

Zahter (*Thymbra spicata* L. var. *spicata*) Bitki Özütlerinin DNA Koruyucu Aktivitelerinin ve *Stenotrophomonas maltophilia* Üzerine Antimikrobiyal Etkisinin Araştırılması

Mahdı Hussam JOMA¹, Mesut ÇAY¹, İbrahim Halil KILIÇ¹, Mehmet ÖZASLAN¹

¹Gaziantep Üniversitesi Biyoloji Bölümü, Gaziantep

kilic@gantep.edu.tr

Özet

Dünya’da alternatif tedavilerde, bitkisel ekstratler birçok hastalıkta tedavi amaçlı kullanılmaktadır. Ülkemizin farklı iklim ve ekolojik koşullara sahip olması, bulunan floranın sayısal açıdan yüksek oranda bitki türü ve çeşitliliği barındırmasından dolayı ülkemizde medikal amaçlı tüketimi yapılan çok sayıda bitki türü vardır. Bu bitkilerin çoğunun antimikrobiyal etkilerinin varlığı hem yurtdışında hem de ülkemizde yapılan araştırmalar sonucunda bildirilmiştir. Doğada kendiliğinden yetişen bazı bitki ekstratlerinin ve uçucu yağlarının bakterilere olduğu kadar, mantarlara karşı da antifungal aktivite gösterdiği yapılan çalışmalarda tespit edilmiştir. Bu çalışmada çıkarılan özütlerin *Stenotrophomonas maltophilia* bakterisine karşı antimikrobiyal etkileri ve DNA koruyucu potansiyeli çalışılmıştır. Antimikrobiyal aktivite disk difüzyon yöntemi ile çalışılmıştır. DNA koruyucu aktivite pBR322 plazmid DNA’sı ile H₂O₂ ve UV-C kullanılarak çalışılmıştır. Su ve Methanol özütlerinin *Stenotrophomonas maltophilia* üzerine etkili olduğu saptanmıştır. Diğer yandan DNA koruyucu aktivite bakımından oldukça yüksek koruyucu aktivite gösterdiği çalışma kapsamında belirlenmiştir.

Anahtar Kelimeler: Antimikrobiyal, DNA koruyucu, UV, *Thymbra spicata* L. var. *spicata*

Abstract

In alternative treatments in the world, botanical extracts are used for treatment in many diseases. The fact that our country has different climatic and ecological conditions, Flora contains many plant species and diversity and therefore there are many plant species consumed for medical purposes in our country. Most of these plants have antimicrobial effects and have been reported both in Turkey and abroad. Studies have shown that some plant extracts and essential oils that naturally grow in the soil show antifungal activity against fungi as well as bacterial activity. Antimicrobial effects of these extracts against *Stenotrophomonas maltophilia* bacteria and DNA protective activity were studied. The antimicrobial activity was tested Disk Diffusion method. DNA protecting activity was studied using H₂O₂ and UV-C using pBR322 plasmid DNA. Water and Methanol extracts did show antimicrobial activity on bacteria. On the other hand They showed a high activity in terms of DNA protective activity.

KeyWords: Antimicrobial, DNA protective. UV, *Thymbra spicata* L. var. *spicata*

1. Giriş

Eski tarihlerden beri insanoğlu pek çok hastalığın tedavisinde şifalı bitkilerden yararlanmışır. Bitkiler hem beslenme amaçlı olarak kullanılmış hem de bazı bitkiler ilaç haline getirilerek tedavi amacıyla tüketilmiştir. Bu açıdan düşünüldüğü zaman bitkilerin insanlık açısından çok büyük bir öneme sahip olmaktadır. Eski medeniyetlerin hastalıkların tedavi edilmesinde bitkileri kullandıklarına dair bulguları ilk yazılı eserlerden de görmekteyiz. Örneğin; Mezopotamya’ da kurulan uygarlıkların yaşamlarını sürdürdüğü dönemlerde ve kullanıldığı bildirilmiştir [1, 2, 3, 4, 5]. 1950’li yıllarda antibiyotiklerin kullanılmaya ve üretilmeye başlamasıyla beraber bitkisel ürünlerin antibiyotik amaçlı kullanılması ile büyük oranda negatif olarak etkilenmiştir. Fakat bilim insanlarının bu konu üzerine yaptıkları çalışmaların ışığında antibiyotik etki mekanizmasının sınırlı olduğu keşfedilmiştir. Bunun yanı sıra piyasada bulunan antibiyotik kullanımıyla beraber; bitkisel olarak elde edilen ilaç olarak kullanılması 1990’lı yılların sonlarında tekrar popüler olmuş ve tekrar gündeme getirmiştir [6]. Ülkemizin bulunduğu konum, farklı iklim koşullarına sahip olması, bitki tür ve çeşitliliği açısından zenginlik yaratmıştır [7]. Bu nedenden dolayı da çok fazla flora bulundurmakta ve ülkemizde bulunan bu bitkiler tıbbi olarak kullanılabilir [8, 9]. Medikal öneme sahip bitkiler pek çok yöntemlerle elde edilen özütlerinin ve bundan elde edilen uçucu yağların antimikrobiyal etkilerinin varlığı bilinmektedir [10, 11]. Kaynaklarda yer alan antibiyotiklere direnç gösteren bakterilerde antibiyotik direnci günden güne artmakta ve bu artış ciddi ölçüde yayılmaktadır. Bu nedenle bakteriler ile mücadelede farklı bir yol olarak medikal önemi olan bitkileri kullanmak büyük önem taşır hale gelmiştir. Ek olarak bilinen bazı yöresel bitkiler antimikrobiyal ajan olarak da kullanılmaktadır [12]. Güneş ışınlarının ozon tabakasını geçerek yerküreye ulaşan çeşitli dalga boylarına sahip UV ışınları cilt kanseri ile sonuçlanan ciddi tahribatlara sebep olabilmektedir. Bitkisel ilaçların cilt üzerine etkisi ile cildi UV ışınlarına karşı korumada etkili sonuçlar vermiştir [13]. Bitkilerin kolay ulaşılabilir olması, maliyetlerinin ilaçlara göre daha uygun olması ve etki alanlarının daha geniş bir alana sahip olması kullanılması için destekle olmaktadır. Fakat medikal açıdan yan etki gösteren yapay ilaçların tehlikeli özellikleri olması ve bakterilerin de bu yapay ilaçlara kolay direnç geliştirmelerinden dolayı bitkisel ürünleri ve bu maddeleri bulduran medikal öneme sahip bitkilerin önemini daha da artırmaktadır. Buna rağmen bazı bitkilerin yöresel olarak fazla kullanılmasından kaynaklanan sayısal azalma ve yok olma riski bulunmaktadır. Varlıklarını sürdürme mücadelesi veren bu tip geleneksel bitkilerin nesillerinin tükenmeden potansiyellerinin araştırılması ve bunun bilimsel verilere dönüştürülmesi büyük önem taşımaktadır [14, 15, 16]. Yapılan bu çalışma kapsamında, ülkemiz florasında bulunan *Thymbra spicata* L. var. *spicata* tıbbi ve aromatik özellikleri bilinen ve buna ek olarak tüketildiği bilinen bir bitki türüdür. Bu nedenden dolayı biyolojik aktivite potansiyelinin belirlenmesi büyük önem taşımaktadır. Yapılan literatür çalışmasında bu bitki ile yapılan biyolojik aktivite potansiyeli belirleme çalışmalarının az olması ve çoklu dirence sahip *Stenotrophomonas maltophilia* bakterisi üzerine etki mekanizmasının ve DNA hasarına karşı koruyucu özelliğinin araştırılması büyük önem taşımaktadır. Yapılan çalışmalar sonucunda ortaya çıkan veriler daha sonra medikal alanda bu bitkinin kullanılması için bir ön çalışma teşkil edecek ve yerel olarak tüketimi bilinen bu bitkinin daha bilinçli ve doğru kullanımı açısından bir öncül olacaktır.

2. Metot

Çalışmada kullanılacak olan *Thymbra spicata* L. var. *spicata*, kuru şekilde hazır olarak satın alınmıştır. Satın alınan materyal distile su ile yıkanarak güneş almayan bir mekanda kurutulmaya bırakılmıştır. *Thymbra spicata* L. var. *spicata* bitki özütünün eldesi için Soxhlet ekstraksiyon cihazı kullanıldı. Kurutulması sağlanan bitkiler, öğütücü ile toz haline getirildi. Özüt çıkarma işlemi için çözücü ile birlikte basınç uygulandı. Özüt çıkarma işleminde

kullanılan çözücüler su, metanol, hekzan ve diklormetan olarak belirlenerek özütleme işlemi bu solventler ile gerçekleştirildi. Basıncı solvent ekstraksiyon yöntemi kullanılarak gerçekleştirilen işlemde Zahter bitki örneği, Soxthern cihazının bölmeleri kullanılarak 10g zahter ve üzerine 150mL metanol eklenerek 5.1 bar basınçta, 2 saat ekstrakte edilmiştir. Diğer solventler içinde aynı miktarlar kullanılarak özütleme işlemi her solvent için uygun sıcaklık ve süre belirlenerek yapılmıştır. *Thymbra spicata* L. var. *spicata* özütlerinin, antimikrobiyal aktivitelerinin değerlendirilmesi için *Stenotrophomonas maltophilia* bakterisi kullanılmıştır. *Stenotrophomonas maltophilia* suşları Gaziantep Üniversitesi Tıp Fakültesi Mikrobiyoloji Laboratuvarı öğretim üyesi Prof. Dr. Yasemin ZER'den temin edilmiştir. *Thymbra spicata* L. var. *spicata* bitkisinin antimikrobiyal belirlenebilmesi için Disk difüzyon yöntemi kullanılmıştır. Antimikrobiyal aktivite tayini amacıyla disk difüzyon testi European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST) kriterleri göz önüne alınarak uygulanmıştır.

Eldesi yapılan Zahter özütleri metanol içerisinde çözündürülmüştür. 50mg ekstre için 1ml metanol kullanıldı. Karışımların homojenize olması için vorteks cihazı kullanıldı ve sonra 6mm çapındaki steril blank (boş) diskler 20µl emdirilmiştir. Özütlerin emdirildiği disklerden metanolün uzaklaştırılması için bir gün süreyle oda sıcaklığında bekletildi. Daha önce besiyerlerinde üreme kontrolleri yapılan *Stenotrophomonas maltophilia* bakteri suşundan bir miktar alınarak ayrı ayrı SF içerisinde 0.5 Baryum Sülfat Bulanıklık Standardı baz alınarak Mcfarland cihazında belirlemeler yapılmıştır. Süspansiyon hale getirilerek vortekslen bu süspansiyonlar steril eküvyon yardımı ile alınan örnek Mueller-Hinton agar yüzeyine 100 µl inoküle edilmiş ve disk difüzyon için kullanılmak amacıyla ekimi gerçekleştirilmiştir. Bu basamakları takiben özüt emdirilmiş diskler steril bir pens ile agar yüzeyine yerleştirilir. İşlem sırasında oluşacak zonların net şekilde ölçülebilmesi için disklerin arasında 22mm, petri kabı kenarından ise 14mm uzaklıkta olmasına özen gösterilmiştir. Sonra besiyerleri 24 saat süreyle 35°C'de inkübe edildi. İnkübasyonun tamamlanmasının ardından meydana gelen zonların çapları cetvel ile ölçülmüştür ve daha sonra değerlendirmek amacıyla kayda alınmıştır.

Zahter özütlerinin DNA'yı UV ve oksidatif stress etkilerinden koruma potansiyellerinin belirlenmesi için pBR322 plazmid DNA'si (vivantis) kullanıldı. Plazmid DNA'sı, özütlerin varlığında H₂O₂ ve UV uygulanarak hasara uğratıldı. Daha sonra Russo vd., 2000, tarafından bulunan metot kapsamınca % 1.5'lik agaroz jel üzerinde yürütülme işlemi yapılarak daha sonra jel görüntüleme cihazında görüntüleme yapıldı. Farklı solventler ile çıkarılan özütler 50mg kuru ağırlıkları ile tartılarak üzerlerine 1000µl distile su eklendi ve özütlerin çözünmesi sağlandı. %1, 5 oranında hazırlanan agaroz jelle örnek yüklemeleri yapılarak 60dk ve 100 voltta DNA örnekleri yürütüldü. Stok olarak hazırlanan pBR322 1:3 oranında distile su ile seyreltildi. Yükleme yapım aşamasında 5µl hazırlanan özüt, 5µl orange G konularak 10µl jelle var olan kuyucuklara yüklendi. Kontrol olarak kullanılacak karışımların dışında, Zahter özütlerinden ependorflara 5µl konulmuş, ependorfların içerisine 3µl pBR322 plazmid DNA (1:3 oranında seyreltilmiş) ve 1µl % 30'luk H₂O₂ konuldu. Özüt içeren ependorflar ve 2- 4. Kontrol grupları 5dk süresince UV ışınına maruz bıraktıktan sonra toplam miktar 10µl olacak şekilde (özüt/kontrol 5µl + Orange G yükleme boyası 5µl) eklenerek % 1, 5'lik agaroz jelle yüklemeler yapıldı. 60dk 100 Voltluk % 1, 5'lik agaroz jel elektroforezi uygulaması sona erdiğinde görüntülemek için jel görüntüleme cihazı kullanıldı (DNRIS, MiniBIS Pro) ve çıkan jel görüntüsü daha sonra değerlendirilmek üzere kaydedildi.

3. Bulgular

Antimikrobiyal etki potansiyelinin belirlenmesi amacıyla disk difüzyon testi EUCAST kriterleri göz önüne alınarak araştırılmıştır. Bu kapsamda daha önceden bekletilerek içerisindeki çözücü uzaklaştırılan blank disklerin yerleştirilmesi için canlandırması yapılan

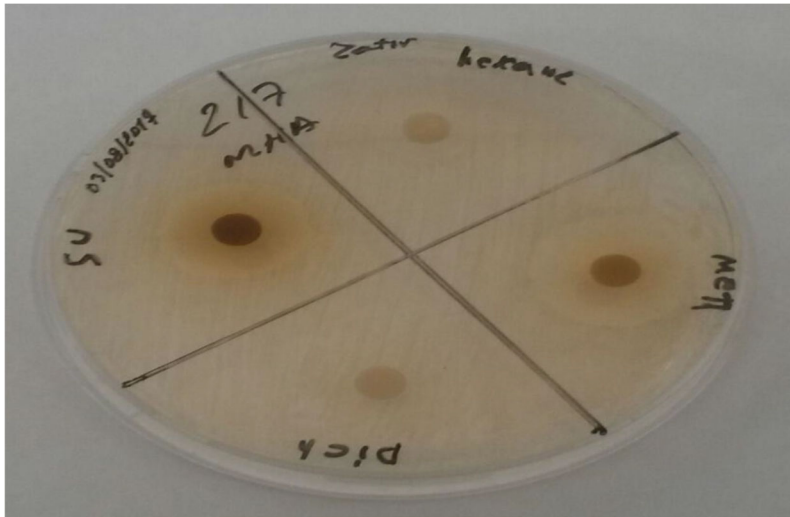
Stenotrophomonas maltophilia suşu MHA (Mueller-Hinton Agar) besiyerine inoküle edilmiştir. Daha sonra özütlerin emdirildiği boş diskler uygun steril koşullar ve yöntemine uygun olarak bakteri inokülesi yapılan besiyerine yerleştirilmiş ve sonuçların görülmesi için uygun sıcaklığa ayarlanmış inkübatöre yerleştirilerek 24saat beklenmiştir. Çıkan sonuçlar Tablo 1’de gösterilmektedir. Disk difüzyon testi sonucunda kullanılan bakteriye en çok etki Metanol çözücüsü ile elde edilen zahter özütünün emdirildiği diskte çıkmıştır. Su ve Hekzan özütlerinde ölçülen zon miktarları da etkili oldukları yönünde yorumlanmıştır. Fakat Diklorometanın çözücüsü ile elde edilen özütün emdirildiği disk çevresinde zon ölçümü yapılamamıştır (Şekil 1).

Thymbra spicata L. var. *spicata* bitkisine ait su, metanol, hekzan ve diklorometan özütlerinin DNA koruyucu aktivitesi, pBR322 plazmit DNA’sı kullanılarak çalışılmıştır. Çalışmanın yapılacağı jelin yoğunluğu bu DNA’nın içerdiği baz çifti sayısına göre hazırlanmıştır. Bu yöntem kapsamında, DNA hasarına neden olan UV ışınları ve H₂O₂ varlığında, elde ettiğimiz özütlerin DNA hasarına engel olma potansiyellerinin olup olmadığının bulunması amaçlanmıştır.

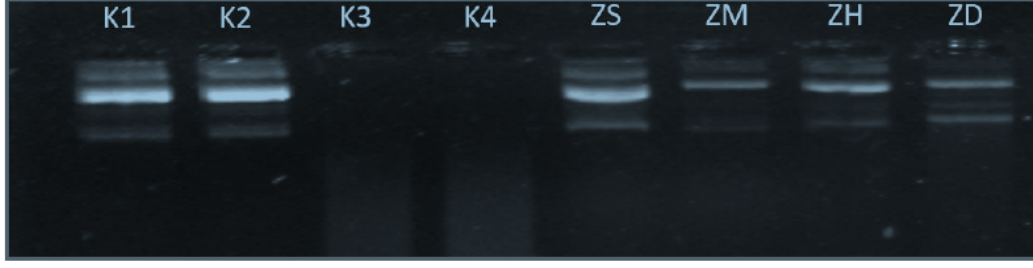
Jel görüntüsü üzerinde görüldüğü gibi zahterden elde edilen özütler eklenerek hazırlanan örneklerin kontroller ile kıyası yapılarak hepsinin DNA koruyucu aktiviteye sahip oldukları söylenebilir. Görüntü üzerindeki bantlar yorumlanacak olursa (Şekil 2) kendi aralarında yapılan kıyasa göre en fazla DNA koruyucu aktivite Zahterin su kullanılarak çıkarılan özütünde bulunmaktadır, diğer solventler ile çıkarılan özütlerinde anlamlı derecede koruyucu etki gösterdiği saptanmıştır. Kontrol 3-4 içerisinde bulunan DNA oksidatif stresten ve UV ışınından etkilenecek kırılmış ve bant oluşumu gözlenmemiştir.

Tablo 1. Disk Difüzyon Yöntemi Sonucunda Ölçülen Zon Çapları

<i>Thymbra spicata</i> L. var. <i>spicata</i>	SU	METANOL	HEKZAN	DİKLOROMETAN
	16mm	23mm	10mm	-



Şekil 1. Disk Difüzyon Sonucu ve Zonlar



K1: Kontrol: Plazmit DNA (3µl) + dH2O (6µl), K2: Kontrol: Plazmit DNA (3µl) + dH2O (6 µl)+ UV (5dk), K3: Kontrol: Plazmit DNA (3µl) + dH2O (6µl) + H2O2 (1µl), K4: Kontrol: Plazmit DNA (3µl) + dH2O (6µl)+ H2O2 (1µl)+ UV(5dk). ZS: Plazmit DNA (3 µl) + Zahter bitki özütü (Solvent Su) 5µl + UV (5dk)+ H₂O₂ (1µl), ZM: Plazmit DNA (3 µl) + Zahter bitki özütü (Solvent Metanol) 5µl + UV (5dk)+ H₂O₂ (1µl), ZH: Plazmit DNA (3 µl) + Zahter bitki özütü (Solvent Hekzan) 5µl + UV (5dk)+ H₂O₂ (1µl), ZD: Plazmit DNA (3 µl) + Zahter bitki özütü (Solvent Diklorometan) 5µl + UV (5dk)+ H₂O₂ (1µl).

Şekil 2. DNA Koruyucu Etki Belirlemede Kullanılan Jel Görüntüsü

4. Tartışma ve Sonuç

Yapılan bu çalışma kapsamında Zahter bitkisinin özütlerinin antimikrobiyal ve DNA koruyucu aktivite potansiyelleri araştırılmış, elde edilen özütlerin, literatür taraması sonucu olarak uçucu yağları ile yapılan biyolojik aktivite çalışmalarının yoğunlukta olduğu fakat çalışılan bakteri türleri arasında *Stenotrophomonas maltophilia* üzerine yapılan herhangi bir çalışmaya rastlanmamıştır. Yapılan diğer literatür taramasında DNA koruyucu aktivite ile ilgili çalışmalara rastlanmamıştır. Bu yüzden tez çalışmamız özgünlük açısından da oldukça önemlidir. *Stenotrophomonas maltophilia* üzerine zahterin ilk defa deniyor olması da çalışmanın özgünlüğü açısından önemlidir. Yapılan literatür taramasında Zahter bitkisinden elde edilen uçucu yağların gıda sektöründe koruyucu olarak kullanıldığı ve bu kullanımla beraber gıdaların raf ömrünün artırıldığı tespit edilmiştir. Aynı çalışma kapsamında yapılan antimikrobiyal etki potansiyeli sonucunun da anlamlı çıktığı bildirilmiştir [17]. Dığrak ve arkadaşları tarafından yapılan diğer bir çalışmada antibakteriyel ve antifungal olarak zahter uçucu yağları kullanılmış, yapılan çalışmada *Micrococcus luteus* LA 2971, *Bacillus megaterium* NRS, *Bacillus brevis* FMC 3, *Enterococcus faecalis* ATCC 15753, *Pseudomonas pyocyaneus* DC 127, *Mycobacterium smegmatis* CCM 2067, *Escherichia coli* DM, *Aeromonas hydrophila* ATCC 7966, *Yersinia enterocolitica* AÜ 19, *Staphylococcus aureus* Cowan 1, *Streptococcus faecalis* DC 74, bakterileri, *Saccharomyces cerevisiae* WET 136 ve *Kluyveromyces fragilis* DC 98 mayaları üzerine çalışılmış ve bunun sonucunda uçucu yağın antibakteriyel ve antifungal etkisi tespit edilmiştir [4]. Kızıl ve arkadaşları tarafından yapılan diğer bir çalışmada zahterin üretildiği topraktaki azot miktarının bitki uçucu yağ oranına etkisi ve diğer agronomik özelliklere etkisi çalışılmış ve bunun sonucunda üretilen zahter toprağındaki azot miktarının bu özelliklerin değişiminde büyük rol oynadığı saptanmıştır [18]. Sonuç olarak *Thymra spicata* L. var. *spicata* üzerine yapılan çalışmalar sonucunda bu bitkinin diğer bakteriler üzerine etkili sonuçlarının çıkması bizi *Stenotrophomonas maltophilia*'ya karşı benzer etkinin olabileceği konusunda araştırma yapmaya yöneltmiştir. Ayrıca bu bakteriye karşı kullanılabilecek yeni bir ilaç veya etken madde potansiyelinin ölçümü de araştırılmıştır. Yapılan çalışmalar sonucunda kullandığımız özütler içerisinde *Stenotrophomonas maltophilia*'ya karşı en etkili özütün zon çapı 23mm çıkan zahter methanol özütü olduğu tespit edilmiştir. Diğer anlamlı olarak değerlendirilen ölçüm ise 16mm zon çapına sahip olan Zahter su özütü olduğu tespit edilmiştir. Hekzan özütünde ölçülen zonun 10mm olması etkinin olduğunu fakat anlamlı ölçüde olmadığı saptanmıştır. Diklorometan özütünde ise herhangi bir zon oluşumu gerçekleşmemiştir. Diğer parametre olarak çalışılan Zahter özütlerinin UV ışınlarına karşı

koruyucu etki kapsamında değerlendirilen sonuçları göre kontrol grupları ile kıyaslanarak yapılan değerlendirme sonucunda en etkili UV koruyucu etkinin Zahter Su özütünde olduğu, etki sırasına göre hekzan, methanol, diklorometan özütlerinde de DNA koruyucu etki olduğu tespit edilmiştir. Piyasada hali hazırda bulunan, UV koruyucu etkisi olduğu düşünülen oxybenzon ve retinil palmitat güneş kremleri, kişisel bakım ürünleri, el ve vücut kremleri içerisinde bulunan aktif bileşenler olarak çok sık olarak kullanılmaktadır [19]. Fakat son zamanlarda yapılan çalışmalar ve araştırmalar sonucunda kozmetik ürünlerinin vazgeçilmezi haline gelen bu bileşenlerin yan etkilere sahip oldukları bildirilmiştir. Bunun yanı sıra Oxybenzonun genotoksik ve endokrin sistemi negatif yönde etkileyen bir bileşen olduğu rapor edilmiştir [20]. Yapılan tüm bu çalışmalar ışığında yaptığımız çalışma sonuçlarının yüksek koruyucu potansiyeli olması bu bileşenlere alternatif bir ürün oluşturmakta, kullanılan bitkinin yan etkilerinin olmaması da bu potansiyelin kullanılmasını daha uygun hale getirmektedir. Değerlendirilen sonuçlar kapsamında elde edilen veriler doğrultusunda yeni çalışmalar yapılarak bu potansiyelin artırılması açısından bu tez bir temel oluşturmaktadır.

Kaynaklar

1. Barış, D., Kızıl, M., Çeken, B., Yavuz, M. ve Aytakin, Ç. (2005). Bazı Hypericum Türlerinin in-vitro Antimikrobiyal ve Antioksidan Aktivitelerinin Araştırılması, XIX. Ulusal Kimya Kongresi, Kuşadası.
2. Baytop, T. (1999). Therapy with Medicinal Plants in Turkey (past and Present), 2nd ed. Nobel Tıp Kitabevi, İstanbul, Turkey.
3. Berber, İ., Avşar, C., Çine, N., Bozkurt, N. ve Elmas E. (2013). Determination Of Antibacterial and Antifungal Activities of Methanolic Extracts of Some Plants Growing in Sinop Karaelmas" Science and Engineering Journal 3(1), 10-16.
4. Toroğlu, S., Dığrak, M., Kocabaş, Y.Z. (2005). Çay veya Baharat Olarak Tüketilen *Teucrium polium* L., *Thymbra spicata* L. var. *spicata*, *Ocimum basilicum* L. ve *Foeniculum vulgare* Miller' in Uçucu Yağlarının In-Vitro Antimikrobiyal Aktivitesi ve Bazı Antibiyotiklerle Etkileşimleri KSÜ. Fen ve Mühendislik Dergisi, 8(2), 36-42.
5. Njume, C., Afolayan, AJ. ve Ndip, R.N. (2009). An Overview of Antimicrobial Resistance and The Future of Medicinal Plants in The Treatment of Helicobacterpylori Infections", Afr. J. Pharm. Pharmacol. 3, 685-699.
6. Şahin, G. (2007). Türkiye' den Toplanan Bazı Paeonia Türlerinin Antibakteriyel Etkisi, Yüksek Lisans Tezi, Ankara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara
7. Bayram, E., Kırıcı, E., Tansi, S., Yılmaz, G., Arabacı, O., Kızıl, S., Telci, İ. (2010). Tıbbi ve Aromatik Bitkiler Üretiminin Arttırılması Olanakları, Ziraat Mühendisliği VII. Teknik Kongresi, Bildiriler Kitabı-1, 11-15 Ocak Ankara, 437-457,
8. Vonderbank, H. (1949). Ergebnisse der Chemotherapieder Tuberculose, Pharmazie, 4:198-207.
9. Dığrak, M., İlçim, A., Alma, M.H. (1999). Antimicrobialactivities of severalparts of Pinus brutia, Juniperusoxycedrus, Abies cilicia, Cedrus libani and Pinusnigra. Phytotherapy Research, 13: 584-587.

10. Dorman, H.J.D., Deans, S.G. (2000). Antimikrobiyal agents from plants: antibacterial activity of plant volatile oils. *Journal of Applied Microbiology* 88:308-316.
11. Akgül, A. (1993). *Baharat Bilimi ve Teknolojisi*. Gıda Teknolojisi Derneği Yayın 15, Ankara, s.451
12. Abascal, K., Yarnell, E. (2002). Herbs and Drug Resistance. Potential of Botanical in Drug-Resistant Microbes. *Alternative & Complementary Therapies*, 1, 237-241.
13. Tepe, B., Degerli, S., Arslan, S., Malatyali, E., Sarikurkcu, C. (2011). Determination of chemical profile, antioxidant, DNA damage protection and antimicrobial activities of *Teucrium polium* and *Stachys iberica*. *Fitoterapia*, 82(2): 237–246.
14. Cragg, G.M., Body, M.R., Cardellina, J.H., Grever, M.R., Schepartz, S.S. and Spader, K.M. (1993). The role of plants in the drug discovery program of the US manipulation. *International Crop Science 1 Maddison, USA*, Crop Science Society of America, 179-196.
15. Nakipoğlu, M., Otan, H. (1992). Tıbbi Bitkilerin Flavonitleri. *Anadolu, J. of AARI* 4(1), s. 70-93
16. Nigg, H.N. ve Seigler, D. (1992). *Phytochemical resources form medicine and agriculture*, New York, Plenum Pres. 76-363.
17. Faydaoğlu, E., Sürücüoğlu, M. (2013). Tıbbi Ve Aromatik Bitkilerin Antimikrobiyal, Antioksidan Aktiviteleri Ve Kullanım Olanakları. *Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi Cilt-Sayı: 6-2 Yıl: 2013* 233-265
18. Kızıllı, S., Tonçer, Ö. (2003). Değişik Azot Dozlarının Floradan Toplanan Karabas Kekik (*Thymbra Spicata* Var. *Spicata* L.)'ın Bazı Agronomik Ve Kalite Özellikleri Üzerine Etkisi. *Anadolu, J. of AARI* 13(1), 132 – 141
19. Downs, C. A., Kramarsky-Winter, E., Segal, R., Fauth, J., Knutson, S., Bronstein, O., Frederic R.C., Jeger, R., Lichtenfeld, Y., Woodley, C.M., Pennington, P., Cadenas, K., Kushmaro, A., Loya, A. (2015). Toxicopathological Effects of the Sunscreen UV Filter, Oxybenzone (Benzophenone-3), on Coral Planulae and Cultured Primary Cells and Its Environmental Contamination in Hawaii and the U.S. Virgin Islands, *Arch Environ Contam Toxicol*, 70: 265–288.
20. Zachary, R. Hopkins, Snowberger, S., Blaney, L. (2017). Ozonation of the oxybenzone, octinoxate, and octocrylene UV-filters: Reaction kinetics, absorbance characteristics, and transformation products, *Journal of Hazardous Materials*, 338 23–32.