

ARAŞTIRMA MAKALESİ / RESEARCH ARTICLE

Gökalp İŞCAN^{1,2}, Yavuz Bülent KÖSE³, Betül DEMİRCİ¹

STACHYS RUPESTRIS (LAMIACEAE)'İN UÇUCU YAĞ BİLEŞİMİ VE ANTİMİKROBİYAL ETKİLERİ

ÖZ

Stachys cinsi (Lamiaceae) dünya üzerinde tanımlanmış yaklaşık 300 türle geniş bir yayılış gösterirken, bu cins ülkemizde %48 endemizm oranıyla 91 tür ve 116 taksa ile temsil edilmektedir. Anadolu'da "Deli adaçayı" veya "Dağ çayı" isimleriyle bilinen *Stachys* türleri sahip olduğu antibakteriyel, antienflamatuvar, antipiretik, antioksidan ve sitotoksik etkilerinden dolayı, halk arasında cilt hastalıkları, ülser, kanser, solunum rahatsızlıkları ve böbrek hastalıklarında kullanılmaktadır. Yapılan çalışmalarda sekonder metabolitlerinin genellikle iridoit ve flavon glikozitleri ile diterpenler ve uçucu yağlar olduğu ortaya konmuştur.

Çalışmamızda Mersin ve civarı için endemik olan *Stachys rupestris* Montbret et Aucher ex Benth.'in çiçekli toprak üstü kısımlarından hidrodistilasyon ile elde edilen uçucu yağın kompozisyonu gaz kromatografisi/alev iyonlaşma dedektörü ve gaz kromatografisi/kütle spektrometresi ile ortaya konmuştur. Ana bileşenler α -pinen (%14.4), tetradekanoik asit (%10.3) ve β -karyofillen (%5.3) olarak saptanmıştır.

Uçucu yağın patojen bakteri ve maya türlerine karşı antimikrobiyal özellikleri "Klinik ve Laboratuvar Standartları Enstitüsü" nün yayımladığı CLSI M27-A2 ve M7-A7 protokolleri uyarınca mikrodilüsyon duyarlılık testleri ile ortaya konmuştur. Yağın bakterilere kıyasla test edilen *Candida* türlerine karşı daha etkili olduğu görülmüş, *Candida parapsilosis*, *C. zeylanoides* ve *C. krusei*'yi 31.25 μ g/mL, *C. zeylanoides*'i ise 15.0 μ g/mL konsantrasyonda (MİK) inhibe ettiği belirlenmiştir.

Anahtar Kelimeler: Lamiaceae, *Stachys*, Uçucu yağ, Gaz kromatografisi, Antimikrobiyal, MİK

CHEMICAL COMPOSITION AND ANTIMICROBIAL EFFECTS OF STACHYS RUPESTRIS ESSENTIAL OIL

ABSTRACT

The genus *Stachys* (Lamiaceae) consists of over 300 species all around the world, while in our country 91 species and 116 taxa are represented with 48% endemism rate. *Stachys* species are known as "Deli adaçayı" or "Dağ çayı" in Anatolia and they are widely used in folk medicine against skin infections, peptic ulcers, respiration and kidney disorders for their antibacterial, anti-inflammatory, antipyretic, antioxidant and cytotoxic properties. Several studies have been reported that common secondary metabolites of the *Stachys* L. are iridoids, flavonoids, diterpenes and essential oils.

In the present study, the hydrodistilled essential oil composition of the flowering aerial parts of the *Stachys rupestris* Montbret et Aucher ex Benth, an endemic species for Mersin province, were determined by using gas chromatography/flame ionisation detector and gas chromatography/mass spectrometer systems. α -pinene (14.4%), tetradecanoic acid (10.3%) ve β -caryophyllene (5.3%) were determined as main compounds of the oil.

¹ Anadolu Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi, Farmakognozi Anabilim Dalı, Eskişehir.

² Anadolu Üniversitesi, Yunus Emre Meslek Yüksekokulu, Eskişehir.

³ Anadolu Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi, Farmasötik Botanik Anabilim Dalı, Eskişehir.

E-mail: giscan@anadolu.edu.tr

Geliş: 24 Aralık 2015 **Kabul:** 30 Aralık 2015

The antimicrobial effects of the essential oil against pathogenic bacteria and yeasts were evaluated by using microdilution susceptibility tests as recommended to Clinical and Laboratory Standards Institute M27-A2 and M7-A7 protocols. The essential oil showed strong inhibitory effects against the tested *Candida* species compared to bacteria. *Candida parapsilosis*, *C. zeylanoides* and *C. krusei* were inhibited at the concentration of 31.25 µg/mL, while the *C. zeylanoides* was inhibited by the oil having a MIC value of 15.00 µg/mL.

Keywords: Lamiaceae, *Stachys*, Essential oil, Gas chromatography, Antimicrobial, MIC

1. GİRİŞ

Labiatae (Lamiaceae) başta Akdeniz Bölgesi olmak üzere tropik ve subtropik alanlarda geniş yayılış gösteren genellikle yüksek miktarda ve farklı bileşimlerde uçucu yağa sahip aromatik bitkilerin yer aldığı kozmopolit bir familyadır. *Stachys* L. tek yıllık veya çok yıllık otsu ve küçük çalı formunda dünya üzerinde 300'e yakın tür sayısı ile temsil edilen bir cinstir (Radulovic ve ark., 2007; Şerbetçi ve ark., 2010; Piozzi ve ark., 2011; Uğur ve ark., 2013; DüNDAR ve ark., 2013). Ülkemizde *Stachys* cinsine ait 91 tür (116 taksa) bulunmaktadır. Morfolojik olarak 15 seksiyona ve 2 alt cinse ayrılan cinste 55 endemik taksa (%48) bulunmaktadır (Davis, 1988; Baştürk ve ark., 2015). Halk arasında deri enfeksiyonlarında, solunum problemlerinde, böbrek rahatsızlıkları, tümörler ve ülserlere karşı kullanılmaktadır. Bitki üzerinde yapılan çalışmalar, bu cinse ait türlerin antitoksik, antibakteriyel, antioksidan, antipiretik ve özellikle uçucu yağlarının bazı kanser hücre serilerine karşı inhibitör etkileri olduğunu göstermiştir (Baytop, 1999; Şerbetçi ve ark., 2010; Erdoğan ve ark., 2013).

Yapılan çalışmalarda *Stachys* türlerinin sahip olduğu sekonder metabolitlerin genellikle iridoit, flavonoid ve fenil etanoit glikozitleri ile fenolik asitler, yağ asitleri, uçucu yağlar ve diterpenler olduğu gösterilmiştir. Uçucu yağlar üzerinde yapılan çalışmalarda α- ve β-pinen, mirsen, limonen, germakren D, bisiklogermakren, γ-kadinen, pulegon, karyofilen, zingiberen ve spatulenol gibi terpenler başta olmak üzere genellikle seskiterpenlerin ve oksijenli türevlerinin yaygın olduğu görülmektedir (Radulovic ve ark., 2007; Erdoğan ve ark., 2013; Tundis ve ark., 2014).

Yapılan bir derlemede çoğu *Stachys* türünde ortak olarak abietatrien, dehidroabietal, betolit, kaur-16-en, epoksisiderol, eubol, eubotriol, foliol, izofolol, izolinearol, linearol, lökantol sideridiol, siderol, sidol ve stakilon gibi 100'ün

üzerinde farklı diterpen olduğu rapor edilmiştir (Tundis ve ark., 2014).

Stachys rupestris Montbret et Aucher ex Benth. Mersin yöresi için endemik bir türdür. *S. rupestris*'in uçucu yağı ve biyolojik etkisi ile ilgili araştırma sayısının yapılan literatür taraması ile son derece az olduğu görülmüştür (Cellat, 2011; Uğur ve ark., 2013; Erdoğan ve ark., 2013).

Çalışmamızda Mayıs 2014 tarihinde Mersin'den toplanan bitki örneklerinden hidrodistilasyon ile elde edilen uçucu yağ, gaz kromatografisi/alev iyonlaşma dedektörü ve gaz kromatografisi/kütle spektrometresi kullanılarak uçucu bileşenleri belirlenmiş, yağın çeşitli patojen bakteri ve *Candida* türlerine karşı olan minimum inhibitör konsantrasyonları (MİK) CLSI protokollerine göre mikrodilüsyon yöntemleri kullanılarak ilk kez bu çalışma ile ortaya konmuştur.

2. MATERYAL ve YÖNTEM

2.1. Bitkisel Materyal ve Uçucu Yağ İzolasyonu

Stachys rupestris (ESSE: 15005), İçel, Namrun kalesi civarında, kayalık alanlardan toplanmıştır (17 v 2014). Bitkisel materyal gölgede kurutulduktan sonra Avrupa Farmakopesi'ne (2004) göre Clevenger aparatında 3 saat boyunca su distilasyonuna tabi tutulmuştur. %0.1 verimle (kuru drog üzerinden hesaplanmış) elde edilen uçucu yağ susuz sodyum sülfattan geçirilerek, analiz edilmek üzere koyu renkli cam şişede +4°C'de saklanmıştır. Uçucu yağın ana bileşeni α-pinen (Aldrich) antimikrobiyal etki testinde kullanılmak üzere ticari kaynaklardan temin edilmiştir

2.2. Uçucu Yağ Kompozisyonunun Belirlenmesi

Bu amaçla Gaz Kromatografisine entegre alev iyonlaşma dedektörü ile gaz kromatografisi/kütle spektrometresi (Agilent 5975 GC-MSD) kullanılmıştır. Maddelerin ayrımı 60 m uzunluğunda, 0.25 mm iç çapa sahip, 0.25 µm film kalınlığı olan HP-Innowax Silika kapiler kolonda yapılmıştır. Split oranı 40:1 olarak ayarlanmıştır. Analizde 60°C de 10 dak // 4°C/dak artışla 220°C ye // 220°C de 10 dak // 1°C/dak artışla 240°C'de sonlanan sıcaklık programı uygulanmıştır. Taşıyıcı gaz olarak 0.8 ml/dak akış hızıyla helyum kullanılmış, enjektör sıcaklığı 250°C'de tutulmuştur. Kolondan çıkan maddeler 35-450 (m/z) kütle aralığında taranmıştır (70eV). Gaz kromatografisi analizinde eşdeğer kolon kullanılmış ve analiz şartları gaz kromatografisi/kütle spektrofotometresi sistemindeki madde tutunma zamanları ile aynı olacak şekilde ayarlanmıştır. Kütle spektrometresi yerine alev iyonlaşma dedektörü (300°C) ile uçucu yağ bileşenlerinin rölatif yüzdeleri belirlenmiştir. Bileşenlerin tanımlanması "Başer Uçucu Yağ Bileşenleri Kütüphanesi"nin yanı sıra "Wiley GC/MS", "Adams" ve "MassFinder 3" kütüphane tarama yazılımları kullanılarak yapılmıştır (Mc Laffery ve ark., 1989; Adams, 2001; Koenig ve ark., 2014).

2.3. Antimikrobiyal Etkinin Belirlenmesi

Escherichia coli ATCC-8739, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 10145, *Salmonella typhimurium* ATCC 14028, *Serratia marcescens* NRRL B-2544, *Staphylococcus aureus* ATCC 43300, *Staphylococcus epidermidis* ATCC 14990, *Listeria monocytogenes* ATCC 19111, *Candida albicans* ATCC 10231 *C. utilis* NRRL Y-900, *C. krusei* NRRL ATCC6258, *C. glabrata* ATCC 66032, *C. tropicalis* ATCC 750, *C. zeylanoides* NRRL Y-1774 ve *C. parapsilosis* ATCC22019 suşları patojen test mikroorganizmaları olarak kullanılmıştır.

Uçucu yağ ve yağın ana maddesi olan α-pinen'in antimikrobiyal özellikleri "Klinik Laboratuvar Standartları Enstitüsü"nin yayınladığı CLSI (eski adıyla NCCLS) M7-A7 ve M27-A2 protokolleri kullanılarak belirlenmiştir. M7-A7 protokolü aerobik olarak gelişen bakterilerin duyarlılıklarını standart

antimikrobiyaller şahitliğinde ölçerken, M27-A2 metodu ise patojen mayalara karşı test örneklerinin antifungal etkilerini ortaya koymaktadır (CLSI, 2002; 2006). Bu amaçla -85°C'de gliserin içinde stoklanmış mikroorganizma kültürleri saflık ve gelişim kontrolü için Mueller Hinton Agar plaklarında 1 gece önceden 37°C'de (*C. zeylanoides* için 28°C) kültüre alınmıştır. İnkübasyonun ardından 3-4 adet koloni %0.85'lik steril NaCl solüsyonunda çözülerek McFarland No: 0.5'e göre bulanıklık ölçer (Biosan) yardımıyla uygun konsantrasyona getirilmiştir. Deneyde bakteriler için Mueller Hinton Broth, *Candida* türleri için filtrasyon ile sterilize edilmiş RPMI 1640 besiyerleri (fenol kırmızısı ve glutamin içeren, bikarbonatsız) kullanılmıştır. Uçucu yağın ana stoğu DMSO'da hazırlanmak üzere, içinde son konsantrasyonu 2 mg/mL ile 0.001 mg/mL aralığında olacak şekilde elde edilen seri dilüsyonları (α-Pinen için 16 mg/ml - 0.03 mg/ml) mikroorganizmalar ile aseptik şartlarda 96 kuyucuklu mikrotitrasyon petrilerinde etkileştirilmiştir. 37°C'de 24 saat (*C. zeylanoides* için 28°C) inkübasyon süresi sonunda üremenin olmadığı (bulanıklığın gözlenmediği) en düşük konsantrasyon "Minimum İnhibitor Konsantrasyonu" (MIK) olarak belirlenmiştir. Standart antimikrobiyal ajanlar olan Amfoterisin B, Ketokonazol, Kloramfenikol ve Ampisilin deney setinde aynı anda çalışılarak pozitif kontrol olarak kullanılmıştır. 96 well petride son sütun mikroorganizma gelişimi için, yanındaki bir sütun ise sadece besi ortamını içermek kaydı ile sterilite kontrolü olarak kullanılmıştır. Tüm testler çift paralel olarak tekrarlanmıştır.

3. BULGULAR

S. rupestris'in çiçekli toprak üstü kısımlarının hidrodistilasyonu ile %0.1 oranda kuru drog verimi ile elde edilen uçucu yağ, gaz kromatografisi/kütle spektrofotometresi ile eş zamanlı olarak gaz kromatografisi/alev iyonlaşma dedektörü sistemleri ile analiz edilmiştir. Yapılan analiz sonucunda tanımlanabilen ana maddelerin α-pinen (%14.4), tetradekanoik asit (%10.3) ve β-karyofillen (%5.3) olduğu belirlenmiştir (Tablo 1). %1'in üzerindeki maddeler dikkate alındığında oksijenli ve oksijensiz seskiterpenlerin de yağda önemli miktarda oldukları görülmüştür.

Tablo 1. *Stachys rupestris* uçucu yağının kimyasal bileşimi

KI	Bileşik	%
1032	α -Pinen	14.4
1118	β -Pinen	1.7
1203	Limonen	0.8
1218	β -Fellandren	1.5
1280	<i>p</i> -Simen	0.2
1452	1-Okten-3-ol	0.4
1497	α -Kopaen	2.1
1612	β -Karyofillen	5.3
1687	α -Humulen	1.4
1688	Selina-4,11-dien	0.8
1704	γ -Kurkumen	0.5
1726	α -Zingiberen	0.4
1740	Valensen	0.3
1745	Selina-4(15),7(11)-dien	0.5
1755	Bisiklogermakren	3.7
1773	δ -Kadinen	2.5
1785	7- <i>epi</i> - α -Selinen	2.6
1786	<i>ar</i> -Kurkumen	2.7
1798	Metil salisilat	0.2
1900	<i>epi</i> -Kubebol	0.4
2001	İsokaryofillen oksit	0.2
2008	Karyofillen oksit	2.6
2069	Germakren D-4-ol	1.0
2144	Spatulenol	1.7
2161	Murola-4,10(14)-dien-1-ol	0.2
2210	Kopaborneol	0.8
2209	<i>T</i> -Murolol	0.7
2214	<i>ar</i> -Turmerol	0.2
2255	α -Kadinol	0.5
2316	Karyofilladienol I	0.4
2438	Kaur-16-en	1.4
2607	1-Oktadekanol	0.4
2670	Tetradekanoik asit	10.3
2931	Hekzadekanoik asit	0.7
Toplam		63.5

KI: Polar kolon için Kovats indisi; % : Alev İyonlaşma Dedektörü değerleridir.

Yapılan *in vitro* antibakteriyal ve antikandidal aktivite testlerinin sonucunda mono ve seskiterpenlerce zengin uçucu yağın *S. typhimurium*, *E. coli* ve *L. monocytogenes* türlerine karşı 500 $\mu\text{g/mL}$ konsantrasyonda etkili olduğu, diğer türlere karşı ise denenen en yüksek dozda da (2000 $\mu\text{g/mL}$) etki göstermediği saptanmıştır. Aynı şekilde *C. albicans* ve *C. utilis*'e karşı uygulanan en yüksek dozda etki gözlenmemiştir. Uçucu yağ *C. zeylanoides*'i 15 $\mu\text{g/mL}$ gibi düşük bir dozda inhibe ederken, *C. tropicalis*, *C. parapsilosis* ve *C. krusei*'nin üremelerini 31.25 $\mu\text{g/mL}$ konsantrasyonda inhibe etmiştir (Tablo 2). Uçucu yağın ana bileşeni olan α -pinen teste dâhil edilmiş, uçucu yağın gösterdiği aktiviteye paralel olarak *Candida* türlerine karşı daha düşük dozlarda etkili olmuştur.

Tablo 2. *Stachys rupestris* uçucu yağının antimikrobiyal etkisi (MİK, µg/mL)

Mikroorganizma	Kaynak	Sr	α -pinen	ST1	ST2	ST3	ST4
<i>C. albicans</i>	ATCC 10231	>2000	500	0.5	0.5	-	-
<i>C. utilis</i>	NRRL Y-900	>2000	500	0.5	0.125	-	-
<i>C. zeylanoides</i>	NRRL Y-1774	15.00	500	1	1	-	-
<i>C. glabrata</i>	ATCC 66032	125	250	0.5	0.5	-	-
<i>C. tropicalis</i>	ATCC 750	31.25	125	1	0.5	-	-
<i>C. parapsilosis</i>	ATCC 22019	31.25	500	0.5	2	-	-
<i>C. krusei</i>	ATCC 6258	31.25	250	0.25	2	-	-
<i>S. marcescens</i>	NRRL B-2544	>2000	8000	-	-	32	16
<i>P. aeruginosa</i>	ATCC 10145	>2000	8000	-	-	32	8
<i>S. typhimurium</i>	ATCC 14028	500	4000	-	-	0.5	8
<i>S. aureus</i>	ATCC 43300	>2000	8000	-	-	1	16
<i>E. coli</i>	ATCC 8739	500	4000	-	-	1	2
<i>L. monocytogenes</i>	ATCC 19111	500	4000	-	-	1	8
<i>S. epidermidis</i>	ATCC 14990	>2000	8000	-	-	1	1

4. TARTIŞMA ve SONUÇ

Uçucu yağın gaz kromatografisi/kütle spektrometresi analizi ile ana bileşenler α -pinen (%14.4), tetradekanoik asit (%10.3) ve β -karyofillen (%5.3) olarak belirlenmiştir. Uçucu yağda tanımlanabilen 34 uçucu bileşen incelendiğinde %18.6'lık kısmının monoterpenlerden, %22.8'inin oksijensiz seskiterpenlerden, %8.7'lik kısmının ise oksijenli seskiterpenlerden oluştuğu görülmektedir. Bir yağ asidi bileşiği olan tetradekanoik asit %10'luk oranla ikinci ana bileşendir. *Salvia rupestris* uçucu yağı ile yapılan bir çalışmada bulduğumuz sonuçlara paralel olarak, ana bileşenin %22.7 oranla α -pinen olduğu rapor edilmiştir (Cellat, 2011). Bir diğer çalışmada oksijenli seskiterpenlerin ve diterpenlerin ana bileşenler olduğu rapor edilmiştir (Erdoğan ve ark., 2013).

Çalışmamızda *S. rupestris* yağının patojen bakteri ve maya türlerine karşı etkileri uluslararası geçerliliği olan valide edilmiş protokollere göre (CLSI M7-A7, M27-A2) gerçekleştirilmiştir. Patojen mayalar olarak ATCC kaynaklı *Candida* türleri seçilmiştir. Günümüzde özellikle kanser ve AIDS hastaları başta olmak üzere düşük immün dirence sahip kişilerde hızla gelişen ve bazen de ölümcül enfeksiyonlara sebebiyet veren *Candida* türlerine karşı yeni antifungal ajan arayışları büyük bir hızla sürmektedir. Bu hastalar uzun

süren tedavi süreçlerinde antifungal ilaçlarla tedavi edilmeye çalışılsa da *Candida* enfeksiyonları tam olarak eradike edilememekte, bunun yanı sıra sıklıkla kullanılan Flukonazol gibi sistemik antifungallere karşı direnç geliştirmektedir (Moran ve ark., 1997). Çalışmamızda *S. rupestris* uçucu yağının bakterilere oranla patojen *Candida* türleri üzerinde etkili olduğu görülmüştür. Özellikle *C. zeylanoides*, *C. tropicalis*, *C. krusei* ve *C. parapsilosis* üzerinde 15 µg/mL ile 31.25 µg/mL dozlarda inhibitör etkiler göstermiştir. Uçucu yağın ana bileşeni oksijensiz bir monoterpen olan α -pinen'in antimikrobiyal etkileri de uçucu yağ gibi genellikle *Candida* türleri üzerinde olmuştur (MİK; 125 µg/mL-500 µg/mL). Uçucu yağın etkisinin, α -pinen'den yüksek çıkması uçucu yağlarda sıklıkla görülen sinerjik etkiden dolayı olması muhtemeldir (Bassoli ve Juliani, 2012).

Stachys rupestris uçucu yağının antimikrobiyal etkilerinin yer aldığı tek çalışmada, yağın bazı Gram (+) ve (-) bakteriler ile *Candida albicans*'a karşı olan inhibitör etkileri disk difüzyon yöntemi ile taranmıştır (Uğur ve ark., 2013). Bu çalışma sonuçlarının bizim bulgularımızla karşılaştırma olanağı olmasa da yağın genellikle Gram (+) bakterilere karşı etkili olduğu, *Candida albicans*'a karşı ise uygulanan dozda etki göstermediği belirtilmiştir.

KAYNAKLAR

- Adams, R.P. (2001). Identification of Essential Oil Components by Gas Chromatography/Quadrupole Mass Spectroscopy, Allured Publishing, 362 South Schmale Road, Carol Stream, IL 60188-2787, USA.
- Avrupa Farmakopesi Adaptasyonu, Türk Farmakopesi-1 (2004), Distilasyonla Su Tayini, T.C. Sağlık Bakanlığı, İlaç ve Eczacılık Genel Müdürlüğü Yayını, 29-30.
- Bassole, I.H.N., Juliani, H.R. (2012). Essential Oils in Combination and their Antimicrobial Properties, *Molecules*, 17, 3989-4006.
- Baştürk, K., Dinç, M., Doğu, S. (2015). Anatomical characteristics of Turkish endemic *Stachys rupestris* Montbret et Aucher ex Bentham (Lamiaceae). *Modern Phytomorphology*, 8, 37-40.
- Baytop, T. (1999). *Türkiye’de Bitkiler ile Tedavi Geçmişten Bugüne* (Therapy with Medicinal Plants in Turkey-Past and Present). 2nd Ed, Nobel Tıp Basımevi, Istanbul, Turkey.
- Cellat, K., Gül, Ş., Everest, A. (2011). Mersin’deki *Stachys rupestris* Montbret et Aucher ex Bentham Türünün Eterik Yağ İçeriğinin Araştırılması. Lokman Hekim Journal, 7. Lokman Hekim Günleri. Poster Bildiri, 11-14 Mayıs 2011.
- CLSI (NCCLS) M27-A2. (2002). *Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Yeasts; Approved Standard*, Second Edition.
- CLSI (NCCLS) M7-A7. (2006). *Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically; Approved Standard*, Seventh Edition.
- Davis P.H., Edmondson J.R., Mill R.R., Tan K. (1988). *Flora of Turkey and East Aegean Islands*. Vol. 7. Edinburg: Edinburg University Press.
- Dündar, E., Akçiçek, E., Dirmenci, T., Akgün, Ş. (2013). Phylogenetic Analysis of the Genus *Stachys* Sect. *Eriostomum* (Lamiaceae) in Turkey based on Nuclear Ribosomal ITS Sequences. *Turk J Bot*, 37, 14-23.
- Erdogan, E. A., Everest, A., De Martino, L., Mancini, E., Festa, M., De Feo, V. (2013). Chemical Composition and *In vitro* Cytotoxic Activity of the Essential Oils of *Stachys rupestris* and *Salvia heldreichiana*, Two Endemic Plants of Turkey, *Natural Product Communications* 8 (11), 1637-1640.
- Koenig, W.A. Joulain, D. Hochmuth, D.H. (2004). *Terpenoids and Related Constituents of Essential Oils*. MassFinder 3, Hamburg, Germany.
- McLafferty, F.W. Stauffer, D.B. (1989). *The Wiley/NBS Registry of Mass Spectral Data*, J. Wiley and Sons, New York.
- Moran, G.P. Sullivan, D.J. Henman, M.C. McCreary, C.E. Harrington, B.J. Shanley, D.B. Coleman, D.C. (1997). Antifungal Drug Susceptibilities of oral *Candida dubliniensis* Isolates from Human Immunodeficiency Virus (HIV)-Infected and Non-Hiv-Infected Subjects and Generation of Stable Fluconazole-Resistant Derivatives *in vitro*. *Antimicrob. Agents Ch.*, 41, 617.
- Piozzi, F., Bruno, M. (2011). Diterpenoids from Roots and Aerial Parts of the Genus *Stachys*, *Rec. Nat. Prod.*, 5(1), 1-11.
- Radulovic, N., Lazarevic, J., Ristic, N., Palic, R. (2007). Chemotaxonomic significance of the volatiles in the genus *Stachys* (Lamiaceae): Essential oil Composition of Four Balkan *Stachys* Species. *Biochemical Systematics and Ecology* 35, 196-208.
- Şerbetçi, T., Demirci, B., Güzel, Ç.B., Kültür, Ş., Ergüven, M., Başer, K.H.C. (2010). Essential Oil Composition, Antimicrobial and Cytotoxic Activities of Two Endemic *Stachys cretica* Subspecies (Lamiaceae) from Turkey, *Natural Product Communications*, 5(9), 1369-1374.

- Tundis, R., Peruzzi, L., Menichini, F. (2014).
Phytochemical and Biological Studies of
Stachys Species in Relation to
Chemotaxonomy: A Review.
Phytochemistry 102, 7-39.
- Ugur, A., Sarac, N., Varol, O. (2013).
Antimicrobial Activities of the Essential
Oils of Endemic *Stachys rupestris* and
Stachys amanica Against Multi-Resistant
Bacteria, *Indian Journal of Pharmacology*
45(2), 201-202.