
Marija Nedeljković, Marko Kojić
i Etir Chalabi

Efekti etarskih ulja pelina (*Artemisia absinthium*) i čajnog drvetva (*Melaleuca alternifolia*) na odabrane klinički značajne bakterijske sojeve

Ispitivani su efekti etarskog ulja pelina (*Artemisia absinthium*) na bakterijski soj *Escherichia coli* SY252 i čajnog drvetva (*Melaleuca alternifolia*) na bakterijske sojeve *Pseudomonas aeruginosa*, *Bacillus subtilis*, *Salmonella enteritidis* i *Shigella flexneri*. Karakterizacija ulja izvršena je gasnom hromatografijom sa masenom spektrometrijom. Dominantna jedinjenja prisutna u ulju pelina su: 1,8-cineol (23.5%), tujon (18.8%) i linalool (9.5%), dok su u ulju čajnog drvetva najzastupljeniji: terpinen-4-ol (39.6%), γ -terpinen (22.2%) i γ -terpinen (9.7%). Minimalna inhibitorna koncentracija ulja pelina na soj *E. coli* iznosi 15 $\mu\text{L/mL}$, dok je ulje čajnog drvetva u koncentracijama iznad 25 $\mu\text{L/mL}$ inhibiralo rast svih testiranih sojeva. Tretman uljem pelina inhibirao je formiranje biofilma *E. coli* za 61% u odnosu na kontrolnu grupu, dok je tretman uljem čajnog drvetva inhibirao formiranje biofilma *P. aeruginosa* za 24%. Antioksidativna aktivnost etarskog ulja čajnog drvetva je određena standardnim DPPH testom. Pokazana je visoka antioksidativna aktivnost: etarsko ulje čajnog drvetva je neutralisalo preko 90% 2,2-difenil-1-pikrilhidrazil (DPPH) radikala u ukupnom uzorku u koncentracijama iznad 3.12 $\mu\text{L/mL}$. Daljim analizama aktivnih supstanci ispitivanih ulja i njihovih eventualnih sinergističkih dejstava moglo bi se doći do formulacije sa potencijalnom primenom u terapiji bakterijskih infekcija.

Uvod

Raširena upotreba antibiotika dovela je do pojave rezistencije kod bakterija, pri čemu postoje sojevi koji su rezistentni na sve komercijalno dostupne antibiotike. Lečenje bakterijskih infekcija sve se više komplikuje zbog sposobnosti bakterija da razviju otpornost (Tenover 2006). Zbog toga postoji potreba za novim pristupom u lečenju oboljenja izazvanih mikroorganizmima. Etarska ulja nekih biljaka ispoljavaju jak antimikrobni efekat u *in vitro*, ali i u *in vivo* modelima infekcija, čak i u niskim koncentracijama (Hili *et al.* 1997).

Bakterije mogu formirati biofilm, sesilnu zajednicu mikroorganizama pričvršćenu za podlogu. Bakterije u biofilmu imaju drugačiji fenotip nego planktonske ćelije. Biofilm se može sastojati od jedinki više različitih bakterijskih sojeva ili samo jednog soja. Nastajanje biofilma se dešava u više faza. Prva faza podrazumeva reverzibilno pričvršćivanje bakterija za podlogu. Ono može biti pasivno i aktivno. Pasivno pričvršćivanje je uslovljeno gravitacionom silom, difuzijom i dinamikom suspenzije u kojoj se nalaze bakterije. Aktivno vezivanje zavisi od karakteristika ćelijske površine kao što su prisustvo flagela, kapsule, pila i adhezivnih proteina. Sekretijom signalnih molekula dolazi do privlačenja drugih ćelija. Biofilm nije jednostavan agregat ćelija, već ima kompleksnu trodimenzionalnu strukturu gde dolazi do deljenja bakterija i stvaranja mikrokolonija. Lučenjem

Marija Nedeljković (1998), Novi Pazar, Stevana Nemanje 190A, učenica 3. razreda Gimnazije u Novom Pazaru

Marko Kojić (1997), Beograd, Komnen Barjaktara 5, Beograd, učenik 4. razreda Prve beogradske gimnazije

Etir Chalabi (1997), Beograd, Bulevar kralja Aleksandra 222, učenik 4. razreda Sedme beogradske gimnazije

MENTOR: Iva Atanasković, student Biološkog fakulteta Univerziteta u Beogradu

polimernih supstanci (polisaharida, proteina, fosfolipida, nukleinskih kiselina i drugih polimera) dolazi do stvaranja ekstracelularnog matriksa. Zahvaljujući prisustvu ekstracelularnog matriksa dolazi do dodatnog pričvršćivanja bakterija za podlogu, posredstvom dipol-dipol interakcija, jonskih i kovalentnih veza. U biofilmu se stvaraju intersticijalni kanalići koji su esencijalni za opstanak biofilma. Preko tih kanalića vrši se razmena vode i hranljivih materija između ćelija unutar biofilma. Dalji razvoj biofilma zavisi od dostupnosti hranljivih materija i rezultat je vezivanja planktonskih ćelija sa već formiranim biofilmom. Ako hranljivih materija ima u dovoljnim količinama, dolazi do maturacije tj. sazrevanja biofilma. U fazi disperzije, pojedine ćelije iz biofilma ponovo prelaze u planktonsko stanje i potom stvaraju novi biofilm (Milanov *et al.* 2008).

Formiranje biofilma komplikuje lečenje bakterijskih infekcija. Bakterije koje rastu u biofilmu su od 10-1000 puta manje osetljivije na antibiotike od planktonskih ćelija (Stewart i Costerton 2001; Stewart 2002). Postoje tri razloga za veću otpornost biofilma na antibiotike. Prvi razlog je slabiji prodor antibiotika kroz ekstracelularni matriks. Drugi razlog je prisustvo ćelija sa već razvijenom rezistentnošću na određeni antibiotik. U biofilm najčešće ulaze različiti bakterijski sojevi, pa se horizontalnim transferom gena mogu razmeniti geni za rezistenciju. Zato se za biofilm može reći da predstavlja rezervoare gena za rezistenciju na antibiotike (Vaz-Moreira *et al.* 2014). Ova razmena se može vršiti između filogenetski bliskih, kao i filogenetski udaljenih sojeva (Rodriguez-Mozaz *et al.* 2015). Treći razlog je sporija deoba bakterija u biofilmu, zbog manje dostupnosti hranljivih materija iz ekstracelularnog matriksa, s obzirom na to da većina antibiotika deluje samo na aktivno rastuće bakterije (Stewart i Costerton 2001; Stewart 2002).

Etarska ulja su hidrofobne tečnosti koje se dobijaju iz raznih delova biljaka. Po hemijskoj strukturi su derivati terpena (Kitić 2010). Koriste se najviše u alternativnoj medicini, a savremena istraživanja su usmerena u pravcu izolacije i karakterizacije aktivnih supstanci iz etarskih ulja sa potencijalnom primenom u lečenju infekcija.

Za neka etarska ulja potvrđeno je antioksidativno dejstvo. Antioksidansi su supstance koje neutralisanjem slobodnih radikala, doniranjem svog elektrona, sprečavaju oštećenja biomolekula u organizmu (Sen *et al.* 2010).

Cilj ovog istraživanja je bila izolacija i karakterizacija etarskih ulja pelina i čajnog drveta. Ispitani su efekti etarskog ulja pelina na rast i na formiranje biofilma *E. coli* i etarskog ulja čajnog drveta na rast i na formiranje biofilma *P. aeruginosa*, *B. subtilis*, *S. enteritidis* i *S. flexneri*. Za etarsko ulje čajnog drveta je ispitivana i antioksidativna aktivnost.

Materijal i metode

Ekstrakcija etarskih ulja. Ulje pelina (*Artemisia absinthium*) ekstrahovano je metodom po Ungeru. Ulje je rastvoreno u dietil-etru. Dehidratacija je vršena anhidrovanim natrijum-sulfatom i ulje je uparavano na vakuum uparivaču. Etarsko ulje čajnog drveta je dobijeno postupkom destilacije vodenom parom iz listova.

Gasna hromatografija spregnuta sa maseonom spektrometrijom (GC-MS). Ulje pelina je rastvoreno u metil hloridu, dok je ulje čajnog drveta čist destilat. Etarska ulja su analizirana Agilent Technologies 7890A gasnom hromatografu sa 240 Ion Trap masenim spektrometrom. Energija elektrona je bila 70 eV, u opsegu od 40 do 1000 m/z. VF5MS kolona (30 m × 250 μm × 0.25 μm) je bila korišćena, a kao noseći gas pri protoku od 1 mL/min korišćen je helijum. Pri analizi etarskog ulja čajnog drveta početna temperatura pećnice je bila 40°C (7°C/min do 310°C), a zatim je povećana na 310°C (temperatura inleta 250°C) u trajanju od 10 min.

Određivanje minimalne inhibitorne koncentracije (MIC). Etarsko ulje pelina je rastvoreno u dimetil-sulfoksidu (DMSO) do finalne koncentracije od 150 μL/mL, dok je etarsko ulje čajnog drveta korišćeno kao čist destilat. Kao pozitivna kontrola je korišćen antibiotik penicilin-streptomycin (10000 U/ml penicilina i 10 mg/mL streptomicina) rastvoren u Mueller-Hinton bujonu (MHB) finalne koncentracije 0.2 mg/mL. Najviša testirana koncentracija za ulje pelina iznosila je 15 μL/mL, a najniža 0.12 μL/mL, dok je opseg koncentracija za ulje čajnog drveta bio od 100 μL/mL do 0.78 μL/mL.

Tretman je vršen tokom 24h na 37°C. Zatim je uzorcima dodat resazurin koncentracije 0.635 mg/mL, te je vršena doinkubacija u trajanju od 3h na 37°C. Resazurin biva redukovan u rezorufin, ukoliko dolazi do bakterijskog rasta, pri čemu se dešava promena boje iz plave u ružičastu. Poslednja koncentracija pri kojoj nije došlo do promene boje se tumači kao minimalna inhibitorna koncentracija (eng. minimal inhibitory concentration, MIC).

Merenje efikasnosti formiranja biofilma. U prvoj fazi eksperimenta inkubirano je po 200 µL prekončne kulture (stare 24 h) u bunarićima mikrotitarske ploče, kako bi se formirao biofilm. Inkubacija je trajala 24 h na 37°C. Nakon toga podloga je odlivena, a bunarići su isprani fiziološkim rastvorom. Zatim je dodata podloga Mueller Hinton Broth (MHB) sa etarskim uljem u odgovarajuće bunariće. Korišćena koncentracija ulja predstavlja polovinu minimalne inhibitorne koncentracije za odgovarajući bakterijski soj. Eksperiment je postavljen u triplicatu. Ploča je inkubirana 24 h na 37°C, nakon čega je odliven supernatant, dok su bunarići isprani fiziološkim rastvorom. U cilju pričvršćivanja biofilma u svaki bunarić je dodato po 125 µL metanola, a potom je supernatant odliven. U svaki bunarić je dodato po 125 µL 0.1% rastvora boje kristal violet (rastvorene u 4% etanolu). Mikrotitarska ploča je inkubirana 20 minuta na sobnoj temperaturi, a nakon toga isprana mlazom vode, radi uklanjanja viška boje. U bunariće je dodato po 125 µL 30% sirćetne kiseline, pa je usledila inkubacija od 10 minuta na sobnoj temperaturi. Potom su izmerene apsorbance na talasnoj dužini od 620 nm. Apsorbanca je proporcionalna debljini biofilma.

DPPH test. DPPH test je najčešće korišćena *in vitro* metoda za određivanje antioksidativne aktivnosti, koja je bazirana na razmeni H-atoma ili elektrona između molekula antioksidanasa iz biljnog ekstrakta i DPPH radikala (2,2-difenil-1-pikrilhidrazil) u rastvoru (Patel i Patel 2011). DPPH radikal pod uticajem redukujućih agenasa menja boju od ljubičaste do žute u zavisnosti od nastalog stabilnog dijamagnetičnog molekula hidrazina (Magalhaes *et al.* 2008). Pripremljeni su rastvori etarskog ulja čajnog drveta u opsegu koncentracija od 100 µL/mL do 0.78 µL/mL, sa faktorom razblaženja 2. U 1 mL etanolnog ras-

tvora DPPH radikala koncentracije 0.0004 % dodato je po 50 µL testirane supstance, a zatim je odmah merena apsorbance uzorka na 517 nm (prva proba) i nakon 30 minuta inkubacije u mraku na sobnoj temperaturi (druga proba). Merena je i apsorbance za etanolni rastvor DPPH radikala i etarskog ulja na 517 nm. Slepna proba za sva merenja je etanol. Kapacitet uklanjanja slobodnih radikala je računat prema jednačini (Stanojević *et al.* 2009):

$$\text{Kapacitet neutralisanja DPPH radikala (\%)} = 100 - \frac{A_U - A_B}{A_K} \times 100$$

gde je A_U – apsorbance uzorka (ulje u rastvoru DPPH radikala), A_B – apsorbance blanka (ulje), a A_K – apsorbance kontrole (rastvor DPPH radikala).

Rezultati i diskusija

Dobijeni procentni sadržaj etarskog ulja pelina i čajnog drveta je prikazan je u tabelama 2 i 3 u prilogu ovog rada.

Minimalna inhibitorna koncentracija (MIC). Minimalna inhibitorna koncentracija etarskog ulja pelina za bakterijski soj *E. coli* iznosi 15 µL/mL. Kod bakterijskih sojeva *Pseudomonas aeruginosa* i *Bacillus subtilis* tri najviše testirane koncentracije etarskog ulja čajnog drveta su ispoljile antimikrobni efekat (od 25 µL/mL do 100 µL/mL). Minimalna inhibitorna koncentracija ulja iznosi 25 µL/mL. Bakterijski sojevi *Salmonella enteritidis* i *Shigella flexneri* osetljivi su na četiri najviše koncentracije etarskog ulja (od 12.5 µL/mL do 100 µL/mL). Minimalna inhibitorna koncentracija iznosi 12.5 µL/mL. Rezultati MIC testova predstavljeni su u tabeli 1.

Tabela 1. Minimalna inhibitorna koncentracija etarskih ulja za ispitivane bakterijske sojeve

Bakterijski soj	MIC (µL/mL)
<i>Escherichia coli</i>	15
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	25
<i>Bacillus subtilis</i>	25
<i>Salmonella enteritidis</i>	12.5
<i>Shigella flexneri</i>	12.5

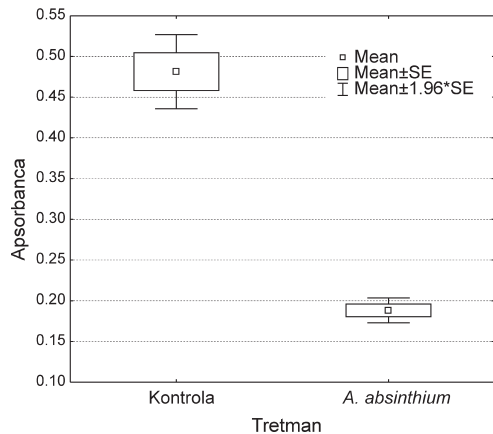
Koncentracije od 25 $\mu\text{L}/\text{mL}$ do 100 $\mu\text{L}/\text{mL}$ etarskog ulja čajnog drveta imaju antimikrobni efekat na sve testirane sojeve. Na bakterijskim sojevima *Salmonella enteritidis* i *Shigella flexneri*, ulje je pokazalo izraženiji efekat i delovalo antibakterijski već pri koncentraciji od 12.5 $\mu\text{L}/\text{mL}$. Ovo etarsko ulje je pokazalo antimikrobno dejstvo i na gram-pozitivne i na gram-negativne bakterije.

Dosadašnja istraživanja su pokazala da α -pinen, jedna od najzastupljenijih komponenti testiranih ulja, ispoljava efekat na ćelijsku membranu i inhibira respiratorne aktivnosti u mitohondrijama (Andrews *et al.* 1980). Uticaj soli ili drugih toksičnih supstanci takođe može izazvati oštećenja na membrani (Landolo i Ordal 1966), a ovakva svojstva pokazuje i 1,8-cineol (Carson *et al.* 2002). Terpinen-4-ol izaziva oštećenja membrane, pojavu mezozoma i razgradnju komponenti citoplazme (Carson *et al.* 2002). Ova je supstanca prisutna u etarskom ulju čajevca u najvećem procentu (39.6%). Dalja istraživanja treba da budu usmerena na pojedinačne efekte i definisanje mehanizama delovanja najzastupljenijih komponenti.

Antibiofilm efekat. Pokazano je da pri koncentraciji MIC/2 etarskog ulja pelina dolazi do inhibicije formiranja biofilma za 61% u odnosu na kontrolu (slika 1).

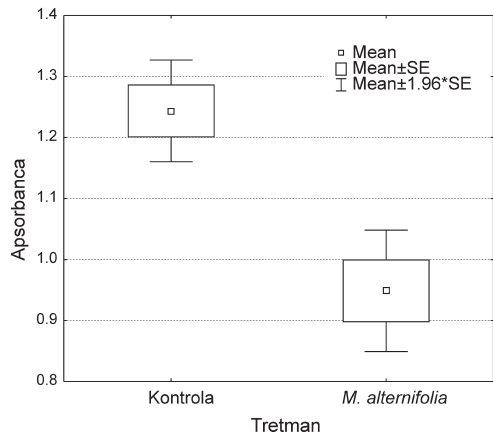
U ovom istraživanju pokazano je da bi ulje pelina moglo da se primenjuje u terapijske svrhe. U literaturi poznat inhibitor formiranja biofilma u visokom procentu (43-61%) je α -amilaza koja degraduje ekstracelularne polimerne supstance (Kalpana *et al.* 2012). Problem je u tome što su komercijalni enzimi veoma skupi i time teže primenjivi u terapiji (Sun *et al.* 2013), dok su etarska ulja značajno jeftinija. Mali broj etarskih ulja inhibira formiranje biofilma više od 50%, zbog čega je efekat ulja pelina na formiranje biofilma *E. coli* veoma zanimljiv za dalja istraživanja.

Ispitivanjem uticaja etarskog ulja čajnog drveta na formiranje biofilma bakterije *Pseudomonas aeruginosa* zabeležena je inhibicija od 24% u odnosu na kontrolu (slika 2). Dobijeni rezultati za etarsko ulje čajevca su u skladu sa rezultatima istraživanja u kojima su korišćena etarska ulja dobijena od drugih biljaka (Kavanaugh i Ribbeck 2012).



Slika 1. Efekat MIC/2 koncentracije etarskog ulja pelina na formiranje biofilma kod *E. coli*

Figure 1. The effect of *Artemisia absinthium* essential oil on biofilm formation of *E. coli*



Slika 2. Efekat MIC/2 koncentracije etarskog ulja čajnog drveta na formiranje biofilma kod *P. aeruginosa*

Figure 2. The effect of *Melaleuca alternifolia* essential oil on biofilm formation of *P. aeruginosa*

DPPH test. Pokazan je visok stepen antioksidativne aktivnosti etarskog ulja čajnog drveta, koje je neutralisalo preko 90% 2,2-difenil-1-pikrilhidrazil (DPPH) radikala u ukupnom uzorku u koncentracijama iznad 3.12 $\mu\text{L}/\text{mL}$. U poređenju sa ovom sposobnošću drugih etarskih ulja, etar-

sko ulje čajevca je aktivnije i predstavlja dobar antioksidans. Pri istim koncentracijama ovo ulje pokazuje od dva do tri puta efikasniju neutralizaciju DPPH radikala (Getahun *et al.* 2008; Stanojević *et al.* 2013).

Zaključak

Etarsko ulje pelina pokazalo je visok procenat inhibicije formiranja biofilмова, pa su dobijeni rezultati interesantni za dalja istraživanja i pronalazjenje potencijalne primene aktivnih supstanci ovog ulja u kliničkoj praksi.

Ulje čajnog drveta poseduje sposobnost neutralisanja DPPH radikala u znatno većem procentu u poređenju sa podacima dostupnim u literaturi za druga etarska ulja, pa dobijeni rezultati ukazuju na mogućnost korišćenja ovog ulja kao antioksidansa.

Prednost ulja u odnosu na sintetičke antibiotike je u tome što ne dovode do pojave rezistentnosti. Daljim analizama aktivnih supstanci ispitivanih ulja i njihovih eventualnih sinergističkih dejstava, kao i nakon farmakokinetičkih ispitivanja, moglo bi se doći do formulacije sa potencijalnom primenom u terapiji bakterijskih infekcija.

Literatura

Andrews R. E., Parks L. W., Spence K. D. 1980. Some effects of Douglas fir terpenes on certain microorganisms. *Applied and Environmental Microbiology*, **40** (2): 301.

Carson C., Mee B., Riley T. 2002. Mechanism of action of *Melaleuca alternifolia* (Tea Tree) Oil on *Staphylococcus aureus* determined by time-kill, lysis, leakage, and salt tolerance assays and electron microscopy. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, **46** (6): 1914.

Getahun Z., Asres K., Mazumder A., Bucar F. 2008. Essential oil composition, antibacterial and antioxidant activities of *Mentha aquatica*. *Ethiopian Pharmaceutical Journal*, **26** (1): 9.

Hili P., Evans C. S., Veness R. G. 1997. Antimicrobial action of essential oils: the effect of dimethylsulfoxide on the activity of cinnamon oil. *Letters in Applied Microbiology*, **24** (4): 269.

Kalpana B. J., Arthy S., Pandian S. K. 2012. Antibiofilm activity of α -Amylase from *Bacillus subtilis* S8-18 against biofilm forming human bacterial pathogens. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, **167** (6): 1778.

Kavanaugh N. L., Ribbeck K. 2012. Selected antimicrobial essential oils eradicate *Pseudomonas* spp. and *Staphylococcus aureus* biofilms. *Applied and Environmental Microbiology*, **78** (11): 4057.

Kitić D. 2010. Etarska Ulja. *Studentski medicinski glasnik*, **1** (1): 149.

Landolo J. J., Ordal Z. J. 1966. Repair of thermal injury of *Staphylococcus aureus*. *Journal of Bacteriology*, **91** (1): 134.

Magalhaes L. M., Segundo M. A., Reis S., Lima J. L. 2008. Methodological aspects about *in vitro* evaluation of antioxidant properties. *Analytical Chimica Acta*, **613** (1): 1.

Milanov D., Ašanin R., Vidić B., Kinjajić D., Petrović J. 2008. Biofilm- organizacija života bakterija u prirodnim ekosistemima. *Arhiv veterinarske medicine*, **1** (2): 5.

Patel M. R., Patel J. N. 2011. In vitro antioxidant activity of coumarin compounds by DPPH, Super oxide and nitric oxide free radical scavenging methods. *Journal of Advanced Pharmacy Education and Research*, **1**: 52.

Rodriguez-Mozaz S., Chamorro S., Marti E., Huerta B.1, Gros M., Sánchez-Melsió A., Borrego C. M., Barceló D., Balcázar J. L. 2015. Occurrence of antibiotics and antibiotic resistance genes in hospital and urban wastewaters and their impact on the receiving river. *Water Research*, **69**: 234.

Sen S., Chakraborty R., Sridhar C., Reddy Z. S. R. 2010. Free radicals, antioxidants, diseases and phytomedicines: current status and future prospect. *International Journal of Pharmaceutical Sciences Review and Research*, **3** (1): 91.

Stanojević Lj., Stanković M., Nikolić V., Nikolić Lj., Ristić D., Čanadanovic-Brunet J., Tumbas V. 2009. Antioxidant activity and total phenolic and flavonoid contents of *Hieracium pilosella* L. extracts. *Sensors*, **9** (7): 5702.

Stanojević Lj., Zdravković A., Stanković M., Cakić M., Nikolić V., Ilić D. 2013. Antioksidativna aktivnost vodeno-etanolnih ekstrakata iz lista koprive (*Urtica dioica* L.). *Savremene tehnologije*, **2** (1): 51.

Stewart P. S., Costerton J. W. 2001. Antibiotic resistance of bacteria in biofilms. *Lancet*, **358** (9276): 135.

Stewart P. S. 2002. Mechanisms of antibiotic resistance in bacterial biofilms. *International Journal of Medical Microbiology*, **292** (2): 107.

Sun F., Qu F., Ling Y., Mao P., Xia P., Chen H., Zhou D. 2013. Biofilm-associated infections, antibiotic resistance and novel characteristics. *Future Medicine*, **8** (7).

Tenover C. F. 2006. Mechanisms of antimicrobial resistance in bacteria. *The American Journal of Medicine*, **119** (6): 3.

Vaz-Moreira I., Nunes O. C., Manaia C. M. 2014. Bacterial diversity and antibiotic resistance in water habitats: searching the links with the human microbiome. *FEMS Microbiology Reviews*, **38** (4): 761.

*Marija Nedeljković, Marko Kojić
and Etir Chalabi*

Effects of *Artemisia absinthium* and *Melaleuca alternifolia* Essential Oils on Selected Clinically Important Bacterial Strains

The aim of this research was to investigate the effects of *Artemisia absinthium* essential oil on the bacterial strain *Escherichia coli* SY252,

and the effects of *Melaleuca alternifolia* essential oil on the bacterial strains *Pseudomonas aeruginosa*, *Bacillus subtilis*, *Salmonella enteritidis* and *Shigella flexneri*. The characterization of these essential oils was done using the gas chromatography with mass spectrometry. 1,8- Cineole (23.5%), Thymone (18.8%) and Linalool (9.5%) are the main components of *Artemisia absinthium* essential oil, while Terpinen-4-ol (39.6%), γ -Terpinen (22.2%) and γ -Terpinen (9.7%) are the most abundant compounds of *Melaleuca alternifolia* essential oil. The minimal inhibitory concentration of *Artemisia absinthium* essential oil is 15 $\mu\text{L}/\text{mL}$, while the concentrations above 25 $\mu\text{L}/\text{mL}$ of *Melaleuca alternifolia* essential oil inhibited the growth of all tested strains. The treatment with *Artemisia absinthium* essential oil inhibited the biofilm formation of *E. coli* for 60.8% compared to the control group, and *Melaleuca alternifolia* essential oil inhibited the biofilm formation of *P. aeruginosa* for 23.8%. Antioxidant activity of *Melaleuca alternifolia* was determined by the standard DPPH assay. The concentrations above 3.12 $\mu\text{L}/\text{mL}$ of this oil showed high antioxidant activity, neutralizing over 90% of 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) radicals in the sample. Further analysis of active components of these oils and their possible synergistic effects could lead us to new, potentially applied formulation in the treatment of bacterial infections.

Prilog

Tabela 2. Procentni sadržaj etarskog ulja pelina

Komponenta	Procenat
(1R,3R,5R)-4-metiliden-1-propan-2-ilbiciklo[3.1.0]heksan-3-ol (Tujen)	1.72
1,3- cikloheksadien	3.1
1-metil-4-propan-2-ilbenzen (Cimen)	4.62
2,2,4-trimetil-3-oksabiciklo[2.2.2]octan (1.8-Cineol)	23.49
4-metil-1-propan-2-ilcikloheks-3-en-1-ol (Terpinen)	0.47
3,7-dimetilokta-1,6-dien-3-ol (Linalool)	9.53
(1S,4R,5R)-4-metil-1-propan-2-ilbiciklo[3.1.0]heksan-3-on (Tujen)	18.79
4-heksen-1-ol	1.22
2-(4-metilcikloheks-3-en-1-il)propan-2-ol (Terpineol)	1.23
1-Isopropil-4-metil-3-cikloheksen-1-ol (4-terpineol)	2.1
(2Z)-3,7-dimetilokta-2,6-dien-1-ol (Nerol)	1.08
Mirtenil acetat	2.41
3,7-dimetilokta-1,6-dien-3-il propanoat (Linalil propionat)	0.78
3,7-dimetilokta-1,6-dien-3-il 3-metilbutanoat (Linalil izovalerat)	1.03
[(1E)-2-etil-4-metil-1,3-pentadienil]benzen	1.1
Kariofilen-oksidi	2.2
1,2,3,4-tetrametil-naften	2.91

Tabela 3. Procentni sadržaj etarskog ulja čajnog drveta

Komponenta	Procenat
4,6,6-trimetilbiciklo[3.1.1]hept-3-en (α -Pinen)	4.66
4-metil-1-propan-2-ilcikloheks-3-en-1-ol (α -Terpinen)	9.68
1-metil-4-propan-2-ilcikloheksa-1,4-dien (γ -Terpinen)	22.15
1-Isopropil-4-metil-3-cikloheksen-1-ol (Terpinen-4-ol)	39.61
2-(4-metilcikloheks-3-en-1-il)propan-2-ol (α -Terpineol)	5.55
2-(4-metilcikloheks-3-en-1-il)propan-2-il acetat (α -Terpineol acetat)	0.53
1-metil-4-propan-2-ilidencikloheksen (Terpinolen)	3.24
(4R)-1-metil-4-prop-1-en-2-ilcikloheksen (Limonen)	2.34
2,2,4-trimetil-3-oksabiciklo[2.2.2]oktan (1,8- Cineol)	3.29
1-metil-4-propan-2-ilbenzen (p-Cimen)	4.15
(1aR,4R,7bS)-1,1,4,7-tetrametil-1a,2,3,4,4a,5,6,7b-oktahidrociklopropa[e]azulen (γ -Gurjunen)	2.13
1,1,7-trimetil-4-metiliden-2,3,4a,5,6,7,7a,7b-oktahidro-1aH-ciklopropa[e]azulen (Aromadendren)	0.44

Tabela 3 (nastavak)

Komponenta	Procenat
(1R,3R,5R)-4-metiliden-1-propan-2-ilbiciklo[3.1.0]heksan-3-ol (Cis-Sabinol)	0.52
(1S,4aR,8aS)-4,7-dimetil-1-propan-2-il-1,2,4a,5,8,8a-heksahidronaftalen (β -Kadinen)	0.45
(1R,4aS,8aS)-7-metil-4-metiliden-1-propan-2-il-2,3,4a,5,6,8a-heksahidro-1H-naftalen (γ -Kadinen)	0.48
(1aR,7R,7aS,7bR)-1,1,4,7-tetrametil-1a,2,3,5,6,7,7a,7b-oktahidrociklopropa[e]azulen (Leden, Viridifloren)	0.79

