



Eurasian Journal of Biological and Chemical Sciences

Journal homepage: www.dergipark.gov.tr/ejbc



Determination of total phenolic compounds and flavanoids in callus cultures of lemon grass (*Melissa Officinalis* L.) stimulated with different plant growth regulators

Aykut TOPDEMİR^{1*}, Nazmi GÜR¹, Zümre DEMİR¹

¹Fırat Üniversitesi, Mühendislik Fakültesi, Biyomühendislik Bölümü, Elazığ, Türkiye

*Corresponding author : atopdemir@gmail.com
Orcid No: 0000-0002-9112-4767

Abstract: Lemon grass (*Melissa officinalis* L.) is a species used as a medicinal and aromatic plant, marketed on the domestic market and also exported. Lemon grass has many uses in the pharmaceutical, perfumery, cosmetics and food industries. The prominence of *M. officinalis* is due to the essential oils found in citronelal and citral. In addition to these two components, compounds such as linalool, geraniol, α -pinene and terpinene are contained at a lower rate. Callus cultures and cell suspension cultures are in vitro propagation pathways for medical and aromatic plants. It is possible to obtain metabolites of plant secondary in the same quality and in high quantity. In this study, total phenolic substances and flavanoid amounts of calli produced in vitro were determined. *M. officinalis* nodes were used as explant source. Nodules were promoted with different plant growth regulator combinations for callus formation in Murashige Skoog medium. The highest phenolic substance content was determined from 1523 mg / g to 1.5 mg / L 2,4-D + 0.5 mg / L BAP-induced callus. 1.356 mg / g and the lowest phenolic substance was found in cultured calli containing 2 mg / L 2,4-D + 0.5 mg / L BAP. In the culture medium with the highest amount of flavanoid (4.392 mg / g), there is a plant growth regulator of 2 mg / L 2,4-D + 1 mg / L PIC + 0.5 mg / L KIN..

Keywords: *Melissa officinalis* L., phenolic compound, flavanoid, antioxidant, callus.

Farklı bitki büyüme düzenleyicilerle stimule edilen limon otu (*Melissa officinalis* L.) kallus kültürlerindeki toplam fenolik bileşikler ve flavanoidlerin belirlenmesi

Özet: Limon otu (*Melissa officinalis* L.), tıbbi ve aromatik bir bitki olarak kullanılan türlerden olup, iç piyasada pazarlanmakta ve ihracatı yapılmaktadır. Limon otu eczacılık, parfümeri, kozmetik ve gıda sanayinde çok sayıda kullanım alanına sahiptir. *M. officinalis*'in önemi içerisinde bulunan uçucu yağlar olan citronelal ve citral'den kaynaklanmaktadır. Bu iki bileşenin yanında daha düşük oranlarda linalool, geraniol, α -pinen, terpinen gibi bileşikler içermektedir. Kallus kültürleri ve hücre süspansiyon kültürleri tıbbi ve aromatik bitkilerin in vitro çoğaltım yollarıdır. Bu sayede aynı kalitede ve yüksek miktarda bitki sekonder metabolitlerini elde etmek mümkündür. Bu çalışmada in vitro olarak üretilen kallusların toplam fenolik madde ve flavanoid miktarları belirlenmiştir. Eksplant kaynağı olarak *M. Officinalis* nodları kullanılmıştır. Nodlar Murashige Skoog besiyerinde kallus oluşumu için farklı bitki büyüme düzenleyici kombinasyonları ile teşvik edilmiştir. En yüksek fenolik madde miktarı 1523 mg/g ile 1.5 mg/L 2,4-D + 0.5 mg/L BAP ile teşvik edilen kallusta tespit edilmiştir. 1.356 mg/g ile en düşük fenolik madde ise 2 mg/L 2,4-D + 0.5 mg/L BAP içeren kültür ortamındaki kalluslarda görülmüştür. Flavanoid miktarının en yüksek olduğu (4.392 mg/g) kallusun bulunduğu kültür ortamında ise bitki büyüme düzenleyicisi olarak 2 mg/L 2,4-D + 1 mg/L PIC + 0.5 mg/L KIN bulunmaktadır.

Anahtar Kelimeler: *Melissa officinalis* L., fenolik bileşik, flavanoid, antioksidan, kallus.

© EJBCS. All rights reserved.

1.Giriş

Tıbbi ve aromatik bitkilerin insan sağlığı üzerinde çok önemli etkileri olduğu bilinmektedir. Bu bitkiler ilk çağlardan beri şifa kaynağı olarak kullanılmaktadır. Türkiye'de bulunan 9000 civarındaki bitki türünün bunların yaklaşık bin kadarı tıbbi ve aromatik bitki olarak kabul edilmektedir (Arslan ve ark., 2002). Bu tıbbi aromatik bitkilerden biri de *Melissa officinalis*'tir. İnsanlar tarafından

uzun yıllardır tedavi amacıyla kullanılan bu bitki üzerinde yapılan in vitro, in vivo ve klinik çalışmalar, *M. officinalis* bitkisinin terapötik etkisinin esas olarak salgı tüylerindeki uçucu yağdan kaynaklandığını ve bu uçucu yağın çeşitli biyolojik aktivitelere sahip olduğunu göstermiştir.

M. officinalis bitkisinin uçucu yağının antiviral, antibakteriyel ve antispazmodik bir etkiye sahip olduğu gösterilmiştir (Farahani ve ark., 2009). Bitkinin uçucu yağı

iyi bilinen bir antimikrobiyal maddedir ve hafif antidepresif ve antispazmolitik özellikleri de bildirilmiştir (Basta vd., 2005; Hussain ve ark., 2011; Vitullo ve ark., 2011;). Ayrıca *Melissa officinalis*'in antioksidatif (Spiridon ve ark., 2011), antiinflamatuvar, ağrı dindirici (Birdane ve ark., 2007), antidiyabetik (Chung ve ark., 2010) ve gastrointestinal hastalıklardaki tedavi edici etkileri de (Beloued, 2009) yapılan araştırmalarla gösterilmiştir.

M. officinalis üzerindeki fitokimyasal araştırmalarla, terpenler (monoterpenler, seskiterpenler ve triterpenler) ve fenolik bileşikler (fenolik asitler, flavonoidler ve tanenler) de dahil olmak üzere çeşitli fitokimyasal maddelerin varlığını ve miktarları belirlenmiştir (Allahverdiyev ve ark., 2004; Moradkhani ve ark., 2010). *M.officinalis*'in ana aktif bileşenleri uçucu bileşikler (örneğin geranial, neral, sitronelal ve geraniol), triterpenler (örneğin ursolik asit ve oleanolik asit) ve fenoliklerdir (örneğin cis ve trans-RA izomerleri, kafeik asit türevleri, luteolin, naringin ve hesperidin) (Argyropoulos ve Müller, 2014; Awad ve ark., 2009). Bu bitkideki uçucu yağ oranı, %0.02 - %0.30 arasında değişmekte olup bu oran Lamiaceae ailesinin diğer üyeleriyle karşılaştırıldığında oldukça düşüktür. Bu sebeple, uçucu yağın üretim maliyeti ve fiyatı piyasada çok yüksektir. Uçucu yağın temel bileşenleri, yağ içeriğinin yaklaşık %96'sını sitral (geranial ve neral), sitronelal, linalool, geraniol, β -pinen, α -pinen, β -karyofilen ve β -karyofilen oksit oluşturmaktadır (Sarı ve Ceylan, 2002; Sağlam ve ark., 2004).

Çalışmamızın amacı, *M. officinalis* bitkisi nodlarını farklı bitki büyüme düzenleyicileriyle (BBD) uyararak, geliştirilen kallusların toplam fenolik ve toplam flavonoid kapasitesini belirlemektir.

2. Materyal ve Metot

Araştırmamızda, *M. officinalis* bitkisinin saksıda yetiştirilen fideleri kullanılmıştır. Fidelerin kurumaması için kültüre alınacakları gün yıpratılmadan toplanmıştır. Çalışmada kullanılan *M. officinalis* fideleri musluk suyuyla yıkandıktan sonra, eksplant kaynağı olarak kullanılacak olan nod kısımları bisturiyle alınmış ve %70 lik etil alkolde yavaşça karıştırılarak 30 saniye süreyle yüzey sterilizasyonu işlemine tabi tutulmuştur. Etil alkolenden çıkarılan eksplantlar 3 defa steril saf suda yıkandıktan sonra 5 dakika da %50 lik ticari sodyum hipokloritte (NaOHCl) bekletilmiştir. Sodyum hipoklorit olarak ticari çamaşır suyu (Ace) kullanılmıştır. Eksplantların yüzey sterilizasyonu bittikten sonra çamaşır suyunun uzaklaştırılması için 3 kez steril saf sudan geçirilmiştir.

2.1. Kallus Oluşumu

Çalışmada bitki doku kültüründe en yaygın olarak kullanılan MS ortamı kullanılmıştır (Murashige ve Skoog, 1962). Besiyerleri hazırlanmasında 4.4 g/L MS, 30 g/L sakkaroz olacak şekilde tartılıp, çalkalayıcı yardımıyla çözünmesi sağlanmıştır. Çözünen besiyerleri pH değeri 5.7-5.8 şeklinde ayarlanmış ve katılaşması için 8 g/L plant agar eklenmiştir. Tablo 2.1 'de görüldüğü gibi 12 farklı BBD kombinasyonu içeren besiyerleri her bir kombinasyonda 5

paralel olacak şekilde (12×5= 60 petri besiyeri) hazırlanmıştır.

Çalışmada MS ortamında 2,4-Diklorofenoksiasetik asit (2,4-D), Indol Asetik Asit (IAA), Kinetin (KIN) ve Picloram (PIC), 6-Benzylaminopürin (BAP) BBD' lerinin çeşitli konsantrasyon ve kombinasyonları kullanılmıştır (Tablo 2.1.).

Ekimi gerçekleşen bitkiler ± 22 °C de, 2500 lux floresan ışık altında, 16 saat aydınlık/ 8 saat karanlık şartlarda iklim odalarında bekletilerek, günlük olarak kallus gelişimi gözlenmiştir. Bu arada kontamine olan kültür kapları kültür ortamından uzaklaştırılıp, otoklavda steril edilmiştir.

Tablo 2.1: Bitki büyüme düzenleyicilerin yoğunlukları.

Besiyeri ortamı	2,4-D (mg/L)	IAA (mg/L)	BAP (mg/L)	KIN (mg/L)	PIC (mg/L)
1	1	1	0.5	-	-
2	1.5	1	0.5	-	-
3	2	1	0.5	-	-
4	1	-	0.5	-	-
5	1.5	-	0.5	-	-
6	2	-	0.5	-	-
7	1	-	-	1	0.5
8	1.5	-	-	1	0.5
9	2	-	-	1	0.5
10	-	-	0.5	-	1
11	-	-	0.5	-	1.5
12	-	-	0.5	-	2

2.2. Kallus Ekstraksiyonu

Besiyerinde yetiştirilen *M. officinalis* kallusları pens yardımıyla dikkatli bir şekilde petriden alınmıştır. Uygulanan bitki büyüme düzenleyicilere göre ayrılan kalluslar saf sudan geçirilerek 50 °C etüvde kurumaya bırakılmıştır. Kuruyan kalluslar hassas teraziyile 0.1 gram olacak şekilde tartılmış ve falkonlara aktarılmıştır. Kallusların üzerine 4 ml % 99.9 luk etanol pipetle eklenmiş ve falkonların etrafı parafimle sarılmıştır. Çözeltinin özdeşleşebilmesi için 72 saat buzdolabında saklanmıştır. Zamanı dolan çözeltiler blender yardımıyla 1-2 dk kadar parçalanmıştır. Daha sonra bu çözeltiler huniye yerleştirilen Whatman filtre kağıtıyla süzülüş ve madde tayininde kullanılacak ekstraktlar elde edilmiştir.

2.3. Toplam Fenolik Madde Analizi

Toplam fenolik madde analizi Singleton ve Rossi (1965)'nin uyguladığı Folin-Ciocalteu metoduna göre yapılmıştır. Bu yöntemle göre, 300 µl *M. officinalis* kallus ekstresi ve 1.5 ml 2 N 'lik Folin-Ciocalteu reaktifi cam tüplerde karıştırılmıştır. Bu karışım 1-2 dakika bekletildikten sonra %7.5 'lik sodyum karbonat çözeltisinden 1.2 ml eklenip, vortekste karıştırılmış ve 25 °C de karanlıkta 90 dk bekletildikten sonra UV-VİS spektrofotometrede 765 nm de absorbans köre (su) karşı ölçülmüştür. Toplam fenol içeriği gallik asit kalibrasyon eğrisinden yararlanılarak gallik asit eşdeğeri olarak verilmiştir. Kalibrasyon eğrisi gallik asidin 5 farklı konsantrasyonlarına (0.1; 0.2; 0.3; 0.4; 0.5 mg/ml) karşı hesaplanan absorbans değerleriyle okunmuştur. Gallik asit kalibrasyon eğrisinden elde edilen $y = 0,0471x + 0,0405$ formülüne göre sonuçlar hesaplanmıştır.

2.4. Toplam Flavonoid Analizi

Flavonoid içeriğinin saptanmasında metanolik form kullanılmıştır (Lamaison ve ark., 1990). Bu analiz için bitki ekstresinden 1 ml ve 1 ml %2 'lik $AlCl_3$ çözeltisi karıştırılmıştır. Tepkime karışımı 10 dakika oda sıcaklığında inkübe edilmiştir. Örneklerin absorbansları 394 nm dalga boyunda UV-VİS spektrofotometrede, kontrol örnek %2 lik $AlCl_3$ 'e karşı okunmuştur. Flavonoid derişimi kuersetinin kalibrasyon eğrisi ile karşılaştırılarak hesaplanmıştır. Kalibrasyon eğrisi kuersetinin 5 farklı konsantrasyonlarına (0.1; 0.2; 0.3; 0.4; 0.5 mg/ml) karşı hesaplanan absorbans değerleriyle okunmuştur. Kuersetinin kalibrasyon eğrisinden elde edilen sonuçlar mg kuersetin eşdeğeri / g ekstre şeklinde ifade edilmiştir. Elde edilen grafik denklemi $y = 0,0029x - 0,1044$ olarak bulunmuştur

3. Sonuçlar

Bu çalışmada *M. officinalis* bitkisinden elde edilen kallus ekstreslerinin toplam fenolik madde ve toplam flavonoid verileri hesaplanmıştır.

3.1. Toplam Fenolik Madde Analizi

M. officinalis bitkisinden elde edilen kallus ekstreslerinin toplam fenolik madde içeriği analiz edilmiştir. Sonuçlar gallik asit kalibrasyon eğrisine göre mg gallik asit eşdeğeri / g ekstre şeklinde ifade edilmiştir (Tablo 3.1.1).

M. officinalis eksplantlarından 12 farklı bitki büyüme düzenleyicisi kombinasyonlarıyla elde edilen kallusların her birinin toplam fenolik madde içeriği, çok yüksek değerler olmamakla beraber birbirlerinden farklı olarak tespit edilmiştir. Bu sonuçlara bağlı olarak, en yüksek toplam fenolik madde içeriği 1.523 mg GAE/ g olarak 1.5 mg/L 2,4-D + 0.5 mg/L BAP hormon kombinasyonundaki kallus etanol ekstresinden elde edilmiştir. En düşük toplam fenolik içeriği ise, 1.178 mg GAE/ g olarak 1 mg/L PIC + 0.5 mg/L BAP bitki büyüme düzenleyicisi

kombinasyonundaki kallus etanol ekstresinden elde edilmiştir.

Tablo 3.1.1. Kallus etanol ekstreslerinin toplam fenolik madde miktarı.

Besiyeri ortamı	Toplam fenolik madde (µg GAE/mg)
1	1.493
2	1.496
3	1.395
4	1.445
5	1.442
6	1.391
7	1.498
8	1.523
9	1.356
10	1.178
11	1.392
12	1.389

3.2. Toplam Flavonoid Analizi

M. officinalis kallus ekstreslerinde bulunan toplam flavonoid bileşiklerin konsantrasyonları analiz edilmiştir. *M. officinalis* kallus etanol ekstreslerinin farklı bitki büyüme düzenleyicilerine göre toplam flavonoid içerikleri tablo 3.2.1 de gösterilmiştir. Kuersetin kalibrasyon eğrisine göre kallus etanol ekstreslerinin toplam flavonoid içerikleri 2.709–4.930 mg kuersetin/g ekstre arasında olduğu belirlenmiştir.

Tablo 3.2.1 deki verilere göre toplam flavonoid içeriği karşılaştırıldığında, en yüksek içerik 2 mg/L PIC + 0.5 mg/L BAP hormon kombinasyonunda, en düşük içerik 1.5 mg/L 2,4-D + 1 mg/L PIC + 0.5 mg/L KIN hormon kombinasyonundan elde edilen *M. officinalis* kallus etanol ekstresinde saptanmıştır.

Tablo 3.2.1. Kallus etanol ekstralarının toplam flavonoid miktarı.

Besiyeri ortamı	Toplam flavonoid madde (µg/mg)
1	2.985
2	4.157
3	3.330
4	3.137
5	2.709
6	4.392
7	3.206
8	3.288
9	4.295
10	4.199
11	2.971
12	4.930

4. Tartışma

Flavonoid ve diğer fenolik maddelerin içerikleri, kanser ve kalp hastalığının gelişiminde önleyici bir rol oynamaktadır (Kahkonen ve ark., 1999). Hücre kültürü ve kallus oluşumunda yapılan literatür araştırmasında, bitkinin gelişimini uyarıcı bitki büyüme düzenleyicileri, ışık etkisi, sıcaklık gibi faktörlerin etkisiyle fenolik ve antioksidan özelliklerinin değiştiği gözlenmiştir. Giri ve ark., yapmış oldukları çalışmada, MS ortamında BA ve metil jasmonat (MeJA) bitki büyüme düzenleyicilerinin farklı konsantrasyonlarında *Habenaria edgeworthii* bitkisinin kallusları üretmiş ve toplam fenolik içeriğinin BA hormonun konsantrasyon artışıyla yükseldiğini, MeJA hormon konsantrasyonu artışıyla ise düştüğünü tespit etmişlerdir. Toplam fenolik içeriğini en yüksek 14.70 mg GAE/ g olarak, 10 µM MeJA hormon takviyesindeki *H.edgeworthii* kallusunda elde etmişlerdir (Giri ve ark., 2012). Asteraceae familyasına ait şeker otu (*Stevia rebaudiana*) bitkisi kallusları farklı renklerde ışıkların etkisiyle üretilip, bitkide toplam fenolik ve toplam flavonoid içeriği incelenmiştir. Çalışma sonucunda, toplam fenolik içeriğin maksimum değeri mavi ışık altında yetiştirilen kalluslarda 0,102 mg GAE/ g olarak belirlenmiştir (Ahmad vd., 2016). Lamiaceae familyasına ait biberiye (*Rosmaricus officinalis*) kallus kültürleri

üzerine yapılan bir çalışmada ise, radyasyona maruz bırakılan kallusların toplam fenolik madde içeriği önemli miktarda artış göstermiştir. Bu çalışmaya göre, ışınlama yapılmayan biberiye kalluslarının (kontrol grup) toplam fenolik içeriği 0.89 mg GAE/ g olurken, ışınlama dozu (Gy) maksimum 20 Gy'de 4.38 mg GAE/ g ulaştığı tespit edilmiştir (El-Beltagi ve ark., 2011).

M. officinalis, fenolik bileşiklerinin zenginliği ile çok belirgin bir antioksidan potansiyeline sahip olduğunu göstermiştir. Mabrouki ve ark., *M. officinalis* bitkisinin farklı çözücülerdeki ekstraktlarının toplam fenolik içeriğini incelemiştir. Raporlarına göre toplam fenolik içeriği, en yüksek 63.00 mg GAE/ g kuru etanol ekstraktında, en düşük 1.01 mg GAE/ g kuru hekzan ekstraktında tespit etmişlerdir (Mabrouki ve ark., 2017). Capecka vd. taze *M. officinalis* bitkisinde, toplam fenolik maddeyi 2253 mg / 100 mg , L-Askorbikası 53.2 mg / 100 mg ve karotenoidi 46.3 mg / 100 mg şeklinde bulmuşlardır (Capecka ve ark., 2005). Ivanova ve ark. ise, *M. officinalis* ekstraktının ortalama 1370.09 mM toplam fenol içerdiğini ve 4.06 mM TEAC (Trolox eşdeğeri antioksidan kapasite) bir antioksidan kapasitesine sahip olduğunu bulmuşlardır (Ivanova ve ark., 2005).

5. Sonuç

Yapılan bu çalışmada da tıbbi ve aromatik bitki olan *M. officinalis* bitkisinin in vitro koşullarda çeşitli bitki büyüme düzenleyicileriyle kallus üretimi sağlanarak toplam flavonoid ve toplam fenolik madde miktarları belirlenmiştir. Sonuçlar genel olarak incelendiğinde toplam flavonoid miktarının verilerinin sınır değerleri içerisinde, toplam fenolik madde verilerinin sınır değerlerin bir miktar altında olduğu görülmektedir. Ayrıca BBD' lerin kombinasyon ve konsantrasyon değişimlerinin hem toplam fenolik madde hem de toplam flavonoid miktarını etkilediği görülmüştür. Bitki çeşidi, bitkiden alınan miktar, ekstraksiyon seçimi, çözücü ve çözünen polaritesi gibi seçeneklerin farklılığı bu sonucun nedenleri olarak sayılabilir.

Teşekkür

Bu çalışma Fırat Üniversitesi Bilimsel Araştırma Birimi'nin MF 15.39 nolu projesi ile desteklenmiştir.

Kaynaklar

- Allahverdiyev A, Duran N, Ozguven M and Koltas S 2004. Antiviral activity of the volatile oils of *Melissa officinalis* L. against Herpes simplex virus type-2. *Phytomedicine* 11:(7-8) 657-661.
- Ahmad N, Rab A 2016. Light-induced biochemical variations in secondary metabolite production and antioxidant activity in callus cultures of *Stevia rebaudiana* (Bert). *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*. 154: 51-56.
- Argyropoulos D, Müller J 2014. Changes of essential oil content and composition during convective drying of lemon balm (*Melissa officinalis* L.). *Industrial Crops and Products*. 52: 118-224.
- Arslan N, Gürbüz B, Gümüşçü A, 2002. Tıbbi Bitkiler İsim Kılavuzu. Ankara Üniversitesi, Ziraat Fakültesi Yayınları No:1530, p 180.

- Awad R, Muhammad A, Durst T, Trudeau VT, Arnason JT 2009. Bioassay-guided fractionation of lemon balm (*Melissa officinalis* L.) using an in vitro measure of GABA transaminase activity. *Phytotherapy Research*, 23: 1075-1081.
- Basta A, Tzakou O and Couladis M 2005. Composition of the leaves essential oil of *Melissa officinalis* sl from Greece. *Flavour and fragrance journal* 20:(6), 642-644.
- Beloued A 2009. *Plantes médicinales d'Algérie*. Alger: Office des Publications Universitaires p 134.
- Birdane YO, Buyukokuroglu ME, Birdane FM, Cemek M, Yavuz H 2007. Anti-inflammatory and antinociceptive effects of *Melissa officinalis* L. in rodents. *Rev Méd Vét* 158:75-81.
- Capecka E, Mareczek A and Leja M 2005. Antioxidant activity of fresh and dry herbs of some Lamiaceae species. *Food chemistry* 93:(2), 223-226.
- Chung MJ, Cho SY, Bhuiyan MJH, Kim KH, Lee SJ 2010. Antidiabetic effects of lemon balm (*Melissa officinalis*) essential oil on glucose and lipid regulating enzymes in type 2 diabetic mice. *Brit J Nutr*.104: 180-188.
- El-Beltagi HS, Ahmed OK and El-Desouky W 2011. Effect of low doses γ -irradiation on oxidative stress and secondary metabolites production of rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.) callus culture. *Radiation Physics and Chemistry* 80:(9), 968-976.
- Farahani HA, Valadabadi SA, Daneshian J and Khalvati MA 2009. Evaluation changing of essential oil of balm (*Melissa officinalis* L.) under water deficit stress conditions. *Journal of Medicinal Plants Research* 3:(5), 329-333.
- Giri L, Dhyani P, Rawat S, Bhatt ID, Nandi SK, Rawal RS and Pande V 2012. In vitro production of phenolic compounds and antioxidant activity in callus suspension cultures of *Habenaria edgeworthii*: a rare Himalayan medicinal orchid. *Industrial Crops and Products* 39: 1-6.
- Hussain AI, Anwar F, Nigam PS, Saker SD, Moore JE, Rao JR et al. 2011. Antimicrobial activity of some Lamiaceae essential oils using resazurin as an indicator of cell growth. *LWT* 44:1199-206.
- Ivanova D, Gerova D, Chervenkov T and Yankova T 2005. Polyphenols and antioxidant capacity of Bulgarian medicinal plants. *Journal of ethnopharmacology* 96:(1-2), 145-150.
- Kahkönen MP, Hopia AI, Vuorela HJ, Rauha, JP, Pihlaja K, Kujala, TS and Heinonen M 1999. Antioxidant activity of plant extracts containing phenolic compounds. *Journal of agricultural and food chemistry* 47:(10), 3954-3962.
- Lamaison JL, Carnat A and Petitjean-Freytet C 1990. Tannin content and inhibiting activity of elastase in Rosaceae. In *Annales pharmaceutiques francaises* Vol. 48 No. 6 pp. 335-340.
- Mabrouki H, Duarte CM M and Akretche DE 2017. Estimation of Total Phenolic Contents and In Vitro Antioxidant and Antimicrobial Activities of Various Solvent Extracts of *Melissa officinalis* L.. *Arabian Journal for Science and Engineering* 1-9.
- Moradkhani H, Sargsyan E, Bibak H, Naseri B, Sadat-Hosseini M, Fayazi-Barjin A and Meftahizade H 2010. *Melissa officinalis* L., a valuable medicine plant. *Journal of Medicinal Plants Research* Vol. 4:(25), 2753-2759.
- Murashige T and Skoog F 1962. A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. *Physiologia plantarum* 15:(3), 473-497.
- Saglam C, Atakisi I, Turhan H, Kaba S, Arslanoglu F and Onemli F 2004. Effect of propagation method, plant density, and age on lemon balm (*Melissa officinalis*) herb and oil yield.
- Sarı AO and Ceylan A 2002. Yield characteristics and essential oil composition of lemon balm (*Melissa officinalis* L.) grown in the Aegean region of Turkey. *Turkish Journal of Agriculture and Forestry* 26:(4), 217-224.
- Singleton VL and Rossi JA 1965. Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. *American journal of Enology and Viticulture* 16:(3), 144-158.
- Spiridon I, Colceru S, Anghel N, Teaca CA, Bodirlau R, Armatu A 2011. Antioxidant capacity and total phenolic contents of oregano (*Origanum vulgare*), lavender (*Lavandula angustifolia*) and lemon balm (*Melissa officinalis*) from Romania, *Nat Prod Res.*, Oct 25 (17): 1657-1661.
- Vitullo M, Ripabelli I, Fanelli I, Tamburro M, Delfine S, Sammarco L 2011. Microbiological and toxicological quality of dried herbs *Lett Appl Microbiol.* 52: 573-580.