

## Lamiaceae Familyasına Ait Bazı Medikal Bitkilerin Bakteriyel Balık Patojenlerine Karşı Anti-Virülans Potansiyeli

Ümran DEVECİ<sup>1</sup>, Yunus UYANIK<sup>2</sup>, İhsan YAŞA<sup>3\*</sup>

<sup>1</sup>Ege Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Temel ve Endüstriyel Mikrobiyoloji, İzmir; ORCID: 0000-0002-7728-2013

<sup>2</sup>Ege Üniversitesi, Fen Fakültesi, Temel ve Endüstriyel Mikrobiyoloji, İzmir; ORCID: 0009-0005-0447-7855

<sup>3</sup>Ege Üniversitesi, Fen Fakültesi, Temel ve Endüstriyel Mikrobiyoloji, İzmir; ORCID: 0000-0002-0477-1377

Gönderilme Tarihi: 20 Eylül 2024

Kabul Tarihi: 24 Aralık 2024

### ÖZ

Bitki özleri, geleneksel tıpta yıllardır yaygın olarak kullanılmaktadır. *Lamiaceae* familyası, tıp, gıda, ilaç endüstrisinde kullanılan aromatik bitkileri içerir. Bu türler gıda olarak tüketilirken, aromatik özellikleriyle de geleneksel tıbbın vazgeçilmez parçası olarak değerlendirilmektedir. Sağlık ve endüstriyel ürünlerde GRAS (Güvenli) kabul edilen *Lamiaceae* türleri ekonomik botanik açısından da önemlidir. İzmir kekiği (*Origanum onites*), Anadolu adaçayı (*Salvia fruticosa*), Mercanköşk (*Origanum majorana*) gibi *Lamiaceae* bitkilerinin güçlü bakterisidal, antifungal özellikleri bilinirken, bu bitkilerden sağlanan yağ ve hidrosol formdaki ekstraktların anti-biyofilm, anti-quorum sensing özellikleri dikkat çekmektedir. Çalışmada bu ekstraktların; kimyasal içerik analizleri, bakteriyel virülansın temelini oluşturan Quorum sensing (QS) ve biyofilm aktivitelerinin inhibisyonuna odaklanılmıştır. Sonuç olarak İzmir kekiği, Anadolu adaçayı ve Mercanköşk bitki ekstraktlarının hidrosol formlarına karşı *Vibrio* spp.'nin dirençli olduğu belirlenmiştir. *Vibrio* spp.'ye karşı en etkili formun İzmir kekiği ve mercanköşk yağ ekstraktı olduğu ortaya konmuş ve ½ MIC (Subletal) konsantrasyonunda biyofilm inhibisyonu %85 tespit edilmiştir. İzmir Kekikiği ve Mercanköşk'ün çalışmadaki tüm *Vibrio* türleri üzerinde antimikrobiyal, anti-biyofilm etkisi gösterirken ayrıca AHL biyosensör suşu CV026'da QS mekanizmasını inhibe etmiştir. Akuakültür çiftliklerinde toplu balık ölümleriyle ilişkilendirilen *Vibrio* spp. patojen suşlarıyla mücadelede doğal bir yaklaşım olarak bitki ekstraktlarının etkinliği gösterilmiştir. Bulgular bu yaklaşımın antimikrobiyallere dirençli balık patojenlerine yönelik, bitkisel ekstraktların kemoterapötiklere alternatif tedavi edici araçlar olarak kullanılmasını desteklemektedir.

**Anahtar Kelimeler:** Antimikrobiyal direnç, anti-quorum sensing, biyoçeşitlilik, vibriosis

**Anti-Virulence Potential of Some Medicinal Plants from the *Lamiaceae* Family Against Bacterial Fish Pathogens**

### ABSTRACT

Plant extracts have been widely used in traditional medicine for centuries. The *Lamiaceae* family, including plants such as Turkish oregano (*Origanum onites*), Anatolian sage (*Salvia fruticosa*), and marjoram (*Origanum majorana*), is highly valued for its antimicrobial properties. These plants are recognized as GRAS (Generally Recognized as Safe) and are significant in the food, pharmaceutical, and healthcare industries. Their strong bactericidal, antifungal, anti-biofilm, and anti-quorum sensing activities make them notable for both traditional and modern applications. This study investigated the chemical composition of the extracts derived from Turkish oregano, Anatolian sage, and marjoram, focusing on their effects against *Vibrio* spp., a major pathogen in aquaculture. Results showed that while *Vibrio* spp. were resistant to the hydrosol forms, the oil extracts of Turkish oregano and marjoram exhibited strong antimicrobial and anti-biofilm activity. Biofilm inhibition reached up to 85% at sublethal concentrations, and quorum sensing (QS) inhibition was observed in the AHL biosensor strain CV026. The findings suggest that these plant extracts, particularly in oil form, could serve as effective alternatives to traditional chemotherapeutics for managing *Vibrio* spp. infections in aquaculture. This approach offers a natural, sustainable solution to combat antimicrobial resistance in fish pathogens.

**Keywords:** Antimicrobial resistance, anti-quorum sensing, bio-diversity vibriosis

### GİRİŞ

Tıbbi bitkiler ve bunlardan elde edilen özler, geçmişten günümüze hem insanlar hem de hayvanlar üzerinde çeşitli tedavi amaçlarıyla yaygın olarak kullanılmaktadır. Günümüzde bu bitkiler, insan ve

çevre sağlığı için risk taşıyan sentetik maddelere alternatif olarak modern tıp uygulamalarında giderek daha fazla tercih edilmektedir [1]. Bu bitkisel ürünlerin çoğu, "Generally Recognized As Safe" (GRAS) yani güvenli olarak kabul edilmektedir [2]. Hem besin hem de tıbbi kullanım açısından dikkat

\*Sorumlu yazar / Corresponding author: ihsan.yasa@ege.edu.tr

çeken *Lamiaceae* familyası, yaklaşık 236 cins ve 7.000'den fazla tür ile angiospermiler arasında altıncı en büyük bitki ailesidir [3]. Bu ailenin üyeleri, özellikle antimikrobiyal ve antioksidan aktiviteleri sayesinde farmasötik alanda büyük bir ilgi görmektedir. Biberiye, kekik, mercan köşk ve adaçayı gibi bu ailenin altında yer alan türler, gastrit, enfeksiyon, dermatit, bronşit ve iltihap gibi hastalıkların tedavisinde geleneksel olarak kullanılmaktadır. Kekik ve adaçayı ise özellikle antioksidan ve antimikrobiyal aktiviteleri nedeniyle kapsamlı bir şekilde araştırılması gereken aromatik bitkiler arasında yer alır [4]. *Lamiaceae* üyesi bitkiler tarafından üretilen uçucu yağlar hem ekonomik hem de ekolojik açıdan büyük bir öneme sahiptir [5]. Aromatik bitkiler, bu uçucu yağlar bakımından oldukça zengindir ve bu yağlar genellikle buhar damıtma yöntemiyle elde edilir. Çiçek, yaprak, sap, dal, tohum, meyve, kök, odun veya kabuk gibi tüm bitki dokularında sentezlenip salgı hücrelerinde, kanallarda, epidermik hücrelerde veya glandüler trikomlarda depolanabilir [6]. Uçucu yağlar, seskiterpen ve monoterpen hidrokarbonlar, alkoller, ketonlar, aldehitler ve oksitler gibi bileşiklerin yanı sıra yağ asitleri ve kükürt türevlerini içeren kompleks karışımlardan oluşur [7]. Bu kimyasal bileşiklerin önemli bileşeni uçucu yağlar, antioksidan, antibakteriyel, antidiyabetik, antimitojenik ve antimikotik özellikler göstermekte ve bilimsel araştırmaların odak noktası olmaktadır [8]. Tıbbi bitkiler yalnızca insan sağlığı için değil, aynı zamanda hayvan sağlığı için de önemli bir role sahiptir. Örneğin, bitkisel uçucu yağlar ve özler, bağışıklık sistemini güçlendirme potansiyelleri sayesinde su ürünleri yetiştiriciliğinde kemoterapötik madde ve gıda katkı maddesi olarak kullanılmaktadır. Bu kullanım, balık sağlığı ve sürdürülebilir yetiştiricilik uygulamaları için alternatif bir çözüm sunmaktadır [9].

Su ürünleri yetiştiriciliği, dengeli beslenme ve sağlıklı yaşam için hayvansal gıda ürünleri tedarikinde ana kaynaklardan biridir. Bu sektörde gerçekleştirilen balık üretimi, diğer tüm hayvansal besin kaynaklarına kıyasla en hızlı büyüyen gıda sektörü konumundadır [10]. Ancak, su ürünleri yetiştiriciliğinde gözlemlenen yoğun üretim, periyodik işlemler, aşırı sıcaklık değişiklikleri, kötü su kalitesi ve yetersiz beslenme gibi faktörler balık sağlığı üzerinde olumsuz etkilere yol açmaktadır [11]. Artan üretim hacmi, balık yoğunluğunu ve kötü fizyolojik çevre koşullarını artırarak, patojenlerin yayılmasına ve balıkların mikrobiyal ajanlara (bakteri, mantar, virüs vb.) karşı direncinin düşmesine neden olmaktadır. Bu durum, yüksek

mortalitelere ve sonuç olarak ciddi ekonomik kayıplara yol açmaktadır [12].

Su ürünleri yetiştiriciliği sektöründe son 10 yılda karşılaşılan en önemli salgınlardan biri *Vibriosis*'tir. *Vibriosis*, *Vibrionaceae* familyasına ait bakteri türlerinin neden olduğu ve balıklarda çeşitli semptomlara yol açarak ölümlü sonuçlanabilen bir enfeksiyon sürecidir [13]. *Vibrio* spp., birçok balık türü, kabuklu, yumuşakça, mercan ve rotiferlerde ciddi enfeksiyonlara neden olmaktadır. *Vibriosis*'ten etkilenen balıklar, yüzgeçlerde kanama, egzozfalmi, körlük ve kuyruk çürümesi gibi semptomlar göstermektedir [14]. Amoksisilin, eritromisin, enrofloksasin, oksitetrasiklin ve furazolidon gibi bazı antibiyotikler, birçok balık hastalığını kontrol altına almak için başarıyla kullanılmaktadır [15]. Ancak, antibiyotiklerin yaygın kullanımı, piyasada mevcut antibiyotiklerin yetersizliği, profilaktik kullanımları ve yeni terapötik ajanların yavaş gelişme hızı son yıllarda antibiyotik direnci krizine yol açmıştır. Bu durum, kemoterapötiklerin etkinliğinin azalmasına sebep olmaktadır [16]. Ayrıca, antibiyotiklerin çevreye yayılımı ve balık dokularındaki kalıntıları son tüketiciye kadar ulaşmakta ve direnç gelişimine yönelik potansiyel riski artırmaktadır [17].

Hızla yayılan antimikrobiyal direnç, şu anda küresel halk sağlığı için acil bir tehdit oluşturmaktadır. Bu sebeplerle, su ürünleri yetiştiriciliği de dahil olmak üzere antimikrobiyal direnç büyük bir sorun haline gelmiştir ve günümüzde daha önce kolayca tedavi edilebilen hastalıklar, birçok bakterinin çoklu ilaca dirençli olması nedeniyle büyük bir sorun haline gelmektedir [18]. Ayrıca bazı durumlarda, antibiyotik tedavisi laboratuvar denemelerinde etkili olsa bile *in vivo* etkinliği düşük olabilmektedir [19]. Gelişen Antimikrobiyal direnç (AMR), yatay gen transferleri gibi genetik aktarım süreçleri ile bakteriler arasında yayılabilmekte ve giderek ciddi bir hal almaktadır [20].

Tüm bu kapsamda antibiyotik direnci hem insan sağlığı hem de su ürünleri yetiştiriciliği gibi önemli sektörler için küresel bir tehdit haline gelmiştir. Bu durum, patojenlerle mücadelede yeni, etkili ve sürdürülebilir yöntemlerin geliştirilmesini zorunlu kılmaktadır. Bitkisel ürünler hem çevre dostu hem de ekonomik olmalarıyla antibiyotik kullanılarak yapılan tedavilere güçlü bir alternatif sunmaktadır. Bu çalışma, özellikle su ürünleri yetiştiriciliği sektöründe ciddi enfeksiyonlara neden olarak ekonomik kayıplara yol açan *Vibrio* spp. türlerine odaklanmaktadır. İzmir kekiği, Anadolu adaçayı ve Mercanköşk bitki ekstraktlarının anti-biyofilm ve antiquorum sensing özelliklerini inceleyerek, yalnızca patojenitenin baskılanmasını değil, aynı

zamanda antibiyotiklere karşı alternatif yenilikçi çözümler sunmayı hedeflemektedir. Çalışma, bitki ekstraktlarının patojenler üzerindeki etkilerini derinlemesine değerlendirerek, su ürünleri sektöründe karşılaşılan bakteriyel salgınlara sürdürülebilir ve etkili bir çözüm sağlamayı amaçlamaktadır.

## MATERYAL VE METOT

### *Vibrio spp. İzolatlarının Aktivasyonu*

Bu çalışmada kullanılan *Vibrio* spp. izolatları 2022 yılında Ege Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projesi (FYL-2021-23352) kapsamında izole edilip, moleküler yöntemler ile tanımlanmıştır. Liyofilize stok halde muhafaza edilen 7 farklı *Vibrio* spp. izolatu, aktivasyon amacıyla %1,5 NaCl içeren Tryptic Soy Broth (TSB, Merck) besiyerine ekilmiş ve 27°C'de 24-48 saat süreyle inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonucunda bulanıklık gözlemlenen tüplerden, %1,5 NaCl içeren seçici ve ayırt edici Thiosulfate Citrate Bile Sucrose (TCBS, Merck) agar besiyerine çizgi ekim yapılmıştır. Petriler, 27°C'de 24-48 saat inkübe edilmiştir.

Kullanılan TCBS agar besiyeri, *Vibrio cholerae* ve diğer enteropatojenik *Vibrio* türlerinin izolasyonu ve gelişimi için selektif bir katı besiyeridir. 27-35°C'de 24-48 saat inkübasyondan sonra *Vibrio* spp. hücreleri düz ve sarı renkli koloniler oluşturmaktadır.

### *Bitki Ekstraktlarının Kimyasal İçerik Analizlerinin Gerçekleştirilmesi*

Bitki ekstraktlarının kimyasal içerik analizleri Boruga vd. [21] tarafından belirtilen yöntemlere uygun olarak BAÇEM tarafından gerçekleştirilmiştir. Bu kapsamda yapılan analizler HP 6890 gaz kromatografisi cihazı ile buna bağlı HP 5973 kütle spektrometresi kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Gaz kromatografisi sistemi, %5 fenil-metilpolisiloksan kaplamalı Factor Four™ VF-35 ms kapiler kolon (30 m uzunluk, 0,25 mm iç çap, 0,25 µm film kalınlığı) ile donatılmıştır. Bölünmüş-bölünmemiş tarz ile çalışan bir enjektör sistemi kullanılmıştır.

Gaz kromatografisi koşullarında Sıcaklık; 50°C'den 250°C'ye, dakikada 40°C'lik artışlarla uygulanmıştır. Enjektör sıcaklığı; 250°C, Taşıyıcı gaz, 1,0 mL/dakika akış hızında helyum (inert gaz), Enjeksiyon hacmi; bölünmemiş modda 1 µL ve çözücü gecikme süresi; 5 dakika uygulanmıştır.

Kütle spektrometrisi (MS) koşullarında ise iyonizasyon enerjisi; 70 eV., dört kutuplu sıcaklık; 100°C, taratma hızı; 1,6 tarama/saniye, kütle ağırlığı; 40-500 amu. olarak gerçekleştirilmiştir.

Uçucu bileşiklerin yüzdesel bileşimleri, her bir bileşiğin gaz kromatografisinde elde edilen tepe

noktalarının yüzde alanına göre hesaplanmıştır. Nitel analiz, her bir bileşiğin kütle spektrumunun, ABD Ulusal Standartlar ve Teknoloji Enstitüsüne (NIST 98 kütüphane yazılımı) ait spektrumlarla karşılaştırılmasıyla gerçekleştirilmiştir.

### *Disk Difüzyon Yöntemi*

Antibakteriyel aktivitenin disk difüzyon yöntemi ile belirlenmesi için TSB besiyeri kullanılmıştır. İlk iş paketinde, katı besiyerinde saflıkları kontrol edilen izolatlar, 5 mL %1,5 NaCl içeren TSB'ye inoküle edilmiştir. *Vibrio* spp. suşları, 24 saat boyunca 27°C'de kültüre edildikten sonra, bu kültürlerden 0,1 mL alınarak TSA (%1,5 NaCl) besiyeri üzerine yayma plaka yöntemi ile ekim yapılmıştır. Bitki ekstraktlarının (İzmir kekiği, adaçayı ve mercanköşk) hidrosolleri doğrudan, yağ ekstraktları ise %25'lik seyreltme ile diskler üzerine damlatılmış ve steril pens yardımıyla petri kaplarına yerleştirilmiştir. Bitki ekstraktlarına ait yağların %100 konsantrasyonunda büyüme gözlemlenmediği için %25 seyreltme kullanılmıştır. Ekimi yapılan ve disklerin yerleştirildiği petri kapları, 27°C'de 24-48 saat inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonunda, disklerin etrafında oluşan inhibisyon zonları ölçülmüştür.

### *Bitki Ekstraktlarının Vibrio spp. İzolatları Üzerinde Minimum İnhibisyon Konsantrasyonlarının (MİK) Araştırılması*

*Vibrio* spp. izolatlarına karşı bitki ekstraktlarına ait uçucu yağ ve hidrosollerin minimal inhibisyon konsantrasyonları (MİK), mikrodilüsyon yöntemi kullanılarak 96 kuyucuklu plakalarda, Yasa vd. [22] tarafından geliştirilen yöntemde küçük değişiklikler yapılarak belirlenmiştir. Test edilecek her bir ekstrakt kuyucuklara 50 µl hacminde eklenmiştir. Negatife kontrol grubu olarak TSB besiyeri (25 µl) ile bitki ekstraktları (yağ veya hidrosol) kullanılırken, pozitif kontrol grubu olarak sadece bakteri suşları (25 µl) kullanılmıştır. Hazırlanan mikroplakalar, 24 saat boyunca 25°C'de inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonrası, bitki ekstraktlarının aktiviteleri, test bakterilerinin inhibisyonunu %0,1 TTC (trifeniltetrazolyum klorür, Merck) çözeltisi 50 µl aktarıldığında kırmızı/beyaz renk oluşumu ile değerlendirilmiştir. Bulanıklık ve renk oluşumu gözlenmeyen ilk kuyucuktaki bileşik konsantrasyonu, ilgili mikroorganizma için MİK değeri olarak kabul edilmiştir.

### *Bitki Ekstraktlarının Antiquorum Sensing Aktivitesinin Belirlenmesi*

QS inhibisyonunu Bulut vd. [23] tarafından gerçekleştirilen metoda uygun olarak

gerçekleştirilmiştir. Bu kapsamda QS inhibisyonunu belirlemek amacıyla *Chromobacterium violaceum* biyosensör suşu kullanılarak disk difüzyon deneyi gerçekleştirilmiştir. Öncelikle, steril LB agar besiyeri petri kaplarına dökülmüştür. Daha sonra, uygun şekilde seyreltilmiş (yaklaşık  $2,5 \times 10^6$  CFU/ml) taze büyütülmüş *C.violaceum* kültürü, yarı katı (%0,5 agar) LB besiyerine aşılanmış ve bu karışım steril LB agar besiyerinin yüzeyini kaplayacak şekilde yayılmıştır. Steril kâğıt diskler petri kaplarına yerleştirildikten sonra, disklerin üzerine 10 µl bitki ekstraktlarının kimyasalları (uçucu yağ ve hidrosol) damlatılmıştır. İnkübasyon 30°C'de 24 saat süreyle gerçekleştirilmiştir. Anti-QS aktivitesi, disklerin etrafında mor olmayan (şeffaf) bir zon oluşumu ile belirlenmiştir.

#### **Bitki Ekstraktlarının *Vibrio* spp. İzolatları Üzerinde Antibiyofilm Etkinliklerinin Belirlenmesi**

*Vibrio* spp. izolatlarında biyofilm inhibisyon kapasiteleri, Bulut vd. [23] tarafından gerçekleştirilen metoda göre mikropilaka yöntemi kullanılarak araştırılmıştır. *Vibrio* spp. kültürleri, %1,5 NaCl içeren TSB besiyerinde üretilmiş ve McFarland 0,5 standardına göre hazırlanan bakteri süspansiyonları, 96 kuyucuklu mikropilakalara 100 µl olarak ilave edilerek 27°C'de 24 saat inkübe edilmiştir. İnkübasyonun ardından, kuyucuklardaki sıvı bakteri kültürleri boşaltılmış ve kuyucuklar distile su ile yıkanmıştır. Biyofilmle ilişkili hücre kalıntıları, %1'lik kristal viyole ile 15 dakika boyunca boyanmıştır. Boya fazlalığı dikkatlice distile su ile yıkanmış ve bakterilerin oluşturduğu biyofilm, 96 kuyucuklu plakalar üzerinde fotoğraflanmıştır. Biyofilm oluşumunu kantitatif olarak belirlemek amacıyla, mikropilakalara %95 etanol-saf su karışımı eklenmiştir. Plakaların optik yoğunlukları, 546 nm'de bir Microplate Reader ile üç tekrarlı olarak ölçülmüştür. Her bir bakteri için OD (optik yoğunluk) değerlerinin ortalamaları alınmıştır. Test sırasında, steril TSB negatif kontrol olarak, *Vibrio* spp. izolatları ile steril TSB'nin birlikte bulunduğu kuyucuk ise pozitif kontrol olarak değerlendirilmiştir. Sonuçlar, inhibisyon yüzdesi olarak aşağıdaki eşitlikle hesaplanmıştır. Elde edilen veriler, GraphPad Prism 8 (San Diego, CA, USA) yazılımı kullanılarak analiz edilmiştir. Sonuçlar standart sapmalar ile ifade edilmiştir. İstatistiksel anlamlılık seviyesi %5 olarak belirlenmiş olup,  $p < 0.05$  değeri anlamlı kabul edilmiştir.

$$[(OD_k - OD_t) / OD_k] \times 100$$

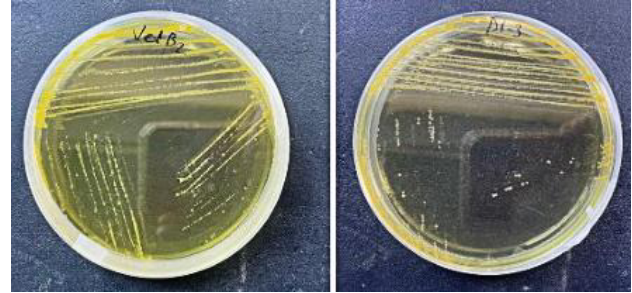
OD<sub>k</sub>: Pozitif kontrol olarak kullandığımız kuyucukların 546 nm'de optik yoğunluğu,  
OD<sub>t</sub>: Bitki yağları ile muamele edilmiş kuyucukların 546 nm'de optik yoğunluğu.

## **BULGULAR**

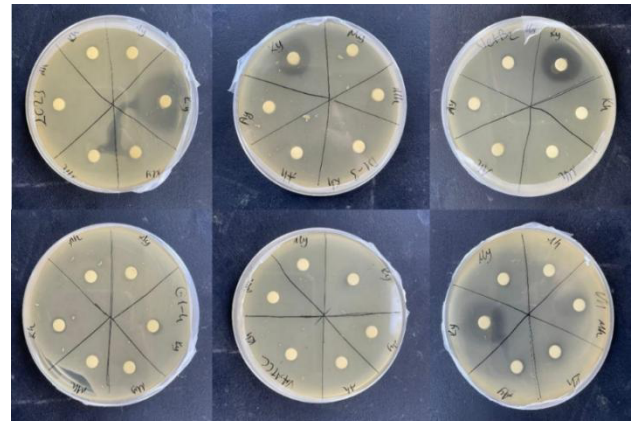
### ***Vibrio* spp. İzolasyonu**

Bu çalışmada kullanılan *Vibrio* spp. suşları (2023, D1-3, VetB2, VetB3, G1-4, VAATCC, VH), TSB besiyerinde 27°C'de 24 saat aktive edilmiştir. İnkübasyonun ardından, *Vibrio* spp. için seçici ve ayırt edici bir besiyeri olan TCBS Agar ortamına çizgi ekim yapılmış ve 27°C'de 24 saatlik inkübasyon sonucunda, yeşil besiyerinde sarı kolonilerin oluşumu Şekil 1'de gösterilmiştir.

*Origanum onites* (İzmir kekiği), *Majorana hortens* (Mercanköşk), *Salvia officinalis* (Adaçayı)'in hidrosol ve uçucu yağları *Vibrio* spp. bakteri izolatları üzerinde antimikrobiyal aktivitenin belirlenmesi için disk difüzyon yöntemi, minimum inhibisyon konsantrasyonu (MIC), anti-quorum sensing aktivitesi ve anti-biyofilm kapasitesinin belirlenmesi için kullanılmıştır. Mercanköşk, kekik ve adaçayının içerdiği bileşik yüzde miktarları Çizelge 1'de sunulmuştur.



Şekil 1. İnkübasyon sonrası TCBS agarda *Vibrio* spp. izolatlarının karakteristik görüntüsü



Şekil 2. Bitki ekstraktlarının (hidrosol ve uçucu yağ) *Vibrio* spp. suşları üzerinde disk difüzyon çalışması görüntüleri

### **Disk Difüzyon Yöntemi**

Kekik yağının tüm *Vibrio* spp. suşlarına karşı etkili olduğu bulunmuştur (Çizelge 2). En yüksek antimikrobiyal etki, 2023 suşuna karşı 28 mm zon çapı ile gözlenmiştir. Bunu takiben VH suşuna karşı

21 mm zon çapı ve Vet-B2 suşuna karşı 19 mm zon çapı ile inhibisyon gözlemlenmiştir. Adaçayı yağına ve hidrosolüne karşı tüm suşların dirençli olduğu tespit edilmiştir. Mercanköşk bitkisine ait yağ, yalnızca G1-4 suşunda 6 mm zon çapı ve VAATCC suşunda 7 mm zon çapı ile etkili olmuştur.

Mercanköşk hidrosolü ise yalnızca D1-3 suşunda inhibisyon zonu oluşturmayı başarmıştır. Disk difüzyon çalışması sonucunda, en yüksek antimikrobiyal etki gösteren bitki ekstraktının kekik yağı olduğu saptanmıştır.

Çizelge 1. Mercan köşk, kekik ve adaçayının içerdiği bileşik miktarları (%)

Mercanköşk		Kekik		Anadolu Adaçayı	
Bileşik	Yüzde Miktar	Bileşik	Yüzde Miktar	Bileşik	Yüzde Miktar
Alpha pinene	2,132	Alpha pinene	1,977	Cis-Salvene	0,470
Canphene	0,241	Camphene	0,855	Trans Salvene	0,073
Beta pinene	0,588	Beta pinene	0,267	Tricyclene	0,285
Sabinene	8,777	Sabinene	0,063	Alpha Pinene	6,618
Myrcepe	2,488	Delta-3-Carene	0,259	Camphene	6,654
Alpha Phellandrene	0,596	Myrcepe	3,680	Beta Pinene	3,792
Alpha Terpinene	11,573	Alpha Phellandrene	0,755	Sabinene	0,312
Limonene	2,382	Alpha Terpinene	4,988	Myrcene	2,125
Beta Phellandrene	2,400	Limonene	0,812	Alpha Terpinene	0,441
1,8 Cineole	0,258	Beta Phellandrene	0,725	Limonene	2,882
Gamma Terpinene	15,306	1,8 Cineole	0,102	Phallandrene	0,248
Trans Beta Ocimene	0,111	Cis-Beta Ocimene	0,437	1,8 Cineole	16,267
Cymene	1,501	Gamma Terpinene	13,356	Gamma Terpinene	0,796
Alpha terpinolene	3,796	Trans Beta Ocimene	0,125	Cymene	1,236
Trans Sabinene Hydrate	2,429	Cymene	19,010	Alpha terpinolene	0,426
Linalool	0,981	Alpha terpinolene	0,549	Beta Thuione	19,752
Cis Sabinene Hydrate	11,362	3 Octanol	0,097	Alpha Thuione	9,225
Linalyl Acetate	2,954	Trans Sabinene Hydrate	0,576	Alpha Copaene	0,194
1-Terpineol	1,305	Linalool	5,653	Amyl Vinyl Carbinol	0,192
Bornyl Acetate	0,112	Amyl Vinyl Carbinol	0,565	Camphor	15,058
Caryophyllene	2,012	Linalyl Acetate	0,077	Linalool	0,225
Terpinen-4-Ol	17,224	1-Terpineol	0,102	Borpyl Acetate	0,916
Cis-P-2 Menthen 1-Ol	0,739	Caryophyllene	2,763	Terpinen-4-Ol	0,602
Alpha Humulene	0,259	Terpinen-4-Ol	2,153	Caryophyllene	3,474
Piperitol Isomer	0,738	Aromandendrene	0,534	Sabinyl Acetate	0,190
Alpha Terpineol	4,653	Pinocarveol	0,081	Isothuiol	0,144
Bomeol	0,514	Viridiflorence	0,294	Alpha Humulene	2,004
Neryl Acetate	0,078	Alpha Terpineol	0,209	Alpha Terpineol	0,273
Elixene	1,950	Bomeol	2,108	Borpeal	2,210
Piperitol Isomer	0,301	Beta Bisabolene	0,550	Myrtepol	0,139
Alpha Terpineol	4,653	Caryone	0,139	Caryophyllene oxide	0,404
Bomeol	0,514	Delta Cadinene	0,072	Humulene epoxide-2	0,210
Neryl Acetate	0,078	Gamma Cadinene	0,101	Veridifloral	1,832
Elixene	1,950	Thymyl Acetate	0,101	Sclareol	0,421
Gernyl Acetate	0,130	Caryacryl Acetate	0,145		
Geraniol	0,103	Caryophyllene Oxide	0,086		
Spathulenol	0,091	Alpha Humulene	0,089		
Diğer Bileşikler	0,217				

Çizelge 2. Bitki ekstraktlarının (hidrosol ve uçucu yağ) *Vibrio* spp. suşları üzerinde inhibisyon zonları (R: resistant, dirençli)

<i>Vibrio</i> spp. suşları	Bitki Ekstraktları					
	Adaçayı yağı	Kekik yağı	Mercan köşk yağı	Adaçayı hidrosolü	Kekik hidrosolü	Mercan köşk hidrosolü
2023	R	28 mm	R	R	R	R
D1-3	R	14 mm	R	R	R	6 mm
Vet-B2	R	19 mm	R	R	R	R
Vet-B3	R	9 mm	R	R	R	R
G1-4	R	8 mm	6 mm	R	8 mm	R
VAATCC	R	11 mm	7 mm	R	R	R
VH	R	21 mm	R	R	R	R

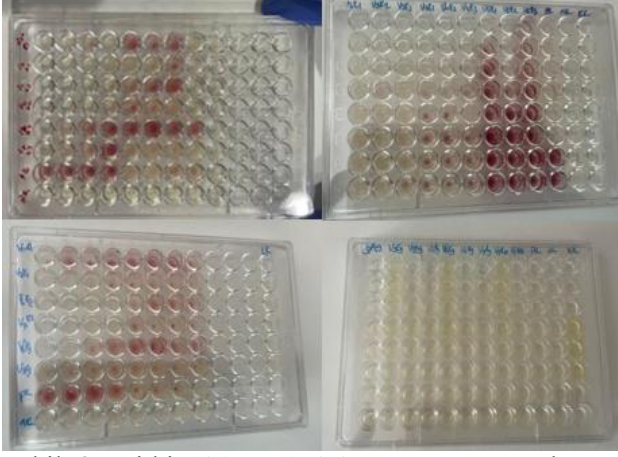
### Bitki Ekstraktlarının *Vibrio* spp. Suşları Üzerindeki MİK Değerleri

Çalışmada kullanılan 7 farklı *Vibrio* spp. izolatına karşı antimikrobiyal etki gösteren uçucu yağlar ve hidrosollerin minimum inhibisyon konsantrasyon (MİK) değerleri mikropilaka yöntemi ile belirlenerek sonuçlar Şekil 3 ve Çizelge 3’de sunulmuştur.

Minimum inhibisyon konsantrasyonu bulguları disk difüzyon yöntemi ile uyumlu sonuçlar vermektedir. Bu kapsamda sonuçlar değerlendirildiğinde adaçayı bitki ekstraktının en yüksek antimikrobiyal aktivite gösterdiği bakteri suşu, ortamın < %0,39 MIC değeri ile Vet-B2, kekik ve mercanköşk bitki ekstraktlarının yağ formunda G1-4 ve 2023VA suşları haricinde ise kalan tüm



suşlar üzerinde % <0,39 MIC değeri ile yüksek antimikrobiyal aktivite gösterdiği gözlemlenmektedir. İlgili değerler Çizelge 3'te gösterilmektedir.



Şekil 3. Bitki hidrosollerinin ve uçucu yağlarının *Vibrio* spp. suşları üzerindeki minimum inhibisyon konsantrasyonlarının (MIC) belirlendiği mikropalakalar

Çizelge 3. *Lamiaceae* üyesi bitki hidrosollerinin *Vibrio* spp. suşları üzerindeki minimum inhibisyon konsantrasyonu (MİK) değerleri (%)

	Adaçayı		Kekik		Mercanköşk	
	Hidrosol	Yağ	Hidrosol	Yağ	Hidrosol	Yağ
2023VA	50	3,12	<0,39	3,12	<0,39	<0,39
D1-3	50	0,39	<0,39	0,39	25	<0,39
Vet-B2	25	<0,39	<0,39	<0,39	<0,39	<0,39
Vet-B3	50	0,78	<0,39	3,12	<0,39	<0,39
G1-4	50	6,25	25	12,5	<0,39	12,5
VAATCC	25	12,5	<0,39	<0,39	<0,39	<0,39
VH	25	1,56	<0,39	<0,39	<0,39	<0,39

### Bitki Ekstraktlarının Antiquorum Sensing Aktivitesi

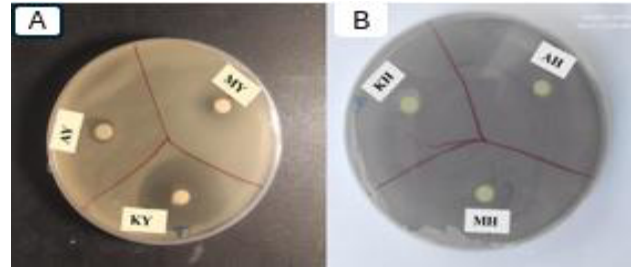
Bitki ekstraktlarının anti-QS aktivitelerini belirlemek adına adaçayı, kekik ve mercanköşk'ün yağ formları damlatılan disklerin yerleştirildiği petrielerde *C.violaceum violacein* pigment üretimini gerçekleştirememiştir (Şekil 4-a). Her üç bitkinde yağ formları anti-QS aktivitesi göstermiştir adaçayı, kekik ve mercan köşke ait hidrosol damlatılmış disklerin yerleştirildiği petrielerde violacein pigment üretiminde inhibisyon gözlemlenmemiştir (Şekil 4-b).

### Bitki Ekstraktlarının *Vibrio* spp. İzolatları Üzerindeki Antibiyofilm Aktivitesi

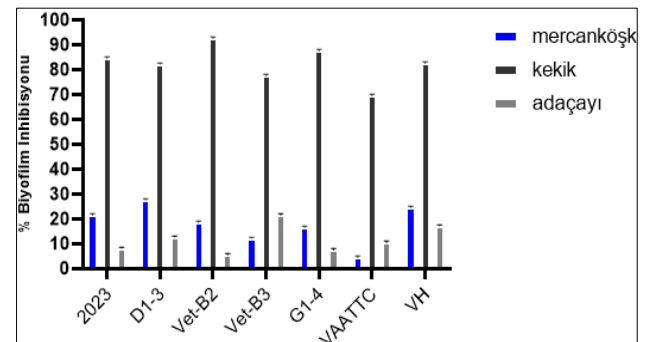
Adaçayı, kekik ve mercanköşk'e ait yağ formlarının *Vibrio* spp. izolatları üzerinde anti-biyofilm aktiviteleri araştırılmıştır. Kristal viyole yöntemi kullanılarak gerçekleştirilen biyofilm

üretimi kapasitesi deneylerinin sonucunda Kekik yağının çalışmada test edilen tüm *Vibrio* spp. izolatları üzerinde yüksek oranlarda anti-biyofilm aktivitesi gösterdiği tespit edilmiştir. Adaçayı ve mercanköşk yağ formlarının ise çok daha düşük oranlarda biyofilm inhibisyonu gösterdiği sonucuna ulaşılmıştır (Şekil 5).

Bitki ekstraktlarının biyofilm inhibisyon kapasiteleri, tüm izolatlar üzerindeki ortalama yüzde inhibisyon değerleri ile değerlendirilmiştir. Mercanköşk ekstraktının *Vibrio* spp. üzerindeki etkisi %5 ile %27 arasında değişmekte olup, ortalama biyofilm inhibisyon oranı %17,57 ( $\pm 0,6$ ) olarak tespit edilmiştir. Anadolu adaçayı ekstraktının antibiyofilm kapasitesi ise %5 ile %22 arasında bir varyasyon göstermiş ve ortalama inhibisyon oranı %11,86 ( $\pm 0,06$ ) olarak belirlenmiştir. İzmir kekiği ekstraktı diğer bitkilere kıyasla oldukça yüksek bir antibiyofilm etkinlik sergilemiş, suşlar üzerindeki etkisi %69 ile %93 arasında değişen inhibisyon oranlarıyla kendini göstermiştir. *Vibrio* spp. üzerindeki ortalama inhibisyon kapasitesi ise %82,21 ( $\pm 0,36$ ) olarak hesaplanmıştır. Sonuçlar Mercanköşk, Anadolu adaçayı ve İzmir kekiği ekstraktlarının biyofilm inhibisyon etkileri arasında istatistiksel olarak anlamlı farklar bulunduğunu desteklemektedir (ANOVA,  $p < 0.05$ ) (Şekil 5).



Şekil 4. Adaçayı, kekik ve mercan köşk ekstraktlarının *C.violaceum* üzerinde antiquorum sensing aktivitesi (4A; KY: kekik yağı; AY: adaçayı yağı; MY: mercanköşk yağı-4B; KH: kekik hidrosolü; AH: adaçayı hidrosolü; MH: mercanköşk hidrosolü)



Şekil 5. Bitki yağı ekstraktlarının *Vibrio* spp. izolatları üzerinde biyofilm inhibisyonu

## TARTIŞMA

Bitkiler alemi, yalnızca bitkiler ve ekosistemler için değil, aynı zamanda insanoğlunun yanı sıra dünya çapındaki araştırma ve endüstri için de potansiyel faydaları olan paha biçilemez bir doğal ürün kaynağıdır. Çeşitli sayıda yağda çözünebilen metabolitlerin bir karışımı olan uçucu yağlar, patojen mikroorganizmalara karşı antimikrobiyal özelliklerinin de bulunduğu sayısız biyolojik uygulamaları nedeniyle son yıllarda oldukça dikkat çekmektedir.

*Lamiaceae* familyası yüzyıllardır alternatif tıpta yaygın olarak kullanılan birçok türü içermektedir. Bu türler arasında yer alan adaçayı, kekik ve mercanköşk farklı formlarda lezzet arttırıcı, gıda preparatları ve alternatif tıpta bitkisel ilaç olarak kullanılmaktadır. Günümüzde her geçen gün hızla artan antimikrobiyal dirençle mücadele kapsamında sürdürülebilir ve doğa dostu yeni alternatif çözümlere ihtiyacımız giderek artmaktadır. Bu kapsamda bitkilerden elde edilen doğal antimikrobiyallerle ilgili birçok çalışma yapılmıştır. Örneğin, Oramadike ve Ogunbanwo [24] tarafından yapılan bir çalışmada, *T.vulgaris*'in *Vibrio* türlerine karşı yüksek oranda antibakteriyel etkisi olduğu ortaya konmuştur. Bu etkinin bitki ekstraktında yer alan sekonder metabolitlerin varlığına bağlı olabileceği öne sürülmüştür. Bitki ekstraktlarının içerisinde yer alan; öjenol, karvakrol ve timol gibi fenolik bileşiklerin yüksek antibakteriyel etki gösterdiği ve *T.vulgaris*'inde timol içeriğinin yüksek olduğu önceki çalışmalarda rapor edilmiştir [25]. Metisilin dirençli 14 klinik *S.aureus* izolatına ve 5 standart (gram (+) ve gram (-)) bakteriye karşı *T.vulgaris* ve *E.globulus* esansiyel yağları antibakteriyel aktiviteler açısından test edildiğinde her iki esansiyel yağ ekstraktının da farklı derecelerde antibakteriyel aktivite gösterdiği tespit edilmiştir. Araştırmacılar gözlemlenen antibakteriyel etkiyi, yağ ekstraktlarındaki en karakteristik bileşenler olan Timol (%48,1, *T.vulgaris*) ve Ökalyptol (%47,2, *E.globulus*) ile ilişkilendirmiştir [26]. Çalışmamızda da Mercanköşk bitki ekstraktı kimyasal içerik analiz sonucuna göre içeriğinde %17,224 oranında Terpinen-4-O1, İzmir kekik bitki ekstraktı içeriğinde %19,010 oranında Cymene ve Anadolu adaçayı bitki ekstraktı içeriğinde %1,8 Cineole içermektedir. Bu bulgular literatür ile doğru orantıda olup bitki ekstraktlarının antimikrobiyal etkisinin artmasında önem arz etmektedir.

Benzer bir şekilde Yılmaz vd. [28] tarafından gerçekleştirilen bir çalışmada da biberiye, kekik ve çemen otu tozlarının *Tilapia* (Nil tilapiyası) yavrularında *Streptococcus iniae*'ye karşı hastalık direncini artırdığı kanıtlanmıştır [27]. Miladinović ve

Miladinović, adaçayı yapraklarından elde edilen uçucu yağın, *B.subtilis*, *S.aureus* ATCC 6538, *E.coli*, *Salmonella enterica serovar Enteritidis* ve *Aspergillus niger*'e karşı antimikrobiyal aktivite sergilediğini bildirmiştir [28].

*Lamiaceae* üyesi bitkilerden elde edilen ekstraktların antimikrobiyal dirençli (AMR) suşlar üzerindeki inhibisyon etkileri incelenmiştir. Örneğin *P.barbatus* ekstraktının, *Salmonella typhi* ve *P.aeruginosa*'ya karşı MİK değerinin 3,12 mg/mL olduğu sonucuna ulaşılmıştır. Benzer şekilde, *P.barbatus*'un esansiyel yağları, *E.coli*, *Proteus vulgaris*, *Bacillus cereus* ve MDR *S.aureus*'a (çoklu ilaca dirençli) karşı antibakteriyel aktivite göstermiştir [29, 30]. Gones vd. [32] tarafından gerçekleştirilen çalışmada ise *Satureja montana* ve *Origanum majorana* bitki ekstraktları, geniş bir patojen yelpazesinde denendiğinde *E.coli* hariç, diğer Gram negatif ve Gram pozitif bakterilere karşı yüksek antimikrobiyal aktivite sergilerken *Candida spp.*'ye karşı etkileri sınırlı kalmıştır.

Literatürdeki benzer çalışmalarla uyumlu şekilde, doğal bitki ekstraktlarının bu etkileri, sürdürülebilir ve doğa dostu antimikrobiyal stratejiler geliştirme gerekliliğini bir kez daha vurgulamaktadır. Özellikle mercanköşk üzerine ülkemizde yapılan çalışmalarda eksiklikler göz önüne alındığında, bu bitkinin daha kapsamlı bir şekilde araştırılması gerekliliği açıktır. Bulgularımız İzmir Kekigi ve mercanköşk yağ ekstraktlarının, akuakültür sektöründe *Vibrio spp.* kaynaklı enfeksiyonlarla mücadelede umut verici doğal ajanlar olarak kullanılabilirliğini işaret etmektedir. Elde edilen sonuçlar, antimikrobiyal direnç sorununun çözümüne yönelik daha geniş çaplı çalışmaların önünü açmakta ve bitkisel tedavi yaklaşımlarının önemini pekiştirmektedir.

## SONUÇ

Bu çalışmada *Lamiaceae* üyesi bitki türlerinden adaçayı, kekik ve mercan köşk ekstraktlarının hem yağ hem de hidrosol formlarının *Vibrio spp.* izolatları üzerindeki antimikrobiyal etkisi karşılaştırılmalı bir şekilde araştırılmıştır. Çalışmamızda bu ekstraktların anti-biyofilm ve anti-quorum sensing aktivitelerine odaklanılmıştır. Sonuç olarak her üç bitkinin hidrosol formlarına karşı *Vibrio spp.*'nin direnç gösterdiği tespit edilmiştir. *Vibrio spp.*'ye karşı etkili formun İzmir kekigi ve mercan köşk yağ ekstraktı olduğu gösterilmiştir. İzmir kekiginin yağ formu çalışmadaki tüm *Vibrio* türleri üzerinde antimikrobiyal ve antibiyofilm etkisi gösterirken aynı zamanda AHL biyosensör suşu CV026'da quorum sensing mekanizmasını inhibe etmiştir. Buna ek

olarak mercanköşk bitki ekstraktı yağ formu da *Vibrio* spp. izolatlarına karşı yüksek bir antimikrobiyal etki göstermiş ve AHL biyosensör suşu CV026'da quorum sensing mekanizmasını inhibe etmiştir. Akuakültür çiftliklerinde sıklıkla toplu balık ölümleriyle ilişkilendirilen *Vibrio* spp. patojen suşlarıyla mücadelede doğal bir yaklaşım olarak bitki ekstraktları kullanılabilir. Bulgularımız bu yaklaşımın antimikrobiyal dirençli balık patojenleri ile mücadelede, bitkisel ekstraktların kemoterapötiklere alternatif bir tedavi yöntemi olarak kullanılmasını desteklemektedir.

### TEŞEKKÜR

Bu çalışma TÜBİTAK 2209-A Üniversite Öğrencileri Araştırma Projeleri Destekleme Programı 1919B012220228 numaralı proje kapsamında desteklenmiştir. Ayrıca çalışmaya katkılarından dolayı Balıkesir Çiftçi Eğitim Merkezi (BAÇEM)'e teşekkürlerimizi sunarız.

### KAYNAKLAR

1. Gurib-Fakim, A. 2006. Medicinal plants: traditions of yesterday and drugs of tomorrow. *Molecular Aspects of Medicine* 27(1):1-93.
2. Özbek, N. 1969. Deneme tekniği (1. sera denemesi, tekniği ve metotları). Ankara Üniversitesi Ziraat Fakültesi, Yayın No:406, Ankara, 346s.
3. Güner, K.G. 2015. Çeşitli aromatik bitkilerin, meyve kurutmada küf-maya gelişimi, fonksiyonel ve duyuşal özelliklere etkileri. Namık Kemal Üniversitesi (Doktora Tezi), Tekirdağ.
4. Hamed, A.N., Attia, E., Desoukey, S.Y. 2021. A review on various classes of secondary metabolites and biological activities of *Lamiaceae* (Labiatae) (2002-2018). *Journal of advanced Biomedical and Pharmaceutical Sciences* 4(1):16-31.
5. Misra, P., John, S.A., Marker, S., Agnihotry, S., Srivastav, A.K., Sagar, A., Shukla, P.K. 2024. Therapeutic applications and pharmacological practices of essential oils. *Aromatherapy: The Science of Essential Oils*, 207.
6. Riaz, U., Iqbal, S., Sohail, M.I., Samreen, T., Ashraf, M., Akmal, F., ... & Akhter, R.M. 2021. A comprehensive review on emerging importance and economical potential of medicinal and aromatic plants (MAPs) in current scenario.
7. Saad, N.Y., Muller, C.D., Lobstein, A. 2013. Major bioactivities and mechanism of action of essential oils and their components. *Flavour and Fragrance Journal* 28(5):269-279.
8. Moghaddam, M., Mehdizadeh, L. 2017. Chemistry of essential oils and factors influencing their constituents. In *Soft Chemistry and Food Fermentation*, pp:379-419, Academic Press.
9. Reddy, D.N. 2019. Essential oils extracted from medicinal plants and their applications. *Natural Bio-Active Compounds: Vol.1, Production and Applications*, 237-283.
10. Tadese, D.A., Song, C., Sun, C., Liu, B., Liu, B., Zhou, Q., ... & Kevin, N.T. 2022. The role of currently used medicinal plants in aquaculture and their action mechanisms: a review. *Reviews in Aquaculture* 14(2):816-847.
11. Pradeepkiran, J.A. 2019. Aquaculture role in global food security with nutritional value: a review. *Translational Animal Science* 3(2):903-910.
12. Mitra, A., Abdel-Gawad, F.K., Bassem, S., Barua, P., Assisi, L., Parisi, C., ... & Guerriero, G. 2023. Climate change and reproductive biocomplexity in fishes: innovative management approaches towards sustainability of fisheries and aquaculture. *Water* 15(4):725.
13. Dar, G.H., Bhat, R.A., Qadri, H., Al-Ghamdi, K.M., Hakeem, K.R. (Eds.). 2022. *Bacterial fish diseases*. Academic Press.
14. Ina-Salwany, M.Y., Al-saari, N., Mohamad, A., Mursidi, F.A., Mohd-Aris, A., Amal, M.N.A., ... & Zamri-Saad, M. 2019. Vibriosis in fish: a review on disease development and prevention. *Journal of Aquatic Animal Health* 31(1):3-22.
15. Varalakshmi, B., Shanmugapriya, A., Karpagam, T., Suganya, V., Firdous, J., Arumugam, V.A., ... & Saradhasri, V. 2022. Bacterial fish diseases and treatment. In *Aquaculture Science and Engineering*, pp:517-572. Singapore: Springer Nature Singapore.
16. Yasin, I.S.M., Mohamad, A., Azzam-Sayuti, M. 2023. Control of fish diseases using antibiotics and other antimicrobial agents. In *Recent Advances in Aquaculture Microbial Technology* pp:127-152, Academic Press.
17. Scarafile, G. 2016. Antibiotic resistance: current issues and future strategies. *Reviews in Health Care* 7(1):3-16.
18. Hossain, A., Habibullah-Al-Mamun, M., Nagano, I., Masunaga, S., Kitazawa, D., Matsuda, H. 2022. Antibiotics, antibiotic-resistant bacteria, and resistance genes in aquaculture: risks, current concern, and future thinking. *Environmental Science and Pollution Research*, 1-22.
19. Jindal, A.K., Pandya, K., Khan, I.D. 2015. Antimicrobial resistance: a public health challenge. *Medical Journal Armed Forces India*, 71(2):178-181.



20. Chrisolite, B., Thiagarajan, S., Alavandi, S.V., Abhilash, E.C., Kalaimani, N., Vijayan, K.K., Santiago, T.C. 2008. Distribution of luminescent *Vibrio harveyi* and their bacteriophages in a commercial shrimp hatchery in South India. *Aquaculture*, 275(1-4):13-19.
21. Moo, C.L., Yang, S.K., Yusoff, K., Ajat, M., Thomas, W., Abushelaibi, A., ... & Lai, K.S. 2020. Mechanisms of antimicrobial resistance (AMR) and alternative approaches to overcome AMR. *Current Drug Discovery Technologies* 17(4):430-447.
22. Borugă, O., Jianu, C., Mișcă, C., Goleț, I., Gruia, A.T., Horhat, F.G. 2014. *Thymus vulgaris* essential oil: chemical composition and antimicrobial activity. *Journal of Medicine and Life* 7(Spec Iss 3):56.
23. Yaşa, İ., Lkhagvajav, N., Koizhaiganova, M., Çelik, E., Sarı, Ö. 2012. Assessment of antimicrobial activity of nanosized Ag doped TiO<sub>2</sub> colloids. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 28, 2531-2539.
24. Bulut, G., Yaşa, İ., Eren Eroğlu, A.E. 2023. Selection and molecular response of AHL-lactonase (aiiA) producing *Bacillus* sp. under penicillin G-induced conditions. *The Protein Journal* 42(4):427-436.
25. Oramadike, C.E., Ogunbanwo, S.T. 2017. Antagonistic activity of *Thymus vulgaris* extracts against *Vibrio* species isolated from seafoods. *Journal of Food Science and Technology* 54(5):1199-1205.
26. Mancini, E., Senatore, F., Del Monte, D., De Martino, L., Grulova, D., Scognamiglio, M., ... & De Feo, V. 2015. Studies on chemical composition, antimicrobial and antioxidant activities of five *Thymus vulgaris* L. essential oils. *Molecules* 20(7):12016-12028.
27. Tohidpour, A., Sattari, M., Omidbaigi, R., Yadegar, A., Nazemi, J. 2010. Antibacterial effect of essential oils from two medicinal plants against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA). *Phytomedicine* 17(2):142-145.
28. Yılmaz, Y.B., Tunaz, H. 2013. Bazı bitki uçucu yağlarının ve monoterpenoid bileşenlerinin Amerikan hamamböceği, *Periplaneta americana* (Dictyoptera: Blattidae): erginlerine karşı fumigant toksisitesi. *Turkish Journal of Entomology* 37(3):319-328.
29. Miladinović, D., Miladinović, L.J. 2000. Antimicrobial activity of essential oil of sage from Serbia. *Facta Universitatis-Series: Physics, Chemistry and Technology* 2(2):97-100.
30. Kowero, E.E., Leweri, C., Chacha, M. 2016. Evaluation of antibacterial activity of five selected medicinal plants in Tanzania against Gram negative bacteria. *Eur. J. Med. Plant* 12(2):1-7.
31. Galvao, R.F.F., Costa, J.G.M., Rodrigues, F.F.G., Campos, A.R. 2013. Study of the interference between *Plectranthus* species essential oils from Brazil and aminoglycosides. *Evid-Based Compl. Alt.*, pp:1-7.