Usporedba redukcijske snage i bioloških učinaka biljnih ekstrakata u ROS-ovisnim procesima

***Anton Ladović*, 4. razred**

Gimnazija Petra Preradovića Virovitica, Virovitica

Mentor: *Borna Louvar*

SAŽETAK

Provedeno je istraživanje s ciljem usporedbe redukcijske snage i bioloških učinaka biljnih ekstrakata bijelog čaja (*Camellia sinensis*), kamilice (*Matricaria chamomilla*) i matičnjaka (*Melissa officinalis*) u procesima povezanima s djelovanjem reaktivnih kisikovih vrsta (ROS). Vodeni biljni ekstrakti pripremljeni su metodom hladne maceracije u koncentracijama od 1 % i 5 % te su ispitani pomoću triju testova dostupnih u školskim uvjetima. Kemijskim testom s otopinom kalijevog permanganata procijenjena je redukcijska snaga biljnih ekstrakata, enzimskim testom ispitan je njihov učinak na aktivnost katalaze u stanicama pivskog kvasca (*Saccharomyces cerevisiae*), a fiziološkim testom praćen je utjecaj predtretmana sjemenki rotkvice (*Raphanus sativus*) na klijavost i duljinu korjenčića, koji su ovisni o fiziološkom djelovanju ROS-a. Rezultati kemijskog testa pokazali su da kod ekstrakta bijelog čaja nema statistički značajne razlike u antioksidativnoj aktivnosti između niže i više koncentracije, dok je kod kamilice i matičnjaka zabilježen porast antioksidativne aktivnosti povećanjem koncentracije. U enzimskom testu nije utvrđena statistički značajna promjena aktivnosti katalaze. U fiziološkom testu nisu uočene veće razlike u klijavosti sjemenki između više i niže koncentracije istog biljnog ekstrakta, što je vidljivo iz sličnih postotaka klijavosti. Razlike su zabilježene u duljini korjenčića, pri čemu su ekstrakti bijelog čaja, suprotno njegovu očekivanju, djelovali stimulativno na rast, dok su kamilica i matičnjak djelovali inhibicijski. Dobiveni rezultati pokazuju da visoka redukcijska snaga biljnih ekstrakata nije nužno jednaka njihovom biološkom učinku u živim sustavima te da je za razumijevanje njihova djelovanja potrebno koristiti i kemijske i biološke testove.

Ključne riječi: *oksidativni stres; prooksidans; vodikov peroksid; doza-ovisni učinak*

UVOD

Prema Svjetskoj organizaciji za koroziju (Hays, 2016), procjenjuje se da korozija metala svake godine uzrokuje goleme štete na vozilima i građevinama diljem svijeta. No, pojava slična koroziji ne prijeti samo metalima, nego i živim bićima. I unutar naših stanica svakodnevno se odvijaju slične reakcije koje ih postupno oštećuju. Zanimljivo je da iza oba procesa stoji isti kemijski element – kisik. Tijekom staničnog disanja u mitohondrijima, osim stvaranja ATP-a, dolazi i do nastanka štetnih spojeva koje nazivamo reaktivnim kisikovim vrstama (ROS, engl. Reactive Oxygen Species), među kojima su najpoznatiji superoksidni anion ($O_2^{-}\bullet$) i hidroksilni radikal (•OH). Ovi se spojevi nazivaju se slobodnim radikalima jer sadrže jedan nespareni elektron, zbog čega su vrlo reaktivni i snažni oksidansi. Vodikov peroksid (H_2O_2) nema nesparene elektrone pa pripada neradikalnim reaktivnim vrstama. Ipak, u reakciji s prijelaznim metalima može postati izvor vrlo reaktivnih •OH (Sotler i sur., 2019).

Tijekom milijuna godina evolucije organizmi su razvili različite antioksidanse kako bi se obranili od prekomjernog stvaranja ROS, tj. oksidativnog stresa. Budući da su biljke sesilne i neprestano izložene promjenama u okolišu, ti su im zaštitni mehanizmi posebno važni. Antioksidansi mogu biti enzimski kao što je katalaza koja razgrađuje H_2O_2 na vodu (H_2O) i kisik (O_2), ili neenzimski, poput fenola i karotenoida (Sotler i sur., 2019). Fenolni spojevi su među najvažnijim biljnim antioksidansima, a građeni su od jednog ili više aromatskih prstenova s jednom (fenoli) ili više (polifenoli) fenolnih –OH skupina. Njihova antioksidativna uloga temelji se na doniranju elektrona ili atoma vodika iz svoje –OH skupine ROS-u, čime ga reduciraju i smanjuju njegovo štetno djelovanje. Pritom se fenolni spoj sam

Autori zadržavaju autorska prava te časopisu daju pravo prvog objavljivanja rada u skladu s licencijom CC BY 4.0, koja dopušta drugima dijeljenje rada uz navođenje autorstva i izvornog mjesta objavljivanja rada u časopisu.

oksidira u stabilniji fenoksilni radikal (slika 1). Ovakva sposobnost antioksidansa, da prijenosom elektrona (ili vodikovog atoma), reducira oksidans naziva se redukcijska snaga (Zagoskina i sur., 2023). Redukcijska snaga je kemijsko svojstvo antioksidansa, čija se biološka uloga može dodatno provjeriti u pokusima s enzimima i živim stanicama.

$$X^{\bullet} + AH \rightarrow XH + A^{\bullet}$$

Slika 1 Neutralizacija ROS-a (X•) antioksidansom (AH). Slobodni radikal X• preuzima vodikov atom iz molekule antioksidansa AH, čime nastaje stabilna molekula XH te stabilni radikal antioksidansa A•

Izvor: Echegaray i sur., 2021

Za istraživanje antioksidativne aktivnosti i bioloških učinaka povezanih s ROS-om odabrane su sljedeće biljne vrste: bijeli čaj (*Camellia sinensis*), kamilica (*Matricaria chamomilla*) i matičnjak (*Melissa officinalis*). Ove su biljne vrste odabrane jer su svima dobro poznate, lako se mogu nabaviti i izvor su bioaktivnih spojeva koji se mogu ekstrahirati vodom. Iako se najčešće konzumiraju u obliku toplih čajeva, u ovom istraživanju primijenjena je metoda maceracije vodom na sobnoj temperaturi kako bi se očuvali spojevi osjetljivi na visoku temperaturu. Stoljećima se brojne biljne vrste zbog svog blagotvornog djelovanja koriste za ublažavanje tegoba. Danas je poznato da njihov učinak uvelike ovisi i o fenolnim spojevima koje sadrže. Fenolni spojevi su vrlo raznolika skupina, a u ovom istraživanju opisani su oni najzastupljeniji u analiziranim biljkama.

U svom preglednom radu, McKay i Blumberg (2006) navode da kamilica sadrži brojne bioaktivne spojeve, ponajprije flavonoide, među kojima se ističe apigenin. Prema njihovim navodima, kamilica pokazuje antioksidativno, antimikrobno i protuupalno djelovanje, što je potvrđeno u istraživanjima na životinjama. Apigenin je flavonoid građen od triju aromatskih prstenova i sadrži tri –OH skupine. U svojoj preglednoj analizi, Somavanshi i sur. (2021) ističu da bijeli čaj obiluje flavonoidima, osobito katehinima, među kojima je najznačajniji epigalokatehin galat (EGCG). Autori navode da EGCG pokazuje snažno antioksidativno djelovanje te inhibira enzime povezane sa starenjem kože, poput elastaze i kolagenaze. EGCG je građen od triju aromatskih prstenova i sadrži ukupno osam –OH skupina. U svom eksperimentalnom radu, Ghazizadeh i sur. (2020) pokazali su da ekstrakt matičnjaka sadrži fenolne kiseline, među kojima se kao glavni bioaktivni spoj ističe rosmarinska kiselina. Prema njihovim rezultatima matičnjak smanjuje oksidativni stres i povećava aktivnost antioksidativnih enzima u organizmu. Rosmarinska kiselina građena je od dvaju aromatskih prstenova, sadrži četiri –OH skupine te jednu karboksilnu skupinu (–COOH), koja joj daje kiseli karakter.

Odnos između antioksidansa i ROS-a složeniji je nego što se na prvi pogled čini, jer antioksidansi u određenim uvjetima mogu djelovati i prooksidativno, osobito u prisutnosti prijelaznih metala. Primjer je askorbinska kiselina koja u prisutnosti iona željeza može reducirati Fe^{3+} u Fe^{2+}, a takvi ioni mogu reagirati s H_2O_2 i stvarati slobodne radikale •OH (Sotler i sur., 2019). S druge strane, ROS ne djeluju uvijek štetno. U odgovarajućim količinama ROS oksidiraju ključne embrionalne proteine, čime se prekida dormantnost sjemena i potiče početak klijanja (Oracz i sur., 2007). Zbog toga se u ovom istraživanju očekuje da veće koncentracije biljnih ekstrakata mogu inhibirati procese ovisne o ROS-u, poput klijanja.

Postoji više specifičnih testova za procjenu antioksidativne aktivnosti, među kojima je jedan od najčešće korištenih DPPH test, koji se temelji na mjerenju promjene apsorbancije nastale redukcijom slobodnog radikala DPPH. Međutim, reagens za ovaj test je teško dostupan, toksičan i zahtijeva uporabu spektrofotometra (Amponsah i sur., 2016). Zbog toga su u ovom istraživanju odabrana tri

modificirana testa koja omogućuju ispitivanje djelovanja biljnih ekstrakata na različitim razinama. Prvi test prikazuje izravnu kemijsku antioksidativnu aktivnost biljnih ekstrakata prema modelnom oksidansu, dok druga dva prikazuju biološke učinke povezane s procesima ovisnima o ROS-u:
1. **kemijski test** – mjeri sposobnost biljnih ekstrakata da reduciranjem smanje oksidativno djelovanje modelnog oksidansa, odnosno permanganatnih iona (MnO_4^-)
2. **enzimski test** – mjeri učinak biljnih ekstrakata na aktivnost katalaze u razgradnji H_2O_2 u stanicama kvasca
3. **fiziološki test** – mjeri kako predtretman biljnim ekstraktima utječe na klijavost i rast korjenčića, procesima koji ovise o razini ROS-a.

Svrha ovoga istraživanja bila je ispitati povezanost između kemijske redukcijske snage biljnih ekstrakata i njihovih bioloških učinaka u procesima ovisnima o ROS-u, odnosno može li se na temelju njihova kemijskog djelovanja predvidjeti učinak u živim sustavima. Nezavisne varijable su vrsta biljnih ekstrakata i njihova koncentracija, a zavisne varijable stupanj redukcije MnO_4^-, aktivnost katalaze te postotak klijavosti i duljina korjenčića. Na temelju postavljene svrhe, cilj je bio ispitati djelovanje ekstrakata bijelog čaja, kamilice i matičnjaka na kemijskoj, enzimskoj i fiziološkoj razini te usporediti njihove učinke pri koncentracijama od 1 % i 5 %, kako unutar pojedinih biljnih vrsta tako i među ispitivanim vrstama.

U skladu s postavljenim ciljevima istraživanja, provjerene su sljedeće hipoteze:
1) Ekstrakti veće koncentracije (5 %) pokazat će veću antioksidativnu aktivnost u kemijskom testu s $KMnO_4$ u odnosu na ekstrakte niže koncentracije (1 %);
2) Ekstrakti veće koncentracije (5 %) uzrokovat će statistički značajnu promjenu aktivnosti katalaze u razgradnji H_2O_2 u odnosu na referentnu kontrolu i ekstrakte niže koncentracije (1 %);
3) Ekstrakti veće koncentracije (5 %) pokazat će jači učinak u fiziološkom testu klijavosti te će smanjiti postotak klijavosti i prosječnu duljinu korjenčića u odnosu na ekstrakte niže koncentracije (1 %);
4) Učinci biljnih ekstrakata razlikovat će se među biljnim vrstama, pri čemu se očekuje da će intenzitet kemijskog i biološkog učinka slijediti redoslijed: bijeli čaj > matičnjak > kamilica.

Poticaj za odabir ove teme bila je spoznaja da se redukcijska snaga biljnih ekstrakata može mjeriti i bez uporabe spektrofotometra. Osim toga, rezultati kemijskih testova ne moraju nužno pokazivati učinak koji ekstrakti imaju u živim organizmima. Stoga su u ovom istraživanju, uz kemijski test, primijenjena i dva biološka testa. Njima se procjenjivao učinak ekstrakata na aktivnost katalaze u stanicama kvasca izloženima oksidativnom stresu te na proces klijanja, koji je povezan s razinom ROS-a, uz poseban naglasak na doza-ovisni učinak.

METODE RADA

U ovom istraživanju ispitani su vodeni ekstrakti komercijalno nabavljenih suhih listova bijelog čaja (*Camellia sinensis*, „Yunnan Special“, Harissa Spice Store, Zagreb, Hrvatska; zemlja podrijetla: Kina), suhih cvjetova kamilice (*Matricaria chamomilla* L., Pampa Tea, Koprivnica, Hrvatska) i suhih listova matičnjaka (*Melissa officinalis* L., Suban d.o.o., Strmec, Hrvatska). Kao pozitivna kontrola korišten je vitamin C u obliku čiste askorbinske kiseline (SilaVit Vitamin C Pulver, Mivolis GmbH, Njemačka; čistoća 100 %), dok je kao negativna kontrola ili referentna kontrola korištena destilirana voda. Za svaki test pripremljena je nova otopina biljnih ekstrakata i kontrola. Ispitivani uzorci prikazani su na slici 2.

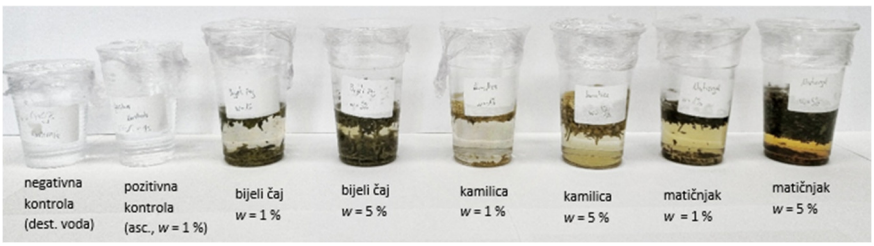
Prije provođenja testova provedeno je mjerenje pH vrijednosti biljnih ekstrakata te pozitivne i negativne kontrole. Za mjerenje pH korišteni su pH-indikator papirići pH-Fix 0–14 PT proizvođača Macherey-Nagel. Kemijski i enzimski test izvedeni su u učionici škole, dok je fiziološki test proveden u kući učenika, autora istraživačkog rada. Sva mjerenja organizirana su po danima prema sljedećem redoslijedu: najprije kemijski test, zatim enzimski test, a na kraju fiziološki test. Nakon provedenih i zabilježenih mjerenja provedena je statistička analiza podataka te izrađeni grafovi za svaki pojedini test.



Slika 2 Shematski prikaz ispitivanih biljnih uzoraka s masenim udjelima od 1 % i 5 % te kontrola
Autor: Ladović A., 2026.

Priprema biljnih ekstrakata

Biljni ekstrakti pripremljeni su potapanjem 1,01 g suhog biljnog materijala za pripravu 1 %-tnog ekstrakta te 5,26 g za 5 %-tni ekstrakt u 100 g destilirane vode. Koncentracija ekstrakta izračunata je kao maseni udio (%) prema formuli: $w(\%) = \frac{m_{tvari}}{m_{tvari} + m_{vode}} \cdot 100$ gdje je m_{tvari} masa biljnog materijala (g), a m_{vode} masa destilirane vode (g). Odabrane koncentracije omogućuju usporedbu učinka dviju različitih doza biljnih ekstrakata u kemijskom, enzimskom i fiziološkom testu. Budući da sastav ekstrakata nije točno određen, dobiveni rezultati se odnose na djelovanje cijelog biljnog ekstrakta, a ne na pojedine tvari. Maceracija je provedena tijekom 24 sata na sobnoj temperaturi, u plastičnim čašama. Biljni materijal prethodno je usitnjen u tarioniku. Čaše s uzorcima bile su prekrivene plastičnom folijom i pohranjene u tamnom ormaru kako bi se smanjio utjecaj svjetlosti. Nakon maceracije, svi ekstrakti filtrirani su kroz dvostruki sloj sterilne gaze, pri čemu je za svaki uzorak korišten novi sloj gaze. Askorbinska kiselina u prahu otopljena je u 100 g destilirane vode (1,01 g), čime je dobivena 1 %-tna otopina koja odgovara najnižoj ispitivanoj koncentraciji biljnih ekstrakata. Destilirana voda korištena za pripremu pozitivne, negativne i referentne kontrole također je ostavljena na sobnoj temperaturi tijekom 24 sata kako bi se osigurali jednaki uvjeti izlaganja kao i kod biljnih ekstrakata. Sve plastične čaše označene su nazivom biljne vrste i masenim udjelom (slika 3).



Slika 3 Biljni dijelovi uronjeni u destiliranu vodu za maceraciju (w = 1 % i 5 %)
Autor: Ladović A., 2026.

Kemijski test biljnih ekstrakata u otopini $KMnO_4$

Za ispitivanje antioksidativne aktivnosti korištena je razrijeđena otopina $KMnO_4$, a tijek reakcije praćen je vizualnim opažanjem karakteristične promjene boje permanganatnog iona (MnO_4^-). Polazna otopina

$KMnO_4$ pripremljena je otapanjem 0,10 g tvari u 100 mL destilirane vode. Iz polazne je otopine odmjeren 1 mL te razrijeđen s 499 mL destilirane vode (razrjeđenje 1:500). Za svako ispitivanje u Erlenmeyerovoj tikvici odmjereno je 20 mL pripremljene radne otopine $KMnO_4$, a biljni je ekstrakt dodavan kapalicom, uz lagano miješanje nakon svake dodane kapi. Prethodno je volumen kapi određen kalibracijom, pri čemu je utvrđeno da 10 kapi odgovara volumenu od 0,5 mL, što znači da jedna kap ima približan volumen od 0,05 mL. Za svaki je uzorak bilježen broj kapi potreban za postizanje trajne promjene boje. Zbog mogućih razlika u veličini kapi i vizualne procjene boje, rezultati ovog testa služe samo za usporedbu uzoraka. Svaki je uzorak ispitivan u šest ponavljanja i to u dvije odvojene serije pokusa, koje su uključivale pozitivnu kontrolu (askorbinska kiselina) i negativnu kontrolu (destiliranu vodu). Metoda je djelomično prilagođena prema radu Amponsah i sur. (2016), u kojem je redukcija MnO_4^- provedena pomoću taninske kiseline i mjerena spektrofotometrom. Antioksidativna aktivnost (AA) određena je prema formuli: $\mathrm{AA}\ (\%) = \left(\frac{N_{neg} - N_{ekstrakt}}{N_{neg} - N_{poz}}\right) \cdot 100$ gdje je N_{neg} prosječan broj kapi u negativnoj kontroli, N_{poz} prosječan broj kapi u pozitivnoj kontroli, a $N_{ekstrakt}$ prosječan broj kapi biljnog ekstrakta. Vrijednost 100 % označava antioksidativnu aktivnost pozitivne kontrole, dok 0 % odgovara negativnoj kontroli, odnosno odsutnosti antioksidativne aktivnosti.

Enzimski test katalazne aktivnosti u biljnim ekstraktima

Za ispitivanje utjecaja biljnih ekstrakata na aktivnost enzima katalaze korištene su žive dehidrirane stanice pivskog kvasca (*Saccharomyces cerevisiae*, Dr. Oetker), koje sadrže prirodni izvor katalaze. Odvagano je 7,00 g suhog praha kvasca, koji je zatim usipan u 100,0 mL biljnog ekstrakta, kao i u otopine referentne kontrole (destilirana voda) i pozitivne kontrole (askorbinska kiselina). Suspenzije su povremeno promiješane staklenim štapićem tijekom inkubacije od 60 minuta na sobnoj temperaturi (25 °C). Vrijeme inkubacije od 60 minuta odabrano je kako bi se omogućila interakcija biljnih spojeva s enzimima kvasca prije izlaganja H_2O_2. Nakon inkubacije, iz svake je suspenzije odvojeno 2,0 mL uzorka te je on raspoređen u tri odvojene epruvete (160 × Ø16 mm), čime su dobivena tri ponavljanja za svaku skupinu. U svaku epruvetu dodano je 0,50 mL 3 %-tne otopine H_2O_2. Epruvete su lagano promućkane kako bi se potaknula enzimska razgradnja i stvorila pjena. Nakon što se pjena stabilizirala, njezina je razina označena markerom, a visina je izmjerena ravnalom s najmanjom podjelom od 1 mm (± 0,5 mm). Ideja testa preuzeta je iz rada Iwase i sur. (2013), u kojem se aktivnost katalaze procjenjuje prema visini pjene nastale tijekom razgradnje H_2O_2. Referentna kontrola sadržavala je prah kvasca u destiliranoj vodi te je predstavljala osnovnu vrijednost katalazne aktivnosti. Negativna kontrola sadržavala je biljni ekstrakt i H_2O_2, ali bez dodatka praha kvasca, radi isključenja mogućeg pjenjenja uzrokovanog sastojcima ekstrakta.

Tijekom razgradnje H_2O_2 djelovanjem enzima katalaze oslobađa se kisik, pa je visina pjene u epruveti korištena kao jednostavan pokazatelj relativne katalazne aktivnosti u usporedbi s referentnom kontrolom. Na temelju prosječnih vrijednosti visine pjene izračunan je indeks katalazne aktivnosti prema formuli: $\mathrm{IKA}\ (\%) = \frac{\bar{h}_{uzorak}}{\bar{h}_{kontrola}} \cdot 100$, gdje $\bar{h}_{uzorak}$ predstavlja prosječnu visinu pjene u suspenziji biljnih ekstrakata u kojima je kvasac bio inkubiran, a $\bar{h}_{kontrola}$ prosječnu visinu pjene referentnog uzorka (kvasac u destiliranoj vodi). Na taj je način katalazna aktivnost prikazana relativno u odnosu na referentnu kontrolu. Vrijednosti veće od 100 % ukazuju na pojačanu razgradnju H_2O_2, dok vrijednosti manje od 100 % označavaju smanjenu katalaznu aktivnost u odnosu na kontrolu.

Fiziološki test djelovanja biljnih ekstrakata na klijavost rotkvice

Za ispitivanje utjecaja biljnih ekstrakata na klijavost korištene su sjemenke rotkvice (*Raphanus sativus*, Bavicchi spa, Via della Valtiera 293, Perugia 06135, Italija) iz ekološkog uzgoja. Prema uputama proizvođača, sjemenke se namaču 10 sati, a tijekom klijanja zalijevaju dva do tri puta dnevno. Sjemenke rotkvice (60 po čaši) potopljene su 6 sati u 100,0 mL otopine biljnih ekstrakata, destilirane vode (referentna kontrola) i otopine askorbinske kiseline (pozitivna kontrola). Vrijeme predtretmana skraćeno je na 6 sati kako bi se izbjegao mogući stres uzrokovan duljim izlaganjem biljnim ekstraktima. Predtretman sjemenki proveden je primjenom metode hidro-priminga. Ideja ove metode preuzeta je iz rada Adhikari i sur. (2022) te se temelji na kratkotrajnom namakanju sjemenki u destiliranoj vodi, odnosno u različitim otopinama. Nakon predtretmana sjemenke su raspoređene na pamučne ubruse navlažene destiliranom vodom, koji su bili položeni na porculanske tanjure. Ukupno su pripremljena 24 tanjura, jer je ispitano osam različitih tretmana, a svaki tretman proveden je u tri ponavljanja. Na svaki tanjur stavljeno je 20 sjemenki, što daje ukupno 60 sjemenki po tretmanu. Tanjuri su bili smješteni uz zapadni prozor, uz prirodno svjetlo (~ 8 h dnevno) i sobnu temperaturu (~ 25 °C). Svaki tanjur sa sjemenkama redovito je vlažen s 20 mL destilirane vode pomoću kapaljke. Desetog dana pokusa izbrojan je ukupan broj proklijalih sjemenki i izmjerena duljina svih korjenčića. Postotak klijavosti (PK) određen je kao omjer broja proklijalih sjemenki i ukupnog broja sjemenki:

$\mathrm{PK}\ (\%) = \left(\frac{\text{broj proklijalih sjemenki}}{\text{ukupan broj sjemenki}}\right) \cdot 100$. Indeks prosječne duljine korjenčića (IPDK) izračunat je kao omjer prosječne duljine korjenčića iz predtretmana biljnim ekstraktima i prosječne duljine korjenčića iz predtretmana s destiliranom vodom: $\mathrm{IPDK}\ (\%) = \left(\frac{\text{prosječna duljina korjenčića u tretmanu}}{\text{prosječna duljina korjenčića u kontroli}}\right) \cdot 100.$

Statistička obrada

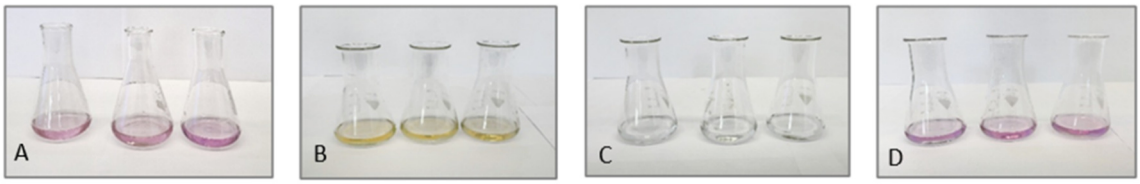
Podatci su obrađeni u programu Microsoft Excel izračunom srednjih vrijednosti i standardnih devijacija. Razlike između uzoraka analizirane su jednofaktorskom analizom varijance (ANOVA), a pri statistički značajnim razlikama ($p < 0,05$) primijenjen je post-hoc test Tukey HSD, uz korištenje javno dostupnog statističkog kalkulatora Statistics Kingdom (https://www.statskingdom.com, 2025). Za analizu podataka o klijavosti korišten je hi-kvadrat test u programu Microsoft Excel ($p < 0,05$ – statistički značajna razlika, $p \geq 0,05$ – nije statistički značajno).

REZULTATI

Izmjerene pH-vrijednosti pomoću pH-indikatorskih listića pokazale su da svi biljni ekstrakti u koncentracijama 1 % i 5 %, kao i destilirana voda (kontrolni uzorak), imaju pH vrijednost 5. Otopina askorbinske kiseline u koncentraciji 1 % imala je pH vrijednost 2.

Kemijski test biljnih ekstrakata u otopini $KMnO_4$

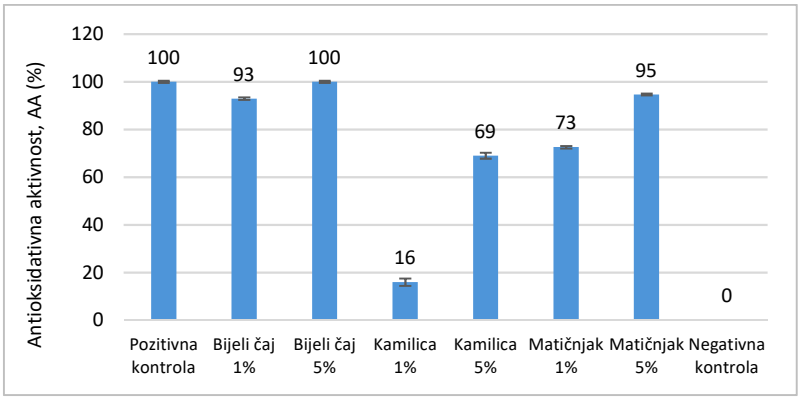
U kemijskom testu početna ljubičasta boja otopine $KMnO_4$ promijenila se nakon dodavanja biljnih ekstrakata i askorbinske kiseline. U pozitivnoj kontroli, nakon dodavanja askorbinske kiseline, ljubičasta boja otopine $KMnO_4$ postala je bezbojna. U svim uzorcima s biljnim ekstraktima u koncentracijama 1 % i 5 %, nakon dodavanja ekstrakata, otopina $KMnO_4$ poprimila je smeđu boju, dok je u negativnoj kontroli s destiliranom vodom zadržana početna ljubičasta boja (slika 4). Kako bi se provjerio mogući utjecaj boje samih ekstrakata na opaženu promjenu boje, ekstrakti su kapanjem dodavani u destiliranu vodu. Pritom nije uočeno zamućenje niti obojenje otopine.



Slika 4 Promjena boje otopine $KMnO_4$ nakon dodavanja ispitivanih uzoraka. Promjena boje $KMnO_4$ u prisutnosti biljnih ekstrakata prikazana je na reprezentativnom primjeru ekstrakta bijelog čaja u koncentraciji od 5 %. Početna ljubičasta boja radne otopine $KMnO_4$ (A). Promjena boje nakon dodavanja biljnih ekstrakta od 1 % i 5 % (B). Pozitivna kontrola – promjena boje nakon dodavanja askorbinske kiseline (C). Negativna kontrola – otopina nakon dodavanja destilirane vode (D)

Autor: Ladović A., 2026

Na slici 5 prikazana je antioksidativna aktivnost (AA) osam ispitivanih uzoraka $KMnO_4$ testom.



Slika 5 Usporedba antioksidativne aktivnosti (AA) ispitivanih uzoraka u $KMnO_4$ testu

Antioksidativna aktivnost bila je najveća kod askorbinske kiseline 1 % i bijelog čaja 5 %, gdje je zabilježena maksimalna vrijednost od 100 %. Vrlo visoke vrijednosti pokazao je i matičnjak 5 % (95 %) i bijeli čaj 1 % (93 %). Umjerenu aktivnost imao je matičnjak 1 % s 73 %. Kamilica je u usporedbi s ostalim uzorcima pokazala slabiji učinak, pri koncentraciji 5 % iznosila je 69 %, a pri 1 % svega 16 %, što je ujedno i najniža zabilježena vrijednost. Negativna kontrola nije pokazala antioksidativnu aktivnost. Detaljni izvorni podaci o prosječnom broju kapi potrebnih za promjenu boje otopine $KMnO_4$ nalaze se u prilogu 1.

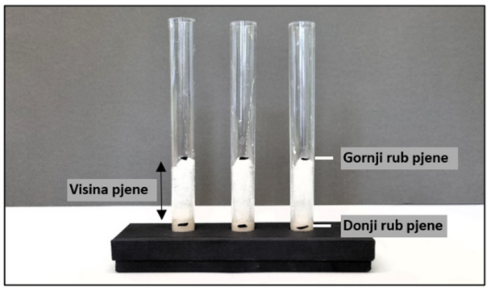
ANOVA testom utvrđena je statistički visoko značajna razlika u antioksidativnoj aktivnosti između ispitivanih skupina (F = 5154,888; p < 0,001), nakon čega je provedena Tukey HSD post-hoc analiza parova.

Post-hoc analizom utvrđeno je da između bijelog čaja u koncentracijama 1 % i 5 % nije postojala statistički značajna razlika u antioksidativnoj aktivnosti. Za razliku od toga, kod matičnjaka i kamilice utvrđene su statistički značajne razlike između koncentracija, pri čemu su ekstrakti u koncentraciji 5 % pokazali veću antioksidativnu aktivnost u odnosu na ekstrakte u koncentraciji 1 %.

Usporedbom ispitivanih ekstrakata biljnih vrsta utvrđeno je da su ekstrakti bijelog čaja imali statistički značajno veću antioksidativnu aktivnost u odnosu na kamilicu u obje ispitivane koncentracije te u odnosu na matičnjak u koncentraciji 1 %, dok između bijelog čaja (1 % i 5 %) i matičnjaka u koncentraciji 5 % nije utvrđena statistički značajna razlika. Matičnjak u koncentraciji 5 % pokazao je statistički značajno veću antioksidativnu aktivnost u odnosu na kamilicu u obje koncentracije, dok između matičnjaka u koncentraciji 1 % i kamilice u koncentraciji 5 % nije utvrđena statistički značajna razlika. Detaljni rezultati post-hoc analize prikazani su u prilogu 2.

Enzimski test katalazne aktivnosti u biljnim ekstraktima

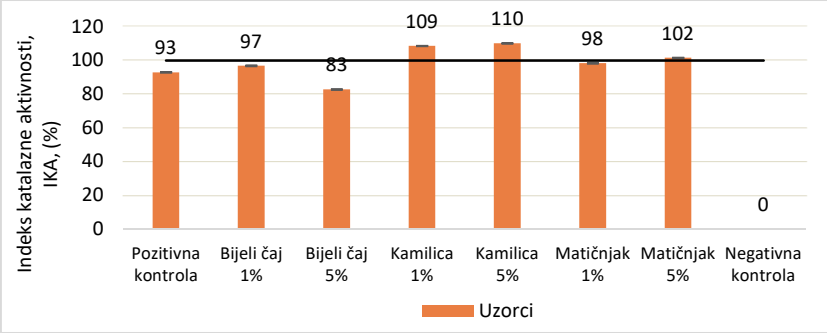
U enzimskom testu katalazne aktivnosti, nakon dodavanja otopine H_2O_2 u uzorke biljnog ekstrakta i kvasca došlo je do stvaranja pjene (slika 6). Pjena se formirala u svim uzorcima koji su sadržavali kvasac, dok se u uzorku bez kvasca (negativna kontrola) nije pojavila. Izmjerene srednje vrijednosti visine pjene korištene su za usporedbu katalazne aktivnosti između ispitivanih uzoraka (biljni ekstrakti + kvasac) i referentne kontrole (destilirana voda + kvasac).



Slika 6 Reprezentativan prikaz pjene nastale razgradnjom H2O2 u stanicama kvasca inkubiranima s ekstraktom kamilice koncentracije 1 %. Prikazana su tri ponavljanja s istim ekstraktom

Autor: Ladović A., 2026

Na slici 7 prikazane su relativne vrijednosti indeksa katalazne aktivnosti (IKA).



Slika 7 Indeks katalazne aktivnosti (IKA) u biljnim ekstraktima nakon inkubacije s kvascem

Najviše vrijednosti IKA zabilježene su kod kamilice 5 % (110 %) i kamilice 1 % (109 %). Matičnjak 5 % imao je nešto višu vrijednost (102 %) u odnosu na matičnjak 1 % (98 %). Bijeli čaj 1 % postigao je 97 %, dok je bijeli čaj 5 % imao najnižu relativnu vrijednost (83 %). Askorbinska kiselina 1 % postigla je 93 %. Izvorni podatci o prosječnoj visini pjene prikazani su u prilogu 1.

ANOVA testom nije utvrđena statistički značajna razlika u indeksu katalazne aktivnosti između ispitivanih uzoraka (F = 0,9735; p = 0,464).

Fiziološki test djelovanja biljnih ekstrakata na klijavost i duljinu korjenčića rotkvice

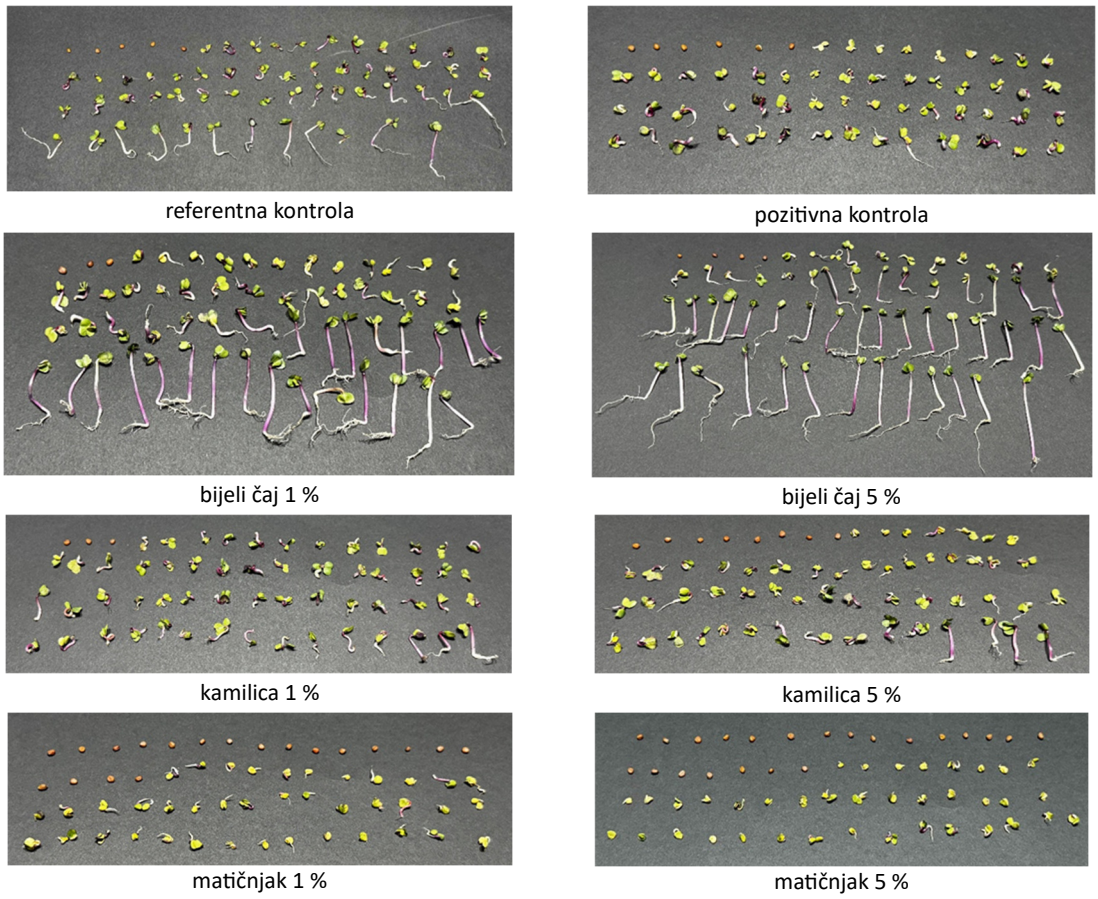
Rezultati klijavosti sjemenki rotkvice prikazani su u tablici 1 te pokazuju visoku klijavost u većini tretmana, uz primjetno smanjenje kod predtretmana ekstraktima matičnjaka.

Tablica 1 Utjecaj predtretmana biljnim ekstraktima na klijavost sjemenki rotkvice

Predtretman sjemenki s uzorcima	Postotak klijavosti (%)	Predtretman sjemenki s uzorcima	Postotak klijavosti (%)
bijeli čaj 1 %	95	pozitivna kontrola	87
kamilica 1 %	95	kamilica 5 %	87
bijeli čaj 5 %	93	matičnjak 1 %	70
referentna kontrola	92	matičnjak 5 %	65

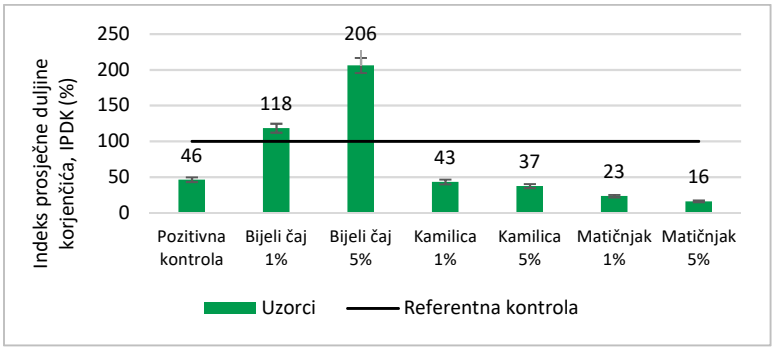
Hi-kvadrat test pokazao je statistički značajnu razliku u klijavosti između tretmana (p = 1,79 × 10^{-9}). Iz postotaka klijavosti vidljivo je da najveće odstupanje imaju uzorci tretirani ekstraktom matičnjaka, koji su pokazali najniži postotak klijanja u odnosu na ostale tretmane.

Razlike u duljini korjenčića i općem izgledu klijanaca rotkvice nakon predtretmana biljnim ekstraktima prikazane su na slici 8. Osim razlika u duljini korjenčića, mogu se uočiti i razlike u općem izgledu klijanaca. Budući da dodatna morfološka obilježja klijanaca nisu bila predmet ovog istraživanja, ona nisu dodatno opisivana ni statistički analizirana.



Slika 8 Klijanci rotkvice nakon predtretmana biljnim ekstraktima. Prikazani su uzorci referentne kontrole, pozitivne kontrole te tretmana bijelim čajem, kamilice i matičnjaka u koncentracijama 1 % i 5 %
Autor: Ladović A., 2026

Rezultati indeksa prosječne duljine korjenčića (IPDK) klijanaca rotkvice prikazani su na slici 9.



Slika 9 Indeks prosječne duljine korjenčića (IPDK) klijanaca rotkvice nakon predtretmana biljnim ekstraktima i kontrolama

Vrijednost IPDK veća od 100 % zabilježena je kod sjemenki predtretiranih ekstraktima bijelog čaja. Pri koncentraciji od 1 % iznosila je 118 %, dok je pri 5 % porasla na 206 %. Niže vrijednosti od referentne kontrole zabilježene su kod sjemenki tretiranih ekstraktima kamilice i matičnjaka. Kod predtretmana ekstraktom kamilice IPDK je iznosio 43 % pri koncentraciji od 1 % te 37 % pri 5 %. Kod matičnjaka su izmjerene još niže vrijednosti: 23 % pri 1 % i 16 % pri 5 %. Izvorni podatci o prosječnoj duljini korjenčića prikazani su u prilogu 1.

ANOVA test pokazao je statistički visoko značajnu razliku u prosječnoj duljini korjenčića između ispitivanih skupina (F = 480,304; p < 0,001). Post-hoc analiza pokazala je da povećanje koncentracije ima statistički značajan učinak samo kod bijelog čaja, dok kod kamilice i matičnjaka razlike između koncentracija 1 % i 5 % nisu bile statistički značajne.

Usporedbom biljnih ekstrakata utvrđeno je da bijeli čaj u obje koncentracije ima statistički značajno veći učinak na duljinu korjenčića u odnosu na kamilicu i matičnjak, dok između kamilice i matičnjaka nisu utvrđene statistički značajne razlike. Svi biljni ekstrakti statistički značajno su se razlikovali od referentne kontrole, pri čemu je najveći učinak u odnosu na referentnu kontrolu zabilježen kod bijelog čaja pri koncentraciji 5 %. Pozitivna kontrola također se statistički značajno razlikovala od referentne kontrole. Detaljni rezultati post-hoc analize prikazani su u prilogu 2.

RASPRAVA

Analiza kemijskog testa s otopinom kalijeva permanganata pokazala je da se kod ekstrakata kamilice i matičnjaka antioksidativna aktivnost povećava s porastom koncentracije biljnog ekstrakta. Ovakav rezultat je očekivan jer veća količina biljnog materijala sadrži više spojeva koji mogu reducirati permanganatne ione. Kod ekstrakta bijelog čaja nije bilo statistički značajne razlike u antioksidativnoj aktivnosti između niže i više koncentracije. To pokazuje da bijeli čaj ima vrlo visoku redukcijsku sposobnost već pri niskim koncentracijama u uvjetima ovog testa. Ovi rezultati djelomično potvrđuju prvu hipotezu jer je doza-ovisni učinak uočen kod kamilice i matičnjaka, ali ne i kod bijelog čaja.

Kemijski test temeljio se na promjeni boje otopine $KMnO_4$ nakon dodavanja biljnih ekstrakata i askorbinske kiseline. Prema Moon i sur. (2015), u prisutnosti blago kiselih biljnih ekstrakata dolazi do djelomične redukcije MnO_4^- u manganov dioksid (MnO_2), koji daje smeđu boju otopini. Hanchi i sur. (2022) navode da jako kisele otopine dovode do potpune redukcije MnO_4^- u manganove(II) ione (Mn^{2+}) i obezbojenja otopine. Takve promjene u skladu su s rezultatima ovoga istraživanja, a razlike u boji ne upućuju nužno na slabiju antioksidativnu aktivnost biljnih ekstrakata, nego na neujednačene pH uvjete (pH otopine askorbinske kiseline bio je 2, a biljnih ekstrakata 5), koje bi u budućim istraživanjima trebalo ujednačiti.

U enzimskom testu katalazne aktivnosti pjena se pojavila u svim uzorcima koji su sadržavali kvasac, dok u negativnoj kontroli (biljni ekstrakt i H_2O_2 bez dodatka kvasca) nije nastala pjena. Ovim je potvrđeno da je razgradnja H_2O_2 posljedica djelovanja enzima katalaze prisutnog u stanicama kvasca. Između koncentracija biljnih ekstrakata od 1 % i 5 % nisu utvrđene statistički značajne promjene u indeksu katalazne aktivnosti. Druga hipoteza nije potvrđena jer nema statistički značajne razlike u aktivnosti katalaze između otopina biljnih ekstrakata niže i više koncentracije kao u odnosu na referentnu kontrolu.

Unatoč izostanku statistički značajnih razlika u enzimskom testu, na grafu (slika 8) se mogu uočiti najveća i najmanja izmjerena odstupanja aktivnosti katalaze u odnosu na ostale biljne ekstrakte i referentnu kontrolu. U otopini bijelog čaja (5 %) zabilježena je najniža izmjerena aktivnost katalaze, dok je kod kamilice u obje koncentracije (1 % i 5 %) zabilježena najviša izmjerena aktivnost katalaze. Budući da razlika nije bila statistički značajna, ove se promjene ne mogu smatrati dokazom, već mogu biti poticaj za daljnja istraživanja. Uočena odstupanja kod bijelog čaja i kamilice mogu se povezati s rezultatima ranijih istraživanja. Pal i sur. (2014) navode da se katehini iz bijelog čaja mogu vezati na katalazu i tako smanjiti njenu aktivnost. S druge strane, Bhaskaran i sur. (2012) pokazali su da ekstrakti kamilice mogu potaknuti aktivaciju antioksidativnih enzima, uključujući katalazu, ali u stanicama makrofaga.

Za razliku od kemijskog i enzimskog testa, fiziološki test omogućio je praćenje učinka biljnih ekstrakata na živi organizam tijekom klijanja. Učinak ekstrakata ispitan je praćenjem klijavosti sjemenki rotkvice i mjerenjem duljine korjenčića. Hi-kvadrat test pokazao je statistički značajnu razliku u klijavosti između tretmana. Iz dobivenih postotaka klijavosti vidljivo je da su tretmani ekstraktom matičnjaka pokazali najnižu klijavost, dok razlike između koncentracija 1 % i 5 % kod svih uzoraka nisu bile velike. Duljina korjenčića pokazala se osjetljivijim pokazateljem djelovanja biljnih ekstrakata. Očekivalo se inhibicijsko djelovanje ekstrakta bijelog čaja na rast korjenčića zbog snažne antioksidativne aktivnosti i mogućeg smanjenja razine ROS-a. Međutim, suprotno očekivanju, ekstrakt bijelog čaja, osobito u koncentraciji od 5 %, potaknuo je rast korjenčića i pokazao statistički značajno jače djelovanje u odnosu na nižu koncentraciju i referentnu kontrolu. Kod kamilice i matičnjaka ekstrakti obje koncentracije imali su inhibicijski učinak na duljinu korjenčića, bez statistički značajne razlike između 1 % i 5 %. S obzirom na dobivene rezultate, treća hipoteza nije potvrđena.

Usporedbom djelovanja biljnih ekstrakata različitih biljnih vrsta pokazalo se da se njihovi učinci razlikuju. U kemijskom testu dobiven je očekivani redoslijed antioksidativne aktivnosti (bijeli čaj > matičnjak > kamilica), čime je kemijski dio četvrte hipoteze potvrđen. Slične rezultate navode i Shannon i suradnici (2017), koji su utvrdili niži sadržaj fenolnih spojeva i slabiji antioksidativni potencijal kamilice u odnosu na bijeli čaj. Matičnjak nije bio obuhvaćen navedenim istraživanjem.

U enzimskom testu katalazne aktivnosti nisu utvrđene statistički značajne razlike među biljnim ekstraktima, pa se u tom dijelu četvrta hipoteza ne može potvrditi.

Rezultati fiziološkog testa razlikovali su se od očekivanog redoslijeda. Najveći inhibicijski učinak zabilježen je kod matičnjaka, a zatim kod kamilice, dok bijeli čaj nije pokazao inhibicijski, već stimulativni učinak na rast korjenčića. Prema Kato-Noguchiju (2001), ekstrakti matičnjaka mogu snažno inhibirati rast biljaka, osobito korijena, što je u skladu s rezultatima ovog istraživanja. Iako autori navode prisutnost alelopatskih tvari kao uzrok inhibicije, mehanizam njihova djelovanja nije razjašnjen. Dobiveni inhibicijski učinak kamilice potvrđuju i Al-Hawas i sur. (2025), koji navode da kamilica sadrži alelopatske tvari s inhibicijskim učinkom, pri čemu su otišli korak dalje i pokazali da je on povezan s potaknutim oksidativnim stresom i porastom ROS-a. Moguće je da slični mehanizmi sudjeluju i u inhibicijskom učinku matičnjaka, no to ovim istraživanjem nije moguće potvrditi. Suprotno tome, Bais i sur. (2010) ističu da učinak katehina ovisi o koncentraciji, što može objasniti stimulativni, a ne toksični učinak ekstrakta bijelog čaja pri koncentracijama od 1 % i 5 %, no točan mehanizam takvih odgovora

ostaje nepoznat. Budući da je očekivani redoslijed potvrđen samo kemijskim testom, četvrta hipoteza smatra se djelomično potvrđenom.

Otopina askorbinske kiseline u ovom je istraživanju korištena kao pozitivna kontrola. Radi se o „čistom“ i dobro poznatom snažnom antioksidansu, te je njime potvrđena osjetljivost kemijskog testa. U enzimskom testu nije zabilježen utjecaj askorbinske kiseline na aktivnost katalaze. U fiziološkom testu zabilježeni su statistički značajno kraći korjenčići u odnosu na referentnu kontrolu, no ne može se sa sigurnošću utvrditi je li taj učinak posljedica izrazito niske pH vrijednosti otopine ili smanjene razine ROS-a. Zbog toga bi, kako je već ranije navedeno, u budućim istraživanjima trebalo ujednačiti pH vrijednost otopine kontrole kako bi se omogućilo detaljnije objašnjenje rezultata.

Rezultati sva tri testa pokazuju da najsnažnija antioksidativna aktivnost biljnih ekstrakata ne mora nužno dovesti do najveće promjene aktivnosti katalaze niti do najintenzivnije inhibicije klijanja i rasta korjenčića, koji su povezani s djelovanjem ROS-a. To pokazuje kako se kemijskim testovima ne mogu u potpunosti predvidjeti biološki učinci u živim organizmima. Budući da su biljni ekstrakti složene smjese različitih bioaktivnih spojeva koji mogu djelovati putem različitih metaboličkih mehanizama, njihovo ukupno biološko djelovanje nije moguće pouzdano predvidjeti isključivo na temelju kemijskih testova. Kako bi se ti učinci u potpunosti objasnili na molekularnoj razini, bilo bi potrebno koristiti naprednije metode koje nisu dostupne u školskom laboratoriju.

Ograničenja ovoga istraživanja su ispitivanje samo dviju koncentracija biljnih ekstrakata i neujednačena pH vrijednost uzoraka. Zbog toga bi u budućim istraživanjima bilo korisno ispitati širi raspon koncentracija otopina biljnih ekstrakata te uključiti dodatna obilježja rasta i razvoja, poput vremena potrebnog za klijanje, mase klijanaca ili promjena u razvoju nadzemnih dijelova biljke. Također, bilo bi korisno ispitati kako zagrijavanje, kakvo se koristi pri pripremi čajeva, utječe na ekstrakciju bioaktivnih spojeva i usporediti ih s rezultatima testova ovoga rada, kao i provesti izolaciju pojedinačnih spojeva s antioksidativnim svojstvima radi preciznijeg povezivanja kemijskog sastava s biološkim učinkom.

ZAKLJUČCI

Na temelju provedenog istraživanja može se zaključiti sljedeće:

- U kemijskom testu potvrđen je doza-ovisni porast antioksidativne aktivnosti kod ekstrakata kamilice i matičnjaka, dok između koncentracija od 1 % i 5 % ekstrakta bijelog čaja nije utvrđena statistički značajna razlika, čime je prva hipoteza djelomično potvrđena;
- U enzimskom testu nije utvrđena statistički značajna razlika u aktivnosti katalaze između koncentracija od 1 % i 5 % biljnih ekstrakata niti u odnosu na referentnu kontrolu, zbog čega druga hipoteza nije potvrđena;
- U fiziološkom testu utvrđena je statistički značajna razlika u klijavosti između tretmana, pri čemu je najniži postotak klijavosti zabilježen kod ekstrakta matičnjaka, a razlike između koncentracija 1 % i 5 % unutar istog ekstrakta nisu bile izražene. Statistički značajna razlika u duljini korjenčića zabilježena je samo kod bijelog čaja, pri čemu je koncentracija od 5 %, suprotno očekivanom, imala stimulativni učinak, zbog čega treća hipoteza nije potvrđena;
- U kemijskom testu utvrđen je očekivani redoslijed antioksidativne aktivnosti (bijeli čaj > matičnjak > kamilica), dok u enzimskom i fiziološkom testu nije utvrđen isti redoslijed učinaka kao u kemijskom testu, zbog čega je četvrta hipoteza djelomično potvrđena.

LITERATURA

Adhikari B., Olorunwa O. J., Barickman T. C. 2022. Seed priming enhances seed germination and morphological traits of *Lactuca sativa* L. under salt stress. Seeds 1: 74–86.

Al-Hawas G. H. S. 2025. Allelopathy effects of *Matricaria chamomilla* L. on germination, early growth and nutrient uptake of pea seedlings. Brazilian Journal of Biology 85: e292131.

Amponsah I. K., Orman E., Mensah A. Y., Sarpong F. M., Armah F. A., Sarpong L. M. 2016. Development and validation of a radical scavenging antioxidant assay using potassium permanganate. Journal of Scientific and Innovative Research 5(2): 36–42.

Bais H. P., Venkatachalam L., Biedrzycki M. L. 2010. Stimulation or inhibition: Conflicting evidence for (±)-catechin's role as a chemical facilitator and disease-protecting agent. Plant Signaling & Behavior 5(3): 239–246.

Bhaskaran N., Srivastava J. K., Shukla S., Gupta S. 2012. Chamomile confers protection against hydrogen peroxide-induced toxicity through activation of Nrf2-mediated defense response. Phytotherapy Research 26(12): 1837–1844.

Echegaray N., Pateiro M., Munekata P. E. S., Lorenzo J. M., Chabani Z., Farag M. A., Domínguez R. 2021. Measurement of antioxidant capacity of meat and meat products: Methods and applications. Molecules 26: 3880.

Ghazizadeh J., Hamedeyazdan S., Torbati M., Farajdokht F., Fakhari A., Mahmoudi J., Araj-Khodaei M., Sadigh-Eteghad S. 2020. *Melissa officinalis* L. hydro-alcoholic extract inhibits anxiety and depression through prevention of central oxidative stress and apoptosis. Metabolic Brain Disease 35: 291–302.

Hanchi H., Sebei K., Mottawea W., Al Kasaa I., Hammami R. 2022. An agar-based bioassay for accurate screening of the total antioxidant capacity of lactic acid bacteria cell-free supernatants. Journal of Microbiological Methods 195: 106437.

Hays G. F. 2016. Now is the Time. World Corrosion Organization, https://corrosion.org/Corrosion+Resources/Publications.html, pristupljeno 25.12.2025.

Iwase T., Tajima A., Sugimoto S., Okuda K., Hironaka I., Kamata Y., Takada K., Mizunoe Y. 2013. A simple assay for measuring catalase activity: A visual approach. Scientific Reports 3: 3081.

Kato-Noguchi H. 2001. Effects of lemon balm (*Melissa officinalis* L.) extract on germination and seedling growth of six plants. Acta Physiologiae Plantarum 23: 49–53.

McKay D.L., Blumberg J. B. 2006. A review of the bioactivity and potential health benefits of chamomile tea. Phytotherapy Research 20: 519–530.

Moon S. A., Salunke B. K., Alkotaini B., Sathiyamoorthi E., Kim B. S. 2015. Biological synthesis of manganese dioxide nanoparticles by *Kalopanax pictus* plant extract. IET Nanobiotechnology 9(3): 129–134.

Oracz K., El-Maarouf-Bouteau H., Kranner I., Bogatek R., Corbineau F., Bailly C. 2007. ROS production and protein oxidation as a novel mechanism for seed dormancy alleviation. The Plant Journal 50: 452–465.

Pal S., Dey S. K., Saha C. 2014. Inhibition of catalase activity by tea catechins. Journal of Biological Chemistry 289(36): 24957–24969.

Shannon E., Jaiswal A. K., Abu-Ghannam N. 2017. Polyphenolic content and antioxidant capacity of white, green, black, and herbal teas: A kinetic study. Food Research International 97: 16–28.

Somavanshi D. B., Kamble P. R., Patil C. D., Jadhav S. P., Sonawane G. B. 2021. A review on the antioxidant and antiaging properties of white tea. Journal of Pharmaceutical Research International 33: 129–136.

Sotler R., Poljšak B., Dahmane R., Jukić T., Pavan Jukić D., Spahić S., Rotim C. 2019. Prooxidant activities of antioxidants and their impact on health. Acta Clinica Croatica 58(4): 726–736.

Zagoskina N. V., Zubova M. Y., Nechaeva T. L., Kazantseva V. V., Goncharuk E. A., Katanskaya V. M., Baranova E. N., Aksenova M. A. 2023. Polyphenols in plants: Structure, biosynthesis, abiotic stress regulation, and practical applications. Plants 12(18): 3227.

PRILOZI

Prilog 1 Prosječan broj kapi (lijevo), prosječna visina pjene (sredina) i prosječna duljina korjenčića (desno) s izračunatim standardnim devijacijama

Uzorci	Prosječan broj kapi ± SD	Uzorci	Prosječna visina pjene (cm) ± SD	Uzorci	Prosječna duljina korjenčića (cm) ± SD
Pozitivna kontrola	1,17 ± 0,41	Referentna kontrola	4,27 ± 0,15	Referentna kontrola	8,17 ± 9,62
Bijeli čaj 1 %	2,50 ± 0,55	Pozitivna kontrola	3,97 ± 0,15	Pozitivna kontrola	3,78 ± 3,27
Bijeli čaj 5 %	1,17 ± 0,41	Bijeli čaj 1 %	4,13 ± 0,21	Bijeli čaj 1 %	9,67 ± 6,26
Kamilica 1 %	17,00 ± 1,55	Bijeli čaj 5 %	3,53 ± 0,12	Bijeli čaj 5 %	16,83 ± 10,56
Kamilica 5 %	7,00 ± 1,26	Kamilica 1 %	4,63 ± 0,06	Kamilica 1 %	3,52 ± 3,40
Matičnjak 1 %	6,33 ± 0,52	Kamilica 5 %	4,70 ± 0,10	Kamilica 5 %	3,05 ± 2,75
Matičnjak 5 %	2,17 ± 0,41	Matičnjak 1 %	4,20 ± 0,26	Matičnjak 1 %	1,90 ± 1,68
Negativna kontrola	20,00 ± 0,00	Matičnjak 5 %	4,33 ± 0,06	Matičnjak 5 %	1,30 ± 1,17

Prilog 2 Statistički značajne razlike u antioksidativnoj aktivnosti u KMnO4 testu (lijevo) i prosječnoj duljini korjenčića rotkvice nakon predtretmana biljnim ekstraktima i kontrolama (desno) (post hoc Tukey HSD)

Uspoređivani uzorci	p-vrijednost	Statistička značajnost	Uspoređivani uzorci	p-vrijednost	Statistička značajnost
Bijeli čaj 1 % – Bijeli čaj 5 %	p = 0,09916	n.s.	Bijeli čaj 1 % – Bijeli čaj 5 %	$p = 2{,}204 \times 10^{-6}$	***
Matičnjak 1 % – Matičnjak 5 %	$p = 8{,}32 \times 10^{-7}$	***	Matičnjak 1 % – Matičnjak 5 %	p = 0,9993	n.s.
Kamilica 1 % – Kamilica 5 %	$p = 1{,}06 \times 10^{-8}$	***	Kamilica 1 % – Kamilica 5 %	p = 0,9999	n.s.
Bijeli čaj 1 % – Kamilica 1 %	$p = 1{,}06 \times 10^{-8}$	***	Bijeli čaj 1 % – Kamilica 1 %	$p = 5{,}204 \times 10^{-4}$	***
Bijeli čaj 1 % – Kamilica 5 %	$p = 1{,}07 \times 10^{-7}$	***	Bijeli čaj 1 % – Kamilica 5 %	$p = 4{,}46 \times 10^{-8}$	***
Bijeli čaj 5 % – Kamilica 1 %	$p = 1{,}06 \times 10^{-8}$	***	Bijeli čaj 5 % – Kamilica 1 %	$p = 1{,}753 \times 10^{-7}$	***
Bijeli čaj 5 % – Kamilica 5 %	$p = 1{,}06 \times 10^{-11}$	***	Bijeli čaj 5 % – Kamilica 5 %	$p = 1{,}753 \times 10^{-7}$	***
Bijeli čaj 1 % – Matičnjak 1 %	$p = 7{,}45 \times 10^{-6}$	***	Bijeli čaj 1 % – Matičnjak 1 %	$p = 2{,}314 \times 10^{-7}$	***
Bijeli čaj 5 % – Matičnjak 1 %	$p = 1{,}22 \times 10^{-8}$	***	Bijeli čaj 5 % – Matičnjak 1 %	$p = 1{,}753 \times 10^{-7}$	***
Bijeli čaj 1 % – Matičnjak 5 %	p = 0,9957	n.s.	Bijeli čaj 1 % – Matičnjak 5 %	$p = 1{,}766 \times 10^{-7}$	***
Bijeli čaj 5 % – Matičnjak 5 %	p = 0,3869	n.s.	Bijeli čaj 5 % – Matičnjak 5 %	$p = 1{,}753 \times 10^{-7}$	***
Matičnjak 5 % – Kamilica 1 %	$p = 1{,}06 \times 10^{-8}$	***	Matičnjak 5 % – Kamilica 1 %	p = 0,9627	n.s.
Matičnjak 1 % – Kamilica 1 %	$p = 1{,}06 \times 10^{-8}$	***	Matičnjak 1 % – Kamilica 1 %	p = 0,8051	n.s.
Matičnjak 5 % – Kamilica 5 %	$p = 2{,}27 \times 10^{-8}$	***	Matičnjak 5 % – Kamilica 5 %	p = 0,733	n.s.
Matičnjak 1 % – Kamilica 5 %	p = 0,8278	n.s.	Matičnjak 1 % – Kamilica 5 %	p = 0,441	n.s.
Pozitivna kontrola – Bijeli čaj 1 %	p = 0,09916	n.s.	Pozitivna kontrola – Bijeli čaj 1 %	$p = 1{,}983 \times 10^{-6}$	***
Pozitivna kontrola – Bijeli čaj 5 %	p = 1,0000	n.s.	Pozitivna kontrola – Bijeli čaj 5 %	$p = 1{,}753 \times 10^{-7}$	***
Pozitivna kontrola – Kamilica 1 %	$p = 1{,}06 \times 10^{-8}$	***	Pozitivna kontrola – Kamilica 1 %	p = 1,0000	n.s.
Pozitivna kontrola – Kamilica 5 %	$p = 1{,}06 \times 10^{-11}$	***	Pozitivna kontrola – Kamilica 5 %	p = 0,9974	n.s.
Pozitivna kontrola – Matičnjak 1 %	$p = 1{,}22 \times 10^{-8}$	***	Pozitivna kontrola – Matičnjak 1 %	p = 0,6527	n.s.
Pozitivna kontrola – Matičnjak 5 %	p = 0,3869	n.s.	Pozitivna kontrola – Matičnjak 5 %	p = 0,2899	n.s.
Pozitivna kont. – Negativna kont.	$p = 1{,}06 \times 10^{-8}$	***	Pozitivna kont. – Referentna kont.	$p = 1{,}368 \times 10^{-3}$	**
Negativna kontrola – Bijeli čaj 1 %	$p = 1{,}06 \times 10^{-8}$	***	Referentna kontrola – Bijeli čaj 1 %	p = 0,8591	n.s.
Negativna kontrola – Bijeli čaj 5 %	$p = 1{,}06 \times 10^{-8}$	***	Referentna kontrola – Bijeli čaj 5 %	$p = 1{,}755 \times 10^{-7}$	***
Negativna kontrola – Kamilica 1 %	$p = 1{,}06 \times 10^{-8}$	***	Referentna kontrola – Kamilica 1 %	$p = 4{,}877 \times 10^{-4}$	***
Negativna kontrola – Kamilica 5 %	$p = 2{,}265 \times 10^{-6}$	***	Referentna kontrola – Kamilica 5 %	$p = 6{,}97 \times 10^{-5}$	***
Negativna kontrola – Matičnjak 1 %	$p = 8{,}32 \times 10^{-7}$	***	Referentna kontrola – Matičnjak 1 %	$p = 2{,}854 \times 10^{-4}$	***
Negativna kontrola – Matičnjak 5 %	$p = 1{,}06 \times 10^{-8}$	***	Referentna kontrola – Matičnjak 5 %	$p = 1{,}137 \times 10^{-5}$	***

*** p < 0,001 – statistički visoko značajna razlika ; ** p < 0,01 – statistički značajna razlika;
* p < 0,05 – statistički značajna razlika; n.s. – nije statistički značajno