



Gimnazija Kranj

RAZISKOVANJE VPLIVA IBUPROFENA,  
NESTEROIDNEGA PROTIVNETNEGA ZDRAVILA,  
NA SVEŽO MASO TER KONCENTRACIJO  
KLOROFILA A IN B V SADIKAH *LACTUCA*  
*SATIVA*

Ekologija, z varstvom okolja

Raziskovalna naloga

Avtor: Olivija Kukovica

Mentor: prof. Petra Košir

Kranj, 2023

## **ZAHVALA**

Zahvaljujem se mentorici prof. Petri Košir za pomoč in vodenje pri opravljanju raziskovalne naloge. Zahvaljujem, se tudi vsem, ki so mi kakorkoli pomagali v času pisanja in opravljanja raziskovalne naloge.

## KAZALO

1. UVOD .....	6
2. TEORETIČNO OZADJE .....	6
3. RAZISKOVALNI DEL .....	7
3.1. RAZISKOVALNO VPRAŠANJE .....	7
3.2. HIPOTEZE .....	7
3.3. SPREMENLJIVKE .....	7
3.4. VARNOST IN OKOLJSKA VPRAŠANJA .....	10
3.5. METODOLOGIJA IN POSTOPEK .....	10
3.5.1. <i>Metoda in materiali</i> .....	10
3.6. POSTOPEK .....	11
3.6.1. <i>Priprava različnih koncentracij raztopin ibuprofena</i> .....	11
3.6.2. <i>Predhodni preizkusi</i> .....	11
3.6.3. <i>Eksperimentalni postopek</i> .....	11
3.6.4. <i>Merjenje podatkov</i> .....	12
4. REZULTATI IN RAZPRAVA .....	12
4.1. REZULTATI .....	12
4.1.1. <i>Neobdelani kvantitativni podatki s povprečjem in standardnim odklonom</i> .....	12
4.1.2. <i>Izračuni</i> .....	14
4.2. STATISTIČNA ANALIZA .....	15
5. ZAKLJUČEK IN VREDNOTENJE .....	17
5.1. ZAKLJUČEK .....	17
5.2. VREDNOTENJE .....	18
5.2.1. <i>Prednosti</i> .....	18
5.2.2. <i>Omejitve in izboljšave</i> .....	18
5.2.3. <i>Razširitve</i> .....	19
6. BIBLIOGRAFIJA .....	20

## KAZALO TABEL

Tabela 1: Laboratorijska oprema in materiali.....	10
Tabela 2: Načrt zalivanja.....	11
Tabela 3: Masa listov <i>Lactuca sativa</i> , pobranih po 6 dneh zalivanja z različnimi koncentracijami Ibuprofena.....	12
Tabela 4: Odstotna masa pigmentov v vsakem vzorcu sadik z dodanim izračunom povprečja in standardnega odklona, ki sta bila izračunana s programom Microsoft Excel. ....	15
Tabela 5: p-vrednosti sveže mase različnih sadik <i>Lactuca sativa</i> , zalivanih z različnimi koncentracijami ibuprofena .....	15
Tabela 6: p-vrednosti primerjave masnih deležev klorofila a pri različnih koncentracijah ibuprofena	16
Tabela 7: p-vrednosti primerjave masnih deležev klorofila a pri različnih koncentracijah ibuprofena	16

## KAZALO GRAFOV

Graf 1: Povprečna masa listov, pobranih po 6 dneh zalivanja z različnimi koncentracijami ibuprofena. Črte napak predstavljajo standardni odklon. ....	13
Graf 2: Absorpcijski spekter za klorofil a in b iz vzorcev <i>Lactuca sativa</i> z dodano legendo. Graf je bil narisana s programom Vernier Spectral Analysis. ....	13
Graf 3: Povprečni masni deleži klorofila a in b po zalivanju sadik <i>Lactuca sativa</i> z različnimi koncentracijami ibuprofena. Črte z napakami predstavljajo standardne odklone. ....	15

## POVZETEK

Ibuprofen, čigar priljubljenost je izredno narasla v preteklih letih, je nesteroidno protivnetno zdravilo, ki velikokrat preide v odpadne vode. Pred kratkim je bil objavljen članek, v katerem je predstavljen vpliv ibuprofena na rast poljščin, saj vpliva na njihov razvoj korenin. Odločila sem se, da raziščem, na kakšen način in zakaj vpliva ibuprofen na rast in razvoj korenin v sadikah priljubljene solatne vrste, *Lactuca sativa*.

Kupila sem trideset sadik solatne vrste *Lactuca sativa*, katere sem razdelila v pet skupin po šest primerov. Vsaka izmed šestih skupin je bila zalivana z različnimi koncentracijami ibuprofena, raztopljenega v vodnem mediju. Ena izmed skupin ni bila zalivana z koncentracijo ibuprofena, saj je predstavljala kontrolno skupino. Po šestih dneh so bile zabeležene mase sadik, s pomočjo analitične tehtnice in koncentracije klorofila a in b, s pomočjo sprektrofotometrične analize.

Ugotovila sem, da višja koncentracija ibuprofena v vodnem mediju, povzroči večje zaviranje rasti korenin v sadikah *Lactuca sativa*, saj ibuprofen deluje kot zaviralec transporta avksina. Avksini so hormoni, ki so ključni za vse razvojne procese v rastlini. V celicah koreninskih laskov sprožijo rast korenin, spodbujajo tvorbo stranskih in adventivnih korenin ter imajo pomembno vlogo pri uravnavanju razvoja listov (Parkes et al., 2020). Toda do določenih višjih koncentracij zdravila navadno povzročajo strupeno okolje, čeprav imajo lahko tudi pozitiven učinek na rastline, vendar le v nižjih koncentracijah. To pomeni, da do določene koncentracije ibuprofena v vodnem mediju tudi prispeva k rasti sadik *Lactuca sativa*, vendar v previsokih koncentracijah sledi zaviranje hormona avksina, kar dovede do propada razvoja korenin in posledično mase sadik ter vsebnosti klorofila a in b v listih sadike.

## ABSTRACT

Ibuprofen, which has grown enormously in popularity in recent years, is a non-steroidal anti-inflammatory drug that often passes into wastewater. Recently, an article has been published on the impact of ibuprofen on the growth of crops, as it affects their root development. I decided to investigate how and why ibuprofen affects root growth and development in seedlings of a popular salad species, *Lactuca sativa*.

I bought thirty *Lactuca sativa* seedlings, which I divided into five groups of six. Each of the six groups was watered with different concentrations of ibuprofen dissolved in an aqueous medium. One of the groups was not watered with a concentration of ibuprofen as it was the control group. After six days, the weights of the seedlings were recorded using an analytical balance and the concentration of chlorophyll a and b was recorded using a spectrophotometric analysis.

I found that higher concentrations of ibuprofen in the aqueous medium resulted in greater inhibition of root growth in *Lactuca sativa* seedlings, since ibuprofen acts as an inhibitor of auxin transport. Auxins are hormones that are essential for all developmental processes in the plant. In root hair cells, they trigger root growth, stimulate the formation of lateral and adventitious roots and play an important role in regulating leaf development (Parkes et al., 2020). However, up to certain higher concentrations, the drugs tend to cause a toxic environment, although they can also have a positive effect on the plants, but only at lower concentrations. This means that up to a certain concentration of ibuprofen in the aqueous medium, it also contributes to the growth of *Lactuca sativa* seedlings, but at too high concentrations, the hormone auxin is inhibited, leading to a collapse in root development and consequently in the weight of the seedling and in the content of chlorophyll a and b in the leaves of the seedling.

## 1. UVOD

V našem gospodinjstvu imamo pogosto pri roki ibuprofen za različne namene, na primer za močne menstrualne krče. Vedno sem vedela, da je to precej močno protibolečinsko zdravilo, saj naj bi bil aspirin blažji. Pred kratkim sem nato v članku prebral, da ibuprofen močno vpliva na okolje, saj zavira rast več poljščin, ker je prišel v odpadne vode (Gray, 2014).

Ko sem prebrala, da je zdravilo vplivalo na korenine rastline (Gray, 2014; Rede et al., 2019), me je zanimalo, kako je nato vplivalo na pigmentacijo njenih listov. Ker so bile korenine deformirane in poškodovane, niso mogle absorbirati učinkovite količine hranil za izvajanje fotosinteze in pigmentacija listov bi začela upadati.

Cilj raziskave je torej vpliv različnih koncentracij ibuprofena na maso sadik solate *Lactuca sativa* ter koncentracijo klorofila a in b v listih, kar bomo izmerili s spektrofotometrom. Ta preiskava bi lahko zagotovila nekaj vpogleda v to, kako nepravilno odstranjevanje zdravil za človeško uporabo vpliva na rast naših pridelkov.

## 2. TEORETIČNO OZADJE

### Predstavitev ibuprofena in njegovih zdravilnih lastnosti

Ibuprofen je bil eden prvih članov derivatov propionske kisline, ki sta ga leta 1969 predstavila farmacevt in farmakolog Stewart Adams ter kemik John Nicholson kot boljši nadomestek za aspirin. Običajno se uporablja kot nesteroidno protivnetno zdravilo (NSAID) (Bushra in Aslam, 2010). Predpisujejo ga za zdravljenje bolečine, vročine, vnetja in prehladov ter za zmanjševanje proliferacije celic človeškega raka prostate (Connelly, 2017).

### Vpliv ibuprofena na rastline

Z naraščajočo priljubljenostjo ibuprofena se povečuje tudi njegova poraba, saj je vsako leto predpisanih kar 30 milijonov receptov. V reviji *Journal of Ecotoxicology and Environmental Safety* (Schmidt in Redshaw, 2015) je bila objavljena nedavna raziskava, ki se je osredotočila na učinke več predpisanih zdravil na rastoče rastline, kot je solata (*Lactuca sativa*). Zdravila za uporabo v humani medicini lahko pridejo v tla kot blato iz čistilnih naprav kot gnojilo ali odpadna voda za namakanje. Ibuprofen je pomembno vplival na zgodnji razvoj korenin rastlin solate (Gray, 2014).

Avksini so hormoni, ki so ključni za vse razvojne procese v rastlini. V celicah koreninskih laskov sprožijo rast korenin, spodbujajo tvorbo stranskih in adventivnih korenin ter imajo pomembno vlogo pri uravnavanju razvoja listov in še bi lahko naštevali. (Parkes et al., 2020) Te tako imenovane beljakovine PIN 3, ki so skupina glikoproteinov in se nahajajo v plazemski membrani celic v stebli, uravnavajo prenos auxina iz ene celice v drugo. Kadar je torej ta pretok nekako moten, to povzroči nepravilen razvoj korenin rastlinskih celic koreninskih laskov. Ta zdravila, v primeru te preiskave ibuprofen, delujejo kot zaviralec transporta avksina. Ibuprofen je sestavljen iz različnih kemikalij, ki vključujejo tudi zaviralce ciklooksigenaze. Ciklooksigenaza je encim, ki povečuje proizvodnjo kemičnih glasnikov, imenovanih prostaglandini. Študije so pokazale, da imajo prostaglandini pomembno vlogo pri cvetenju, fotosintezi in uravnavanju prepustnosti celičnih membran (Cole, 2014).

Do določenih višjih koncentracij zdravila navadno povzročajo strupeno okolje, čeprav imajo lahko tudi pozitiven učinek na rastline (hormeza), vendar le v nižjih koncentracijah. Izraz hormoneza je običajno opredeljen kot prilagoditveni odziv rastlin na zunanje stresne dejavnike, ki je pogosto zmeren in občasen (Mattson, 2008). Študija Kundre *et al.* (2020) je pokazala, da se je s povečevanjem koncentracije paracetamola, ki je prav tako nevnetno zdravilo, vsebnost klorofila do določene mere

povečevala, preden je zaradi previsoke koncentracije paracetamola začela upadati. V tej raziskavi so bile sadike *Lactuca sativa* izpostavljene koncentraciji paracetamola le 15 dni.

Po drugi strani pa so nekatere raziskave Wijaya *et al.* (2020) pokazale, da je pri podobnih koncentracijah ibuprofena koncentracija klorofila že od samega začetka začela postopoma upadati, ne da bi se povečala. Sadike *Lactuca sativa* v tej raziskavi so bile izpostavljene koncentracijam Ibuprofena 50 dni.

### 3. RAZISKOVALNI DEL

#### 3.1. Raziskovalno vprašanje

Kako različne koncentracije ibuprofena (0,0, 0,2, 0,4, 0,6, 0,8, 1,0 M) v mediju za zalivanje vplivajo na svežo maso ter koncentracije klorofila a in b v listih *Lactuca sativa* po 6 dneh zalivanja, merjene s spektrofotometrom?

#### 3.2. Hipoteze

##### ***Hipoteza 1:***

S povečevanjem koncentracije ibuprofena se postopoma zmanjšuje tudi masa sadik *Lactuca sativa*.

Ibuprofen moti pretok auxina, saj deluje kot inhibitor avksina, kar povzroči spremembo v razvoju celic koreninskih laskov. Avksini so odgovorni za rast korenin, spodbujajo tvorbo stranskih in adventivnih korenin ter imajo pomembno vlogo pri uravnavanju razvoja listov. Če je ta pretok kakor koli moten, to povzroči nepravilen razvoj korenin rastline, kar lahko privede do zmanjšanja mase sadik *Lactuca sativa*. (Parkes *et al.*, 2020)

##### ***Hipoteza 2:***

S povečevanjem koncentracije ibuprofena se koncentracija klorofila a in b postopoma zmanjšuje.

Ibuprofen je sestavljen iz različnih kemikalij, ki vključujejo tudi zaviralce ciklooksigenaze. Ciklooksigenaza je encim, ki povečuje proizvodnjo prostaglandinov, za katere je bilo dokazano, da imajo pomembno vlogo pri cvetenju, fotosintezi in uravnavanju prepustnosti celične membrane (Cole, 2014). Ibuprofen je inhibitor avksina. Avksin je hormon, ki spodbuja razvoj listov (Parkes *et al.*, 2020). Zato lahko motnje v razvoju listov povzročijo zmanjšanje vsebnosti klorofila.

#### 3.3. Spremenljivke

##### 3.3.1. Neodvisna spremenljivka

Različne koncentracije ibuprofena (M) v mediju za zalivanje

Ibuprofen bo pripravljen v različnih koncentracijah z redčenjem z destilirano vodo. Koncentracije bodo naslednje: 0,08 M, 0,16 M, 0,24 M, 0,32 M in 0,40 M.

V preiskavo bo vključeno tudi kontrolirano preskušanje, pri katerem bo uporabljena le destilirana voda brez ibuprofena, vendar bo prostornina ostala enaka.

### 3.3.2. Odvisna spremenljivka

#### 3.3.2.1. Koncentracija klorofila a in b (%)

Klorofil a in b bomo izmerili s spektrofotometrom. Prikazal bo graf absorbance v odvisnosti od valovne dolžine. Meritev absorbance se nato uporabi za izračun koncentracij. Absorbance bomo izmerili pri 662 nm, 645 nm in 470 nm.

#### 3.3.2.2. Sveža masa sadik *Lactuca sativa* (g)

Svežo maso sadik *Lactuca sativa* bomo po 6 dneh zalivanja z različnimi koncentracijami ibuprofena stehali z analitično tehtnico.

### 3.3.3. Nadzorovane spremenljivke

#### 3.3.3.1. Enake vrste sadik

Vsaka vrsta sadik se na koncentracije Ibuprofena v vodi odziva drugače. Zato bomo uporabili sadike iste vrste (*Lactuca sativa*), vzete pri istem proizvajalcu.

#### 3.3.3.2. Dostopnost svetlobe

Ker je osvetlitev ključna za fotosintezo in s tem razvoj klorofila a in b, so bile vse sadike postavljene na okensko polico v isti sobi, tako da so bile deležne enake količine svetlobe.

#### 3.3.3.3. Količina raztopine za zalivanje z različnimi koncentracijami ibuprofena

Različne prostornine različnih raztopin Ibuprofena lahko vplivajo na koncentracijo klorofila a in b ter posledično na rast sadik (svežo maso). Zato bomo vsako sadiko zalivali z enako prostornino (15 ml ± 0,1 ml) raztopine za zalivanje z različnimi koncentracijami ibuprofena.

#### 3.3.3.4. Čas zalivanja

Čas, ob katerem bomo zalivali sadike, je prav tako ključna spremenljivka, ki jo je treba spremljati, da bodo tla enako navlažena. Zato bo vsak poskus zalit ob istem času (ob 7. uri zjutraj).

#### 3.3.3.5. Temperatura prostora in raztopine za zalivanje

Temperatura je pomemben dejavnik pri gojenju kalčkov, saj vpliva na hitrost presnovnih reakcij. Zato bomo rastline gojili pri sobni temperaturi ( $25 \pm 1$  °C).

#### 3.3.3.6. Vrsta in teža zemlje

V vsakem lončku, uporabljenem za gojenje sadik, bo le ena sadika in enaka vrsta zemlje, saj imajo različna tla različne stopnje kislosti, količino hranil, kar bi vplivalo na rast sadik in posledično na koncentracijo klorofila a in b. Zato bo vsak lonček vseboval 70 g ( $\pm 0,001$  g) iste vrste zemlje.



#### 3.3.3.7. Velikost in oblika lonca

Različne velikosti in oblike loncev bi lahko privedle do negotovosti, saj bi sadike zaradi različnih okolij rasle različno, kar bi vplivalo na rast sadik. Zato bodo vse sadike posajene v enako vrsto in velikost lonca iz trajnostnega materiala.

#### 3.3.3.8. Čas, ko so bile sadike izpostavljene ibuprofenu

Vse ponovitve (sadike) so bile pregledane in analizirane po 6 dneh zalivanja z različnimi koncentracijami ibuprofena.

#### 3.3.3.9. Isti del sadike, pripravljen za meritve

Ker se za vsako koncentracijo vzame le en del listov, bi bilo subjektivno, kateri del je treba vzeti. Zato smo vse liste vsake ponovitve macerirali in jih uporabili kot vzorec, tako da smo iz sadik lahko pridobili ves možni klorofil.

#### 3.3.3.10. Razredčenje in prostornina pripravljenih vzorcev klorofila

Vse vzorce, pripravljene iz maceriranih listov *Lactuca sativa*, smo razredčili do enake mere (0,5 ml ekstrakta klorofila v 2,75 ml 95 % etanola). Razredčenje je bilo potrebno za pridobitev najbolj natančnih rezultatov s spektrofotometrom, da bi bila absorpcija med 0,0 in 1,0.

#### 3.3.3.11. Čas filtriranja

Vsi vzorci macerirane *Lactuca sativa* so bili filtrirani po približno treh minutah maceracije ( $\pm 30$  sekund). Pri daljšem času se je izločilo več klorofila a in b.

#### 3.3.3.12. Čistoča kivete

To bi lahko vplivalo na merjenje absorbance. Zato smo vse kivete pred uporabo očistili z mehkim robčkom brez vlaken in brez prask.

#### 3.3.3.13. Čistost raztopine

Delci v raztopini bi lahko povzročili odstopanja. Zato je bilo pri vseh vzorcih opravljeno eno filtriranje s filtrirnim papirjem.

#### 3.3.3.14. Kalibracija spektrofotometra

Kalibracija je bila opravljena z isto vrsto kivete, saj bi kalibracija z različnimi kivetami lahko povzročila neskladja. Z istimi kivetami je bil za kalibracijo uporabljen 95-odstotni etanol, ker je bil uporabljeno topilo.

#### 3.3.3.15. Valovne dolžine merjenja

Valovne dolžine so bile ves čas 662 nm, 645 nm in 470 nm  $\pm 0,001$  nm. Različne valovne dolžine merjenja bi privedle do napačnih in nedopustnih rezultatov.

### 3.3.3.16. Priprava koncentracij ibuprofena

Vse koncentracije ibuprofena so bile pripravljene po enakem postopku, saj bi različni eksperimentalni postopki povzročili različne negotovosti v rezultatih.

### 3.3.3.17. Enaka velikost sadik

Ker bi večje in manjše sadike *Lactuca sativa* lahko povzročile razlike v poskusu, so bile vse sadike enako visoke in imele enako število listov. To je zagotavljalo, da je na rast sadik neposredno vplivala koncentracija ibuprofena.

## 3.4. Varnost in okoljska vprašanja

Med izvajanjem poskusov smo vedno nosili zaščitna očala, laboratorijske plašče in rokavice, da bi se izognili neposrednemu stiku s 95-odstotnim etanolom in ibuprofenom, uporabljenim v laboratoriju.

Z ibuprofenom smo ravnali zelo previdno, saj je imel svoj varnostni seznam. Zato je bil shranjen v suhi tesni posodi, da bi preprečili neposredno vdihavanje belega prahu.

Ker je znano, da ibuprofen resno ogroža okolje, je bil odstranjen v varnostne vrečke in predan laborantu, ki je ibuprofen odstranil tako previdno kot pri ravnanju z drugimi nevarnimi kemikalijami, da ne bi onesnaževal okolja.

## 3.5. Metodologija in postopek

### 3.5.1. Metoda in materiali

"Spektroskopija se ukvarja z izdelavo, merjenjem in razlago spektrov, ki nastanejo pri interakciji elektromagnetnega sevanja s snovjo. Spektroskopske meritve lahko uporabimo za merjenje količine določene snovi v vzorcu (kvantitativna analiza) ali celo samo za identifikacijo neznanega vzorca (kvalitativna analiza)." (*Spectroscopy, n.d.*)

V tej raziskavi je bil za določitev koncentracije klorofila a in b uporabljen spektrofotometer z izračunom absorbanca pri 662, 645 in 470 nm z negotovostjo  $\pm 0.001$ .

Tabela 1: Laboratorijska oprema in materiali

Laboratorijska oprema	Količina
Stekleno mešalo	3
Kivete	30
Čase (500 ml $\pm$ 0.8 ml)	6
Merilni valj (100 $\pm$ 0.8 ml)	2
Analitična tehtnica	1
Morter in pestič	1
Epruvete	30
Filtrirni papir	30 pieces of 10x10 cm
Vernierjev spektrofotometer	1
Automatska pipeta (10 mL)	2
Rokavice	1
Varnostna očala	1

Štoparica	1
Varnostna maska	1
Računalnik s programsko opremo Vernier	1
<b>Druga oprema</b>	
Trajni marker	1
Etikete	6
Zemlja	30x 70 grams
Lonci	30
Aluminijaska folija	30x 10x10 cm
<b>Materiali</b>	
Sadike <i>Lactuca sativa</i>	30
95-odstotni etanol	500 mL
Ibuprofen	120 grams
Distilirana voda	4 litres

### 3.6. Postopek

#### 3.6.1. Priprava različnih koncentracij raztopin ibuprofena

Za pripravo različno koncentriranih raztopin ibuprofena z molsko maso 206,29 g/mol smo uporabili naslednje formule:

$$\text{Množina ibuprofena} = \frac{\text{masa ibuprofena (g)}}{\text{molska masa ibuprofena } \left(\frac{\text{g}}{\text{mol}}\right)}$$

$$\text{Koncentracija ibuprofena} = \frac{\text{množina ibuprofena (mol)}}{\text{volumen raztopine (L)}}$$

Za vsako različno koncentracijo ibuprofena smo dodali 500 ml vode, da smo dosegli želeno koncentracijo.

Primer: Za 4,0 g zdrobljenega in odtehtanega ibuprofena je bilo izvedeno in izračunano naslednje.

$$\text{Množina ibuprofena} = \frac{4,0 \text{ g}}{206,29 \frac{\text{g}}{\text{mol}}} = 0,0194 \text{ mol}$$

$$\text{Koncentracija ibuprofena} = \frac{0,0194 \text{ mol}}{0,5 \text{ L vode}} = 0,0388 \text{ mol/L} = 0,0388 \text{ M}$$

#### 3.6.2. Predhodni preizkusi

Izvedeni so bili predhodni preizkusi, da bi se prepričali, da je bila za poskus izbrana ustrezna rastlina. Ti preskusi so zagotovili, da je bil glavni poskus izveden v čim bolj optimalnih pogojih. Najprej so vzklila semena *Lepidium sativum*, kasneje pa so bile sadike zalite z enakimi koncentracijami ibuprofena.

Poskusi so pokazali, da je rastlina *Lepidium sativum* preveč občutljiva na tako visoke koncentracije ibuprofena, saj so vse sadike po enem zalivanju s koncentracijami ibuprofena propadle, zaradi česar sem prešel na drugo rastlino, bolj odporno na ibuprofen. Zato so bile izbrane sadike *Lactuca sativa*, saj so se izkazale za bolj trpežne, raziskavo pa bi lahko bolj uporabili tudi za zelenjavo, ki jo vsakodnevno uživamo. S predhodnimi testi je bilo zagotovljeno tudi, da je bil postopek praktičiran, tako da kasneje pri poskusu ne bi prišlo do zapletov.

#### 3.6.3. Eksperimentalni postopek

Eksperimentalni postopek je bil povzet in prilagojen po Kudrna *et al.* (2020). V vsak biorazgradljiv lonček, v katerem je bila ena sadika *Lactuca sativa*, je bilo dano 70 gramov zemlje. Vsak lonček je bil označen s točno določeno koncentracijo ibuprofena, s katero je bil zalit (od 0,0 M do 0,40 M). Sadike so bile zalivane po spodnjem razporedu. Zalivali smo jih na ta način, ker bi ob vsakodnevnem zalivanju z raztopino Ibuprofena usahnile hitreje kot v šestih dneh, saj bi se zemlja sadik *Lactuca sativa* nasičila z Ibuprofenom.

Tabela 2: Načrt zalivanja

Dan	Volumen in vrsta tekočine
1	15 mL Ibuprofen koncentracije
2	15 mL distilirane vode
3	15 mL Ibuprofen koncentracije
4	15 mL distilirane vode
5	15 mL Ibuprofen koncentracije
6	15 mL distilirane vode

Vsi lončki so bili postavljeni na isto okensko polico, ki ni bila na neposredni sončni svetlobi, da bi preprečili opekline mladih sadik. Zalivanje je potekalo vsak dan ob isti uri (7.00) s pripravljenimi raztopinami ibuprofena.

### 3.6.4. Merjenje podatkov

Postopek poskusa je bil povzet in prilagojen po Sumanta *et al.*, (2014) in Straumite, Kruma in Galoburda (2015). Po 6 dneh smo vse sadike očistili odvečne zemlje in jih stekali na analitični tehtnici. Vsi listi vsake ponovitve so bili macerirani in uporabljeni kot vzorec. Macerirali smo jih z možnarjem in pestilom ter 10 ml 95-odstotnega etanola. Po 3 minutah ( $\pm$  30 sekund) smo te raztopine filtrirali s filtrirnim papirjem 10x10 cm, preden smo jih dali v epruvete in zavili v aluminijasto folijo, saj je znano, da klorofil na sončni svetlobi razpada, vendar zelo počasi (Petrović, Zvezdanović in Marković, 2017).

Vsako filtrirano raztopino smo nato razredčili v naslednji snovi: 0,5 mL raztopine klorofila in 2,75 mL 95-odstotnega etanola. Vsak volumen je bil z avtomatsko pipeto prenesen v epruveto.

Vsako razredčeno raztopino smo nato izmerili s spektrofotometrom Vernier, ki je bil povezan z računalnikom, na katerem je bila aplikacija Vernier za grafično analizo za merjenje absorbance glede na valovno dolžino. Absorpcija je bila izmerjena pri 662, 645 in 470 nm.

## 4. REZULTATI IN RAZPRAVA

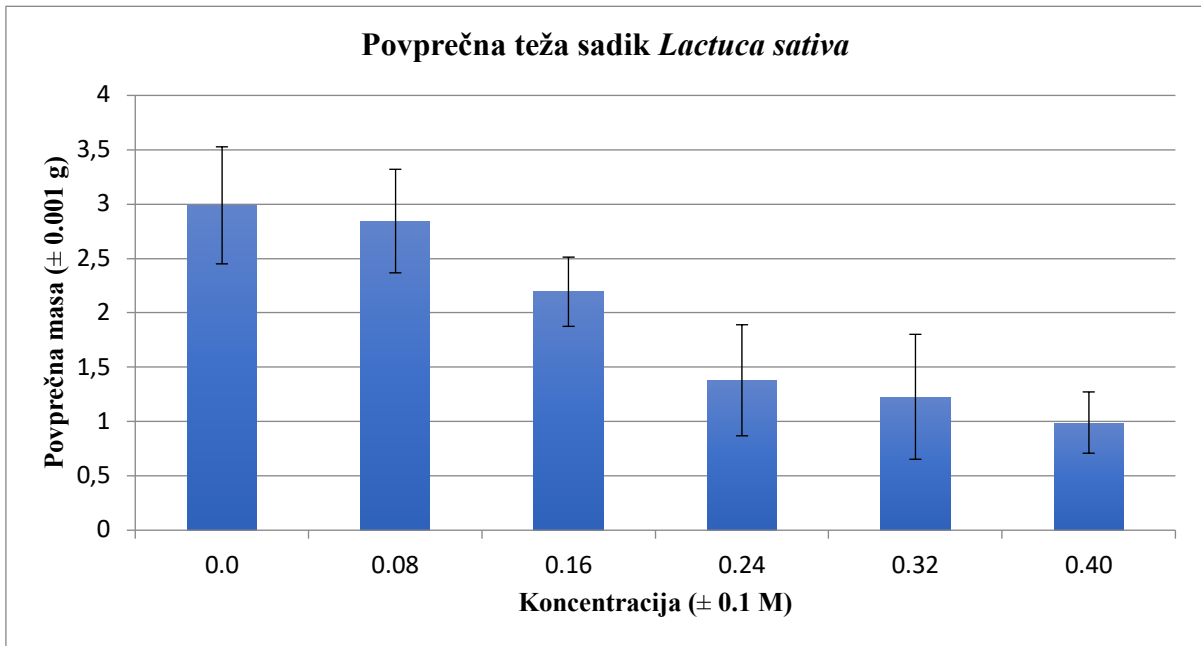
### 4.1. Rezultati

#### 4.1.1. Neobdelani kvantitativni podatki s povprečjem in standardnim odklonom

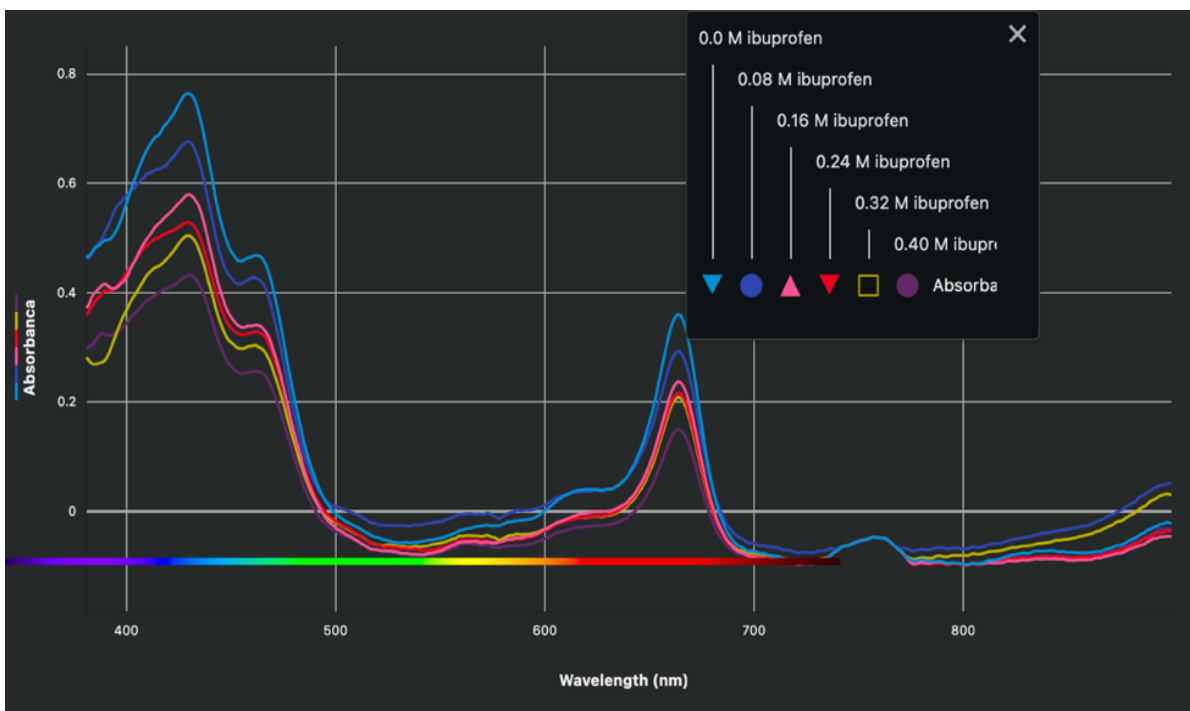
Za prikaz osrednje tendence in s tem predstavitev splošnega trenda so bile izračunane povprečne vrednosti vsakega poskusa. Dodan je bil še en parameter, in sicer standardni odklon, saj bi vpogled v razpršenost vrednosti pokazal variabilnost in zanesljivost rezultatov. Vse vrednosti so bile izračunane z uporabo programa Microsoft Excel, funkcija =AVG za srednjo vrednost in =STDEV za standardni odklon. Koeficient variabilnosti je statistično merilo relativne razpršenosti podatkov v seriji okoli povprečja. Predstavlja razmerje med standardno deviacijo in povprečjem. (Hayes, 2003)

Tabela 3: Masa listov *Lactuca sativa*, pobranih po 6 dneh zalivanja z različnimi koncentracijami Ibuprofena.

Koncentracija ( $\pm$ 0.1 M)	Masa sadik <i>Lactuca sativa</i> ( $\pm$ 0.001 g)							
	1	2	3	4	5	Mean	SD	CV
0.0 – kontrola	2,770	2,967	3,269	3,687	2,250	2,989	0,538	18,014
0.08	2,912	3,226	3,322	2,603	2,158	2,844	0,476	16,753
0.16	1,823	2,614	1,965	2,178	2,391	2,194	0,319	14,521
0.24	0,833	1,273	1,432	2,205	1,154	1,379	0,511	37,048
0.32	1,958	0,657	1,143	0,715	1,664	1,227	0,575	46,812
0.40	1,312	0,980	0,879	1,192	0,589	0,990	0,282	28,445



Graf 2: Povprečna masa listov, pobranih po 6 dneh zalivanja z različnimi koncentracijami ibuprofena. Črte napak predstavljajo standardni odklon.



Graf 1: Absorpcijski spekter za klorofil a in b iz vzorcev *Lactuca sativa* z dodano legendo. Graf je bil narisani s programom Vernier Spectral Analysis.

Graf 2 je bil uporabljen za izračun koncentracije klorofila a in b na podlagi absorbance, ki jo je prikazal pri naslednjih valovnih dolžinah: 662, 645 in 470 nm.

#### 4.1.2. Izračuni

Koncentracijo klorofila a in klorofila b na 1 ml 95-odstotne raztopine etanola in listnega vzorca smo izračunali po enačbi iz Sumanta *et al.* (2014) ter Straumite, Kruma in Galoburda (2015). Vsi primeri so bili izračunani za sadiko številka 3, ki je bila zalita z 0,08 M koncentracijo ibuprofena. V prvem sklopu izračunov je bila izračunana količina na 1 ml raztopine. Ker so imeli vzorci v poskusih prostornino 3,25 mL, je bilo v drugem sklopu izračunov izračunano število pigmentov v 3,25 mL. Izračunana vrednost je bila nato deljena s skupno maso vzorca listov, ki je za vsak vzorec drugačna, saj so bili uporabljeni vsi listi vsakega vzorca, da bi se izognili subjektivni izbiri listov v vsakem vzorcu. Vse vrednosti so bile nato pomnožene s 100, da smo dobili odstotno maso, kar je omogočilo lažjo primerjavo.

##### - Koncentracija klorofila a

$$C_{Ch\ a} = 13,36 \times A_{662} - 5,19 \times A_{645}$$

$C_{Ch\ a}$  = koncentracija klorofila a v 1 mL raztopine

$A_{662}$  = absorpcija pri 662 nm  $A_{645}$  = absorpcija pri 645 nm

**Primer:**  $C_{Ch\ a} = 13,36 \times 0,321 \text{ Au} - 5,19 \times 0,121 \text{ Au} = 3,661 \text{ mg/ml}$  ( $1 \pm 0,5 \%$ )

$$m_{Ch\ a} = 3,661 \text{ mg/ml} \times 3,25 \text{ ml} = 11,897 \text{ mg}$$
 ( $1 \pm 0,5 \%$ )

$$m_{Ch\ a} = 11,897 \text{ mg} : 3321,7 \text{ mg} = 0,358 \%$$
 ( $1 \pm 0,5 \%$ )

##### - Koncentracija klorofila b

$$C_{Ch\ b} = 27,42 \times A_{645} - 8,12 \times A_{662}$$

$C_{Ch\ b}$  = koncentracija klorofila b v 1 ml raztopine

$A_{662}$  = absorpcija pri 662 nm  $A_{645}$  = absorpcija pri 645 nm

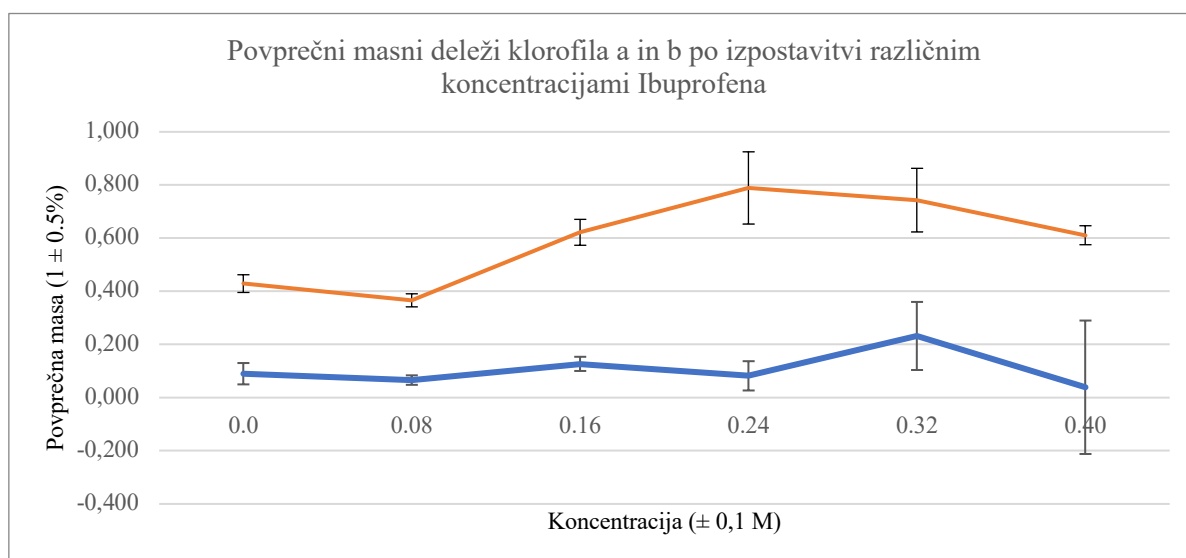
**Primer:**  $C_{Ch\ b} = 27,42 \times 0,121 \text{ Au} - 8,12 \times 0,321 \text{ Au} = 0,713 \text{ mg/ml}$  ( $1 \pm 0,5 \%$ )

$$m_{Ch\ b} = 0,713 \text{ mg/ml} \times 3,25 \text{ ml} = 2,316 \text{ mg}$$
 ( $1 \pm 0,5 \%$ )

$$m_{Ch\ b} = 2,316 \text{ mg} : 3321,7 \text{ mg} = 0,0697 \%$$
 ( $1 \pm 0,5 \%$ )

Tabela 4: Odstotna masa pigmentov v vsakem vzorcu sadik z dodanim izračunom povprečja in standardnega odklona, ki sta bila izračunana s programom Microsoft Excel

Koncentracija ( $\pm 0,1 \text{ M}$ )	Odstotna masa določenih pigmentov ( $1 \pm 0,5\%$ )							
	Pigment	vzorec 1	vzorec 2	vzorec 3	vzorec 4	vzorec 5	povprečje	SD
0,0	Chl a	0,429	0,486	0,406	0,405	0,420	0,429	0,033
	Chl b	0,114	0,048	0,147	0,062	0,081	0,090	0,040
0,08	Chl a	0,358	0,344	0,379	0,346	0,402	0,366	0,025
	Chl b	0,070	0,094	0,062	0,049	0,053	0,066	0,018
0,16	Chl a	0,630	0,641	0,597	0,556	0,686	0,622	0,049
	Chl b	0,091	0,124	0,138	0,120	0,164	0,127	0,027
0,24	Chl a	0,810	0,697	1,014	0,743	0,679	0,789	0,136
	Chl b	0,086	0,066	0,067	0,021	0,171	0,082	0,055
0,32	Chl a	0,659	0,954	0,686	0,710	0,705	0,743	0,120
	Chl b	0,388	0,286	0,106	0,288	0,093	0,232	0,128
0,40	Chl a	0,590	0,577	0,592	0,632	0,663	0,611	0,036
	Chl b	0,493	0,450	0,270	0,330	0,910	0,491	0,251



Graf 3: Povprečni masni deleži klorofila a (oranžno) in b (modro) po zalivanju sadik *Lactuca sativa* z različnimi koncentracijami ibuprofena. Črte z napakami predstavljajo standardne odklone.

**Kvalitativno opazovanje:** Sadike smo spremljali in vzgajali 6 dni, preden smo jih nadalje pregledali in analizirali. Pred šestim dnevom se je barva listov sadik spremenila, saj so se z višjimi koncentracijami ibuprofena listi hitreje spremenili v rahlo rumenkasto barvo od svetlo zelene, ki je bila prisotna na začetku poskusa.

#### 4.2. Statistična analiza

Za preverjanje, ali so razlike med povprečji statistično pomembne, so bili s programom Excel izvedeni T-testi. Ta program izračuna p-vrednost. Vrednost p kaže verjetnost zaključka, ali obstaja pomembna razlika med skupinami rezultatov, če je ničelna hipoteza resnična (verjetnost napačnega zaključka). Na splošno je p-vrednost 0,05 ali manj pomembna, v tem primeru se ničelna hipoteza zavrne (sprejme se alternativna hipoteza). Če je p-vrednost večja od 0,05, sprejmemo ničelno hipotezo in lahko sklepamo, da med skupinama ni pomembne razlike. (T-test, n. d.)

Ničelna hipoteza: Med svežo maso, pigmentacijo klorofila a in b v različnih vzorcih, ki so bili zaliti z različno molarnostjo raztopine Ibuprofena, ni bistvene razlike.

Alternativna hipoteza: Obstaja pomembna razlika v sveži masi, pigmentaciji klorofila a in b v različnih vzorcih, ki so bili zaliti z različno molarnostjo raztopine ibuprofena.

Tabela 5: p-vrednosti sveže mase različnih sadik *Lactuca sativa*, zalvanih z različnimi koncentracijami ibuprofena

Koncentracija [M]	p-vrednost	Signifikantnost
0,0 vs 0,08	0,6649	Ni signifikantno
0,0 vs 0,16	0,0218	Signifikantno
0,0 vs 0,24	0,0013	Signifikantno
0,0 vs 0,32	0,0011	Signifikantno
0,0 vs 0,40	0,0001	Signifikantno
0,08 vs 0,16	0,0350	Signifikantno
0,08 vs 0,24	0,0016	Signifikantno
0,08 vs 0,32	0,0013	Signifikantno
0,08 vs 0,40	0,0001	Signifikantno
0,16 vs 0,24	0,0164	Signifikantno
0,16 vs 0,32	0,0110	Signifikantno
0,16 vs 0,40	0,0002	Signifikantno

0,24 vs 0,32	0,6707	Ni signifikantno
0,24 vs 0,40	0,1744	Ni signifikantno
0,32 vs 0,40	0,4311	Ni signifikantno

Tabela 6: p-vrednosti primerjave masnih deležev klorofila a pri različnih koncentracijah ibuprofena

Koncentracija [M]	p-vrednost	Signifikantnost
0,0 vs 0,08	0,0090	Signifikantno
0,0 vs 0,16	0,0001	Signifikantno
0,0 vs 0,24	0,0004	Signifikantno
0,0 vs 0,32	0,0005	Signifikantno
0,0 vs 0,40	0,0000	Signifikantno
0,08 vs 0,16	$5,9 \times 10^{-6}$	Signifikantno
0,08 vs 0,24	$1,3 \times 10^{-4}$	Signifikantno
0,08 vs 0,32	$1,3 \times 10^{-4}$	Signifikantno
0,08 vs 0,40	$1,4 \times 10^{-6}$	Signifikantno
0,16 vs 0,24	0,0325	Signifikantno
0,16 vs 0,32	0,0701	Ni signifikantno
0,16 vs 0,40	0,6894	Ni signifikantno
0,24 vs 0,32	0,5871	Ni signifikantno
0,24 vs 0,40	0,0221	Signifikantno
0,32 vs 0,40	0,0458	Signifikantno

Tabela 7: p-vrednosti primerjave masnih deležev klorofila a pri različnih koncentracijah ibuprofena

Koncentracija [M]	p-vrednost	Signifikantnost
0,0 vs 0,08	0,2426	Ni signifikantno
0,0 vs 0,16	0,1245	Ni signifikantno
0,0 vs 0,24	0,7948	Ni signifikantno
0,0 vs 0,32	0,0458	Signifikantno
0,0 vs 0,40	0,0078	Signifikantno
0,08 vs 0,16	0,0026	Signifikantno
0,08 vs 0,24	0,5394	Ni signifikantno
0,08 vs 0,32	0,0205	Signifikantno
0,08 vs 0,40	0,0054	Signifikantno
0,16 vs 0,24	0,1372	Ni signifikantno
0,16 vs 0,32	0,1110	Ni signifikantno
0,16 vs 0,40	0,0123	Signifikantno
0,24 vs 0,32	0,0428	Signifikantno
0,24 vs 0,40	0,0075	Signifikantno
0,32 vs 0,40	0,0744	Ni signifikantno



## 5. ZAKLJUČEK IN VREDNOTENJE

### 5.1. Zaključek

Raziskali smo, kako različne koncentracije ibuprofena (0,08, 0,16, 0,24, 0,32 in 0,40 M) vplivajo na rast sadik *Lactuca sativa* ter na koncentracijo klorofila a in b v listih. Koncentracijo klorofila a in b smo izmerili s spektrofotometrom Vernier, ki je meril absorpcijo pri 662, 645 in 470 nm. Na podlagi rezultatov za vsako hipotezo je bilo mogoče oblikovati zaključke.

Iz *grafa 1* je razvidno, da se sveža masa sadik *Lactuca sativa* s povečevanjem koncentracij ibuprofena na splošno zmanjšuje. Vendar se črte napak standardnega odklona na grafu pri različnih koncentracijah včasih prekrivajo, kar lahko pomeni, da razlike med nekaterimi koncentracijami niso bile statistično pomembne.

Za boljše razumevanje dokazov so bili izvedeni dodatni T-testi, ki so dokazali, da je med najnižjo koncentracijo in kontrolo (0,08 in 0,0 M) ter tremi najvišjimi koncentracijami (0,24, 0,32 in 0,40 M) nekaj rezultatov nepomembnih. Vendar so bili rezultati med 0,08, 0,16 in 0,24 M signifikantni.

To bi lahko razumeli tako, da je pri višjih koncentracijah ibuprofena (od 0,24 M naprej) zaviranje hormonov avksina doseglo določeno točko, pri kateri naraščajoča koncentracija ibuprofena ni več bistveno vplivala na razvoj korenin rastline in njeno rast. Po drugi strani pa so bili pri primerjavi vseh koncentracij ibuprofena, razen 0,08 M, s kontrolnim stanjem vsi rezultati pomembni, kar pomeni, da je bilo zaviranje procesa rasti uspešno pri nekaterih koncentracijah ibuprofena.

Zaključimo lahko, da je bilo med različnimi koncentracijami Ibuprofena nekaj pomembnih razlik, saj se je sveža masa sadik *Lactuca sativa* postopoma zmanjševala, kar pomeni, da je ibuprofen pomembno vplival na razvoj korenin rastline. Čeprav razlike med višjimi koncentracijami niso vedno pomembne, je splošni trend zmanjševanja sveže mase jasno viden. To pomeni, da je **hipoteza 1**, ki pravi, da se s povečevanjem koncentracije ibuprofena postopoma zmanjšuje tudi sveža masa sadik *Lactuca sativa*, **potrjena**.

Do podobnega zaključka so prišli tudi Wijaya *et al.* (2020), saj se je z višjimi koncentracijami sveža masa sadik *Vigna unguiculata L.* zmanjševala. To se je izkazalo za pravilno, saj so bile dolžine korenin pri višjih koncentracijah ibuprofena bistveno krajše, kar je povzročilo splošno zmanjšanje rasti sadik *Vigna unguiculata L.*

Iz *grafa 3* je razvidno, da se je med kontrolo in 0,08 M koncentracijo klorofila a rahlo zmanjšala, nato pa so se masni odstotki povečali do 0,24 M koncentracije ibuprofena in nato spet upadli. Vsi rezultati so se z izračunom s T-testom izkazali za pomembne, razen rezultatov med 0,24 M, 0,32 M in 0,40 M, vendar je bila dokazana pomembna razlika med 0,40 M in 0,16 M, kar pomeni, da lahko sklepamo na upad po najvišji vrednosti masnih odstotkov.

Pri klorofilu b ni mogoče opaziti jasnega trenda. Za boljše razumevanje dokazov so bili izvedeni dodatni T-testi, ki so dokazali, da so bili rezultati večinoma nepomembni. Med 0,08 M in 0,16 M je bilo izmerjeno zelo rahlo povečanje, nato pa majhen upad med 0,24 M in 0,40 M. Standardni odkloni v *grafu 3* so bili v primerjavi s povprečnimi vrednostmi precej veliki, kar kaže na veliko variabilnost, zato so rezultati manj zanesljivi.

To bi lahko razložili tako, da je pri koncentracijah ibuprofena med 0,08 M in 0,24 M pozitivno vplival na klorofil a, kar je znano kot hormeza; prilagoditveni odziv rastlin na zunanje stresne dejavnike, ki je pogosto zmeren in občasen (Mattson, 2008). Pri koncentracijah ibuprofena nad 0,24 M je klorofil začel upadati, kar bi lahko pomenilo, da je okolje za sadike *Lactuca sativa* postalo toksično. Ibuprofen vsebuje tudi zaviralce ciklooksigenaze. Ciklooksigenaza je encim, ki povečuje proizvodnjo prostaglandinov, ki imajo pomembno vlogo pri cvetenju, fotosintezi in uravnavanju prepustnosti celičnih membran (Cole, 2014). Zato so višje koncentracije ibuprofena dosegle toksično raven teh inhibitorjev za rastlino, kar je zmanjšalo proces fotosinteze in posledično proizvodnjo klorofila a.

Poleg tega so Kudrna *et al.* (2020) pokazali, da se je s povečanjem vsebnosti paracetamola, ki je prav tako protivnetno zdravilo, vsebnost klorofila do določene mere povečala, nato pa se je zaradi previsokih koncentracij paracetamola začela zmanjševati. Čeprav se je ta študija osredotočila na vsebnost celotnega klorofila in ne ločeno na klorofil a in b. Zato so med navedeno raziskavo in to preiskavo prisotne nekatere razlike, ki jih je treba upoštevati. Nasprotno pa je raziskava, ki so jo opravili Wijaya *et al.* (2020), pokazala, da so pri podobnih koncentracijah ibuprofena omenili neravnovesje hranil, ki je povzročilo upad razvoja ne le korenin, temveč tudi koncentracij klorofila a in b, kar je lahko vzrok daljše izpostavljenosti nesteroidnemu protivnetnemu zdravilu. Kot pri nekaterih rezervah so bile sadike *Lactuca sativa* izpostavljene le 15 dni (Kudrna *et al.*, 2020), druge pa kar 50 dni (Wijaya *et al.*, 2020).

Zaključimo lahko, da se masni deleži klorofila a niso samo zmanjšali, kot je bilo zapisano v hipotezi 2, in da klorofil b ni bil upoštevan, ker ni imel dovolj pomembnih rezultatov, s povečevanjem koncentracije ibuprofena se koncentracija klorofila a in b postopoma zmanjšuje, zato lahko sklepamo, da **hipoteza 2 ni potrjena**.

## 5.2. Vrednotenje

### 5.2.1. Prednosti

Ena od prednosti so bili predhodni preskusi, pri katerih je bila uporabljena druga rastlina, ki je celo vzknila, na podlagi česar je bilo mogoče ugotoviti, da ni bila najbolj zaželena v tej kategoriji, saj je bila zelo krhka in ne bi bila tako odporna na močno zdravilo ibuprofen, kot so bile sadike *Lactuca sativa*. To je zagotovilo, da je bil naslednji poskus čim bolj optimalen in še bolj uporaben v našem vsakdanjem življenju, saj vpliva na naše vsakodnevno zaužite pridelke.

Sistematičnim in naključnim napakam smo se čim bolj izognili. Spektrofotometer je bil umerjen na prava topila, uporabljene so bile kivete brez prask, čas zalivanja in prostornina tekočine pa sta bila natančno izmerjena za vsako ponovitev. Zato je bilo prisotnih veliko nadzorovanih spremenljivk, da bi zagotovili najbolj obetavne in natančne rezultate. Kot vodilo pri eksperimentiranju so bile uporabljene tudi zanesljive zunanje študije.

Poleg tega ima spektrofotometer manjšo negotovost, zato so bile meritve s spektrofotometrom pri večjih koncentracijah precej natančne  $\pm 0,001$  nm. Pri nižjih koncentracijah pa je bila negotovost nekoliko večja, vendar še vedno ne tako velika. Negotovost je bila od 0,076 % do 0,235 %, kar verjetno ni bistveno vplivalo na končne rezultate in zaključke.

### 5.2.2. Omejitve in izboljšave

Upoštevati je bilo treba nekatere negotovosti podatkov, na primer pri merjenju mase sveže mase sadik z analitično tehtnico je bila negotovost  $\pm 0,001$  g. To bi lahko pomenilo nekoliko neenako količino

sveže mase sadik. Poleg tega je bila pri raztopinah ibuprofena in 15 ml destilirane vode negotovost  $\pm 0,1$  ml. Te napake bi lahko posledično le rahlo vplivale na rezultat, vendar ne vplivajo na splošni trend in končni sklep.

Omeniti je treba tudi naključne napake, ki bi lahko vplivale na končne rezultate in sklep, kot je razgradnja klorofila pod neposredno sončno svetlobo. Čeprav so bile kivete zavite v aluminijasto folijo, da bi preprečili to zagotovilo in izhlapevanje etanola, je bilo zagotovo prisotno nekaj razgradnje, ki bi jo lahko preprečili, če bi poskus izvedli v temnem prostoru. Drug primer je ročna maceracija vsake serije listov, nabranih iz listov *Lactuca sativa*, kar pomeni, da vsi listi niso mogli biti enako macerirani, kar bi lahko privedlo do določenih napak.

Poleg tega sveža teža sadik *Lactuca sativa* ni bila tako reprezentativna, saj so imeli meritve visoke koeficiente variabilnosti (od 14,521 % do 46,812 %), prikazane v *preglednici 4*. To bi lahko popravili z večjo količino vzorcev, na primer 10 za vsako koncentracijo ibuprofena namesto petih.

### 5.2.3. Razširitve

Dodali bi lahko še eno neodvisno spremenljivko, in sicer drugo nesteroidno protivnetno zdravilo, na primer naproksen, da bi preverili, ali lahko pride do pojava hormeze kot pri ibuprofenu in paracetamolu (Kudrna *et al.*, 2020). Opravljenih je bilo nekaj raziskav, v katerih so preverjali učinek kofeina ali diklofenaka (University of Exeter, 2014). To bi lahko bila ena od možnosti, torej da bi Ibuprofen nadomestili z drugim zdravilom, pri čemer bi še vedno uporabljali sadike *Lactuca sativa*. Druga možnost bi bila, da se ne preuči le učinek Ibuprofena na rast rastlin, temveč tudi na presnovo drugih organizmov, na primer *Paramecium* sp., kjer je bilo dokazano, da lahko nizke koncentracije Ibuprofena kažejo na hormetično krivuljo odzivnosti na odmerek, ki se je izražala s porastom dveh merjenih procesov, rasti celic in dihanja (Kermiche, Berrebah in Djebar, n. d.).

## 6. BIBLIOGRAFIJA

Bushra, R. and Aslam, N. (2010) "An overview of clinical pharmacology of Ibuprofen," *Oman medical journal*, 25(3), pp. 155–1661. doi: 10.5001/omj.2010.49.

Cole, E. (2014) "The effects of tetracycline and ibuprofen on common duckweed, *Lemna minor* L.," *ESSAI*, 12(1), p. 13. Available at: <https://dc.cod.edu/essai/vol12/iss1/13> (Accessed: September 21, 2022).

Connelly, D. (2017) *A brief history of ibuprofen*, *The Pharmaceutical Journal*. Available at: <https://pharmaceutical-journal.com/article/infographics/a-brief-history-of-ibuprofen> (Accessed: August 30, 2022).

Gray, R. (2014) "Ibuprofen changes how lettuces and radishes grow, study reveals," *Daily mail*, 5 December. Available at: <https://www.dailymail.co.uk/sciencetech/article-2862080/Is-ibuprofen-stunting-growth-CROPS-Anti-inflammatory-painkillers-change-lettuces-radishes-grow-study-reveals.html> (Accessed: August 30, 2022).

Hayes, A. (2003) *Coefficient of Variation (CV)*, *Investopedia*. Available at: <https://www.investopedia.com/terms/c/coefficientofvariation.asp> (Accessed: September 21, 2022).

Kermiche, F., Berrebah, H. and Djebar, M. R. (no date) *Toxicological effects of drugs (Diclofenac, Ibuprofen, mixture) and Hormesis on a non-target organism: Paramecium sp*, *Entomoljournal.com*. Available at: <https://www.entomoljournal.com/archives/2016/vol4issue5/PartC/4-4-71-760.pdf> (Accessed: September 8, 2022).

Kudrna, J. *et al.* (2020) "Effect of Acetaminophen (APAP) on Physiological Indicators in *Lactuca sativa*," *Life (Basel, Switzerland)*, 10(11), p. 303. doi: 10.3390/life10110303.

Mattson, M. P. (2008) "Hormesis defined," *Ageing research reviews*, 7(1), pp. 1–7. doi: 10.1016/j.arr.2007.08.007.

Parkes, B. *et al.* (2020) *Pearson Bacalaureate Biology Higher Level 2nd edition ebook only edition (Active Learn) for the IB Diploma*. London, England: Pearson Education.

Petrović, S., Zvezdanović, J. and Marković, D. (2017) "Chlorophyll degradation in aqueous mediums induced by light and UV-B irradiation: An UHPLC-ESI-MS study," *Radiation physics and chemistry (Oxford, England: 1993)*, 141, pp. 8–16. doi: 10.1016/j.radphyschem.2017.05.024.

Rede, D. *et al.* (2019) "Individual and mixture toxicity evaluation of three pharmaceuticals to the germination and growth of *Lactuca sativa* seeds," *The Science of the total environment*, 673, pp. 102–109. doi: 10.1016/j.scitotenv.2019.03.432.

Schmidt, W. and Redshaw, C. H. (2015) "Evaluation of biological endpoints in crop plants after exposure to non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs): implications for phytotoxicological assessment of novel contaminants," *Ecotoxicology and environmental safety*, 112, pp. 212–222. doi: 10.1016/j.ecoenv.2014.11.008.

*Spectroscopy* (n. d.) *A Level Chemistry*. Available at: <https://alevelchemistry.co.uk/notes/spectroscopy/> (Accessed: August 29, 2022).

Straumite, E., Kruma, Z. and Galoburda, R. (2015) "Pigments in mint leaves and stems," *Agronomy Research*, 13(4), pp. 1104–1111.

Sumanta, N. *et al.* (2014) “Spectrophotometric analysis of chlorophylls and carotenoids from commonly grown fern species by using various extracting solvents,” *Research Journal of Chemical Sciences*, 4(9), pp. 63–69.

*T-test* (n. d.) *BIOLOGY FOR LIFE*. Available at: <https://www.biologyforlife.com/t-test.html> (Accessed: August 30, 2022).

University of Exeter (2014) “Drugs in the environment affect plant growth,” *Science Daily*, 5 December. Available at: <https://www.sciencedaily.com/releases/2014/12/141205113959.htm> (Accessed: August 30, 2022).

Wijaya, L. *et al.* (2020) “Ecotoxicological effects of ibuprofen on plant growth of *Vigna unguiculata* L.,” *Plants*, 9(11), p. 1473. doi: 10.3390/plants9111473.