

BACHELOROPPGAVE

Emnekode: R-BACH

Student: Ingvild Veium

Undersøkelse av antibakteriell aktivitet hos tre ulike naturpreparater og relaterte virkestoffer, *in vitro*

Antibacterial activity of three different natural products and related bioactive compounds: an *in vitro* study

Dato: 15.02.2016

Totalt antall sider: 37

SAMMENDRAG

Midler fra naturen har lang brukshistorie i tradisjonell medisin, og er fortsatt i bruk i utstrakt grad i dag. Formålet med denne studien var å undersøke antibakteriell aktivitet *in vitro* hos tre naturpreparater samt tre relaterte virkestoffer: olivenbladedekstrakt, oleuropein, propolis, galangin, usneaekstrakt og (+)-usninsyre. Den antibakterielle aktiviteten ble målt på fem tilfeldig valgte bakteriearter ved bruk av «disc diffusion»-test og «well diffusion»-test. Resultatene viste at den antibakterielle aktiviteten mot de ulike bakterieartene varierte betydelig for de ulike naturmidlene. Virkestoffene viste gjennomgående bedre aktivitet enn sine tilhørende preparater, med unntak av olivenbladedekstrakt og oleuropein. Olivenbladedekstraktet viste aktivitet mot tre av fem bakterier, mens oleuropein ikke viste noen effekt. Propolis viste i likhet med oleuropein liten aktivitet i denne undersøkelsen, mens virkestoffet galangin hadde effekt mot to av fem bakterier. Usneaekstraktet viste ingen antibakteriell aktivitet løst i NaOH, men løst i etanol hadde det effekt mot tre bakterier. (+)-usninsyre var den av testsubstansene som kom best ut i denne undersøkelsen med effekt mot fire av fem bakterier.

Innhold

1. INNLEDNING	1
2. TEORI	2
2.1 Olivenbladekstrakt og oleuropein	2
2.2 Propolis og galangin.....	3
2.3 Usnea-tinktur og (+)-usninsyre	5
3 METODE	7
3.1 Kildekritikk	7
3.2 Naturmidler og virkestoff	9
3.2.1 Olivenbladekstrakt	9
3.2.2 oleuropein	9
3.2.3 Propolis	9
3.2.4 Galangin	10
3.2.5 Usnea-tinktur	10
3.2.6 (+)-usninsyre	10
3.2.7 Kontroller	11
3.3 Vekstmedium	11
3.4 Bakterier	11
3.5 Testmetoder.....	12
3.5.1 «Disc diffusion»-test	12
3.5.2 «Well diffusion»-test	13

4	RESULTATER	15
4.1	Olivenbladedekstrakt og oleuropein	15
4.2	Propolis og galangin.....	15
4.3	Usnea-tinktur og (+)-usninsyre	16
5	DISKUSJON	18
5.1	Olivenbladedekstrakt og oleuropein	18
5.2	Propolis og galangin.....	21
5.3	Usnea-tinktur og (+)-usninsyre	24
6	KONKLUSJON	28
	Litteratur	29

ANTALL ORD: 9027

1. INNLEDNING

Naturmidler har vært benyttet i behandling av en rekke ulike lidelser gjennom generasjoner. Bruken baserte seg på tidligere erfaringer og tradisjoner, og kunnskapen ble videreformidlet fra generasjon til generasjon. Bruk av naturmidler er og har lenge vært utbredt i store deler av verden (1, 2). Flere legemidler som anvendes i dag, eksempelvis morfin, salisylsyre og artemisinin, har sitt opphav fra tradisjonelle naturmidler (1). I de siste tiårene har interessen for medisinske planter og deres antimikrobielle egenskaper økt (3), og det er gjort flere studier på dette området (4-6). I dagens samfunn er antibiotikaresistens et stadig økende problem, og dette utgjør en stor utfordring for den globale helsen. Det har gjort at interessen for søk etter nye effektive antimikrobielle midler har økt betraktelig, hvor naturen utgjør en stor ressurs av ubenyttede substanser (7). Denne studien tar for seg tre naturpreparater med lang brukstid innen tradisjonell medisin, hvor de blant annet er brukt som antimikrobielle midler. I tillegg er det blitt valgt ut tre relaterte virkestoffer, ett for hver av preparatene. Formålet med studien er å undersøke naturpreparatenes og virkestoffenes antibakterielle aktivitet med følgende problemstilling:

«Undersøkelse av antibakteriell aktivitet hos tre ulike naturpreparater og relaterte virkestoffer, *in vitro*».

De utvalgte naturpreparatene som undersøkes i denne studien er olivenbladedekstraktkapsler, propolis halsspray og usnea-tinktur, og de relaterte virkestoffene er henholdsvis oleuropein, galangin og (+)-usninsyre. For testing av antibakteriell aktivitet ble det valgt ut to metoder, «disc diffusion» og «well diffusion», som begge baseres på diffusjon av testsubstans ut i agar (8). Dette er to av flere metoder som er mye brukt ved testing av antimikrobielle egenskaper ved planteekstrakter og andre antimikrobielle substanser (9-11). Som testorganismer ble det valgt ut fem tilfeldige bakteriearter; *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis*, *Kocuria rhizophilia*, og *Listeria monocytogenes*.

2. TEORI

2.1 Olivenbladekstrakt og oleuropein

Oliventre er et mye brukt navn for omtrent 35 trearter i slekten *Olea* i olivenfamilien *Oleaceae*. *Olea Europaea*, som er en av de mest omtalte artene i olivenbladfamilien, er spesielt kjent for sine spiselige frukter kalt oliven. Oliventreet er, og har lenge vært, en viktig handelsvare i middelhavsområdet som en verdifull kilde til olivenfrukt og olivenolje. Oljen ble for eksempel brukt i kosmetikk, parfyme, som brensel i lamper og som en viktig del av kostholdet (12). Olivenolje er fortsatt en viktig ingrediens i den såkalte middelhavsdietten, som er kjent for å være en av de sunneste diettene sett i sammenheng med lav forekomst av hjerte- og karsykdommer (13).

Oliventreet har en lang brukshistorie i tradisjonell medisin og brukes fortsatt i mange land i behandling av en rekke lidelser. Eksempelvis har olivenolje blitt brukt som smertestillende mot magesmerter og øreverk, samt som antiseptisk middel i behandling av sår og hudirritasjoner (12). I USA har olivenolje blitt brukt mot hypertensjon og uro, samt som lakserende middel (14). Av andre anvendelser er avkok av tørkede oliven og olivenblader brukt mot blant annet luftveis- og urinveisinfeksjoner, og mot diaré. Infusjon av olivenblader tas som betennelsesdempende, samt mot øyeinfeksjoner og sår hals. Avkok av friske olivenblader benyttes som vanddrivende, mot høyt blodtrykk og i behandling av astma. I Palestina brukes for eksempel infusjoner av oliven og olivenblader i behandling av diabetes, mens man i Italia anvender tinkturer med olivenblader som febernedsettende. Frukt og blader fra oliventreet benyttes også i behandling av hemoroider og reumatisme. I tillegg brukes oljeekstrakt fra olivenfrukten til behandling av nyrestein, mens olivenolje (fra frukt) sammen med sitronjuice, brukes mot gallestein. Infusjon av bark er i Øst-Afrika benyttet mot bendelorm (14).

Olivenbladekstrakt er en mørk brun og bitter væske som utvinnes fra en blanding av blader og kvister fra oliventreet. Den bitre smaken kommer fra polyfenolen oleuropein, som er en av de viktigste bioaktive komponentene i treet og som er funnet i høyest konsentrasjon i bladene (opptil 14%) (15). Biologiske aktiviteter hos olivenbladekstrakt ses i sammenheng med innholdet av fenoler, slik som koffeinsyre, luteolin, verbacoside og oleuropein. En rekke studier har undersøkt biologisk aktivitet ved olivenblad og oleuropein, og disse har vist at de

blant annet har antiinflammatorisk-, antiaterosklerotisk-, antihyperglykemisk-, antioksidierende-, antiviral- og antibakteriell effekt (16).

Det er gjort mye forskning in vitro på antimikrobiell aktivitet hos oleuropein og olivenbladedekstrakt. Oleuropein har vist antimikrobiell aktivitet både mot gram-positive bakterier, eksempelvis *Bacillus cereus* og *Lactobacillus plantarum*, og gram-negative bakterier, slik som *Salmonella enteritidis* (17). En studie utført av Lee & Lee (4) viste blant annet at oleuropein hadde sterk antimikrobiell effekt mot *S. enteritidis*, men at oleuropein i en blanding sammen med andre fenoler fra olivenbladedekstrakt viste enda bedre effekt mot bakterien (4). Markin, Duek & Berdicevsky (18) testet antimikrobiell aktivitet hos olivenbladedekstrakt mot flere gram-negative og gram-positive bakterier: *E. coli*, *S. aureus*, *Bacillus subtilis*, *Klebsiella pneumoniae* og *Pseudomonas aeruginosa*. Deres resultater viste god antimikrobiell aktivitet hos vandig uttrekk av olivenbladedekstrakt mot alle testede bakterier, med unntak av *B. subtilis*. Disse resultatene bekreftes av Pereira m.fl. (19) som i sin studie som også antyder en bred, men konsentrasjonsavhengig antimikrobiell aktivitet hos olivenbladedekstrakt. En annen studie gjort av Sudjana m.fl. (20) viste varierende effekt mot ulike mikroorganismer som ble testet, hvor olivenbladedekstrakt eksempelvis hadde god effekt mot *Campylobacter jejuni* og *Helicobacter pylori*, men dårligere effekt mot *B. subtilis* og *E. coli*. Konklusjonen var at studien ikke støtter opp under påstander om at olivenbladedekstrakt er et effektivt middel mot et bredt spekter av infeksjonssykdommer (20).

2.2 Propolis og galangin

Propolis er et naturlig, harpikslignende produkt laget av honningbier. Det er satt sammen av ulike plantekomponenter, som biene henter fra ulike områder og blander med bivoks og spyttzymer. Rå propolis består typisk av 50% planteharpiks, 30% voks, 10% essensielle og aromatiske oljer, 5% pollen og 5% andre organiske substanser (21, 22). Biene benytter propolis som et forseglingsmateriale når de tetter og reparerer bikuben. Dette gjør de for å beskytte kolonien mot vær og vind, samt mot inntrengere som slanger og øgler, og mot mikrobielle infeksjoner. Propolis bidrar også til å holde bikuben stabil året rundt ved å regulere temperatur og fuktighet (22-24).

Propolis er sammensatt av en rekke ulike kjemiske komponenter, og studier viser at den kjemiske komposisjonen varierer i stor grad (21). Bankova (24) belyste i sin artikkel

problemet med standardisering av propolis på bakgrunn av stor variasjon i kjemisk sammensetning, og satte opp en tabell over de mest studerte propolistypene med hensyn til deres geografiske opprinnelse og plantebakgrunn. De ulike ble kalt «poplar propolis», «birch propolis», «green propolis», «red propolis», «pacific propolis» og «canarian propolis». Til tross for problemer med standardisering av propolis grunnet stor variasjon i kjemisk komposisjon, viser det seg at enkelte komponenter er mer typiske for noen typer propolis enn andre. Eksempelvis er pinocembrin, pinobanksin, galangin og koffeinsyre noen av hovedkomponentene i «poplar» propolisprøver fra Europa og Nord-Amerika (23).

I studier gjort på ulike typer propolis frem til 2012 er det til sammen funnet rundt 300 ulike kjemiske komponenter. Disse tilhører ulike kjemiske grupper som for eksempel polyfenoler, benzosyrer m/derivater, benzaldehydderivater og mineraler (21, 22). Hvilke substanser og forholdet mellom de ulike substansene man finner i propolisprøver vil variere. Dette avhenger av flere faktorer slik som geografisk opprinnelse, hvilke planter biene har hentet materiale fra, samt hvilken type bie som har produsert propolisen. En annen faktor av stor betydning er hvilken metode man benytter når man ekstraherer komponentene, da ulike løsningsmidler vil ekstrahere ulike komponenter. Dette gjør at man ved undersøkelse, analysering og sammenligning av biologisk aktivitet hos propolis bør ta hensyn til disse faktorene (21-25).

Propolis har i lang tid blitt brukt mot ulike lidelser i folkemedisin og er fortsatt brukt i utstrakt grad i dag. Tradisjonelt ble propolis anvendt ved blant annet reumatisme, forkjølelse, hjertesykdom, diabetes, karies, forstuinger og i behandling av ulike sår. Egypterne i det gamle Egypt var kjent med propolis sine forråtnelsesdempende egenskaper og brukte derfor stoffet i sin balsamering av de døde, og hindret dermed spredning av infeksjoner. I Hellas og Roma benyttet legene propolis som et antiseptisk middel i sårbehandling, mens inkaene brukte det som febernedsettende. Perserne anvendte propolis for eksempel i behandling av reumatisme og muskelsmerter, samt mot eksem. Under 2. verdenskrig ble propolis tatt i bruk av sovjeterne i behandling av sår og tuberkulose. I dag er propolis benyttet ved blant annet lindring av forkjølelessymptomer, og i preparater for dermal applikasjon. Disse preparatene brukes eksempelvis i sårbehandling, behandling mot akne og herpesinfeksjoner, og i profylaktisk behandling av karies og tannkjøttinflammasjoner. Propolis fås kjøpt i ulike formuleringer, slik som kapsler, pastiller, kremer, munnskyllevann- og halsspray med propolis (21-23, 26).

Flere studier har undersøkt biologisk aktivitet hos propolis, og det er blitt rapportert at propolis skal ha blant annet antimikrobiell-, antioksiderende-, antitumor- og antiinflammatorisk aktivitet (22, 27). Propolis har vist å ha høy antibakteriell aktivitet mot både gram-negative bakterier, slik som *K. pneumoniae*, og gram-positive bakterier, slik som *Staphylococcus epidermidis* (27). Man har også sett at den antimikrobielle aktiviteten hos propolis har variert avhengig av dose, ekstraksjonsmiddel og hvor propolisprøven kommer fra. I en studie hvor propolis ble testet på bakteriestammer resistente mot penicillin, tetrasyklin og erytromysin, viste det seg at disse bakteriestammene var sensitive for propolis. I den samme studien ble det også avdekket synergiske effekter mellom propolis og de ulike antibiotikaene mot de resistente bakteriestammene (28).

Galangin (3,5,7-trihydroxyflavon) er et stoff som tilhører den kjemiske gruppen flavonoler, en undergruppe av gruppen flavonoider (21), og er som nevnt tidligere en av hovedkomponentene i såkalt «poplar propolis» (23). Den antibakterielle aktiviteten til propolis er sett i sammenheng med innhold av flavonoider, og da spesielt pinocembrin og galangin (29, 30). Flere studier har undersøkt galangins antimikrobielle egenskaper og det er funnet aktivitet mot både gram-positive bakterier slik som *B. cereus* og *S. aureus*, og gram-negative bakterier, som for eksempel *Enterobacter cloacae* (31). En studie utført av Pepeljnjak & Kosalec (30) viste blant annet at galangin hadde antibakteriell aktivitet mot *S. aureus*, *Enterococcus* spp. og *P. aeruginosa*.

2.3 Usnea-tinktur og (+)-usninsyre

Lav er en plante som består av to organismer som lever i symbiose med hverandre; en sopp (kalt mykobiont) og en alge og/eller en cyanobakterie (kalt fotobiont) (32). Sammen danner partene et plantelegeme kalt tallus, som beskriver et legeme uten rot, stengel eller blad (33). De vokser på ulike steder, slik som på steiner og trær, og finnes i mange ulike farger og fasonger. I systematikken tilhører lav soppriket, *Fungi*, og per 2005 var det registrert 18 500 arter i verden (34).

Interessen for lav har vært stor i en årrekke, og det har foregått mye forskning på disse plantene. Dette spesielt på grunn av deres karakteristiske sekundære metabolitter, som også har vist biologisk aktivitet. De sekundære metabolittene kan produseres av mykobionten eller fotobionten alene, eller av disse to sammen. De er som oftest uløselige i vann og kan utgjøre

opp mot 30% av tørrvekten av laven. Over 800 kjemiske komponenter er blitt identifisert og disse tilhører ulike kjemiske grupper, eksempelvis fenoler, terpenoider og dibenzofurans, hvor dibenzofurans er en av de gruppene som har vist å ha de mest unike komponentene i lav. Blant de kjemiske komponentene i gruppen dibenzofurans er det usninsyre som er mest studert, og denne er typisk for mange lavarter. Usninsyren er blant annet identifisert i slektene *Usnea*, *Ramalina* og *Parmelia*. Arter i slekten *Usnea* (strylav) er spesielt rike på usninsyre, eksempelvis utgjør usninsyre 1-3% av tørrvekten i arten *Usnea barbata* (grovstry) (6, 32, 35, 36).

Lav har lenge vært brukt i tradisjonell medisin og er fortsatt i bruk i dag. I europeisk folkemedisin har lav blant annet blitt benyttet i behandling mot forkjølelse, feber, hoste og tuberkulose, samt i behandling av kreft. På New Zealand er det blitt brukt i tradisjonell medisin og homeopati, og også i spansk folkemedisin er lav anvendt i forbindelse med ulike medisinske lidelser. Lav fra slekten *Usnea* har lang historie i kinesisk tradisjonell medisin. Kineserne brukte blant annet lavarten i en te de kalte Song Lo, som ble drukket som et antimikrobielt middel. Avkok av *Usnea* ble anvendt både innvortes og utvortes mot eksempelvis hoste, sår, slangebitt og malaria. I dag brukes lavekstrakter i ulike produkter som for eksempel i kosmetikk, solbeskyttelse og i ulike hygieneartikler, som deodoranter, tannkrem og munnskyllevann. I Nepal anvendes lav i behandling av tannverk og sår hals, mens man i Italia benytter det som vanddrivende, mot hodepine og i sårbehandling. Arter i slekten *Usnea* er brukt mot smerter, feber, sår og som et antibiotikum. I USA er blant annet tinkturer med *Usnea* vanlige produkter å få kjøpt i helsekostbutikker. Det skal også nevnes at man i flere land har utviklet farmasøytiske preparater basert på substanser fra lav. Eksempelvis har man i Tyskland og Italia antiseptiske produkter som inneholder usninsyre (34, 35, 37).

En rekke studier har undersøkt biologiske aktiviteter ved lav, der aktivitet mot mikrober og kreft, veksthemmende effekt hos planter og enzymhemmende aktivitet er noe av det som er funnet. Usninsyre er ofte satt i sammenheng med den antibiotiske aktiviteten, og metabolitten er blitt studert i flere år. Studier knyttet til usninsyrens antimikrobielle aktivitet har blant annet vist aktivitet mot ulike typer resistente bakterier, eksempelvis methicillin-resistente *S. aureus* (37) og syre-resistente bakterier som *Mycobacterium tuberculosis* (34). Usninsyre har også vist effekt mot bakteriearter som *Enterococcus*, *Bacteroides* og *Clostridium* (36). Flere studier har vist at usninsyre har bedre effekt mot gram-positive bakterier enn mot gram-negative

bakterier (34, 38). *E. coli* har eksempelvis vist seg resistent mot usninsyre i flere studier (38, 39), mens den i andre studier har vist seg sensitiv ved høyere konsentrasjoner av usninsyre (34). I en studie gjort av Ranković m.fl. (6) ble antimikrobiell aktivitet ved to typer lav og deres sekundære metabolitter usninsyre og norstictic syre undersøkt. Resultatet viste antimikrobiell aktivitet ved begge lavartene, men at aktiviteten var størst hos de sekundære metabolittene. Usninsyre var den av de to metabolittene som viste lavest MIC-verdier. Studien antyder på bakgrunn av disse resultatene at det er de sekundære metabolittene som gir opphav til den antimikrobielle aktiviteten hos lav.

3 METODE

Problemstillingen i denne oppgaven er knyttet opp mot en praktisk undersøkelse av naturmidler, og har dermed som mål å finne egne data om emnet. Metoden som er benyttet er derfor et praktisk laboratorieforsøk. Det ble her valgt ut tre naturmidler, samt et virkestoff fra hver av dem, som skulle undersøkes med tanke på antimikrobiell aktivitet. For å kunne vurdere resultatene fra forsøket ble det i tillegg foretatt søk i litteratur for å finne tidligere rapporteringer og relevant teori om emnet. Søkemotorene som ble brukt for innhenting av litteratur var i hovedsak PubMed, samt Science Direct og Google scholar. Noen av ordene som ble brukt i søket var ulike kombinasjoner av følgende: «antimicrobial effect», «antimicrobial activity», «galangin», «olive leaf extract», «usnic acid», «Usnea», «oleuropein», «propolis», «disc diffusion method» og «well diffusion method». Litteraturkildene ble i stor grad funnet ved hjelp av «snøballmetoden». Dette innebærer aktivt bruk av referanselister hos aktuelle artikler. I tillegg ble forslag fra databasene til relevante artikler også vurdert. Alle vitenskapelige artikler brukt i denne oppgaven er publisert i tidsskrifter som står til nivå 1 eller 2 i Norsk samfunnsvitenskapelige datatjeneste (NSD) sitt register over autoriserte publiseringskanaler (40). Dette vil si at artiklene brukt i denne oppgaven er fagfellevurdert.

3.1 Kildekritikk

I oppgaver som denne er valg og riktig bruk av kilder en viktig, og det er dermed viktig å stille seg kritisk til kildene som anvendes. I vurderingen av utvelgelse og bruk av kilder er det ulike faktorer som burde tas i betraktning. Disse innebærer blant annet vurderinger knyttet til

forfatter(e), faglig innhold, presentasjon og relevans. Viktige momenter vil være kvalifikasjon, objektiv og faglig formidling, oppdatert innhold og dokumentasjon (41).

Ved å benytte seg av primærkilder minsker sjansen for ukorrekte opplysninger, da informasjonen man innhenter ikke er bearbeidet av andre. I denne oppgaven er det likevel benyttet både primærkilder og sekundærkilder. I teoridelen ble det ansett som tilstrekkelig å i hovedsak benytte seg av sekundærkilder, da informasjonen de ga ble vurdert som pålitelig. Bruken av sekundære kilder har også vært nødvendig, da tilgangen til primærkilder har vært begrenset. Bruk av sekundærkilder kan utgjøre en svakhet, men det skal likevel nevnes at sekundærkildene som er brukt henviser til primærkilden, noe som øker troverdigheten. I tillegg er flere av sekundærkildene mye sitert, noe som tyder på at flere har vurdert kildene som gode.

Fagkunnskap oppdateres stadig og man kan dermed diskutere hvorvidt bruk av eldre forskning er relevant. I denne oppgaven er det benyttet både nyere og eldre litteratur. Eldre forskning kan utgjøre en svakhet med tanke på utdatert informasjon, men er her likevel vurdert som relevant for oppgaven. På enkelt områder har innhenting av ny litteratur vært en utfordring og det har dermed vært nødvendig å bruke eldre litteratur for å ha tilstrekkelig med materiale. Samtidig er mye av den litt eldre forskningen sitert aktivt i nyere forskning, noe som indikerer at litteraturen fortsatt er aktuell.

Kildene som er benyttet i denne oppgaven er i hovedsak funnet via søk på internett, og da først og fremst gjennom søkemotoren PubMed. At det her er valgt å ikke benytte flere søkemotorer kan ha ført til at relevant litteratur har blitt utelatt og kan dermed utgjøre en svakhet.

De fleste kildene i oppgaven er engelskspråklige vitenskapelige artikler, noe som ofte innebærer et tungt språk med til dels komplisert faglig innhold. Mulige mistolkninger på grunn av språk kan dermed ikke utelukkes, og dette kan ha ført til at informasjonen som er gitt i denne oppgaven har et visst avvikt i forhold til originalartiklene. Sammen med språk skal det også nevnes at mine fagkunnskaper har vært en begrensende faktor, noe som kan ha ført til feiltolkning av litteraturen. Dette har også vært en faktor for at enkelte studier er blitt valgt bort.

3.2 Naturmidler og virkestoff

3.2.1 Olivenbladekstrakt

Olivenbladekstrakt kapsler («Olive leaf extract») fra «SOLGAR U.K. Ltd» ble kjøpt fra Life AS (Oslo, Norge). I henhold til etiketten inneholder hver kapsel 225 mg pulverisert olivenbladekstrakt (fra *Olea Europaea*), hvor oleuropein utgjør 13,5 mg av innholdet.

For å løse opp kapselinnholdet ble det brukt sterilt vann, 1 ml per kapsel. Da ikke alt av innholdet løste seg ble blandingen videre sentrifugert ved 2000 rpm (Eppendorf, Oslo, Norge). Supernatanten ble så skilt fra sedimentet og videre fortynnet med vann i tre omganger: 1:2, 1:4 og 1:8. Olivenbladekstraktprøvene ble på grunn av usikkerhet rundt oleuropeins stabilitet ikke lagd før på forsøksdagen.

3.2.2 oleuropein

Ett glass med 500 mg oleuropein ble kjøpt fra VWR® (Oslo, Norge). Oleuropein er et lyst gult til gult pulver, og renheten til stoffet skal ifølge leverandøren være $\geq 90\%$ (42).

Det ble laget en stamløsning med en konsentrasjon på 40 mg/ml, ved hjelp av sterilt vann. Videre ble stamløsningen fortynnet i tre omganger til konsentrasjonene 20 mg/ml, 10 mg/ml og 5 mg/ml. Oleuropeinprøvene ble i likhet med prøvene fra olivenbladekstraktet ikke lagd før på forsøksdagen.

3.2.3 Propolis

Propolis halspray produsert av Medicata Filia (Litauen) og importert av NATUREALES, ble kjøpt fra Life AS. Preparatet inneholder i henhold til etiketten 12-24 mg ren propolis per døgndose, og er produsert etter EUs kvalitetskrav.

Ufortynnet propolispray ble brukt som stamløsning og videre fortynnet i tre omganger (1:2, 1:4, 1:8) med sterilt vann. Ufortynnet spray samt de tre fortynningen ble oppbevart i romtemperatur til forsøksdagen.

3.2.4 Galangin

Ett glass med 25 mg galangin (3,5,7-trihydroxyflavone) ble kjøpt fra VWR®. Galangin er et gult pulver og renheten skal ifølge leverandøren være > 96 % (43).

Det ble laget en stamløsning med konsentrasjonen 6,25 mg/ml, ved hjelp av 0,1M NaOH. Ut fra stamløsningen ble det videre laget tre fortyntinger med konsentrasjonene 3,13 mg/ml, 1,56 mg/ml og 0,78 mg/ml. Prøvene med galangin ble lagd på forsøksdagen.

3.2.5 Usnea-tinktur

Ett glass med 50 ml usnea-tinktur ble kjøpt fra Urtekilden (Oppdal, Norge). Tinkturen er et uttrekk av strylavarten glattstry (*Usnea hirta*) i 50 % etanol. Laven som er brukt i produksjonen av tinkturen er samlet i Norge (44).

Ufortynnet usnea-tinktur ble sterilfiltrert 0,2µm (nylon membrane, VWR®) og brukt som stamløsning. Videre ble den fortynnet i tre omganger (1:2, 1:4, 1:8) med sterilt vann. Prøvene ble lagd på forsøksdagen.

I tillegg til disse prøvene ble det laget fire prøver av usnea-tinktur uten etanol. Dette ble gjort ved at 20 ml usnea-tinktur ble kjørt i en rotasjonsfordamper (Heidolph instruments, Schwabach, Tyskland), slik at etanolen fordampet. Usneaekstraktet ble så løst i 20 ml 0,1M NaOH. Videre ble denne løsningen fortynnet med 0,1M NaOH til 1:2, 1:4 og 1:8. Også disse prøvene ble lagd på forsøksdagen.

3.2.6 (+)-usninsyre

Ett glass med 5 g (+)-usninsyre ble kjøpt fra Sigma-Aldrich® (Oslo, Norge). Usninsyre er et gult, gul-grønt eller gullfarget pulver, og renheten til stoffet skal ifølge leverandøren være ≥ 97,5 % (45).

Det ble laget en stamløsning med en konsentrasjon på 16,67 mg/ml, ved hjelp av 0,1M NaOH. Ut fra stamløsningen ble det laget tre fortyntinger med konsentrasjonene 8,33 mg/ml, 4,17 mg/ml og 2,08 mg/ml. Usninsyreprøvene ble lagd samme dag som forsøkene ble gjennomført.

3.2.7 Kontroller

For å se om midlene som ble brukt til oppløsning og fortynning har antibakterielle egenskaper, ble testene også utført med disse (vann, etanol 75% og 0,1M NaOH). I tillegg ble bakteriene testet med 60 µg chloramphenicol-tabletter (Rosco Diagnostica, Taastrup, Danmark) som positiv kontroll.

3.3 Vekstmedium

Vekstmediet dette forsøket ble utført på var Mueller-Hinton agar. Dette er et vekstmedium bestående av en blanding av agar, stivelse, syrehydrolysat fra kasein og «storfeekstrakt», og som skal gi gode vekstvilkår for en rekke bakterier (46). Mueller-Hinton agar er mye brukt i antibiotikaresistenstesting, og er blant annet anbefalt som testmedium i «disc diffusion assay» (47). Mueller-Hinton agaren som ble brukt i dette forsøket ble kjøpt fra VWR®, og vekstmediet ble støpt ved Kystlab – PreBIO AS (Namsos, Norge).

3.4 Bakterier

I dette forsøket ble følgende bakterier benyttet: *E. faecalis* (CCUG 19916), *E. coli* (CCUG 17620), *S. aureus* (CCUG 17621), *K. rhizophilia* (CCUG 10782) og *L. monocytogenes* (CCUG 15527). Alle bakteriestammene stammer fra «Culture Collection University of Göteborg (CCUG)» og ble skaffet fra Kystlab – PreBIO AS. To uker før forsøket ble gjennomført ble bakteriene sådd ut på Mueller-Hinton agarplater, som var vekstmediet testene ble utført på, for å se om vekstmediet var egnet. På forsøksdagen ble bakteriene overført fra Mueller-Hinton agaren til en bufret peptonvannløsning, hvor de ble dyrket i 3 timer ved 37 °C. De ulike bakteriesuspensjonene ble fortynnet slik at bakteriekonsentrasjonen ble omtrent 10⁵ CFU/ml (se tabell 1).

Tabell 1: Bakteriekonsentrasjoner

<i>L.monocytogenes</i>	4,50 * 10 ⁵ CFU/ml
<i>E.facealis</i>	2,95 * 10 ⁵ CFU/ml
<i>S.aureus</i>	3,08 * 10 ⁵ CFU/ml
<i>E.coli</i>	1,03 * 10 ⁵ CFU/ml
<i>K.rhizophilia</i>	4,80 * 10 ⁵ CFU/ml

CFU = «colony forming units» (koloniformende enheter)

3.5 Testmetoder

Antibakteriell aktivitet ble undersøkt ved bruk av to metoder: «disc diffusion»-test og «well diffusion»-test. Prinsippet bak metodene er at substansen som skal testes plasseres på sterile filterlapper («disc diffusion»-test), eller i brønner («well diffusion»-test), på en agar som fra før er inokulert med testorganisme. Testsubstansen vil diffundere fra filterlappen/brønnen og ut i agaren, hvor konsentrasjonen av testsubstansen vil avta med avstanden til filterlappen/brønnen. Dersom testorganismen er følsom ovenfor testsubstansen vil det oppstå en hemningssone rundt filterlappen/brønnen, hvor størrelsen på hemningssonen gjenspeiler organismens følsomhet ovenfor substansen. Jo større hemningssoner jo mer følsom er bakterien, da konsentrasjonen av testsubstansen avtar med avstanden til filterlappen/brønnen. Eventuelle hemningssoner som avleses kan videre sammenlignes med sonene for andre testsubstanser eller testorganismer, forutsatt at testene er gjennomført på samme måte (8).

3.5.1 «Disc diffusion»-test

«Disc diffusion»-testen ble utført ved at det for hver av de fem bakterieartene ble sådd ut 0,1 ml bakteriesuspensjon på syv Mueller-Hinton agarplater, en plate for hver av de ulike testsubstansene: oleuropein, olivenbladet ekstrakt, galangin, propolis, (+)-usninsyre, usnea-tinktur med etanol og usnea-tinktur uten etanol. I tillegg ble det for hver av de fem bakterieartene sådd ut 0,1 ml bakteriesuspensjon på en Mueller-Hinton agarplate for kontrollsubstansene vann, etanol (75 %), 0,1M NaOH og chloramphenicol. Etter at platene hadde tørket ble det plassert fire sterile filterpapirlapper på hver av platene, en filterlapp for hver fortykning av de ulike testesubstansene. På kontrollplaten ble det kun plassert tre filterpapirlapper. Det ble så pipettert 30 µl testløsning på hver filterpapirlapp. På kontrollplaten ble 30 µl vann, etanol 75 % og 0,1M NaOH pipettert over på hver sin

filterpapirlapp, mens chloramphenicol i form av en tablett ble plassert på agaren ved bruk av en pinsett. Etter at testsubstansene hadde trukket inn i filterpapirlappen ble platene inkubert ved 37°C i ca. 15 timer før resultatet ble avlest. Hemmingssonene ble målt med linjal og oppgitt i mm.

Tabell 2: Virkestoffkonsentrasjon i mg per «disc»

Prøvesubstans	Fortynning nr.			
	1	2	3	4
Oleuropein	1,20	0,60	0,30	0,15
Olivenbladekstrakt *	0,41	0,20	0,10	0,05
Galangin	0,19	0,09	0,05	0,02
Propolis	×	×	×	×
(+)-usninsyre	0,50	0,25	0,13	0,06
Usnea-tinktur m/etanol	×	×	×	×
Usnea-tinktur u/etanol	×	×	×	×

* Konsentrasjon av oleuropein i olivenbladekstrakt

× Innhold av virkestoff er ukjent

3.5.2 «Well diffusion»-test

«Well diffusion»-testen ble utført ved at det for hver av de fem bakterieartene ble sådd ut 0,1 ml bakteriesuspensjon på syv Mueller-Hinton agarplater, en plate for hver av de ulike testsubstansene. I tillegg ble det for hver av de fem bakterieartene sådd ut 0,1 ml bakteriesuspensjon på en Mueller-Hinton agarplate for kontrollsubstansene. Etter at platene hadde tørket ble det ved hjelp av et korkepipesett laget fire brønner à 6mm i agaren, en brønn for hver fortynning til de ulike prøvesubstansene. På kontrollplatene ble det kun laget tre brønner; en for vann, en for etanol (75 %) og en for 0,1M NaOH. Det ble så pipettert 50 µl prøvesubstans fra hver fortynning over i «sin» brønn. Etter at prøvesubstansene hadde trukket inn i agaren ble platene inkubert ved 37°C i ca. 15 timer. Hemmingssonene ble målt med linjal og oppgitt i mm.

Tabell 3: Virkestoffkonsentrasjon i mg per brønn

Prøvesubstans	Fortynning			
	1	2	3	4
Oleuropein	2,00	1,00	0,50	0,25
Olivenbladekstrakt *	0,68	0,34	0,17	0,08
Galangin	0,31	0,16	0,08	0,04
Propolis	×	×	×	×
(+)-usninsyre	0,83	0,42	0,21	0,10
Usnea-tinktur m/etanol	×	×	×	×
Usnea-tinktur u/etanol	×	×	×	×

* Konsentrasjon av oleuropein i olivenbladekstrakt

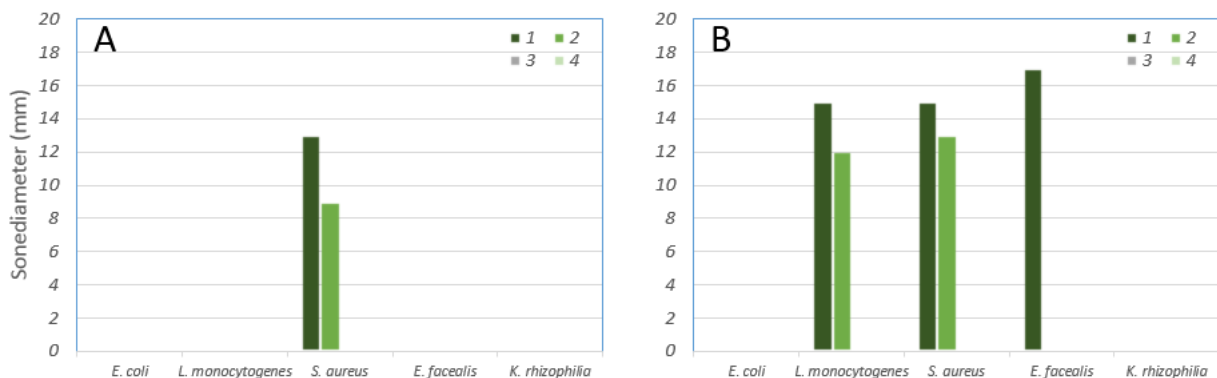
× Innhold av virkestoff er ukjent

4 RESULTATER

4.1 Olivenbladekstrakt og oleuropein

I dette forsøket viste olivenbladekstrakt liten antibakteriell aktivitet med hemmende effekt kun på *S. aureus* i «disc diffusion»-testen (figur 1 A). Resultatet var noe bedre i «well diffusion»-testen hvor olivenbladekstrakt, i tillegg til effekt mot *S. aureus*, også viste hemmende effekt mot *L. monocytogenes* og *E. faecalis* (figur 1 B). Den antibakterielle aktiviteten til olivenbladekstrakt viste seg kun i de høyeste konsentrasjonene for de aktuelle bakteriene (figur 1).

Oleuropein viste her ingen antibakteriell aktivitet på noen av de testede bakteriene (resultat ikke illustrert), og var dermed det virkestoffet i forsøket som kom dårligst ut.



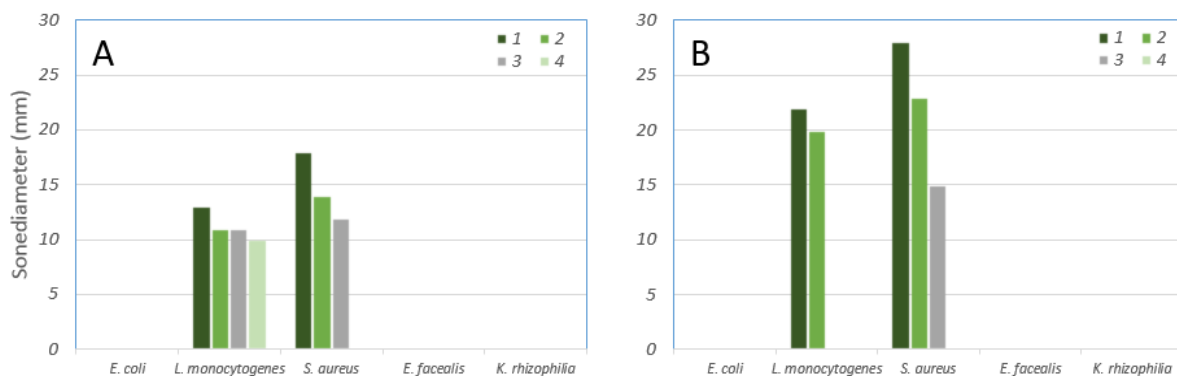
Figur 1: Antimikrobiell aktivitet målt ved «disc diffusion»-test (A) og «well diffusion»-test (B) ved ulike konsentrasjoner (1-4) av olivenbladekstrakt på fem ulike bakterier. For verdier av konsentrasjonene av olivenbladekstraktet se tabell 2 og 3.

4.2 Propolis og galangin

Den antibakterielle aktiviteten til propolis viste seg i dette forsøket å være lav. I «well diffusion»-testen hadde propolis hemmende effekt på *L. monocytogenes*, men kun i den høyeste konsentrasjonen (resultat ikke illustrert). I «disc diffusion»-testen viste propolis ingen antibakteriell aktivitet mot noen av de testede bakteriene.

Galangin viste i dette forsøket antibakteriell aktivitet mot kun to av bakteriene:

L. monocytogenes og *S. aureus*, hvor sistnevnte var den av de to bakteriene som var mest sensitiv (figur 2). I «disc diffusion»-testen viste *S. aureus* følsomhet ved de tre høyeste konsentrasjonene mens *L. monocytogenes* viste følsomhet ved alle de fire konsentrasjonene (figur 2 A). I «well diffusion»-testen viste derimot *L. monocytogenes* kun følsomhet i de to høyeste konsentrasjonene, mens *S. aureus* også her viste følsomhet i de tre høyeste (figur 2 B).



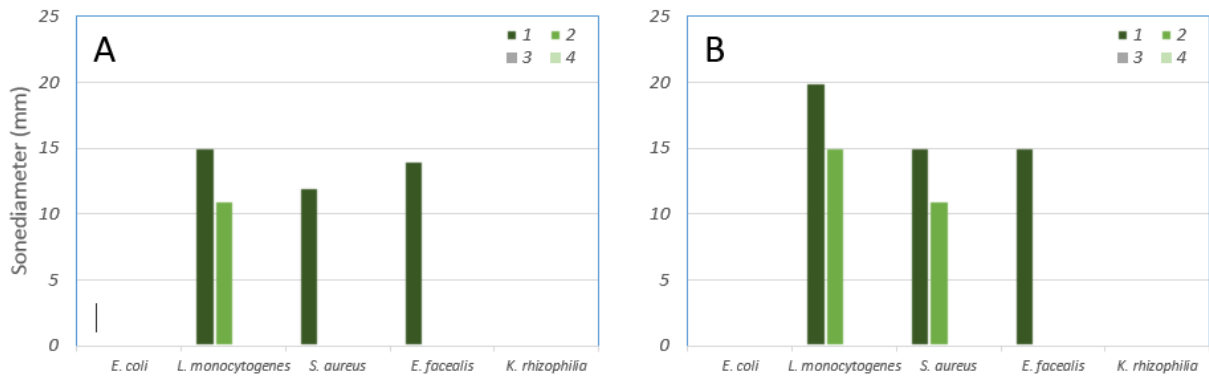
Figur 2: Antimikrobiell aktivitet målt ved «disc diffusion»-test (A) og «well diffusion»-test (B) ved ulike konsentrasjoner (1-4) av galangin på fem ulike bakterier. For verdier av konsentrasjonene av galangin se tabell 2 og 3.

4.3 Usnea-tinktur og (+)-usninsyre

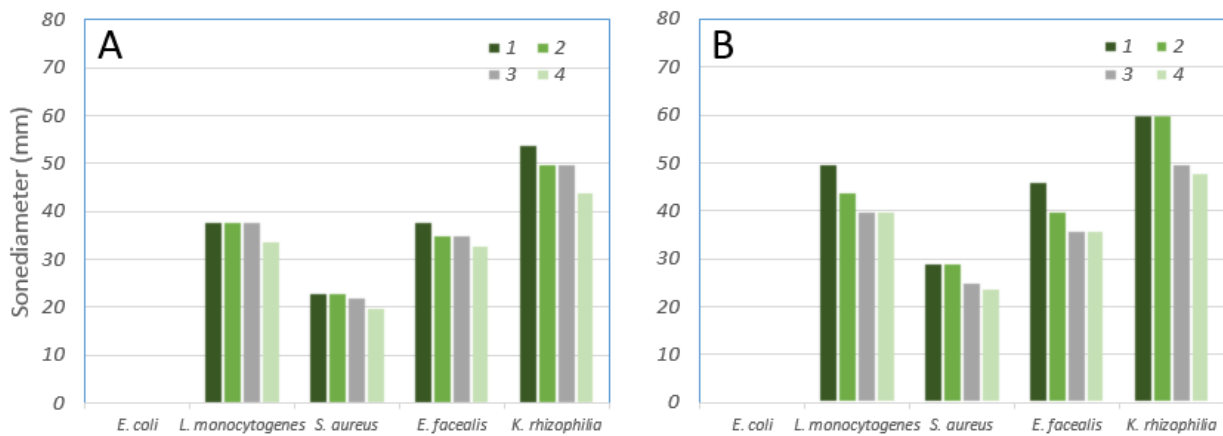
Når det gjelder usnea-tinkturpreparatene viste tinkturen med etanol bedre effekt enn tinkturen uten etanol, som her ikke viste noen antibakteriell aktivitet (resultat ikke illustrert). Usnea-tinktur med etanol viste effekt mot *L. monocytogenes*, *S. aureus* og *E. faecalis*, men ikke mot *K. rhizophilia* og *E. coli* (figur 3). Bakterien som var mest følsom var *L. monocytogenes*, etterfulgt av *E. faecalis* og *S. aureus*. Usnea-tinkturen viste i «disc diffusion»-testen kun effekt i den høyeste konsentrasjonen mot *E. faecalis* og *S. aureus*, mens den mot *L. monocytogenes* viste effekt i de to høyeste konsentrasjonene (figur 3 A). I «well diffusion»-testen viste den effekt i de to høyeste konsentrasjonene mot *L. monocytogenes* og *S. aureus*, mens den mot *E. faecalis* kun viste effekt i den høyeste konsentrasjonen (figur 3 B).

Den testsubstansen som viste best antibakteriell aktivitet i forsøket, med effekt mot fire av de fem bakteriene, var (+)-usninsyre (figur 4). Stoffet viste effekt mot *L. monocytogenes*,

S. aureus, *E. faecalis* og *K. rhizophilia*, hvor sistnevnte var den bakterien som var mest sensitiv. (+)-usninsyre viste effekt i alle konsentrasjonene i begge testene (figur 4 A og B), og effekten viste seg konsentrasjonsavhengig. Hemningssonene for (+)-usninsyre var i gjennomsnitt mye større enn hemningssonene for de andre testsubstansene.



Figur 3: Antimikrobiell aktivitet målt ved «disc diffusion»-test (A) og «well diffusion»-test (B) ved ulike konsentrasjoner (1-4) av usnea-tinktur m/etanol på fem ulike bakterier. For verdier av konsentrasjonene av usnea-tinktur m/etanol se tabell 2 og 3.



Figur 4: Antimikrobiell aktivitet målt ved «disc diffusion»-test (A) og «well diffusion»-test (B) ved ulike konsentrasjoner (1-4) av (+)-usninsyre på fem ulike bakterier. For verdier av konsentrasjonene av (+)-usninsyre se tabell 2 og 3.

5 DISKUSJON

5.1 Olivenbladekstrakt og oleuropein

Undersøkelse av antibakteriell aktivitet hos sju testsubstanser i ulike konsentrasjoner på fem tilfeldig valgte bakteriearter, viste at den antibakterielle aktiviteten hos stoffene varierte betydelig. Virkestoffene viste gjennomgående bedre effekt enn sine tilhørende preparater, med unntak av oleuropein og olivenbladekstrakt, hvor resultatet viste nettopp det motsatte. I dette forsøket viste olivenbladekstraktet aktivitet mot *S. aureus*, *E. faecalis* og *L. monocytogenes*, mens *E. coli* og *K. rhizophilia* ikke viste noen følsomhet (figur 1). Olivenbladekstraktets antibakterielle aktivitet samsvarer delvis med tidligere studier på området, som har vist at blant annet *S. aureus*, *E. faecalis*, *L. monocytogenes*, *H. pylori* og *K. pneumoniae* er følsomme ovenfor ekstraktet (18, 20). I denne undersøkelsen viste derimot *E. coli* og *K. rhizophilia* ingen følsomhet, selv om dette er vist tidligere (20). Hvorfor resultatene her bare delvis er i samsvar med andre forsøk kan skyldes ulike faktorer slik som valg av metode, bakteriekonsentrasjon, konsentrasjon av prøvesubstans og utførelse av forsøket. Samtidig bør det nevnes at innholdet i olivenbladekstraktet også kan variere mellom ulike prøver, da den kjemiske komposisjonen påvirkes av ulike faktorer slik som for eksempel klima og opprinnelsessted. Eksempelvis kan innholdet av oleuropein i olivenblader variere mellom 1 % til 14 % (16). Det kan dermed tenkes at forskjellen i antibakteriell aktivitet mellom ulike studier skyldes ulik kjemisk sammensetning av olivenbladet. I likhet med ulik kjemisk sammensetning vil også ekstraksjonsmetoder påvirke hvorvidt ulike prøver av olivenbladekstrakt kan ansees som sammenlignbare.

Olivenbladekstrakt er tidligere antatt å ha helsebringende effekter (13, 17, 48), og dette er sett i sammenheng med polyfenoler slik som oleuropein (13). Dette har gjort at flere studier med oleuropein er utført, spesielt med tanke på antimikrobiell aktivitet (4, 49). Resultatene i dette forsøket viste at olivenbladekstrakt har bedre antibakteriell aktivitet enn oleuropein, til tross for at konsentrasjonen av oleuropein er lavere i olivenbladekstraktet. Dette samsvarer imidlertid med andre studier gjort på olivenbladekstrakt og oleuropein, hvor olivenbladekstrakt blant annet har vist bedre effekt enn oleuropein på bakterier som *B. subtilis* og *S. enteritidis* (4). Det er tidligere vist at olivenbladekstrakt inneholder flere bioaktive komponenter, eksempelvis verbascoside og rutin (13, 19), og det kan dermed tenkes at det er nettopp blandingen av ulike komponenter som utøver den antibakterielle aktiviteten og ikke

enkeltkomponenter som oleuropein alene. I dette forsøket tyder resultatene på at det er miksen av flere substanser som utgjør den antibakterielle aktiviteten, da oleuropein alene ikke viser aktivitet. Derimot har noen studier også vist at enkeltkomponenter har bedre effekt mot visse bakterier enn flere komponenter sammen (4), så hvordan dette henger sammen er tydelig sammensatt og komplekst.

Ut fra resultatene kan man se at olivenbladedekstraktet viste bedre antibakteriell aktivitet i «well diffusion»-testen (figur 1 B) enn i «disc diffusion»-testen (figur 1 A). Hva som er grunnen til dette er vanskelig å si sikkert, og det kan godt tenkes at det skyldes tilfeldigheter. Begge metodene baseres på diffusjon (8), og man er derfor avhengig av at virkestoffet er i stand til å diffundere ut i agaren for å kunne måle antibakteriell aktivitet. Som nevnt tidligere kan det være en blanding av flere bioaktive komponenter som utøver den antibakterielle aktiviteten til olivenbladedekstraktet. Dersom dette stemmer kan det tenkes at noen av de antibakterielle aktive stoffene i olivenbladedekstraktet er mindre polare og at de i «disc diffusion»-testen heller «fester seg» til lappene enn å diffundere ut i agaren. I «well diffusion»-testen har ikke stoffene noe å «feste seg» til og mer vil dermed diffundere ut i agaren. Dette kan være årsaken til at det observeres et bedre resultat i «well diffusion»-testen enn i «disc diffusion»-testen. Samtidig skal det også nevnes at konsentrasjonene i «well diffusion»-testen er høyere enn i «disc diffusion»-testen, og det kan også tenkes at det er dette som gjør at «well diffusion»-testen kommer bedre ut. Med tanke på at resultatene fra denne undersøkelsen ikke er helt i samsvar med tidligere funn, hvor olivenbladedekstraktet har vist bedre effekt, kan det tyde på at diffusjonsmetoden ikke er optimal for testsubstansen. Eksempler på metoder som er benyttet hvor olivenbladedekstraktet har vist effekt er «broth microdilution assay» (20) og «time-kill assay» (18), og det kan tenkes at disse metodene er bedre egnet.

I dette forsøket viste oleuropein ingen antimikrobiell aktivitet mot noen av de testede bakteriene. Oleuropein er et av flere virkestoffer i olivenbladedekstrakt som i tidligere studier har vist hemmende effekt mot både gram-positive og gram-negative bakterier. Stoffets antibakterielle aktivitet har også variert for enkelte bakterier i ulike studier, slik som for *S. aureus* (4, 49). Konsentrasjonene for oleuropein brukt i dette forsøket er valgt ut fra tidligere rapporterte verdier som har vist effekt i lignende tester (4, 49), og det ble valgt å ligge over disse verdiene. Ut fra dette hadde man dermed kunne forvente at oleuropein i dette forsøket ville vise antibakteriell effekt. Hvilke grunner som ligger bak at resultatene likevel ikke samsvarer kan være flere. Ser man eksempelvis på en av studiene (49) som har testet

oleuropein i lavere konsentrasjoner, men hvor stoffet likevel har vist antimikrobiell aktivitet, kan man se at man her har valgt å teste mot andre bakteriearter. Unntaket er *S. aureus*, som her viser følsomhet til tross for mye lavere konsentrasjoner av oleuropein. Ser man derimot på en studie hvor oleuropein er testet mot noen av de samme type bakterier, slik som *E. coli* og *S. aureus* (4), samsvarer resultatene. Dette viser at valg av bakteriearter vil ha innvirkning på målt antibakteriell aktivitet for et stoff, og at effekten kan variere alt etter hvilke arter man benytter. Mulige forklaringer på dette kan her ligge i oleuropeins virkningsmekanismer. Det at oleuropeins virkning på *S. aureus* varierer viser at man ikke kan trekke konklusjoner om antibakteriell virkning ut fra en studie, men at man trenger flere bekreftende studier før man sikkert kan si om et stoff har effekt eller ikke.

Andre grunner til motstridende resultater kan være valg av bakteriekonsentrasjon. I denne undersøkelsen ble det valgt å bruke en bakteriekonsentrasjon på omtrent 10^5 CFU/ml (se tabell 1), mens man i andre tilsvarende forsøk har valgt å ligge på konsentrasjoner rundt 10^7 - 10^8 CFU/ml (4, 49). Forskjellige bakteriekonsentrasjoner kan utgjøre en svakhet når det gjelder sammenligning av resultater på antibakteriell aktivitet, da bakteriekonsentrasjon kan ha innvirkning på bakteriedrepende effekt på den måten at økt bakteriekonsentrasjon kan føre til redusert bakteriedrepende effekt. Hvor stor påvirkning det har kan imidlertid variere mellom ulike virkestoffer (50). At bakteriekonsentrasjonen i dette forsøket er det som gjør at resultatene ikke samsvarer, er heller lite trolig. Dette fordi det i denne undersøkelsen er brukt bakteriekonsentrasjoner som er lavere enn hos de studiene hvor oleuropein har vist antibakteriell aktivitet (4, 49).

Det at oleuropein her ikke viser antibakteriell aktivitet til tross for at det er blitt rapportert i flere studier (15, 17) kan også, i likhet med for olivenbladetektet, ligge i valg av metode. I dette forsøket er det valgt å bruke «disc diffusion»-test og «well diffusion»-test, som begge baseres på diffusjon av substans ut i agar (8). Dette gir likevel ingen god forklaring på oleuropeins manglende antibakteriell aktivitet i denne undersøkelsen, da metoden skal være godt egnet for polare stoffer (10), og dermed også oleuropein. I tillegg har andre studier, hvor oleuropein viser antibakteriell aktivitet, også benyttet denne metoden (4, 49).

5.2 Propolis og galangin

I dette forsøket viste propolis ingen stor antibakteriell aktivitet, med effekt kun mot *L. monocytogenes* (resultat ikke illustrert). Ut fra det man har sett i tidligere studier hadde man kunne forvente at propolis viste bedre antibakteriell aktivitet. Tidligere har man blant annet sett at etanolekstrakt av propolisprøver fra ulike områder i nordvest-Italia har god effekt mot den gram-positive bakterien *Streptococcus pyrogenes* (51). Videre har også etanolekstrakt av propolisprøver fra Tyrkia og Brasil vist seg effektive mot ulike oralpatogene bakterier, hvor gram-positive bakterier viste seg mer følsomme for ekstraktene enn gram-negative (52). I andre studier (5) har propolisprøver fra Sør-Afrika og Brasil vist effekt mot blant annet *E. faecalis*, *E. coli* og *S. aureus*, hvor sistnevnte var spesielt følsom. Dette er bakterier som også er blitt testet i denne undersøkelsen, men som her ikke viste noen følsomhet ovenfor propolis. Så hvorfor skiller resultatene i dette forsøket seg fra resultater i tidligere forsøk? En av faktorene som bør nevnes er innholdet av propolis i preparatet som her er testet. I studiene nevnt ovenfor (5, 51, 52) har man hentet «rå» propolis fra naturen som man videre har ekstrahert i etanol. Propolisprøven brukt i dette forsøket kommer ikke direkte fra en «rå» propolisprøve, men er tatt ut fra et preparat som også inneholder andre stoffer, slik som eksempelvis honning (53). Informasjonen man får ut fra etiketten på preparatet gjør det også vanskelig å vurdere hvor mye propolis som er i de prøvene som her har blitt tatt ut for testing. Det kan dermed tenkes at konsentrasjonen av propolis som er testet i dette forsøket er lav i forhold til de andre studiene og at resultatet derav viser lavere antibakteriell aktivitet. Det at propolis her har effekt mot *L. monocytogenes*, men at effekten kun viser seg i den høyeste konsentrasjonen, tyder nettopp på for lav konsentrasjon. Ser man på forskjellen mellom «well diffusion»-testen og «disc diffusion»-testen viser propolis kun effekt i «well diffusion»-testen. Dette tyder også på at konsentrasjonen av propolisprøven er for lav, da konsentrasjonen vil være høyere i «well diffusion»-testen enn i «disc diffusion»-testen.

En annen faktor som kan påvirke resultatet er også her valg av metode. Bosio m. fl. (51) testet antibakteriell aktivitet ved propolis ved bruk av ulike metoder, hvor en av metodene var en form for «disc diffusion»-test. Deres resultater viste at denne metoden ikke var godt egnet for testing av propolis, da man så en ujevn diffusjon av prøvene. Man vet at propolis er et produkt som består av en rekke ulike kjemiske komponenter, slik som flavonoider og fenolsyrer (27). Det er tidligere sagt at metoder basert på diffusjon er dårlig egnet for propolis nettopp på grunn av at resultatet vil påvirkes av i hvor stor grad de ulike komponentene diffunderer (22).

Flavonoider er et eksempel på stoffer som i diffusjonsbaserte metoder gir varierende resultater, og som propolis er rik på (29). Om resultatene i dette forsøket er påvirket av ujevn diffusjon er vanskelig å si, men metoden er nok ikke optimal for testing av dette produktet og utgjør dermed en svakhet i forhold til troverdigheten til resultatet.

Som nevnt ovenfor vet man at propolis er sammensatt av en rekke ulike kjemiske komponenter, og man vet at ulike løsningsmidler ekstraherer ulike komponenter. Samtidig er det også antydning at noen bestanddeler i propolis er mer potente når det gjelder antibakteriell aktivitet enn andre (30, 51). Ut fra dette er det tydelig at valg av løsningsmiddel vil ha betydning for hvilket resultat man får. Som et eksempel viste Koru m.fl. (52) at ulike prøver av propolis viste ulik løselighet i lik mengde etanol. Dette viser at kjemisk sammensetning av prøven burde tas i betraktning med tanke på valg av løsningsmiddel, noe som igjen viser utfordringen med propolis da sammensetningen varierer i stor grad. En svakhet med propolispreparatet som er testet i dette forsøket er at man ikke har noen informasjon om hvilket ekstraksjonsmiddel som er brukt. Det skal også nevnes at man ikke har noen god informasjon om propolisen som er i preparatet. Dette gjør det vanskelig å sammenligne resultatet med andre studier, men det kan være mulige forklaringer på hvorfor man ser ulik antibakteriell aktivitet.

Selv om de faktorene som er nevnt ovenfor samt andre faktorer slik som bakterietyper og bakteriekonsentrasjon kan være med å forklare motstridende resultater, vil det være vanskelig å kunne sammenligne resultatene fra dette forsøket opp mot andre. Å angi et mål på antimikrobiell aktivitet hos propolis generelt vil være vanskelig. Dette nettopp på grunn av at den kjemiske sammensetningen av propolis varierer i stor grad. Ikke bare er propolisprøver fra ulike områder forskjellige, men også prøver fra samme område kan være ulike i kjemisk sammensetning. Dette kommer av flere faktorer slik som hvilke planter som er i området, men også hvilke biearter som har produsert propolisen (21). Det kan tenkes at studier hvor propolis har vist antibakteriell effekt har en helt annen komposisjon og kanskje dermed høyere potensial som antibakterielt middel enn preparatet i dette forsøket. Uten mulighet til å sammenligne resultatene, er det vanskelig å vurdere propolis sin antibakterielle aktivitet ut fra denne undersøkelsen. Det som likevel kan sies er at propolispreparatet i dette forsøket ikke viser særlig antibakteriell aktivitet og dermed ikke viser stort potensial som antibakterielt middel.

Propolis sin antibakterielle aktivitet har tidligere blitt forklart med innhold av blant annet flavonoider, eksempelvis galangin og pinocembrin (30, 52). Flavonoider er ulike fenolforbindelser som blant annet finnes i en rekke ulike planter (29). Galangin tilhører gruppen flavonoler og er funnet i relativt høye konsentrasjoner i noen typer propolis (5), samt i planter slik som eksempelvis *Helichrysum aureonitens* (31). Galangins antibakterielle aktivitet er ikke undersøkt i stor grad, men noen studier på stoffet er gjort. Stoffet har blant annet tidligere vist antibakteriell effekt mot bakterier som *B. cereus*, *S. aureus*, *Micrococcus kristinae* og *E. cloacae*. Mens bakterier som *E. coli* og *K. pneumoniae* ikke har vist seg følsom (31). *P. aeruginosa* og meticillinresistente *S. aureus* (MRSA) er bakterier som har vist seg følsomme ovenfor stoffet i andre studier (30). I dette forsøket viste galangin antibakteriell aktivitet mot to av fem bakterier, *L. monocytogenes* og *S. aureus* (figur 2). Resultatet bekrefter delvis det som tidligere er funnet, men stoffets effekt på *L. monocytogenes* er derimot ikke funnet rapportert tidligere. Den antibakterielle aktiviteten til galangin har vist seg bedre mot gram-positive bakterier enn mot gram-negative (31). Dette samsvarer delvis med resultatene i denne undersøkelsen, hvor stoffet viser effekt mot noen gram-positive bakterier men ikke mot gram-negative. Det at galangin har vist bedre effekt mot gram-positive enn gram-negative (31), gjør at man kunne forventet bedre resultater, da kun to av fire gram-positive bakterier viste følsomhet i dette forsøket (figur 2). Samtidig er grunnlaget for å si at det er en forskjell mellom galangins aktivitet på gram-positive og gram-negative bakterier i denne undersøkelsen liten, da det her kun er testet mot en gram-negativ bakterie. Ser man på konsentrasjonene som er benyttet i dette forsøket, er disse valgt ut fra verdier hvor galangin tidligere har vist effekt (31, 54). Det ble også valgt å ligge godt over disse tidligere rapporterte verdiene, og man kunne dermed også på grunn av konsentrasjonene ha forventet bedre resultater. Hvorfor man i denne undersøkelsen får lavere antibakteriell aktivitet kan skyldes tilfeldigheter, eller faktorer som bakteriekonsentrasjon, løsningsmidler og metode, som diskutert tidligere.

Det at resultatene ikke samsvarer helt med tidligere rapporteringer gjør at man også her kan stille seg spørsmål til troverdigheten til resultatene. Noe som kan diskuteres, i likhet med for propolis, er valg av løsningsmiddel og metode. Som nevnt tidligere er diffusjonsbaserte metoder for testing ved antimikrobiell aktivitet ikke optimal for flavonoider. Dette på grunn av at det er sett en ujevn diffusjon av forbindelsene ut i agaren (22, 29). Galangin er en flavonol, som er en undergruppe av flavonoider, og metodene som ble benyttet i dette forsøket vil dermed ikke være optimal for stoffet. Metoden utgjør dermed en svakhet i forhold

til troverdigheten av resultatet. For å løse opp galangin ble 0,1M natriumhydroksid (NaOH) brukt. Tilsetning av NaOH gjør galangin mer vannløselig ved hjelp av saltdannelse. Dersom galangins virkningsmekanisme er knyttet til intracellulære prosesser, må forbindelsen krysse cellemembranen for å ha effekt. Saltdannelse kan dermed ha negative innvirkninger på forbindelsens antibakterielle aktivitet, da den får redusert evne til å krysse lipofile membraner. Den antibakterielle aktiviteten av galangin vil dermed være lavere enn hva som er rapportert i andre studier, hvor andre løsningsmidler er benyttet (30, 31).

Selv om løsningsmiddel og metode setter spørsmålstegn til resultatene, er det likevel ting som indikerer at de er troverdige. Ut fra resultatet kan man blant annet se at den antibakterielle effekten av galangin er konsentrasjonsavhengig (figur 2). For både *L. monocytogenes* og *S. aureus* ser man at effekten gradvis øker med økt konsentrasjon av galangin, og dette gjelder både for «disc diffusion»-testen (figur 2 A) og «well diffusion»-testen (figur 2 B). Hadde galangin hatt ujevn diffusjon ut i agaren ville resultatet mest sannsynlig ikke vist en like tydelig konsentrasjonsavhengig aktivitet som den gjør her. Sammenligner man resultatene fra denne undersøkelsen opp mot tidligere funn, ser man at noe også bekreftes. Galangin er blant annet tidligere testet mot *E. coli* uten å påvise antibakteriell aktivitet (31), noe som bekreftes i denne undersøkelsen (figur 2). I tillegg bekrefter resultatene at *S. aureus* er følsom ovenfor stoffet (30, 31).

5.3 Usnea-tinktur og (+)-usninsyre

Prøvene av usneaekstraktet i dette forsøket ble undersøkt både i originalform som tinktur, og i en form hvor etanolen ble fordampet og ekstraktet i stedet ble løst i NaOH. Resultatet fra undersøkelsen viste at usnea-tinkturen hadde effekt mot tre av fem bakterier (figur 3), mens ekstraktet løst i NaOH ikke hadde effekt mot noen av de testede bakteriene (resultat ikke illustrert). Det er ikke funnet litteratur gjort på denne typen preparater tidligere, og uten mulighet til sammenligning blir det dermed vanskelig å verifisere resultatet. Det at det kun er prøven som inneholder etanol som viser antibakteriell aktivitet, gjør at det kan stilles spørsmål til om det er ekstraktet i seg selv om utøver effekten, eller om det er løsningsmidlet. Etanol er mye brukt som desinfeksjonsmiddel på grunn av sine antibakterielle egenskaper (55), og ble i dette forsøket i likhet med usneaprøvene testet etter antibakteriell aktivitet. Resultatene viste tydelig effekt mot bakteriene i «disc diffusion»-testen, med unntak av *E. faecalis*. I «well diffusion»-testen viste derimot etanol ingen aktivitet på bakteriene. Etanol er et flyktig stoff

og forskjellen på resultatene mellom de ulike metodene skyldes derfor mest sannsynlig at stoffet lettere fordampes i «well diffusion»-testen enn i «disc diffusion»-testen, hvor stoffet absorberes inn i lappene og dermed ikke fordampes like lett. Ut fra den antibakterielle aktiviteten til etanol og den manglende aktiviteten til usneaekstraktet løst i NaOH, tyder det på at det etanolen som utøver effekten til tinkturen og ikke usneaekstraktet. Samtidig kan man spørre seg hvorfor tinkturen viser effekt i «well diffusion»-testen (figur 3 B), dersom det er etanolen som utøver effekten, da man skulle tro at etanolen ville fordampes på samme måte her som for prøven med kun etanol. I tillegg skulle man forvente at tinkturen viste effekt mot *E. coli* og *K. rhizophilia* i likhet med etanolprøvene, dersom det er etanolen i tinkturen som står bak den antibakterielle aktiviteten. Ut fra dette tyder det på at det ikke er etanolen som utøver effekt mot de testede bakteriene. Det skal likevel nevnes at etanolprøven er sterkere (75 %) enn etanolstyrken på tinkturen (50 %), og dette kan være en mulig forklaring på hvorfor etanolprøven viser effekt på flere bakterier enn tinkturen.

Som virkestoff for usnea-preparatet ble (+)-usninsyre valgt ut, da stoffet er sett i sammenheng med antibakteriell aktivitet hos *Usnea*-arter og lav generelt (6, 32). Det gis ingen informasjon om innhold av (+)-usninsyre i preparatet, og innholdet av tinkturen er heller ikke analysert i dette forsøket. Man kan dermed ikke garantere at usnea-tinkturen inneholder (+)-usninsyre. Det vil likevel være sannsynlig at virkestoffet er i preparatet, da arter i slekten *Usnea* er rike på usninsyre (32, 37) og løsningsmidlene som er brukt skal være godt egnet for stoffet. Dersom det ikke er etanolen som utøver effekten ved preparatet, kan det være virkestoffer som (+)-usninsyre som står bak den antibakterielle aktiviteten. Ser man på resultatet for (+)-usninsyren (figur 4) i forhold til usnea-tinkturen (figur 3), viser virkestoffet høy antibakteriell aktivitet i forhold til preparatet. Ut fra dette kunne man ha forventet bedre resultater av tinkturen enn det som ble vist i undersøkelsen. Etersom konsentrasjonen av (+)-usninsyre i preparatet er ukjent, kan den lave antibakterielle aktiviteten dermed skyldes for lav konsentrasjon av stoffet. Samtidig skal det nevnes at dersom det er usneaekstraktet og (+)-usninsyre som utøver den antibakterielle effekten for tinkturen, burde også usneaekstraktet som er løst i NaOH vist effekt.

I og med at resultatet fra denne undersøkelsen er litt misvisende, er det vanskelig å si om usneaekstraktet her i seg selv har potensial som antimikrobielt middel. Dersom det faktisk er usneaekstraktet som står bak den antimikrobielle aktiviteten målt i forsøket, er det likevel lite trolig at preparatet vil ha klinisk effekt. Ut fra etiketten på preparatet skal ikke tinkturen

«drikkes ren», men fortynnes i vann før den drikkes. Konsentrasjonen av ekstraktet vil dermed bli lavere enn det som er testet her, og man ser i dette forsøket at det kun er de høyeste konsentrasjonene som faktisk har effekt (figur 3).

Usninsyre er en av de mest kjente sekundære metabolittene i flere typer lav, og er ofte sett i sammenheng med deres antibakterielle aktivitet. Forbindelsen finnes naturlig som både (+) og (-) enantiomer, hvor begge har vist biologisk aktivitet (32). (+)-usninsyre har i tidligere studier vist effekt mot både gram-positive (38, 39, 56) og gram-negative bakterier (6), men stoffet har vist seg mest aktivt mot gram-positive (38, 39, 56). I dette forsøket viste (+)-usninsyre god antibakteriell aktivitet, med effekt på fire av fem bakterier (figur 4). I likhet med tidligere studier (38, 56) viste stoffet også her bedre effekt mot gram-positive bakterier enn gram-negative, hvor *E. coli* var den eneste av bakteriene som ikke viste seg følsom. Aktiviteten mot *L. monocytogenes* og *K. rhizophilia* er derimot ikke blitt funnet rapportert tidligere. (+)-usninsyre var den testsubstansen i dette forsøket som viste best aktivitet. Aktiviteten viste seg konsentrasjonsavhengig og var tilsvarende i begge metodene (figur 4 A og B), noe som indikerer at metodene er godt egnet for stoffet. Selv om *E. coli* har vist seg resistent mot (+)-usninsyre i flere studier, er det også studier som har påvist effekt mot bakterien. Ranković m.fl. (6) undersøkte blant annet antibakteriell aktivitet ved usninsyre og acetonekstrakter av lavarten *Usnea barbata*. Resultatene viste at *E. coli*, sammen med flere gram-positive bakterier og noen sopper, var sensitive for testsubstansene. Det skal likevel nevnes at konsentrasjonen hvor *E. coli* viste følsomhet var høyere enn for de gram-positive bakteriene. Hvorfor denne studien fikk et annet resultat kan blant annet skyldes ulike faktorer som konsentrasjonen av usninsyre, valg av metode og løsningsmiddel. Konsentrasjonen som ble brukt hvor stoffet viste effekt var høyere enn det som har blitt benyttet i enkelte studier (38). Det er likevel lite trolig at forskjellen kun skyldes høyere konsentrasjon, da konsentrasjonen både i denne undersøkelsen og i andre studier (39) har vært høyere uten å påvise effekt.

Ut fra undersøkelsen gjort i dette forsøket kan man ikke si noe om virkningsmekanismen til (+)-usninsyre. Det eneste som kan trekkes fram er den tydelige forskjellen mellom gram-positive og gram-negative bakterier. Når det gjelder studier knyttet til virkningsmekanismer til usninsyre er det blant annet antydning at stoffets virkning på gram-positive bakterier skyldes hemming av RNA-syntese (38). I samme studie ble det vist at usninsyre ikke har denne virkningen på *E. coli*. Det er også antydning at usninsyrens virkning på *S. aureus* skyldes

ødeleggelse av cellemembranen (57). Hvorfor usninsyre ikke viser betydelig effekt på gram-negative bakterier, slik som *E.coli*, er derimot ikke nevnt. Dersom virkningsmekanismen krever at stoffet må inn i bakterien for å utøve sin effekt, kan forskjellen mellom usninsyrens effekt på gram-negative og gram-positive bakterier skyldes bakterienes ulike oppbygging av celleveggen. Gram-negative bakterier har et tynt peptidoglykanlag mellom en ytre og en indre membran, mens gram-positive bakterier har et tykkere peptidoglykanlag men mangler den ytre membranen (55). Dersom virkningsmekanismen er knyttet til ødeleggelse av cellemembranen, som antydnet for *S. aureus* (57), kan manglede effekt på gram-negative bakterier som *E. coli* skyldes at stoffet ikke klarer å passere den ytre membranen.

Ut fra det denne undersøkelsen og tidligere studier (6, 38, 39, 56) har vist, er det tydelig at (+)-usninsyre har potensial som antibakterielt middel. Så hvorfor er ikke bruken av stoffet da mer utbredt enn det det er i dag? Det finnes allerede flere produkter med usninsyre på markedet, hvor stoffet eksempelvis er brukt i deodoranter, munnskyllevann og produkter for vektreduksjon (32, 37). Samtidig har det i studier på blant annet mus blitt vist at usninsyre har toksiske effekter, da spesielt på leveren. Usninsyren er også blitt assosiert med leverskade og leversvikt hos mennesker i forbindelse med inntak av vektreduksjonsprodukter med usninsyre (37). Med tanke på disse toksiske effektene er usninsyre dårlig egnet som innvortes antibakterielt middel. Det kan likevel tenkes at stoffets antibakterielle effekt kan utnyttes i preparater til utvortes bruk. Fra resultatene i dette forsøket og andre studier (6, 38, 39, 56, 57), ser man blant annet at usninsyre har god effekt mot *S.aureus*, som er en bakterie assosiert med ulike hudinfeksjoner (55). I tillegg er stoffet også funnet effektivt mot andre bakterier assosiert med akne og andre hudsykdommer (56).

6 KONKLUSJON

Resultatene fra denne undersøkelsen viste at den antibakterielle aktiviteten hos de aktuelle naturpreparatene og virkestoffene varierte betraktelig. For enkelte substanser var den antibakterielle aktiviteten god, mens den for andre var fraværende. Effekten viste seg konsentrasjonsavhengig for de substansene som hadde effekt, og den viste seg varierende mot ulike bakteriearter.

Litteratur

1. **Gurib-Fakim, A.** (2006) Medicinal plants: Traditions of yesterday and drugs of tomorrow. *Molecular Aspects of Medicine*, 27(1), 1-93. Doi: 10.1016/j.mam.2005.07.008
2. **Balunas, M. J. & Kinghorn, A. D.** (2005) Drug discovery from medicinal plants. *Life Sciences*, 78(5), 431-441. Doi: 10.1016/j.lfs.2005.09-012
3. **Ríos, J. L. & Recio, M. C.** (2005) Medicinal plants and antimicrobial activity. *Journal of Ethnopharmacology*, 100(1-2), 80-84. Doi: 10.1016/j.jep.2005.04.025
4. **Lee, O.-H. & Lee, B.-Y.** (2010) Antioxidant and antimicrobial activities of individual and combined phenolics in *Olea europaea* leaf extract. *Bioresource Technology*, 101(10), 3751-3754. Doi: 10.1016/j.biortech.2009.12.052
5. **Suleman, T., Vuuren, S. V., Sandasi, M. & Viljoen, A. M.** (2015) Antimicrobial activity and chemometric modelling of South African propolis. *Journal of Applied Microbiology*, 119(4) 981-990. Doi: 10.1111/jam.12906
6. **Ranković, B., Kosanić, M., Stanojković, T., Vasiljević, P. & Manojlović, N.** (2012) Biological Activities of *Toninia candida* and *Usnea barbata* Together with Their Norstictic Acid and Usnic Acid Constituents. *International Journal of Molecular Sciences*, 13(11) 14707-14722. Doi:10.3390/ijms131114707
7. **Abreu, A. C., McBain, A. J. & Simões, M.** (2012) Plants as sources of new antimicrobials and resistance-modifying agents. *Natural Product Reports*, 29(9), 1007-1021. Doi: 10.1039/c2np20035j
8. **Hogg, S.** (2013). *Essential Microbiology* (2nd. Ed.). Chichester: John Wiley & Sons, Ltd.
9. **Othman, M., Loh, H. S., Wiart, C., Khoo, T. J., Lim, K. H. & Ting K. N.** (2010) Optimal methods for evaluating antimicrobial activities from plant extracts. *Journal of Microbiological Methods*, 84(2) 161-166. Doi: 10.1016/j.mimet.2010.11.008
10. **Klančnik, A., Piskernik, S., Jeršek, B & Monžina, S. S.** (2010) Evaluation of diffusion and dilution methods to determine the antibacterial activity of plant extracts. *Journal of Microbiological Methods*, 81(2) 121-126. Doi: 10.1016/j.mimet.2010.02.004
11. **Cowan, M.** (1999) Plant Products as Antimicrobial Agents. *Clinical Microbiology Reviews*, 12(4) 564-582.
12. **Boskou, D.** (2006). *Olive oil chemistry and technology* (2nd. Ed.). Champaign, Illinois: American Oil Chemists' Society (AOCS).

13. **Ghanbari, R., Anwar, F., Alkharfy, K. M., Gilani, A.-H. & Saari, N.** (2012). Valuable Nutrients and Functional Bioactives in Different Parts of Olive (*Olea europaea* L.) – A Review. *International Journal of Molecular Science*, 13(3), 3291-3340. Doi: 10.3390/ijms13033291
14. **Hashmi, M. A., Khan, A., Hanif, M., Farooq, U. & Perveen, S.** (2015). Traditional Uses, Phytochemistry, and Pharmacology of *Olea europaea* (Olive). *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2015. Article ID 541459. Hentet fra <http://dx.doi.org/10.1155/2015/541459>
15. **Omar, S. H.** (2010). Oleuropein in Olive and its Pharmacological Effects. *Scientia Pharmaceutica*, 2010(78), 133-154. Doi: 10.3797/scipharm.0912-18
16. **El, N. S. & Karakaya, S.** (2009). Olive tree (*Olea europaea*) leaves: potential beneficial effects on human health. *Nutrition Reviews*, 67(11), 632-638. Doi: 10.1111/j.1753-4887.2009.00248.x
17. **Barbaro, B., Toietta, G., Maggio, R., Arciello, M., Tarocchi, M., Galli, A. & Balsano, C.** (2014). Effects of the Olive-Derived Polyphenol Oleuropein on Human Health. *International Journal of Molecular Science*, 15(10), 18508-18524. Doi: 10.3390/ijms151018508
18. **Markin, D., Duek, L. & Berdicevsky, I.** (2003) *In vitro* antimicrobial activity of olive leaves. *Mycoses*, 46(3-4), 132-136
19. **Pereira, A. P., Ferreira, I. C. F. R., Marcelino, F., Valentão, P., Andrade, P. B., Seabra, R. ... Pereira, J. A.** (2007) Phenolic Compounds and Antimicrobial Activity of Olive (*Olea europaea* L. Cv Cobrançosa) Leaves. *Molecules*, 12(5), 1153-1162. Doi: 10.3390/12051153
20. **Sudjana, A. N., D'Orazio, C., Ryan, V., Rasool, N., Ng, J., Islam, N. ... Hammer, K. A.** (2008) Antimicrobial activity of commercial *Olea europaea* (olive) leaf extract. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 33(5), 461-463. Doi: 10.1016/j.ijantimicag.2008.10.026
21. **Huang, S., Zhang, C.-P., Wang, K., Li, G. Q. & Hu, F.-L.** (2014) Recent Advances in the Chemical Composition of Propolis. *Molecules*, 19(12) 19610-19632. Doi: 10.3390/molecules191219610
22. **Wagh, V. D.** (2013) Propolis: A Wonder Bees Product and Its Pharmacological Potentials. *Advances in Pharmacological Sciences*, 2013. Article ID 308249. Hentet fra <http://dx.doi.org/10.1155/2013/308249>

23. **Silva-Carvalho, R., Baltazar, F. & Almeida-Aguiar, C.** (2015) Propolis: A Complex Natural Product with a Plenthora of Biological Activities That Can Be Explored for Drug Development. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2015. Article ID 206439. Hentet fra <http://dx.doi.org/10.1155/2015/206439>
24. **Bankova, V.** (2005) Chemical diversity of propolis and the problem of standardization. *Journal of Ethnopharmacology*, 100(1-2) 114-117. Doi: 10.1016/j.jep.2005.05.004
25. **Sforcin, J. M. & Bankova, V.** (2010) Propolis: Is there a potential for the development of new drugs? *Journal of Ethnopharmacology*, 133(2) 253-260. Doi: 10.1016/j.jep.2010.10.032
26. **Life AS** (2015) *Propolis halsspray* Hentet 11.11.15 fra <http://www.life.no/produkter/forkjolelse/hals/propolis-halsspray>
27. **Kurek-Górecka, A., Rzepecka-Stojko, A., Górecki, M., Stojko, J., Sosada, M. & Świerczek-Zięba, G.** (2013) Structure and Antioxidant Activity of Polyphenols Derived from Propolis. *Molecules*, 19(1) 78-101. Doi: 10.3390/molecules19010078
28. **Lotfy, M.** (2006) Biological Activity of Bee Propolis in Health and Disease. *Asian Pacific journal of Cancer Prevention*, 7(1) 22-31.
29. **Cushnie, T. P. T. & Lamb, A. J.** (2005) Antimicrobial activity of flavonoids. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 26(5) 343-356. Doi: 10.1016/j.ijantimicag.2005.09.002
30. **Pepeljnjak, S. & Kosalec, I.** (2004) Galangin express bactericidal activity against multiple-resistant bacteria: MRSA, *Enterococcus* spp. and *Pseudomonas aeruginosa*. *FEMS Microbiology Letters*, 240(1) 111-116. Doi: 10.1016/j.femsle.2004.09.018
31. **Afolayan, A. J. & Meyer, J. J. M.** (1997) The antimicrobial activity of 3,5,7-trihydroxyflavone isolated from the shoots of *Helichrysum aureonitens*. *Journal of Ethnopharmacology*, 57(3) 177-181. Doi: 10.1016/S0378-8741(97)00065-2
32. **Ingólfssdóttir, K.** (2002) Usnic acid. *Phytochemistry*, 61(7) 729-736. Doi: 10.1016/S0031-9422(02)00383-7
33. **Kunnskapsforlaget, Aschehoug & Gyldendal.** (2015) *Norsk ordbok: Definisjon "tallus"*. Hentet 06.11.15 fra <https://www.ordnett.no/search?search=tallus&lang=no>
34. **Moreira, A. S. N., Braz-Filho, R., Mussi-Dias, V. & Vieira, I. J. C.** (2015) Chemistry and Biological Activity of *Ramalina* Lichenized Fungi. *Molecules*, 20(10) 8952-8987. Doi: 10.3390/molecules20058952

35. **Zambare, V. P. & Christopher, L. P.** (2012) Biopharmaceutical potential of lichens. *Pharmaceutical Biology*, 50(6) 778-798. Doi: 10.3109/13880209.2011.633089
36. **Müller, K.** (2001) Pharmaceutically relevant metabolites from lichens. *Applied Microbiology and Biothechnology*, 56(1) 9-16. Doi: 10.1007/s002530100684
37. **Guo, L., Shi, Q., Fang, J.-L., Mei, N., Ali, A. A., Lewis, S. M. ... Frankos, V. H.** (2008) Review of Usnic Acid and *Usnea Barbata* Toxicity. *Journal of Environmental Science and Health Part C – Environmental Carcinogenesis & Ecotoxicology Reviews*, 26(4) 317-338. Doi: 10.1080/10590500802533392
38. **Maciąg-Dorszyńska, M., Węgrzyn, G. & Guzow-Krzemińska, B.** (2014) Antibacterial activity of lichen secondary metabolite usnic acid is primarily caused by inhibition of RNA and DNA synthesis. *FEMS Microbiology Letters*, 353(1) 57-62. Doi: 10.1111/1574-6968.12409
39. **Leuterwein, M., Oethinger, M., Belsner, K., Peters, T. & Marre, R.** (1995) In Vitro Activities of the Lichen Secondary Metabolites Vulpinic Acid, (+)-Usnic Acid, and (-)-Usnic Acid against Aerobic and Anaerobic Microorganisms. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 39(11) 2541-2543. Doi: 10.1128/AAC.39.11.2541
40. **Norsk samfunnsvitenskapelige datatjeneste.** (2016) *Database for statistikk om høgre utdanning: Publiseringsskanaler*. Hentet 06.02.16 fra <https://dbh.nsd.uib.no/publiseringsskanaler/Forside>
41. **Veien til informasjonskompetanse** (2010). *Kildekritikk*. Hentet 28.01.15 fra <http://www.ntnu.no/viko/kildekritikk>
42. **PanReac AppliChem** (2016). *Analysesertifikat oleuropein*. Hentet 22.01.16 fra <https://www.applichem.com/en/shop/product-detail/as/oleuropein-reinst/>
43. **Alfa Aesar®** (2016). *Produktspesifikasjon 3,5,7-trihydroxyflavone*. Hentet 22.01.16 fra <https://www.alfa.com/en/prodspec/L14223>
44. **Urtekilden** (2015). *Urtekildens tinkturer*. Hentet 22.12.15 fra <http://www.rolv.no/butikk/tinkturer.htm>
45. **Sigma-Aldrich®** (2016). *Produktspesifikasjon (+)-Usnic acid*. Hentet 22.01.16 fra http://www.sigmaaldrich.com/Graphics/COFAInfo/SigmaSAPQM/SPEC/32/329967/329967-BULK_ALDRICH_.pdf
46. **VWR®Chemicals** (2012) *Mueller-Hinton Agar*. Hentet 15.01.16 fra https://no.vwr.com/store/asset?assetURI=https://no.vwr.com/stibo/hi_res/std.lang.all/32/99/13393299.pdf

47. **Matuschek, E., Brown, D. F. J. & Kahlmeter, G.** (2013) Development of the EUCAST disk diffusion antimicrobial susceptibility testing method and its implementation in routine microbiology laboratories. *Clinical Microbiology and Infection*, 20(4) 255-266. Doi: 10.1111/1469-0691.12373
48. **Torre, R.** (2008) Bioavailability of olive oil phenolic compounds in humans. *Inflammopharmacology*, 16(5) 245-247. Doi: 10.1007/s10787-008-8029-4
49. **Bisignano, G., Tomaino, A., Cascio, R. L., Crisafi, G., Uccella, N. & Saija, A.** (1999) On the *In-vitro* Antimicrobial Activity of Oleuropein and Hydroxytyrosol. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 51(8) 971-974
50. **Morrissey, I. & George, J. T.** (1999) The effect of the inoculum size on bactericidal activity. *Journal of antimicrobial Chemotherapy*, 43(3) 423-424. Doi: 10.1093/jac/43.3.423a
51. **Bosio, K., Avanzini, C., D'Avolio, A., Ozino, O. & Savoia, D.** (2000) *In vitro* activity of propolis against *Streptococcus pyogenes*. *Letters in Applied Microbiology*, 31(2) 174-177
52. **Koru, O., Toksoy, F., Acikel, C. H., Tunca, Y. M., Baysallar, M., Guclu, A. U. ... Salih, B.** (2007) In vitro antimicrobial activity of propolis samples from different geographical origins against certain oral pathogens. *Anaerobe*, 13(3-4) 140-145. Doi: 10.1016/j.anaerobe.2007.02.001
53. **NATURALES** (2012). *Propolis halsspray, 30 ml*. Hentet 10.02.16 fra <http://www.naturales.no/produkter/>
54. **Cushnie, T. P. T. & Lamb, A. J.** (2006) Assessment of the antibacterial activity of galangin against 4-quinolone resistant strains of *Staphylococcus aureus*. *Phytomedicine*, 13(3) 187-191. Doi: 10.1016/j.phymed.2004.07.003
55. **Madigan, M., Martinko, J., Bender, K., Buckley, D. & Stahl, D.** (2015). *Brock Biology of Microorganisms* (14th. Ed.). Harlow: Pearson Education Limited.
56. **Weckesser, S., Engel, K., Simon-Haarhaus, B., Wittmer, A., Pelz, K. & Schempp, C. M.** (2007) Screening of plant extracts for antimicrobial activity against bacteria and yeasts with dermatological relevance. *Phytomedicine*, 14(7-8) 508-516. Doi: 10.1016/j.phymed.2006.12.013
57. **Gupta, V. K., Verma, S., Gupta, S., Singh, A., Pal, A., Srivastava, S. K. ... Darokar, M. P.** (2012) Membrane-damaging potential of natural L-(-)-usnic acid in *Staphylococcus aureus*. *European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*, 31(12) 3375-3383. Doi: 10.1007/s10096-012-1706-7