



## Determination of the Chemical Composition, Antimicrobial Activity and Flavonoid Content of the Essential Oils of *Cedrus libani* and *Pinus nigra* subsp. *pallasiana*

Ayşe Nur Demirci<sup>1,a</sup>, Nazan Çömlekciöğlü<sup>1,b,\*</sup>, Ashabil Aygan<sup>1,c</sup>

<sup>1</sup>Department of Biology, Faculty of Arts and Sciences, Kahramanmaraş Sütçü İmam University, 46050 Kahramanmaraş, Turkey

\*Corresponding author

ARTICLE INFO	ABSTRACT
<p>Research Article</p> <p>Received : 05/04/2020 Accepted : 04/05/2020</p> <p>Keywords: <i>Cedrus libani</i> <i>Pinus nigra</i> subsp. <i>pallasiana</i> Uçucu yağ Antimikrobiyal aktivite Flavonoid</p>	<p>Essential oil composition, antimicrobial activity and flavonoid contents of leaf-fruits of <i>Cedrus libani</i> and <i>Pinus nigra</i> subsp. <i>pallasiana</i> were determined with GC-MS, disc diffusion method and HPLC in three different period. When the essential oil composition of leaf and fruits of <i>P. nigra</i> ssp <i>pallasiana</i> collected in April, July and September, major components were <math>\alpha</math>-pinene, <math>\beta</math>-pinene, limonene, <math>\beta</math>-caryophyllene ve germacrene-D. On the other hand, additionally to these contents, myrcene and <math>\alpha</math>-terpineol were also detected in <i>C. libani</i>. According to HPLC analysis, rutin, quercetin, kaempferol, naringin and resveratrol flavonoids were detected in different proportions. While rutin (154.33 <math>\mu\text{g g}^{-1}</math>) and resveratrol (20.02 <math>\mu\text{g g}^{-1}</math>) has the highest ratio in <i>C. libani</i>, quercetin (9.65 <math>\mu\text{g g}^{-1}</math>) and naringin (9.31 <math>\mu\text{g g}^{-1}</math>) were detected in <i>P. nigra</i> subsp. <i>pallasiana</i> along with rutin (39.66 <math>\mu\text{g g}^{-1}</math>). According to the antimicrobial activity results the essential oils of <i>C. libani</i> obtained in April has produced higher activity than that of July and September. On the contrary, the essential oils from <i>P. nigra</i> subsp. <i>pallasiana</i> have produced the best antimicrobial activity on September compared to April and July. As a result, <i>C. libani</i> and <i>P. nigra</i> subsp. <i>pallasiana</i> essential oils have a composition showing antimicrobial activity and their harvesting season should be determined for the best and effective content.</p>

Türk Tarım – Gıda Bilim ve Teknoloji Dergisi, 8(8): 1747-1754, 2020

## *Cedrus libani* ve *Pinus nigra* subsp. *pallasiana*'nın Uçucu Yağlarının Kimyasal Bileşimi, Antimikrobiyal Aktivitesi ve Flavonoid İçeriklerinin Belirlenmesi

MAKALE BİLGİSİ	ÖZ
<p>Araştırma Makalesi</p> <p>Geliş : 05/04/2020 Kabul : 04/05/2020</p> <p>Anahtar Kelimeler: <i>Cedrus libani</i> <i>Pinus nigra</i> subsp. <i>pallasiana</i> Essential oil Antimicrobial activity Flavonoid.</p>	<p>Kahramanmaraş'ta doğal olarak yayılış gösteren <i>Cedrus libani</i> A. Rich ve <i>Pinus nigra</i> subsp. <i>pallasiana</i> (Lamb.) Holmboe'nın iğne yaprak ve meyvelerine ait uçucu yağların bileşimi GC-MS ile; antimikrobiyal etkileri disk difüzyon yöntemi ile flavonoid içerikleri ise HPLC cihazı ile belirlenmiştir. Nisan, Temmuz ve Eylül olmak üzere üç farklı zamanda toplanan yaprak örneklerine ait uçucu yağların kimyasal kompozisyonundaki mevsimsel değişimin incelendiği bu çalışmada, uçucu yağ ana bileşenlerini <i>P. nigra</i> subsp. <i>pallasiana</i>'da <math>\alpha</math>-pinene, <math>\beta</math>-pinene, limonene, <math>\beta</math>-caryophyllene ve germacrene-D ile; <i>C. libanii</i>'de bu bileşenlere ek olarak, myrcene ve <math>\alpha</math>-terpineol olarak bulunmuştur. HPLC analizi sonucunda rutin, quercetin, kaempferol, naringin, ve resveratrol flavonoidleri çeşitli oranlarda bitkilerde bulunmuştur. <i>C. libanii</i>'de en yüksek oranda rutin ve resveratrol (sırasıyla 154,33 ve 20,02 <math>\mu\text{g g}^{-1}</math>) bulunurken; <i>P. nigra</i> subsp. <i>pallasiana</i>'da ise yine rutin (39,66 <math>\mu\text{g g}^{-1}</math>) yanı sıra quercetin ve naringin (sırasıyla 9,65 ve 9,31 <math>\mu\text{g g}^{-1}</math>) elde edilmiştir. Antimikrobiyal aktivite sonuçlarına göre Nisan'da toplanan <i>C. libanii</i> uçucu yağları Haziran ve Eylül ayı uçucu yağlarından daha yüksek aktivite göstermiştir. Buna karşılık <i>P. nigra</i> subsp. <i>pallasiana</i> uçucu yağları en iyi antimikrobiyal aktiviteyi Nisan ve Haziran'a kıyasla Eylül'de göstermiştir. Sonuç olarak, <i>C. libanii</i> ve <i>P. nigra</i> subsp. <i>pallasiana</i> antimikrobiyal aktivite gösteren bir içeriğe sahiptir ancak en iyi ve etkin bir içerik için hasat dönemlerine dikkat edilmelidir.</p>

<sup>a</sup> [andfe\\_11@hotmail.com](mailto:andfe_11@hotmail.com)  
<sup>c</sup> [ashabil@ksu.edu.tr](mailto:ashabil@ksu.edu.tr)

<sup>b</sup> <https://orcid.org/0000-0001-7922-9358>  
<https://orcid.org/0000-0003-4936-9872>

<sup>b</sup> [noktem80@gmail.com](mailto:noktem80@gmail.com) <sup>id</sup> <https://orcid.org/0000-0001-7729-5271>



## Giriş

Açık tohumluların en zengin sınıfı olan Koniferler 7 aile, 52 cins ve 600'ü aşkın taksonla dünya üzerinde, özellikle Kuzey yarımkürede çok geniş alanlara yayılmaktadır. Bu çalışmaya konu olan iki konifer türünden biri olan Türkiye'de halk arasında 'Katran' adı verilen *Cedrus libani* G.Don türü, asıl yayılışını Türkiye'de Güney Anadolu'nun Toroslar Bölgesi'nde yapmaktadır (Avcı ve Bilir, 2017). Batıda Fethiye ve Köyceğiz'den başlayıp, doğuya Toros dağları üzerinden uzanmakta, Göksun ve Kahramanmaraş yörelerinden bir kavisle güneye Amanos Dağları'na yönelmektedir (Efe ve ark., 2013). Dünyada sadece Lübnan'ın Cebel-Lübnan bölgesinde yayılmaktadır (Semaan ve Dodd, 2008). *Pinus nigra* (Lamb.) Holmboe (Karaçam)'nın sistematigi henüz tam yapılamamıştır. Güneybatı, Güney, Güneydoğu Avrupa ile Batı Asya'daki "Submediterranean" bölgelerde geniş coğrafi yayılışa sahiptir. Ülkemizde Karadeniz, Marmara, Ege, Toroslar ve İç Anadolu bölgelerinde yaklaşık 4,2 milyon hektarlık bir alana yayılmıştır (Kızıllarslan ve Sevgi, 2013).

Flavonoidlerin de dahil olduğu fenolik bileşikler ve uçucu yağlar çoğunlukla bitkinin çiçek, tomurcuk, yaprak, meyve, kök ve odunsu kısımlarında bulunmaktadır (Kähhönen ve ark., 1999; Mohammed ve ark., 2018). Bu nedenle genellikle aromatik bitkiler çiçek ve yaprak kısımları kurutulmuş drog halinde (Baytop, 1999) ya da ekstraksiyon, destilasyon gibi yöntemlerle elde edilen ekstraktlar şeklinde kullanılmaktadır (Botsoglou ve ark., 2003; Mohammed ve ark., 2019). Aromatik bitkilerin kimyasal bileşimi birçok etmene (bitki organı ve türü, hasat mevsimi, yetiştirme yöntemi gibi) bağlı olarak farklılık gösterdiğinden, antioksidan etkileri de değişebilmektedir (Javanmardi ve ark., 2003). Enfeksiyon kontrolü için antibiyotik direnci araştırmasının yanı sıra, bilim adamları bitki özlerinin ve fraksiyonlarının antimikrobiyal özelliklerini giderek daha fazla araştırmaktadırlar (Malika ve ark., 2004; Imelouane ve ark., 2009; Pehlivan ve Sevindik, 2018). Çeşitli bilimsel raporlar, birçok bitkinin çeşitli mikroorganizmalar üzerindeki önleyici etkisini tanımlamış olsa da, farklı mikroorganizmaların belirli bir bitkiye ve aynı mikroorganizmaların farklı bitkilere karşı direncinde önemli farklılıklar gözlenmiştir (Arora ve Kaur, 1999; Sevindik ve ark., 2017).

Koniferlerin filogeni ve biyocoğrafyası, moleküler çalışmaları, karyotip analizleri, genetik çeşitlilik ve populasyon yapısı, polenleri, karşılaştırmalı anatomisinin yanı sıra tohum yağı ve proteinleri, uçucu yağları, terpenoid ve flavonoidleri, antimikrobiyal aktivitesine odaklanarak tıbbi yönüne yönelik pek çok çalışma yapılmıştır (Gamon ve ark., 2016; Feucht ve ark., 2016; Garcia ve ark., 2017; Klaus ve Matzke, 2019; Mamoci ve ark., 2020). Günümüzde çeşitli bitki organları ve ürünlerinin gıda takviyesi olarak diyetle yer almasının, çeşitli hastalıkların önlenmesine ve tedavisine yardımcı olabildiği ve insan sağlığına karşı ciddi tehdit oluşturan ortaya çıkan hastalıklara karşı antimikrobiyal potansiyeli olduğu bilinmektedir (Sevindik ve ark., 2017). Bilimsel çalışmalar, iğne yapraklı ağaçların uçucu yağlarında bolca bulunan terpenlerin, çeşitli hastalıkların tedavisinde kullanılabileceğini ve uçucu yağ bileşenlerinin ekonomik değerlerinin yanı sıra, bitki savunma sisteminde mantar ve böcek saldırılarına karşı önemli bir rol oynadığını

göstermiştir (Sezik ve ark., 2010; Vieira ve ark., 2018). Yapılan literatür taramasında çalışmaların *C. atlantica* G. Manetti ve *C. deodora* (Roxb.) G. Don üzerinde yoğunlaştığı görülmüştür. Az sayıda olsa da *Cedrus libani*'nin iğne yapraklarının uçucu yağlarına ait çeşitli çalışmalara rastlanmıştır. Farklı lokalitelerde, farklı yüksekliklerde yetişen bitkilerin uçucu yağları kıyaslanmış (Loizzo ve ark., 2007; Bilir ve Avcı, 2013) fakat mevsimsel değişime ait bir çalışma bulunmamıştır. Bu çalışmada Kahramanmaraş'ta doğal olarak yayılış gösteren *C. libani* ve *Pinus nigra* subsp. *pallasiana*'nın iğne yapraklarına ait uçucu yağ bileşimine ait mevsimsel değişimin (Nisan, Temmuz ve Eylül) ve flavonoidlerinin yanı sıra, yaprak ve kozalaklardan elde edilen uçucu yağların antimikrobiyal aktiviteleri araştırılmıştır.

## Materyal ve Yöntem

### Bitki Materyali

Bu çalışmada, *C. libani* "Lübnan sediri" ve *P. nigra* subsp. *pallasiana* "Karaçam" türlerinin iğne yaprakları ve kozalakları, Kahramanmaraş Sütçü İmam Üniversitesi/Avşar Kampüsü'nden toplanmıştır. Ayrıca Kampüs içerisindeki ağaçlar işaretlenerek, işaretli bitkilerin iğne yaprakları Nisan, Temmuz ve Eylül ayları olmak üzere üç farklı vejetasyon döneminde toplanarak, yapraklardan elde edilen uçucu yağ içeriklerinin mevsimsel değişiminin incelenmesi amaçlanmıştır.

### Uçucu Yağ Eldesi

İğne yaprak ve kozalakların uçucu yağları, Neo-Clevenger cihazı kullanılarak su distilasyonu yöntemiyle elde edilmiştir. Bu çalışmada her bir örnekten 100'er g alınmış, üzerine 1 litre su eklenmiş ve neo-clevenger cihazında yaklaşık 3 saat kaynatıldıktan sonra uçucu yağ eldesi gerçekleştirilmiştir (Kılıç, 2008).

### GC-MS Çalışma Koşulları

Elde edilen uçucu yağ bileşenlerinin tespiti Agilent Technologies GC 6890N Network, MS 5975C VL MSD cihazı ile gerçekleştirilmiştir. NIST08, Willey7n.1 ve Flavor2 kütüphaneleri referans alınmıştır. HP 88 (100m 0,25 mm id; 0,2 µm film kalınlığı) kapiler kolon kullanılmıştır. Taşıyıcı gaz Helyum olup, elektron enerjisi 70 eV'tur. Enjeksiyonlar split modda (1:20), 250°C ısıda gerçekleştirilmiş olup, dedektör sıcaklığı da 250°C'dir. Isı programı 70°C-1'//70°C -230°C -16'//230°C-25' şeklindedir.

### Flavonoid Analizleri

Bitki ekstraktlarının flavonoid içerikleri HPLC cihazı ile analiz edilmiştir. Kurutulmuş toz haline getirilen bitki örneklerinden ekstraksiyon, ultrasonik banyoda metanol yardımıyla yapılmıştır. Ekstraksiyondan sonra örnekler santrifüj edilmiş ve üst fazdan 20 µl HPLC'ye enjekte edilmiştir. Analizler C18 kolonda (Nucleosil 100-5 C18, 250x4.6 mm), HPLC-DAD dedektörü (Shimadzu, Kyoto, Japan) ile yapılmış olup, sonuçlar mikrogram/gram olarak %97 güven aralığı ile verilmiştir. İnjektion şartları ise: Mobil faz: A: %3 asetik asit, B: Metanol olmak üzere iki çözücüden oluşan taşıyıcı faz ile, 0,8 mL dk<sup>-1</sup>lık akış hızında ayarlanmıştır. Kolon sıcaklığı 30°C'dir.

### Antimikrobiyal Aktivite

Antimikrobiyal etkinlik belirlenmesi standart disk difüzyonu testi ile gerçekleştirilmiştir (Collins ve ark., 1989). Test mikroorganizmalarından bakteriler Nutrient Broth'a aşılansak 37°C'de 24 saat; maya suşları Sabouraud Dekstroz Broth'a aşılansak 30°C'de bir gece inkübe edilerek aktive edilmişlerdir. Daha sonra Müeller-Hinton agar ve SDA (Sabouraud dextrose agar) besiyerlerine bakteri suşları 0,5 Mc Farland turbiditesinde steril serum fizyolojik ile sulandırılarak ( $1.5 \times 10^8$  bakteri ml<sup>-1</sup>; ( $0.5 \times 10^6$  maya ml<sup>-1</sup>) yayma şeklinde ekim yapılmıştır (Anonim 1999). Elde edilen uçucu yağ örneklerini antimikrobiyal aktivitelerinin test edilmesi için uçucu yağlardan 30 µl alınarak ve 6 mm çapındaki steril disklerle emdirilmiştir. Uçucu yağ emdirilmiş diskler hafifçe besiyeri üzerine bastırılarak yerleştirilmiştir. Bu şekilde hazırlanan petri kutuları 4°C'de 1 saat bekletildikten sonra, bakteri aşılansak petri kutuları 37°C'de 24 saat, maya aşılansak petri kutularında 30°C'de 24-48 saat süre ile inkübe edilmiştir (Collins ve ark., 1989). Süre sonunda besiyeri üzerinde oluşan inhibisyon zonları mm olarak değerlendirilmiştir (Çetin ve Gürler, 1989; Bradshaw, 1992).

### Mikroorganizmalar

Çalışmada kullanılan test mikroorganizmaları KSÜ, Biyoteknoloji Laboratuvarı kültür koleksiyonundan temin edilmiştir. Bunun için Gram pozitif bakterilerden *Bacillus subtilis* ATCC 6633, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, Gram negatif bakterilerden *Klebsiella pneumonia* (Klinik İzolat), *Escherichia coli* ATCC 39628, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Enterobacter aerogenes* ATCC 13048 ile mayalardan *Candida albicans* (Klinik izolat), *Saccharomyces cerevisia* ve *Yarrowia lipolytica* kullanılmıştır.

### Bulgular ve Tartışma

#### Uçucu Yağ Analizine Ait Bulgular

Yaprak örneklerine ait uçucu yağların kimyasal kompozisyonundaki mevsimsel değişimin incelendiği bu çalışmada, *C. libani* bitkisinin GC-MS analizi sonucunda elde edilen bileşenlerin ortalama değerleri Çizelge 1'de verilmiştir. Uçucu yağdaki ana bileşenler  $\alpha$ -pinene ve  $\beta$ -pinene başta olmak üzere myrcene, limonene,  $\alpha$ -terpineol, caryophyllene E ve germacrene-D olarak bulunmuş ve bu yedi bileşenin miktarlarında aylara göre değişimler gözlenmiştir. Bu çalışmada major bileşenlerden  $\alpha$ -pinene ve  $\beta$ -pinene, diğer bileşenlere nazaran oldukça yüksek miktarlarda bulunmakta olup, incelenen aylardaki mevsimsel değişimi ise dikkat çekicidir.  $\alpha$ -pinene miktarı Nisan'dan (%65,77) Eylül ayına (%18,68) kadar kademeli olarak düşerken;  $\beta$ -pinene miktarı ise tam tersine Nisan ayından (%2,94) Eylül ayına (%49,41) kadar önemli bir artış göstermiştir. Diğer bileşenlerden caryophyllene E ve germacrene-D miktarları Eylül ayında artarken (sırasıyla %6,95 ve 9,22), myrcene ve  $\alpha$ -terpineol azalmış, limonene seviyesinde ise önemli bir değişiklik olmamıştır.

Bilir ve Avcı (2017) farklı lokalitelerden topladıkları *C. libani* yaprak örneklerinin uçucu yağ ana bileşenlerini  $\alpha$ -pinene (24,45-33,49) ve  $\beta$ -pinene (17,78-22,82) olarak bulmuşlardır. Tümen ve ark. (2010), *C. libani*'nin yaprak uçucu yağ ana bileşenlerini  $\alpha$ -pinene (12,30),  $\beta$ -pinene (8,25), limonene (17,71) ve  $\beta$ -myrcene (4,94) olarak

bulmuşlardır. Bu çalışmada elde edilen bulguların, Canard ve ark. (1997)'nin *C. libani*'de buldukları terpen kompozisyonu sonuçları ile uyumlu olduğu görülmektedir. Çalışmalarında  $\alpha$ -pinene,  $\beta$ -pinene, myrcene, limonene, caryophyllene miktarlarını sırasıyla %45,43, 11,68, 22,63, 13,63 ve 5,05 olarak belirlemişlerdir. İçeriklerin miktarları arasındaki kısmi farklılıklar mevsimsel değişim ve coğrafik farklılıktan kaynaklanmaktadır. Saab ve ark., (2005) Lübnan'da yetişen *C. libani*'nin odun kısmındaki uçucu yağlarının kimyasal içerikleri üzerinde yaptıkları çalışmada 14 adet ana bileşen belirlemişlerdir. Major bileşenlerin himachalene ve himachalol'un  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$  izomerleri olduğunu tespit etmişlerdir. Benzer olarak Başer ve Demirçakmak (1995) Türkiye'den topladıkları *C. libani*'nin kök ve odun dokularının uçucu yağ bileşenleri üzerine yaptıkları çalışmada ana bileşenleri  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ -himachalene'nin yanı sıra trans  $\alpha$ -atlantone olarak elde etmişlerdir. Bu sonuçlar değerlendirildiğinde odun, kök ve yaprak gibi farklı organların uçucu yağ içeriklerinde büyük farklılıklar olabilmektedir.

Bu çalışmada çalışılan diğer bitki olan *P. nigra* subsp. *pallasiana*'nın iğne yapraklarına ait uçucu yağ ana bileşenleri  $\alpha$ -pinene,  $\beta$ -pinene, limonene,  $\beta$ -caryophyllene ve germacrene-D olarak bulunmuştur.  $\beta$ -caryophyllene Nisan ayında (%13,79) en yüksek oranda bulunurken;  $\alpha$ -pinene (%34,37),  $\beta$ -pinene (%20,10) ve germacrene-D (%18,20) Eylül ayında diğer aylara nazaran daha yüksek oranlara ulaşmıştır (Çizelge 2). Limonene ise Temmuz ayında (%23,63) en yüksek oranda bulunurken, Eylül ayında en düşük seviyesine (%3,93) gerilemiştir.

Macchioni ve ark. (2003), *Pinus pinea*, *P. halepensis*, *P. pinaster* ve *P. nigra* olmak üzere dört farklı *Pinus* türünün çeşitli organlarının uçucu yağ bileşimlerini incelemişlerdir. *P. nigra*'nın iğne yapraklarında %28,4 olmak üzere tüm organlarında  $\alpha$ -pineni ana bileşen olarak bulmuşlardır. İğne yapraklardaki diğer ana bileşenleri germacren D (%21,2) ve  $\beta$ -caryophyllene (%16,2) olarak belirtmişlerdir. Roussis ve ark. (1995), *P. nigra* iğne yapraklarındaki uçucu yağların ana bileşenlerini, tıpkı Macchioni ve ark. (2003) gibi  $\alpha$ -pinen, germacren D,  $\beta$ -caryophyllene olarak belirtmişlerdir. Bu çalışmada bu üç ana bileşenin yanı sıra  $\beta$ -pinene ve limonene değişen oranlarda bulunmuştur. Rezzi ve ark. (2001), *Pinus nigra* subsp. *laricio* bitkisinin iğne yapraklarının uçucu yağ bileşenlerini çalışmışlar ve başlıca bileşenleri alfa-Pinene, manoyl oxide, germacrene-D, myrcene, (E)-caryophyllene ve limonene olarak bulmuşlardır. Bu çalışmada manoyl oxide hiç bulunmamış, ancak myrcene Temmuz hasadında elde edilen uçucu yağda görülmüştür. Tümen ve ark. (2010), dört *Pinus* türünün konilerinden elde ettikleri uçucu yağların bileşimini araştırmıştır. *P. slyvestris*, *P. nigra* (%45,36) ve *P. halepensis*'te ana bileşeni  $\alpha$ -pinen, ve *P. pinea*'da limonen (%62,8) ve *P. brutia*'da ise  $\beta$ -pinen (%39,6) olarak belirtmişlerdir. Bu üç bileşenin *P. nigra* subsp. *pallasiana*'nın iğne yapraklarında aylara göre değişen oranlarda ve major miktarlarda bulunduğu gözlenmiştir. Sezik ve ark. (2010), Türkiye'nin farklı bölgelerindeki sekiz ilden dört farklı zamanda topladıkları *P. nigra* bitkilerinin iğne yapraklarındaki uçucu yağ değişimini incelemişlerdir. Yağlardaki  $\alpha$ -pinen miktarlarının her zaman  $\beta$ -pinen'den daha yüksek olduğunu, ayrıca Akdeniz Bölgesi'nden toplanan örneklerde (Antalya ve İçel)  $\alpha$ -pinen ve  $\beta$ -pinenin toplam

içeriğinin %52 ile %67 arasında değiştiğini belirtmişlerdir. Bir Akdeniz şehri olan Kahramanmaraş'tan toplanan bu örneklerde, α-pinen ve β-pinen toplam içeriği, diğer aylarda daha düşükken, Eylül ayında yaklaşık %55'e çıkarak en yüksek miktarına ulaşmıştır.

Çalışılan bitkilere ait iğne yaprakların Nisan, Temmuz ve Eylül olmak üzere 3 farklı zamanda toplanmasındaki amaç, uçucu yağ bileşenlerinin miktar bakımından mevsimsel olarak değişimini incelemek ve özellikle de major bileşenlerin spesifik kullanımlar için maksimum olduğu seviyeleri saptamaktır. Çam başta olmak üzere iğne yapraklı ağaçların birçok türünün yağlarında bulunan alfa

ve beta -Pinene insanlarda bir bronş açıcıdır ve geniş bir biyolojik aktivite yelpazesine, yani antienflamatuvar, antibakteriyel, antioksidan, antikanser ve antinosiseptif aktivitelere sahip olduğu bildirilmiştir (Aydın ve ark., 2013). Limonen; kötü tatları baskılamak için tatlandırıcı, losyon, banyo ürünleri ve diğer çeşitli kişisel bakım ürünlerinde hoş koku verici, tarımda insektisit ve herbisit, temizlik ürünlerine yağları çözücü, yanıcı olduğu için biyoyakıt, geleneksel tıpta safra taşı, reflü hastalığı ve mide ekşimesini rahatlatmak gibi farklı sektörlerde pek çok kullanımı bulunmaktadır (Butler, 2010; Sharma ve ark., 2017; Vieira ve ark., 2018).

Çizelge 1. *C. libani* iğne yapraklarına ait uçucu yağ bileşenlerinin ortalama değerleri

Table 1. Mean values of essential oil components of *C. libani* needle

No	Uçucu Yağ Bileşenleri	Nisan	Temmuz	Eylül
1	α-pinene	65,77±2,25	39,58±0,05	18,68±0,24
2	Camphene	0,53±0,06	0,48±0,02	0,33±0,01
3	β-pinene	2,94±0,06	20,05±0,16	49,41±0,58
4	Myrcene	8,94±0,44	3,57±0,02	-
5	α-phellandrene	-	0,35±0,01	-
6	Limonene	3,76±0,15	3,83±0,01	3,46±0,07
7	β-phellandrene	-	2,20±0,04	-
8	Sabinene	0,91±0,04	-	-
9	Isoamyl propionate	0,34±0,01	-	-
10	Terpinolene	1,37±0,07	3,74±0,06	-
11	γ-terpinene	-	-	3,13±0,08
12	δ-carene	-	-	0,75±0,01
13	cis-β-Terpineol	0,32±0,35	-	-
14	Linalool	0,23±0,03	-	-
15	(+)-Longifolene	0,42±0,09	-	-
16	α-copaene	-	0,33±0,06	0,10±0,03
17	Thujopsene	0,43±0,03	-	-
18	4-Carvomenthenol	1,21±0,01	-	-
19	β-copaene	-	-	0,23±0,02
20	α-terpineol	4,93±0,18	6,69±0,27	1,34±0,01
21	α-humulene	-	-	0,67±0,42
22	Junipene	-	0,23±0,00	0,38±0,06
23	(E)-β-Caryophyllene	-	1,73±1,43	6,95±0,24
24	γ-Amorphene	-	-	0,64±0,01
25	m-Cresol	0,54±0,06	-	-
26	Epizonarene	-	0,66±0,04	-
27	α-bisabolene	-	2,16±0,06	0,99±0,04
28	γ-amorphene	-	0,92±0,01	-
29	δ-cadinene	-	-	0,75±0,04
30	Carvacrol	0,32±0,21	-	-
31	α-humulene	-	1,14±0,04	1,87±0,06
32	Germacrene D	-	2,54±0,01	9,22±0,51
33	3-floro-Benzeneacetonitrile	0,51±0,29	-	-
34	1,2-benzisothiazole	0,18±0,07	-	-
35	Borneol	-	0,37±0,05	-
36	Benzothiazole	0,46±0,15	-	-
37	Umbellulone	-	0,59±0,01	-
38	α-Cadinol	0,81±0,01	-	-
39	Widdrol	0,54±0,01	-	-
40	α-Cadinol	0,55±0,05	-	-
41	Phenethyl isovalerate	-	-	0,32±0,01
42	Epi-α-Muurolol	-	0,83±0,45	-
43	Caryophyllene oxide	-	-	0,31±0,06
44	Roza-5,15-dien	-	0,48±0,02	-
45	Epi-cedrol	-	0,45±0,01	-
46	Epi-α-muurolol	-	1,24±0,03	-

Limonenin terapötik etkileri, sağlıktaki diğer faydalı etkilerin yanı sıra antimikanti-enflamatuvar, antioksidan, antinosisseptif, antikanser, antidiyabetik, antimikrobiyal, antiviral ve gastroprotektif etkilerinden ileri gelmektedir (Ravichandran ve ark., 2018; Vieira ve ark., 2018). Beta-caryophyllene'in antikanserijen, analjezik etkilerinin yanı sıra kolesterol ve diyabet hastalıklarının tedavisinde olumlu sonuçlarına dair pek çok çalışma bulunmaktadır (Basha ve Sankaranarayanan, 2016; Fidyat ve ark., 2016; Baldissera ve ark., 2017; Arul ve ark., 2020). Germacrene, antimikrobiyal ve insektisit özelliklerinin yanısıra, böcek feromonları olarak da rol oynarlar (Adio, 2009). Yukarıda faydalarından bahsedilen bu bileşikler, çalışılan her iki türde de aylara göre değişen oranlarda bulunmakta olup, bitkilerin bu çalışma ile tıbbi ve ekonomik potansiyelleri ortaya konmuştur.

### Flavonoid Analizine Ait Bulgular

Kahramanmaraş Avşar Kampüsü'nden toplanan *C. libani* ve *P. nigra* subsp. *pallasiana*'nın iğne yapraklarına ait

flavonoid içeriklerinin miktarları Çizelge 3'te verilmiştir. Öncelikle flavonoid standartları HPLC'de koşturulmuş ve elde edilen grafikler kullanılarak regresyon denklemleri hesaplanmıştır. *P. nigra* subsp. *pallasiana* yaprağının metanol ile ekstraktının analizleri sonucunda rutin 39,66 µg g, quercetin 9,66 µg g, kampherol 4,00 µg g, naringin 9,33 µg g ve resveratrol 2,33 µg g bileşenleri belirlenmiştir. Fenolik maddelerin doğal antioksidan olmakla beraber kalp hastalıklarında ve kanser tedavisinde de önleyici rol oynadıkları ortaya konmuştur (Faydaoğlu ve Sürücüoğlu, 2013; Mohammed ve ark., 2018; Mohammed ve ark., 2019). Bitkilerde bulunan fenolik bileşiklerin antioksidan aktiviteye sahip oldukları bilinmektedir (Skerget ve ark., 2005). *C. libani* yaprağının metanol ile ekstraktının analizleri sonucunda rutin 154,33 µg g, quersetin 2,00 µg g, kampherol 5,00 µg g ve resveratrol 20,00 µg g bileşenleri belirlenmiştir. *P. nigra* subsp. *pallasiana* ve *C. libani* bitkilerinin flavonoid içeriklerine yönelik bir çalışmaya literatürde rastlanmamıştır.

Çizelge 2. *P. nigra* subsp. *pallasiana* iğne yapraklarına ait uçucu yağ bileşenlerinin ortalama değerleri

Table 2. Mean values of essential oil components of *P. nigra* subsp. *pallasiana* needle

No	Uçucu Yağ Bileşenleri	Nisan	Temmuz	Eylül
1	alpha-Pinene	9,01±0,15	18,96±0,25	34,37±0,04
2	Myrcene	-	5,43±0,78	-
3	Sabinene	5,33±0,07	0,99±0,04	-
4	β-pinene	15,15±0,11	17,46±0,42	20,10±0,15
5	Limonene	13,63±0,11	9,25±0,11	5,93±0,02
6	sabinene	3,82±0,05	0,99±0,04	1,36±0,02
7	δ-carene	-	3,6±0,03	-
8	Terpinolene	1,29±0,01	-	0,54±0,01
9	Eucalyptol	0,72±0,01	-	-
10	p-Cymene	1,03±0,01	0,25±0,02	0,34±0,01
11	α-Cubebene	0,53±0,66	-	0,57±0,01
12	Valencene	-	-	1,95±0,02
13	cis-β-terpineol	0,56±0,00	-	-
14	Linalol	1,38±0,01	-	-
15	α-Cubebene	4,02±0,00	-	-
16	Z-β-terpineol	1,04±0,67	-	-
17	α-Elementene	2,49±0,29	-	-
18	beta-Caryophyllene	13,79±0,01	10,76±0,02	6,46±0,01
19	Naphthalene	-	-	1,22±0,01
20	alpha-Caryophyllene	-	-	2,61±0,02
21	Bicyclo[2.2.1]heptan-2-ol,1,7,7-trimethyl-	-	-	1,85±0,01
22	Terpinolene	1,62±2,23	-	-
23	α-Terpeneol	1,03±0,00	3,73±0,02	0,78±0,01
24	(Z)-piperitol	0,65±0,01	-	-
25	γ-muurolen	-	1,05±0,01	-
26	Fenchol	-	1,03±0,01	-
27	Calamenene	0,82±0,00	-	-
28	Germacrene-D	15,30±0,28	16,63±0,03	18,20±0,02
29	Isobornyl acetate	-	0,99±0,01	-
30	δ-cadinene	-	1,51±0,03	-
31	α-humulene	-	2,48±0,01	-
32	d-piperiton	0,54±0,01	-	-
33	Endo-borneol	-	0,72±0,01	-
34	2H-2,4a-Methanonaphthalene	0,78±0,03	-	-
35	Fonenol	-	0,54±0,05	-
36	α-cedrene	3,56±0,03	-	-
37	Cedrol	0,84±0,08	-	0,16±0,01
38	α-Cadinol	1,25±0,07	0,55±0,04	-
39	Epi-α-muurolo	-	2,20±0,18	-
40	Coumarin	0,64±0,19	-	-

Çizelge 3. *C. libani* ile *P. nigra* subsp. *pallasiana*'nın flavonoid miktarları

Table 3. The flavonoid amounts of *C. libani* with *P. nigra* subsp. *pallasiana*

Flavonoidler	<i>C. libani</i>	<i>P. nigra</i> subsp. <i>pallasiana</i>
	µg g <sup>-1</sup>	µg g <sup>-1</sup>
Rutin	154,33±1,15	39,66±1,27
Myrcetin	*	*
Morin	*	*
Quersetin	2,00±0,56	9,66±0,78
Kampherol	5,00±0,45	4,00±0,44
Catechine	*	*
Naringin	*	9,33±0,65
Naringenin	*	*
Resveratrol	20,00±0,95	2,33±0,26

\*: Tespit edilemedi

Shi ve ark. (2006), *Cedrus deodora*'nın iğne yapraklarındaki flavonoid içeriğini myrcetin, quercetin, kaempferol ve isorhamnetin olarak ve sırasıyla 1,89, 2,01, 2,94 ve 1,2 µg g<sup>-1</sup> miktarlarda bulunduğunu bildirmişlerdir. Naeem ve ark. (2010), ise *Pinus roxburghii* ve *Pinus wallichiana* kabuk ve yaprak ekstraktlarında quercetin, kampherol, rhamnetin, isorhamnetin ve myrcetin olmak üzere beş flavonol tanımlamışlardır. *P. wallichiana* A.B.Jacks. ve *P. roxburghii* Sarg. kabuk ve iğne yapraklarında en bol bulunan flavonoidin quercetin olduğunu belirtmişler fakat bu çalışmada her iki bitkide de en bol bulunan flavonoid rutin olmuştur. *P. wallichiana* ve *P. roxburghii* iğnelerinde myrcetin, kampherol ve rhamnetin flavonoidlerini bulamamışlar, bu çalışmada ise myrcetin, morin, catechine ve naringenin flavonoidlerine her iki bitkide de rastlanmamıştır. Ayrıca tıbbi çalışmalarla kanser, antidiabetik çalışmalar, cilt, nörolojik ve kardiyolojik rahatsızlıklar üzerinde yararlı etkileri tespit edilen başta quercetin ve kampherol olmak üzere, resveratrol, naringin ve antikanser, antidiabetik ve antimikrobiyal özellikleriyle öne çıkan rutin flavonoidlerine sahip olduğu bu çalışmayla ilk kez gösterilmiştir (Iacaponi ve ark., 2008; Jadhav ve Puchchakayala, 2012; Berman ve ark., 2017; Ganeshpurkar ve Saluja, 2017).

#### Antimikrobiyal Aktiviteye Ait Bulgular

Bugün, birçok araştırmacı yeni antimikrobiyal kaynakları tanımlamak için bitkiler, hayvanlar ve mantarlar gibi doğal kaynaklara odaklanmıştır. Bitkilerden elde edilen uçucu yağlar ve ekstraktlar,

özellikle farklı patojenik organizma grupları üzerinde antimikrobiyal etkilere sahip çok çeşitli biyolojik aktivitelere sahiptir (Pehlivan ve Sevindik, 2018). Farklı dönemlerde toplanan *P. nigra* subsp. *pallasiana* ve *C. libani* yaprak ve kozalaklarının uçucu yağlarının farklı mikroorganizmalar üzerine antimikrobiyal aktiviteleri Çizelge 4 ve 5'de gösterilmiştir. Üç farklı dönemde toplanan *C. libani* örneklerinin uçucu yağları Nisan dönemi diğer dönemlere nazaran en yüksek antimikrobiyal etkiyi oluşturmuştur. Nisan döneminde antimikrobiyal etki hem yapraklarda hem de kozalaklarda gözlenirken, Haziran döneminde sadece yapraklarda *E. coli*, *K. pneumonia* ile *C. albicans* organizmalarına karşı bir etkinlik tespit edilmiştir. Eylül döneminde ise antimikrobiyal etkinlik sadece *P. aeruginosa*'ya karşı gözlenmiştir. Bu sonuç bize bitkilerdeki antimikrobiyal etkinlik gösteren aktif bileşenlerin zamanla değiştiğini göstermektedir. Diğer taraftan, *P. nigra* subsp. *pallasiana* uçucu yağları *C. libani*'ye göre tamamen farklı seyreden bir antimikrobiyal etkinlik ortaya koymuştur. *P. nigra* yaprak uçucu yağları, Nisan döneminde sadece *B. megaterium*, *K. pneumonia*, *E. coli* ve *C. albicans*'a karşı antimikrobiyal etkinlik gösterirken, Haziran döneminde kozalaklarda da 4, yapraklarda ise 6 organizmaya karşı aktivite ortaya çıkmıştır. Eylül döneminde ise hem yapraklarda hem de kozalaklarda mikroorganizma çeşitliliği açısından daha geniş bir spektrumda antimikrobiyal aktivite gözlenmiştir. Fitokimyasallar genellikle küçük organik moleküller olarak bilinirler ve hidrofobik olup tabiatlı antimikrobiyal özelliklere sahiptirler. Bu özellikleri daha çok sitoplazmik zar koagülasyonu, itici proton güç bozunumu, elektron akışı bozunumu ve aktif taşıma dengesizlikleri ile fosfolipaz ve esteraz enzimlerinin inhibisyonu gibi durumları ortaya çıkararak antimikrobiyal etkinlik gerçekleştirebilmektedirler (Sikkema, 1995; Carlson ve ark., 2002; Silva ve ark., 2012). Alpha- pinen, *P. nigra* subsp. *pallasiana* ve *C. libani*'den elde edilen uçucu yağların ana bileşenlerinden birisidir ve muhtemel antimikrobiyal aktiveden sorumludur. Bu bileşenin antimikrobiyal etkinliklerinin olmadığını belirten (Koutsoudaki ve ark., 2005; Zore ve ark., 2011) araştırmalar olmasına rağmen, antimikrobiyal etkinliklerini ortaya koyan daha detaylı araştırmalar da mevcuttur (Aligiannis ve ark., 2001; Leite ve ark., 2007, Silva ve ark., 2012).

Çizelge 4. *C. libani* yaprak ve kozalaklarının farklı dönemlerde elde edilen uçucu yağlarının antimikrobiyal aktiviteleri  
Table 4. Antimicrobial activities of essential oils of *C. libani* needle and cones obtained in different periods

Mikroorganizma	Nisan		Temmuz		Eylül	
	Yaprak	Kozalak	Yaprak	Kozalak	Yaprak	Kozalak
<i>B. subtilis</i> ATCC 6633	12	13	-	-	-	-
<i>S. aureus</i> ATCC 25923	12	12	-	-	-	-
<i>K. pneumonia</i> *	13	12	12	-	-	-
<i>E. coli</i> ATCC 39628	12	13	12	-	-	-
<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853	12	13	-	-	13	12
<i>E. aerogenes</i> ATCC 13048	12	13	-	-	-	-
<i>C. albicans</i> *	18	16	12	-	-	-
<i>S. cerevisia</i>	12	13	-	-	-	-
<i>Y. lipolytica</i>	18	15	-	-	-	-

\* Klinik İzolat

Çizelge 5. *P. nigra* subsp. *pallasiana* yaprak ve kozalaklarının farklı dönemlerde elde edilen uçucu yağlarının antimikrobiyal aktiviteleri

Table 5. Antimicrobial activities of essential oils of *P. nigra* subsp. *pallasiana* needle and cones obtained in different periods

Mikroorganizma	Nisan		Temmuz		Eylül	
	Yaprak	Kozalak	Yaprak	Kozalak	Yaprak	Kozalak
<i>B. subtilis</i> ATCC 6633	-	-	-	-	12	12
<i>S. aureus</i> ATCC 25923	-	-	12	-	12	12
<i>K. pneumonia</i> *	16	-	12	12	14	13
<i>E. coli</i> ATCC 39628	16	-	12	-	12	12
<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853	-	-	12	12	13	13
<i>E. aerogenes</i> ATCC 13048	-	-	14	13	14	14
<i>C. albicans</i> *	-	-	-	-	12	13
<i>S. cerevisia</i>	-	-	12	12	-	-
<i>Y. lipolytica</i>	-	-	-	-	-	-

\* Klinik İzolat

## Sonuç

Bu çalışmada, *C. libani* ve *P. nigra* subsp. *pallasiana*'nın iğne yaprak ve meyvelerine ait uçucu yağların bileşimi, flavonoid ve antimikrobiyal aktivitelerinin değerlendirilmesi gerçekleştirilmiştir. *P. nigra* subsp. *pallasiana*'nın alfa-pinen içeriğinin Nisan döneminde en az olmakla birlikte zamana bağlı olarak artarak Eylül döneminde en çok miktara ulaşmaktadır. Diğer taraftan, *C. libani*'nin uçucu yağ analizlerinde ise alfa-pinen miktarı *P. nigra* subsp. *pallasiana*'dakinden tam tersi bir şekilde en yüksek Nisan ayında gözlenirken bu değer dereceli olarak Eylül ayına kadar neredeyse 3 kat azalmıştır. *C. libani* uçucu yağların antimikrobiyal aktiviteleri Nisan Döneminde en yüksek, Eylül döneminde ise gözlenmemesi, *P. nigra* subsp. *pallasiana* da Nisan döneminde olmaması ve giderek artan bir şekilde Eylül döneminde yaygın bir antimikrobiyal etki gözlenmesi, dönemsel olarak değişen uçucu yağ içerikleri ile antimikrobiyal etkinlik arasındaki ilişkiyi ortaya koymaktadır. Antimikrobiyal aktivite sonuçlarına paralel bir şekilde değişen yağ içeriği ana bileşeni ise alfa-pinen dir. Bu çalışma aerosollerle birleşerek ikincil organik aerosol üretimine katkıda bulunan alfa ve beta pinen, limonen, beta karyofileni bitkilerin major bileşenler olarak içerdiğini ve bu bileşenlerin antimikrobiyal aktiviteden sorumlu ana bileşik olduğunu desteklemektedir. Etki mekanizmasının aydınlatılması için daha fazla araştırmaya ihtiyaç olduğu gibi, bu içeriğin değerlendirilmesinde mevsimsel değişimin etkisi göz ardı edilmemelidir. Ayrıca tıbbi çalışmalarla kanser, antidiabetik çalışmalar, cilt, nörolojik ve kardiyolojik rahatsızlıklar üzerinde yararlı etkileri tespit edilen başta kuersetin ve kamferol olmak üzere, resveratrol, naringin ve antimikrobiyal özellikleriyle öne çıkan rutin flavonoidlerine sahip olduğu bu çalışmayla ilk kez gösterilmiştir.

## Kaynaklar

- Adio AM. 2009. Germacrenes A–E and related compounds: thermal, photochemical and acid induced transannular cyclizations. *Tetrahedron*. 65 (8): 1533–1552. doi:10.1016/j.tet.2008.11.050.
- Aliğannis N, Kalpoutzakis E, Chinou IB, Mitakou S, Gikas E, Tsarbopoulos A. 2001. Composition and antimicrobial activity of the essential oils of five taxa of *Sideritis* from Greece. *J. Agric. Food Chem.*, 49(2): 811-815.
- Arora D, Kaur J. 1999. Antimicrobial activity of spices. *Int. J. Antimicrob. Agents*. 12: 257–262.

- Arul S, Rajagopalan H, Ravi J, Dayalan H. 2020. Beta-Caryophyllene Suppresses Ovarian Cancer Proliferation by Inducing Cell Cycle Arrest and Apoptosis. *Anti-cancer Agents Med. Chem.* doi: 10.2174/1871520620666200227093216.
- Avcı AB, Bilir N. 2017. Effects of growth and geographic characteristics on essential oil of taurus cedar (*Cedrus libani* A. Rich.). *Fresenius Environmental Bulletin*, 26(6):3919-3923.
- Aydın E, Türkez H, Geyikoğlu F. 2013. Antioxidative, anticancer and genotoxic properties of  $\alpha$ -pinene on N2a neuroblastoma cells. *Biologia*, 68(5): 1004-1009.
- Baldissera MD, Souza CF, Grando TH, Doleski PH, Boligon AA, Stefani LM, Monteiro SG. 2017. Hypolipidemic effect of  $\beta$ -caryophyllene to treat hyperlipidemic rats. *N-S Arch Pharmacol*, 390(2): 215-223.
- Basha RH, Sankaranarayanan C. 2016.  $\beta$ -Caryophyllene, a natural sesquiterpene lactone attenuates hyperglycemia mediated oxidative and inflammatory stress in experimental diabetic rats. *Chem-Biol Interact*, 245: 50-58.
- Başer KHC, Demircakmak B. 1995. The essential oil of taurus cedar (*Cedrus libani* A. rich): Recent results. *Chemistry of Natural Compounds*, 31(1): 16-20.
- Baytop T. 1999. Türkiye'de Bitkiler ile Tedavi, Nobel Tıp Kitapevleri, İstanbul, 4-10.
- Berman AY, Motechin RA, Wiesenfeld MY, Holz MK. 2017. The therapeutic potential of resveratrol: a review of clinical trials. *NPJ Precision Oncology*, 1(1): 1-9.
- Bilir N Avcı, AB. 2013. Essential oil in taurus cedar (*Cedrus libani* A. Rich) seeds. *J. Essent.*, 16(4): 538-544.
- Botsoglou NA, Fletouris DJ, Florou-Paneri P, Christaki E, Spais AB. 2003. Inhibition of lipoxidation in long-term frozen stored chicken meat by dietary oregano essential oil and  $\alpha$ -tocopheryl acetate supplementation. *Food Res. Int.*, 36: 207-213.
- Butler P. 2010. It's Like Magic; Removing Self-Adhesive Stamps from Paper. *American Philatelist*. APS. 124(10): 910–913.
- Canard D, Perru O, Tauzin V, Devillard J, Bonhoure JP. 1997. Terpene composition variations in diverse provenances of *Cedrus libani* (A.) Rich. and *Cedrus atlantica* Manet. *Trees*, 11: 504–510.
- Carlson CF, Mee BJ, Riley TV. 2002. Mechanisms of action of *Melaleuca alternifolia* (tea tree) oil on *Staphylococcus aureus* determined by time kill, lysis, leakage and salt tolerance assays and electron microscopy. *Antimicrob. Agent. Chemother.*, 46:1914-1920.
- Collins CH, Lyne PM, Grange JM. 1989. *Microbiological Methods*. Butterworths & Co. (Publishers) Ltd. London, 450s.
- Efe R, Soykan A, Cürebal İ, Sönmez S. 2013. Balıkesir'in Ağaçları ve Çalıkları. Balıkesir Belediyesi Kent Arşivi Yayınları, No:8, Sy: 177.

- Faydaoğlu E, Sürücüoğlu M. 2013. Tıbbi ve aromatik bitkilerin antimikrobiyal, antioksidan aktiviteleri ve kullanım olanakları. EÜFBED-Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi, 6(2): 233-265.
- Feucht W, Schmid M, Treutter D. 2016. Acclimation changes of flavonoids in needles of conifers during heat and drought stress 2015. *Climate*, 4(3): 35.
- Fidyk K, Fiedorowicz A, Strzdała L, Szumny A. 2016.  $\beta$ -caryophyllene and  $\beta$ -caryophyllene oxide—natural compounds of anticancer and analgesic properties. *Cancer Med.*, 5(10): 3007-3017.
- Gamon JA, Huemmerich KF, Wong CY, Ensminger I, Garrity S, Hollinger DY, Peñuelas J. 2016. A remotely sensed pigment index reveals photosynthetic phenology in evergreen conifers. *PNAS*, 113(46): 13087-13092.
- Ganeshpurkar A, Saluja AK. 2017. The pharmacological potential of rutin. *Saudi Pharm J*, 25(2): 149-164.
- Garcia G, Garcia A, Gibernau M, Bighelli A, Tomi F. 2017. Chemical compositions of essential oils of five introduced conifers in Corsica. *Nat Prod Res*, 31(14): 1697-1703.
- Iacopini P, Baldi M, Storch P, Sebastiani L. 2008. Catechin, epicatechin, quercetin, rutin and resveratrol in red grape: Content, in vitro antioxidant activity and interactions. *J Food Compost Anal*, 21(8): 589-598.
- Imelouane B, Elbachiri A, Ankit M, Benzeid H, Khedid K. 2009. Physico-chemical compositions and antimicrobial activity of essential oils of Eastern Moroccan *Lavandula dendata*. *Int. J. Agric. Biol.*, 11: 113-118.
- Jadhav R, Puchchakayala G. 2012. Hypoglycemic and antidiabetic activity of flavonoids: boswellic acid, ellagic acid, quercetin, rutin on streptozotocin-nicotinamide induced type 2 diabetic rats. *Int J Pharm Pharm Sci*, 4(2):251-256.
- Javanmardi J, Stushnoff C, Lcke E, Vivanco JM. 2003. Antioxidant activity and total phenolic content of Iranian *Acimum* Accessions. *Food Chem*. 83:547-550.
- Kähkönen MP, Hopia AI, Vuorela HJ, Rauha JP, Pihlaja K, Kujala TS, Heinonen M. 1999. Antioxidant activity of plant extracts containing phenolic compounds. *J. Agric. Food Chem*. 47:3954-3962.
- Kılıç A. 2008. Uçucu Yağ Elde Etme Yöntemleri. *Bartın Orman Fakültesi Dergisi*, 10(13):37-45.
- Kızılarlan Ç, Sevgi E. 2013. Ethnobotanical uses of genus *Pinus* L.(Pinaceae) in Turkey. *Indian J Tradit Know*, 12(2):209220.
- Klaus KK, Matzke N. 2019. Morphological traits and their impact on the historical biogeography in conifers. In *Society for Systematic Biology Mayr Award Symposium*.
- Koutsoudaki C, Krsek M, Rodger A. 2005. Chemical composition and antibacterial activity of the essential oil and the gum of *Pistacia lentiscus* var. *chia*. *J Agric Food Chem*, 53(20): 7681-7685.
- Leite AM, Lima EO, Souza EL, Diniz MF, Trajano VN, Medeiros IA. 2007. Inhibitory effect of  $\beta$ -pinene,  $\alpha$ -pinene and eugenol on the growth of potential infectious endocarditis causing Gram-positive bacteria. *Braz J Pharm Sci*, 43:121- 126.
- Loizzo MR, Saab AM, Statti GA, Menichini F. 2007. Composition and  $\alpha$ -amylase inhibitory effect of essential oils from *Cedrus libani*. *Fitoterapia*, 78(4): 323-326.
- Macchioni F, Cioni PL, Flamini G, Morelli I, Maccioni S, Ansaldi M. 2003. Chemical composition of essential oils from needles, branches and cones of *Pinus pinea*, *P. halepensis*, *P. pinaster* and *P. nigra* from central Italy. *Flavour Frag J*, 18(2): 139-143.
- Malika N, Faid M, Chakib EA. 2004. Antimicrobial activities of natural honey from aromatic and medicinal plants on antibiotic-resistant strains of bacteria. *Int. J. Agric. Biol.* 6: 289-293.
- Mamoci E, Mara K, Lloha I, Andrés MF, Olmeda S, González-Coloma A. 2020. Chemical composition and antimicrobial activity of essential oils from Albanian conifer plants. 55th Croatian & 15th International Symposium on Agriculture, February 16-21, p.213-217, Vodic, Croatia.
- Mohammed FS, Akgul H, Sevindik M, Khaled BMT. 2018. Phenolic content and biological activities of *Rhus coriaria* var. *zebaria*. *Fresenius Environmental Bulletin*, 27(8): 5694-5702.
- Mohammed FS, Karakaş M, Akgül H, Sevindik M. 2019. Medicinal Properties of *Allium calocephalum* Collected from Gara Mountain (Iraq). *Fresen Environ Bull*, 28(10): 7419-7426.
- Naeem I, Taskeen A, Mubeen H, Maimoona A. 2010. Characterization of flavonols present in barks and needles of *Pinus wallichiana* and *Pinus roxburghii*. *Asian J Chem*, 22(1): 41-44.
- Pehlivan M, Sevindik M. 2018. Antioxidant and antimicrobial activities of *Salvia multicaulis*. *Turkish Journal of Agriculture-Food Science and Technology*, 6(5): 628-631.
- Ravichandran C, Badgujar PC, Gundev P, Upadhyay A. 2018. Review of toxicological assessment of d-limonene, a food and cosmetics additive. *Food Chem Toxicol*, 120: 668-680.
- Rezzi S, Bighelli A, Mouillot D, Casanova J. 2001. Composition and chemical variability of the needle essential oil of *Pinus nigra* subsp. *laricio* from Corsica. *Flavour Frag J*, 16(5): 379-383.
- Roussis V, Petrakis PV, Ortiz A, Mazomenos BE. Volatile constituents of needles of five *Pinus* species grown in Greece. *Phytochemistry*, 39: 357-361.
- Saab AM, Harb FY, Koenig WA. 2005. Essential oil components in heart wood of *C.libani*, *C. atlantica* in Lebanon. *Minerva Biotec.*, 17:159-161.
- Semaan MT, Dodd RS. 2008. Genetic variability and structure of the remnant natural populations of *Cedrus libani* (Pinaceae) of Lebanon. *Tree Genet Genomes*, 4(4): 757-766.
- Sevindik M, Akgul H, Pehlivan M, Selamoglu Z. 2017. Determination of therapeutic potential of *Mentha longifolia* ssp. *longifolia*. *Fresen Environ Bull*, 26(7): 4757-4763.
- Sezik E, Üstün O, Demirci B, Başer KHC. (2010). Composition of the essential oils of *Pinus nigra* Arnold from Turkey. *Turk J Chem*, 34(2): 313-325.
- Sharma K, Mahato N, Cho MH, Lee YR. 2017. Converting citrus wastes into value-added products: Economic and environmentally friendly approaches. *Nutrition*, 34: 29-46.
- Shi X, Liu D, Zhang J, Hu P, Shen W, Fan B, Wang X. 2016. Extraction and purification of total flavonoids from pine needles of *Cedrus deodara* contribute to anti-tumor in vitro. *BMC Complement Altern Med*, 16(1): 1-9.
- Sikkema J, De Bonte JAM, Poolman B. 1995. Mechanisms of membrane toxicity of hydrocarbons. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, 59:201-222.
- Silva ACR, Lopes PM, Azevedo MMB. 2012. Biological Activities of  $\alpha$ -Pinene and  $\beta$ -Pinene Enantiomers. *Molecules*, 17:6305-6316.
- Skerget M, Kotnik P, Hadolin M, Hras AR, Simonic M, Knez Z. 2005. Phenols, proanthocyanidins, flavones and flavonols in some plant materials and their antioxidant activities. *Food Chem*, 89:191-198.
- Tumen I, Hafizoglu H, Kilic A, Dönmez IE, Sivrikaya H, Reunanen M. 2010. Yields and constituents of essential oil from cones of Pinaceae spp. natively grown in Turkey. *Molecules*, 15(8):5797-5806.
- Vieira AJ, Beserra FP, Souza MC, Totti BM, Rozza AL. 2018. Limonene: Aroma of innovation in health and disease. *Chem-Biol Interact*, 283:97-106.
- Zore GB, Thakre AD, Jadhav S, Karuppaiyl SM. 2011. Terpenoids inhibit *Candida albicans* growth by affecting membrane integrity and arrest of cell cycle. *Phytomedicine*, 18(13):1181-1190.