebne su dodatne analize dobivenog ekstrakta polifenola kako bi se grupirale i odvojile komponente što bi vodilo ponavljanju eksperimenata sa standardnim otopinama detektiranih spojeva te boljem razumijevanju mehanizma djelovanja na patogene mikroorganizme. Obzirom na navedeno i prethodna istraživanja može se zaključiti da *Salvia officinalis* L. ima potencijal u suzbijanju dentalnih patogena te su potrebna daljnja istraživanja kako bi se mehanistički razumjele interakcije prisutnih komponenti i mikroorganizama uzročnika dentalnih oboljenja.

## 5. ZAKLJUČAK

1. Uspješno je provedena vodena ekstrakcija ukupnih polifenola iz kadulje *Salvia officinalis* L. te su testirane različite koncentracije vodenog ekstrakta na rast četiri dentalna patogena: *Streptococcus mutans* DSM 20523, *Streptococcus sanguinis* DSM 20068, *Streptococcus intermedius* DSM 20573 te *Candida albicans* 8.
2. Vodeni ekstrakt kadulje *Salvia officinalis* L. ima inhibitorni utjecaj na rast svih ispitivanih mikroorganizama.
3. Kod soja *Streptococcus intermedius* DSM 20573 najveći stupanj inhibicije je nakon 48 sati rasta pri koncentraciji vodenog ekstrakta kadulje od 20 mg/ml i iznosi 67,54%.
4. Stupanj inhibicije od 49,72% zabilježen nakon 48 sati rasta u prisutnosti 300 mg/ml vodenog ekstrakta kadulje je kod dentalnog patogena *Streptococcus mutans* DSM 20523.
5. Koncentracija vodenog ekstrakta kadulje od 300 mg/ml najbolja je u suzbijanju rasta patogena *Streptococcus sanguinis* DSM. Stupanj inhibicije rasta kod 48 sati rasta i navedenoj koncentraciji ekstrakta iznosi 43,77%.
6. Koncentracija vodenog ekstrakta kadulje od 300 mg/ml, nakon 48 sati rasta pokazuje najveći stupanj inhibicije rasta patogena *Candida albicans* 8 i iznosi 85,07%.

## 6. POPIS LITERATURE

1. Ahn, S.-J., Ahn, S.-J., Wen, Z. T., Brady, L. J., Burne, R. A. (2008) Characteristics of Biofilm Formation by *Streptococcus mutans* in the Presence of *Saliva*. *Infection and Immunity* **76(9)**: 4259–4268.
2. Ajdic, D., McShan, W. M., McLaughlin, R. E., Savic, G., Chang, J., Carson, M. B., Ferretti, J. J. (2002) Genome sequence of *Streptococcus mutans* UA159, a cariogenic dental pathogen. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **99(22)**: 14434–14439.
3. Beheshti-Rouy, M., Azarsina, M., Rezaie-Soufi, L., Alikhani, M. Y., Roshanaie, G., Komaki, S. (2015) The antibacterial effect of sage extract (*Salvia officinalis*) mouthwash against *Streptococcus mutans* in dental plaque: a randomized clinical trial. *Iranian journal of microbiology* **7(3)**: 173-177.
4. Belda-Ferre, P., Alcaraz, L. D., Cabrera-Rubio, R., Romero, H., Simón-Soro, A., Pignatelli, M., Mira, A. (2011) The oral metagenome in health and disease. *The ISME Journal* **6(1)**: 46–56.
5. Bozin, B., Mimica-Dukic, N., Samojlik, I., Jovin, E. (2007) Antimicrobial and Antioxidant Properties of Rosemary and Sage (*Rosmarinus officinalis* L. and *Salvia officinalis* L., *Lamiaceae*) Essential Oils. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **55(19)**: 7879–7885.
6. Clarridge J. E., III, Attorri, S., Musher, D. M., Hebert, J., Dunbar, S., (2001) *Streptococcus intermedius*, *Streptococcus constellatus*, and *Streptococcus anginosus* ("Streptococcus milleri Group") Are of Different Clinical Importance and Are Not Equally Associated with Abscess, *Clinical Infectious Diseases* **32(10)**:1511–1515.
7. Dewhirst, F. E., Chen, T., Izard, J., Paster, B. J., Tanner, A. C. R., Yu, W.-H., Wade, W. G. (2010) The Human Oral Microbiome. *Journal of Bacteriology* **192(19)**: 5002–5017.
8. Durling, N., Catchpole, O., Grey, J., Webby, R., Mitchell, K., Foo, L., Perry, N. (2007) Extraction of phenolics and essential oil from dried sage (*Salvia officinalis*) using ethanol–water mixtures. *Food Chemistry* **101(4)**: 1417–1424.
9. Fei, F., Mendonca, M.L., McCarry, B.E. et al. (2016) Metabolic and transcriptomic profiling of *Streptococcus intermedius* during aerobic and anaerobic growth. *Metabolomics* **12**: 46.
10. Finkel, J. S., Mitchell, A. P. (2010) Genetic control of *Candida albicans* biofilm development. *Nature Reviews Microbiology* **9(2)**: 109–118.
11. Hamidpour, M., Hamidpour, R., Hamidpour, S., Shahlari, M. (2014) Chemistry, Pharmacology, and Medicinal Property of Sage (*Salvia*) to Prevent and Cure Illnesses

- such as Obesity, Diabetes, Depression, Dementia, Lupus, Autism, Heart Disease, and Cancer. *Journal of Traditional and Complementary Medicine* **4(2)**: 82–88.
12. Hardie, J. M., Whiley, R. A. (1997) Classification and overview of the genera *Streptococcus* and *Enterococcus*. *Journal of Applied Microbiology* **83(S1)**: 1S–11S.
  13. Hayouni, E. A., Chraief, I., Abedrabba, M., Bouix, M., Leveau, J.-Y., Mohammed, H., Hamdi, M. (2008) Tunisian *Salvia officinalis* L. and *Schinus molle* L. essential oils: Their chemical compositions and their preservative effects against *Salmonella* inoculated in minced beef meat. *International Journal of Food Microbiology* **125(3)**: 242–251.
  14. Jebashree, H. S., Kingsley, S. J., Sathish, E. S., Devapriya, D. (2011) Antimicrobial activity of few medicinal plants against clinically isolated human cariogenic pathogens- An in vitro study. *ISRN dentistry*.
  15. Kamatou, G. P. P., Viljoen, A. M., Gono-Bwalya, A. B., Van Zyl, R. L., Van Vuuren, S. F., Lourens, A. C. U., Steenkamp, P. (2005) The in vitro pharmacological activities and a chemical investigation of three South African *Salvia* species. *Journal of Ethnopharmacology* **102(3)**: 382-390.
  16. Kreth, J., Merritt, J., Shi, W., Qi, F. (2005) Competition and Coexistence between *Streptococcus mutans* and *Streptococcus sanguinis* in the Dental Biofilm. *Journal of Bacteriology* **187(21)**: 7193–7203.
  17. Krzyściak, W., Pluskwa, K. K., Jurczak, A., Kościelniak, D. (2013) The pathogenicity of the *Streptococcus* genus. *European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases* **32(11)**: 1361–1376.
  18. Longaray Delamare, A. P., Moschen-Pistorello, I. T., Artico, L., Atti-Serafini, L., & Echeverrigaray, S. (2007) Antibacterial activity of the essential oils of *Salvia officinalis* L. and *Salvia triloba* L. cultivated in South Brazil. *Food Chemistry* **100(2)**: 603–608.
  19. Lu, Y., Yeap Foo, L. (2001) Antioxidant activities of polyphenols from sage (*Salvia officinalis*). *Food Chemistry* **75(2)**: 197–202.
  20. Marsh, P. D. (2010) Microbiology of Dental Plaque Biofilms and Their Role in Oral Health and Caries. *Dental Clinics of North America* **54(3)**: 441–454.
  21. Martinez-Mier, E. A., Zandona, A. F. (2013) The Impact of Gender on Caries Prevalence and Risk Assessment. *Dental Clinics of North America* **57(2)**: 301–315.
  22. McCullough, M. J., Ross, B. C., Reade, P. C. (1996) *Candida albicans*: a review of its history, taxonomy, epidemiology, virulence attributes, and methods of strain differentiation. *International Journal of Oral and Maxillofacial Surgery* **25(2)**: 136–144.
  23. Mishra, A.K., Fournier, P. (2013) The role of *Streptococcus intermedius* in brain abscess. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases* **32**: 477–483.

24. Mitić-Ćulafić, D., Vuković-Gačić, B. S., Knežević-Vukčević, J. B., Stanković, S., Simić, D. M. (2005) Comparative study on the antibacterial activity of volatiles from sage (*Salvia officinalis* L.). *Archives of Biological Sciences* **57(3)**: 173-178.
25. Moreira, M. R., Souza, A. B., Moreira, M. A., Bianchi, T. C., Carneiro, L. J., Estrela, F. T., Veneziani, R. C. S. (2013) RP-HPLC analysis of manool-rich *Salvia officinalis* extract and its antimicrobial activity against bacteria associated with dental caries. *Revista Brasileira de Farmacognosia* **23(6)**: 870–876.
26. Nadir, M., Rasheed, M., Sherwani, S. K., Kazmi, S., Ahmad, V. U. (2013) Chemical and antimicrobial studies on the essential oil from *Salvia santolinifolia* Boiss. *Pakistan Journal of Pharmaceutical Sciences* **26(1)**: 39-52.
27. Narayanan N, Thangavelu L. (2015) *Salvia officinalis* in dentistry. *Dent Hypotheses* **6**: 27-30.
28. Nasidze I., Li, J., Quinque, D., Tang, K., Stoneking, M. (2009) Global diversity in the human salivary microbiome. *Genome Research* **19**: 636–643.
29. Peterson, S. N., Snesrud, E., Liu, J., Ong, A. C., Kilian, M., Schork, N. J., Bretz, W. (2013) The Dental Plaque Microbiome in Health and Disease. *PLoS ONE* **8(3)**: e58487.
30. Pitts, N. B., Zero, D. T., Marsh, P. D., Ekstrand, K., Weintraub, J. A., Ramos-Gomez, F., Ismail, A. (2017) Dental caries. *Nature Reviews Disease Primers* **3**: 17030.
31. Ramos-Gomez, F., Kinsler, J., Askaryar, H. (2020) Understanding oral health disparities in children as a global public health issue: how dental health professionals can make a difference. *Journal of Public Health Policy* **41(2)**:114-124.
32. Salama A.A., Konsowa E.M., Alkalash S.H. (2020) Mothers' knowledge, attitude, and practice regarding their primary school children's oral hygiene. *Menoufia Medical Journal*. **33**: 11-7.
33. Selwitz, R. H., Ismail, A. I., Pitts, N. B. (2007) Dental caries. *The Lancet* **369(9555)**: 51–59.
34. Shortle, E., O'Grady, M.N., Gilroy, D., Furey, A., Quinn, N., Kerry, J.P., (2014) Influence of extraction technique on the anti-oxidative potential of hawthorn (*Crataegus monogyna*) extracts in bovine muscle homogenates. *Meat Science* **98(4)**: 828-834.
35. Strużycka, I. (2014) The oral microbiome in dental caries. *Polish Journal of Microbiology* **63**: 127–135.
36. Ten Cate, J. M. (2001) What Dental Diseases Are We Facing in the New Millennium: Some Aspects of the Research Agenda. *Caries Research* **35(1)**: 2–5.
37. Xiao, J., Huang, X., Alkhers, N., Alzamil, H., Alzoubi, S., Wu, T. T., Castillo D.A., Campbell F., Davis J., Herzog K., Billings R., Kopycka-Kedzierawski D.T., Hajishengallis



- E., Koo H. (2017) *Candida albicans* and Early Childhood Caries: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Caries Research* **52(1-2)**: 102–112.
38. Xu, P., Alves, J. M., Kitten, T., Brown, A., Chen, Z., Ozaki, L. S., Buck, G. A. (2007) Genome of the Opportunistic Pathogen *Streptococcus sanguinis*. *Journal of Bacteriology* **189(8)**: 3166–3175.
39. Zida, A., Bamba, S., Yacouba, A., Ouedraogo-Traore, R., Guiguemdé, R. T. (2017) Anti-*Candida albicans* natural products, sources of new antifungal drugs: A review. *Journal de Mycologie Médicale* **27(1)**: 1–19.

## Izjava o izvornosti

*Izjavljujem da je ovaj završni rad izvorni rezultat mojeg rada te da se u njegovoj izradi nisam koristio drugim izvorima, osim onih koji su u njemu navedeni.*

Andreja Spitek

ime i prezime studenta