

Isolering og strukturoppklaring av antimikrobielle forbindelser fra gråorbark

Ikram Massoudy



Masteroppgave i farmasi

45 Studiepoeng

Seksjon for Farmasøytisk Kjemi

Seksjon for farmakologi og farmasøytisk biovitenskap

Farmasøytisk Institutt

Det matematisk-naturvitenskapelige fakultet

UNIVERSITETET I OSLO

Mai 2023

Isolering og strukturoppklaring av antimikrobielle forbindelser fra gråorbark

Ikram Massoudy

Masteroppgave ble utført ved
Seksjon for Farmasøytisk kjemi og
Seksjon for farmakologi og farmasøytisk biovitenskap
Farmasøytisk Institutt.
Det matematisk-naturvitenskapelige fakultet

Universitet i Oslo

Mai 2023

Veiledere:

Professor Helle Wangenstein

Professor Hanne Cecilie Winther-Larsen

Isolering og strukturoppklaring av antimikrobielle forbindelser fra gråorbark

Ikram Massoudy
2023

© Ikram Massoudy

2023

Isolering og strukturoppklaring av antimikrobielle forbindelser fra gråorbark

Ikram Massoudy

<https://www.duo.uio.no>

Trykk: Reprosentralen, Universitetet i Oslo

Sammenheng

Antimikrobiell resistens har blitt et alvorlig globalt helseproblem som kan føre til sykdom og død. Derfor er det viktig å utvikle nye antimikrobielle midler for å begrense den økende resistensen.

Gråor (*Alnus incana*) tilhører bjørkefamilien, og barken har blitt brukt mot ulike sykdommer. I Norge har gråorbark blitt mest brukt til sårbehandling, mens andre deler av verden (Europa og Nord-Amerika) er barken brukt til behandling av sår, brannskader, hudsykdommer, ryggmerter, gastrointestinale plager, og til behandling av infeksjoner i munnen og svelget.

Noen få vitenskapelige studier har vist at ekstraktet fra gråorbarken har antimikrobielle effekter. Men disse studiene har ikke gått videre med å isolere og identifisere de virksomme stoffene. Derfor ble dette gjort i dette prosjektet. Hovedmålet med denne studien var å finne naturlige stoffer fra gråorbarken som har antimikrobielle effekter.

Gråorbarken ble ekstrahert med 60 % etanol, ved hjelp av et ASE-instrument. Deretter ble råekstraktet fraksjonert ved bruk av Diaion HP-20 kolonnekromatografi og dette ga fire fraksjoner (AI-E-D1-D4). Råekstraktet og Diaion-fraksjonene ble testet mot bakteriestammene *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis*, *Pseudomonas aeruginosa* og soppen *Candida albicans* med DISC assay.

Fraksjonen AI-E-D2 ble valgt ut for videre fraksjonering på en Sephadex LH-20 kolonne, dette ga 14 fraksjoner (AI-E-D2-S1-S14). Alle de 14 fraksjonene ble testet med minimum inhibitorisk konsentrasjon (MIC)-metoden mot to mikroorganismer, den gram-positive bakterien *S. aureus* og den gram-negative bakterien *E. coli*. Basert på resultatene fra MIC, samt NMR-resultater ble fraksjonene AI-E-D2-S2S3, AI-E-D2-S4 og AI-E-D2-S6 rensert med flash kromatografi for å oppnå rene forbindelser. Stoffene ble identifisert ved 1D og 2D (HSQC, COSY og HMBC) NMR. Fire av de isolerte stoffene ble testet for antimikrobiell effekt mot *S. aureus* med MIC-metoden.

Råekstraktet og diaionfraksjonene AI-E-D1-D3 viste antimikrobiell aktivitet mot bakteriestammen *S. aureus* (1 mg/disk), og fraksjonen AI-E-D2 viste den høyeste aktiviteten med en gjennomsnittlig inhiberingssone på $13,02 \pm 0,32$ mm. Ingen effekt ble vist mot *E. coli*, *B. subtilis*, *P. aeruginosa* eller *C. albicans*.

MIC test av Sephadex fraksjonene viste antimikrobiell aktivitet mot *S. aureus* av fraksjonen AI-E-D2-S2S3 med en MIC-verdi på 200 µg/ml. Det var ingen antimikrobiell aktivitet mot bakteriestammen *E. coli*. Fra fraksjonene AI-E-D2-S2S3, AI-E-D2-S4 og AI-E-D2-S6 ble det isolert fem renstoffer etter flash kromatografi. De isolerte stoffene var diarylheptanoidene oregonin, hirsutanolol-5-O-β glucopyranosid, plathyphyllosid, coumaryloregonin og alnusid A eller B. Coumaryloregonin hadde ikke tidligere blitt identifisert i gråor.

Det ble bestemt MIC mot *S. aureus* for de isolerte stoffene. Oregonin og hirsutanolol-5-O-β glucopyranosid viste antimikrobiell aktivitet med en MIC på 200 µg/ml. Platyphylloside og coumaryloregonin viste ingen hemming av bakterievekst. Antibakteriell effekt ble for første gang påvist for hirsutanolol-5-O-β glucopyranosid.

Forord

Masteroppgaven i farmakognosi og mikrobiologi har gitt meg en unik mulighet til å fordype meg i problemstilling om isolering, strukturoppklaring og testing av antimikrobielle effekt av gråor.

Jeg er kjempeglad at jeg har fått sjanse til å jobbe med naturstoffer, arbeidet med denne masteroppgaven har gitt meg en bred forståelse av bruk av isolering av naturstoffer og ulike metoder for testing av antimikrobielle effekt, det har vært en svært lærerik prosess.

Jeg har fått mye hjelp i denne masteroppgaven, og den første vil jeg takke mine hovedveiledere professor Helle Wangensteen og Hanne Cecilie Winther-Larsen for gode veiledning, tilbakemelding og oppfølging gjennom både skriveprosessen og det praktiske arbeidet.

Videre vil jeg også rette en kjempestor takk til professor Karl Egil Malterud for gode råd og hjelp på laben.

Jeg vil også rette en enorm takk til mannen min Abdelielah, sønnen min Jacob, mine foreldre, søsken og venner som alltid støttet meg gjennom hele master studie.

Til slutt vil jeg takke masterstudenter, stipendiater og forskere ved Farmasi og ZEB bygget, Farmasøytisk institutt for godt samarbeid.

Oslo, mai 2023

Ikram Massoudy

Innholdsfortegnelse

Sammendrag	VI
Forord	IX
Innholdsfortegnelse	X
Forkortelser.....	1
1 Bakgrunn.....	2
1.1 <i>Alnus incana</i> , gråor.....	2
1.1.1 Taksonomisk klassifisering	2
1.1.2 Synonymer og lokale navn	3
1.1.3 Botanisk forhold.....	4
1.1.4 Habitat	5
1.1.5 Tradisjonell bruk	5
1.2 <i>Identifisert naturstoffer i gråor og biologisk effekt</i>	7
1.2.1 Naturstoffer i <i>A. incana</i>	7
1.3 <i>Biologisk effekt samt funn og skreening av antimikrobielle midler fra miljøet/planter</i>	9
1.4 <i>Problemer rundt antibiotika resistens og behovet for nye og bedre løsninger samt behovet for nye antimikrobielle midler</i>	13
1.5 <i>Isolering og identifikasjon av naturstoffer</i>	15
1.5.1 Ekstraksjon	15
1.5.2 Fraksjonering og identifisering.....	15
2 Hensikt	17
3 Materialer og metoder.....	18
3.1 <i>Materialer</i>	18
3.1.1 Kjemikalieliste.....	18
3.1.2 Liste over apparatur og utstyr.....	19
3.2 <i>Generelle metoder</i>	21
3.2.1 Vannkvalitet	21
3.2.2 Innveing.....	21
3.2.3 Inndamping på rotavapor.....	21
3.2.4 Frysetøking.....	21
3.2.5 Flash kolonnekromatografi.....	21
3.2.6 Analytisk TLC	22
3.2.7 Kjernemagnetisk resonansspektroskopi (NMR).....	22
3.3 <i>Plantematerialet</i>	23
3.4 <i>Ekstraksjon av gråor</i>	24
3.5 <i>Kromatografisk metoder for fraksjonering og isolering</i>	24
3.5.1 Diaion HP-20 kolonne separasjon	24
3.5.2 Sephadex-LH-20, fraksjonering av AI-E-D2.....	25
3.5.3 Flash kolonne kromatografi, fraksjonering av AI-E-D2-S4	26
3.5.4 Flash kolonne kromatografi, fraksjonering av AI-E-D2-S2S3	27
3.5.5 Flash kolonne kromatografi, fraksjonering AI-E-D2-S6	28
3.6 <i>Disc assay</i>	29

3.7	<i>MIC assay</i>	30
3.8	<i>Bakteriestammer</i>	30
3.9	<i>Disc diffusjons assay</i>	32
3.9.1	Testing av antimikrobiell aktivitet av Diaion-HP-20 fraksjoner til gråorbarken samt rækstraktet ved bruk av disc diffusjonsmetode.....	34
3.10	<i>MIC assay</i>	36
3.10.1	Testing av Sephadex-LH-20 fraksjoner til gråorbarken mot mikroorganismen <i>E. coli</i> med bruk av MIC assay.	41
3.10.2	Testing av Sephadex-LH-20, Flash fraksjoner til gråorbarken mot <i>S. aureus</i> mikroorganismen med bruk av MIC assay.	42
3.11	<i>Metoden utvikling av OD vs cfu/ml</i>	43
4	Resultater og diskusjon	44
4.1	<i>Ekstraksjon av gråor</i>	44
4.2	<i>Diaion HP-20 kolonne, separasjon av rækstraktet</i>	45
4.3	<i>Sephadex-LH-20, fraksjonering av AI-E-D2</i>	46
4.4	<i>Isolering av diarylheptanoider med flash kolonne kromatografi</i>	48
4.5	<i>Karakterisering naturstoffer fra gråor etanolekstraktet</i>	49
4.5.1	Naturstoff 1: AI-E-D2-S4-F1 Oregonin	50
4.5.2	Naturstoff 2: AI-E-D2-S2S3-F1 Hirsutanolol 5-O-B-glucopyranosid.....	54
4.5.3	Naturstoff 3: AI-E-D2-S2S3-F5 Platyphylloside.....	57
4.5.4	Naturstoff 4: AI-E-D2-S6-F2 Coumaroyloreogonin	60
4.5.5	Naturstoff 5: AI-E-D2-S6-F5 Alnuside A eller B.....	64
4.6	<i>Disc assay antimikrobielle effekter av rækstraket og Diaion-HP-20 fraksjoner</i>	68
4.7	<i>Mic assay</i>	72
4.7.1	Metodeutvikling ved å sjekk OD vs cfu/ml til <i>E. coli</i> bakterieinokulum	72
4.7.2	Metodeutvikling ved å sjekke OD vs cfu/ml til <i>S. aureus</i> bakterieinokulum	73
4.7.3	Test av DMSO konsentrasjoner.....	74
4.7.4	Minimum inhibitorisk konsentrasjon (MIC) av sephadex fraksjoner til gråorbarken mot mikroorganismen <i>E. coli</i>	75
4.7.5	Minimum inhibitorisk konsentrasjon (MIC) av sephadex fraksjoner til gråorbark mot mikroorganismen <i>S. aureus</i>	76
4.7.6	Minimum inhibitorisk konsentrasjon (MIC) av isolerte stoffer.....	76
5	Diskusjon av antimikrobielle effekt:	78
5.1	<i>Antimikrobielle effekt av gråorfraksjoner DISC assay</i>	78
5.2	<i>Antimikrobielle effekt av gråorfraksjoner MIC assay</i>	80
6	Konklusjon og videre arbeid	82
	Litteraturliste	84
	Vedlegg	88

Forkortelser

Forkortelser	Full form
ASE	accelerated solvent extraction
dH ₂ O	destillert vann
DMSO-d ₆	deuterert dimetylsulfoksid
MeOH	metanol
NMR	nuclear magnetic resonance
EtOH	etanol
CD ₃ OD	deuterert metanol
DE	diatomaceous earth (kiselgur)
FaI	Farmasøytisk institutt
Forkortelser i NMR-data	
s	singlett
d	dublett
t	triplett
m	multiplett
dd	dublett av dublett
ddd	dublett av dublett av dublett
dt	dublett av triplett
ppm	parts per million
J	koblingskonstant
Hz	hertz
δ	Delta (kjemisk skift)
Forkortelse av antimikrobielle effekt	
TSA	Tryptic soy agar
MH	Mueller Hinton agar -2
NaCl	Natriumklorid
SDA	Sabouraud dextrose agar
MHB	Mueller Hinton Broth 2
Forkortelse for fraksjoner	
AI	<i>Alnus incana</i> , (gråorbark)
D	Diaion TM
F	Flash TM
S	Sephadex TM

1 Bakgrunn

1.1 *Alnus incana*, gråor

1.1.1 Taksonomisk klassifisering

Gråor (figur 1) er det norske navnet for *Alnus incana* (1), arten tilhører oreslekta (*Alnus*) og bjørkefamilien (*Betulaceae*). Taksonomiske oversikt er vist i tabell 1.

Tabell 1: Taksonomisk klassifisering av *A. incana* (2).

Rike	Planteriket Plantae
Rekke	Dekkfrøete planter Magnoliophyta
Klasse	Tofrøbladete planter Eudicots
Orden	Bøkeordenen Fagales
Familie	Bjørkefamilien Betulaceae
Slekt	Oreslekta <i>Alnus</i>
Art	Gråor <i>Alnus incana</i> (L.) Moench



Figur 1: Gråor (*Alnus incana*) ved innhøstingsstedet i Vang Valdres. Foto: Helle Wangensteen

1.1.2 Synonymer og lokale navn

Synonymer til *A. incana* er *Betula incana* (L.) L.f., *Betula alnus* L. og *Betula alnus* var. *incana* L (3). Navn for arten på forskjellige språk er vist i tabell 2.

Tabell 2 :Lokale navn av *A. incana* med forskjellige språk (2).

Språk	Lokale navn
Samisk	Leaibi
Svensk	Gråor, alder, arre, vita
Dansk	Hvidel, Gråel
Engelsk	Grey alder, gray alder, mountain alder, European alder, speckled alder.
Tysk	Grau-Erle, Weiss-erle
Fransk	Aune blanchatre, aulune blanc, aulune blanchatre, aulune de montagne
Finsk	Harmaaleppa
Islandsk	Graelri, graolur.

1.1.3 Botanisk forhold

Gråor kan vokse som busker eller som trær som kan bli ti meter høye (4). Den blomstrer vanligvis i perioden fra februar til mars (5). Gråor kan beskrives med sin lysegrå, glatte bark, og mindre kvister med kort hår. Bladene er eggformede og har avrundete spisse blader. Gråor har egenartete blomsterbestander som sitter i en begrenset del av planten, både hunn og hannblomster sitter på samme plante. Hunnblomstene er korte og runde, raklene er vist i figur 2, mens hannblomstene har lange og hengende rakler som dannes allerede høsten før, vist i figur 3 (4). Nitrogenfikserende bakterier sitter i knoller på røttene til gråor (4) og hjelper til med å holde bladene grønne helt frem høstens bladfall (6).

I Norge er det to underarter som forekommer av gråor: skoggråor eller vanlig gråor (*A. incana ssp. incana*), som kan danne trær, og kolagråor (*A. incana ssp. Kolaënsi*) som danner busker eller mindre trær (4).



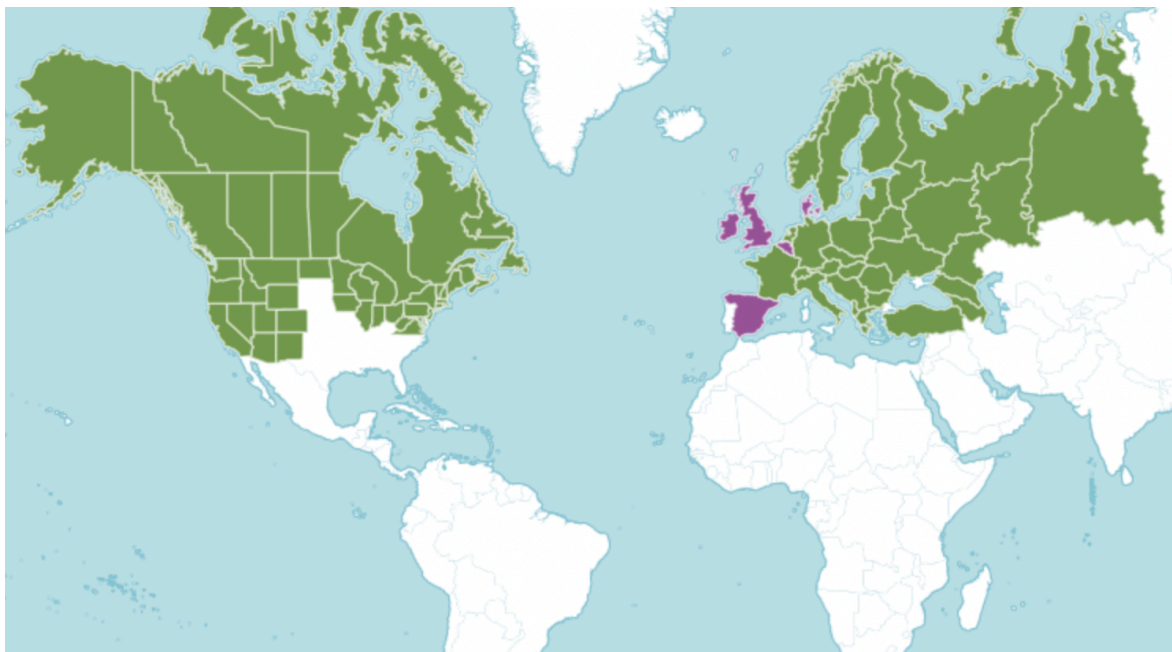
Figur 3: Gråor hannrakler. Bilde hentet fra snl (CC BY SA 3.0)
Fotograf: John Magne Grindeland (4).



Figur 2: Hunnblomsterstandene. Bilde hentet fra snl (CCBY
NC SA 3.0 lisens). Fotograf: Marte Holten Jørgensen (4).

1.1.4 Habitat

Gråor er utbredt i Europa, Kaukasus og nordligere deler av USA, Canada og Alaska (1) (figur 4). *A. incana* i Norge deles i to underarter: *A. incana* ssp. *incana* som er vanlig i lavlandet, mens *A. incana* ssp. *Kolaënsis* som er vanlig i fjelleområdene i Sør-Norge, Troms og Finnmark (6). Gråor liker fuktige forhold, og er vanlig i langs elvebredder. Den vokser i ulike typer jordsmønn, surhetsgrader og fuktighetsforhold, og finnes i høyder opptil 1800 m.o.h (7). Gråor trives i tørr jord som er sand-, grus eller leirholdig, samt i områder med både sol og skygge (8).



Figur 4: Kartet viser utbredelse av gråor i ulike deler i verden: Europa, Kaukasus og nordligere deler av USA, Canada og Alaska (1).

1.1.5 Tradisjonell bruk

Det finnes over 30 *Alnus*-arter over hele verden som er kjent for sin tradisjonelle bruk i behandling av ulike sykdommer som inkluderer diare, feber, magesmerter, dysenteri, revmatisme, livmorkreft, hepatitt og kreft. Folkemedisin i Ayurveda, Unani og kinesiske medisinske systemer har tradisjonelt brukt alle planter fra *Alnus* slekten (9).

Mot kreft og hepatitt har *Alnus japonica* blitt brukt i koreansk folkemedisin, mens barken til *Alnus glutinosa* har blitt brukt som et febernedsettende middel, og for betennelser i munn og svelg (9).

Or har blitt brukt som nyttevekst i Norge, hvor bladene har blitt brukt på åpne sår og gnagsår, barken har blitt brukt til brannsåre, og et avkok av orebark har blitt brukt til å behandle såre lepper (10).

I det nordlige British Columbia (vest Canada) er barken til *A. incana* tradisjonelt brukt i behandling av sår og brannskader. Barken har også blitt brukt for å lindre smerter i munnen som følge av sår, og for å behandle hudkreft ved å bruke avkok bark som en hudvask (11). I tillegg har barken av *A. incana* og *Betula nigra* blitt brukt til å behandle hudsykdommer på både hester og mennesker i British Columbia (12).

A. incana har blitt brukt til å behandle ulike sykdommer i ulike deler av verden. I fjellområdene i Europa har den blitt brukt til å behandle ryggsmarter ved å legge tørkede blader på det smertefulle området (13), mens i Samogitia-region i Litauen har den blitt brukt til å behandle diare (14). *A. incana* har blitt brukt i folkemedisin i Serbia i form av en infusjon for å behandle gastrointestinal og hudsykdommer. Det har også blitt brukt til gurgling for å behandle bakterielle infeksjoner i munnen og svelget (15).

1.2 Identifisert naturstoffer i gråor og biologisk effekt

1.2.1 Naturstoffer i *A. incana*

Tabell 3: Identifisert naturstoffer i *A. incana*

Stoffklasse	Navn	Referanse
Diarylheptanoider	Oregonin	(16, 17)
	Platyphylloside	
	1,7-Bis-(3,4 dihydroxyphenyl)-heptane-5-O-b-D-glucopyranoside.	
	1,7-Bis-(3,4-dihydroxyphenyl)-3-hydroxy-heptane-5-O-b-D-xylopyranoside.	
	1,7-Bis-(3,4-dihydroxyphenyl)-heptane-3-one-5-O-b-D-glucopyranoside.	
	Alnuside A og B	(18)
Triterpener og steroider	Betulin	(19, 20)
	Betylinsyre	
	Betulone	
	Lupenone	(20)
	Lupeol	
	Lupen -3-one	
	Betulinol	
	Sitosterol	
Fettsyrer	Oktadekadiensyre	(20)
	Hydroksyoktadekadiensyre	
Alifatiske alkoholer	Docosan-1-ol	(20)
	Tetracosan-1-ol	
Di- og tri-glyserider	Hexadecznoyl monoglycerol	(20)
	Octadecadienoyl monoglycerol	
Kanelsyrer	p-Kumarsyre	(21)
	Ferulsyre	
Flavonoider	Hyperosid	(21, 22)
	Isoquercitrin	(16)
	Proanthocyanidiner	
	Alnikortin	(15)
	Alnikortol	

Tabell 3 viser tidligere identifiserte naturlige stoffer i *A. incana*, fra blader, blomster, bark og kongler. *A. incana* og *A. glutinosa* (svartor) inneholder flere av de samme stoffene (17) (23). Diarylheptanoider er den mest kjente gruppen i Alnus-slekten. I 1969 og 1970 ble den første diarylheptanoidene fra Alnus-arter isolert av Yoshinori Asakawa (24). Oregonin, platyphyllosid, hirsutenon og platyphyllenon er den meste kjente lineære diarylheptanoidene fra Alnus-artene (24). Andre sekundære metabolitter inkluderer triterpener og flavonoider.

Flavonoidene alnikortol og alnikortin ble oppdaget i *A. incana* og *A. glutinosa*, og andre *Alnus*-arter, som viste antimikrobiell effekt (15).

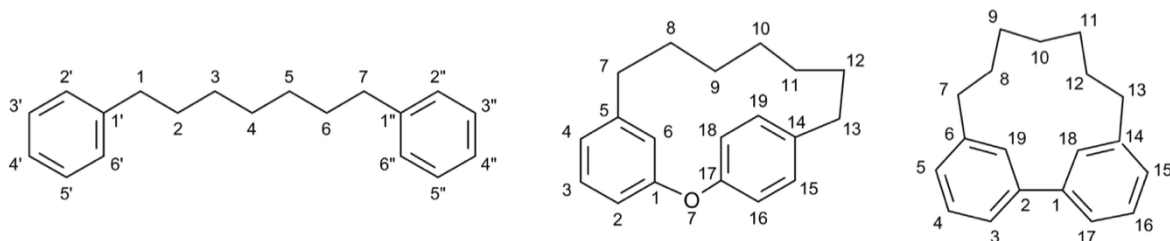
Diarylheptanoider:

Diarylheptanoider er sekundære metabolitter med en 1,7-difenylheptan-struktur som kan deles inn i lineære eller sykliske forbindelser (17). Curcumin i gurkemeie var det første diarylheptanoidet som ble identifisert, og siden da er det identifisert over 400 andre diarylheptanoider (25).

Lineære diarylheptanoider inneholder to benzenringer koblet med en heptankjede (24). Aromatiske ringene koblet sammen for å danne [7,1]-meta-, para- eller [7.0]-meta, meta-cyklofaner, som kan være hydroksylerte eller metoksylerte og C-4 hydroksylgrupper kan acetyleres eller glykosyleres. C-7 kjeden kan være mettet eller inneholde dobbeltbindinger for karbongruppe. C-5 kan være substituert med en hydroksylgruppe, denne kan være fri eller være bundet til metyl- acetyl-, sulfat- eller glykosylgruppe. I tillegg så kan sukkerdelen være substituert med fenolkarboksylyrer (25).

Sykliske diarylheptanoider kan være enten mettede eller umettede, og de kan ha karbonyl- eller hydroksylgrupper festet til heptankjeden. De aromatiske ringene kan også være hydroksylert eller metoksylyert, i tillegg kan O-glykosylering også forekomme (25).

På grunn av biologiske egenskaper til diarylheptanoider, inkludert anti-inflammatorisk, anti-kreft og antioksidativ aktivitet, er det av interesse å oppdage nye diarylheptanoider (25).



Figur 5: Struktur til lineære og sykliske diarylheptanoider (25).

1.3 Biologisk effekt samt funn og skreening av antimikrobielle midler fra miljøet/planter.

Alnus-slekten finnes over hele verden og er kjent for sin tradisjonelle bruk i folkemedisinen. Viktige stoffer som triterpenoider, flavonoider, tanniner, fenoler, steroider og særlig diarylheptanoider i alnus slekten er de meste biologisk aktive forbindelsene. Diarylheptanoider er mest kjent for å ha antioksidanteffekt, og antimikrobiell aktivitet (9). I tillegg er mange effekter som aktiviteter som anticancer, og antiviral aktivitet også rapportert (26). Stoffer fra or har også vist seg å modulere quorum sensing (QS) i ulike bakterie arter (24).

Antimikrobielle aktivitet:

I en studier ble *A. incana* og *A. viridis* bark, kongler og blad-ekstrakter testet mot 15 mikroorganismer med bruk av mikrofortynningsmetoden i 96-brønns plater for å bestemme MIC-verdier. Antimikrobiell aktivitet ble observert i ekstrakter av *A. incana*, og *A. viridis* kongler med en MIC-verdier 0.117 til 0.292 mg/ml. Effekten ble antatt å skyldes innhold av fenoler og tanniner i ekstraktene (15).

Vann og etanol-ekstrakter av *A. glutinosa* og *A. orientalis* ble testet *in vitro* for å bestemme antimikrobiell aktivitet mot fem forskjellige mikroorganismer med bruk av buljongfortynningsmetoden. Antimikrobiell aktivitet ble observert med etanolekstraktet med en MIC-verdier på 0.125-0.250 mg/ml mot de testede mikroorganismene (27).

I en studie av metanolekstraktet fra barken til *A. glutinosa* ble de meste aktive fraksjonene testet mot 22 mikroorganismer ved hjelp av MIC-assay (minimum inhibitory concentration), for å bestemme den minste hemmende konsentrasjon som dreper bakterier. Antibakteriell aktivitet mot både gram-positive og for gram-negative bakterier samt gjærstammer ble observert, med en med MIC-verdier på 0.3 mg/ml eller lavere (28).

Oregonin ble identifisert som hovedstoffet i rækstraktet og ble undersøkt mot de samme 22 mikroorganismene. Sterk antibakteriell aktivitet ble observert for oregonin mot mange stammer med en MIC-verdi på 15.1 til 125 µg/ml på 22 mikrobielle stammer. 20 stammer av de 22 viste en MIC-verdi på 62 µg/ml eller lavere, resultatet var omtrent like effektivt som antibiotika. Mikroorganismen *S. aureus* viste høyest følsomhet for oregonin med den høyeste antibakteriell

hemmende aktivitet sammenlignet med test antibiotikum. De to gram-positive bakteriene *Bacillus subtilis* og *S. aureus*, viste høy følsomhet med MIC=15.1 µg/ml (28).

Modulering av quorum sensing aktivitet i *Pseudomonas aeruginosa*:

Anti-quorum sensing aktivitet til utvalgte diarylheptanoider fra barken til *Alnus viridis* ssp og *A. glutinosa* ble testet med de to biosensorene *Pseudomonas aeruginosa* og chromo bakterium violaceum. Fire diarylheptanoider hemmet den tidlige biofilmdannelse av mikroorganismen *P. aeruginosa*, mens tre diarylheptanoider platypyllosid, aceroside VIII, og hirsutenon hadde en negativ påvirkning på biosyntesen av procyanin. To diarylheptanoider platyphyllenon og hirsutenon hemmet biosyntesen i *C.violaceum*.

I tillegg viste diarylheptanoidet (1S,3R)-3-hydroksy-5-(4-hydroksyfenyl)-1-[2-(4-hydroksyfenyl)etyl]pentyl-O-B-D-glukopyranoside å redusere produksjon av aceylhormoserinaktoner (AHL) i *P. aeruginosa*, og en del av det *P. aeruginosa* kinolon-medierte syntesen 2-alkyl-4-kinoloner syntesen ble redusert av fire diarylheptanoider; (5S)-1,7-bis(4-hydroksyfenyl)-5-O-γ-β-D-apiofuranosyl (1-6)- β-D-glukopyranosyloksyheptan-3-on, platypyllosid, aceroside VIII og hirsutenon .

En MIC på 125 til 500 µg/ml ble observert med de syv diarylheptanoidene som ble testet mot *P. aeruginosa* og en stimulerende effekt som er tre ganger høyere på biofilmdannelse ble observert med forbindelsene hirsutenon og oregonin (24). I tillegg ble det observert effekt av diarylheptanoidene på produksjon av pyocyanin av *P. aeruginosa*.

MTT-analysen ble brukt til testing av antiproliferative effekter av syv diarylheptanoider mot MRC5-cellelinje (humane lungefibroblaster). Dette resulterte i en hemming av celleproliferasjon med diarylheptanoidene. Fem diarylheptanoidene viste også cytotoksiske effekter i høye konsentrasjoner (24).

Anti-inflammatorisk effekt:

I en studie ved Universitet i Oslo ble 22 norske medisinsplanter undersøkt for immunodulerende effekter. Gråorbark-ekstraktet viste høyest anti-inflammatorisk effekt blant alle de undersøkte plantene, med blant annet reduksjon av IFN-γ og TNF-α sekresjon i immunceller (29).

Anti-mykobakteriell effekt mot tuberkulose.

Barkekstrakt fra canadisk planten *A. incana* har blitt isolert og har resultert i fire lupan-triterpener som inkluderer betulin, betulinsyre, betulon og lupenon, som ble testet med MIC assay. Betulin viste den høyeste antimykobakterielle aktivitet mot *Mycobacterium tuberculosis* med en MIC på 12.5 µg/ml (19).

Anti-fedme aktivitet:

I en studie fra Canada viste *A. incana* å ha effekt mot fedme, ved å hemme adipogenese, og å virke som agonist mot PPAR (proliferator aktivert reseptor gamma) aktivitet. *A. incana* har vist å gi en tidligere effekt i differensieringsprosessen, uten å endre de morfologiske transformasjonene fra fibroblastlignende til avrundede fettladede eller klonal ekspansjon av pre-adipocytter (18).

Cytotoksisk og anti-tumor effekt:

Diarylheptanoidet hirsutenon isolert fra *A. japonica*, *A. hirsuta*, og *A. pendula* er mye studert og har vist anti-tumor effekt i ulike studier. Hirsutenon hemmet patogenesen av forskjellige typer kreft som tumorpromotoren 12-O- tetradecanoylforbol-13-acetat (TPA)-indusert oppregulering av cyklooksygenase-2 (COX-2) og matrisemetalloproteinaser-9 (MMP-9) i humane brystepitelceller. I tillegg til en hemmende effekt på TPA-indusert COX-2-ekspressjon i immortaliserte humane brystepitel-MCF10A-celler ble det observert at naturstoffene oregonin og hirsutanool hadde cytotoksisk effekt mot kreftceller. Oregonin viste antikreftaktivitet ved økning av aktiviteten til makrofager og naturlige drepeceller (26). I tillegg i en studie mot humane kreftceller har diarylheptanoidene vist *in vitro* cytotoksisk aktivitet mot humane kreftcellelinjer, og *in vivo* har oregonin vist cytotoksisk aktivitet i B16 musemodeller for melanom (25).

Antioksidant aktivitet:

Gråorbarken har vist antioksidant aktivitet i *in vitro* forsøk ved inkubering av menneskelig blodprøver og i *in vivo* forsøk med rotter som har vist biologiske aktiviteten (16). Diarylheptanoidene oregonin og hirsutenon viste effekt på oksygenradikaler. I tillegg viste oregonin den sterkeste antioksidant aktivitet (26).

Kjemobeskyttende effekt på humane lymfocytter DNA:

14 diarylheptanoider fra *Alnus glutinosa* barken ble funnet å ha in vitro-beskyttende effekt på kromosomavvik i perifere humane lymfocytter. Dette resulterte i en reduksjon av DNA-skader i lymfocytter (23).

1.4 Problemer rundt antibiotika resistens og behovet for nye og bedre løsninger samt behovet for nye antimikrobielle midler.

Antimikrobiell resistens (AMR) fører til økning i sykkelighet og dødelighet og har blitt et alvorlig globalt helseproblem. Resistente infeksjoner i Europa og USA tar minst 50 000 liv hvert år. Et eksempel er Meticillin-resistente stammer av *S. aureus* (MRSA) som forårsaker mer enn 10% av infeksjonene i 15 europeiske land. Overbruk og misbruk av antimikrobielle midler kan føre til utvikling av resistens (30). “The Review on Antimicrobial Resistance” av Jim O’Neil, viste at 300 millioner mennesker kan dø på grunn av medisinerresistens i løpet av de neste 35 årene, og det antas et tap på mellom 60 og 100 billioner USD i økonomisk produksjon hvis ikke antimikrobiell medikamentresistens ikke blir løst (30).

For å stoppe eller hjelpe med å begrense antibiotikaresistens er det nødvendig å øke bevisstheten om riktig antibiotika bruk og redusere unødvendig bruk av antibiotika både hos mennesker og dyr. Bedre hygiene for å redusere spredning, og begrense sykdommer som kan kreve antibiotikabehandling er også viktig. Vaksiner kan bidra til å redusere bruken av antibiotika og forebygge infeksjoner. I tillegg er samarbeid mellom landene viktig for å begrense antibiotikaresistens globalt (31).

Utvikling av nye antimikrobielle midler er viktig for å begrense den økende resistens og de antibiotika som har mistet effektiviteten. Naturlige produkter, planter, mikrobielle ekstrakter, eteriske oljer og andre naturlige kilder er blant de viktigste kildene til disse midlene (32).

Screeningsmetoder brukes for å identifisere stoffer, og for å undersøke antimikrobiell aktivitet av naturlige produkter. Agar diffusjonsmetoden i både skive- og i brønn er to av de vanligste metodene som brukes for å undersøke antimikrobiell aktivitet (33). Det finnes også andre screeningsmetoder som kan deles inn i tre grupper, bioautografisk, diffusjons- og fortynningsmetoder. Discdiffusjons og bioautografiske metodene er kvalitative teknikker som gir en oversikt som hvilke stoffer som har antimikrobiell aktivitet, men fortynningsmetoder er kvantitativ analyser og gir også informasjon om den minste hemmende konsentrasjon av det antimikrobielle stoffet (33).

I denne studien har barken fra gråor som tilhører *Alnus*-slekten blitt brukt. Gråor er kjent for sin tradisjonelle bruk mot ulike infeksjons sykdommer over hele verden. I avsnitt 1.1.5 om tradisjonell bruk, nevnes at gråor brukes mot sår, gnagsår og infeksjoner i munnen, noe som kan indikere at barken har antimikrobiell aktivitet. Gråor er kjent også for sin tradisjonelle bruk

mot andre sykdommer, inkludert hudkreft, diare og gastrointestinale problemer. Gråor er kjent for sitt innhold av diarylheptanoider, som er mest kjent fra *Alnus*-slekten, i tillegg til andre sekundære metabolitter som triterpener og flavonoider. Diarylheptanoider er kjent for sine antiinflammatoriske, antikreft og antioksidantegenskaper, som indikerer at de har biologiske effekter. Flere studier har dokumentert antimikrobiell aktivitet av gråor mot ulike mikroorganismer, som nevnt i avsnitt 1.3 om biologisk effekt.

1.5 Isolering og identifikasjon av naturstoffer

Med økende mikrobiell resistens vil naturprodukter fra planter, mikroorganismer eller andre naturlige kilder være en viktig kilde til nye antimikrobielle substanser på grunn av innholdet av bioaktive forbindelser som organismene selv produserer som forsvarsstoffer mot andre mikroorganismer. For å finne de(n) aktiv(e) forbindelsen(e) i disse naturlige kildene er det viktig å bruke riktige ekstraksjonsteknikker og ulike kromatografiske teknikker for å isolere de aktive forbindelsene (34).

1.5.1 Ekstraksjon

Det viktigste trinnet for å trekke ut komponenter fra planten er ekstraksjon. Løsningsmidlet som velges er avgjørende. Polare løsningsmidler som metanol, etanol eller vann brukes til å ekstrahere hydrofile stoffer, mens etylacetat, diklometan eller en blanding av diklometan og metanol for ekstrahering av mer lipofile stoffer (34). I tillegg til polariteten, er stabiliteten til de ekstraherte stoffene i ekstraksjonsmidlene, temperatur toksisiteten, flyktigheten, og viskositeten til ekstraksjonsmiddelet viktige faktorer som må vurderes (35). Det finnes ulike ekstraksjonsmetoder som kan benyttes til å trekke ut viktige komponenter fra biomassen, som maserering, perkolering og Soxhlet-ekstraksjon. Akselert løsmiddelekstraksjon (ASE), som ble benyttet i denne oppgaven, bruker høyere temperatur og trykk for å øke effektiviteten, og anses som en mer skånsom metode enn Soxhlet, men mer effektiv enn både maserering og perkolering (35).

1.5.2 Fraksjonering og identifisering

For fraksjonering av stoffer er flere separasjonsteknikker brukes, som TLC, kolonnekromatografi, flashkromatografi, Sephadex-kromatografi og HPLC (35). For å identifisere isolerte bruker ulike spektroskopiske teknikker: massespektrometri (MS), UV, infrarød (IR), kjernemagnetisk resonans (NMR). NMR ble brukt i denne oppgaven. ¹H NMR spekteret gir blant annet gir oversikt over antall H-atomer som gir hvert signal, antall naboatomer, og hvilke posisjoner kjernene er i molekylet (36).

2D NMR metoder viser koblinger mellom nærstående protoner (COSY), protoner og karbonatomer som er 2-4 bindingsavstander fra hverandre (HMBC), og protoner og karbonatomer som er bundet til hverandre (HSQC).

2 Hensikt

Med økende resistens over hele verden er det viktig å utvikle nye antimikrobielle midler, og planter er en viktig kilde til dette. Bruk av gråorbark har lang tradisjon, både i Norge, ellers i Europa og Nord-Amerika i behandling av infeksjoner, slik som i munn, halsinfeksjoner, og sår på huden. Diarylheptanoidet oregonin er kjent for sine antimikrobielle effekter, og er et av innholdsstoffene i gråor. Det er likevel få studier som har undersøkt innhold av nye antimikrobielle stoffer i gråorbark.

Hensikten med denne oppgaven var å isolere og strukturoppklare naturstoffer fra gråorbark og undersøke antimikrobielle effekter mot relevante test mikroorganismer ved bruk av DISC assay og MIC (minimal inhibitory concentration) assay. Sekundært var det behov for å utvikle metoden for å måle antall CFU per OD for to av test- mikroorganismene *E. coli* og *S. aureus*.

3 Materialer og metoder

3.1 Materialer

3.1.1 Kjemikalieliste

Kjemikalie	Produsent
Til isolering, fraksjonering og NMR	
Etanol	VWR Chemicals, Frankrike
Metanol	VWR Chemicals, Frankrike
Destillert vann, Milli-Q	Farmasøytisk Institutt, Oslo, Norge
Diaion HP-20 resin	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Acetone	VWR Chemicals, Frankrike
ASE ^R prep diatomaceous earth (DE)	Thermo Fisher Scientific, Sunnivale, California, USA
Tetramethylsilane	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
DMSO Dimethyl sulfoxide til MIC	Merck, Darmstadt, Tyskland
Dimethyl sulfoxide-d ₆ til NMR	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Methanol-d ₄ (CD ₃ OD)	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Sephadex LH-20 resin	GE Healthcare, Uppsala, Sverige
Til antimikrobielle tester	
70% Etanol	Farmasøytisk institutt
Destillert vann	Farmasøytisk institutt, ZEB-bygget
NaCl	Sigma-Aldrich, Darmstadt, Tyskland
Miconazol nitrat	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Vekstmedier	
MH	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
TSA	Oxoid, United Kingdom
SDA	Oxoid, United Kingdom
MHB	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA

3.1.2 Liste over apparatur og utstyr

Materiell	Produsent
Apparatur	
Ultrabad	
Ultrasonic cleaner USC300T	VWR, Darmstadt, Tyskland
Filtrering	
Sprøytefilter 0.2 um PTFE membran, 25 mm	VWR, Darmstadt, Tyskland
Ekstraksjon	
Dionex ASE [®] 350	Dionex corporation, Sunnyvale, California, USA.
Flash kromatografi	
Biotage [®] Select, Flash instrument	
Biotage [®] Sfär C18 kolonner (60 g)	Biotage AB, Uppsala, Sverige
Analytisk TLC	
TLC silica gel 60 RP-18 F254S	Merck, Darmstadt, Tyskland
NMR spektroskopi	
Bruker AVneo400	Bruker Rheinstetten, Tyskland
Frysetøking	
Edwards 5 RV5 Vakumpumpe	Edwards, West Sussex, UK
Christ Alpha 1-4 LD plus Frysetørker	CHRIST, Osterode am Harz, Tyskland
Vannkvalitet	
Mili -Q [®] rensesystem	Merck, Darmstadt, Tyskland
Inndamping	
Rotavapor med varmebad HB10/RV10	IKA, Staufen, Tyskland
Innveiging	
ED224S analytical balance	Sartorius, Goettingen, Tyskland
Apparatur og utstyr til antimikrobielle tester	
Innveiging	
ADAM ^R HCB3001	Highland
Vannkvalitet	
Destillert vann	Farmasøytisk institutt, ZEB bygget
Disc	
Antibiotic Disc	Liofilchem, Italy
BD BBL [™] Disc filter papir, kloramfenikol, 30 µg	Becton, Dickinson and Company, Franklin Lakes New Jersey, USA

BD BBL™ Senci -disc, Tetrasyklin, 30 µg	Becton, Dickinson and Company, Franklin Lakes New Jersey, USA
CN Disc filter papir, Gentamicin, 30 ug	, Oxoid, Basingstoke, United Kingdom.
Røring	
Whirlmixer MS2 minishaker, MS3 basic	IKA, Staufen, USA
Autoklaving	
Sterilisasjonsteknikk, lab K300E	LTE touchclave, HMC Europe sterillisationstechnik
Inkubator	
Mini inkubator Stor inkubator	Labnet I 5110-230V. Lbor-teknikk A/S, Western, Germany
Måle Od	
Eppendorf AG 22331, OD 600 Biophotometer	Hamburg, Germany
Utstyr til antimikrobielle tester	
Multi pipette (50-200 µl) 72504 Multi pipette (30-300 µl) K26187E ADJ.	Titertek· Finland, Eppendorf Research plus
Pipette (5-50 µl) U19412 Pipette (0.5-10µl) N91655 Pipette (0.2-2 µl) N89039 Pipette (0.5-10 µl) U32164	Thermos lab systems, Thermos electron
Pipette (200-1000 µl) A61576 og E03901	Pipetti Lab systems, Finnpipette lab systems
Pipette (10-100 µl) S51326 og G26571 Pipette (50-200 µl) AK 32261 Pipette (20-200 µl) H35686	Thermo Lab systems, Finnpipette Lab systems Biohit proline
Herasafe KS avtrekskap	Thermo scientific, Langenselbold Germany.
IBS integra	Biosciences Tecnomat
Spisser Filter Tips (20-300ul) (300ul), (0.1-10ul), (1000ul).	Biosphere, Sarstedt, Germany
Blå sterile øse	Nunc serving life science
spreder	Thermo Scientific
Pipette 5 ml	Sarstedt serological, Numbrecht, France
Gassflamme WLD-TEC GmbH.	Fuego, Sarstedt, Germany
Flacon -rør	Numbrecht, Germany
Kyvetter	VWR, Germany
Reservoar	VWR, North American
96-brønners plate (Hard plastic polystyrene round bottom plates)	Costar, USA
Til røring av løsning med magnet RCT B	IKA, Staufen, Germany.
MC Farland Standard 2.0	Pro -lab, UK.
Petriskål	Sarstedt, Tyskland

3.2 Generelle metoder

3.2.1 Vannkvalitet

Vann fra et Milli-Q rensesystem ble benyttet til ekstraksjon og kromatografi. For disc og MIC assay ble destillert vann fra mikrobiologilaboratoriet på ZEB-bygget ved Farmasøytisk institutt benyttet.

3.2.2 Innveiing

Det ble brukt overskålsvekt vekt for innveiing av fraksjoner over 10 g, vanlig vekt til større mengder over 420 g og analysevekt til masser under 220 g. Til innveiing av stoffer til næringsagar til DISC og MIC assay ble analysevekt Highland (type) i ZEB-bygget benyttet.

3.2.3 Inndamping på rotavapor

Det ble benyttet rotavapor for inndamping av løsemiddel etter ekstraksjon fraksjonering, og avhengig av løsemiddelet ble temperaturen i vannbad til rotavaporen satt til 40-60°C.

3.2.4 Frysetørking

Frysetørking ble benyttet til fjerning av vannrester fra ekstraktet etter inndamping med rotavaporen.

3.2.5 Flash kolonnekromatografi

Det ble benyttet et Biotage[®] instrument med Sfär C 18 D 60 g kolonne for fraksjonering, med en mobilfase hastighet på 50 ml/min. Prøvefraksjon ble løst i MeOH, deretter ble den filtrert med sprøytefilter med 0.2 µm PTFE membran, og applisert på kolonnen med sprøyte. Det ble målt UV absorbans ved 280 nm og 320 nm, og fraksjoner ble samlet i reagensrør. Mobilfase hastighet gradient og antall kolonnevolum er vist i tabell 4.

Tabell 4: Mobilfasegradient Biotage[®] Sfär Flah kromatografi.

MeOH i vann	Kolonne volum (CV)
10-10%	3
10-90%	20

3.2.6 Analytisk TLC

Silika gel 60 RP-18 F254S TLC plate ble benyttet for å undersøke fraksjoner etter Sephadex LH-20 kolonnekromatografi.

Det ble markert TLC plate med blyant med tall som tilsvarer ulike prøvefraksjoner, deretter ble prøvefraksjoner applisert på markert punkter med en kapillærrør, så ble TLC plate satt i en elueringskar med lokk med mobilfasesammensetning. Deretter ble det observert under uv lys og flekkene ble markert. Fraksjoner som inneholdt flekker med samme R_t -verdi ble slått sammen.

3.2.7 Kjernemagnetisk resonansspektroskopi (NMR)

Det ble benyttet et Bruker AVneo400 instrument ved Kjemisk institutt til NMR-analyser av ekstrakt, fraksjoner og isolerte stoffer. NMR-analyse ble klargjort ved å løse Diaion fraksjoner i ca 0,7 ml DMSO- d_6 , og Sephadex og flash fraksjoner i ca 0,7 ml deuterert metanol (CD_3OD) tilsatt noe få dråper av tetrametylsilan (internstandard, 0 ppm). Prøvene ble overført til NMR rør med en høyde på 4 cm. 1H -NMR ble tatt opp for alle prøver, mens ^{13}C NMR- eller ^{13}C APT, og 2 D (COSY, HMBC, HSQC) spektra ble tatt opp for renstoffer.

3.3 Plantematerialet



Gråorbark (figur 6,7 og 8) ble identifisert og høstet inn av professor Helle Wangensteen, Universitet i Oslo i Vang i Valdres, 5. juni 2022. GPS koordinater: 61°9'22.2"N 8°47'27.6"E. Barken ble lufttørket. Katalognummer: RL-20220605-ai.

Tørket bark ble malt på en Brablender knivmølle, 4 mm sikt ble benyttet til maling av barken og 805 g ble totalvekten etter oppmaling.

Figur 6: Gråor (*Alnus. incana*) ved innhøstingsstedet i Vang Valdres. Foto: Helle Wangenstee



Figur 7: Høsting av gråorbark i Vang i Valdres



Figur 8: Lufttøking av gråorbark.

3.4 Ekstraksjon av gråor

Instrumentet Dionex ASE[®] 350 ble benyttet til ekstraksjon av pulverisert gråorbark. Gråorbark (750 g) ble blandet med 250 g diatomaceous earth (DE) (3:1) og fylt i 28 ekstraksjonsceller. Et filtrerpapir ble plassert i bunnen, og en teskje DE ble tilsatt både i bunnen og på toppen. Det ble ekstrahert med 60% etanol, og hver ekstraksjonscelle kjørte to sykluser ved 50 °C. Etter ekstraksjon ble det benyttet rotavapor og frysetørking for fjerning av etanol og vann. 251.07 g råekstrakt ble utbytte etter etanolekstraksjon.

3.5 Kromatografisk metoder for fraksjonering og isolering

3.5.1 Diaion HP-20 kolonne separasjon

Diaion HP-20 kolonnekromatografi ble benyttet til grovseparasjon av råekstraktet. Kolonnen ble fylt med Diaion HP-20 resin, med litt glassull i bunnen og på toppen. Høyden på kolonnen var 43 cm og 5.5 cm i indrediameteren, og kolonnen ble kondisjonert med 3 l starteluenten.

200 g løst i 500 ml 30% MeOH og råekstraktet ble filtrert gjennom et gasbind før den ble applisert på Diaion kolonnen. Det ble benyttet ulike styrker av mobilfase for fraksjonering av råekstraktet som er vist i tabell 5. Fraksjon AI-E-D1 ble satt på frysetørking etter rotavaporen mens AI-E-D2, AI-E-D3, AI-E-D4, ble satt i oljepumpe etter rotavaporen.

Tabell 5: Metode for fraksjonering av råekstraktet på Diaion HP-20 kolonnen.

Mobilfase	Volum (L)	Fraksjoner
25% MeOH i dH ₂ O	3 L	AI-E-D1
50% MeOH i dH ₂ O	3 L	AI-E-D2
100% MeOH	4 L	AI-E-D3
100% aceton i dH ₂ O	3 L	AI-E-D4

AI-E-D2 fraksjon viste antimikrobiell aktivitet på Disc assay, den ble fraksjonert videre med Sephadex LH-20 kolonnekromatografi

3.5.2 Sephadex-LH-20, fraksjonering av AI-E-D2

Sephadex LH-20 kolonnekromatografi ble benyttet for å fraksjonere AI-E-D2. Kolonnen ble fylt med Sephadex LH-20. Høyde på kolonnen var 38 cm og 5 cm i diameter. 1.65 l starteluent ble tilsatt til Sephadex HP-20 for kondisjonering. AI-E-D2 (7 g) ble løst i 35 ml 55% MeOH og applisert på kolonnen.

Det ble kjørt ulike styrke av mobilfaser som er anvist på tabell 6 og kolonne-fraksjoner ble samlet i størrelser på 250 ml og 500 ml.

Tabell 6: Gradienteluerings for fraksjonering av AI-E-D2, og sammenslått fraksjoner etter TLC.

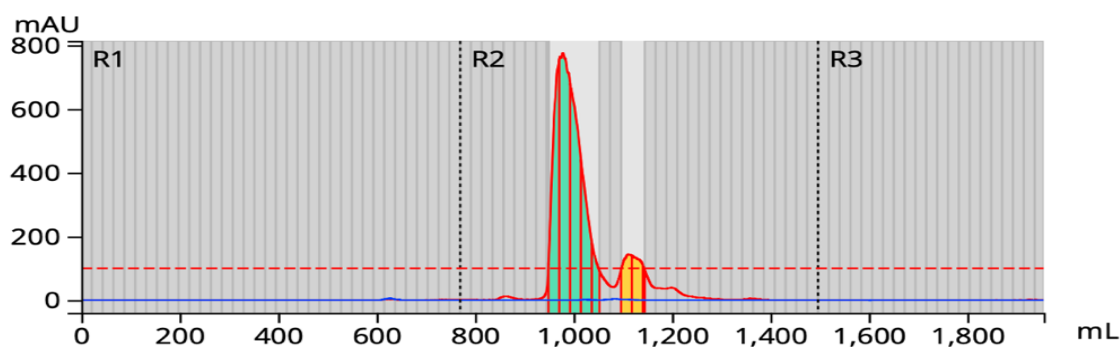
Mobilfase	Antall fraksjoner etter sephadex	Mengde (ml)	Antall fraksjoner Etter TLC	Mobilfase i TLC	Fraksjon
20% MeOH	5	1650	1	-	AI-E-D2-S1
40% MeOH	9	2060	3	50% MeOH	AI-E-D2-S2 AI-E-D2-S3 AI-E-D2-S4
80% MeOH	7	2000	3	60% MeOH	AI-E-D2-S5 AI-E-D2-S6 AI-E-D2-S7
100% MeOH	6	1000	3	100% MeOH	AI-E-D2-S8 AI-E-D2-S9 AI-E-D2-S10
70% Acetone	4	1000	2	80% MeOH	AI-E-D2-S11 AI-E-D2-S12
100% Acetone	2	1000	2	100% MeOH	AI-E-D2-S13 AI-E-D2-S14

Det ble kjørt TLC etter sephadex fraksjonering av AI-E-D2, og det ble slått sammen stoffer som vandrer likt med samme elueringsgradient. Det ble 14 hoved fraksjoner etter Sephadex fraksjonering som vist i tabell 6.

3.5.3 Flash kolonne kromatografi, fraksjonering av AI-E-D2-S4

Med bruk av instrumentet Biotage ® Select flash ble fraksjonen AI-E-D2-S4 fraksjonert. 500 mg ble veid og løst i 3 ml 25 % MeOH.

AI-E-D2-S4



Figur 9: AI-E-D2-S4 kromatogram etter flash kolonneseparasjon. Rød linje =280 nm. blå linje=320 nm.

To topper er vist i AI-E-D2-S4 kromatogrammet, den høye grønne toppen og den lave gule toppen absorbert ved 280 nm (figur 9). Det ble dampet inn tre fraksjoner fra den grønne toppen, den gule toppen som vist i tabell 7.

Tabell 7: Sammenslåtte fraksjoner etter flash-kromatografi av AI-E-D2-S4

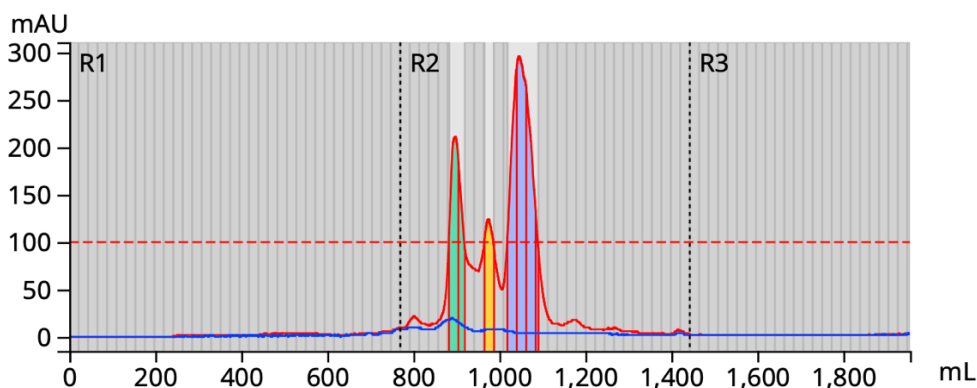
Fraksjoner	Samlede fraksjoner	Farge på toppen i kromatogram
AI-E-D2-S4-F1	(10,11,12,13,14)	Grønn
AI-E-D2-S4-F2	(15,16)	Mellomfraksjoner
AI-E-D2-S4-F3	(17,18,19)	Gul

Etter flash kolonneseparasjon av AI-E-D2-S4, det ble tre fraksjoner AI-E-D2-S4-F1, AI-E-D2-S4-F2 og AI-E-D2-S4-F3 som er vist i tabell 7.

3.5.4 Flash kolonne kromatografi, fraksjonering av AI-E-D2-S2S3

På bakgrunn av likt signal mønster i ^1H NMR-spektra ble fraksjonen AI-E-D2-S2 (0.116 g) og AI-E-D2-S3 (0.233 g) slått sammen til fraksjonen AI-E-D2-S2S3. Den sammenslåtte fraksjonen (349 mg i 1 ml 25% MeOH) ble fraksjonert med Biotage® Select flash.

AI E D2 S2S3



Figur 10: AI-E-D2-S2S3 kromatogram etter flash kolonneseparasjon. Rød linje = 280 nm, blå linje = 320 nm.

Tre topper er vist i AI-E-D2-S2S3 kromatogrammet, den grønne, gule og lille fargen (figur 10). Det ble dampet sammen rørene fra den grønne fargete toppen, den grå mellomste fargen, den gule, og den mellomste grå fargen og den lille toppen hver for seg som er vist i tabell 8.

Tabell 8: Sammenslåtte Fraksjoner etter flash-kromatografi av AI-E-D2-S2S3

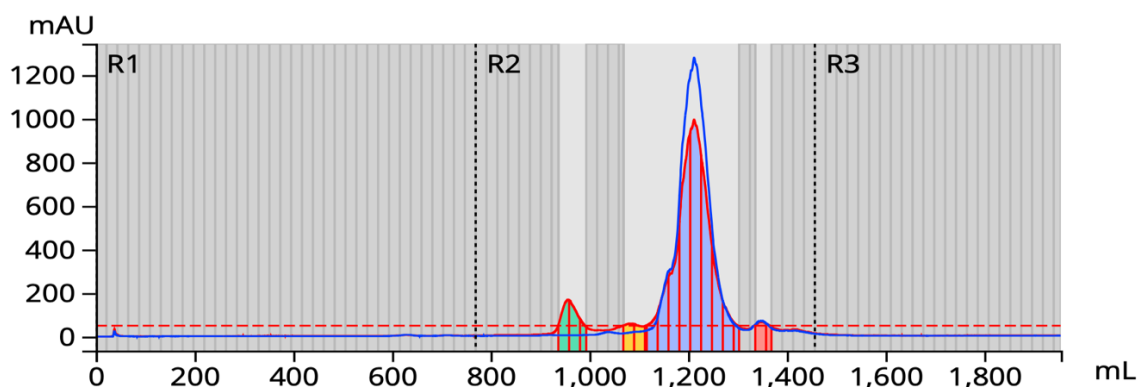
Fraksjoner	Samlede fraksjoner	Farge på topper i kromatogram
AI-E-D2-S2S3-F1	(7,8)	Grønn
AI-E-D2-S2S3-F2	(9,10,11)	Mellomfraksjoner
AI-E-D2-S2S3-F3	(12)	Gul
AI-E-D2-S2S3-F4	(12,14,15)	Mellomfraksjoner
AI-E-D2-S2S3-F5	(16,17,18,19)	Lilla

Etter flash kolonne separasjon av AI-E-D2-S2S3 ble det 5 fraksjoner som er vist i tabell 8.

3.5.5 Flash kolonne kromatografi, fraksjonering AI-E-D2-S6

AI-E-D2-S6 ble fraksjonert med Biotage® Select flash. 350 mg av fraksjonen ble veid og løst i 2 ml 50 % MeOH.

AI-E-D2-S6



Figur 11: AI-E-D2-S6 kromatogrammet etter flash kolonneseparasjon. Rød linje= 280, blå linje= 320 nm

4 fargete topper er vist i AI-E-D2-S6 kromatogrammet, hoved toppen med lilla farge, grønn, gul og rose topper (figur 11). Det ble dampet rørene fra den grønne, gule, rose hver for seg, mens den hoved lilla fargete toppen ble delt på to og dampet inn som er vist i tabell 9.

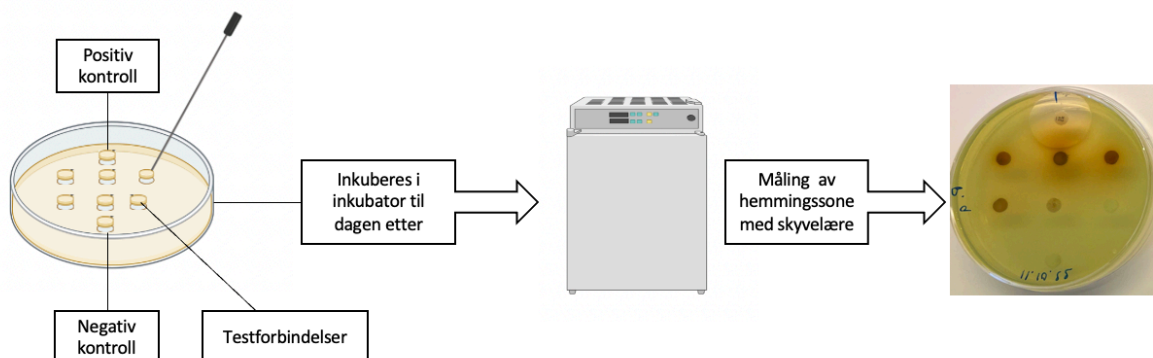
Tabell 9: Sammenslåtte fraksjoner etter flash-kromatografi av AI-E-D2-S6

Fraksjoner	Samlede fraksjoner	Fargen på topper i kromatogram
AI-E-D2-S6-F1	(19,20,21)	Lilla (del1)
AI-E-D2-S6-F2	(22,23,24,25,26,27)	Lilla (del2)
AI-E-D2-S6-F3	(30,31)	Rose
AI-E-D2-S6-F4	(09,10,11)	Grønn
AI-E-D2-S6-F5	(16,17,18)	Gul

Etter flash separasjon av fraksjonen AI-E-D2S6 ble det 5 fraksjoner som er vist i tabell 9.

3.6 Disc assay

Discdiffusjonsmetoden er en kvalitativ metode som gir en oversikt over stoffer som har antimikrobiell aktivitet (33). Denne metoden ble utviklet i 1940 (32) og er dermed blant en av de første antimikrobielle aktivitetstestene i kliniske laboratorier (37). Agar discdiffusjons metoden utføres ved at en agarplaten inokuleres med utsprengningsmetoden med en kjent stamme testmikroorganisme. En 6 mm filterpapirskive som inneholder en ønsket mengde av en testforbindelse plasseres på overflaten av agaren. I tillegg inkluderes en negativ og positiv kontroll av filterpapirskiver. Videre inkuberes agarskålen i en inkubator ved 37 °C for vekst av bakterier og 25 °C for vekst av sopp. Ved antimikrobielle aktivitet vil det etter 24 timers inkubering vil en hemmingssone bli observert en hemmingssone rundt disken ved at den diffunderer inn i agaren og hemmer vekst av testmikroorganismen. Hemmingssone måles i diameter ved hjelp av et skyvelære (figur 12) (32). Fordelen med denne metoden er at den er rimelig å utføre og enkel i bruk. Dette muliggjør skreening av en rekke stoffer som planteekstrakter, essensielle oljer og andre legemidler, for antimikrobiell aktivitet på kort tid. Ulempen med denne metoden er at den ikke skiller mellom bakteriedrepende og bakteriostatiske effekter og er ikke egnet for å bestemme minimumhemmende konsentrasjon (MIC) av antimikrobielle stoffer (32) (37). I tillegg er metoden avhengig av at stoffene diffunderer ut i agaren.



Figur12: Fremgangsmetoden til disc diffusjon assay. Først inokuleres en petriskål med en kjent mikroorganisme. 6 mm filterpapirskiver med ønsket testforbindelser plasseres på agaren, samt en negativ og positiv kontroll. Petriskål inkuberes i 24 timer, og ved antimikrobiell aktivitet vil det bli observert en tydelig hemmingssone rundt filterpapirskivene.

3.7 MIC assay

Minimum hemmede konsentrasjon (MIC) er den laveste konsentrasjon av et stoff som hindrer vekst av en testet mikroorganisme. MIC blir ofte uttrykt i $\mu\text{g/ml}$ eller mg/l (32) (33).

Fortynningstesting av antimikrobielle forbindelser utarbeides av Clinical and laboratory Standards institute (CLSI) og European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST).

MIC-testen utføres ved å bruke en 96-brønners plate, hvor det gjøres en serie fortynning med bruk av kulturmedier. I denne oppgaven ble Mueller Hinton buljong brukt til fortynning til bestemte konsentrasjoner, og fraksjoner som skulle testes ble løst til en sluttkonsentrasjon på 0.5 % DMSO. (løsningsmiddelet kan gjerne være noe annet enn DMSO). En bakteriesuspensjon ble fremstilt med ønsket mikroorganisme, samt antibiotikakontroll.

Et bestemt volum av hver fortynning blir tatt og satt i 96-brønners plate, deretter tilsettes bakteriesuspensjon (1×10^6 cfu/ml) unntatt negativ kontroll. Platen blandes godt og inkuberes ved 37°C . Dagen etter ble det observert vekst eller ikke vekst av bakterier,

Den laveste konsentrasjon som hemmer vekst angir MIC verdien (33).

3.8 Bakteriestammer

Etter anbefaling fra EUCAST (The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing) (38) (39) ble fem ulike mikrobielle testorganismer benyttet i denne oppgaven, to gram negative bakterier, to gram positive bakterier og en sopp.

Escherichia coli

Escherichia coli er en gram-negativ bakterie som tilhører familien Enterobacteriaceae. Den finnes i virveldyrets tarm og forårsaker infeksjon i intestinale og ekstraintestinale. Multiresistente stammer av *E. coli* er et alvorlig problem i både human og veterinærmedisin over hele verden (40).

Det er fire vanlige sykdomsfremkallende varianter av *E. coli*: enterohemoragiske (EHEC), enteroinvasive (EIEC), enteropatogene (EPEC) og enterotoksigene (ETEC). EPEC var den første varianten som ble påvist i 1940-tallet, og bakterien førte til utbrudd av alvorlig spedbarnsenteritt. I dag forårsaker EPEC akutte bakterielle betennelsestilstander i fordøyelseskanalen. EHEC forekommer mest i industrialiserte land, mens EIEC forekommer mest i utviklingsland, men den kan forekomme som en importsykdom i Norge. ETEC kan forårsake diare hos turister som besøker utviklingsland (41).

Staphylococcus aureus

Staphylococcus aureus, er en ikke-bevegelig gram-positiv bakterie i Firmicutes familien. Den finnes i mikrobiotaen i neseslimhinnen hos 20-40% av befolkningen (42). Den forårsaker et bredt spekter av alvorlig patogenesiser som septikemi og kolonisering av huden og slimhinneoverflaten. Misbruk og feilbruk av antibiotika har ført til utvikling av meticillin resistente stammer av *S.aureus*, kalt MRSA (43).

Pseudomonas aeruginosa

Pseudomonas aeruginosa, er en gram-negativ bakterie (44). Den kan forårsake flere ulike infeksjoner, blant annet sykehusinfeksjoner, urinveisinfeksjoner, cystisk fibrose, mellomørebetennelse og infeksjoner i sår og brannskader. Verdens helseorganisasjon (WHO) har definert *P. aeruginosa* som en kritisk patogen som kan føre til katastrofale konsekvenser i helsevesenet på grunn av resistens (45).

Bacillus subtilis

Bacillus subtilis, er en gram-positiv bakterie fra fylumet Firmicutes. *B. subtilis* er en jordbakterie (46).

Candida albicans

Candida albicans er en gjærsopp som befinner seg i kroppen i små mengder, som i munnen, på huden og i tarmen. Ubalansen av *Candida* i kroppen kan føre til infeksjoner som vaginal soppinfeksjon, bleieutslett og trøske (47). I tilfeller med nedsatt immunsystem som f. eks HIV eller ved cytostatika behandling kan alvorlige tilfeller av infeksjoner med *C. albicans* forekomme (48).

3.9 Disc diffusjons assay

Mueller-Hinton agar (M.H)

Mueller-Hinton agar (38 g) ble veid ut og løst i en målekolbe til 1000 ml destillert vann. Løsningen ble plassert på magnetrører i ca. 7 minutter til alt ble løst. Deretter ble toppen dekket med aluminiumsfolie og autoklavert for sterilisering ved 121 °C i 20 minutter. MH løsning ble deretter avkjørt til 50 °C. Ved bruk av en IBS-maskin ble porsjoner a ca. 20 ml av Mueller-Hinton løsningen fordelt i petriskåler.

Triptic soya agar (TSA)

Triptic soya agar (40 g) ble veid ut og løst i en målekolbe til 1000 ml destillert vann. Løsningen ble plassert på magnetrører i ca. 7 minutter til alt ble løst. Deretter ble løsningen plassert inne i autoklaven for sterilisering ved 121 °C i ca. 20 minutter. Ved bruk av en IBS-maskin ble porsjoner a ca. 20 ml av TSA-løsning fordelt i petriskåler.

Sabouraud dextrose agar (SDA)

Sabouraud dextrose agar (16,25 g) ble veid ut og løst i en målekolbe til 250 ml destillert vann. Deretter ble løsningen plassert i autoklaven for sterilisering ved 121 °C i ca. 20 minutter. Ved bruk av en IBS-maskin ble porsjoner a ca. 20 ml av SDA løsningen fordelt i petriskåler.

Mueller-Hinton, triptic soya og sabouraud dextrose agarskålene ble avkjølt i et laminært luftstrømkabinett til dagen etter. Platene ble oppbevart i kjølerom ved 4 °C.

Fysiologisk saltvannløsning

Natriumklorid (18 g) ble løst i en målekolbe til 2000 ml destillert vann. Løsningen ble plassert på magnetrører i ca. 7 minutter til alt ble løst. Deretter ble natriumklorid løsning plassert i autoklaven for sterilisering ved 121 °C i ca. 20 minutter.

Vekst av bakterier

Mikroorganismene benyttet i forsøkene (Tabell 10) er langtidslagret ved – 80 °C. Før bruk ble mikroorganismer tatt ut fra -80 °C og applisert med en steril blå engangsøse på

næringsagarplater, TSA for bakterier og SDA for sopp. For vekst ble agarskålene plassert i en inkubator ved 37 °C for bakterier og 25 °C for sopp i 24 timer. Agarskåler med mikroorganismene ble deretter lagret ved 4 °C. Det ble brukt ferske bakteriekolonier for hvert forsøk. For dette ble kolonier med bakterie eller sopp strøket på nye agarskåler som ble inkubert over natten ved temp og tid før hvert forsøk.

Tabell 10: Mikroorganismer som ble benyttet i disc diffusjons assay, samt positiv kontroll (dobbel kontroll med kjent antibiotika).

	Mikroorganismen	Antibiotika følsomhet, positiv kontroll
Gram positive bakterier	<i>S. aureus</i> (ATCC6538)	Kloramphenikol 30 µg/ml
	<i>B. subtilis</i> (ATCC6633)	Tetracyclin 30 mg/ml
Gram negative bakterier	<i>E. coli</i> (ATCC8739)	Gentamycin sulfat 20 mg/ml
	<i>P. aeruginosa</i> (ATCC9029)	
Sopp	<i>C. albicans</i>	Miconazole nitrate 100 mg/ml

3.9.1 Testing av antimikrobiell aktivitet av Diaion-HP-20 fraksjoner til gråorbarken samt rækstraktet ved bruk av disc diffusjonsmetode

Disc diffusjon assay fremgangsmetoden for antimikrobielle testing:

Discdiffusjonsanalysen ble benyttet til antimikrobielle aktivitet, hovedsakelig som beskrevet i retningslinjer fra Clinical and Laboratory Standards Institute CLSI. (49).

Antimikrobiell aktivitet til Diaion-fraksjoner av gråorrækstraktet samt rækstraktet, ble testet mot fem forskjellige mikroorganismer: to gram-positive, to gram-negative bakterier og en sopp (Tabell 10). To replikater ble utført for mikroorganismene *B. subtilis*, *P. aeruginosa*, *E. coli*, *C. albicans*, mens tre replikater ble kjørt for mikroorganismen *S. aureus*. Ved positivt resultater ble tre replikater utført og to for negativt resultat.

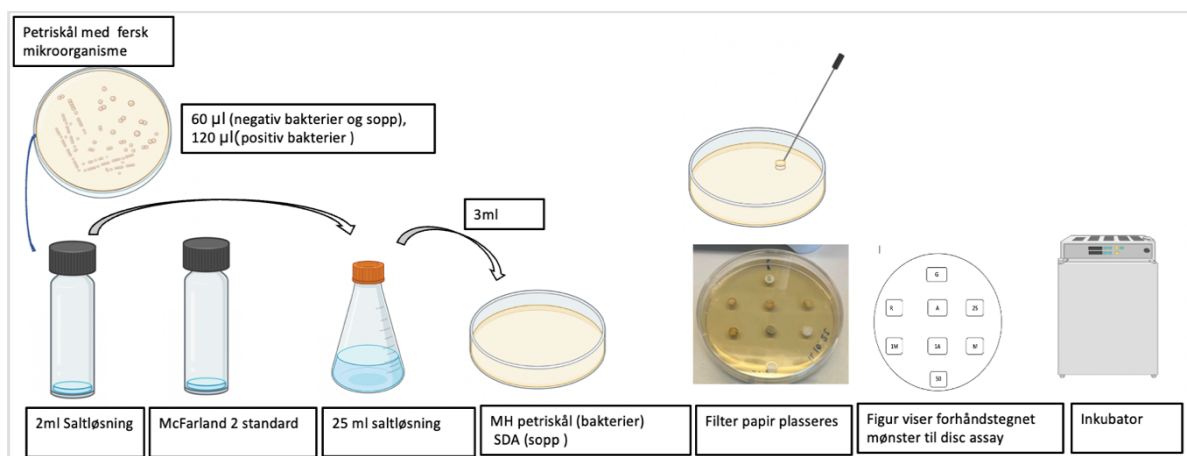
Før forsøket ble et aseptisk miljø laget. Lab-benken ble vasket med 70 % etanol, og gassbrenner ble slått på under forsøket. 2 ml steril saltløsning ble fylt aseptisk i et glassrør, og ferske enkeltkolonier fra næringsagaren (TSA for bakterier og SDA for soppen) ble overført med en blå podeøse og blandet godt til den oppnådde samme tetthet som McFarland 2 standarden (figur 13). McFarland 2 brukes som turbiditetsstandard for justering av tettheter av bakteriesuspensjoner (50).

For gram-negative bakterier *E. coli*, *P. aeruginosa* og soppen *C. albicans* ble 60 µl av inokulumet tilsatt til 25 ml steril saltløsning, mens 120 µl inokulumet ble tilsatt for de gram-positive bakteriene *S. aureus* og *B. subtilis* til en 25-ml-saltvannløsning.

Petriskålene ble merket med navn, dato, mikroorganisme og en strek slik at det ble lettere å orientere agarskålen for avlesning av resultater. Overflaten av Mueller-Hinton agar ble dekket med 3 ml av det nylagde inokulatet. Overskuddet av inokulatet ble fjernet fra platen ved å pipetere tilbake til 25 ml flasken. Platen med inokulatet ble stående i benken i minst 30 minutter helt til overflaten ble helt tør.

Rækstraktet og fraksjonene AI-E-D1, AI-E-D2, AI-E-D3, AI-E-D4 til *A. incana*, ble klargjort ved å veie ut 20 mg som ble løst i 1 ml 100 % MeOH til en konsentrasjon på 20 mg/ml. For å oppnå 1 mg på filterskiven ble 10 µl volum applisert fem ganger totalt på hver fraksjon. Mellom hver applisering ble en hårføner benytte til å fordampe bort metanolen.

For kontroller ble filterskiver tilsatt 50 µl kun løsningsmidlene MeOH, acetone eller DMSO, som fungerte som en negativ kontroll. Det ble også laget disc filterskiver for positiv kontroll for soppen ved at 10 mg ble veid av miconazole nitrate og løst i 100 µl av DMSO for å oppnå styrke 100 mg/ml. Ferdig laget antibiotikafilterskiver med gentamycin sulfat 20 µg/disc, kloramfenikol 30 µg/disc og tetracyclin 30 µg/disc ble også benyttet som positive kontroller for bakteriene. Filterskivene med fraksjonene ble plassert på Mueller-Hinton-Agar på en fremstilt plan i forhold til orientering av petriskålen. For hver plate ble det også plassert en positiv og en negativ filterskive for kontroll. Platen ble stående i romtemperatur i 1 time, før den ble inkubert med bunnen opp ved 37 °C for bakterier og 25 °C for sopp. Etter 24 timer inkubering ble hemmingsonen rundt filterskiven avlest ved bruk av skyvelære. Både den vertikale og horisontal retning for diameteren av hemmingssonen ble avlest og gjennomsnittet beregnet. Resultatene ble sammenlignet med positiv kontroll. Alle forsøkene ble utført to ganger ved negativ effekt og tre ganger ved positiv effekt.



Figur 13: Fremgangsmetoden for disc assay. Først overføres ferske enkeltkolonier til 2 ml saltløsning og blandet godt til de oppnår samme tetthet som McFarland 2 standard. Deretter tilsatt 60 µl eller 120 µl inokulumet til 25 ml steril saltløsning avhengig av om det er gram-negative eller gram-positive bakterier. Overflaten av Mueller-Hinton agar ble dekket med 3 ml av det nylagde inokulatet. Filterskivene med de ulike fraksjonene ble plassert på agarplaten på en bestemt måte i forhold til orientering av petriskålen, platen inkuberes med bunnen opp ved 37 °C for bakterier og 25 °C for sopp.

3.10 MIC assay

Mueller-Hinton Buljong (MHB) medium

Det ble laget Mueller-Hinton Buljong ved å vei ut 22 g og løse den i en målekolbe til 1000 ml destillert vann. Deretter ble det fordelt på 250 ml kolber. Toppen av de 4 kolber ble dekket med aluminiumsfolie og plassert i autoklaven for sterilisering ved 121 °C i 20 minutter. Mediet ble deretter oppbevart i kjølerom ved 4 °C frem til bruk.

Luria Bertani (LB) agar

Det ble laget Luria Bertani (LB) agar ved å varme opp en ferdig tilberedt LB agar til 300 ml flaske til det er løst ved hjelp av mikrobølgeovn i 10-15 min. LB agaren ble så avkjølt og deretter fylt med cirka 20 ml flytende LB i petriskåler. Arbeidet ble gjennomført i en sikkerhetsbenk. LB agar ble stående til avkjøling i sikkerhetsbenk til dagen etter og videre oppbevart i kjølerom ved 4 °C.

Sephadex Fraksjoner til MIC assay

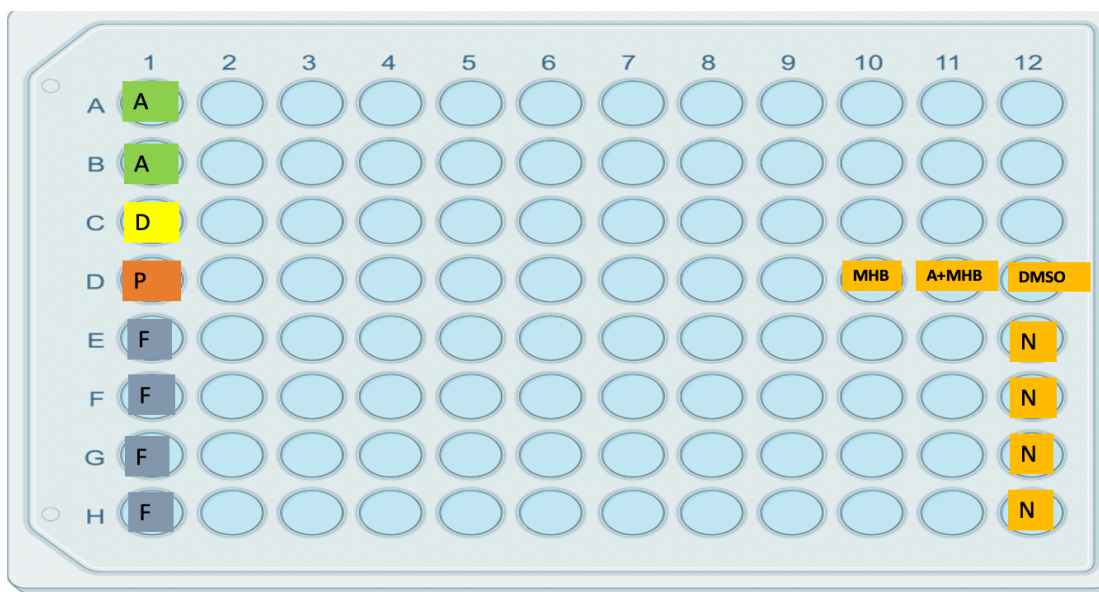
Fraksjon AI-E-D2 viste antimikrobielle effekt i Disc assay mot den Gram-positive bakterien *S. aureus*. AI-E-D2 ble videre fraksjonert med Sephadex LH-20 kolonne til totalt 14 fraksjoner. 10 mg stoff ble vei ut fra alle 14 fraksjoner og 0,250 ml DMSO ble tilsatt til alle for å oppnå en konsentrasjon på 40 mg/ml. 50 µl av de 14 fraksjoner ble overført til falkonrører hvor det ble tilsatt 4950 µl MHB medium så totalvolumet ble 5 ml per falkonrør.

Det ble klargjort isolerte stoffer med Flash kromatografi ved å bruke samme metode som sephadex-fraksjoner (tabell 2 Vedlegg D).

Mic assay fremgangsmetoden for antimikrobielle testing

For et aseptisk miljø ble lab-benken vaskes med 70% etanol og alt manuelt arbeid gjennomført i nærheten av en gassbrenner. Alt arbeid med *E. coli* (BSL-1) ble gjennomført på en vanlig lab-benk mens arbeidet med *S. aureus* ble gjennomført i en sikkerhetsbenk (BSL-2). Testen ble gjennomført i en 96-brønn polystyrene plate med 12 kolonner fra 1 til 12 og 8 rader fra A til H som er vist i figuren 14. De to første radeden (A og B) ble fylt med antibiotika kontroll.

96 brønn plate



Figur 14: Forhåndstegning mal til Mic assay i 96-brønners plate. A) Grønn farge indikerer antibiotika kontroll. D) Gul farge indikerer DMSO-kontroll. P) Oransje farge i rad D fra brønn D1 til D9 indikerer positiv kontroll, mens lys oransje farge indikerer negativ kontroll. F) Grå farge indikerer fraksjoner.

Antibiotika kontroll:

Antibiotika med en kjent konsentrasjon ble hentet fra -20 °C fryseren og tint på is. Deretter ble formelen brukt å regne antibiotikavolumet.

$$500 \mu\text{l} \times 128 \mu\text{g/ml} = X \mu\text{l} \times (\text{kjent konsentrasjon av antibiotika}).$$

For mikroorganismen *S. aureus* ble antibiotikakonsentrasjoner på 34 mg/ml og 25 mg/ml kloramfenikol benyttet, mens for *E. coli* ble konsentrasjonen på 50 mg/ml ampicillin benyttet. En antibiotikakonsentrasjon på 128 $\mu\text{g/ml}$ ble klargjort ved å blande et gitt μl -volum av antibiotika med 1 ml MHB i eppendorfrør, hvor 100 μl av dette ble pipettert inn i de to første

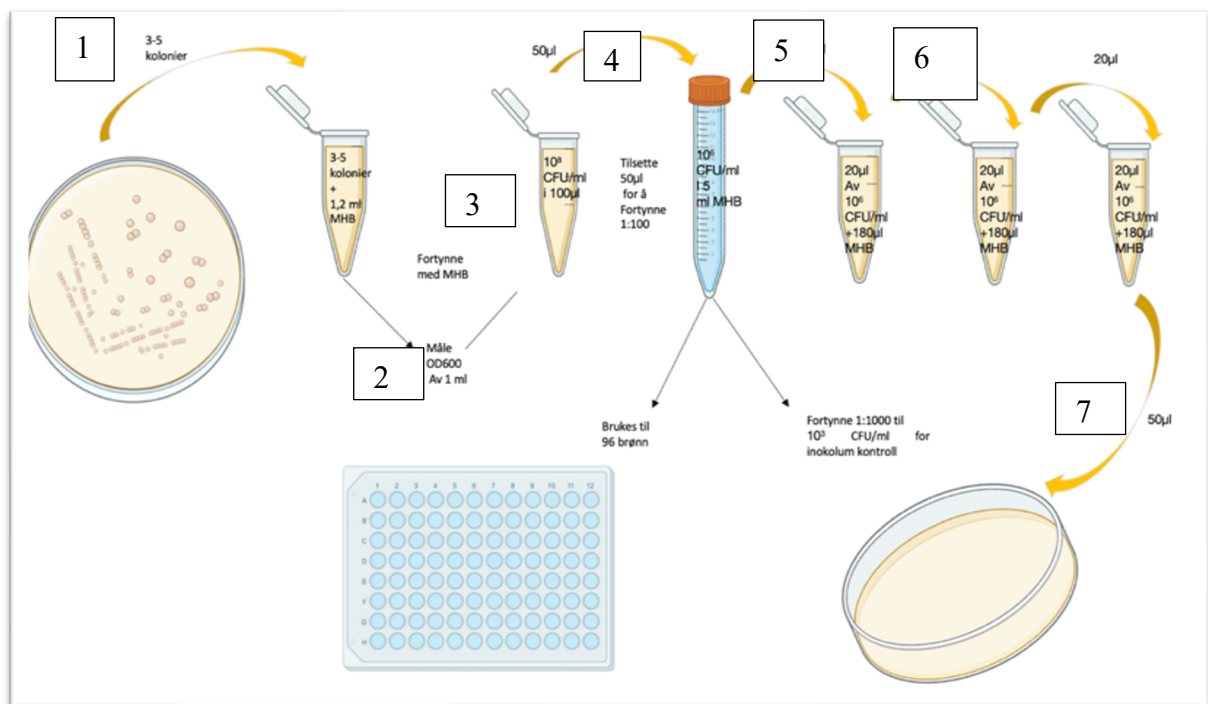
radene i 96-brønners plate A1 og B1. Deretter ble 50 µl av MHB medium tilsatt i brønnene A2-A12 og B2 til B12.

Seriefortynning ble utført ved å overføre 50 µl av antibiotikakonsentrasjon på 128 µg/ml fra A1 til A2 med videreoverføring fra brønn til neste brønn slik at konsentrasjonen i hver brønn ble halvert for hver fortynning.

For hver fortynning ble det blandet godt ved å pipettere opp og ned. Etter blanding ble 50 µl fra A12 og B12 kastet, slik at volumet i alle brønnene er 50 µl.

Til hver brønn ble det tilsatt 50 µl av bakterieinokulum med en konsentrasjon på 1×10^6 cfu/ml for å oppnå et endelig inokulum med tetthet på 5×10^5 cfu/ml.

Bakterie inokulum 1×10^6 cfu/ml



Figur 15: Fremgangsmetoden av tillaging av bakterieinokulum og inokulum kontroll. 1) Enkelte kolonier av den kjente mikroorganismen ble plukket og overført til en eppendorfør med 1.2 ml MHB. 2) Bakteriesuspensjon ble målt i et spektrofotometer. 3) Tetthet ble justert til 1×10^8 cfu/ml og fortynnet til 1×10^6 cfu/ml. 4) 5 ml MHB medium ble overført til et falkonrør og 50 µl av bakteriesuspensjon ble tilsatt. Tettheten på 1×10^6 cfu/ml ble brukt i 96-brønners plate. 5) Bakteriesuspensjonen på 1×10^6 cfu/ml ble fortynnet 1000 ganger ned til 1×10^3 cfu/ml. 180 µl MHB ble fylt i tre eppendorfører, og deretter ble 20 µl av 1×10^6 cfu/ml pipettert inn i det første røret for å oppnå en tetthet på 1×10^5 cfu/ml. 6) Prosessen ble gjentatt ned til en fortynning på 1×10^3 cfu/ml. 7) 50 µl av løsningen med 1×10^3 cfu/ml ble pipettert ut på en LB agar-skål, Skålene ble deretter inkuberte ved 37°C over natten,

Bakterieinokulumet ble klargjort ved at 3 til 5 enkelte kolonier av mikroorganismen ble plukket fra en fersk LB agar og blandet med 1,2 ml Mueller-Hinton Buljong (MHB) i et eppendorfrør som er vist i figur 15. Bakteriesuspensjonen ble blandet med en Wirlmixer. For videre beregninger av cfu tall for inokulumet ble tettheten av bakteriesuspensjonen målt i et spektrofotometer. 1 ml ren MHB ble pipettert i plastkyvette og benyttet for nullstilling av spektrofotometeret. For måling av OD ble 1 ml av bakteriesuspensjon pipettert i en plastkyvette og målt ved OD 600nm. Ved hjelp av en formel ble tettheten av bakteriesuspensjonen justert til 1×10^8 cfu/ml.

$$100 \mu\text{l} \times (\text{OD ønsket}) = \text{OD600}(\text{målt}) \times X$$

X- verdien representerer bakteriesuspensjonen, mens volumet av MHB ble regnet som 100 μl minus X. Bakteriesuspensjonen og volumet av MHB ble deretter overført til et eppendorfrør i et totalt volum på 100 μl . Videre ble bakteriesuspensjonen fortynnet fra tetthet på 1×10^8 cfu/ml til 1×10^6 cfu/ml. Fem milliliter MHB medium ble aseptisk overført til et falkonrør og deretter ble 50 μl av bakteriesuspensjon tilsatt til 5 ml falkonrør.

DMSO kontroll

Rad C ble det fylt med 50 μl 1 % DMSO som ble klargjort ved at 10 μl DMSO (100%) ble blandet med 990 μl MHB. Deretter ble 50 μl av bakteriesuspensjonen med tetthet 1×10^6 cfu/ml tilsatt og blandet godt. Sluttkonsentrasjon av DMSO ble dermed 0,5 % i 96 brønners platen som er samme konsentrasjon som fraksjonene er løst i.

Positiv kontroll

Rad D1-D9 ble tilegnet en positiv kontroll hvor 50 μl MHB ble pipettert sammen med 50 μl av 1×10^6 cfu/ml bakteriesuspensjonen og blandet godt. Denne kontrollen ble satt opp for å dokumentere at bakterie har evne til å vokse i det oppsatte assayet.

Negativ kontroll

I rad D i kolonne, 10, 11 og 12 ble dedikert til negativ kontroll. I kolonne 10 var det kun MHB, i kolonne 11 antibiotika og MHB, og i kolonne 12 er det 0.5% DMSO. Rad E12-H12 ble det fylt med kun rene fraksjoner. Negativ kontroll ble inkludert for å dokumentere at det ikke var vekst i mediene uten tilsatt bakterierinokulat.

Fraksjoner

Rad E til H ble det fylt med Sephadex-fraksjonene. 100 µl av fraksjonene med konsentrasjon 40 mg/ml pipetteres i brønnene E1 til H1, deretter ble 50 µl MHB tilsatt i brønnene E2-E11, F2-F11, G2-G11 og F2-F11. Det ble foretatt en seriefortynning hvor 50 µl av fraksjonene på 40 mg/ml fra E1, F1, G1 og H1 ble overført fra en brønn til neste brønn slik at konsentrasjon av fraksjoner i hver brønn ble halvert for hver fortynning. Det ble blandet godt for hver fortynning ved å pipettere opp og ned med bruk av en multikanal pipette mellom hvert trinn. 50 µl fra E11, F11, G11, H11 ble kastet etter blanding slik at volumet i alle brønnene er 50 µl. Til slutt ble det tilsatt 50 µl av bakterieinokulumet med en konsentrasjon på 1×10^6 cfu/ml til hver brønn slik at et endelig inokulum med tetthet på 5×10^5 cfu/ml ble oppnådd. Sluttkonsentrasjon ble da 200 µg/ml i E1-H1 og videre halvert i de neste brønnene ned til ca. 0.018 µg/ml. 96-brønners platen ble forseglet med (See-through seel) eller parafilm, og deretter ble den inkubert i 37 °C i inkubator overnatten.

Inokulum kontroll

Bakteriesuspensjonen på 1×10^6 cfu/ml ble fortynnet 1000 ganger ned til 1×10^3 cfu/ml. 180 µl MHB ble fylt aseptisk i tre eppendorfer, deretter ble 20 µl av 1×10^6 cfu/ml bakteriesuspensjonen pipettert til først rør for å oppnå en tetthet på 1×10^5 cfu/ml. Suspensjonen ble blandet godt på en whirlmixer, før 20 µl av bakteriesuspensjonen ble overført til nye 180 µl HMB for å oppnå en tetthet på 1×10^5 cfu/ml. Prosessen ble gjentatt ned til en fortynning på 1×10^3 cfu/ml. Deretter ble 50 µl av løsningen 1×10^3 cfu/ml pipettert ut på en LB agarskål, og løsningen ble fordelt med utstrykningsmetoden. Skålene ble til slutt inkubert ved i 37 °C over natt, som er vist i figur 15.

3.10.1 Testing av Sephadex-LH-20 fraksjoner til gråorbarken mot mikroorganismen *E. coli* med bruk av MIC assay.

Fjorten ulike sephadex-fraksjoner (AI-E-D2-S1-14) av gråor ble testet ved bruk av MIC assay mot mikroorganismen *E. coli* i tre parallelle tester. De 14 fraksjonene ble delt inn i tre grupper (S1-S5, S6-S9 og S10-S14) og testet i separate forsøk. Det første forsøket med fraksjoner S1-S5, det andre forsøket med fraksjoner S6-S9 og det tredje med fraksjonert med S10-S14. De to første forsøkene ble gjentatt fire ganger, mens det tredje forsøket med fraksjoner S10-S14 ble gjentatt to ganger.

I alle forsøkene ble en bakteriekonsentrasjon på 5×10^5 cfu/ml benyttet. For å oppnå dette ble en OD på 0,15 benyttet som utregnet tilsvarende 5×10^5 cfu/ml i sluttkonsentrasjon i 96-brønners plate, (se avsnitt overfor om beregning av cfu). OD-verdier for alle forsøkene er gitt i tabell 10 vedlegg B. I det første og andre forsøket av de 14 fraksjonene som ble testet mot mikroorganismen *E. coli* ble fremgangsmetoden som beskrevet over benyttet til skrenning av antimikrobielle aktivitet, men uten inkludering av en negativ kontroll. Ved tredje og fjerde forsøket ble en negativ kontroll inkludert. Ampicillin med en utgangskonsentrasjon på 50 mg/ml ble benyttet til tillagning av en startkonsentrasjon for MIC på 64 µg/ml. En konsentrasjon på 128 µg/ml ampicillin ble klargjort ved å blande 12,8 µl ampicillin med 1 ml MHB i et eppendorfrør. Riktig volum av antibiotika ble beregnet ved hjelp av formelen beskrevet i (kap om antibiotikakontroll.)

3.10.2 Testing av Sephadex-LH-20, flash fraksjoner til gråorbarken mot *S. aureus* mikroorganismen med bruk av MIC assay.

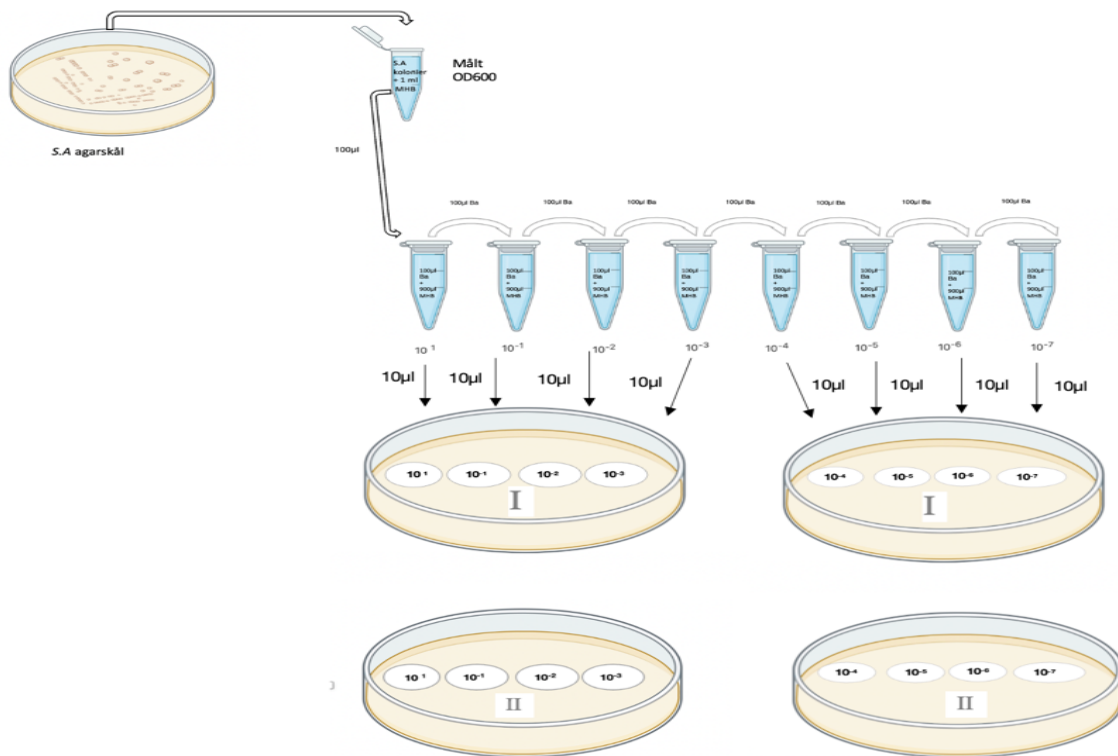
Ni ulike sephadex-fraksjon fra gråorbarken (AI-E-D2-S1-9) ble testet for antimikrobiell aktivitet mot bakterien *S. aureus* ved hjelp MIC assay i to parallelle tester. Det første parallellforsøket med fraksjoner S1-S5 og det andre parallellforsøket med fraksjoner S6-S9. Det første parallelle ble gjentatt tre ganger, mens det andre ble gjentatt to ganger. Det ble benyttet samme fremgangsmetoden som er beskrevet over til skrening av antimikrobielle aktivitet. I alle forsøkene ble en bakteriekonsentrasjon på 5×10^5 benyttet. For å oppnå dette ble en OD tilsvarende 0.0193 benyttet som utregnet tilsvarende 5×10^6 cfu/ml i sluttkonsentrasjon i 96-brønners plate (se kap overfor om beregning av cfu). Målt OD er vist i tabellen 1 Vedlegg D. Kloramfenikol med utgangskonsentrasjon på 34 mg/ml ble benyttet til tillaging av en startkonsentrasjon for MIC på 64 $\mu\text{g/ml}$. Konsentrasjon på 128 $\mu\text{g/ml}$ kloramfenikol ble klargjort ved å blande 18,8 μl kloramfenikol i 1 ml MHB i et eppendorfrør. Riktig volum av antibiotika ble beregnet ved hjelp av formelen beskrevet i (kap om antibiotikakontroll.)

Fire isolerte stoffer av gråor ble testet mot *S. aureus* ved bruk av MIC assay. Disse fraksjoner var hirsutanolol-5-O-B-glukopyranosid (AI-E-D2-S2S3-F1), platyphyllosid (AI-E-D2-S2S3-F5), oregonin (AI-E-D2-S4-F1), og coumaryloregonin (AI-E-D2-S6-F2). Det ble utført tre parallelle forsøk for hver av de de fire stoffene. Forsøkene ble gjennomført som beskrevet over. Tabell 3 i vedlegg D viser målt OD_{600nm}, samt volum av bakterie og MHB som ble blandet.

3.11 Metoden utvikling av OD vs cfu/ml

Tillaging av fortynningsrekke til utvikling av od vs cfu/ml til *S. aureus*.

Først ble enkelte kolonier med mikroorganismen *S. aureus* skrapet fra næringsplaten til 1 ml MHB, deretter ble OD målt. Fortynningsrekke med *S. aureus* ble laget med 100 µl bakterieinokulum i 990 µl MHB ned til 10^{-7} som er vist i figur 16, hvor 10 µl av hver fortynning ble applisert på en petriskål med fire dråper på, og det ble laget to replikanter, A og B. Deretter ble petriskåler vippet etter avsetning, slik at dråpene spredde nedover skålen, så ble det inkubert i 37 °C.



Figur16: Fortynningsrekke fremgangsmetoden av mikroorganismen *S. aureus* som ble benyttet til utvikling av od vs cfu/ml fra 10^1 -ned til 10^{-7} .

Tillaging av bakterieinokulum od vs cfu/ml til *E. coli*

Det ble laget bakteriesuspensjon for *E. coli* som beskrevet tidligere av tillaging av bakteriesuspensjon.

4 Resultater og diskusjon

4.1 Ekstraksjon av gråor

Etter etanolekstraksjon av 750 g gråorbark med ASE instrument, ble utbyttet på 251,07 g (33,5 %). Råekstraktet var brunt i fargen og tørt.

NMR-analyse

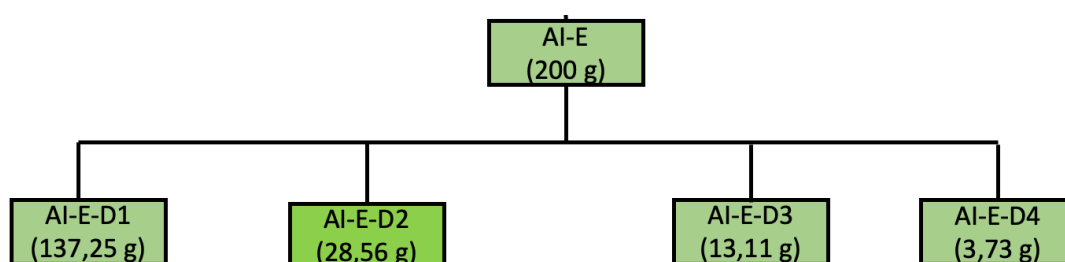
¹H NMR spektre for råekstraktet er vist i figur 1 Vedlegg A. ¹H NMR-spekteret viste en kompleks blanding av signaler, og domineres av intense signaler i det aromatiske området ved 6.3 til 6.7 ppm. I tillegg viste ¹H NMR spektret mange signaler i sukkerområdet fra ca. 2.9-4.2 ppm, samt en del signaler fra alifatiske protoner, ca 1-2,8 ppm.

Anti-mikrobielle tester:

Disc assay viste at råekstraktet ved 1 mg/disc hadde antimikrobiell aktivitet mot mikroorganismen *S. aureus*, imens ingen effekt ble vist mot andre bakteriene, *B. subtilis*, *E. coli*, *P. aeruginosa*, og soppen *C. albicans* (see kap.4.6, s.68)

4.2 Diaion HP-20 kolonne, separasjon av råekstraktet

Fra Diaion HP 20 kolonnen ble det samlet fire fraksjoner. AI-E-D1 var oppsamling av 25% MeOH i dH₂O mobilfasekonsentrasjon, AI-E-D2 var oppsamling av 50% MeOH i dH₂O, AI-E-D3 var oppsamling av 100% MeOH og AI-E-D4 var oppsamling av 100% Acetone. Utbytte av de fire fraksjoner er vist i skjema1, AI-E-D1 var sterk brun farget, AI-E-D2 var enda mer sterk brun farget, AI-E-D3 var lys brun farget, AI-E-D4 var sterkt grønn farget. Totalutbytte av fraksjonene etter Diaion HP-20 kolonnen ble 182,7 g (91,4 %) fra 200 g fordelt på fire fraksjoner.



Skjema1: Utbyttet av fraksjoner etter Diaion HP-20 kolonneseparasjon av råekstraktet.

NMR-analyser:

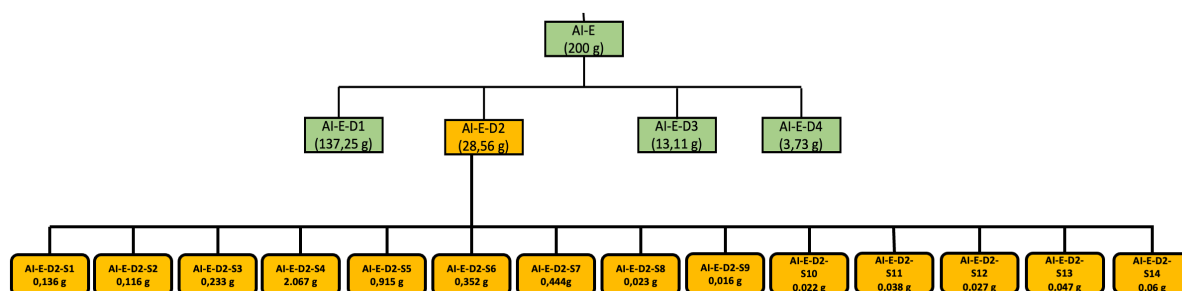
¹H NMR spektre for AI-E-D2 er vist i figur 2 vedlegg A. ¹H NMR-spekteret viste intense signaler i det aromatiske området, i tillegg viste signaler i sukkerområdet. Spektret av AI-E-D2 hadde mange likhets trekk med spektret av råekstraktet.

Anti-mikrobielle tester:

Disc assay viste at fraksjonen AI-E-D2 ved 1 mg/disc hadde høyeste antimikrobiell aktivitet mot *S. aureus*, imens ingen effekt ble vist mot andre bakteriene *B. subtilis*, *E. coli*, *P. aeruginosa*, og soppen *C. albicans* (see kap.4.6, s,68). Basert på dette ble fraksjonen valgt ut for videre fraksjonering.

4.3 Sephadex-LH-20, fraksjonering av AI-E-D2

Fraksjonering av fraksjon AI-E-D2 på Sephadex kolonnen ga et totalutbytte på 4,49 g (64,2 %) fordelt på 14 fraksjoner, hvor alle hadde sterk brun farge og solide i form. Utbytte av alle fraksjoner er vist i skjema 2.



Skjema 2: Utbytte av fraksjoner etter sephadex LH-20 kolonneseparasjon av AI-E-D2

NMR-analyse

^1H NMR spektre for fraksjonen AI-E-D2-S2 er vist i figur 3 vedlegg A. En del signaler har forsvunnet i det aromatisk område sammenlignet med Diaion HP-20 fraksjonen AI-E-D2 og hovedkomponenten har blitt betydelig renere. ^{13}C NMR-spektret er vist i figur 4 vedlegg A. Det betraktes innhold av en hovedkomponent, men fraksjonen er uren.

^1H NMR spektre for fraksjonen AI-E-D2-S3 er vist i figur 5 vedlegg A, og ^{13}C NMR-spektret er vist i figur 6 vedlegg A. Denne fraksjonen ligner på fraksjonen AI-E-D2-S2, derfor ble fraksjonene slått sammen og betegnet AI-E-D2-S2S3.

^1H NMR spektre av AI-E-D2-S4 (figur 7 vedlegg A), viste flere signaler som stemmer med signaler til naturstoffet oregonin (51), i tillegg litt signaler fra andre komponenter.

^1H NMR spektret viste signaler i diarylheptanoid delen med signaler, δ_{H} , 1.73-4.10, i tillegg signaler i det aromatiske område, δ_{H} 6.50-6.66 samt signaler fra xylosedelen, δ_{H} , 3.3-4.22. ^{13}C NMR-spektret er vist i figur 8 vedlegg A, den viste signaler til oregonin i tillegg noen mindre signaler fra andre stoffer.

^1H NMR spektre til fraksjonen AI-E-D2-S6 er vist i figur 9 vedlegg A. Spektret viste flere signaler i det aromatisk område samt i sukkerdelen som er typisk for diarylheptanoider. Spektret

viste i tillegg signaler ved, δ_H 7.62, 7.39, 6.78, 6.29. Signalene ved δ_H 7.62 og δ_H 6.29 hadde en koblingskonstant på $J=15.8$ Hz, noe som tyder på tilstedeværelse av coumaryldelen i et diarylheptanoid.

Anti-mikrobielle tester:

Basert på resultatene fra MIC assay samt NMR-resultater, ble fraksjonene AI-E-D2-S4, AI-E-D2-S2S3, og AI-E-D2-S6 valgt for opprensning med flash kromatografi. MIC assay av Sephadex-fraksjonene fra gråor viste at fraksjonen AI-E-D2-S2S3 hadde antimikrobiell aktivitet mot *S. aureus*. (see kap 4.7.5, s.76)

4.4 Isolering av diarylheptanoider med flash kolonne kromatografi.

Fraksjonene AI-E-D2-S2S3, AI-E-D2-S4 og AI-E-D2-S6 ble renset opp på en omvendt fase C18 Biotage flash kolonne med MeOH-vann gradient som mobilfase, og fraksjonene samlet opp basert ved (280 nm). Utbytte og identifiserte innholdsstoffer er vist i tabell 11. Flash metoden med en gradienteluering med økende konsentrasjon av metanol i vann vist seg å være en effektiv og egnet metode for å isolere diarylheptanoider fra gråorbark, og de fem stoffene er oregonin, hirsutanolol 5-O-B-glycopyranoside, platyphylloside, coumaryloregonin, alnuside A eller B ble isolert. De isolerte stoffene ble identifisert ved å sammenligne NMR spektrene med litteraturverdier, see beskrivelse i kap 4.5.1-4.5.5.

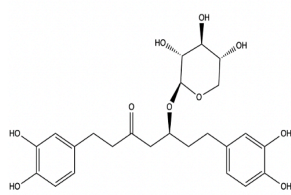
Tabell 11: Utbytte og identifiserte stoffer etter C18 flash kromatografi av AI-E-D2-S2S3, AI-E-D2-S4 og AI-E-D2-S6.

	AI-E-D2-S2S3 (349 mg)		AI-E-D2-S4 (500mg)		AI-E-D2-S6 (335 mg)	
F1	18 mg	Hirsutanolol-5-O-B-glucopyranosid (2)	166 mg	Oregonin (1)	22 mg	--
F2	16 mg	--	20 mg	--	112 mg	Coumaryloregonin (4)
F3	16 mg	--	34 mg	--	1mg	--
F4	6 mg	--			56 mg	Oregonin (1)
F5	178 mg	Platyphyllosid (3)			1 mg	Alnusid A eller B
Utbyttet	234 mg (67 %)		220 mg (44%)		192 mg (57 %)	

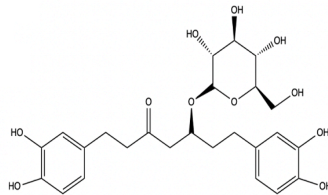
--ikke identifisert

4.5 Karakterisering naturstoffer fra gråor etanolekstraktet

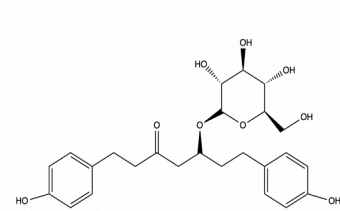
Molekylstruktur av identifisert naturstoffer i gråorbarken



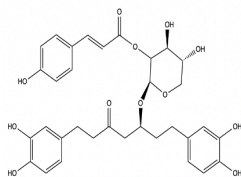
1.Oregonin



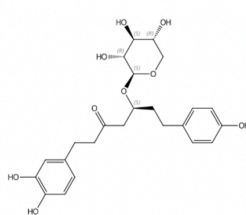
2.Hirsutanolol-5-O-B-glucopyranosid



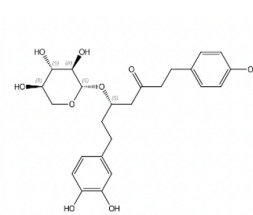
3.Platyphylloside



4.Coumaryloregonin



5.Alnuside B

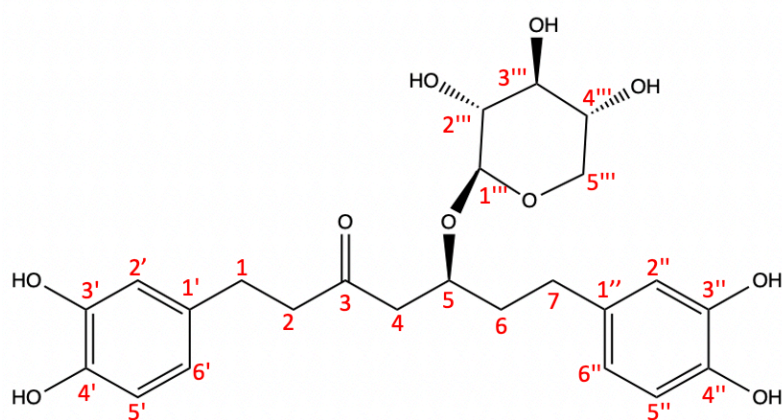


5.Alnuside A

Figur 17: Molekylstrukturer av identifiserte naturstoffer i gråorbarken.

4.5.1 Naturstoff 1: AI-E-D2-S4-F1 Oregonin

Oregonin ble isolert i fraksjonene AI-E-D2-S4-F1 og AI-E-D2-S6-F4 med flash kromatografi, 166 mg og 56 mg ble i utbyttene. Fraksjonene var brun-farget og fast i form. Molekylstruktur for oregonin (figur 18) ble bekreftet med ^1H og ^{13}C NMR og 2D spektra, og sammenlignet med data fra litteratur (51) (52). Tabellen (12) viser ^1H og ^{13}C NMR-verdier sammenlignet med referansedata for oregonin, og NMR-spektrene for AI-E-D2-S4-F1 er vist i vedlegg A figur 10,11,12,13 og 14. ^1H NMR spektret til AI-E-D2-S6-F4 er også vist i figur 20 vedlegg A.



1. Oregonin

Figur 18: Naturstoff 1 molekylstruktur med plasseringsnummer i rødt.

Tabell 12: NMR Spektroskopiske data av ^1H -NMR-verdier for naturstoff 1 [400 MHz, CD_3OD , (δ i ppm, J i Hz)] sammenlignet med referansedata for Oregonin [300 MHz, CD_3OD , (δ i ppm, J i Hz)], og ^{13}C -NMR-verdier for naturstoff 1 [100 MHz, CD_3OD , (δ i ppm)] sammenlignet med referansedata for Oregonin [100 MHz, CD_3OD , (δ i ppm)]

Posisjon	Kjemisk skift δ_{H} CD_3OD i ppm (Integral, multiplisitet, koblingskonstant J)		Kjemisk skift δ_{C} CD_3OD i ppm	
	Naturstoff 1	Litteratur (51)	Naturstoff 1	litteratur (52)
Diarylhept				
1	2.7 (m*)	2.35-2.50 (m)	30.07	29.90
2	2.7 (m*)	2.35-2.50 (m)	46.41	46.3
3			211.89	212
4	2.56 (dd, J=16.7, 5.2)	2.35-2.50 (m)	48.73	48.6
	2.77 (dd, J=16.7, 6.8)			
5	4.10 (tt, J=6.8, 5.2)	4.05 (m)	76.32	76.3
6	1.73 (m*)	1.65-1.78 (m)	38.58	38.4
7	2.50 (m*)	2.35-2.50 (m)	31.73	31.6
1', 1''			134.02 (1'), 135.14 (1'')	134.0 (1'), 135.1 (1'')
2', 2''	6.61 (d, J=2.2), 6.62 (d, J=2.2)	6.54-6.63 (m)	116.52 (2'), 116.59 (2'')	116.3 (2'), 116.5 (2'')
3', 3''			146.01 (3'), 146.10 (3'')	145.8 (3'), 145.9 (3'')
4', 4''			144.12 (4'), 144.39 (4'')	144.0 (4'), 144.2 (4'')
5', 5''	6.65 (d, J=8.0), 6.66 (d, J=8.0)	6.42 (dd, J= 2.8)	116.25 (5'), 116.37 (5'')	116.3 (5'), 116.5 (5'')
6', 6''	6.50 (m*)	6.54-6.63 (m)	120.59 (6'), 120.68 (6'')	120.6 (6'), 120.7 (6'')
xylose				
1'''	4.22 (d, J=7.5)	4.15 (d, J=7.6)	104.27	104.1
2'''	3.13 (m*)	3.24*	75.08	75
3'''	3.3 (m*)	3.1 (t, J=8)	77.86	77.7
4'''	3.50 (m*)	3.45 (m)	71.24	71.1
5'''	3.17 (m*)	3.8 (dd, J=5.11)	66.93	66.8
	3.86 (dd, J=11.4, 5.4)			

*overlappende signaler

NMR strukturoppklaring:

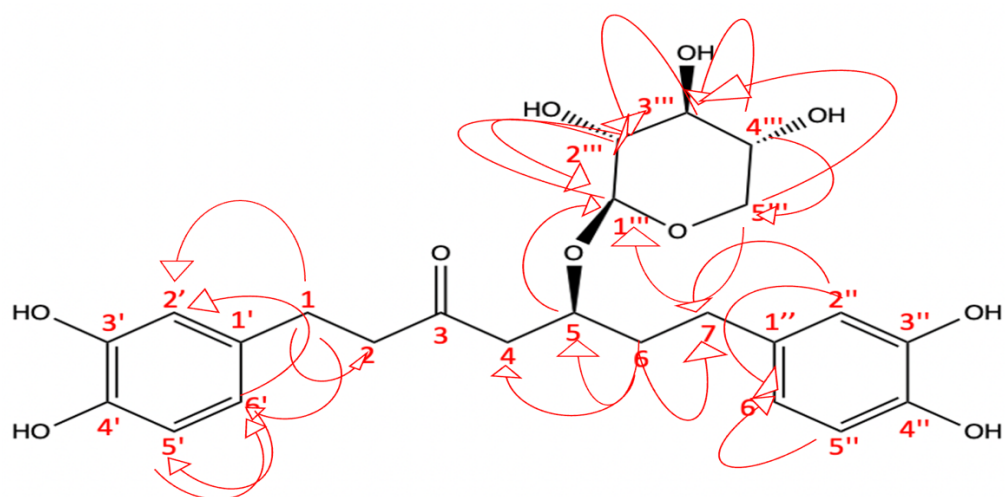
^1H NMR og ^{13}C NMR spektrene viste signaler for diarylheptanoidet (51) (52). I det aromatiske område viste flere signaler fra de to trisubstituerte benzen ringene. Basert på koblingskonstaten og kjemiske skift ble protonene H-2' og H-2'' (δ_{H} 6.61, 6.62) med koblingskonstanten 2.2 Hz, og dermed i meta posisjon til H-6' og H-6''. H-5' og H-5'' (δ_{H} 6.65, 6.66) med koblingskonstanten 8 Hz ble plassert i nabostilling til H-6'/ H-6''. Signalene for H-6'/ H-6'' var overlappet, og det var ikke mulig å beregne koblingskonstant for disse protonene. ^1H NMR viste også signaler fra en xylopyranosyl gruppe, som er bundet til sp^2 karbonet C-5 og med et anomert proton δ_{H} 4.22 med en koblingskonstant 7.5 Hz som indikerer B-konfigurasjon. Sukkersignalene for H-2''', H-3''', H-4''' og H-5''' var overlappende og integral kunne ikke markeres.

COSY-spektret (figur 19) viste i posisjon H-5''' (δ_{H} 3.17) kobling til H-5''' (δ_{H} 3.86), og viste kobling også fra H-5''' til nabo signal i posisjon H-4''' (δ_{H} 3.50) som igjen koblet videre til H-3''' (δ_{H} 3.30), fulgt av H-2''' (δ_{H} 3.13) deretter H-1''' (δ_{H} 4.22).



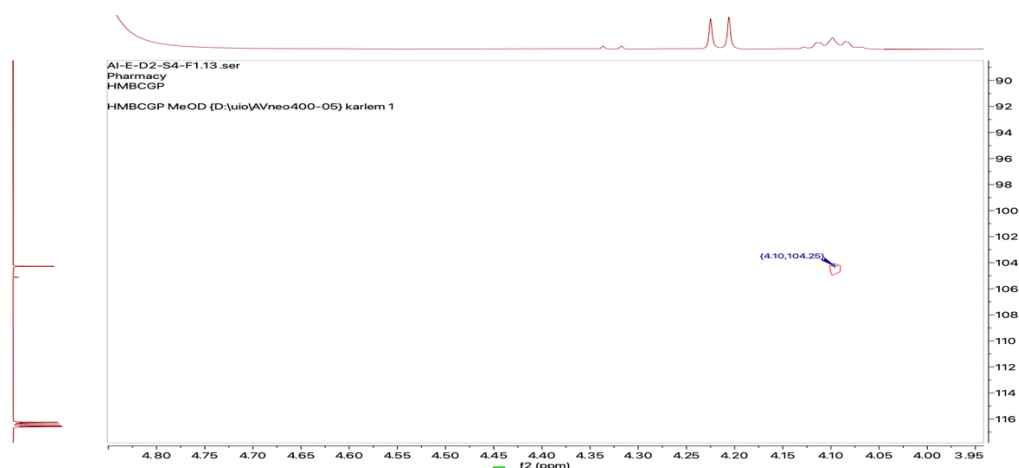
Figur 19: utklipp av COSY-spektret for naturstoff 1 til sukke-rområde

Cosy-spektret viste også koblinger fra H-7 (δ_{H} 2.50) koblet til H-6 (δ_{H} 1.73) som igjen koblet til H-5 (δ_{H} 4.10), fulgt av H-4 (δ_{H} 2.56) deretter H-4 (δ_{H} 2.77).



Figur 20: Utvalgte HMBC-koblinger for naturstoff 1.

Det ble benyttet HMBC-spektret for å bekrefte substitusjonsmønsteret, figur 21 viser utvalgte HMBC koblinger i molekylet.



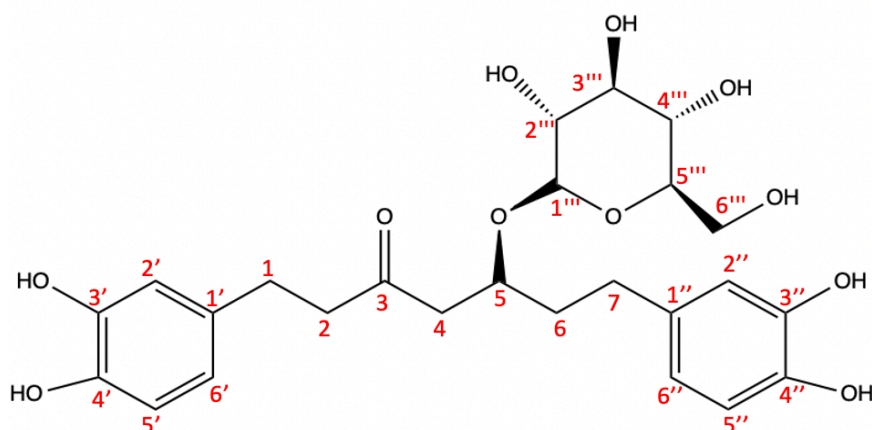
Figur21: krysstopp mellom H-5 (δ_H 4.10) og C-3''' (δ_C 104.2)

HMBC spektret viser krysstopp (figur 21) mellom H-5 (δ_H 4.10) og C-3''' (δ_C 104.2) og viser at xylosen er bundet til aglykonet i posisjon C-5. Figuren 20 viste i den ene trisubstituerte benzen ringen kobling H-5' (δ_H 6.65) til nabo C-6' (δ_C 120.59) i orto posisjon og H-2' (δ_H 6.61) er koblet til C-6' (δ_C 120.59) som er i meta posisjon. I den andre trisubstituerte benzen ringen, kobling fra H-5'' (δ_H 6.66) til nabo C-6'' (δ_C 120.68) i orto posisjon og H-2'' (δ_H 6.62) er koblet til C-6'' (δ_C 120.69) som er i meta posisjon. Videre var det kobling mellom C-1 og C-7 i heptankjeden og de aromatiske protonene H-2'/H-2'' og H-6'/H6''.

Tidligere funn av naturstoffet 1: Oregonin er en forbindelse som tidligere er blitt indentifisert i gråorbarken (16) og andre alnus arter som *Alnus glutinosa* (17).

4.5.2 Naturstoff 2: AI-E-D2-S2S3-F1 Hirsutanolol 5-O-B-glucopyranosid

Hirsutanolol 5-O-B-glucopyranosid ble isolert i fraksjonen AI-E-D2-S2S3-F1 med flash kromatografi, 18 mg ble i utbyttet. Fraksjonen var brun-farget og fast i form. Molekylstruktur for hirsutanolol 5-O-B-glucopyranosid (figur 22) ble bekreftet med ^1H NMR spektret sammenlignet med data fra litteratur (23). Tabellen 13 viser ^1H NMR verdier sammenlignet med referansedata for hirsutanolol 5 -O-B-glucopyranosid. NMR-spektret for forbindelsen er vist i figur 15 vedlegg A.



Figur 22: Naturstoff 2 molekylstruktur med plasseringsnummer i rødt

Tabellen 13: NMR Spektroskopiske data av ^1H -NMR-verdier for naturstoff 2 [400 MHz, CD_3OD , (δ i ppm, J i Hz.] sammenlignet med referansedata for Hirsutanolol-5-O-B-glucopyranosid [500 MHz, CD_3OD , (δ i ppm, J i Hz]

Posisjon	Kjemisk skift i δH CD_3OD i ppm (Integral, multiplisitet, koblingskonstant J)	
	Naturstoff 2	litteratur (23)
Diarylhept		
1	2.70 (m)	2.70-2.72
2	2.70 (m)	2.70-2.72
3		
4	2.78 (dd, J=6.7, 16.6)	2.78-2.81
	2.57 (m*)	2.56-2.60
5	4.17 (m)	4.16-4.18
6	1.82-1.70 (m)	1.73-1.85
7	2.54 (m*)	2.54
1', 1''		
2', 2''	6.61(d, J=2.1), 6.68 (d, J=2.1)	6.62,6.69
3', 3''		
4', 4''		
5', 5''	6.65 (d, J=8.0), 6.65 (d, J=8.0)	6.65,6.67
6', 6''	6.48 (dd, J=2.1, 8.2), 6.50 (dd, J=2.4, 8.4)	6.50
Glukose		
1'''	4.28 (d, J=7.9)	4.29
2'''	3.15 (dd, 7.7,8.8)	3.15
3'''	3.2-3.4*	3.25-3.35
4'''		
5'''		
6'''	3.89 (dd, J=2.2, 11.9)	3.88-3.90
	3.71 (dd, J=5.3, 11.9)	3.69-3.73

* Overlappende signaler

NMR strukturoppklaring

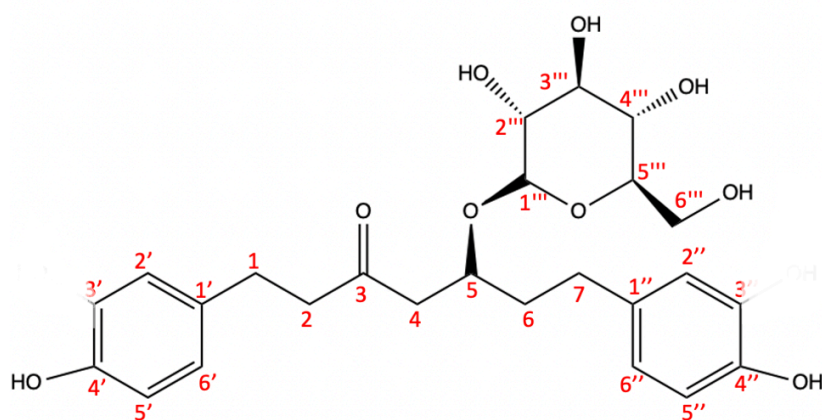
^1H NMR-spekteret viste signaler for diarylheptanoidet (23). I det aromatiske område viste flere signaler fra de to trisubstituerte benzen ringene. Basert på koblingskonstaten og kjemiske skift ble protonene H-2' og H-2'' (δ_{H} , 6.61-6.68) med koblingskonstaten 2.1 Hz, og dermed i meta posisjon til H-6' og H-6'' (δ_{H} , 6.48, 6.50). H-5' og H-5'' (δ_{H} , 6.65) med konblingskonstanten 8 Hz ble plassert i nabostilling H-6' og H-6'' (δ_{H} , 6.48, 6.50). Spektret viste også signalene for posisjon H-6' og H-6'', dublett av dublett (δ_{H} 6.48) med koblingskontantene på, (2.1, 8.2), og (δ_{H} 6.50) med koblingskonstantene (2.4, 8.4).

I tillegg viste ^1H NMR signaler i glycopyranosyl gruppe, som er bundet til sp^2 karbonet C-5 og med et anomert proton δ_{H} , 4.28 med en koblingskonstant 7.9 Hz som indikerer B-konfigurasjon. Sukker signaler for H-3''', H-4''' og H-5''' var overlappende og integral kunne ikke beregnes. I posisjon H-6''' viste to dubletter av dubletter, i den ene protonet (δ_{H} , 3.89) med koblingskonstantene (2.2, 11.9) Hz og i den andre protonet (δ_{H} , 3.71) med koblingskonstantene (5.3, 11.9) Hz. Videre viste spektret signaler i heptan kjeden C1-C7 (δ_{H} , 1.70-2.78) og i posisjon H-5 (δ_{H} , 4.17) er skjermet av O-glycopyranose i C-5.

Tidligere funn av naturstoffet 2: Hirsutanolol 5-O-B-glycopyranosid er en forbindelse som tidligere er blitt identifisert i gråorbark (16) og i andre alnus arter som *Alnus glutinosa* (17).

4.5.3 Naturstoff 3: AI-E-D2-S2S3-F5 Platyphylloside

Platyphylloside ble isolert i fraksjonen AI-E-D2-S2S3-F5 med flash kromatografi, 178 mg ble utbyttet. Fraksjonen var brun-farget og fast i form. Figur 23 viser molekylstruktur for platyphylloside strukturen ble bestemt basert på ^1H og ^{13}C NMR-spektre, og ved sammenligning med NMR-data fra litteraturen. Tabellen 14 viser ^1H og ^{13}C NMR-verdier sammenlignet med referansedata for platyphylloside og NMR-spektrene for forbindelsen er vist i figur 16 og 17 vedlegg A.



Figur 23: Naturstoff 3 molekylstruktur med plasseringsnummer i rødt

Tabell 14: NMR Spektroskopiske data av ^1H -NMR-verdier for naturstoff 3 [400 MHz, CD_3OD , (δ i ppm, J i Hz.) sammenlignet med referansedata for Platyphylloside [500 MHz, CD_3OD , (δ i ppm, J i Hz)], og ^{13}C -NMR-verdier for naturstoff 3 [100 MHz, CD_3OD , (δ i ppm)] sammenlignet med referansedata for Platyphylloside [101MHz, CD_3OD , (δ i ppm)]

Posisjon	Kjemisk skift i δH CD_3OD i ppm (Integral, multiplisitet, koblingskonstant J)		Kjemisk skift δC CD_3OD i ppm	
	Naturstoff 3	Litteratur (23)		Litteratur (53)
Diarylhept				
1	2.74 (s)	2.74	29.87	29.8
2	2.74 (s)	2.74	46.47	46.3
3			211.91	211.9
4	2.80 (dd, J=16.6, 6.8)	2.74-2.82	48.75	48.7
5	4.16 (m)	4.16	76.28	76.7
6	1.67-1.77 (m)	1.74-1.83	38.57	38.4
7	1.79-1.89 (m)	2.57-2.60	31.48	31.4
1', 1''			133.27, 134.38	133.2, 134.3
2', 2'', 6', 6''	7.01 (d, J=8.5), 6.99 (d, J=8.5)	6.98-7.02	130.37, 130.47	130.3, 130.4, 130.3, 130.4
3', 3'', 5', 5''	6.67 (d, J=8.5), 6.67 (d, J=8.5)	6.67-6.69	116.10, 116.22	116.0, 116.1, 116.0, 116.1
4', 4''			156.35, 156.63	156.1, 156.4
Glukose				
1'''	4.28 (d, J=7.8)	4.29	103.51	103.3
2'''	3.14 (dd, J=9.1, 7.7)	3.16	75.27	75.1
3'''	3.2-3.4*	3.25-3.34	78.10	77.9
4'''	3.2-3.4*	3.25-3.34	71.64	71.5
5'''	3.2-3.4*	3.25-3.34	77.89	77.7
6'''	3.86 (dd, J=11.8, 2.3)	3.85-3.88	62.80	62.7
	3.70 (dd, J=11.8, 5.3)	3.69-3.72		

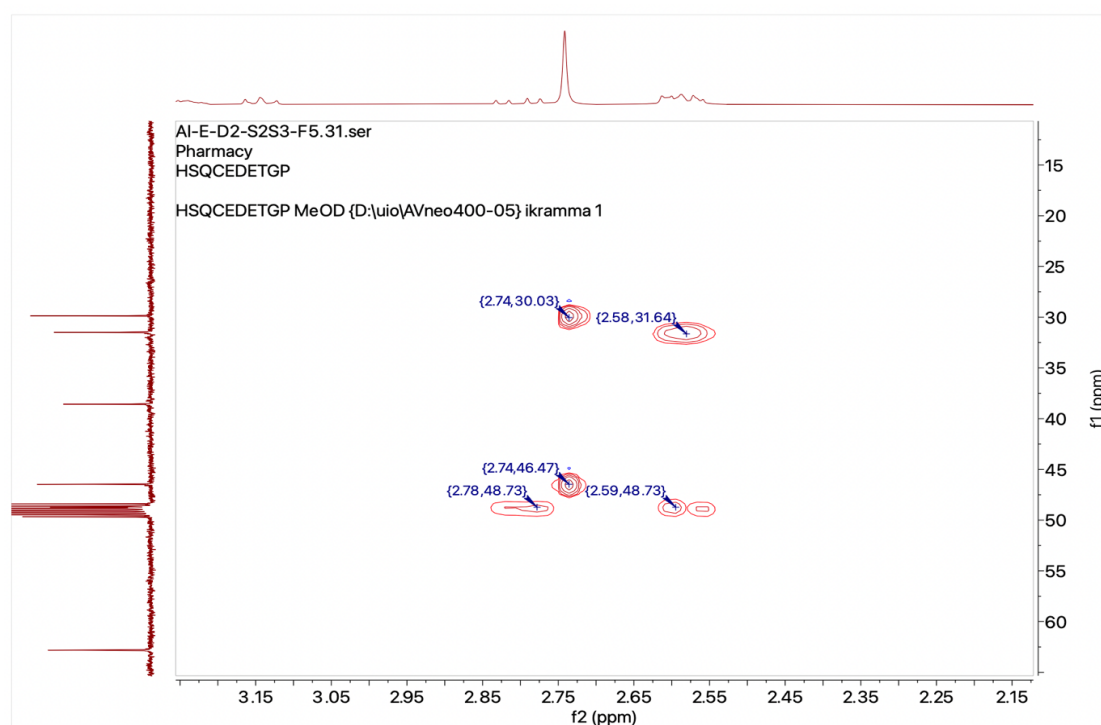
*Overlappende signaler

NMR strukturoppklaring:

^1H NMR og ^{13}C NMR spektrene viste karakterisert signaler for diarylheptanoidet platyphylloside (23) (53). I det aromatiske område signaler ble det observert fra de to 1,4 di substituerte benzenringene, og basert på koblingskonstaten og kjemiske skift ble protonene H-2', H-2'', H-6', H-6'' identifisert med verdier på henholdsvis (δH 7.01, 6.99). På grunn av symmetri var H-2' og H-6' identiske, det samme med H-2'' og H-6''. Spektret viste også dubletter for H-3', H-3'', H- 5', og H-5'' med verdi (δH 6.67), dublettene overlappet. ^1H NMR

vite signaler fra en glycopyranosyl gruppe som er koblet til sp^2 karbonet C-5 og med et anomert proton δ_H , 4.28 med et koblingskonstant 7.8 Hz. Sukker signaler for H-3''', H-4''' og H-5''' var overlappende og integral kunne ikke beregnes. I tillegg viste spektret dublett av dublett i posisjon H-6''', den ene protonet δ_H , 3.86 med koblingskonstanten (2.3, 11.8) Hz og den andre protonet δ_H , 3.70 med koblingskonstanten (5.3, 11.8) Hz.

Ved hjelp av HSQC-spektret som viser hvilken protonsignalene i 1H NMR-spektret koblet til karbonsignalene i ^{13}C NMR-spektret. Spektret (figur 24) viste at protonene H-1 og H-2 (δ_H 2.74) er koblet til ulike karboner δ_C 30.03, 46.47.



Figur 24: utklipp av av HSQC-spekteret for naturstoff 3, markert kobling i H-1 og H-2 (δ_H 2.74, δ_C 30.03.) og (δ_H 2.74, δ_C 46.47) og H-4 (δ_H 2.78, δ_C 48.73), (δ_H 2.59, δ_C 48.73) samt H-7 (δ_H 2.58, δ_C 31.64).

Tidligere funn av naturstoffet 3: Platyphyllaside er en forbindelse som tidligere er blitt identifisert i gråorbark (16) og i andre alnus arter som *Alnus glutinosa* (17).

Tabell 15: NMR Spektroskopiske data av ¹H-NMR-verdier for naturstoff 4 [400 MHz, CD₃OD, (δ i ppm, J i Hz)] sammenlignet med referansedata for Coumaroyloregonin [400 MHz, CD₃OD, (δ i ppm, J i Hz)], og ¹³C-NMR-verdier for naturstoff 4 [100 MHz, CD₃OD, (δ i ppm)] sammenlignet med referansedata for coumaroyloregonin [101MHz, CD₃OD, (δ i ppm)]

Posisjon	Kjemisk skift i δH CD ₃ OD i ppm (Integral, multiplisitet, koblingskonstant J)		Kjemisk skift δC CD ₃ OD i ppm	
	Naturstoff 4	Litteratur (54)		Litteratur (54)
Diarylhept				
1	2.56 (m*)	2.56 (m)	30.04 ^S	30.1
2	2.56 ^S (m*)	2.50 (m), 2.57 (m)	46,48 ^S	46.3
3			210,99	211.0
4	2.42 ^S (m), 2.61 ^S (m*)	2.40 (m), 2.62 (m)	49.06	49.8
5	4.06 (m)	4.07 (m)	77,02	77.0
6	1.72 ^S (m*)	1.69 (m), 1.76 (m)	38.42 ^S	38.5
7	2.47 (m*)	2.47 (m)	31,6	31.6
1'			133,8	133.8
2'	6.54 (d, J=2.1)	6.52 (d, J=2.0)	116,25	116.25
3'			146,00	146.0
4'			144,1	144.1
5'	6.61 (m*)	6.60 (d, J=8.0)	116,44	116.4
6'	6.30 (d, J=2.1)	6.30 (dd, J= 2.0,8.0)	120,47	120.5
1''			135,08	135.1
2''	6.61 (m*)	6.60 (d, J=2.0)	116,34	116.34
3''			146,05	146.1
4''			144,35	144.4
5''	6.65 (d, J=8.0)	6.64 (d, J=8.0)	116,57	116.6
6''	6.47 (dd, J=2.1, 8.0)	6.46 (dd, J=2.0,8.0)	120,53	120.7
Xylose				
1'''	4.48 (d,7.8)	4.47 (d, J=7.9)	103,08	103.1
2'''	4.75 (m*)	4.74 (dd, J=8.0,8.9)	75,27	75.3
3'''	3.53 (m*)	3.52 (t, J=9.0)	76,19	76.2
4'''	3.58 (m)	3.58 (m)	71,33	71.3
5'''alfa	3.25 (m*)	3.23 (dd, J=10.1,11.5)	66,9	66.9
5'''beta	3.92 (dd, J=5.19,11.44)	3.91 (dd, J=5.2,11.5)	66.9	
O-p-Coumaryl				
1''''			168,35	168.3
2''''	6.30 (d, J=15.8)	6.29 (d, J=15.9)	146,89	146.9
3''''	7.62 (d, J=15.8)	7.61 (d, J=15.9)	115,23	115.2
4''''			127,08	127.1
5''''	7.39 (d, J=8.7)	7.38 (d, J=8.6)	131,24	131.2
6''''	6.78 (d, J=8.63)	6.77 (d, J=8.6)	116,86	116.9
7''''			161,2	161.2

8'''	6.78 (d, J=8.63)	6.77 (d, J=8.6)	116,86	116.9
9'''	7.39 (d, J=8.75)	7.38 (d, J=8.6)	131,24	131.2

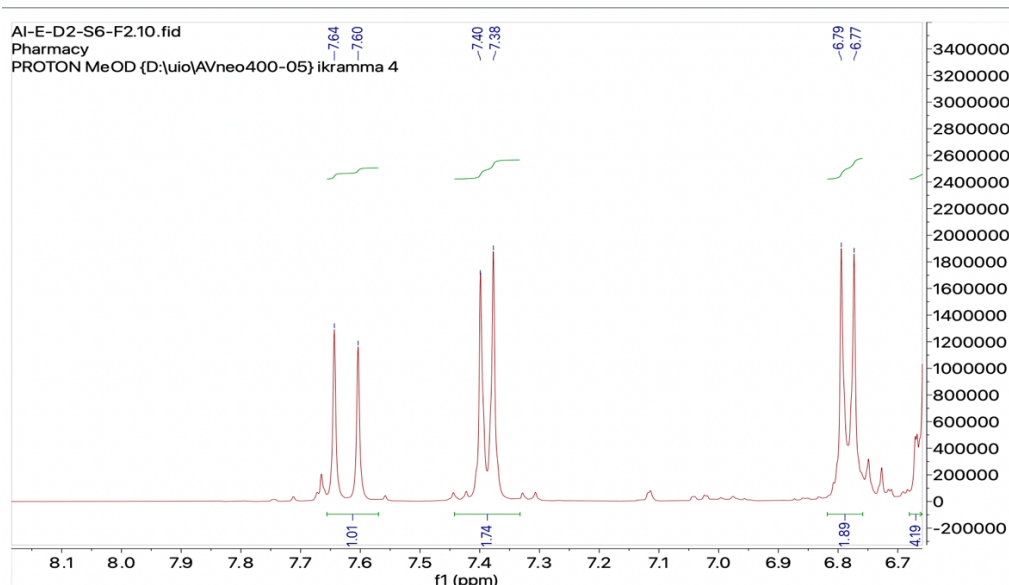
* Overlappende signal, S: signaler med HSQC

NMR strukturoppklaring

^1H NMR og ^{13}C NMR-spektrene viste karakteristiske signaler for diarylheptanoidet coumaryloregonin (54). I det aromatiske område viste flere signaler fra de to trisubstituerte benzen ringene. Basert på koblingskonstanten og kjemiske skift ble protonene H-2' og H-2'' (δ_{H} , 6.54, 6.61) med koblingskonstanten 2.1 Hz, og dermed i meta posisjon til H-6' og H-6'', det ble observert en dublett av dublett på H-6'' (δ_{H} 6.47) med koblingskonstantene (2.1, 8.0) Hz og en dublett på H-6' (δ_{H} 6.30) med koblingskonstanten 2.1 Hz. H-5'' (δ_{H} , 6.65) med koblingskonstanten 8 Hz ble plassert i nabostilling til H-6'', mens for H-5' (δ_{H} , 6.61) integralet kunne ikke regnes.

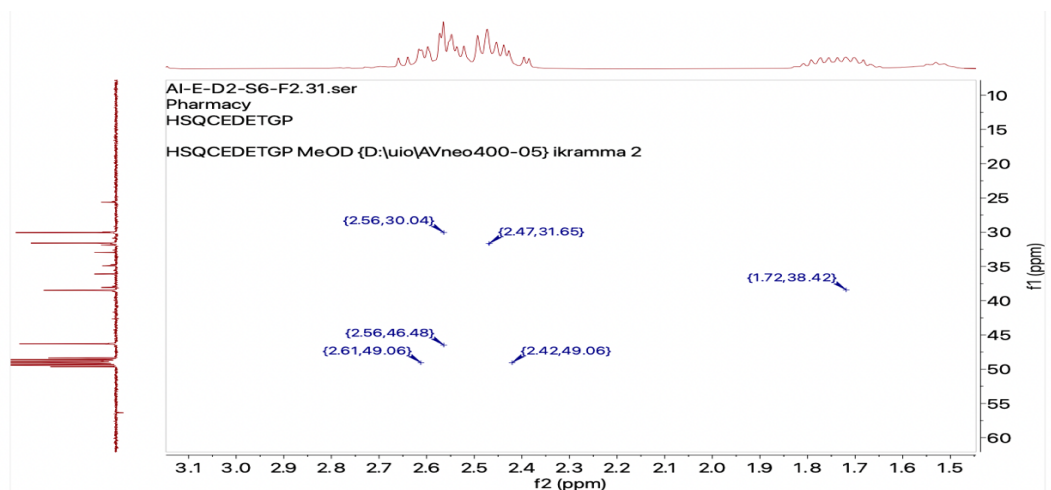
^1H NMR viste også signaler fra en xylopyranose gruppe, som er bundet til sp^2 karbonet C-5 og med et anomert proton δ_{H} , 4.48 med en koblingskonstant 7.8 Hz som indikerer B-konfigurasjon. Sukker signaler for H-2''', H-3''' og H-5''' alfa var overlappende og integral kunne ikke regnes. H-5''' beta (δ_{H} , 3.92) viste en dublett av dublett. Spektret viste også signaler fra en xylosepyranose gruppe H-2'''' (δ_{H} , 4.75) er koblet til O-coumaryl gruppe på en sp^2 karbonet C-1'''. I tillegg viste spektret (figur 26) i posisjon H-2'''' (δ_{H} , 6.30) og H-3'''' (δ_{H} , 7.62) med koblingskonstanten på 15.8 Hz som tyder på at disse to protonene befinner seg på en dobbeltbinding i trans-posisjon.

I den aromatiske ringen på coumaryl delen, viste den symmetriske 1.4 di-substituerte benzenringensignaler fra H-5''''/H-9'''' (δ_{H} 7.39) og H-6''''/H-8'''' (δ_{H} 6.78) som sitter i orto posisjon til hverandre med koblingskonstanten 8.7 Hz



Figur 26: Utklippet av $^1\text{H-NMR}$ -spekteret for naturstoff 4, merket signaler i coumaryl gruppen med δ_{H} 7.62 i posisjon H 3^{'''} som sitter i trans i forhold til H 2^{'''}, og i posisjon H-5^{'''} og H-9^{'''} med signaler δ_{H} 7.39 og i posisjon H-6^{'''} og H-8^{'''} δ_{H} 6.78.

Det ble benyttet HSQC-spekteret for å identifisere direkte kobling mellom hvilket proton som kobler til hvilket karbon. I den alifatiske kjeden (figur 27) ble det observert kobling mellom protonene H-1 og H-2 (δ_{H} 2.56, δ_{C} 46.48), (δ_{H} 2.56, δ_{C} 30.04), og H-4 (δ_{H} 2.42, δ_{C} 49.06), (δ_{H} 2.61, δ_{C} 49.06), samt H-6 (δ_{H} 1.72) er koblet til (δ_{C} 38.42) og H-7 (δ_{H} 2.47) er koblet til (δ_{C} 31.06).

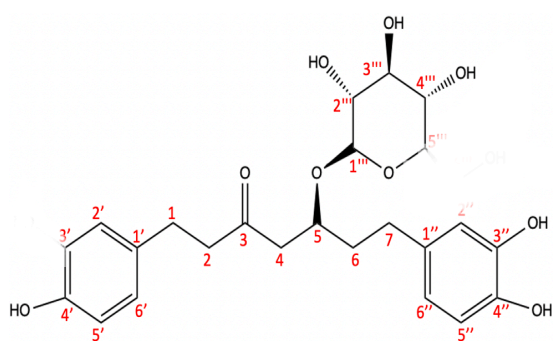


Figur 27: utklipp av av HSQC-spekteret for naturstoff 4, markert kobling i H-1, og H-2 (δ_{H} 2.56, δ_{C} 46.48), (δ_{H} 2.56, δ_{C} 30.04), og H-4 (δ_{H} 2.42, δ_{C} 49.06), (δ_{H} 2.61, δ_{C} 49.06), samt H-6 (δ_{H} 1.72) er koblet til (δ_{C} 38.42) og H-7 (δ_{H} 2.47) er koblet til (δ_{C} 31.06).

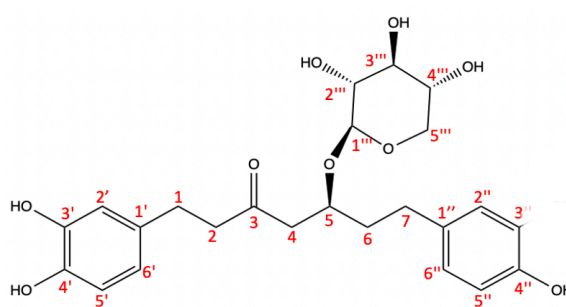
Tidligere funn av naturstoff 4: Coumaryloreгонin har tidligere ikke blitt identifisert i gråor, men det har blitt påvist i *Alnus formosana* (54).

4.5.5 Naturstoff 5: AI-E-D2-S6-F5 Alnuside A eller B.

Alnusider A eller B ble isolert i fraksjonen AI-E-D2-S6-F5, 1 mg ble utbyttet. Fraksjonen var brun-farget. Figur (28) og (29) viser molekylstruktur som ble brukt til definering av ^1H og ^{13}C NMR-spektre, og til sammenligning av NMR-data fra litteraturen. Tabellen 16 viser ^1H og ^{13}C NMR-verdier sammenlignet med referansedata for Alnuside A og B. NMR-spektrene for forbindelsene er vist i figur 21 og 22 vedlegg A.



Figur 28: Alnuside A



Figur 29: Alnuside B

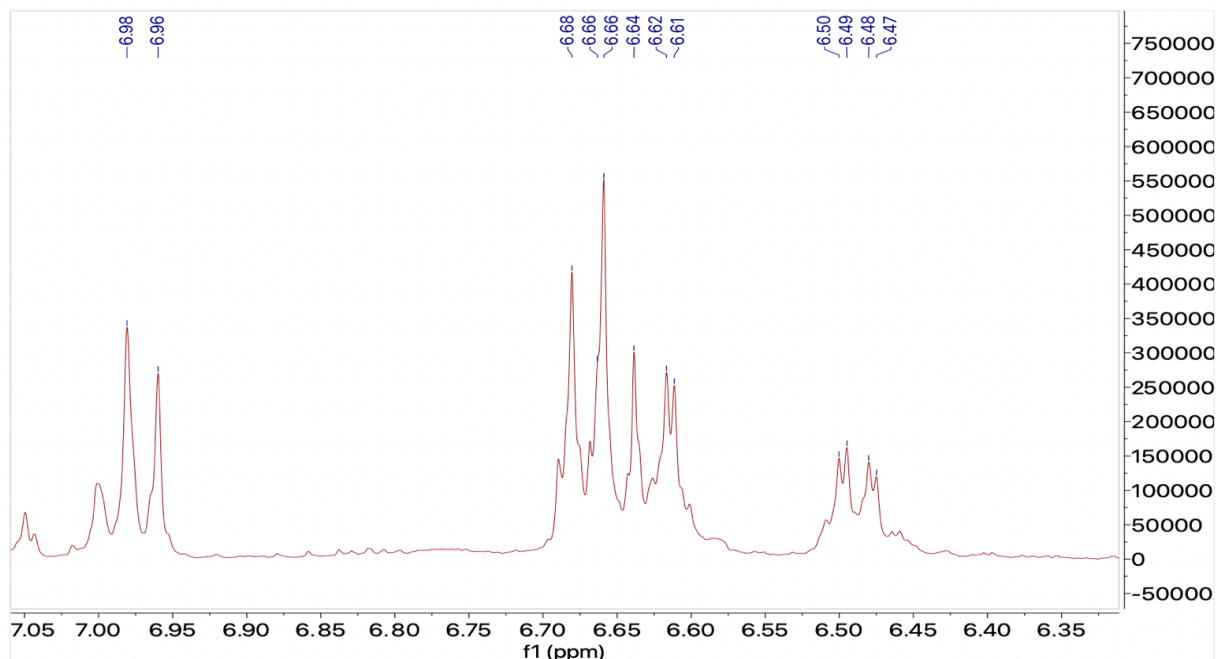
Tabell 16: NMR Spektroskopiske data av ^1H -NMR-verdier for naturstoff 5 [400 MHz, CD_3OD , (δ i ppm, J i Hz.] sammenlignet med referansedata for Alnuside A eller B [400 MHz, CD_3OD , (δ i ppm, J i Hz)], og ^{13}C -NMR-verdier for naturstoff 5 [100 MHz, CD_3OD , (δ i ppm)] sammenlignet med referansedata for Alnuside A og B [100MHz, CD_3OD , (δ i ppm)]

Posisjon	Kjemisk skift i δH CD_3OD i ppm (Integral, multiplisitet, koblingskonstant J)			Kjemisk skift δC CD_3OD i ppm		
	Naturstoff 5	Litteratur Alnuside A (55)	litteratur Alnuside B (55)	Naturstoff 5	litteratur Alnuside A (55)	litteratur Alnuside B (55)
Diaryl hept						
1	2.69-2.74 (m*)	2.74 (s)	2.73 (brt, J=5.5)	30.11	29.8	30.1
2	2.69-2.74 (m*)	2.74 (s)	2.69 (brt, J= 5.5)	46.46	46.5	46.5
3				211.83	211.8	211.8
4	2.59 (m)	2.57 (dd, J=17,5.5),	2.57 (dd, J=17.0,5.5)	*	48.7	48.8
	2.80 (dd, J=16.7, 7.7)	2.79 (dd, J=17,7)	2.79 (dd, J= 17,7)			
5	4.10 (m)	4.10 (br qui, J=5)	4.10 (br qui, J=5)	76.22	76.2	76.2
6	1.73 (m*)	1.72 (m), 1.77 (m)	1.72 (m),1.77 (m)	38.73	38.6	38.7
7	2.55 (m*)	2.50 (m)	2.5 (m)	31.52	31.8	31.5
1', 1''				134,31 134.02	134.3 134	134.0 143.3
2', 2''	6.97 (d, J=8.4), 6.61 (d, J=2.1)	6.99 (d, J=8.5), 6.60 (d, J=2)	6.60 (d, J= 2), 6.99 (d,J=8.6)	130.34, 116.36	130.3, 116.3	116.5, 130.3
3', 3''	6.67 (d, J=8.6),	6.67 (d, J=8.5)	6.67 (d, J=8.5)	116.06	116.2 146.1	146.2 116.1
4', 4''				156.31	156.6, 144.2	144.5 156.1
5', 5''	6.67 (d, J=8.6) 6.6*	6.67 (d, J=8.5) 6.64 (d, J=7.5)	6.67 (d, J=8.5)	116.06 116.53	116.2 116.6	116.4 116.1
6', 6''	6.97 (d, J=8.4) 6.49 (dd, J=2.1, 8.0)	6.99 (d, J=8.5) 6.47 (dd, J=7.5,2)	6.47 (dd, J= 7.5,2.0) 6.99 (d,J=8.6)	130.34 120.67	130.3 120.7	120.6 130.3
Xylose						
1'''	4.21 (d, J=7.6)	4.21 (d, J=8)	4.21 (d, J=7.6)	104.28	104.3	104.3
2'''	3.1-3.2 (m*)	3.12 (dd, J=9,7.5)	3.12 (dd, J=9,8)	75.11	75.1	75.1
3'''	3.3*	3.29 (t, J=9)	3.29 (t, J=9)	78.09	77.9	77.9
4'''	3.47 (m)	3.47 (ddd, J=10.5, 8.5,5.5)	3.47 (ddd, J=10.5, 8.5,5.5)	71.28	71.3	71.3
5'''	3.1-3.2 (m*)	3.16 (dd, J=11.5,10.0)	3.16 (dd, J=11.5,10.0)	66.98	67.0	67.0
	3.85 (m*)	3.86 (dd, J=11.5,5.5)	3.84 (dd,11.5, 5.5)			

*overlappende signaler

NMR strukturoppkl ring:

^1H NMR-spekteret viste signaler for naturstoff 5 som kan være enten Alnaside A eller B. Naturstoffer Alnaside A og B er isomerer som har forskjellige posisjoner i aromatisk ringer, spektret viste en god overstemmelse med begge stoffer (55).



Figur 30: Utsnitt av ^1H NMR-spekteret viser signaler i det aromatiske ringen. H-2' og H- 6' viste signalet ($\delta_{\text{H}}, 6.97$, d , $J=8.4$) som var identiske, og H-3' og H- 5' viste signalet ($\delta_{\text{H}}, 6.67$, d , $J=8.6$) i den ene aromatisk ring, i den andre aromatisk ring, ble observert i H-2'' ($\delta_{\text{H}}, 6.61$, d , $J=2.1$) og for H-5'' ($\delta_{\text{H}}, 6.6$) kunne ikke regnes på grunn av overlappning. Det ble observert i tillegg i H-6'' en dublett av dublett ($\delta_{\text{H}}, 6.49$, $J=2.1, 8.0$)

^1H NMR (figur 30) viste i det aromatiske område flere signaler fra de to benzen ringene, og basert på koblingskonstantene og kjemiske skift viste protonene H-2' og H- 6' signalet ($\delta_{\text{H}}, 6.97$) med koblingskonstanten 8.4 Hz, som var identiske. H-3' og H- 5' viste signalet ($\delta_{\text{H}}, 6.67$) med koblingskonstantene 8.6 Hz i den ene aromatisk ring, i den andre aromatisk ring, ble observert i H-2'' ($\delta_{\text{H}}, 6.61$) med koblingskonstanten 2.1 Hz, og for H-5'' ($\delta_{\text{H}}, 6.6$) kunne ikke integralet beregnes på grunn av overlappning. Det ble observert i tillegg i H-6'' en dublett av dublett ($\delta_{\text{H}}, 6.49$) med koblingskonstantene på 2.1 og 8.0 Hz. Sammenlignet med referansen (55) så tyder det at Alnaside A, har en OH gruppe koblet i posisjon H-4', på den ene aromatisk ringen, og to OH grupper i den andre aromatisk ringen i posisjon H-3'' og H-4'', og motsatt i posisjon for Alnaside B som er isomer til Alnaside A.

^1H NMR spektret viste også signaler fra en xylopyranosyl gruppe som er bundet til sp^2 karbonet C-5 og med anomert proton (δ_{H} , 4.21) med en koblingskonstant 7.6 Hz som indikerer B-konfigurering. Sammenlignet med referanse for Alnuside A og B (55) ^1H NMR spektret viste identiske signaler i det xylopyranosyl gruppe og fra diarylheptanoid delen. På grunn av lite mengde stoff av naturstoff 5, var det ikke mulig å ta HMBC spektrum, som ville gitt klare indikasjoner om det var Alnuside A eller B. Vanligvis ville dette blitt avklart gjennom å observere koblingene mellom det to aromatiske ringene i posisjon C-1' og C-1".

Tidligere funn av naturstoff 5: Tidligere studier har identifisert alnuside A i gråor (17), og både alnuside A og B er også tidligere identifisert i *Alnus glutinosa*, (23) og *Alnus incana* (18).

4.6 Disc assay antimikrobielle effekter av råekstraket og Diaion-HP-20 fraksjoner.

Det ble benyttet disc diffusjonsmetoden for å undersøke antimikrobiell aktivitet av råekstraket og diaionfraksjoner fra gråorbarken mot fem forskjellige mikroorganismer. Oppsummering av resultater av alle forsøker er vist i tabell 17, der hver verdi i tabellen ble beregnet som gjennomsnittet av to eller tre målinger \pm standardavvik. En detaljert tabell er vist i tabell 6 i vedlegg B. Forsøket ble gjentatt tre ganger ved antimikrobiell aktivitet og to ganger ved negativ effekt.

Alle fraksjoner viste antimikrobiell aktivitet mot bakteriestammen *S. aureus*, med unntak av fraksjon AI-E-D4 som viste ingen aktivitet mot noen av testorganisme, og sammenlignet med positiv kontroll, er det fraksjon AI-E-D2 som hadde den høyeste antimikrobielle aktiviteten. Ekstraket etter fraksjonene fra gråor viste ingen antimikrobiell aktivitet mot bakteriestammene *E. coli*, *B. subtilis*, *P. aeruginosa* eller soppen *C. albicans*

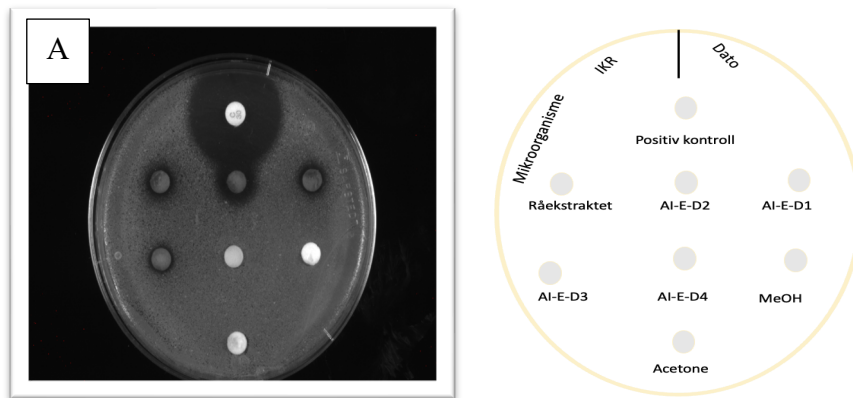
Tabell 17: Resultater fra disc-assay for de testede mikroorganismene med ulike fraksjoner fra gråor. Hemmingsone er gitt som gjennomsnittlig målt radius i millimeter (\pm standardavvik) for de ulike fraksjonene og for positiv og negativ kontroll. ^{*X}=antall forsøker som ble utført.

Mikroorganisme	<i>S. aureus</i> ^{*3X}	<i>B. subtilis</i> ^{*2X}	<i>P. aeruginosa</i> ^{*2X}	<i>C. albicans</i> ^{*2X}	<i>E-coil</i> ^{*2X}
	Hemmingssone i mm				
Positiv kontroll	29.13 \pm 0.38	34.4 \pm 0.56	26.03 \pm 1.17	38.2 \pm 3.96	24.93 \pm 0.46
Råekstraket	7.25 \pm 0.1	0	0	0	0
AI-E-D1	8.20 \pm 0.13	0	0	0	0
AI-E-D2	13.02 \pm 1.3	0	0	0	0
AI-E-D3	7.067 \pm 0.32	0	0	0	0
AI-E-D4	0	0	0	0	0
MeOH**	0	0	0	0	0
Acetone**	0	0	0	0	0

** Negativ kontroll, ^{*2X} forsøket ble gjentatt 2 ganger, ^{*3X} forsøket ble gjentatt 3 ganger.

Effekten av fraksjonene av gråorbark mot *Staphylococcus aureus*

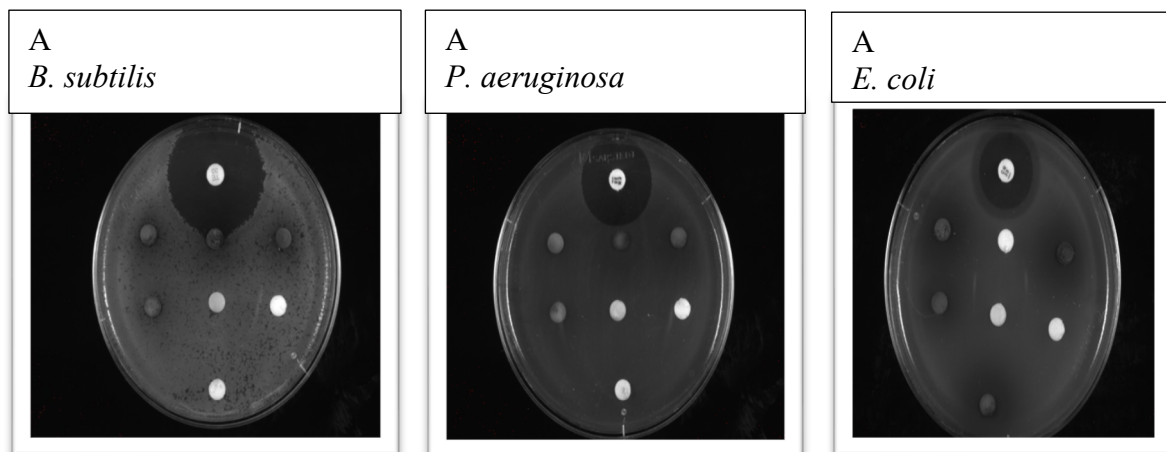
Gjennomsnittlig diameteren av inhiberingssonen for positiv kontroll (kloramfenikol 30 µg/disc) var 29,13 (± 0,38) mm. Råekstraktet, AI-E-D1 og AI-E-D3 viste en gjennomsnittlig inhiberingssone på 7,5 (±0,18) mm, mens fraksjon AI-E-D2 viste den høyeste aktiviteten med en gjennomsnittlig inhiberingssone på 13,02 (± 0,32) mm (figur 31).



Figur 31: Resultat av antimikrobiell aktivitet av gråorfraksjoner mot *S. aureus* med bruk av disc assay metoden for Replikat A (til venstre). Diagrammet til høyre viser plasseringen av papirskiver (positiv kontroll, gråorfraksjoner, negativ kontroll) på MH petriskål for disc diffusjonsmetode til Replikat A, merket med strek, dato og type mikroorganismen. Bildet ble tatt med Gel Doc TM XR+ with image LabTM Software fra BIO-RAD.

Effekten av fraksjonene av gråorbark mot *Bacillus subtilis*, *Pseudomonas aeruginosa* og *Escherichia coli*

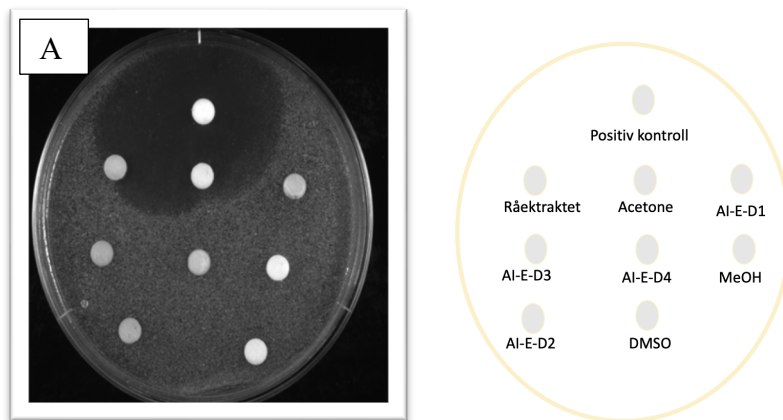
Gråorfraksjoner viste seg å være ineffektive som et antimikrobielt middel mot *B. subtilis*, *P. aeruginosa* eller *E. coli*. Gjennomsnittlig målt diameter av hemmingssone var 0.00 mm for alle tre bakteriene med alle fraksjoner som ble testet (vist i tabell 17), De positive kontrollene viste tydelige inhiberingssone; Tetracyclin 30 µg/disc ga en inhiberingssone på 34.4 mm mot *B. subtilis*. Gentamicin sulfat 20 µg/disc med en gjennomsnittdiameteren på 26.03 mm mot *P. aeruginosa* og et gjennomsnitt diameter på 24.93 mm mot *E. coli* (figur 32).



Figur 32: Resultatene av antimikrobiell aktivitet av gråorfraksjoner mot *B. subtilis*, *P. aeruginosa* og *E. coli* for Replikat A, som ble observert ved hjelp av disc assay metoden. Bildene ble tatt med Gel Doc TM XR+ with image LabTM Software fra BIO-RAD.

Effekten av fraksjonene av gråorbarken mot soppen *Candida albicans*

For soppen *C. albicans* ble det heller ikke observert noen hemmingssone for gråorfraksjoner, men det var tydelig hemmingssone rundt positiv kontroll (miconazole nitrate 100 mg/ml) med en gjennomsnittsdiameter på 38.2 mm. Ettersom resultatene var negative, ble forsøket gjennomført to ganger med *C. albicans* slik som for bakteriene *E. coli*, *P. aeruginosa* og *B. subtilis*. I første forsøk med *C. albicans* ble alle skivene plassert i en petriskål (som er vist i figur 33, replikat A). Det ble observert en stor hemmingssone rundt positiv kontroll i Replikant A slikt at det ble vanskelig å tyde hemming fra fraksjonene. Derfor ble fraksjonene fordelt i 2 petriskåler for replikat B, for å verifisere om det var hemmingssone rundt fraksjonene.



Figur 33: Resultat av antimikrobiell aktivitet av gråorfraksjoner mot *C. albicans* med bruk av disc assay metoden for Replikant A (til venstre). Diagrammet til høyre viser plasseringen av papirskiver (positiv kontroll, gråorfraksjoner og negativ kontroll) på MH petriskål for disc diffusjonsmetode til Replikant A. Bildet ble tatt med Gel Doc TM XR+ with image LabTM Software fra BIO-RAD.

Radius målt i mm med skyvelære i både vertikal og horisontal retning og gjennomsnittet av fraksjoner samt positiv kontroll er vist i vedlegg B, tabell 1 for *S. aureus*, tabell 2 for *B. Subtilis*, tabell 3 for *P. aeruginosa*, tabell 4 for *E. coli*, og tabell 5 for soppen *C. albicans*.

Figurer for den andre replikat B for mikroorganismen er vist i vedlegg B, figur 1, 2, 3 og 4.

4.7 Mic assay

4.7.1 Metodeutvikling ved å sjekk OD vs cfu/ml til *E. coli* bakterieinokulum

Ifølge retningslinjene til EUCAST, er det anbefalt 5×10^5 cfu /ml i MIC-testing. Det var ikke etablert en metode for å måle antall CFU per OD for *E. coli* stammen i dette forsøket.

Derfor ble det tatt utgangspunkt i OD 0.17 som allerede var etablert for en annen *E. coli* stamme og som ga 20-80 kolonier (4×10^2 - 1.6×10^3) på inokulumdobbel kontroll som tilsvarer 5×10^5 cfu/ml i 96 brønners-plateformat.

Fire uavhengige parallelle tester ble utført med forskjellige OD verdier for å finne riktig cfu/ml for mikroorganismen *E. coli* til å gi en sluttkonsentrasjon på 5×10^5 cfu/ml ved bruk av 96 brønners plateformat. I den første testen ble den tidligere etablert OD 0.17 for *E. coli* testet. Det ble laget bakteriesuspensjon som beskrevet tidligere av tillaging av bakteriesuspensjon. Tabell 3 i vedlegg C viser målinger av OD600, volumet av bakteriesuspensjon og MHB som til sammen utgjør en total på 100 µl.

Bakteriesuspensjon for første forsøket ved OD 0.17 var for høy (tabell 18) i forhold til ønsket cfu tall på 5×10^5 cfu/ml.

Forsøket ble gjentatt med en fortynningsserie (0.17, 0.13, 0.10 og 0.05). Også dette ga for høye verdier, og testen ble gjentatt en tredje gang med fortynningsserie OD (0.15, 0.05, og 0.015) og fjerde gang med forskjellige fortynningsserier OD (0.15, 0.05, 0.015, 0.005, 0.0015). Resultatene er oppsummert i vedlegg C tabell 3 (målt OD og volum bakteriesuspensjon). Figur 1, 2, 3, og 4 i vedlegg C viser inokulumkontroll til alle fire forsøkene.

Tabell 18: Resultatene av antall koloner (i næringsagar) cfu/ml med ulike OD testet til alle fire forsøkene.

OD	Første forsøket	Andre forsøket	Tredje forsøket	Fjerde forsøket
0.17	6×10^3	6×10^3	--	--
0.15	--	--	6×10^3	1.98×10^3
0.13	--	6×10^3	--	--
0.10	--	6×10^3	--	--
0.05	--	6×10^3	3.35×10^3	8×10^2
0.015	--	--	4.3×10^3	2×10^2
0.005	--	--	--	0
0.0015	--	--	--	0

--ikke testet,

Basert på resultatene over ble det videre i MIC forsøk tatt utgangspunkt med OD 0.15 som resulterte i en konsentrasjon på (1.98×10^3) cfu/ml (antall kolonier 99 kolonier på agar /50 μ l *1000 μ l). Dette tilsvarer omtrent 20-80 kolonier på næringsagar (4×10^2 - 1.6×10^3) cfu/ml i inokulumdobbeltkontrollen som gir en sluttkonsentrasjon på ca. 5×10^5 cfu/ml i 96 brønners plateformat.

4.7.2 Metodeutvikling ved å sjekke OD vs cfu/ml til *S. aureus* bakterieinokulum

Som for *E. coli* var det ikke etablert en OD vs cfu/ml korrelasjon. Det ble dermed utført tre uavhengige parallelle fortytningstester for å finne en passende OD- cfu/ml korrelasjon, ble det laget en bakteriesuspensjon som beskrevet tidligere i fremgangsmetoden av tillaging av fortyttingsrekke til od vs cfu/ml.

Forforsøket med den første fortytningen ga en OD på 0.0088 som tilsvarte 5×10^5 cfu/ml ved en 10^{-4} fortytning (figur 5, og tabell 1 vedlegg E viser resultat og beregning av OD).

Videre ble det utført to replikater med en 96-brønners plate-test med negativ kontroll, MHB, DMSO, og positiv kontroll med bakterieinokulum *S. aureus* målt til en OD 0.0088 (Tabell 2 Vedlegg E viser OD målt). For det første replikatet ble ingen kolonier observert på næringsagarskålene, mens i det andre replikat ble det vekst av 10 kolonier. Dette tilsvarer tall på 2×10^2 cfu/ml (som er vist i figur 2 vedlegg E). Dette indikerer at en OD på 0.0088, ikke tilsvarer et cfu tall på 5×10^5 cfu/ml på sluttkonsentrasjonen.

Forforsøket ble dermed gjentatt med andre fortytning gjentatt med et målt OD på 0.530 i OD600 spektrofotometri (figur 6 vedlegg E). Antall kolonier ble mellom 20 og 80 på petriskål med både fortytning 10^{-4} og 10^{-5} som tilsvarer 5×10^5 cfu/ml. Tabell 3 vedlegg E viser resultat og beregning av OD. Dette resulterte en OD på 0.0027 beregnet tilbake med fortytning 10^{-4} (96 kolonier) og OD på 0.00106 beregnet tilbake med fortytning 10^{-5} (25 kolonier).

Basert på forforsøket over ble et MIC-kontroll-forsøk satt opp i et 96 brønners plate format, som inkluderte testete med negativ kontroll MHB, løsningsmiddelet DMSO og positiv kontroll for *S. aureus* med OD= 0.0027 og OD= 0.00106. Tabell 4 vedlegg E viser målt OD. Det ble observert null kolonier med OD 0.00106 og kun 2 kolonier med OD 0.0027 som er vist i figur

3 vedlegg E dobbelt kontroll i næringsagar. Dette indikerer at en OD på 0.0027 og OD på 0.00106 dessverre ikke gir 5×10^5 cfu/ml i sluttkonsentrasjon.

En tredje forforsøket ble dermed satt opp med nye fortyninger (figur 7 vedlegg E). Denne gangen viste en OD-verdi på henholdsvis 0,00198 med fortyning 10^{-4} og 0.00244 med fortyning 10^{-5} som tilsvarer 5×10^5 cfu/ml. Tabell 5 Vedlegg E viser beregning av OD.

I tillegg ble det utført tester med større volum på OD 0.00198 for å gi en sluttkonsentrasjon på 5×10^5 cfu/ml og på OD 0.0193 for en sluttkonsentrasjon på 5×10^6 cfu/ml. Beregning av OD står under figur 4 vedlegg E. Det ble ikke observert noen kolonier på nærings LB agar med OD 0.00198, men det ble observert 29 kolonier (tilsvarende 5.8×10^2 cfu/ml) på LB agar med OD 0.0193 (figur 4 vedlegg E) resultatene med OD tilsvarende 5×10^5 cfu/ml ga ingen vekst på dobbeltkontroll i næringsagarer, derfor ble det bestemt etter den siste testen at OD 0.0193 var passende for å oppnå en konsentrasjon på ca. 5×10^6 cfu/ml i 96-brønners plater med *S. aureus*.

4.7.3 Test av DMSO konsentrasjoner.

DMSO ble brukt som løsningsmiddel til å løse gråorfraksjoner og derfor ble det testet ulike konsentrasjoner. Testing av ulike DMSO konsentrasjon ble utført for å finne den minste konsentrasjon av DMSO som ikke gir hemming av bakterier. Test av antimikrobiell aktivitet av ulike konsentrasjoner av løsningsmiddelet DMSO testet fra 100% og ned til 1% DMSO. De høyeste konsentrasjonene (100 %, 50 % og 25 %) viste hemming på bakterievekst, mens de lavere konsentrasjonene (10 %, 5 %, 1 %) viste ingen hemming av bakterier. Basert på disse resultatene ble gråorfraksjoner løst opp i 1% DMSO for å avgjøre om fraksjonene i seg selv forårsaket hemming av bakterier. (Tillaging av DMSO er vist i tabell 2 Vedlegg C)

Antimikrobielle effekt av gråorfraksjoner i MIC assay:

Målet med forsøket var å finne den konsentrasjonen til fraksjonene som kunne hemme veksten av mikroorganismer (MIC). Fraksjonen AI-E-D2 viste seg å ha antimikrobiell aktivitet mot mikroorganismen *S. aureus* ved bruk av Disc assay metoden. Derfor ble denne fraksjonen videre fraksjonert ved bruk av Sephadex LH-20, og dette ga 14 fraksjoner..

4.7.4 Minimum inhibitorisk konsentrasjon (MIC) av sephadex fraksjoner til gråorbarken mot mikroorganismen *E. coli*

Det har blitt gjennomført tre uavhengige forsøk av Sephadex-gråorfraksjoner på *E. coli*. Tabell 4 i vedlegg C viser målingene av OD-verdiene for alle tre forsøker. I det første forsøket ble fraksjonene S1, S2S3, S4 og S5 testet med fire replikater (1, 2, 3, og 4), og det ble ikke observert hemming av bakteriene med gråorfraksjoner (figur 5, vedlegg C). Det ble observert vekst på positiv kontroll med MHB og bakterieinokulum, samt DMSO kontrollen.

I det andre forsøket ble fraksjonene S6, S7, S8 og S9 testet med fire replikater (1, 2, 3 og 4), og heller ikke her ble det observert hemming av *E. coli* vekst (figur 6, vedlegg C).

MIC-verdien for antibiotika ampicilin (50 mg/ml) var mellom 4 og 8 µg/ml i den første og andre parallelle forsøker.

I det tredje forsøket ble fraksjonene S10, S11, S12, S13 og S14 testet med to replikater (1 og 2), MIC-verdien for antibiotika kontrollen var 2 µg/ml, og det ble ikke observert noen veksthemming av *E. coli* for noen av fraksjonene. I det siste forsøket ble det benyttet en annen batch av antibiotika som kan forklare skiftet i MIC verdi fra de første to forsøkene (fra 8 µg/ml til 2 µg/ml). En detaljert oversikt over alle parallellene er vist i tabell 1 vedlegg C.

Konsentrasjon av *E. coli* under MIC assayen ble verifisert ved utplating av kontrollskåler fra forsøket. Antall kolonier på skålen ble mellom 20 og 80 kolonier som tilsvarer en tilnærmet konsentrasjon på 5×10^5 cfu/ml i bakterieløsningen, figur 7,8 og 9 viser inokulum kontroll for alle forsøkene Vedlegg C.

4.7.5 Minimum inhibitorisk konsentrasjon (MIC) av sephadex fraksjoner til gråorbark mot mikroorganismen *S. aureus*.

Det har blitt utført to uavhengige forsøker med Sephadex-gråorfraksjoner for *S. aureus*. Tabell 1 vedlegg D viser målt OD til begge parallelle forsøker.

I det første forsøket ble fraksjonene S1-S5 testet, mens S6-S9 ble testet i det andre forsøket.

I det første forsøket ble testen utført tre ganger. MIC-verdiene for antibiotika kloramfenikol (34 mg/ml) varierte mellom 1 og 0.25 µg/ml. En positiv kontroll med MHB og bakterieinokulum, samt DMSO og bakterieinokulum, viste vekst av *S. aureus*. En negativ kontroll med kun MHB, DMSO, antibiotika og fraksjoner ble testet uten bakterieinokulum, for å sikre at mediet var rent og ikke var noen vekst tilsetning av bakterier. Det ble ikke observert vekst av *S. aureus* i disse brønnene.

Av alle fraksjonene ble det observert hemming av bakterievekst med gråorfraksjoner S2S3 med en MIC-verdi på 200 µg/ml for alle tre replikater (Figur 1 vedlegg D).

I det andre forsøket ble testen utført to ganger. MIC-verdiene for antibiotika kloramfenikol (34 mg/ml) varierte mellom 0.25 og 0.5 µg/ml. Det ble ikke observert noen hemming av bakterievekst med fraksjonene S6-S9 (figur 2 vedlegg D viser utvalgte MIC-bestemmelse for S6-S9)). Resultatene fra begge forsøkene er oppsummert i Tabell 4 vedlegg D.

4.7.6 Minimum inhibitorisk konsentrasjon (MIC) av isolerte stoffer.

Fraksjonen AI-E-D2-S2S3 viste antimikrobiell aktivitet med en MIC på 200 µg/ml mot mikroorganismen *S. aureus*. Fraksjonen ble deretter fraksjonert med flash kromatografi, som resulterte to rene stoffer; AI-E-D2-S2S3-F1, (hirsutanolol-5-O-β glucopyranosid), og fraksjonen AI-E-D2-S2S3-F5, (platyphylloside). I tillegg ble fraksjonen AI-E-D2-S4-F1 (oregonin), og fraksjonen AI-E-D2-S6-F2, (coumaryloregonin) testet med MIC.

Oregonin og hirsutanolol-5-O-β glucopyranosid viste antimikrobiell aktivitet med en MIC på 200 µg/ml i alle tre forsøkene (figur 3 og 4 Vedlegg D viser MIC-bestemmelse i Replikat A og B).

I tillegg hadde begge fraksjonene en MIC på antibiotika kloramfenikol (25 mg/ml) på 0.5 µg/ml. Platyphylloside og coumaryloregonin viste ingen hemming av bakterievekst.

Konsentrasjon av *S. aureus* under MIC assayen ble verifisert ved utplating av kontrollskåler fra forsøket. Dette ble gjennomført som beskrevet tidligere i avsnitt om inokulum kontroll over (figur 5, 6, og 7 vedlegg D). Antall kolonier på skålen ble mellom 20 og 80 kolonier som tilsvarer tilnærmet konsentrasjon på 5×10^5 cfu/ml i bakterieløsningen. (Tabell 5 vedlegg D viser resultat av alle tre forsøk).

5 Diskusjon av antimikrobielle effekt:

5.1 Antimikrobielle effekt av gråorfraksjoner DISC assay

Nye antimikrobielle midler har fått mye fokus fra plantene. Alnus slekter har blitt brukt i mange land for å behandle ulike lidelser, og inneholder diarylheptanoidene har vist seg å ha biologisk effekt i flere studier. I denne studier viste rækstraktet og diaionfraksjoner fra gråorbarken etanolekstraktet antimikrobiell aktivitet mot bakteriestammen *S. aureus*, med unntak av fraksjon AI-E-D4. Fraksjonen AI-E-D2 hadde den høyeste antimikrobielle aktiviteten mot *S. aureus* med en hemmingsone på 13.02 ± 1.3 mm, men ingen antimikrobiell aktivitet mot bakteriestammene *E. coli*, *B. subtilis*, *P. aeruginosa* eller soppen *C. albicans*.

I en tidligere studie av vannekstrakter fra blader og bark av *A. incana*, *A. viridis* og *A. glutinosa* fra (fra fjellet Vranica i det sentrale Bosnia) antimikrobiell aktivitet mot tre gram-positive bakterier (*B. subtilis*, *S. aureus*, *Micrococcus luteus*) og tre gram-negative bakterier (*E. coli*, *P. aeruginosa*, *Salmonelle abony*), samt to gjærstammer (*C. albicans*, *Aspergillus brasiliensis*) testet med bruk av agar-diffusjonsmetoden.

S. aureus var meste følsom for vannekstraktene fra bladene til *A. viridis* (21.3 ± 1.15) mm og *A. glutinosa* (19.3 ± 1.15) mm og gram positive-bakterier *S. aureus* og *B. subtilis* viste den største diameteren av inhiberingssone. Vannekstraktet fra *Alnus incana* bark viste en hemmingsone på (17.6 ± 0.57) mm mot *B.subtilis* og (10.6 ± 0.57) mot *E.coli*, samt en hemmingsone av *A.incana* blader med (13.6 ± 2.3) mm mot *E.coli* (56). Men i vår studie ble det ingen hemming av *E. coli* heller ikke mot *Bacillus subtilis*. I den tidligere studien *A. incana* barken viste heller ikke en hemmingsone på mikroorganismer *C. albicans* og *Pseudomonas*, dette samsvarer med vår studie som viste heller ikke aktivitet på disse.

Tidligere studie viste ingen hemming på mikroorganismen *S. aureus*, derimot vår studie viste det. En forskjell mellom de to studiene er at vannekstrakter ble brukt i den tidligere studien, mens i vår studie ble det brukt etanolekstraktet. Det var også en forskjell i mengde filterpapir som ble impregnert med ekstraktene. I tidligere studier ble filterpapir impregnert med 30 µl av ekstraktet, men i denne studie ble det brukt 50 µl av konsentrasjon på 1 mg /disc.

Forskjellen kan være også på grunn av type mikroorganisme, det brukes ulike stammer av samme bakterie.

I en annen studie ble antimikrobielle aktivitet av metanolekstrakter fra blader og bark til *A. glutinosa*, *A. incana* og *A. viridis* testet mot åtte mikroorganismer med disc -diffusjonsmetoden. *S. aureus* viste seg å være den mest følsomme mikroorganismen for alle ekstraktene. Studien viste at blader fra *A. viridis* var den som ga den høyeste antibakterielle og antifungale aktiviteten og kunne sammenlignes med antibiotika (57).

Ekstrakter fra bark av *A. glutinosa* og *A. viridis* blader og barken, viste en hemming av den gram-negative bakterien *Pseudomonas aeruginosa*, men *A. incana* viste ingen hemming (57). Dette samsvarer med vår studie som også ikke viste noen hemming av denne bakterien. På grunn av den ytre membranbarrieren av *Pseudomonas aeruginosa*, er den kjent for å ha et høyt nivå av egenresistens mot alle kjente antibiotika.

Studie viste også en hemmingsone av *A. incana*-barken mot *S. aureus* med en hemmingsone på 25 ± 2.88 (57) , dette samsvarer med vår studie som også viste at rækstraktet og diaion fraksjoner av *A. incana* viste hemming mot *S. aureus*.

Studien viste også at barken til *A. incana* ikke har noen hemming mot soppen *C. albicans* (57), noe som også stemmer med vår studie. I tillegg viste studien hemming av *E. coli* og *B. subtilis* som vi ikke fikk på vår studie. Dette kan skyldes forskjeller i konsentrasjonen av filterpapir impregnert med, samt ulike stammer av disse mikroorganismer med ulike følsomhet (57).

I tillegg i en annen studie det ble testet diarylheptanoider fra *Alnus viridis* og *Alnus glutinosa* av quorum sensing aktivitet in *Pseudomonas aeruginosa*. En MIC på 125 til 500 µg/ml ble observert med de syv diaryheptanoidene som ble testet mot *P. aeruginosa* og en stimulerende effekt som er tre ganger høyere biofilmdannelse ble observert med forbindelsene hirsutenon og oregonin (24). Dette samsvarer med vår studie til etanolekstraktet av gråorbark har ikke effekt på *Pseudomonas aeruginosa*.

5.2 Antimikrobielle effekt av gråorfraksjoner MIC assay.

Alnus-slekter er rapportert å ha ulike biologiske aktiviteter og det mest kjente er antimikrobiell aktivitet. Barken er kjent med sitt innhold av sekundære metabolitter som er viktig for trevekst og liv (28). I vår studie undersøkte vi den antimikrobielle aktiviteten til etanolekstraktet fra gråor-bark med MIC-bestemmelse mot to mikroorganismer: en gram-positiv bakterie og en gram-negativ bakterie. Det ble benyttet diaion-sephadex-flash kromatografi til fraksjonering. Dette resulterte i isolering av de to naturstoffer oregonin og hirsutanolol-5-O- β glucopyranoside, som viste antimikrobiell aktivitet mot mikroorganismen *S. aureus* med en MIC på 200 $\mu\text{g/ml}$, men ingen aktivitet mot *E. coli*.

Etanolekstraktet fra barken til *Alnus glutinosa* har tidligere blitt testet i en studie mot 17 bakterier og fem gjærsopp. MIC verdiene funnet å være mellom 0.3 mg/ml og 0.6 mg/ml. Oregonin ble isolert og hadde en sterk hemmende effekt med (MIC) på 15,1 til 125 $\mu\text{g/ml}$ mot de 22 ulike mikrobielle stammene. De to Gram positive bakteriene *S. aureus* og *B. subtilis* viste høyest følsomhet for oregonin med en MIC på (15.1 $\mu\text{g/ml}$) (28). Dette stemte med vår studie hvor det vist at oregonin hadde antimikrobielle aktivitet mot *S. aureus* med en MIC på 200 $\mu\text{g/ml}$. MIC ikke ble testet mot *B. subtilis* grunnet liten respons fra Disc assay, men kan likevel være verd å prøve.

Denne tidligere studien viste også en MIC på 125 $\mu\text{g/ml}$ mot *E. coli*, men vi har ikke oppnådd dette resultat i vår studie. MIC-verdi mot gram positive og gram negative bakterier kan skyldes ytre cellemembran og tykke cellevegg. Dette kan forklares på grunn av den peptidoglykanet i celleveggen som hindrer inngangen av antimikrobielle stoffer på grunn av lipopolysakkarider laget som finnes i den ytre overflaten av gramnegative bakterier (28). Det kan også skyldes en annen stamme av *E. coli*, og derfor viste den ingen effekt. En annen mulighet er at ulikheter i konsentrasjon av fraksjonene ble testet i disse to studiene samt ulike fraksjoneringsmåter.

I en annen studie ble etanolekstraktet av barken til *Alnus rubra* testet for sin antimikrobielle aktivitet mot gram-positive og gram-negative bakterier ved bruk av agar-diffusjonsmetoden og MIC. *Alnus rubra* inneholder to aktive stoffer, (5S)-1,7-bis(3,4-Dihydroxyphenyl)-5-hydroxyhepta-3-one og oregonin, som er står bak den antimikrobielle aktiviteten. Studien viste en MIC på 31.2-125 $\mu\text{g/ml}$ mot *S. aureus* og *P. aeruginosa*, og 250 $\mu\text{g/ml}$ og 125 $\mu\text{g/ml}$ mot *E. coli* og *B. subtilis* (51). Dette samsvarer delvis med vår studie, som også viste at det aktive

naturstoffet oregonin har antimikrobiell effekt mot *S. aureus* med en MIC på 200 µg/ml, men stemmer ikke overens med effekten mot *E. coli*.

Det har vært en stor interesse for å bruke planter til å kontrollere patogene mikroorganismer spesielt for å bekjempe infeksjoner av Meticillin-resistente *S. aureus* (MRSA). Barken til *A. pendula* har blitt testet, og etanolekstraktet vist antibakteriell aktivitet mot meticillinresistent *S. aureus* (MRSA) ved bruk av MIC assay. Oregonin og hirsutenon som ble isolert fra bark-ekstraktet viste en MIC på 31,25 til 250 µg/ml (58). Dette stemte med vår studie, der oregonin viste antimikrobielle aktivitet mot *S. aureus*. Det ble ikke undersøkt effekt mot MRSA i vår studie.

Det ble forsøkt å finne referanser som kunne dokumentere antimikrobiell aktivitet av hirsutanolol-5-0-β-glucopyranoside og ved søk i Scifinder (20.apr.2023), men ingen av referanser som omtaler dette stoffet har studert antimikrobielle effekt. Men det ble funnet antioksidantaktivitet av stoffet hirsutanolol-5-0-β-glucopyranoside og andre diarylheptanoider i en cellbasert assay (59).

Oregonin og hirsutanolol-5-O-β-glucopyranosid inneholder begge to ortho-dihydroxylbenzenringer, katekolringer. Platyphylloside, som viste ingen antibakteriell effekt, har ikke disse katekolstrukturene som ser til å være viktig for effekt. Coumaryloregonin har katekolstruktur, mens comaryl-delen kan muligens ødelegge for den antibakterielle virkningen som ble observert for oregonin.

6 Konklusjon og videre arbeid

På grunn av de globale helseproblemene knyttet til resistens, er det blitt mer fokus på utvikling av nye antimikrobielle midler fra planter. *Alnus*-slekten er kjent for sine biologiske egenskaper på grunn av det høye innholdet av diarylheptanoider. Gråor (*Alnus incana*) er kjent for sin tradisjonelle bruk mot sårbehandling i Norge og i flere andre land. Flere biologisk effekter er rapportert for gråor, som antioksidantaktivitet og antimikrobielle aktivitet.

I dette arbeidet det ble utført en ekstraksjon av tørket gråorbark ved bruk av 60% etanol. Ulike kromatografiske kolonne-separasjonsmetoder ble benyttet til fraksjonering av råekstraktet.

Råekstraktet og diaionfraksjoner fra gråorbark ble studert ved DISC assay mot fem mikroorganismer anbefalt av Ph Eur (European Pharmacopoeia). Dette resulterte at fraksjonene AI-E-D1-D3 ga hemming av mikroorganismen *S. aureus*, mens AI-E-D4 ikke gjorde det, og fraksjonen AI-E-D2 ga den høyeste hemming av *S. aureus* med en hemmingsone på 13.02 ± 0.32 mm, råekstraktet viste en hemmingsone på 7.25 ± 0.1 mm. Ingen hemming ble observert mot bakteriestammene *E. coli*, *B. subtilis*, *P. aeruginosa* eller soppen *C. albicans*.

Fraksjonen AI-E-D2 ble valgt ut for videre fraksjonering med Sephadex LH-20 etterfulgt av flash kromatografi. Ved hjelp av NMR-spektroskopi ble fem innholdsstoffer identifisert:

Coumaryloregonin (4) ble identifisert for første gang i gråor, mens oregonin (1), hirsutanolol-5-O- β glucopyranoside (2) platyphylloside (3) var identifisert tidligere i gråor samt andre *alnus* arter som *A. glutinosa*. Alnusid A eller B (5) ble påvist i gråor, men var uren.

Oregonin og hirsutanolol-5-O- β glucopyranosid viste antimikrobiell aktivitet mot mikroorganismen *S. aureus* med en MIC på 200 $\mu\text{g/ml}$. I denne studien har det for første gang vist antibakteriell effekt for hirsutanolol-5-O- β - glucopyranosid. Disse to stoffene inneholder begge to ortho dihydroxylbenzenringer (katekolstruktur) som ser ut til å være viktig for effekt, ettersom platyphylloside med kun en hydroxylgruppen på benzenringen var inaktiv. Denne studien har gitt ny kunnskap om antimikrobielle innholdsstoffer fra gråorbark. Kunnskapen kan brukes videre i søk etter nye antimikrobielle midler.

Videre arbeid inkluderer fraksjonering og isolering av flere stoffer fra de andre Diaion fraksjonene (AI-E-D1 og AI-E-D3) som viste antibakteriell effekt, og opprensing av flere av innholdstoffene fra Sephadex fraksjoner av AI-E-D2. Testing av innholdsstoffer fra gråor for

antimikrobiell aktivitet i flere typer mikroorganismer, inkludert resistente stammer, samt testing av stoffene i kombinasjon (synergi) kan være relevant. Det hadde vært spennende også å finne virkningsmekanismen til stoffene som ble isolert fra gråorbaken og viste antimikrobielle aktivitet på *S. aureus*.

Litteraturliste

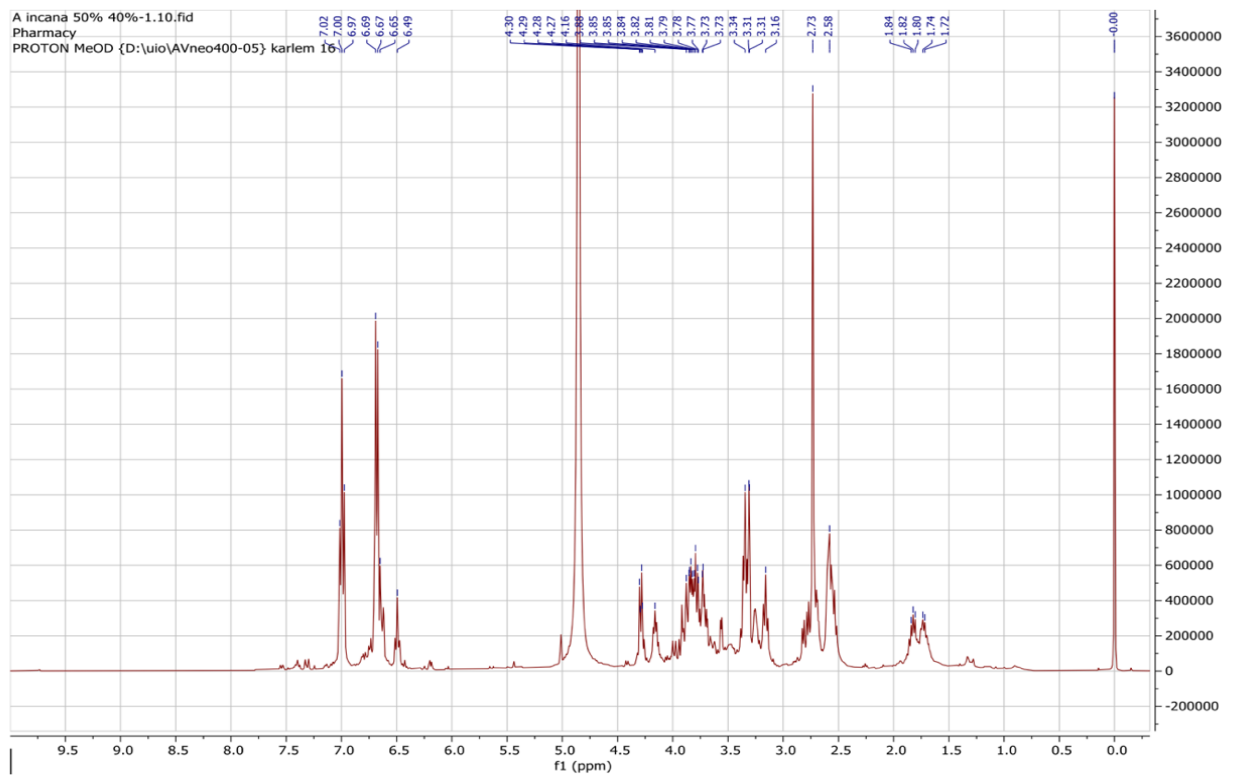
1. Royal Botanic Garden Kew. *Alnus incana* (L.) Moench: Plants of the World Online; [Hentet 2023 20.apr]. Tilgjengelig fra: <https://powo.science.kew.org/taxon/urn:lsid:ipni.org:names:30106706-2#distributions>.
2. Urtekildens planteleksikon. Or [Hentet 2023 18.apr]. Tilgjengelig fra: https://www.rolv.no/urtemedisin/medisinplanter/alnus_sp.htm.
3. Artsdatabanken. Art Gråor *Alnus incana* (L.) Moench [Hentet 2023 20.apr]. Tilgjengelig fra: <https://artsdatabanken.no/ScientificName/Alnus%20incana/102132>.
4. Grindeland JM. Gråor: Store Norske Leksikon; 2023 [Hentet 2023 19.apr]. Tilgjengelig fra: <https://snl.no/gråor>.
5. Plants For A Future. *Alnus incana* - (L.) Moench [Hentet 2023 19.apr]. Tilgjengelig fra: <https://pfaf.org/user/Plant.aspx?LatinName=Alnus+incana>.
6. Parkogannlegg. *Alnus incana*-trær for ekstensiv skjøtsel [Hentet 2023 19.apr]. Tilgjengelig fra: <https://parkogannlegg.no/cat-treportrettet/alnus-incana-traer-for-ekstensiv-skjotsel/>.
7. Euforgen. *Alnus incana* [Hentet 2023 24.apr]. Tilgjengelig fra: <https://www.euforgen.org/species/alnus-incana/>.
8. Plante Portalen. Gråor (*Alnus incana*) [Hentet 2023 22.apr]. Tilgjengelig fra: <https://planteportalen.no/lovtraer/graor/>.
9. Sati SC, Sati N, Sati OP. Bioactive constituents and medicinal importance of genus *Alnus*. *Pharmacogn Rev.* 2011;5:174-83.
10. Høeg OA. Planter og tradisjon: Universitetsforlaget; 1974 [Hentet 2023 26.apr]. Tilgjengelig fra: https://urn.nb.no/URN:NBN:no-nb_digibok_2008052600013.
11. Ritch-Krc EM, Thomas S, Turner NJ, Towers GHN. Carrier herbal medicine: traditional and contemporary plant use. *J Ethnopharmacol.* 1996;52:85-94.
12. Lans C. Possible similarities between the folk medicine historically used by First Nations and American Indians in North America and the ethnoveterinary knowledge currently used in British Columbia, Canada. *J Ethnopharmacol.* 2016;192:53-66.
13. Fontefrancesco MF, Pieroni A. Renegotiating situativity: transformations of local herbal knowledge in a Western Alpine valley during the past 40 years. *J Ethnobiol Ethnomed.* 2020;16:58-.
14. Pranskuniene Z, Dauliute R, Pranskunas A, Bernatoniene J. Ethnopharmaceutical knowledge in Samogitia region of Lithuania: where old traditions overlap with modern medicine. *J Ethnobiol Ethnomed.* 2018;14:70-.
15. Stević T, Šavikin K, Zdunic G, Stanojkovic T, Juranic Z, Jankovic T, et al. Antioxidant, Cytotoxic, and Antimicrobial Activity of *Alnus incana* (L.) ssp. *incana* Moench and *A. viridis* (Chaix) DC ssp. *viridis* Extracts. *J Med Food.* 2010;13:700-4.
16. Telysheva G, Dizhbite T, Bikovens O, Ponomarenko J, Janceva S, Krasilnikova J. Structure and antioxidant activity of diarylheptanoids extracted from bark of grey alder (*Alnus incana*) and potential of biorefinery-based bark processing of European trees. *Holzforschung.* 2011;65:623-9.
17. Vidakovic V, Vidaković V, Novaković M, Popović Z, Janković M, Matić R, et al. Significance of diarylheptanoids for chemotaxonomical distinguishing between *Alnus glutinosa* and *Alnus incana*. *Holzforschung.* 2018;72:9-16.
18. Martineau LC, Martineau L, Hervé J, Muhamad A, Saleem A, Harris C, et al. Anti-adipogenic Activities of *Alnus incana* and *Populus balsamifera* Bark Extracts, Part I: Sites and Mechanisms of Action. *Planta medica.* 2010:1439-46.

19. Li H, Webster D, Johnson JA, Gray CA. Anti-mycobacterial triterpenes from the Canadian medicinal plant *Alnus incana*. *J Ethnopharmacol.* 2015;165:148-51.
20. Bikovens O, Roze L, Pranovich A, Reunanen M, Telysheva G. Chemical Composition of Lipophilic Extractives from Grey Alder (*Alnus incana*). *BioResources.* 2012;350.
21. Peev CI, Vlase L, Antal DS, Dehelean CA, Szabadai Z. Determination of some polyphenolic compounds in buds of *Alnus* and *Corylus* species by HPLC. *Chemistry of natural compounds.* 2007;43:259-62.
22. Mircea T, Carmen P, Anda P. The analysis of flavonoids from indigenous species of Betulaceae. *Farmacia.* 2008;56:556-62.
23. Novaković M, Stanković M, Vučković I, Todorović N, Trifunović S, Tešević V, et al. Diarylheptanoids from *Alnus glutinosa* Bark and Their Chemoprotective Effect on Human Lymphocytes DNA. *Planta Med.* 2013;79:499-505.
24. Ilic-Tomic T, Sokovic M, Vojnovic S, Ciric A, Veljic M, Nikodinovic-Runic J, et al. Diarylheptanoids from *Alnus viridis* ssp. *viridis* and *Alnus glutinosa*: Modulation of Quorum Sensing Activity in *Pseudomonas aeruginosa*. *Planta Med.* 2017;83:117-25.
25. Alberti A, Riethmuller E, Beni S. Characterization of diarylheptanoids: An emerging class of bioactive natural products. *J Pharm Biomed Anal.* 2018;147:13-34.
26. Ren X, He T, Chang Y, Zhao Y, Chen X, Bai S, et al. The Genus *Alnus*, A Comprehensive Outline of Its Chemical Constituents and Biological Activities. *Molecules.* 2017;22:1383.
27. Altınyay Ç, Eryılmaz M, Yazgan AN, Sever Yılmaz B, Altun ML. Antimicrobial activity of some *Alnus* species. *Eur Rev Med Pharmacol Sci.* 2015;19:4671-4.
28. Abedini A, Chollet S, Angelis A, Borie N, Nuzillard J-M, Skaltsounis A-L, et al. Bioactivity-guided identification of antimicrobial metabolites in *Alnus glutinosa* bark and optimization of oregonin purification by Centrifugal Partition Chromatography. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci.* 2016;1029-1030:121-7.
29. Ulriksen ES, Butt HS, Ohrvik A, Blakeney RA, Kool A, Wangensteen H, et al. The discovery of novel immunomodulatory medicinal plants by combination of historical text reviews and immunological screening assays. *J Ethnopharmacol.* 2022;296:115402-.
30. Jim O'Neil. Antimicrobial Resistance: Tackling a crisis for the health and wealth of nations. *The Review on Antimicrobial Resistance*; 2014.
31. Jim O'Neil. Tackling Dug-Resistant Infections Globally. *The Review on Antimicrobial Resistance*; 2016.
32. Balouiri M, Sadiki M, Ibsouda SK. Methods for in vitro evaluating antimicrobial activity : A review. *J Pharm Anal.* 2016;6:71-9.
33. Valgas C, Souza SMd, Smânia EFA, Smânia Jr A. Screening methods to determine antibacterial activity of natural products. *Braz J Microbiol.* 2007;38:369-80.
34. Sasidharan S, Chen Y, Saravanan D, Sundram KM, Latha LY. Extraction, Isolation And Characterization Of Bioactive Compounds From Plants' Extracts. *Afr J Tradit Complement Altern Med.* 2011;8:1-10.
35. Bucar F, Wube A, Schmid M. Natural product isolation - how to get from biological material to pure compounds. *Nat Prod Rep.* 2013;3:525-45.
36. Altemimi A, Lakhssassi N, Baharlouei A, Watson DG, Lightfoot DA. Phytochemicals: Extraction, isolation, and identification of bioactive compounds from plant extracts. *Plants (Basel).* 2017;6:42.
37. Humphries RM, Humphries RM, Kircher S, Ferrell A, Krause KM, Malherbe R, et al. The Continued Value of Disk Diffusion for Assessing Antimicrobial Susceptibility in Clinical Laboratories: Report from the Clinical and Laboratory Standards Institute Methods Development and Standardization Working Group. *Journal of Clinical Microbiology.* 2018:e00437.

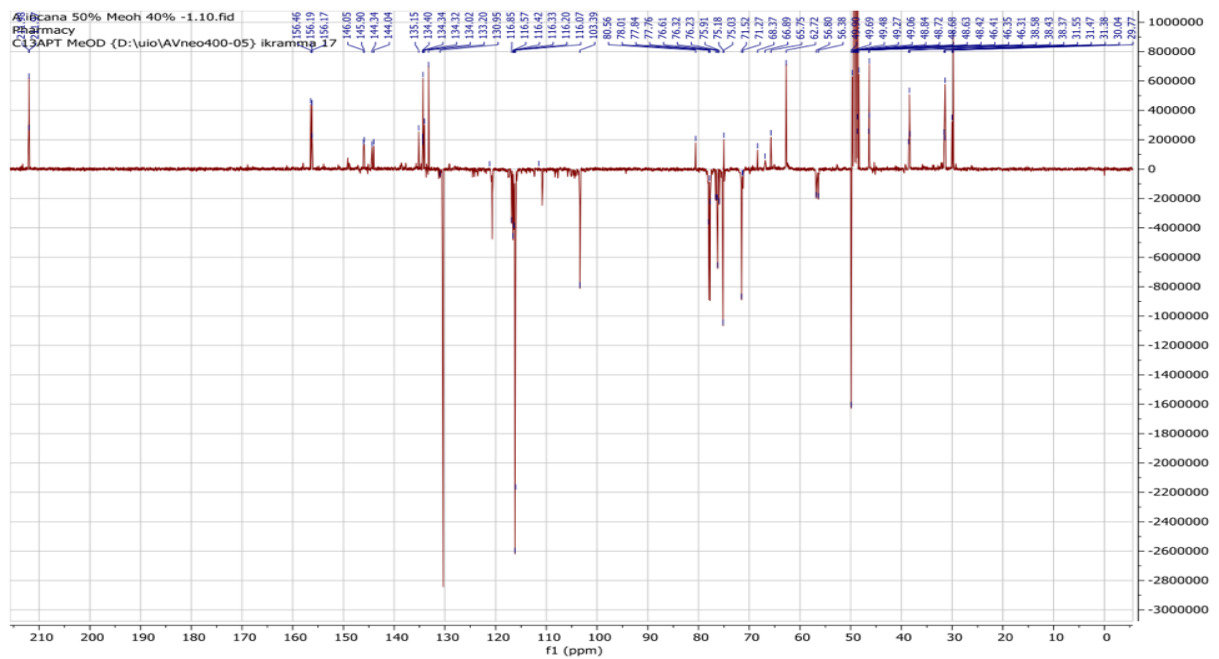
38. EUCAST. The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing- EUCAST [Hentet 2023 15.mar]. Tilgjengelig fra: <https://www.eucast.org>.
39. E. Matuschek DFJBaGK. Development of the EUCAST disk diffusion antimicrobial susceptibility testing method and its implementation in routine microbiology laboratories. 2013.
40. Jnani D, Ray SD. *Escherichia coli*. Reference Module in Biomedical Sciences: Elsevier; 2022.
41. Tønjum Tone. E.coli-enteritt: Store Norske Leksikon; 2020 [Hentet 2023 20.apr]. Tilgjengelig fra: https://sml.snl.no/E._coli-enteritt.
42. Lee AS, de Lencastre H, Garau J, Kluytmans J, Malhotra-Kumar S, Peschel A, et al. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. Nat Rev Dis Primers. 2018;4:18033-.
43. Hassan H, Afrin F, Ozbak H, Hemeg H. *Staphylococcus Aureus*. London, : IntechOpen; 2019 [Hentet 2023 29.apr]. Tilgjengelig fra: https://books.google.no/books?id=0937DwAAQBAJ&printsec=copyright&redir_esc=y#v=onepage&q&f=false.
44. Bogler A, Rice D, Perreault F, Bar-Zeev E. Comparing membrane and spacer biofouling by Gram-negative *Pseudomonas aeruginosa* and Gram-positive *Anoxybacillus* sp. in forward osmosis. Biofouling. 2019;35:104-16.
45. Das T. *Pseudomonas aeruginosa* : biofilm formation, infections and treatments: IntechOpen; 2021 [Hentet 2023 29.apr]. Tilgjengelig fra: <https://www.intechopen.com/books/9665>.
46. Harwood CR, Pohl S, Smith W, Wipat A. Chapter 4 - *Bacillus subtilis*: Model Gram-Positive Synthetic Biology Chassis. In: Harwood C, Wipat A, editors. Methods in Microbiology. 40: Academic Press; 2013. p. 87-117.
47. Cleveland Clinic. *Candida Albicans* 2022 [Hentet 19.apr. 2023]. Tilgjengelig fra: <https://my.clevelandclinic.org/health/diseases/22961-candida-albicans>.
48. Bjørn Myrvang. Candidiasis: Store Medisinke Leksikon; 2022 [Hentet 2023 23.apr]. Tilgjengelig fra: <https://sml.snl.no/candidiasis>.
49. Clinical and Laboratory standards Institute. Procedure for Optimizing Disk contents (Potencies) for Disc diffusion testing og Antimikrobial Agents Using Harmonized CLSI and EUCAST criteria. 2020.
50. Medix. McFarland Standard 2, 10 mL [Hentet 2023 20.apr]. Tilgjengelig fra: https://www.medixcorp.com/catalog/detail.asp?Item_id=1678.
51. Saxena G, Farmer S, Hancock REW, Towers GHN. Antimicrobial compounds from *Alnus rubra*. International Journal of Pharmacognosy. 1995;33:33-6.
52. Tung NH, Sun K, Fan J-Y, Shoyama Y, Han J-Y. Oregonin from the Bark of *Alnus japonica* Restrained Ischemia-Reperfusion-Induced Mesentery Oxidative Stress by Inhibiting NADPH Oxidase Activation. Microcirculation. 2014;21:688-95.
53. Šmite E, Lundgren LN, Andersson R. Arylbutanoid and diarylheptanoid glycosides from inner bark of *Betula pendula*. Phytochemistry. 1993;32:365-9.
54. Lai Y-C, Chen C-K, Lin W-W, Lee S-S. A comprehensive investigation of anti-inflammatory diarylheptanoids from the leaves of *Alnus formosana*. Phytochemistry. 2012;73:84-94.
55. Masanori K, Mari S, Yasuo N, Norio M, Takuro O, Nobuo K, et al. New Diarylheptanoids from *Alnus japonica* and Their Antioxidative Activity. Chemical & Pharmaceutical Bulletin. 2005;53:1519-23.
56. Dahija S, Haverić S, Čakar J, Parić A. Antimicrobial and cytotoxic activity of *Alnus glutinosa* (L.) Gaertn., *A. incana* (L.) Moench, and *A. viridis* (Chaix) DC. extracts. Journal of Health Sciences (Sarajevo). 2016;6:100-4.

57. Dahija S, Čakar J, Vidic D, Maksimović M, Parić A. Total phenolic and flavonoid contents, antioxidant and antimicrobial activities of *Alnus glutinosa* (L.) Gaertn., *Alnus incana* (L.) Moench and *Alnus viridis* (Chaix) DC. extracts. *Nat Prod Res.* 2014;28:2317-20.
58. Choi JG, Lee MW, Choi SE, Kim MH, Kang OH, Lee YS, et al. Antibacterial activity of bark of *Alnus pendula* against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Eur Rev Med Pharmacol Sci.* 2012;16:853-9.
59. Kuroyanagi M, Shimomae M, Nagashima Y, Muto N, Okuda T, Kawahara N, et al. New Diarylheptanoids from *Alnus japonica* and Their Antioxidative Activity. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin.* 2005;53:1519-23.

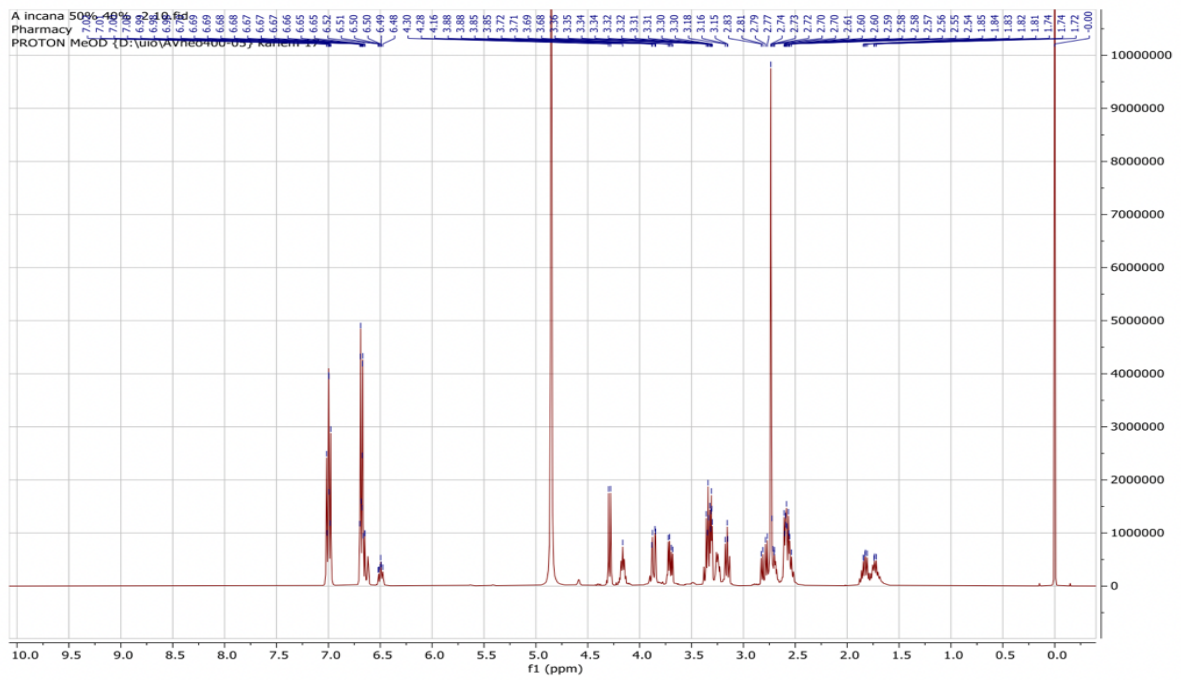
Figur 3: ^1H -NMR-spekter av AI-E-D2-S2[CD_3OD]



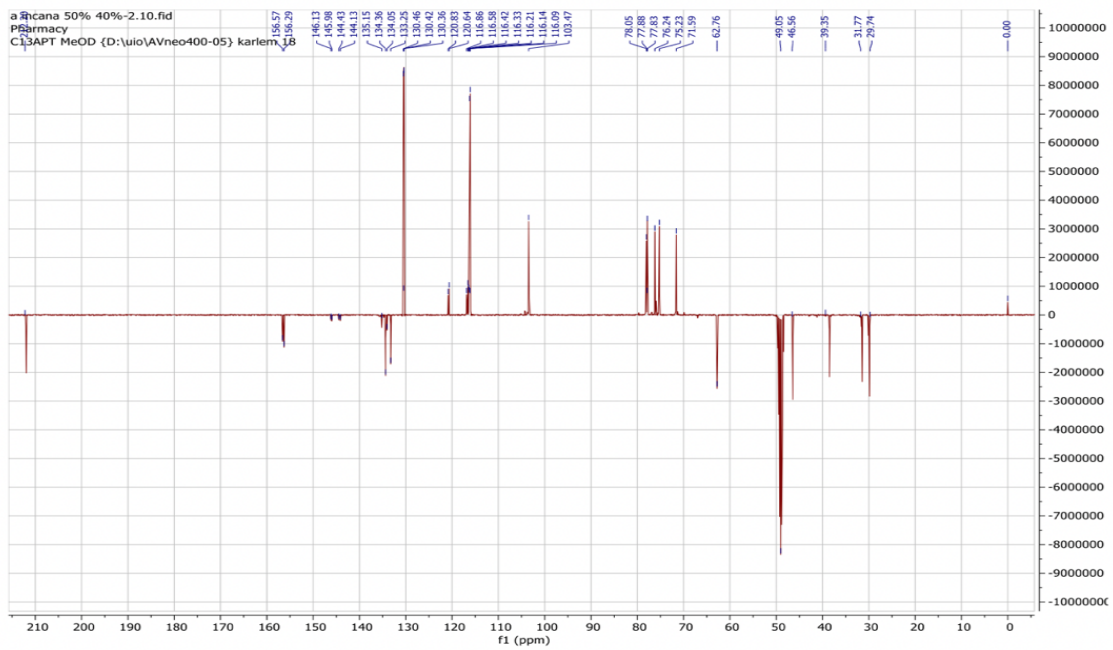
Figur 4: ^{13}C -NMR-spekter av AI-E-D2-S2 [CD_3OD]



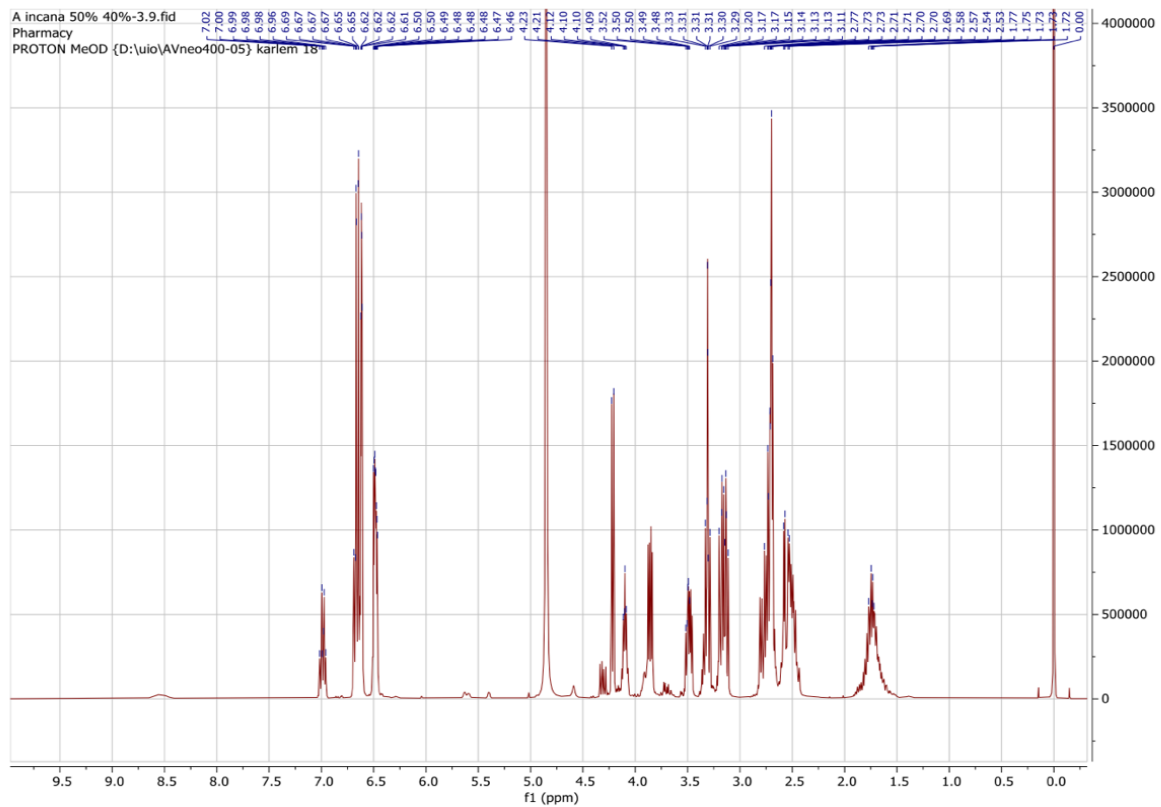
Figur 5: ^1H -NMR-spekter av AI-E-D2-S3[CD_3OD]



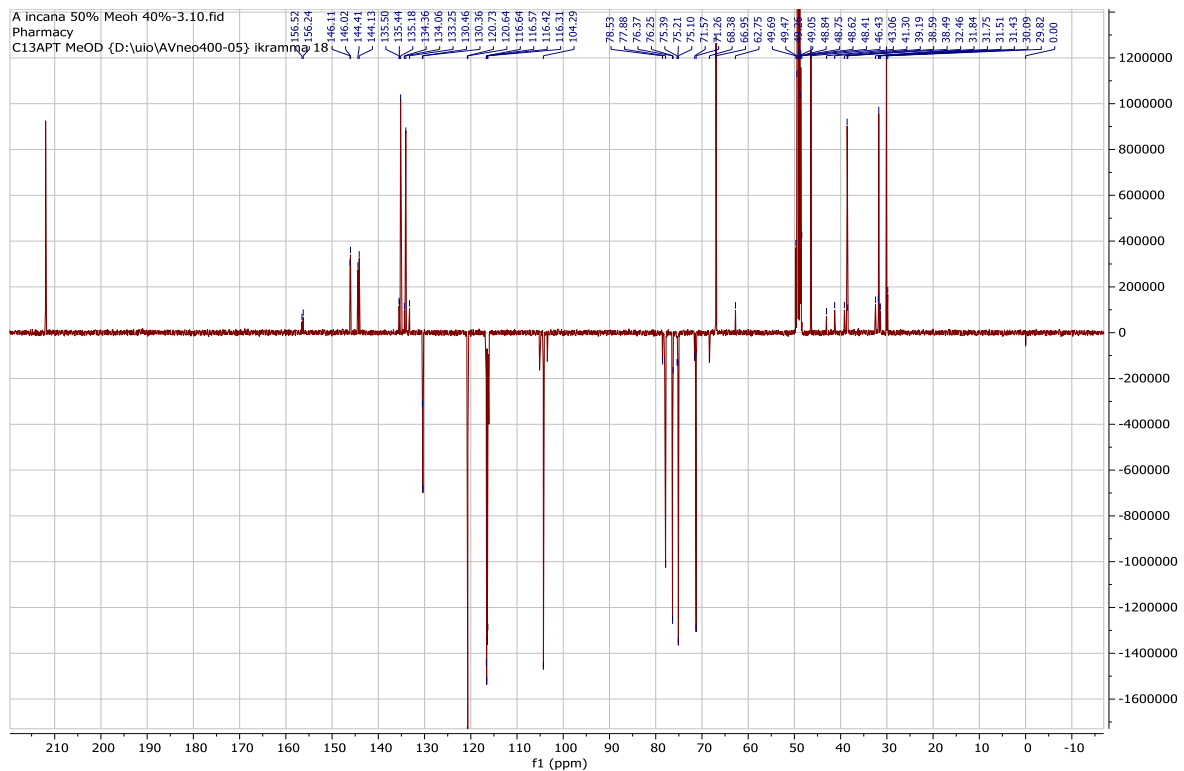
Figur 6: ^{13}C -NMR-spekter av AI-E-D2-S3[CD_3OD]



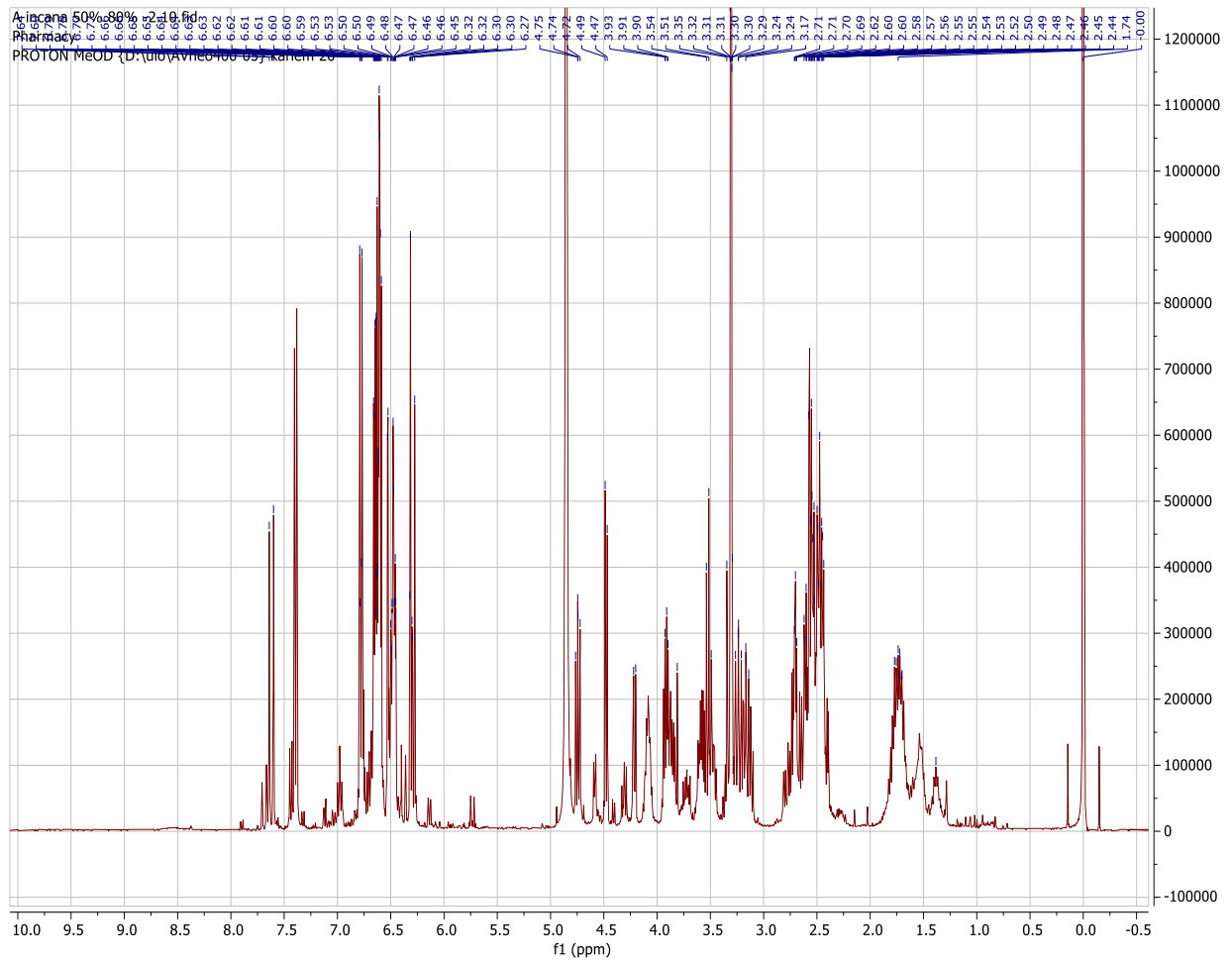
Figur 7: ^1H -NMR-spekter av AI-E-D2-S4[CD_3OD]



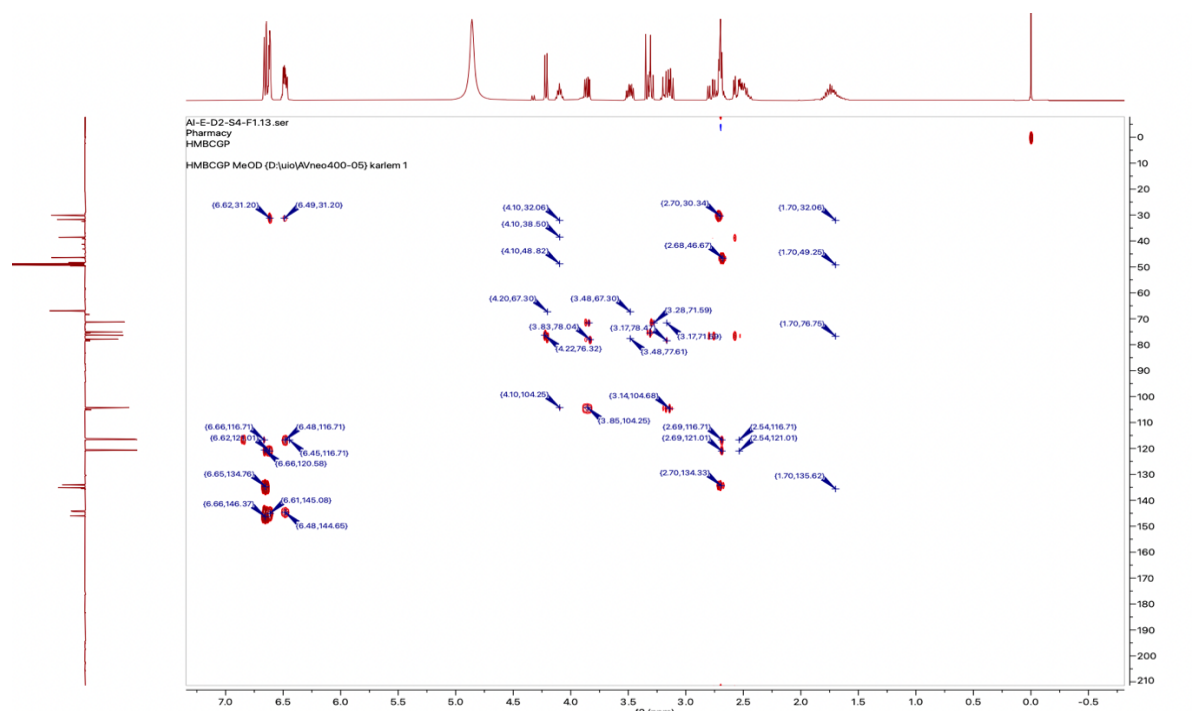
Figur 8: ^{13}C -NMR-spekter av AI-E-D2-S4 [CD_3OD]



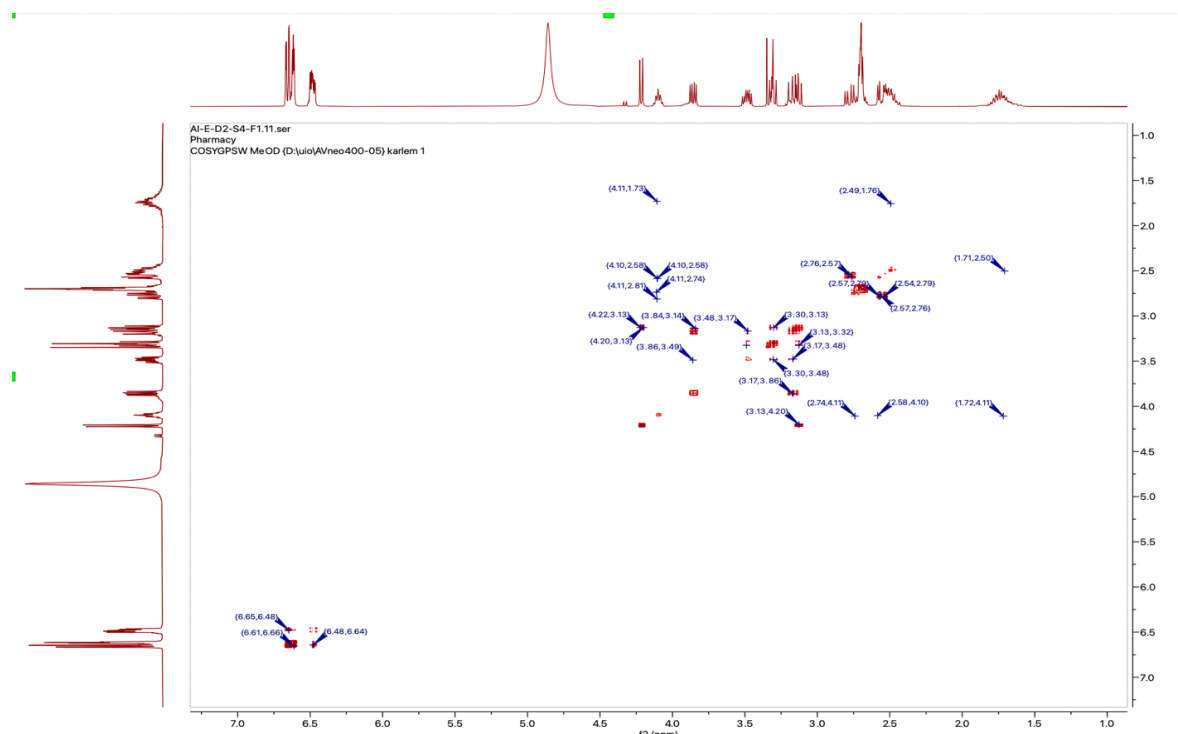
Figur 9: ¹H-NMR-spekter av AI-E-D2-S6 [CD₃OD]



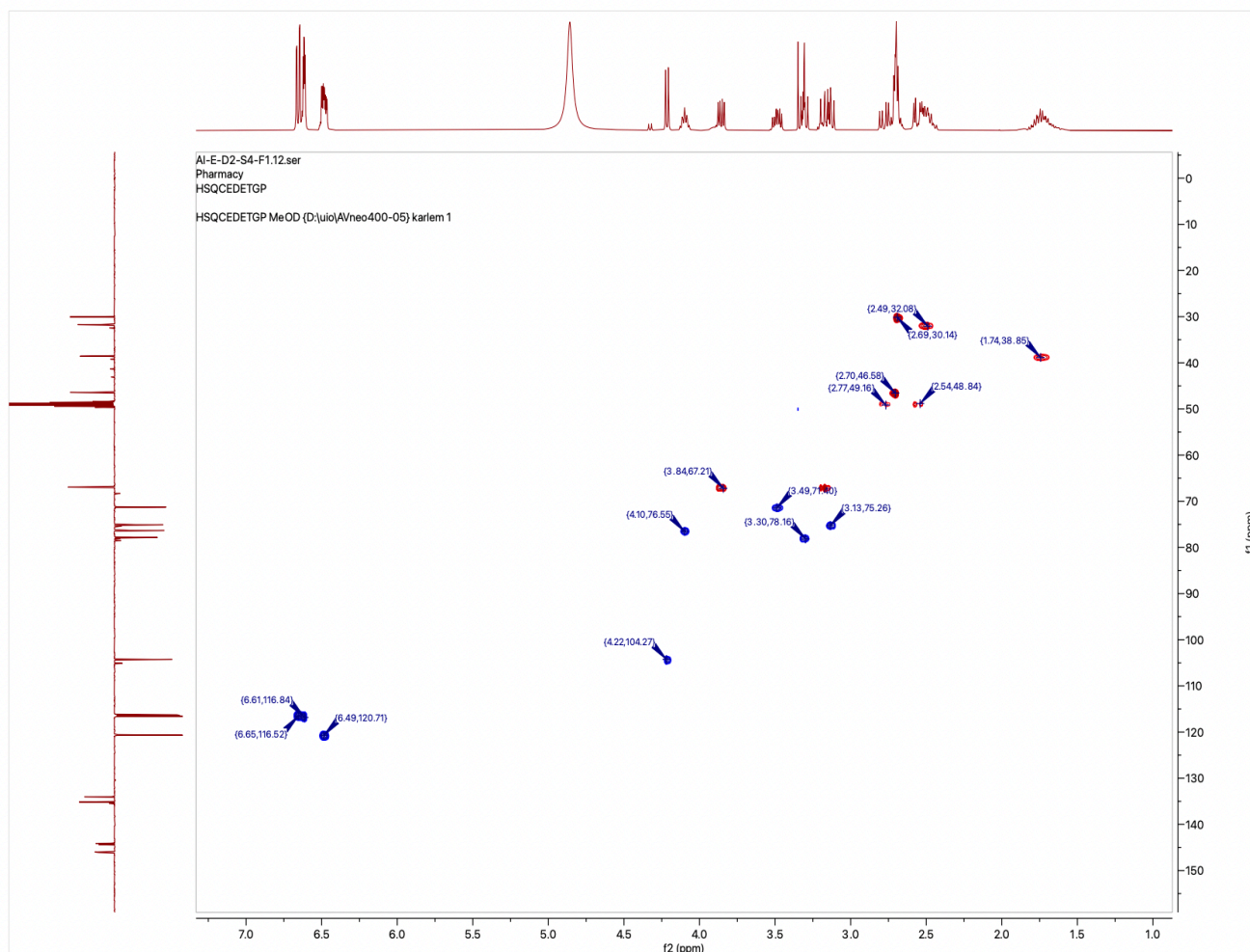
Figur 12: HMBC -spekter av AI-E-D2-S4-F1 [CD₃OD]



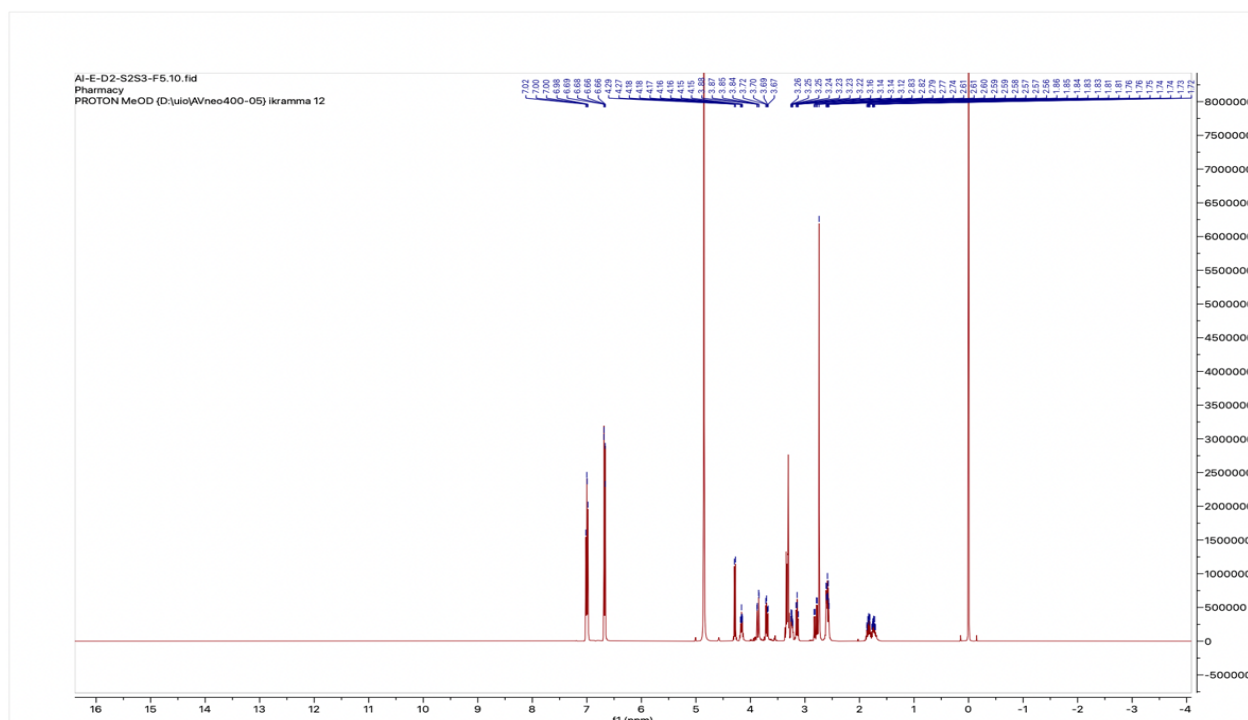
Figur 13: COSY-spekter av AI-E-D2-S4-F1 [CD₃OD]



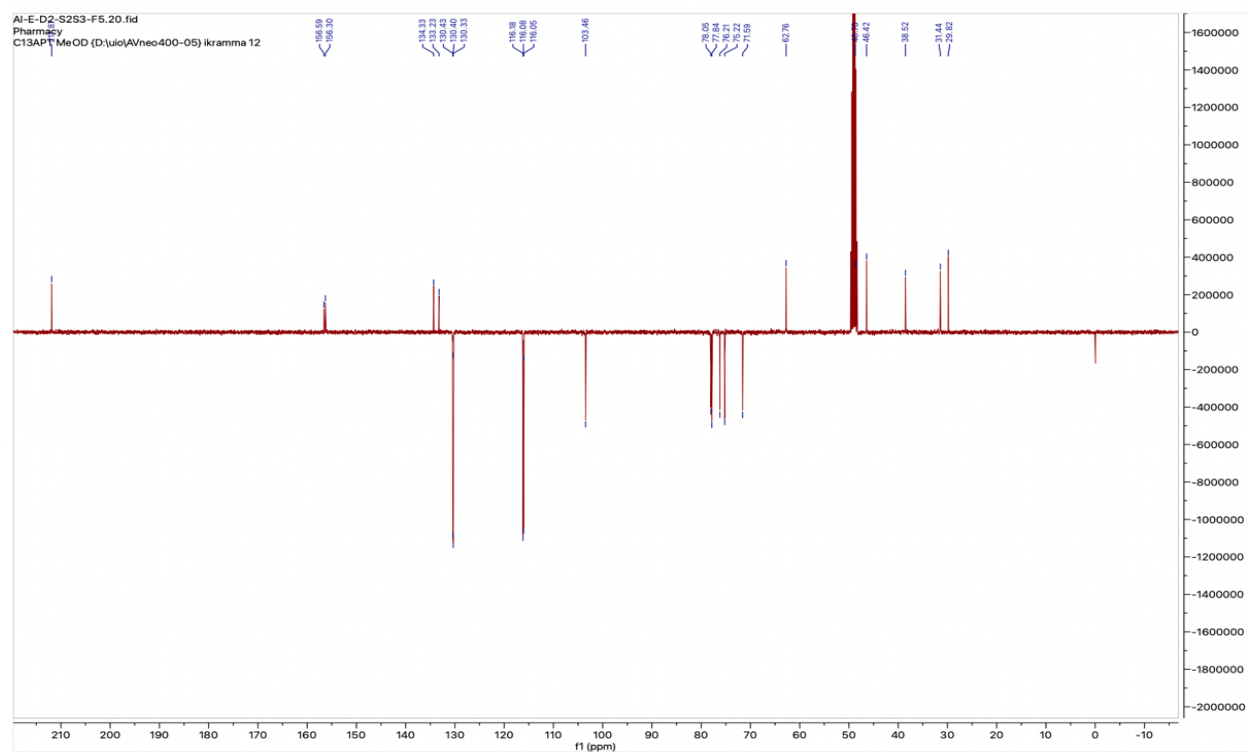
Figur 14: HSQC-spekter av AI-E-D2-S4-F1 [CD₃OD]



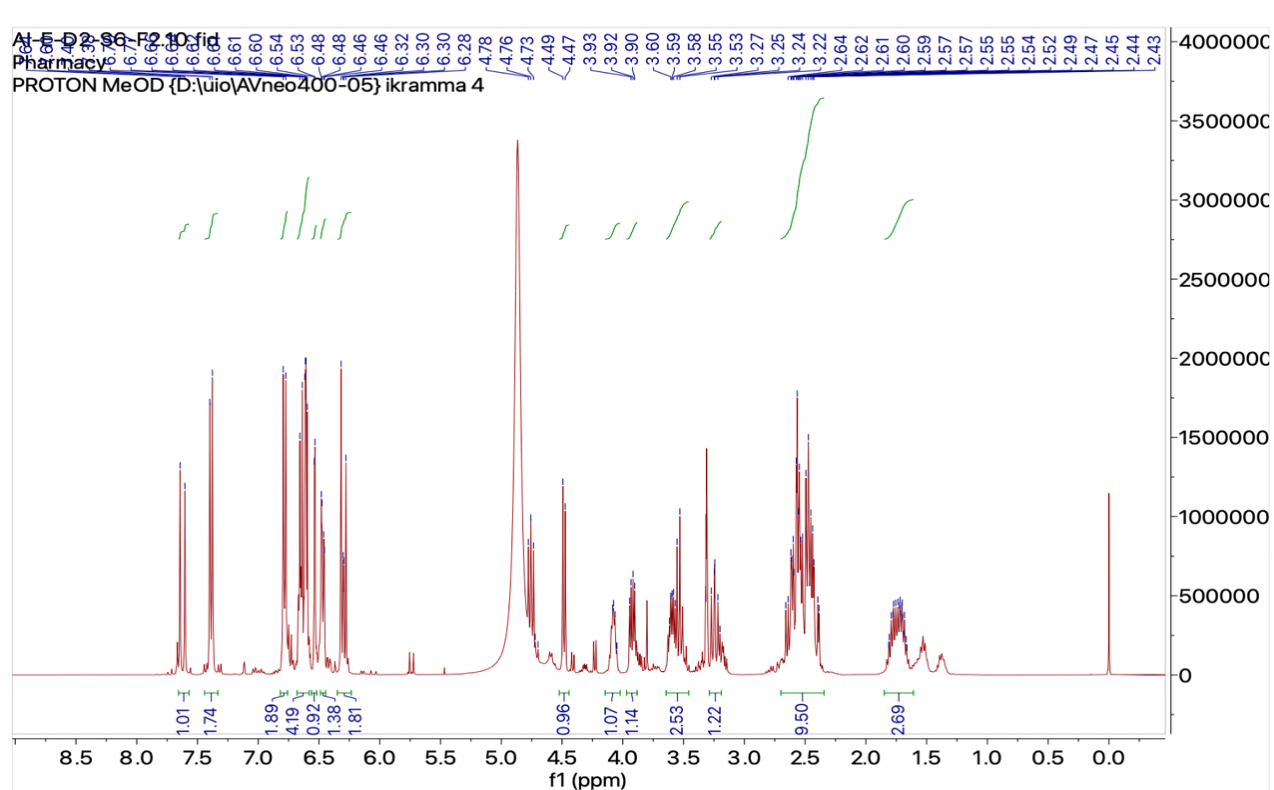
Figur 16: ^1H -NMR-spekter av AI-E-D2-S2S3-F5[CD_3OD]



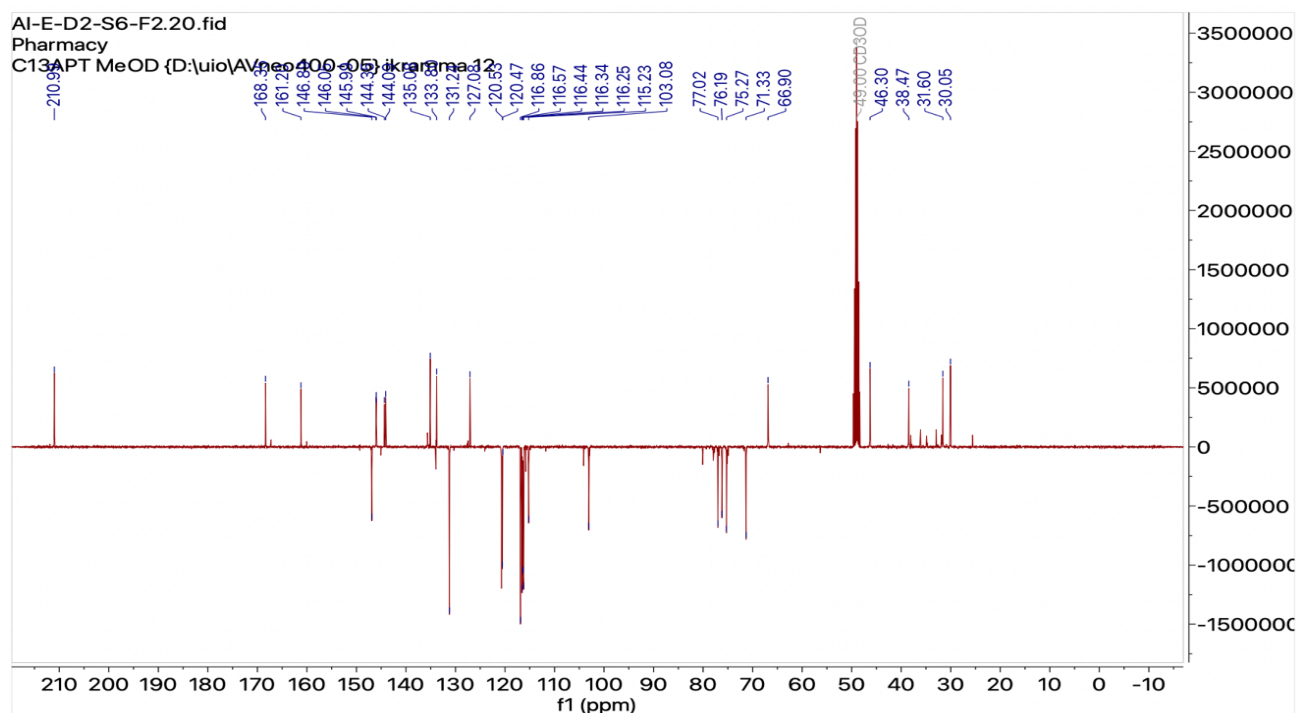
Figur 17: ^{13}C -NMR spekter av AI-E-D2-S2S3 -F5 [CD_3OD]



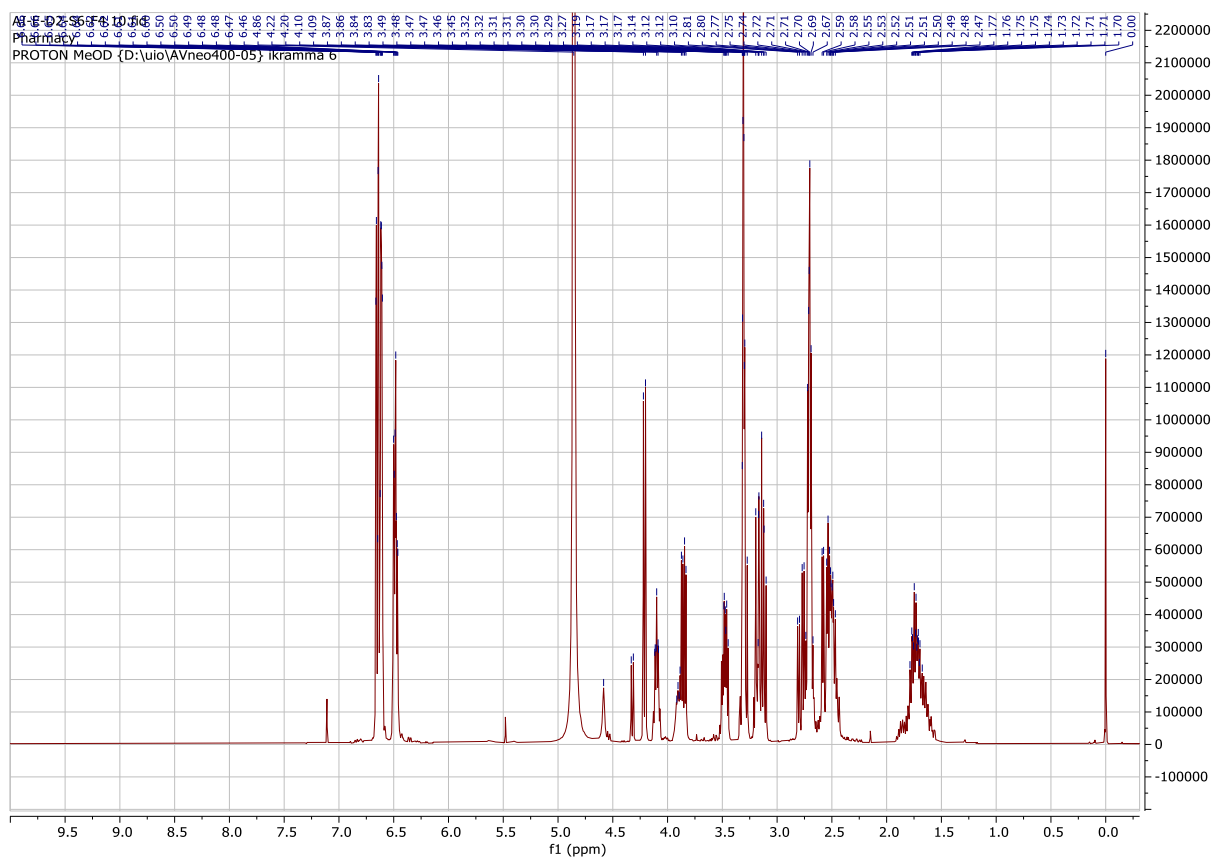
Figur 18: ^1H -NMR spekter av AI-E-D2-S6-F2 [CD_3OD]



Figur 19: ^{13}C -NMR-spekter av AI-E-D2-S6-F2 [CD_3OD]



Figur 20: ¹H-NMR-spekter av AI-E-D2-S6-F4 [CD₃OD]



Vedlegg B: DISC assay antimikrobielle test

Disc assay til gråorfraksjoner mot fem mikroorganismer:

Staphylococcus aureus ATCC6538

Tabell 1: Resultater fra disc-assay for *S. aureus* med ulike fraksjoner fra gråor. Hemmingsone er gitt som radius målt i millimeter med skyvelære i både vertikal og horisontal retning. Gjennomsnittet av tre replikanter, fraksjoner samt positiv kontroll (G) er vist i tabellen.

	Replikant A		Replikant B		Replikant C	
	Radius målt	Gjennomsnittet	Radius målt	Gjennomsnittet	Radius målt	Gjennomsnittet
	Positiv kontroll kloramfenikol 30 µg/ml					
G	29,1 30	29,55	28,6 29	28,8	29 29,1	29,05
	Fraksjoner					
Råekstraktet	7,5 7	7,25	7,3 7,4	7,35	7 7,3	7,15
AI-E-D1	7,8 8,3	8,05	8,1 8,4	8,25	8,4 8,2	8,3
AI-E-D2	12,4 11,7	12,05	14 15	14,5	11 14	12,5
AI-E-D3	7 7,4	7,2	7 6,4	6,7	7 7,6	7,3

Bacillus subtilis ATCC6633

Tabell 2: Radius målt i mm med skyvelære i både vertikal og horisontal retning og gjennomsnittet av positiv kontroll for begge replikanter til *B. subtilis*.

	Replikant A		Replikant B	
	Radius målt	Gjennomsnittet	Radius målt	Gjennomsnittet
	Positiv kontroll tetracyclin 30 mg/ml			
G	35 34,6	34,8	33 35	34

Pseudomonas aeruginosa ATCC9029

Tabell 3: Radius målt i mm med skyvelære i både vertikal og horisontal retning og gjennomsnittet av positiv kontroll for begge replikanter til mikroorganismen *P. aeruginosa*

	Replikant A		Replikant B	
	Radius målt	Gjennomsnittet	Radius målt	Gjennomsnittet
	Positiv kontroll gentamycin sulfat 20 mg/ml			
G	27 26,7	26,85	25 25,4	25,2

E. coli ATCC8739

Tabell 4: Radius målt i mm med skyvelære i både vertikal og horisontal retning og gjennomsnittet av positiv kontroll for begge replikanter til mikroorganismen *E. coli*

	Replikant A		Replikant B	
	Radius målt	Gjennomsnittet	Radius målt	Gjennomsnittet
	Positiv kontroll gentamycin sulfat 20 mg/ml			
G	25 24,2	24,6	25,5 25	25,25

Candida albicans

Tabell 5: Radius målt i mm med skyvelære i både vertikal og horisontal retning og gjennomsnittet av positiv kontroll for begge replikanter til mikroorganismen *C. albicans*

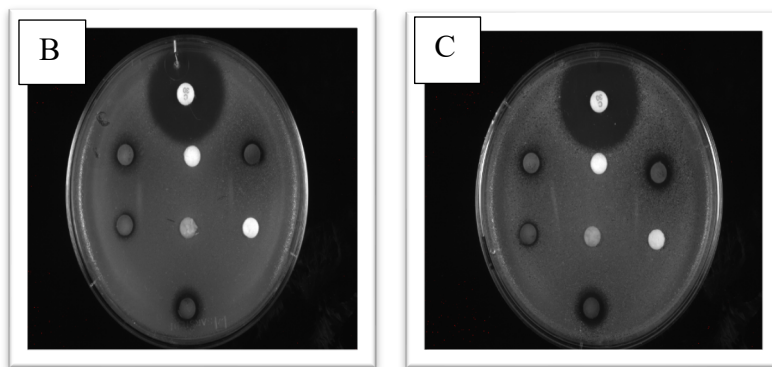
	Replikant A		Replikant B1		Replikant B2	
	Radius målt	Gjennomsnittet	Radius målt	Gjennomsnittet	Radius målt	Gjennomsnittet
	Positiv kontroll miconazole nitrate 100 mg/ml					
G	47 35	41	36 34,6	35,3	35 36	35,5

Tabell 6: Resultater fra disc-assay for de testede mikroorganismene med ulike fraksjoner fra gråor.

Hemmingssone er gitt som målt radius i millimeter for de ulike fraksjonene og for positiv og negativ kontroll.

Mikroorganisme	<i>S. aureus</i>			<i>B. subtilis</i>		<i>P. aeruginosa</i>		<i>C.albicans</i>		<i>E. coli</i>	
	1	2	3	1	2	1	2	1	2	1	2
Antall forsøk	1	2	3	1	2	1	2	1	2	1	2
Positiv kontroll	29,55	28,8	29,05	34,8	34	26,85	25,2	41	35,4	24,6	25,25
Råekstraktet	7,25	7,35	7,15	0	0	0	0	0	0	0	0
AI-E-D1	8,05	8,25	8,3	0	0	0	0	0	0	0	0
AI-E-D2	12,05	14,5	12,5	0	0	0	0	0	0	0	0
AI-E-D3	7,2	6,7	7,3	0	0	0	0	0	0	0	0
AI-E-D4	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
MeOH**	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Acetone**	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

** negativ kontroll

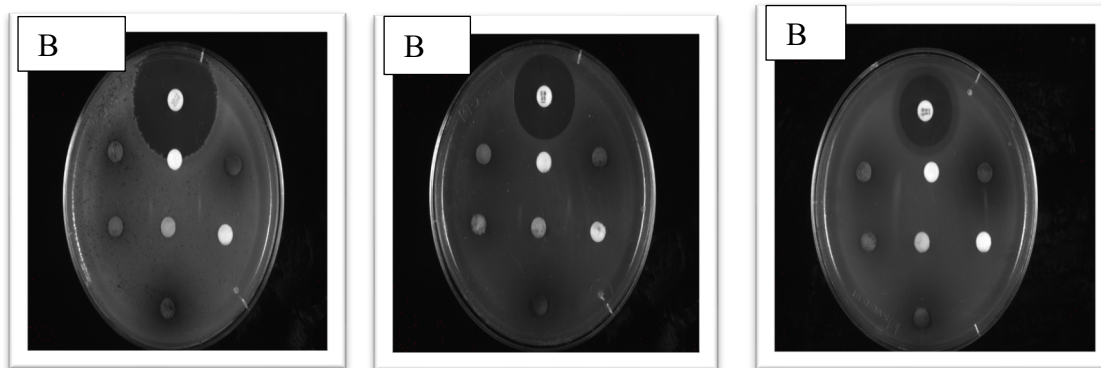


Figur 1: Resultat av antimikrobiell aktivitet av gråorfraksjoner med *S. aureus* med bruk av disc assay metoden for replikant B og C. Bildene ble tatt med Gel Doc TM XR+ with image LabTM Software fra BIO-RAD.

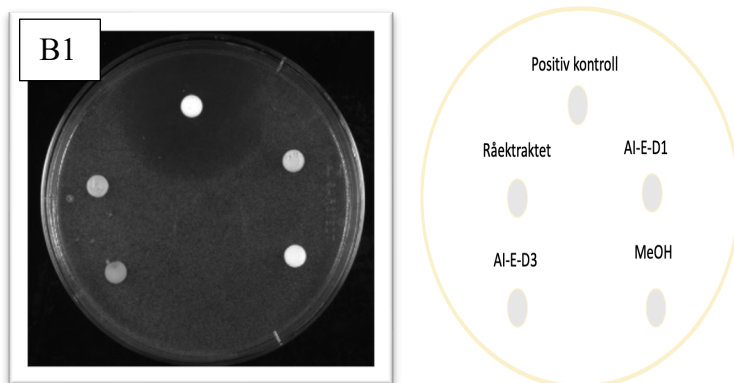
Bacillus subtilis

Pseudomonas aeruginosa

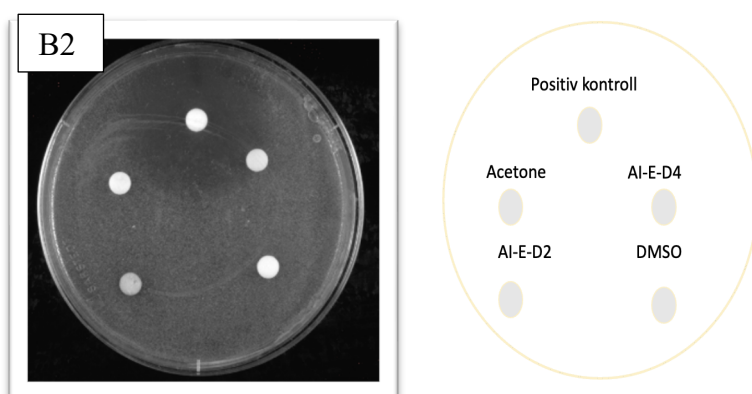
E. coli



Figur 2: Resultatene av antimikrobiell aktivitet av gråorfraksjoner mot *B. subtilis*, *P. aeruginosa* og *E. coli* for Replikant B, som ble observert ved hjelp av disc assay metoden. Bildene ble tatt med Gel Doc TM XR+ with image LabTM Software fra BIO-RAD.



Figur 3: Resultat av antimikrobiell aktivitet av gråorfraksjoner mot *C. albicans* med bruk av disc assay metoden for Replikant B (til venstre). Diagrammet til høyre viser plasseringen av papirskiver på MH petrisk al for disc diffusjonsmetode til Replikant B1. Bildet ble tatt med Gel Doc TM XR+ with image LabTM Software fra BIO-RAD



Figur 4: Resultat av antimikrobiell aktivitet av gråorfraksjoner mot *C. albicans* med bruk av disc assay metoden for Replikant B2 (til venstre). Diagrammet til høyre viser plasseringen av papirskiver på MH petrisk al for disc diffusjonsmetode til Replikant B2. Bildet ble tatt med Gel Doc TM XR+ with image LabTM Software fra BIO-RAD

Vedlegg C: MIC assay antimikrobielle test

MIC-bestemmelse av gråorfraksjoner mot *E. coli*

Tabell 1: Resultater fra MIC -bestemmelse med *E. coli* mikroorganismen med ulike fraksjoner fra gråor., Inokulum kontroll cfu/ml, MIC antibiotika µg/ml, fraksjoner, positiv kontroll og DMSO av alle tre parallelle forsøker.

Microorganism <i>E-coli</i>	Inokulum kontroll CFU/ml	MIC Antibiotika (µg/ml) +inokulum	Fraksjoner	Positiv kontroll (MHB+ Inokulu m	DMSO + inokulum
Ampicilin (50 mg/ml)					
FRAKSJON S1					
Første forsøket	6.10 ³	8	V	V	V
Andre forsøket	1.98.10 ³	4	V	V	V
Tredje forsøket	2. 040.10 ³	4	V	V	V
Fjerde forsøket	1.9.10 ³	4	V	V	V
FRAKSJONS2S3					
Første forsøket	6.10 ³	8	V	V	V
Andre forsøket	1.98.10 ³	4	V	V	V
Tredje forsøket	2. 040.10 ³	4	V	V	V
Fjerde forsøket	1.9.10 ³	4	V	V	V
FRAKSJON S4					
Første forsøket	6.10 ³	8	V	V	V
Andre forsøket	1.98.10 ³	4	V	V	V
Tredje forsøket	2. 040.10 ³	4	V	V	V
Fjerde forsøket	1.9.10 ³	4	V	V	V
FRAKSJON S5					
Første forsøket	6.10 ³	8	V	V	V
Andre forsøket	1.98.10 ³	4	V	V	V
Tredje forsøket	2. 040.10 ³	4	V	V	V
Fjerde forsøket	1.9.10 ³	4	V	V	V
FRAKSJON S6					
Første forsøket	1.42.10 ³	8	V	V	V
Andre forsøket	1.6.10 ³	4	V	V	V
Tredje forsøket	1.920.10 ³	4	V	V	V
Fjerde forsøket	2.4. 10 ³	4	V	V	V
FRAKSJON S7					
Første forsøket	1.42.10 ³	8	V	V	V
Andre forsøket	1.6.10 ³	4	V	V	V
Tredje forsøket	1.920.10 ³	4	V	V	V
Fjerde forsøket	2.4. 10 ³	4	V	V	V
FRAKSJON S8					
Første forsøket	1.42.10 ³	8	V	V	V
Andre forsøket	1.6.10 ³	4	V	V	V
Tredje forsøket	1.920.10 ³	4	V	V	V
Fjerde forsøket	2.4. 10 ³	4	V	V	V
FRAKSJON S9					
Første forsøket	1.42.10 ³	8	V	V	V
Andre forsøket	1.6.10 ³	4	V	V	V
Tredje forsøket	1.920.10 ³	4	V	V	V
Fjerde forsøket	2.4. 10 ³	4	V	V	V
FRAKSJONS10					

Første forsøket	1.64.10 ³	2	V	V	V
Andre forsøket	1.68.10 ³	2	V	V	V
FRAKSJONS11					
Første forsøket	1.64.10 ³	2	V	V	V
Andre forsøket	1.68.10 ³	2	V	V	V
FRAKSJONS12					
Første forsøket	1.64.10 ³	2	V	V	V
Andre forsøket	1.68.10 ³	2	V	V	V
FRAKSJONS13					
Første forsøket	1.64.10 ³	2	V	V	V
Andre forsøket	1.68.10 ³	2	V	V	V
FRAKSJONS14					
Første forsøket	1.64.10 ³	2	V	V	V
Andre forsøket	1.68.10 ³	2	V	V	V

V: vekst

Tabell 2: DMSO konsentrasjon som ble testet i 96 brønners plate format for begge mikroorganismer.

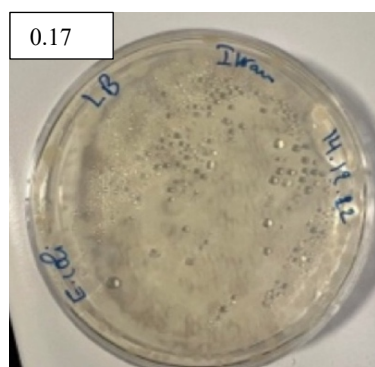
konsentrasjon av DMSO	volum DMSO (µl)	Volum MHB (µl)
25% (0,25)	250	750
50% (0,5)	500	500
100% (1)	1000	-
10% (0,1)	100	900
5% (0,05)	50	950
1% (0,01)	10	990

Tabell 3: Ønsket OD og målt OD600 som ble brukt til utvikling av OD vs. cfu/ml bakterie inokulum til *E. coli*, samt volum av bakterie inokulum og MHB som utgjør til sammen 100 μ l.

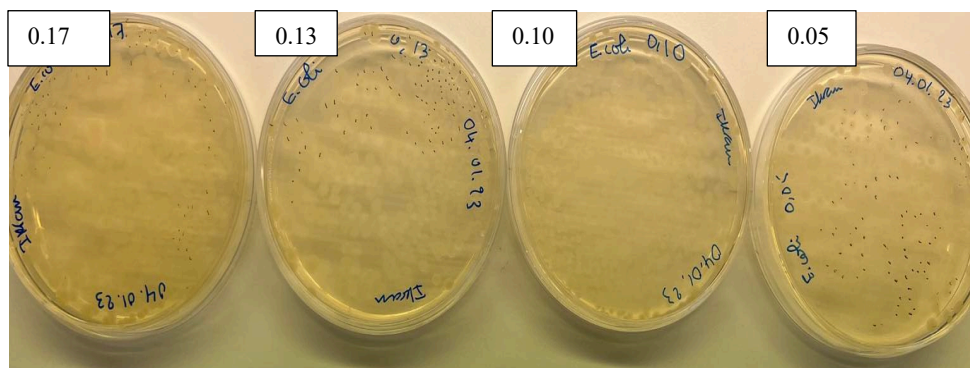
<i>E. coli</i>	Ønsket OD	Målt OD600	Bakterie inokulum (μ l)	MHB (μ l)
Første forsøket	0.17	0.400	42.5	57.5
Andre forsøket	0.17	0.410	41	59
	0.13	0.410	31	69
	0.10	0.410	24	76
	0.05	0.410	12	88
Tredje forsøket	0.15	0.214	70	30
	0.05	0.214	23	77
	0.015	0.214	7	93
Fjerde forsøket	0.15	0.171	87	13
	0.05	0.171	29	71
	0.015	0.171	8	92
	0.005	0.171	10ul (0.05)	90
	0.0015	0.171	10 ul (0.015)	90

Tabell 4: Målt OD600 til alle 3 parallelle forsøker av gråor fraksjoner med bakterie inokulum *E. coli*. 1 (første forsøket), 2 (andre forsøket), 3 (tredje forsøket), og 4 (fjerde forsøket).

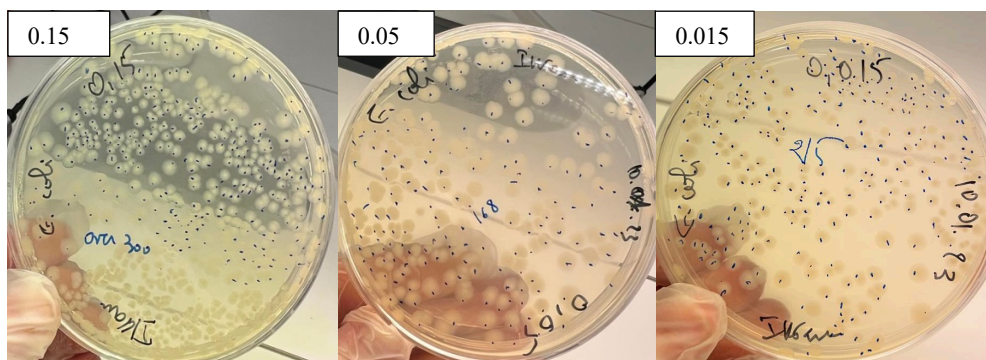
	Målt OD600	Bakterieinokulum (µl)	MHB (µl)
<u>Parallell 1:</u> Fraksjoner S1, S2, S3, S4 og S5			
1	0.214	70	30
2	0.171	87	13
3	0.556	26.98	73.02
4	0.241	62.24	37.76
<u>Parallell 2:</u> Fraksjoner S6, S7, S8, S9			
1	0.348	43.10	56.9
2	0.342	43.85	56.14
3	0.534	28.08	71.91
4	0.438	34.8	65.2
<u>Parallell 3:</u> Fraksjoner S10, S11, S12, S13, S14			
1	0.243	61.72	38.27
2	0.200	75	25



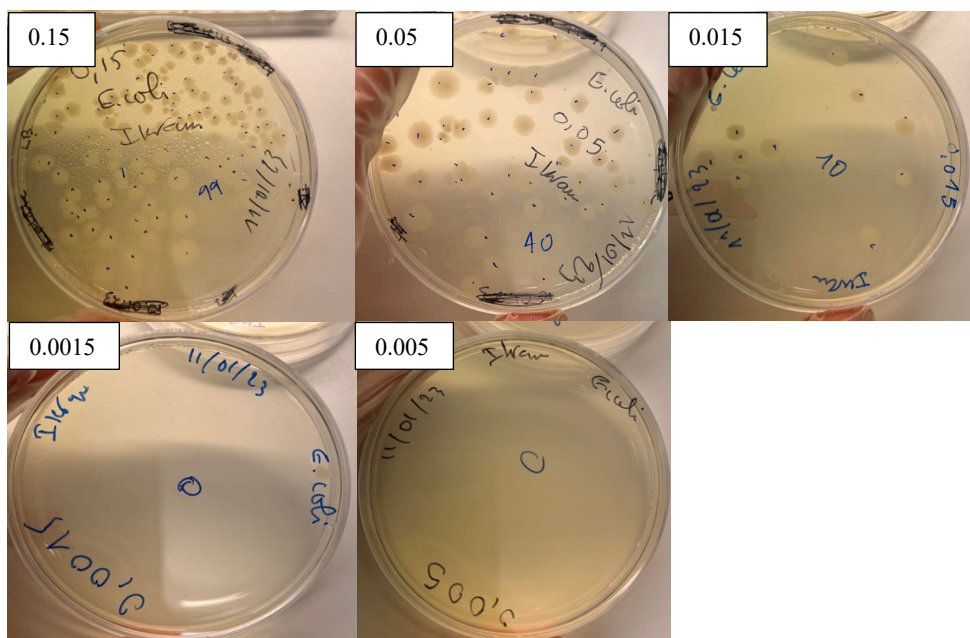
Figur 1: Resultat av det første forsøket til utvikling av OD vs cfu/ml til *E. coli* med OD 0.17, antall kolonier i næringsagar er over 300.



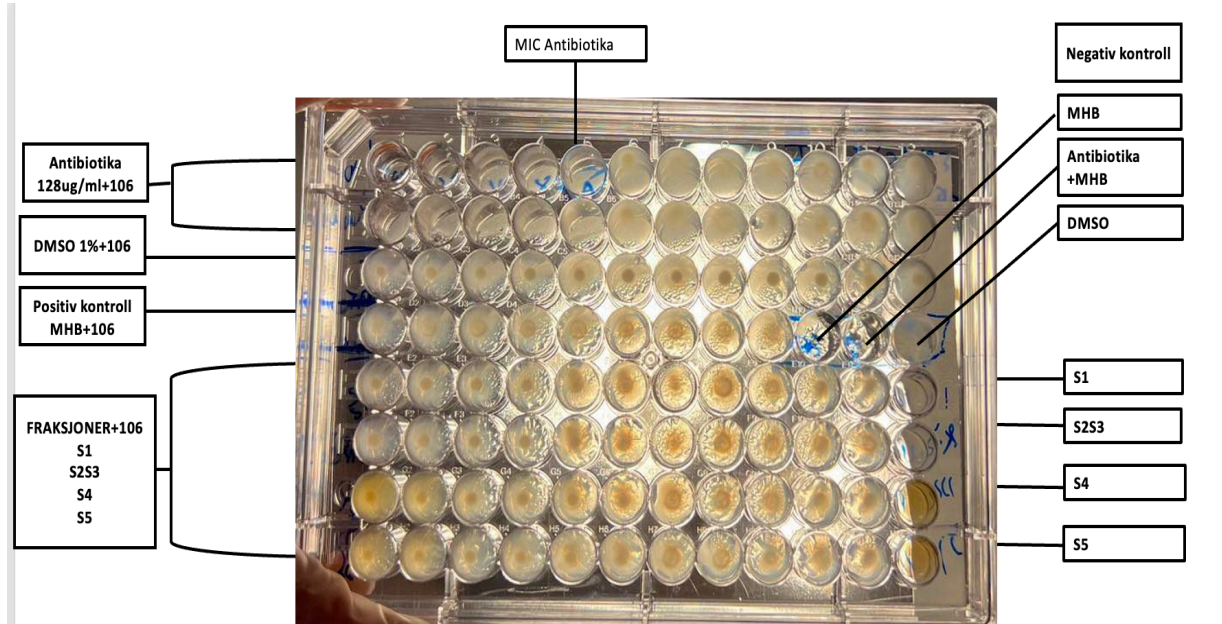
Figur 2: Resultater av det andre forsøket til utvikling av OD til E. coli, antall kolonier med alle OD som ble testet. 0.17,0.13,0.10,0.05, ble over 300 kolonier.



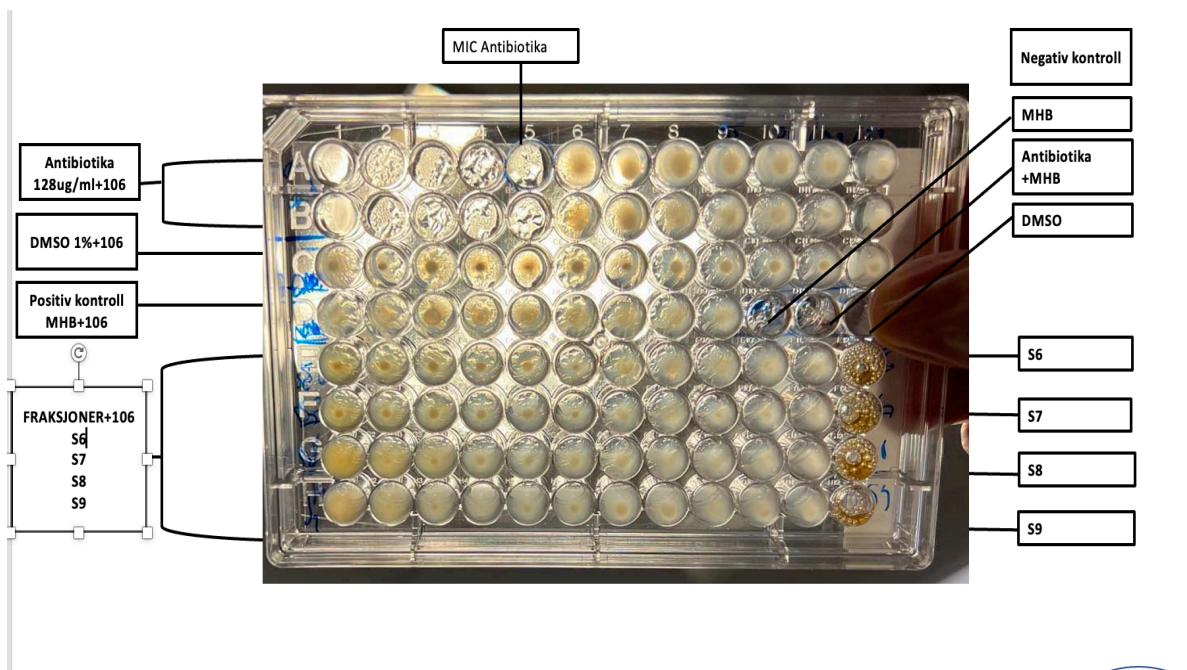
Figur 3: Resultater av det tredje forsøket til utvikling av OD til E. coli med OD 0.15, 0.05 og 0.015, antall kolonier på næring agarer. med OD 0.15 ble over 300, neste bilde med OD 0.05 ble det 168 og siste bilde med OD 0.015 ble det 215 kolonier.



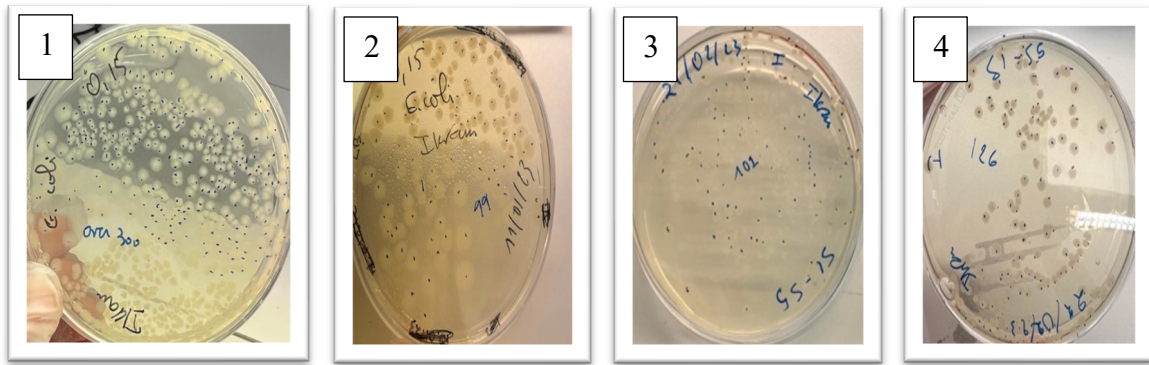
Figur 4: Resultater av det fjerde forsøket til utvikling av OD til E. coli med OD 0.15, 0.05, 0.015, 0.005 og 0.0015, antall kolonier på næring agarer. Med OD 0.15 ble det 99 kolonier, med OD 0.05 ble det 40 og bilde med OD 0.015 ble det 10 kolonier og med OD 0.005 og 0.0015 ble det ingen kolonier.



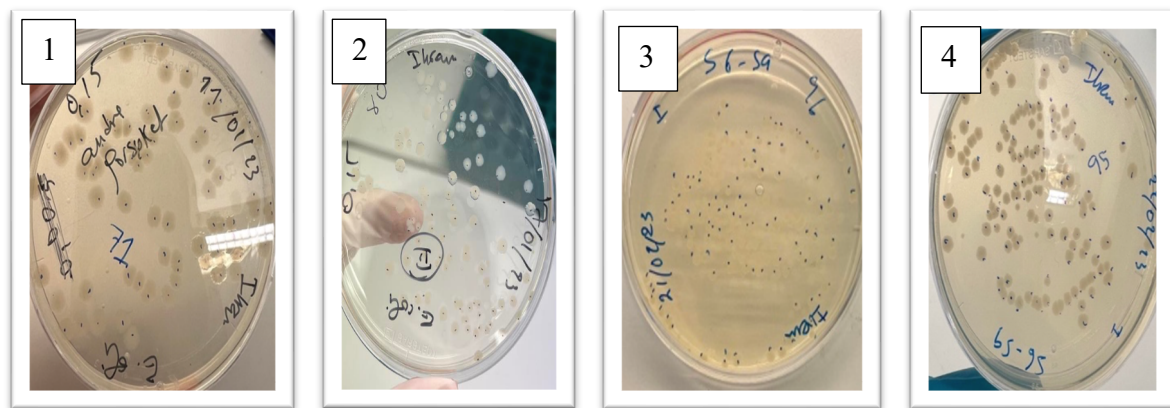
Figur 5: Resultater en utvalgte MIC-bestemmelse for *E. coli* utført i en 96-brønnsplate format. Platebrønnene inneholder antibiotika ampicillin, 1% DMSO, positiv kontroll, fraksjoner S1-S5 med bakterie inokulum (*E. coli*), negativ kontroll med kun MHB, antibiotika og MHB, DMSO og kun rene fraksjoner (bakterie inokulum=106)



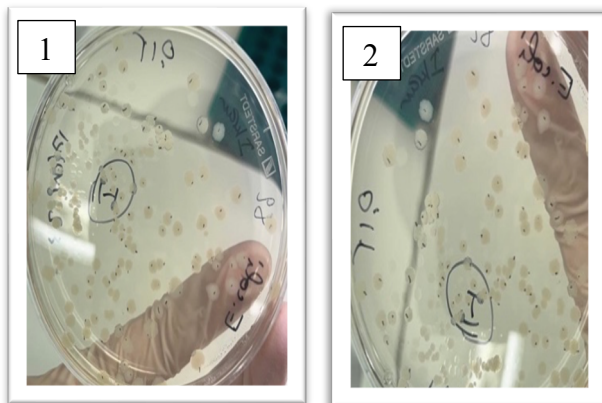
Figur 6: Resultater av en utvalgte MIC-bestemmelse for *E. coli* i en 96-brønnsplate format. Platebrønnene inneholder antibiotika ampicillin, 1% DMSO, positiv kontroll, fraksjoner S6-S9 med bakterie inokulum (*E. coli*), negativ kontroll med kun MHB, antibiotika og MHB, DMSO og kun rene fraksjoner (bakterie inokulum=106)



Figur 7: Inokulumkontrollen (*E. coli*) med fraksjoner S1-S5 til alle fire replikanter, (1, 2, 3 og 4) til det første parallellen. Resultatene viste at i, 1) 300 kolonier, 2) 99 kolonier, 3) 102 kolonier og 4) 126 kolonier.



Figur 8: Inokulumkontrollen (*E. coli*) med fraksjoner S6-S9 i alle fire replikanter, (1, 2, 3 og 4) til det andre parallellen. Resultatene viste at i, 1) 71 kolonier, 2) 80 kolonier, 3) 96 kolonier, 4) 95 kolonier.



Figur 9: Inokulumkontrollen (*E. coli*) med fraksjoner S10-14 til begge replikanter, (1 og 2) til det tredje parallellen. Resultatene viste at i, 1) 82 kolonier, 2) 84 kolonier.

Vedlegg D: MIC assay antimikrobielle test

MIC-bestemmelse av gråorfraksjoner mot *S. aureus*

Tabell 1: Målt OD600 av to parallelle forsøkene til gråor fraksjoner med bakterieinokulum til *S. aureus*.

Parallel 1: Fraksjoner S1, S2S3, S4 og S5	Målt OD600	Bakterie inokulum(μ l)	MHB(μ l)
1	0.695	2.77	97.23
2	0.465	4.15	95.8
3	0.379	5.092	94.9
Parallel 2: Fraksjoner S6, S7, S8, S9			
1	0.458	4.2	95.8
2	0.460	4.1	95.9

Tabell 2: Tillaging av de 4 rene fraksjoner som ble testet med MIC mot *S. aureus*.

Fraksjoner	Mengde (mg)	DMSO(μ l)
AI-E-D2-S4-F1	15,8	395
AI-E-D2-S2S3-F1	9.5	237
AI-E-D2-S2S3-F5	12,9	322
AI-E-D2-S6-F2	10	250

Tabell 3: Målt OD600 (bakterieinokulum *S. aureus*) til de tre forsøkene av isolerte gråor fraksjoner.

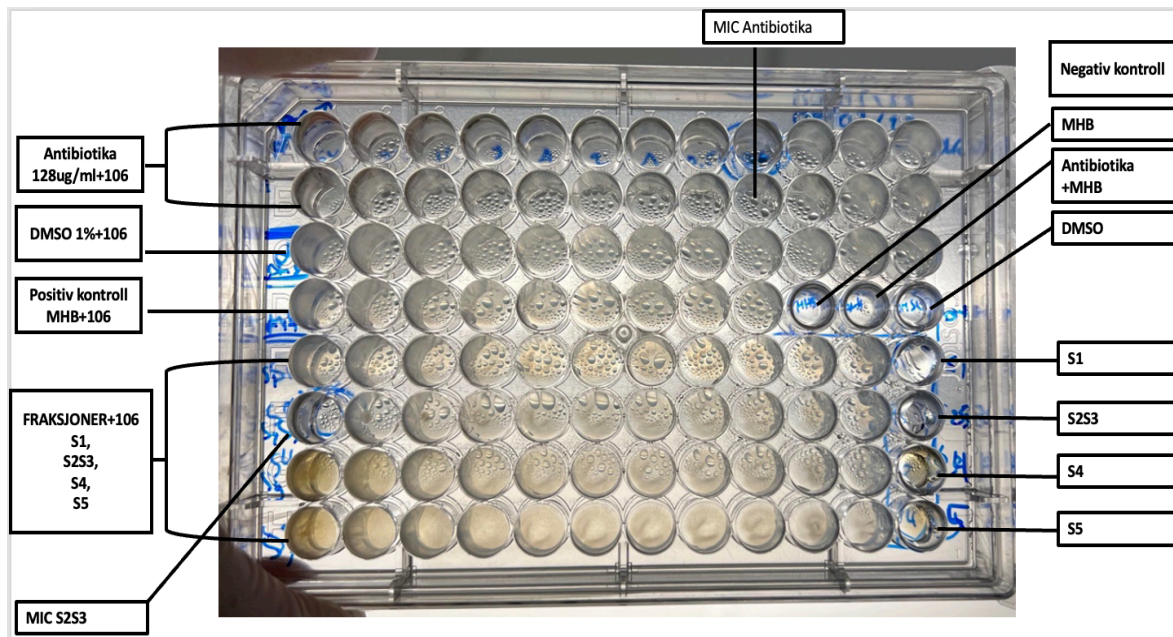
Fraksjoner: AI-E-D2-S4-F1, AI-E-D2-S2S3-F1, AI-E-D2-S2S3-F5, AI-E-D2-S6-F2	Målt OD600	Bakterie inokulum (μ l)	MHB(μ l)
1	0.796	2.425	97.58
2	0.353	5.467	94.53
3	0.745	2.592	97.41

Tabell 4: Resultater fra MIC-bestemmelse med *S. aureus* mikroorganismen, med ulike fraksjoner fra gråor. Inokulumkontroll cfu/ml, MIC antibiotika µg/ml, fraksjoner, positiv kontroll og DMSO av de to parallelle forsøker

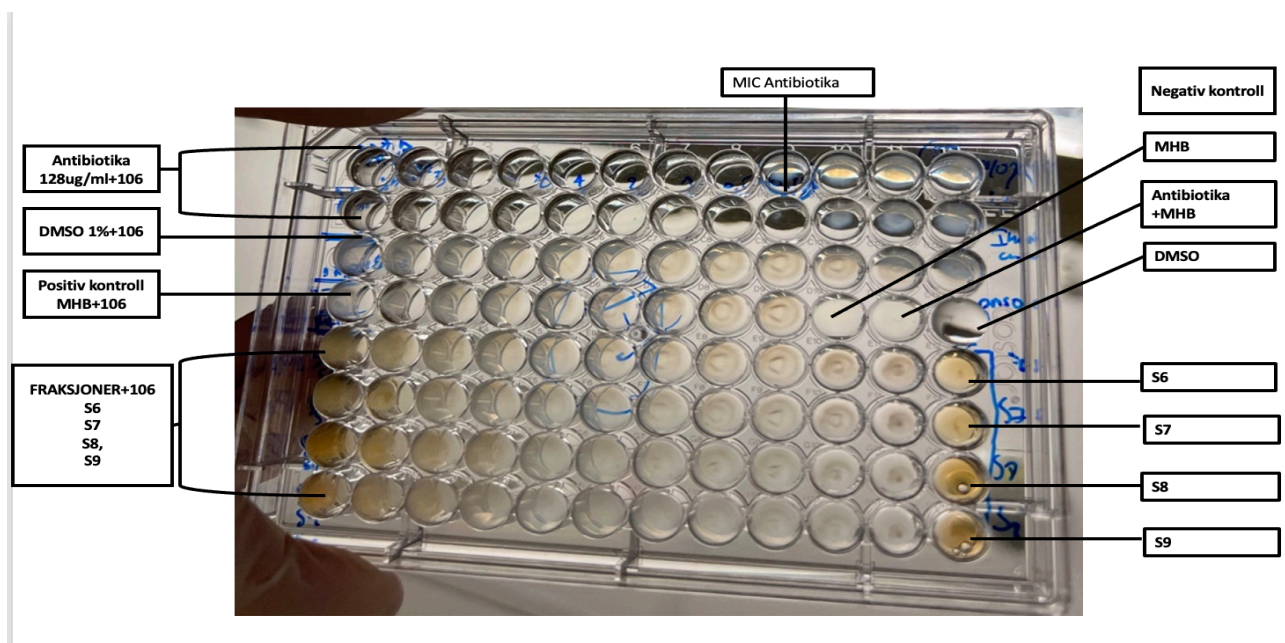
Mikroorganisme <i>Staphylococcus aureus</i>	Inokulum kontroll cfu/ml	Antibiotika (µg/ml)	Fraksjon er µg/ml	Positiv kontroll (MHB+ inokulum)	DMSO + inokulum
Kloramfenikol 34 mg/ml					
FRAKSJON S1					
Første forsøket	3.2.10 ²	0,25	v	v	v
Andre forsøket	5.8. 10 ²	1	v	v	v
Tredje forsøket	3.8. 10 ²	1	v	v	
FRAKSJONS2S3					
Første forsøket	3.2.10 ²	0,25	200	v	v
Andre forsøket	5.8. 10 ²	1	200	v	v
Tredje forsøket	3.8. 10 ²	1	200	v	v
FRAKSJON S4					
Første forsøket	3.2.10 ²	0,25	v	v	v
Andre forsøket	5.8. 10 ²	1	v	v	v
Tredje forsøket	3.8. 10 ²	1	v	v	v
FRAKSJON S5					
Første forsøket	3.2.10 ²	0,25	v	v	v
Andre forsøket	5.8. 10 ²	1	v	v	v
Tredje forsøket	3.8. 10 ²	1	v	v	v
FRAKSJON S6					
Første forsøket	3.4.10 ²	0,25	v	v	v
Andre forsøket	5.6.10 ²	0,5	v	v	v
FRAKSJON S7					
Første forsøket	3.4.10 ²	0,25	v	v	v
Andre forsøket	5.6.10 ²	0,5	v	v	v
FRAKSJON S8					
Første forsøket	3.4.10 ²	0,25	v	v	v
Andre forsøket	5.6.10 ²	0,5	v	v	v
FRAKSJON S9					
Første forsøket	3.4.10 ²	0,25	v	v	v
Andre forsøket	5.6.10 ²	0,5	v	v	v

Tabell 5: Resultater fra MIC-bestemmelse med *S. aureus* mikroorganismen, med ulike fraksjoner fra gråor. Inokulum kontroll cfu/m, MIC antibiotika µg/ml, fraksjoner, positiv kontroll og DMSO av alle 3 parallelle forsøker

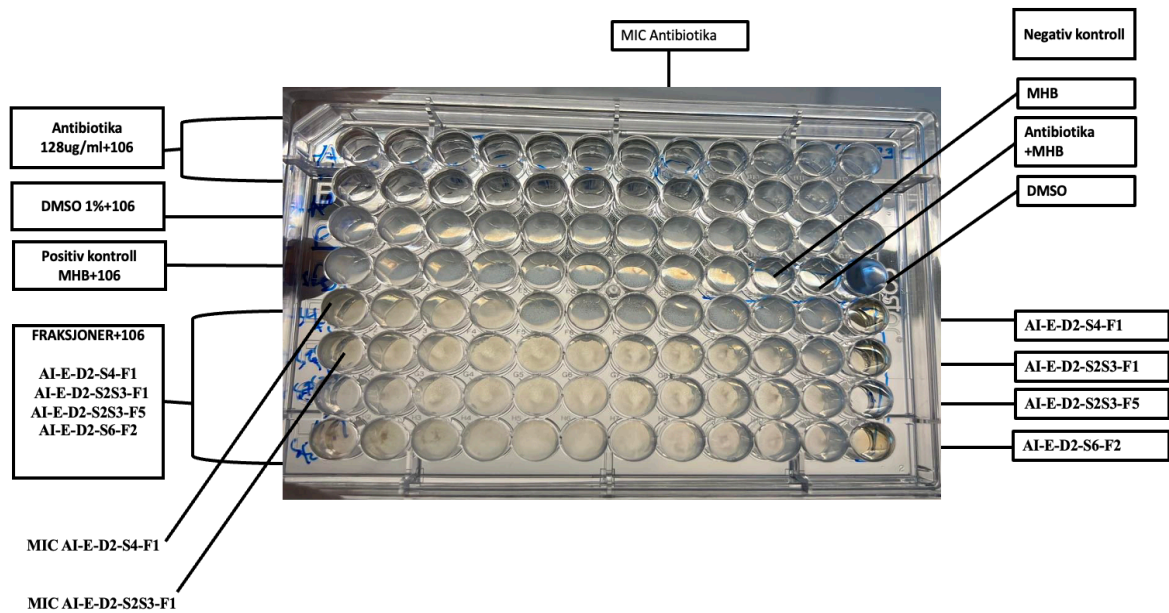
Mikroorganisme <i>Staphylococcus aureus</i>	Inokulum kontroll CFU/ml	MIC Antibiotika + inokulum (µg/ml)	Fraksjoner µg/ml	Positiv kontroll (MHB+ inokulum)	DMSO + inokulum
Kloramfenikol 25 mg/ml					
FRAKSJON AI-E-D2-S4-F1					
Første forsøket	5.8.10 ²	0.5	200	v	v
Andre forsøket	7.8.10 ²	0.5	200	v	v
Tredje forsøket	5.0.10 ²	0.5	200	v	
FRAKSJON AI-E-D2-S2S3-F1					
Første forsøket	5.8.10 ²	0.5	200	v	v
Andre forsøket	7.8.10 ²	0.5	200	v	v
Tredje forsøket	5.0.10 ²	0.5	200	v	v
FRAKSJON AI-E-D2-S2S3-F5					
Første forsøket	5.8.10 ²	0.5	v	v	v
Andre forsøket	7.8.10 ²	0.5	v	v	v
Tredje forsøket	5.0.10 ²	0.5	v	v	v
FRAKSJON AI-E-D2-S6-F2					
Første forsøket	5.8.10 ²	0.5	v	v	v
Andre forsøket	7.8.10 ²	0.5	v	v	v
Tredje forsøket	5.0.10 ²	0.5	v	v	v



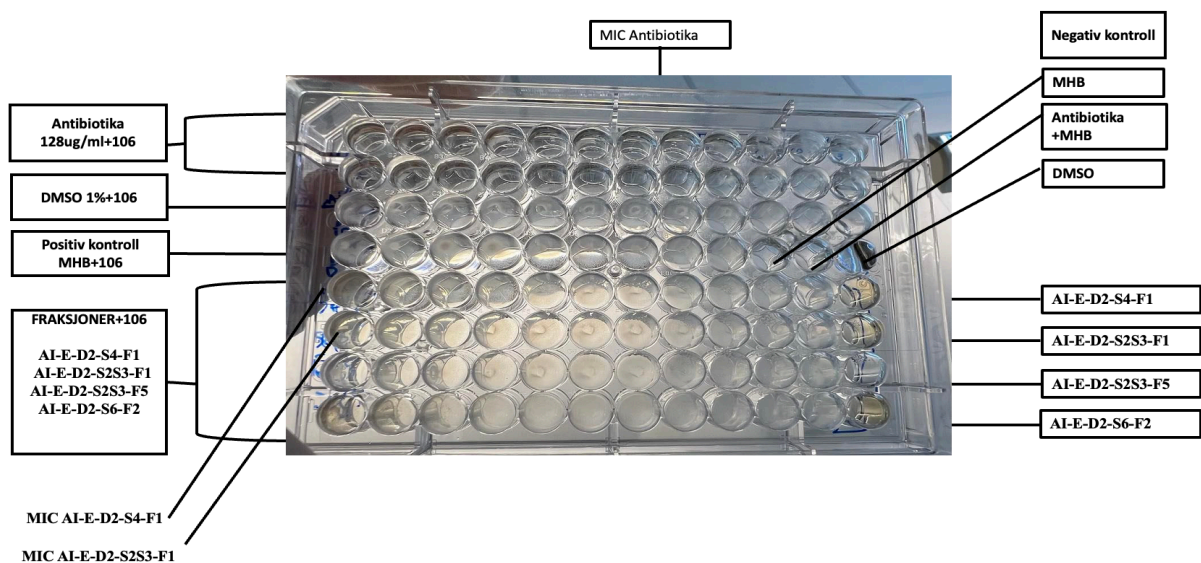
Figur 1: Resultater av en utvalgte MIC-bestemmelse for *S. aureus* i en 96-brønnsplate format. Platebrønnene inneholder antibiotika kloramfenikol, 1% DMSO, positiv kontroll, fraksjoner S1-S5 med bakterie inokulum (*S. aureus*), negativ kontroll med kun MHB, antibiotika og MHB, DMSO og kun rene fraksjoner (bakterie inokulum=106). Fraksjonen AI-E-D2-S2S3 viste en MIC=200 µg/ml.



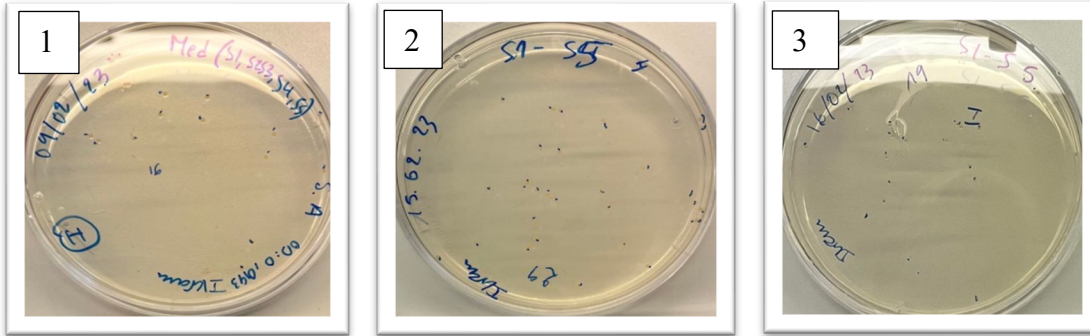
Figur 2: Resultater av en utvalgte MIC-bestemmelse for *S. aureus* i en 96-brønnsplate format. Platebrønnene inneholder antibiotika kloramfenikol, 1% DMSO, positiv kontroll, fraksjoner S6-S9 med bakterie inokulum (*S. aureus*), negativ kontroll med kun MHB, antibiotika og MHB, DMSO og kun rene fraksjoner (bakterie inokulum=106).



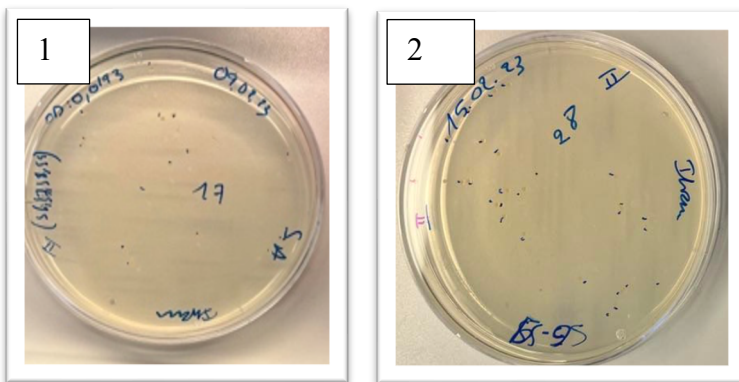
Figur 3: Resultater av Replikant A for MIC-bestemmelse for *S. aureus* i en 96-brønnsplate format. Platebrønnene inneholder antibiotika kloramfenikol, 1% DMSO, positiv kontroll, fraksjonene AI-E-D2-S4-F1, AI-E-D2-S2S3-F1, AI-E-D2-S2S3-F5 og AI-E-D2-S6-F2 og en positiv kontroll (106 står for bakterieinokulum). Fraksjonene AI-E-D2-S2S3-F1 og AI-E-D2-S4-F1 viste en MIC=200 µg/ml.



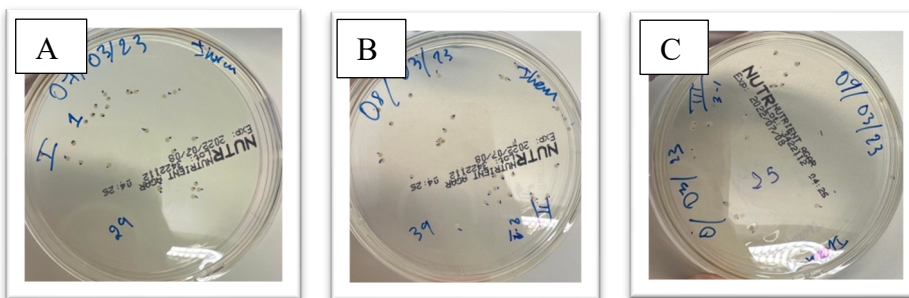
Figur 4: Resultater av Replikant B for MIC-bestemmelse for *S. aureus* i en 96-brønnsplate format. Platebrønnene inneholder antibiotika kloramfenikol, 1% DMSO, positiv kontroll, fraksjonene AI-E-D2-S4-F1, AI-E-D2-S2S3-F1, AI-E-D2-S2S3-F5 og AI-E-D2-S6-F2 og en positiv kontroll (106 står for bakterieinokulum). Fraksjonene AI-E-D2-S2S3-F1 og AI-E-D2-S4-F1 viste en MIC=200 µg/ml.



Figur 5: Inokulumkontroll (*S. aureus*) med fraksjonene S1-S5 til alle tre replikanter, (1, 2 og 3) i det første parallell. Resultater vist at i 1) 16 kolonier, 2) 29 kolonier, 3) 19 kolonier.

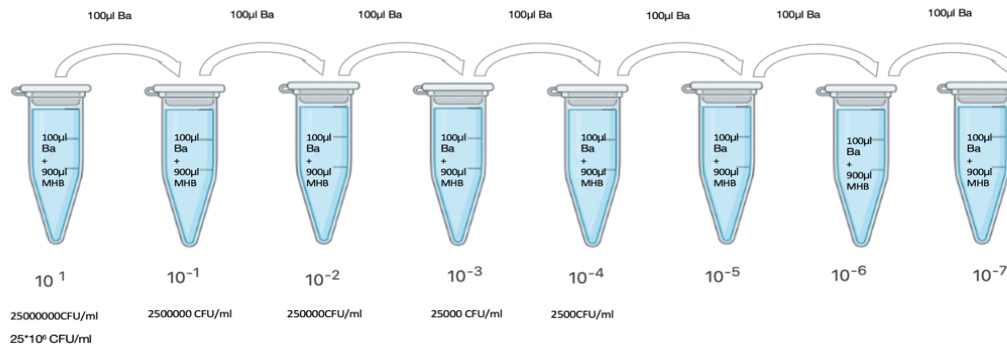


Figur 6: Inokulumkontroll (*S. aureus*) med fraksjoner S6-S9 for begge replikanter (1 og 2) i det andre parallell. Resultater viste at i, 1) 17 kolonier, 2) 28 kolonier.

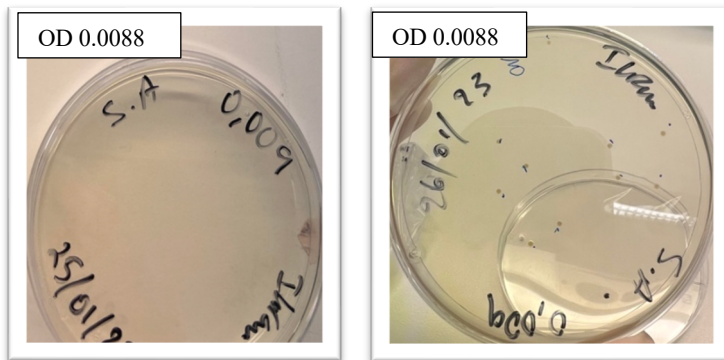


Figur 7: Inokulumkontroll (*S. aureus*) med fraksjonene AI-E-D2-S4-F1, AI-E-D2-S2S3-F1, AI-E-D2-S2S3-F5 og AI-E-D2-S6-F2 til alle tre replikanter (A, B og C). Resultater vist at i A))29 kolonier, B) 39 kolonier C) 25 kolonier.

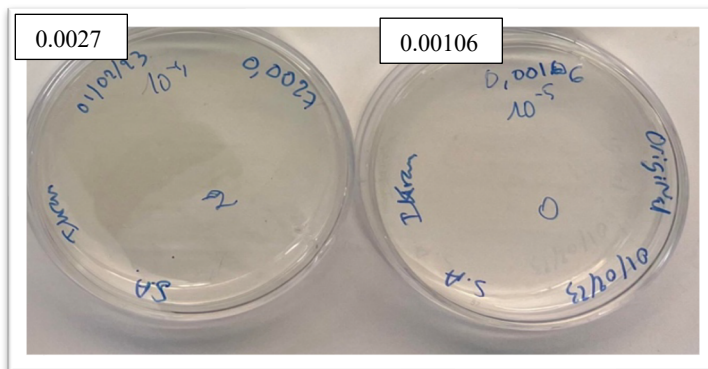
Vedlegg E: Utviklings av od vs cfu/ml



Figur 1: cfu/ml i forhold til antall kolonier på petriskål for den første fortynning med et od målt på 0.441 fra $10E1$ -ned til $10E7$. $10 \mu\text{l}$ av fortynning 10^{-4} = 25 Kolonier, $1000 \mu\text{l}$ = 2500 kolonier det vil si 2500 cfu/ml OD målt = 0.441 tilsvarer $25 \times 10E6$ cfu/ml.

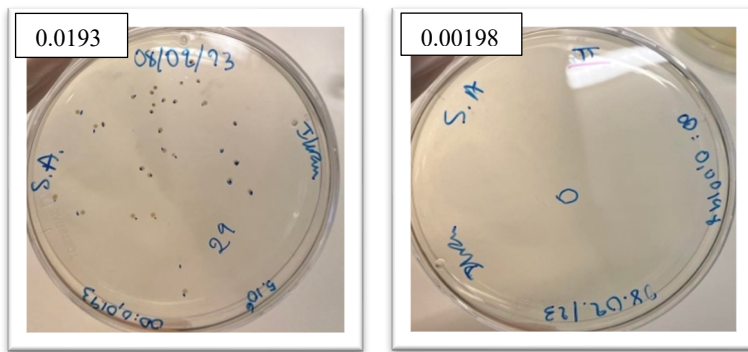


Figur 2: Resultater av inokulumkontroll for det første og andre testing til utvikling av OD til *S. aureus* med OD 0.0088, 1) det ble 0 kolonier, B) 10 kolonier.



Figur 3: Resultater av inokulumkontroll for det første og andre testing til utvikling av OD til *S. aureus*

1) med OD 0.0027, ble det 2 kolonier, 2) med OD 0.00106 ble det 0 kolonier.



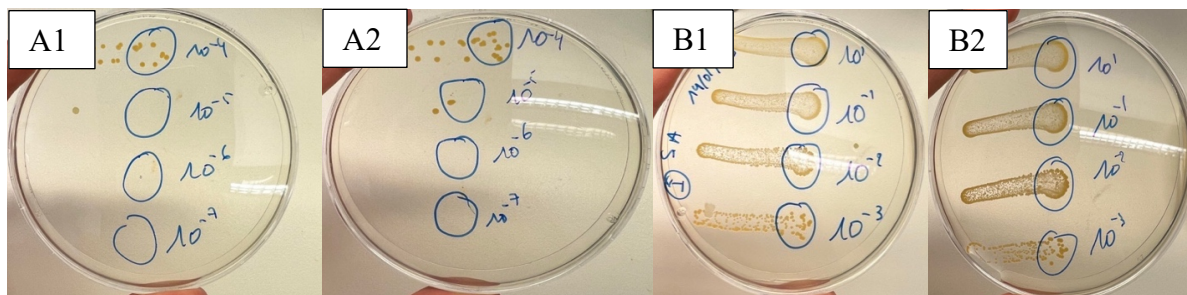
Figur 4: Resultater av inokulumkontroll til utvikling av OD vs cfu/ml til *S. aureus*, 1) med bruk av OD 0.0193, det ble 29 kolonier, 2) med bruk av OD 0.00198, det ble 0 kolonier.

Antall kolonier ble telt og beregnet tilbake ved hvilken fortytning som gir 5×10^5 cfu/ml:

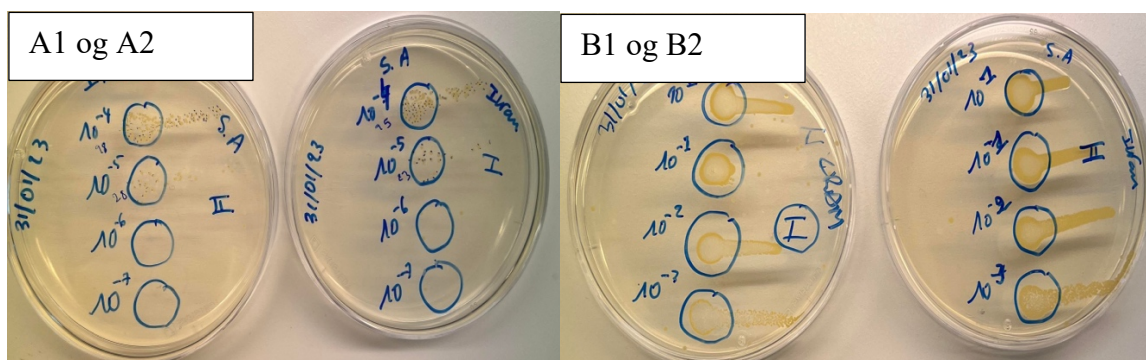
Fra den tredje fortytning:

$$OD = \frac{0,349}{90 \times 10^6} \times (5 \times 10^5) = 0,00198 \text{ som tilsvarer } 5 \times 10^5 \text{ cfu/ml som er ønsket.}$$

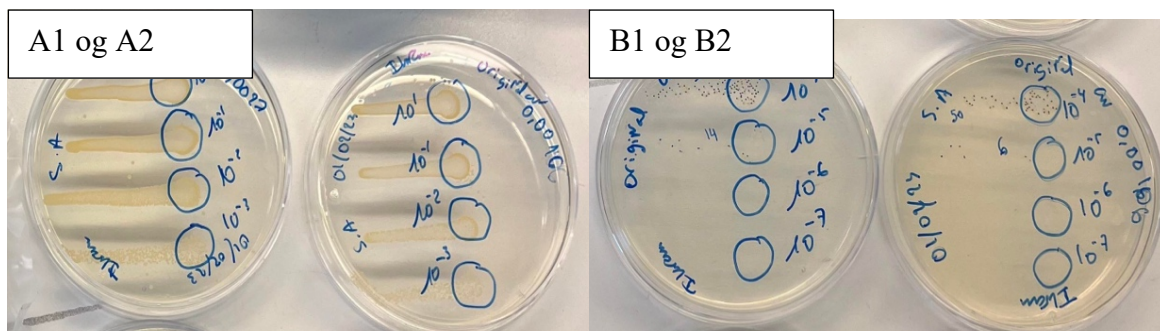
$$OD = \frac{0,349}{90 \times 10^6} \times (5 \times 10^6) = 0,0193 \text{ som tilsvarer } 5 \times 10^6 \text{ cfu/ml som er ønsket.}$$



Figur 5: Resultater av det første fortynning fra 10^1 ned til 10^{-7} for utvikling av od vs cfu/ml for *S. aureus*. A1 og A2 er begge replikanter til fortynning fra 10^{-4} - 10^{-7} , og B1 og B2 er replikanter til fortynning 10^1 - 10^{-3} .



Figur 6: Resultater av det andre fortynning fra 10^1 ned til 10^{-7} for utvikling av od vs cfu/ml for *S. aureus*. A1 og A2 er begge replikanter til fortynning fra 10^{-4} - 10^{-7} , og B1 og B2 er replikanter til fortynning 10^1 - 10^{-3} .



Figur 7: Resultater av det tredje fortynning fra 10^1 ned til 10^{-7} for utvikling av od vs cfu/ml for *S. aureus*. A1 og A2 er begge replikanter til fortynning fra 10^{-4} - 10^{-7} , og B1 og B2 er replikanter til fortynning 10^1 - 10^{-3} .

Tabell 1: Resultater av det første fortynning med bakterieinokulum *S. aureus* til utvikling av od vs cfu/ml med målt od på 0.441.

	Antall kolonier	Antall kolonier	
Fortynning	Replikant A	Replikant B	Gjennomsnittet
10 ⁻¹	Over 100	Over 100	Over 100
10 ⁻¹	Over 100	Over 100	Over 100
10 ⁻²	Over 100	Over 100	Over 100
10 ⁻³	Over 100	Over 100	Over 100
10 ⁻⁴	25	28	26,5
10 ⁻⁵	2	1	1,5
10 ⁻⁶	0	0	0
10 ⁻⁷	0	0	0

Antall kolonier ble telt og beregnet tilbake ved hvilken fortynning som gir 5x10⁵ cfu/ml.

10 µl av fortynning 10⁻⁴ = 25 Kolonier

1000 µl = 2500 kolonier det vil si 2500 cfu/ml

OD målt = 0.441 tilsvarer 25x10⁶ cfu/ml

$OD = \frac{0,441}{25 \times 10^6} \times (5 \times 10^5) = 0,0088$ som tilsvarer 5x10⁵ cfu/ml som er ønsket.

Tabell 2: OD målt for testing av MHB, DMSO og positiv kontroll på 96 brønners plate format med OD 0.0088 fra første fortynning.

Mikroorganisme <i>S. aureus</i>	Målt od	Inokulum bakterie (µl)	MHB (µl)
Første replikant 1	0.312	2.8	97.2
Andre replikant 2	0.557	1.6	98.4

Tabell 3: Resultater av det andre fortynning med bakterieinokulum *S. aureus* til utvikling av od vs cfu/ml med målt od på 0.530

	Antall kolonier	Antall kolonier	
Fortynning	Replikant A	Replikant B	Gjennomsnittet
10 ⁻¹	Over 100	Over 100	Over 100
10 ⁻¹	Over 100	Over 100	Over 100
10 ⁻²	Over 100	Over 100	Over 100
10 ⁻³	Over 100	Over 100	Over 100
10 ⁻⁴	95	98	96,5
10 ⁻⁵	23	28	25,5
10 ⁻⁶	0	3	3
10 ⁻⁷	0	1	1

Antall kolonier ble telt og beregnet tilbake ved hvilken fortynning som gir 5x10⁵ cfu/ml

10 µl av fortynning 10⁻⁴ = 96 Kolonier, det vil si 9600 cfu/ml

OD målt = 0.530 tilsvarer 96x10⁶ cfu/ml

$OD = \frac{0,530}{96 \times 10^6} \times (5 \times 10^5) = 0,0027$ som tilsvarer 5x10⁵ cfu/ml som er ønsket.

10 µl av fortynning 10⁻⁵ = 25 Kolonier, det vil si 2500 cfu/ml

OD målt = 0.530 tilsvarer 25x10⁷ cfu/ml

$OD = \frac{0,530}{25 \times 10^7} \times (5 \times 10^5) = 0,00106$ som tilsvarer 5x10⁵ cfu/ml som er ønsket.

Tabell 4: Målt od for det tredje fortynning med bakterieinokulum *S. aureus* til utvikling av od vs cfu/ml

	Målt od	Inokulum bakterie (µl)	MHB (µl)
Første testing med OD 0.0027	0.349	0.77	99.23
Andre testing med OD 0.00106	0.244	0.43	99.5

Tabell 5: Resultat av det tredje fortytning med bakterieinokulum *S. aureus* til utvikling av od vs cfu/ml

Original	Antall kolonier Fortynning 10^{-4}	Antall kolonier fortynning 10^{-5}
Fortynning	Forsøk 1 OD=0,0027	Forsøk 2 OD=0,00106
10^{-1}	Over 100	Over 100
10^{-1}	Over 100	Over 100
10^{-2}	Over 100	Over 100
10^{-3}	Over 100	Over 100
10^{-4}	90	50
10^{-5}	14	6
10^{-6}	0	0
10^{-7}	0	0

Antall kolonier ble telt og beregnet tilbake ved hvilken fortytning som gir 5×10^5 cfu/ml

I fortytning 10^{-4} ble det brukt OD= 0.0027

10 μ l av fortytning 10^{-4} = 90 Kolonier, det vil si 9000 cfu/ml

OD målt =0.349 tilsvarer 90×10^6 cfu/ml

$OD = \frac{0,349}{90 \times 10^6} \times (5 \times 10^5) = 0,00198$ som tilsvarer 5×10^5 cfu/ml som er ønsket.

I fortytning 10^{-5} ble det brukt OD=0.00106

10 μ l av fortytning 10^{-5} = 50 Kolonier, det vil si 5000 cfu/ml

OD målt =0.244 tilsvarer 20×10^6 cfu/ml

$OD = \frac{0,244}{50 \times 10^6} \times (5 \times 10^5) = 0,00244$ som tilsvarer 5×10^5 cfu/ml som er ønsket.