

Hemijski sastav, antioksidativna i antimikrobna aktivnost etarskog ulja *Ocimum sanctum* L.

Damir V. Beatović¹, Slavica Ć. Jelačić¹, Čedo D. Oparnica¹, Dijana B. Krstić-Milošević², Jasmina M. Glamočlija², Mihailo S. Ristić³, Jovana D. Šiljegović²

¹Univerzitet u Beogradu, Poljoprivredni fakultet, Beograd, Srbija

²Univerzitet u Beogradu, Institut za biološka istraživanja „Siniša Stanković“, Beograd, Srbija

³Institut za proučavanje lekovitog bilja „Dr Josif Pančić“, Beograd, Srbija

Izvod

U radu su prikazani rezultati ispitivanja hemijskog sastava, antioksidativne i antimikrobne aktivnosti etarskog ulja *Ocimum sanctum* L. gajenog u Srbiji. Količina etarskog ulja u suvoj herbi prosečno iznosi 0,68%. U njemu je identifikovana 41 komponenta. Najzastupljenija hemijska grupa su seskviterpenske ugljovodonici sa 80,47%. Seskviterpenske ugljovodonik β-kariofilen je sa 63,80% dominantna komponenta u etarskom ulju. Količina etarskog ulja koja je potrebna da se ostvari 50% inhibicije DPPH radikala iznosi 0,35 μg/ml te ono poseduje visoku sposobnost neutralizacije slobodnih radikala. Etarsko ulje je ispoljilo antibakterijsku aktivnost na sve testirane Gram-pozitivne i Gram-negativne bakterijske sojeve. Ono je delovalo na sve sojeve inhibitorno u intervalu 0,34–41,50 μl/ml i baktericidno u opsegu 22,50–124,50 μl/ml. Etarsko ulje je ispoljilo i antifungalnu aktivnost na sve testirane gljive i delovalo je inhibitorno u intervalu 4,42–8,83 μl/ml i mikrobicidno u opsegu 10,00–50,00 μl/ml.

Ključne reči: *Ocimum sanctum*, etarsko ulje, hemijski sastav, antioksidativna aktivnost, antimikrobna aktivnost.

Dostupno na Internetu sa adrese časopisa: <http://www.ache.org.rs/HI/>

Etarska ulja svojim hemijskim sastavom, antioksidativnim i antibakterijskim delovanjem utiču na mnoge fiziološke procese, kako biljnog tako i ljudskog organizma, i na taj način štite od slobodnih radikala i razvoja patogenih mikroorganizama [1]. Otpornost nekih bakterija i gljiva na komercijalne antibiotike i mogući negativni efekti sintetičkih antioksidanata opravdano su povećali interes za istraživanja etarskih ulja [2–4]. Etarska ulja ispoljavaju antimikrobno, antivirusno, antioksidativno, antikancerogeno, hepatoprotektivno delovanje [5–7].

Ocimum sanctum L. (*Lamiaceae*) sin. *Ocimum tenuiflorum* L. – Tulsi bosiljak je lekovita biljka poreklom iz tropskih i subtropskih delova Indije. Koristi se u tradicionalnoj i oficinalnoj medicini u Indiji. U Ajurveda i Sidha medicini se primenjuje za lečenje različitih infekcija, kožnih bolesti, poremećaja jetre, nazeba, kašlja, groznice i malarije [8]. Dosadašnja istraživanja etarskog ulja vrste *Ocimum sanctum* pokazuju da ono ima značajnu antiinflamatornu, antioksidativnu, imunomodulatorsku i antistresnu aktivnost [9–12]. Na osnovu kompozicije i dominantne komponente u etarskom ulju u okviru vrste *Ocimum sanctum* identifikovano je nekoliko hemotipova: eugenolni [8,9,13,14], kariofilenski

NAUČNI RAD

UDK 547.9:665.3:582.929.4:615

Hem. Ind. 67 (3) 427–435 (2013)

doi: 10.2298/HEMIND120615086B

[8,15,16], metileugenolni [17] i kariofilensko-metileugenolni [8].

Ocimum sanctum L. je vrsta bosiljka koja do sada u Srbiji nije istraživana a malo je proučavana i u Evropi. U Srbiji je najviše proučavana vrsta *Ocimum basilicum* L. čije etarsko ulje po hemijskom sastavu pripada linalolnom (evropskom) hemotipu i ispoljava izrazito antimikrobnu aktivnost [3,18,19].

Cilj rada je ispitivanje introdukovane vrste Tulsi bosiljka (*Ocimum sanctum* L.), odnosno određivanje hemijskog sastava, antioksidativne i antimikrobne aktivnosti njegovog etarskog ulja.

EKSPERIMENTALNI DEO

Biljni materijal

Kao materijal za istraživanje korišćen je bosiljak *Ocimum sanctum* L., genotip Holy red iz kolekcije banke Biljnih gena Srbije i Instituta za ratarstvo i povrtarstvo Poljoprivrednog fakulteta u Beogradu (oznaka DB0013). Biljni materijal za analize je dobijen sa poljskog ogleđa koji je postavljen u Surčinu tokom 2010. godine. Usev bosiljka je gajen do faze početka cvetanja, kada su uzimani uzorci. Herba bosiljka je osušena prirodno, propisno je upakovana i čuvana do hemijskih analiza.

Izolacija etarskog ulja

Etarsko ulje iz suve herbe bosiljka *Ocimum sanctum* L. je dobijeno je hidrodestilacijom u oficinalnom aparatu

Prepiska: D.V. Beatović, Poljoprivredni fakultet, Nemanjina 6, 11080 Beograd-Zemun, Srbija.

E-pošta: beatovic@agrif.bg.ac.rs

Rad primljen: 15. jun, 2012

Rad prihvaćen: 13. jul, 2012

po Clavenger-u [20]. Određena je količina etarskog ulja na 100 g suve herbe (v/w) u tri ponavljajnja i izražena je kao srednja vrednost \pm standardna devijacija (SD). Dobijeno ulje je osušeno uz pomoć bezvodnog natrijum sulfata i čuvano na temperaturi od 4 °C do hemijske analize GC-FID/MS, određivanja antioksidativnog potencijala i antimikrobne aktivnosti.

Gasno masena hromatografija etarskog ulja (GC i GC/MS)

Klasična analitička gasnohromatografska analiza (GC-FID) urađena je na Hewlett-Packard gasnom hromatografu, model HP-5890 Series II, opremljenom split-splitless injektorom povezanim sa HP-5 kolonom (25 m \times 0,32 mm, debljine filma 0,52 μ m) i plameno-jonizujućim detektorom (FID). Etanolni rastvori uzorka etarskog ulja (1 μ l, 1% rastvor) injektovani su u split-režimu (1:30). Kao noseći gas korišćen je vodonik (1 ml/min). Temperatura injektora iznosila je 250 °C, a detektora (FID) 300 °C, dok je temperatura kolone menjana u linearnom režimu temperaturskog programiranja od 40–260 °C (4 °C/min).

Gasna hromatografija sa masenom spektromerijom izvršena je na HP G 1800C Series II GCD analitičkom sistemu, opremljenim split-splitless injektorom, povezanim sa HP-5MS kolonom (30 m \times 0.25 mm \times 0.25 μ m) i maseno spektrometrijskim selektivnim detektorom. Primljeni su isti analitički uslovi. Etanolni rastvori uzorka etarskog ulja (1 μ l, 1% rastvor) injektovani su u split-režimu (1:30). Kao noseći gas korišćen je helijum (1 ml/min). Temperatura injektora iznosila je 250 °C, a transfer linije (MSD) 260 °C dok je temperatura kolone menjana u linearnom režimu temperaturskog programiranja od 40–260 °C (4 °C/min). Maseni spektri snimani su u EI režimu (70 eV), u opsegu *m/z* 40–400.

Identifikacija pojedinačnih komponenata etarskog ulja vršena je masenospektrometrijski preko Kovačevih indeksa, uz korišćenje različitih baza masenih spektara (NIST/Wiley), različitih načina pretrage (PBM/NIST/AMDIS) i raspoloživih literaturnih podataka [21]. Za kvantifikacione svrhe, kao osnova uzeti su procenti površina pikova, dobijeni integracijom sa odgovarajućih hromatograma (GC/FID).

Određivanje antioksidativne aktivnosti etarskog ulja (DPPH metoda)

Relativna antiradikalna aktivnost etarskog ulja ispitivana je pomoću stabilnog slobodnog radikala DPPH (1,1-difenil-2-pikrilhidrazil) i određena je po spektrofotometrijskoj metodi [22] sa modifikacijama koje se odnose na količinu analiziranog uzorka, koncentraciju DPPH rastvora i jedinjenja koja su korišćena kao pozitivna kontrola.

Etarsko ulje je rastvoreno u metanolu i pripremljene su koncentracije od 0,06, 0,09, 0,12, 0,15 i 0,20 mg/ml. Reakciona smeša od 500 μ l testiranog ulja u metanolu i

500 μ l metanolnog rastvora DPPH (150 μ M), ostavljena da stoji u mraku na sobnoj temperaturi 20 min. Nakon toga je spektrofotometrijski merena apsorbanacija DPPH na 517 nm (Agilent 8453 UV-VISIBLE). Kao kontrola korišćen je metanol, a kao pozitivna kontrola Troloks (analog α -tokoferola rastvoren u vodi) i askorbinska kiselina. Svako merenje je urađeno u tri ponavljanja. Antiradikalna aktivnost je prikazana kao % inhibicije DPPH radikala prema formuli:

$$\% \text{inhibicije} = 100(A_{\text{blank}} - A_{\text{test}})/A_{\text{blank}}$$

gde je: A_{blank} – apsorbanacija DPPH bez testiranog uzorka, A_{test} – apsorbanacija DPPH sa testiranim uzorkom.

Dobijeni rezultati su izraženi kao vrednosti IC_{50} (μ g/ml), a koje su dobijene linearnom regresijom i predstavljaju koncentraciju uzorka koja je potrebna da inhibira DPPH aktivnost za 50%. Podaci su prikazani kao srednja vrednost \pm standardne devijacije (SD).

Određivanje antimikrobne aktivnosti etarskog ulja

Mikroorganizmi i uslovi skladištenja

U radu su korišćeni mikroorganizmi (bakterije i gljive) iz mikološke laboratorije Odeljenja za biljnu fiziologiju, Instituta za biološka istraživanja „Siniša Stanković“ u Beogradu. U ispitivanju je korišćeno 8 bakterijskih sojeva i 7 mikromiceta (gljiva). Testirani su sledeći bakterijski sojevi: Gram (+): *Bacillus cereus* (klinički izolat) *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538), *Micrococcus flavus* (ATCC 10240), *Listeria monocytogenes* (NCTC 7937) i *Enterococcus faecalis* (humani izolat) i Gram (-): *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC27853), *Salmonella typhimurium* (ATCC 13311), *Escherichia coli* (ATCC 35218). Od gljiva ispitivani su: *Aspergillus ochraceus* (ATCC 12066), *Aspergillus versicolor* (ATCC 11730), *Aspergillus niger* (ATCC 6275), *Aspergillus fumigatus* (biljni izolat), *Trichoderma viride* (IAM 5061), *Penicillium ochrochloron* (ATCC 9112) i *Penicillium funiculosum* (ATCC 36839).

Za uzgoj bakterijskih kultura korišćena je Müller–Hinton čvrsta podloga. Za uzgoj gljiva korišćena je čvrsta Malt-agar podloga (MA). Kulture su skladištene na 4 °C i presejavane jednom mesečno.

Mikrodiluciona metoda

Za ispitivanje antimikrobne aktivnosti etarskih ulja korišćena je metoda mikrodilucije na mikrotitracionim pločama, 96-sistem [23,24]. U određivanju antimikrobnog dejstva korišćen je automatski čitač mikrotiter ploča (Sunrice RC), opseg sa standardnim optičkim spektrom.

Određivane su minimalne inhibitorne (MIC) i minimalne fungicidne (MFC) koncentracije serijskim razređivanjem etarskih ulja.

Za ispitivanje antibakterijske aktivnosti pripremane su kulture bakterijskih sojeva u TSB tečnoj podlozi. U zavisnosti od željene koncentracije etarskog ulja prav-

ljena su razblaženja različitom količinom tečnog medijuma uz dodavanje prekoćne kulture bakterija (10^6 ćelija/ml). Mikrotitracione ploče inkubirane su na 37 °C, u trajanju od 24 h. Najniža koncentracija pri kojoj nije bilo vodljivog rasta uzeta je za minimalnu inhibitornu koncentraciju (MIC). Minimalna baktericidna koncentracija (MBC) određivana je reinokulisanjem 2 μ l u 100 μ l tečnog medijuma i inkubiranjem sledeća 24 h na 37 °C. Ukoliko nije bilo rasta data koncentracija je uzimana za MBC. Streptomycin i ampicilin su komercijalni antibiotici korišćeni kao pozitivne kontrole i sadrže 1mg aktivne supstance u 1 mL 5% DMSO (Sigma P7794).

Gljive su gajene na MA podlozi, 21 dan na sobnoj temperaturi, 24 °C. Inokulumi su su pripremani tako što su spirane spore sterilnim 0,85% rastvorom NaCl, koji sadrži 0,1% Tween 80 (v/v). Korišćeni su inokulumi sa 10^6 CFU/ml medijuma. Nakon inokulacije od 7 dana na 25 °C, utvrđene su MIC vrednosti.

Minimalne fungicidne koncentracije (MFC) su određivane reinokulisanjem u čist medijum i inkubiranjem na istoj temperaturi, 24 h. Koncentracije na kojoj nije bilo rasta micelije, uzimane su kao MFC vrednosti. Kao kontrola korišćeni su antimikotici: bifonazol koji sadrži 1g u 100 mL 70% etanola uz dodatak solubizatora i gli-

cerola (Srbolek, Beograd, Srbija 10 mg/ml) i ketonazol koji sadrži 1 mg/ml u 5% DMSO (Hemofarm koncern A.D., Vršac, Srbija 1 mg/ml).

Pored reinokulacije rezultati su čitani na mikrotitracionom čitaču na 450 i 650 mm talasne dužine.

REZULTATI I DISKUSIJA

Hemijski sastav etarskog ulja *Ocimum sanctum* L.

Dobijeno etarsko ulje vrste *Ocimum sanctum* L. (genotip Holy red) jeste intenzivno žute boje i jakog aromatičnog mirisa. Količina etarskog ulja na 100g suve herbe (v/w) iznosi 0,68% ($\pm 0,15$). U istraživanjima istog genotipa u SAD (Indijana) sadržaj etarskog ulja je iznosio 0,93% [14]. U Misisipiju (SAD) genotip Holy red je ostvario prosečne vrednosti etarskog ulja od 0,32 do 0,55% [25,26].

Hemijski sastav etarskog ulja određen gasnomasom hromatografijom prikazan je u tabeli 1. Ukupno je identifikovana 41 komponenta. Detektovane komponente se mogu grupisati u tri grupe: monoterpene, seskviterpene i fenilpropanoide. Zastupljenost grupa hemijskih jedinjenja prikazana je u tabeli 1 i na slici 1.

Tabela 1. Hemijski sastav etarskog ulja *Ocimum sanctum* L.
Table 1. Chemical composition of essential oil of *Ocimum sanctum* L.

Komponenta	KIE ^a	KIL ^b	RRT ^c	CI ^d	mas.%
α -Pinen	934.2	932	0,656	10	0,67
Kamfen	–	946	0,688	10	0,64
Sabinen	974.7	969	0,739	2	0,13
β -Pinen	977.0	974	0,748	8	0,49
Mircen	994.7	988	0,770	0	0,03
p -Cimen	1026.0	1020	0,846	1	0,04
Limonen	1030.3	1024	0,855	4	0,25
1,8-Cineol	1032.4	1026	0,863	6	0,37
γ -Terpinen	1060.5	1054	0,919	1	0,03
Fenhon	1090.5	1083	0,982	1	0,07
Linalol	1105.5	1095	1,000	50	3,21
Kamfor	1146.7	1141	1,108	1	0,07
δ -Terpineol	1171.9	1162	1,150	30	1,91
Terpinen-4-ol	1181.3	1174	1,172	2	0,13
α -Terpineol	1195.5	1186	1,198	1	0,06
Metil kavikol	1203.5	1195	1,213	1	0,08
Eugenol	1363.5	1356	1,519	114	7,25
<i>trans</i> -Metil cinamat	1387.4	1376	1,577	4	0,28
β -Elemen	1395.0	1389	1,590	74	4,71
Methyl eugenol	1410.7	1403	1,598	66	4,21
Seskvitujen	1418.3	1405	1,625	2	0,12
β -Kariofilen	1420.0	1417	1,653	1000	63,80
α - <i>trans</i> -Bergamoten	1439.3	1432	1,664	8	0,49
α -Guajen	1441.8	1437	1,678	9	0,55
α -Humulen	1456.4	1452	1,690	8	0,49

Tabela 1. Nastavak
Table 1. Continued

Komponenta	KIE ^a	KIL ^b	RRT ^c	CI ^d	mas.%
<i>trans</i> - β -Farnezen	1461.0	1454	1,710	64	4,09
10- <i>epi</i> - β -Akoradien	1469.6	1474	1,742	4	0,24
Germakren D	1484.3	1484	1,756	4	0,24
<i>trans</i> -Muurool-4(14),5-dien	1488.0	1493	1,767	4	0,28
Biciklogermakren	1499.6	1500	1,781	4	0,27
α -Bulnezen (δ -Guajen)	1509.0	1509	1,800	2	0,13
γ -Kadinen	1517.4	1513	1,809	1	0,04
<i>trans</i> -Kalamenen	1524.6	1521	1,821	4	0,28
β -Seskvifelandren	1526.0	1521	1,830	2	0,12
<i>trans</i> - α -Bisabolen	1545.8	1530	1,838	2	0,13
<i>trans</i> -Nerolidol	1566.7	1561	1,865	2	0,15
Maliol	1569.7	1566	1,881	1	0,08
Kariofilen oksid	1584.6	1582	1,935	53	3,39
1,10-di-Epi-kubenol	1617.9	1618	1,978	4	0,24
Aromadendran-14-ol	1673.8	1679	2,127	1	0,07
α -Bisabolol	1690.2	1685	2,151	3	0,17
Ukupno					100,00
Monoterpenski ugljovodonic					2,28
Oksidovani monoterpeni					5,82
Seskviterpenski ugljovodonic					80,47
Oksidovani seskviterpeni					4,10
Fenilpropanoidi (Aromatične komponente)					7,33

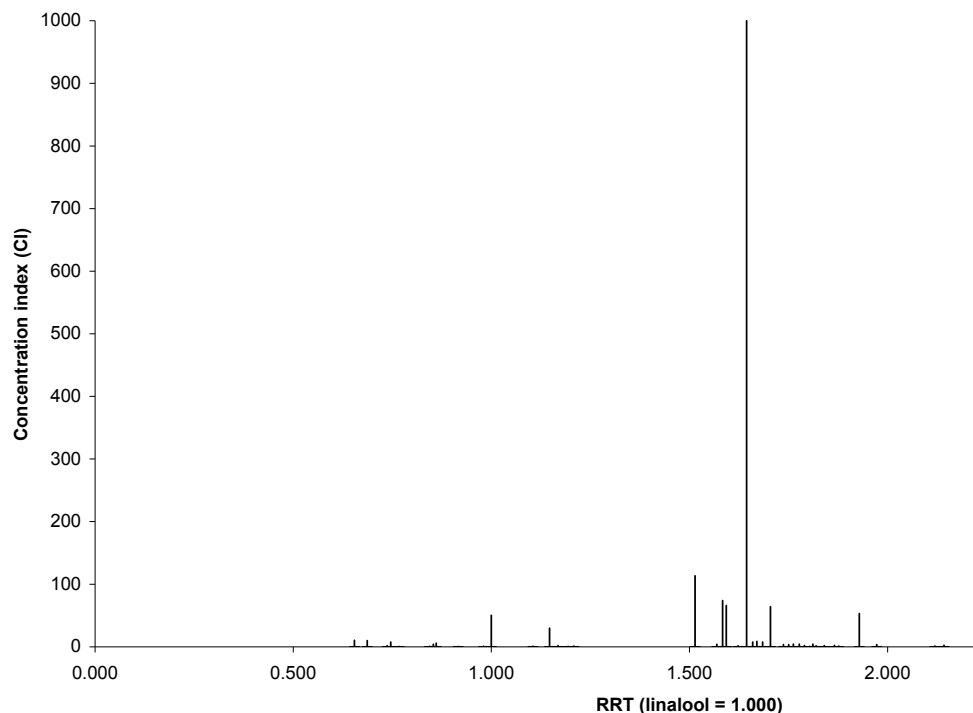
^aEksperimentalno određen Kovačev indeks; ^bKovačev indeks dat literaturnim podacima; ^crelativno retenciono vreme (FID) odgovarajuće komponente u odnosu na odabranu referentnu (zajedničku) komponentu; ^dkoncentracioni indeks

Slika 1. Grupe hemijskih jedinjenja u etarskom ulju *Ocimum sanctum* L.Figure 1. Group of chemical compounds in the essential oil of *Ocimum sanctum* L.

Najzastupljenija hemijska grupa su seskviterpenski ugljovodonic sa 80,47%. Ostale grupe su manje zastupljene: oksidovani monoterpeni 5,82%, oksidovani seskviterpeni 4,1%, monoterpenski ugljovodonic 2,28% i fenilpropanoidi 7,33%.

Seskviterpenski ugljovodonic β -kariofilen je sa 63,80% najzastupljenija komponenta u ispitivanom etarskom

ulju. Ostale komponente u etarskom ulju zastupljene su u znatno manjoj količini: eugenol 7,25%, β -elemen 4,71%, metil eugenol 4,21%, *trans*- β -farnezen 4,09%, kariofilen oksid 3,39%. Interesantno je da je dobijen veoma nizak sadržaj linalola (0,07%) i metil kavikola (0,08%), komponenti koje su najzastupljenije u evropskom hemotipu bosiljka [18,27]. Na slici 2 prikazan je



Slika 2. Normalizovani hromatogram etarskog ulja *Ocimum sanctum* L.
Figure 2. Normalised chromatogram essential oil of *Ocimum sanctum* L.

normalizovani hromatogram dominantnih komponenti u etarskom ulju izražen u vrednostima koncentracionog indeksa (CI) i relativnog retencionog vremena (RRT).

Rezultati ispitivanja hemijskog sastava etarskog ulja *Ocimum sanctum* L. pokazuju da ono pripada kariofilenskom hemotipu, te da je to novi identifikovani hemotip bosiljka na našem području.

Kariofilenski hemotip je detektovan i u SAD gde je sadržaj β -kariofilena iznosio 75% i kariofilensko-metil-eugenolni hemotip sa sadržajem β -kariofilena od 41% i metil eugenola od 33% [14]. U etarskom ulju vrste *O. sanctum* gajene u Brazilu dobijene su dve glavne komponente: 59,4% β -kariofilena i 29,4% α -humulena [16].

Antioksidativna aktivnost etarskog ulja *Ocimum sanctum* L.

U ovom radu je korišćena metoda u kojoj DPPH (1,1-difenil-2-pikrilhidrazil) kao stabilna slobodno-radikalna forma, direktno reaguje sa ispitivanim biljnim ekstraktima ili jedinjenjima. Metoda je vrlo pogodna i korisna za određivanje antioksidativnosti, jer se za kratko vreme može analizirati veliki broj uzoraka, a dovoljna je osetljiva i detektuje antioksidante u malim koncentracijama [28].

Rezultati antioksidativne aktivnosti etarskog ulja prikazani su u tabeli 2. Količina etarskog ulja koja je potrebna da se ostvari 50% inhibicije DPPH radikala iznosi 0,35 μ g/ml. Poređenjem antioksidativnog kapaciteta etarskog ulja sa askorbinskom kiselinom i troloksom,

ispitivano etarsko ulje poseduje visoku sposobnost neutralizacije DPPH radikala.

Tabela 2. DPPH antiradikalna aktivnost (RSC) etarskog ulja *Ocimum sanctum* L.
Table 2. DPPH radical-scavenging activity of essential oils of *Ocimum sanctum* L.

Antioksidans	DPPH IC_{50} , μ g/mL
Etarsko ulje	0,35 \pm 0,02
Askorbinska kiselina (ASA)	2,80 \pm 0,21
Troloks	3,49 \pm 0,11

Dobijene vrednosti su u saglasnosti sa rezultatima istraživanja bosiljka *Ocimum sanctum* L. gajenog u Brazilu čija vrednost iznosi 0,26 μ g/ml [16].

Komponente etarskog ulja bosiljka kod kojih je najčešće proučavana antioksidativna aktivnost su: linalol, metil kavikol, 1,8-cineol i eugenol. Fenolpropanoidi eugenol i metil eugenol ispoljavaju značajnu antioksidativnu aktivnost u odnosu na linalol i druge komponente u etarskom ulju bosiljka [29,30]. U ispitivanom etarskom ulju *Holy red* bosiljka dominantne komponente su: β -kariofilen (63,80%) i eugenol (7,25%). Literaturnih podataka o antioksidativnoj aktivnosti β -kariofilena kao pojedinačne komponente u etarskom ulju bosiljka nema.

U mnogim slučajevima, antioksidativna aktivnost etarskih ulja se ne može pripisati dominantnoj komponenti u etarskom ulju, već i drugim koje su prisutne u manjem procentu. Takođe, značajan je i sinergistički efekat komponenti etarskog ulja [31].

Antimikrobna aktivnost etarskog ulja *Ocimum sanctum* L.

Veliki broj studija *in vitro* pokazuje visoku efikasnost etarskih ulja protiv bakterija i gljiva zagađivača hrane [3,6,32].

Rezultati određivanja antibakterijske i antifungalne aktivnosti etarskog ulja dati su u tabelama 3 i 4. Gljive su pokazale veću osetljivost na etarsko ulje u odnosu na bakterije.

Rezultati istraživanja pokazuju izraženu antibakterijsku aktivnost ulja na sve testirane bakterijske sojeve, Gram (+) i Gram (–), a u odnosu na komercijalne antibiotike (tabela 3). Etarsko ulje je delovalo na sve testirane sojeve inhibitorno u intervalu 0,34–41,50 $\mu\text{l/ml}$ i baktericidno u opsegu 22,50–124,5 $\mu\text{l/ml}$. Referentni antibiotik streptomycin je delovao inhibitorno u intervalu 1,25–10,00 $\mu\text{l/ml}$ i baktericidno u opsegu 2,5–25,00 $\mu\text{l/ml}$, a ampicilin inhibitorno 100,00 $\mu\text{l/ml}$ i baktericidno 150,00 $\mu\text{l/ml}$. Zabeležena je veća antibakterijska aktivnost na Gram-negativne bakterije, najosetljiviji bakterijski sojevi su *Salmonella typhimurium* (MBC = 22,50 $\mu\text{l/ml}$) i *Escherichia coli* (MBC = 25,00 $\mu\text{l/ml}$). *Listeria monocytogenes* i *Enterococcus faecalis* pokazale su najveću rezistentnost na ispitivano ulje (MBC = 124,50 $\mu\text{l/ml}$).

Dobijeni rezultati su u saglasnosti sa istraživanjima na ovoj vrsti koja su sprovedena u Nepalju [33]. Takođe, potvrđena je i antibakterijska aktivnost ekstrakta *Oci-*

mum sanctum L. na gram-pozitivne i gram-negativne bakterije [34].

U tabeli 4 prikazani su rezultati antifungalne aktivnosti etarskog ulja. Rezultati pokazuju izraženu antifungalnu aktivnost ulja na sve testirane gljive u odnosu na komercijalne antimikotike. Etarsko ulje je delovalo na sve testirane gljive inhibitorno u intervalu 4,42–8,83 $\mu\text{l/ml}$ i mikrobicidno u opsegu 10,00–50,00 $\mu\text{l/ml}$. Referentni antimikotik ketonazol je delovao inhibitorno u intervalu 10,00–50,00 $\mu\text{l/ml}$ i fungicidno u opsegu 25,00–150,00 $\mu\text{l/ml}$, a bifonazol inhibitorno 100,00–200,00 $\mu\text{l/ml}$ i fungicidno 100,00–250,00 $\mu\text{l/ml}$. Najosetljivije gljive su *Aspergillus ochraceus*, *Penicillium ochrochloron* i *Penicillium funiculosum* (MBC = 10,00 $\mu\text{l/ml}$), dok je najrezistentnija gljiva *Aspergillus niger* (MBC = 50,00 $\mu\text{l/ml}$).

Iz rezultata hemijske analize etarskog ulja može se videti da je seskviterpenski ugljovodonik β -kariofilen dominantna komponenta. Dosadašnja istraživanja na različitim vrstama bosiljka (*Ocimum spp.*) pokazala su da je glavni nosilac antibakterijske aktivnosti u etarskom ulju linalol [6,35]. Antimikrobna aktivnost β -kariofilena nije istražena, dok je aktivnost fenilpropanoide (eugenola i metil eugenola) poznata. Ovo nam sugerise da glavne komponente etarskih ulja prilično dobro reflektuju biofizičke i biološke karakteristike ulja i da intenzitet antimikrobnog delovanja ulja zavisi od koncentracija glavnih komponenata [36,37].

Tabela 3. Antibakterijska aktivnost (MIC i MBC, $\mu\text{g/ml}$) etarskog ulja *Ocimum sanctum* L.

Table 3. Antibacterial activity (MIC and MBC, $\mu\text{g/ml}$) of essential oil of *Ocimum sanctum* L.

Bakterijski soj	Etarsko ulje		Streptomycin		Ampicilin	
	MIC	MBC	MIC	MBC	MIC	MBC
<i>Bacillus cereus</i>	41,50	83,00	1,25	2,50	100,00	150,00
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC6538	8,83	41,50	10,00	25,00	100,00	150,00
<i>Micrococcus flavus</i> ATCC10240	2,20	41,50	1,25	2,50	100,00	150,00
<i>Listeria monocytogenes</i> NCTC 7937	2,20	124,50	10,00	25,00	100,00	150,00
<i>Enterococcus faecalis</i>	8,83	124,50	2,50	5,00	100,00	150,00
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC27853	22,50	41,50	1,25	2,50	100,00	150,00
<i>Salmonella typhimurium</i> ATCC13311	13,25	22,50	1,25	2,50	100,00	150,00
<i>Escherichia coli</i> ATCC35218	0,34	25,00	5,00	10,00	100,00	150,00

Tabela 4. Antifungalna aktivnost (MIC i MFC $\mu\text{g/ml}$) etarskog ulja *Ocimum sanctum* L.

Table 4. Antifungal activity (MIC i MFC $\mu\text{g/ml}$) of essential oil of *Ocimum sanctum* L.

Gljiva	Etarsko ulje		Ketokonazol		Bifonazol	
	MIC	MFC	MIC	MFC	MIC	MFC
<i>Aspergillus ochraceus</i> ATCC12066	4,42	10,00	10,00	25,00	100,00	200,00
<i>Aspergillus versicolor</i> ATCC11730	4,42	25,00	25,00	50,00	100,00	200,00
<i>Aspergillus niger</i> ATCC6275	8,83	50,00	50,00	150,00	150,00	100,00
<i>Aspergillus fumigatus</i>	4,42	25,00	25,00	50,00	150,00	100,00
<i>Trichoderma viride</i> IAM5061	4,42	25,00	25,00	100,00	200,00	250,00
<i>Penicillium ochrochloron</i> ATCC9112	4,42	10,00	10,00	25,00	150,00	100,00
<i>Penicillium funiculosum</i> ATCC36839	4,42	10,00	10,00	25,00	200,00	250,00

ZAKLJUČAK

U ispitivanom etarskom ulju identifikovana je 41 komponenta. Najzastupljenija hemijska grupa su seskviterpinski ugljovodonici sa 80,47%. Seskviterpinski ugljovodonik β -kariofilen je sa 63,80% dominantna komponenta u etarskom ulju Holy red bosiljka. Ostale komponente zastupljene su u znatno manjoj količini. Detektovan je novi hemotip etarskog ulja do sada neopisan kod nas. To je β -kariofilenski hemotip etarskog ulja bosiljka.

Etarska ulja su vrlo aktuelna alternativa sintetičkim antioksidantima. Ona se sve više koriste u industrijske svrhe kao prirodni konzervansi i konzervacijski agensi u hrani, kozmetičkoj industriji i kao aktivni sastojci medicinskih preparata. Ispitivano etarsko ulje bosiljka *Ocimum sanctum* L. je ispoljilo značajno antioksidativno i antimikrobno dejstvo te se može koristiti kao sirovina u prehrambenoj, farmaceutskoj i hemijskoj industriji.

Zahvalnica

Rezultati ovih istraživanja su deo projekta III 46001, OI 173015 i OI 173032 Ministarstva prosvete, nauke i tehnološkog razvoja Republike Srbije.

LITERATURA

- [1] S. Burt, Essential oils: their antibacterial properties and potential application in foods – a review, *Int. J. Food Microbiol.* **94** (2004) 223–253.
- [2] J. Gutierrez, C. Barry-Ryan, P. Bourke, The antimicrobial efficacy of plants oils combinations and interactions with food ingredients, *Int. J. Food Microbiol.* **124** (2008) 91–97.
- [3] M. Soković, J. Glamočlija, P. D. Marin, D. Brkić, L.J. L. D. V Griensven, Antibacterial effects of the essential oils of commonly consumed medicinal herbs using an *in vitro* model, *Molecules* **15** (2010) 7532–7546.
- [4] A.I. Hussain, F. Anwar, T. Iqbal, I.A. Bhatti, Antioxidant attributes of for *Lamiaceae* essential oils, *Pak. J. Bot.* **43** (2011) 1315–1321.
- [5] B. Božin, N. Mimica-Dukić, N. Simin, G. Anackov, Characterization of the volatile composition of essential oils of some *Lamiaceae* spices and the antimicrobial and antioxidant activities of the entire oils, *J. Agric. Food Chem.* **54** (2006) 1882–1828.
- [6] D. Runyoro, O. Ngassapa, K. Vagionas, N. Aligiannis, K. Graikou, I. Chinou, Chemical composition and antimicrobial activity essential oils of four *Ocimum* species growing in Tanzania, *Food Chem.* **119** (2010) 311–316.
- [7] M.J. Mukazayire, J.C. Tomani, C. Stévigny, J. C. Chalchat, F. Conforti, F. Menichini, P. Duez, Essential oils of four Rwandese hepatoprotective herbs: Gas chromatography–mass spectrometry analysis and antioxidant activities, *Food Chem.* **129** (2011) 753–760.
- [8] S.K. Gupta, J. Prakash, S. Srivastava, Validation of traditional claim of Tulsi *Ocimum sanctum* Linn. as a medicinal plant, *In. J. Exp. Biol.* **40** (2002) 765–773.
- [9] W. Wangcharoen, W. Morasuka, Antioxidant capacity and phenolic content of holy basil, *Songklanakar J. Sci. Technol.* **29** (2007) 1407–1415.
- [10] D.N. Vadakkemuriyil, A.J. Cheruth, R. Gopi, M. Gomathinayagam, R. Panneerselvam, Antioxidant potential of *Ocimum sanctum* under growth regulator treatments, *EurAsia J. BioSci.* **3** (2009) 1–9.
- [11] M.P. Venu Prasad, F. Khanum, Antifatigue activity of ethanolic extract of *Ocimum sanctum* in rats, *Res. J. Med. Plant* **6** (2012) 37–46.
- [12] R. Hemalatha, K.N. Babu, M. Karthik, R. Ramesh, B.D. Kumar, P.U. Kumar, Immunomodulatory activity and Th1/Th2 cytokine response of *Ocimum sanctum* in myelosuppressed Swiss Albino Mice, *Trends Med. Res.* **6** (2011) 23–31.
- [13] L. Mondello, G. Zappia, A. Cotroneo, I. Bonaccorsi, J.U. Chowdhury, M. Yusufi, G. Dugo, Studies on the essential oil-bearing plants of Bangladesh. Part VIII. Composition of some *Ocimum* oils *O. basilicum* L. var. *purpurascens*; *O. sanctum* L. *green*; *O. sanctum* L. *purple*; *O. americanum* L. *citral* type; *O. americanum* L. *camphor* type, *Flavour Fragr. J.* **17** (2007) 335–340.
- [14] J.A. Pino, A. Rosado, M. Rodriguez, D. Garcia,, Composition of the essential oil of *Ocimum tenuiflorum* L. grown in Cuba, *J. Essent. Oil Res.* **10** (1998) 437–438.
- [15] J.E. Simon, M.R. Morales, W.B. Phippen, R.F. Vieira, Z. Hao, Basil: A Source of Aroma Compounds and a Popular Culinary and Ornamental Herb. Perspectives on new crops and new uses, J. Janick, Ed., ASHS Press, Alexandria, VA, 1999, pp. 499–550.
- [16] M.T.S. Trevisan, M.G.V. Silva, B. Pfundstein, B. Spiegelhalder, R.W. Owen, Characterization of the volatile pattern and antioxidant capacity of essential oils from different species of the genus *Ocimum*, *J. Agr. Food Chem.* **54** (2006) 4378–4382.
- [17] S.K. Kothari, A.K. Bhattacharya, S. Ramesh, Essential oil yield and quality of methyl eugenol rich *Ocimum tenuiflorum* L.f. (syn. *O.sanctum* L.) grown in south India as influenced by method of harvest, *J. Chromatogr., A* **1054** (2004) 67–72.
- [18] S. Jelačić, D. Beatović, S. Prodanović, S. Tasić, Đ. Moravčević, A. Vujošević, S. Vučković, Chemical composition of the essential oil of basil (*Ocimum basilicum* L. *Lamiaceae*), *Hem. ind.* **65** (2011) 465–471 (in Serbian).
- [19] M. Soković, L.J.L.D. Van Griensven, Antimicrobial activity of essential oils and their components against the three major pathogens of the cultivated button mushroom, *Agaricus bisporus*, *Eur. J. Plant Pathol.* **116** (2006) 211–224.
- [20] Jugoslovenska farmakopeja Ph.Yug. IV, Savezni zavod za zdravstvenu zaštitu, Beograd, 1984, pp. 126–127.
- [21] R.P. Adams, Identification of Essential Oil Components by Gas Chromatography / Mass Spectrometry, 4th Ed., Allured Publishing Co. Carol Stream, IL, 2007, pp. 69–351.
- [22] M. Cuendet, K. Hostettmann, O. Potterat, Iridoid glucosides with free radical scavenging properties from *Fagaria blumei*, *Helv. Chim. Acta* **80** (1997) 1144–1152.

- [23] H. Hanel, W. Raether, A more sophisticated method of determining the fungicidal effect of water-insoluble preparations with a cell harvester, using miconazole as an example, *Mycoses* **31** (1988) 148–154.
- [24] K.D. Daouk, M.S. Dagher, J.E. Sattout, Antifungal activity of the essential oil of *Origanum syriacum* L., *J. Food Protect.* **58** (1995) 1147–1149.
- [25] V.D. Zheljzkov, C.L. Charles, W.B. Evans, W.M. Ebelhar, C. Coker, Yield and composition of *Ocimum basilicum* L. and *Ocimum sanctum* L. grown at four locations, *Hort-Science* **43** (2008) 737–741.
- [26] K.M. Bowes, V.D. Zheljzkov, Factors affecting yields and essential oil quality of *Ocimum sanctum* L. and *Ocimum basilicum* L. cultivars, *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* **12** (2004) 789–784.
- [27] M. Goncariuc, Z. Balmus, E. Gille, A. Spac, I. Ganea, P. Botnarenco, Differences in essential oil content and chemical composition of new *Ocimum basilicum* genotypes in relation to some quantitative characters, *J. Med. Plants Res.* **6** (2012) 1447–1454.
- [28] P. Molyneux, The use of the stable free radical diphenylpicrylhydrazyl (DPPH) for estimating antioxidant activity, *Songklanakar J. Sci. Technol.* **26** (2004) 211–219.
- [29] O. Politeo, M. Jukić, M. Miloš, Chemical composition and antioxidant capacity of free volatile aglycones from basil (*Ocimum basilicum* L.) compared with its essential oil. *Food Chem.* **101** (2007) 379–385.
- [30] J.S. Dambolena, M.P. Zunino, A.G. López, H.R. Rubinstein, J.A. Zygadlo, J.W. Mwangi, G.N. Thoithi, I.O. Kibwage, J.M. Mwalukumbi, S.T. Kariuki, Essential oils composition of *Ocimum basilicum* L. and *Ocimum gratissimum* L. from Kenya and their inhibitory effects on growth and fumonisin production by *Fusarium verticillioides*, *Innov. Food Sci. Emerg.* **11** (2010) 410–414.
- [31] T.A. Misharina, E.S. Alinkina, L.D. Fatkulina, A.K. Vorobyova, I. B. Medvedeva, E. B. Burlakova, Influence of the composition of essential oils on their antioxidant and antiradical properties, *Appl. Biochem. Micro.* **48** (2012) 102–107.
- [32] J. Gutierrez, C. Barry-Ryan, P. Bourke, The antimicrobial efficacy of plants oils combinations and interactions with food ingredients, *Int. J. Food Microbiol.* **124** (2008) 91–97.
- [33] B. Joshi, S. Lekhak, A. Sharma, Antibacterial property of different plants: *Ocimum sanctum*, *Cinnamomum zeylanicum*, *Xanthoxylum armatum* and *Origanum majorana*, *Katmandu Univer. J. Sci. Eng. Technol.* **5** (2009) 143–150.
- [34] P. Mishra, S. Mishra, Study of antibacterial activity of *Ocimum sanctum* extract against gram positive and Gram-negative bacteria. *Am. J. Food Technol.* **6** (2011) 336–341.
- [35] A.I. Hussain, F. Anwar, S.S.T. Hussain R. Przybylski, Chemical composition, antioxidant and antimicrobial activities of basil (*Ocimum basilicum*) essential oils depends on seasonal variations. *Food Chem.* **108** (2008) 986–995.
- [36] N. Stanković, Lj. Čomić, B. Kocić, D. Nikolić, T. Mihajilov-Krstev, B. Ilić, D. Miladinović, Antibacterial activity chemical composition relationship of the essential oils from cultivated plants from Serbia, *Hem. ind.* **65** (2011) 583–589 (in Serbian).
- [37] D. Godevac, Lj. Vujišić, I. Vučković, V. Vajs, M. Soković, P. Marin, V. Tešević, Composition and antimicrobial activity of the essential oil from *Galatella linosyris* (L.) Rchb. f. (*Asteraceae*), *J. Serb. Chem. Soc.* **77** (2012) 619–626.

SUMMARY**CHEMICAL COMPOSITION, ANTIOXIDATIVE AND ANTIMICROBIAL ACTIVITY OF ESSENTIAL OIL OF *Ocimum sanctum* L.**

Damir V. Beatović¹, Slavica Č. Jelačić¹, Čedo D. Oparnica¹, Dijana B. Krstić-Milošević², Jasmina M. Glamočlija², Mihailo S. Ristić³, Jovana D. Šiljegović²

¹University of Belgrade, Faculty of Agriculture, Belgrade, Serbia

²University of Belgrade, Institute for Biological Research "Siniša Stanković", Belgrade, Serbia

³Institute for Medicinal Plant Research "Dr Josif Pančić", Belgrade, Serbia

(Scientific paper)

Ocimum sanctum L. (Lamiaceae) sin. *Ocimum tenuiflorum* L. or Tulsi basil is a plant originating from the tropical and subtropical areas of India. It is used in both the traditional and official medicine in India. Tulsi is a type of basil that is insufficiently explored and studied in Europe. The goal of this paper is to determine the chemical composition, antioxidative, and antimicrobial activity of the essential oil *Ocimum sanctum* L. grown in Serbia. The quantity of essential oil in 100 g of herb (v/w) is 0.68%, with 41 components identified in the tested essential oil. The most represented chemical group were sesquiterpene hydrocarbonates with 80.47%. Other groups were much less represented. Sesquiterpene hydrocarbonate β -carioophyllene is a predominant component in the essential oil with 63.80%. The quantity of tested essential oil needed to achieve 50% of inhibition of DPPH radicals is 0.35 μ g/ml, and it has high potential to neutralize free radicals. The essential oil exhibited antibacterial activity to all tested strains of bacteria, both Gram-positive and Gram-negative. It affected all strains in an inhibitory way in the interval 0.34–41.50 μ l/ml, and in a bactericide way within the range 22.50–124.5 μ l/ml. The most sensitive strains of bacteria were *Salmonella typhimurium* and *Escherichia coli*, while *Listeria monocytogenes* and *Enterococcus faecalis* showed greatest resistance. The essential oil exhibited antifungal activity on all tested fungi. It affected all tested fungi in an inhibitory way in the interval 4.42–8.83 μ l/ml, and in a microbicide way within the range 10.00–50.00 μ l/ml. The most sensitive fungi are: *Aspergillus ochraceus*, *Penicillium ochrochloron* and *Penicillium funiculosum*, while the most resistant one is *Aspergillus niger*. The tested basil essential oil *Ocimum sanctum* demonstrated significant antioxidative and antimicrobial effect and may be used as a raw material in food, pharmaceutical and chemical industries.

Keywords: *Ocimum sanctum* • Essential oil • Chemical composition • Antioxidative activity • Antimicrobial activity