

CİLT ENFEKSİYONLARININ GELENEKSEL TEDAVİSİNDE KULLANILAN *ONONIS SPINOSA* L. KÜLÜNÜN ANTİFUNGAL ETKİSİNİN ARAŞTIRILMASI*

INVESTIGATION OF ANTIFUNGAL ACTIVITY OF *ONONIS SPINOSA* L. ASH USED FOR THE THERAPY OF SKIN INFECTIONS AS FOLK REMEDIES

Ergin Murat ALTUNER¹, Talip ÇETER¹, Cemil İŞLEK²

¹ Kastamonu Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi, Biyoloji Bölümü, Kastamonu. (ergin.murat.altuner@gmail.com)

² Niğde Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi, Biyoloji Bölümü, Niğde.

ÖZET

Yüzyıllardır halk arasında uygulanan geleneksel bitki tedavileri, son yıllarda bitkisel kaynaklı doğal ürünlerin kullanımına karşı eğiliminin artmasıyla yeniden ilgi odağı olmuştur. Buna ek olarak günümüzde fırsatçı mantar enfeksiyonlarının morbidite ve mortalitesindeki artış ve mantarların antifungal ajanlara karşı hızla geliştirdikleri direnç sorunu, bitki kaynaklı preparatların yeni antifungaller olarak kullanıldığı geleneksel tedavi alternatifini de gündeme getirmektedir. *Leguminosae* ailesinde yer alan *Ononis spinosa* L. (kayışkıran otu), birçok hastalığın yanı sıra deri lezyonları ve/veya enfeksiyonlarının geleneksel tedavisinde kullanılmaktadır. Yapılan çalışmalar da, *Ononis spinosa* (OS)'nin antibakteriyel, antifungal, antiinflamatuar ve analjezik etkileri olduğunu desteklemektedir. Bu bitkinin genellikle kök ve aerial kısımlarının kullanılmasına karşın; ülkemizin Güneydoğu Anadolu Bölgesi'nde, cilt enfeksiyonlarına karşı yerel halk, OS külünü daha yaygın olarak kullanmaktadır. Literatür taramasında bu bitkinin külünden elde edilen ekstraktların antifungal etkileri ile ilgili herhangi bir çalışmaya rastlanmamıştır. Bu çalışmanın amacı, Şırnak'ın Cizre ilçesinden toplanan OS örneklerinin 400°C'de yakılmasıyla elde edilen külünün antifungal etkisinin araştırılmasıdır. OS külünün steril distile su ve etanol içinde ekstraksiyonu yapılmış ve elde edilen ekstraktların in vitro antifungal aktiviteleri; bir *Candida albicans* standart suşu (ATCC 95071) ile 9 klinik izolat (*C. albicans*, *Candida glabrata*, *Candida tropicalis*, *Candida krusei*, *Candida guilliermondii*, *Candida parapsilosis*, *Candida pelliculosa*, *Trichosporon asahii*, *Trichophyton rubrum*) olmak üzere toplam 10 mantar suşu üzerinde disk difüzyon (DD) yöntemi ile araştırılmıştır. Elde edilen veriler mikrodilüsyon yöntemi ile belirlenen minimal inhibitör konsantrasyon (MİK) ve minimal fungisidal konsantrasyon (MFK) değerleri ile de desteklenmiştir. Çalışmamızda, OS külünün hem su hem de etanol ekstraktlarının *C. albicans* standart suşuna karşı etkili olduğu saptanmış (DD inhibisyon zonu sırasıyla, 16 ve 15 mm; MİK= 1.25 µg/ml, MFK= 1.25 µg/ml); bir *C. glabrata* klinik izolatı üzerindeki etkinin, sadece etanol ekstraktı ile oluşturulduğu (DD inhibisyon zonu= 10 mm; MİK= 5.00 µg/ml, MFK= 40.00 µg/ml) gösterilmiştir. Buna karşın di-

* Bu çalışma, "International Union of Microbiological Societies (IUMS)" (5-9 Ağustos 2008, İstanbul) kongresinde sunulmuştur.

ğer klinik *Candida* spp. suşları ile *T.asahii* ve *T.rubrum* suşlarına karşı herhangi bir antifungal etki belirle-
nememiştir. Sonuç olarak çalışmamızda, cilt enfeksiyonlarının geleneksel tedavisinde kullanılan OS külü-
nün bazı *Candida* suşları üzerinde antifungal etkisi olduğunu vurgulayan ön veriler elde edilmiş; ancak bu
bulguların daha kapsamlı ve ileri çalışmalarla desteklenmesi gerektiği kanısına varılmıştır.

Anahtar sözcükler: Antifungal etki, *Ononis spinosa* L. külü, disk difüzyon testi, MK, MFK.

ABSTRACT

Traditional folk remedies used for centuries come up focus of interest in recent years, due to the
trend of use of herb-derived natural products. In addition, increasing morbidity and mortality rates of
opportunistic fungal infections and accelerating antifungal resistance rates of fungi lead to the use of al-
ternative therapies with herb-derived preparations as novel antifungals. *Ononis spinosa* L. (spiny resthar-
row), which is classified in Leguminosae family, is one of the plants used in herbal medicine as folk re-
medies for the treatment of skin lesions and/or infections as well as many other disorders. Antibacterial,
antifungal, anti-inflammatory and analgesic effects of *Ononis spinosa* (OS) have already been supported
by different studies. The roots and aerial sections of OS are the mainly employed parts for application,
however local communities inhabiting at southeastern parts of Anatolia, Turkey, employ the ashes of OS
widely to heal the skin infections. There have been no reports about the antifungal activity of OS ashes
as far as the current literature is concerned. The aim of this study was to investigate the antifungal ac-
tivity of ashes of OS, collected from a rural area located at Southeast Anatolia. Ashes of OS have been ob-
tained by burning the plant samples at 400°C, and extracted in sterile distilled water and ethanol. The
efficacy of aqueous and ethanol extracts of OS ashes were tested against 10 fungi, of which one was a
Candida albicans standard strain (ATCC 95071) and the others were clinical isolates (*C.albicans*, *Candida*
glabrata, *Candida tropicalis*, *Candida krusei*, *Candida guilliermondii*, *Candida parapsilosis*, *Candida pellicu-
losa*, *Trichosporon asahii*, *Trichophyton rubrum*). Antifungal susceptibility test was performed by disc dif-
fusion (DD) method and the results were confirmed with minimum inhibitory concentration (MIC) and
minimal fungicidal concentration (MFC) values determined by microdilution method. The results indi-
cated that both aqueous and ethanol extracts of OS ash showed antifungal activity against *C. albicans*
ATCC 95071 (DD inhibition zones were 16 and 15 mm, respectively; MIC= 1.25 µg/ml, MFC= 1.25
µg/ml), whereas against *C.glabrata* clinical isolate only ethanol extract exhibited antifungal activity (DD
inhibition zone= 10 mm, MIC= 5.00 µg/ml, MFC= 40.00 µg/ml). No antifungal effect was detected aga-
inst the other clinical *Candida* spp, *T.asahii* and *T.rubrum* isolates. In conclusion, since our results emp-
hasize that extracts of OS ash that traditionally used for skin disorders, showed promising degrees of an-
tifungal activity against some of *Candida* strains, these preliminary data should be supported by further
large-scale studies.

Key words: Antifungal activity, *Ononis spinosa* L. ash, disc diffusion test, MIC, MFC.

GİRİŞ

Bitkilerin antimikrobiyal, antineoplastik ve antioksidan etkileri gibi biyolojik aktiviteleri
ile ilgili araştırmalar son zamanlarda büyük ilgi uyandırmaktadır. Bitkilerin antimikrobi-
yal aktivitelerinin, doğal tedavi ve ilaç ham maddesi olarak kullanımı gibi birçok uygula-
ma alanı vardır^{1,2}. Günümüzde birçok gelişmiş ülkede, tedavide kullanılan maddelerin
yaklaşık %80'i tıbbi bitkilerden elde edilmektedir. Son yıllarda mikroorganizmaların an-
timikrobiyal ajanlara sürekli direnç kazandığı düşünüldüğünde, alternatif tedavilere ihti-
yaç duyulması kaçınılmazdır.

Baklagiller (*Leguminosae*) ailesinde yer alan ve halk arasında "kayışkırın otu" olarak bilinen *Ononis spinosa* L, başta idrar yolları enfeksiyonları, egzama ve diğer deri lezyonları/enfeksiyonları olmak üzere birçok hastalığın geleneksel tedavisinde kullanılmaktadır³⁻⁵. Yapılan çalışmalar da, *O.spinosa* (OS)'nin antibakteriyel, antifungal ve analjezik etkileri olduğunu göstermektedir⁶⁻¹¹.

Ülkemizin Güneydoğu Anadolu Bölgesi'nde cilt lezyonlarına karşı yerel halk, OS'yi doğrudan kullanmak yerine, külünü kullanmakta ve bu uygulama sonucunda lezyonların 4-6 gün içinde iyileştiğini ifade etmektedir (anonim veri). OS'nin antimikrobiyal aktivitesi ile ilgili yapılan az sayıdaki çalışmaya^{8,10-13} rağmen, ulaşılabildiği kadarıyla, bu bitkinin külünden elde edilen ekstraktların antifungal etkileri ile ilgili herhangi bir çalışmaya rastlanmamıştır. Bu çalışmada, OS külünün *Candida* spp., *Trichosporon asahii* ve *Trichophyton rubrum* suşları üzerine in vitro antifungal etkisinin araştırılması amaçlanmıştır.

GEREÇ ve YÖNTEM

Çalışmada kullanılan *Ononis spinosa* L. bitki örnekleri, Şırnak'ın Cizre ilçesinden toplandı ve Ankara Üniversitesi Biyoloji Bölümünde tür düzeyinde tanımlandı. Ekstraktların hazırlanması amacıyla, bitki örnekleri 400°C'de yakıldı ve elde edilen külden 400 mg kullanılarak, 2 ml steril distile su (dH₂O) ve etanol ile oda sıcaklığında 24 saat ekstraksiyon yapıldı. Elde edilen ekstraktlar, Ankara Üniversitesi Biyoloji Bölümü, Bakteriyoloji Laboratuvarı kültür koleksiyonundan alınan *Candida albicans* ATCC 95071 ile Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Laboratuvarından alınan *Candida* spp. (*C.albicans*, *C.glabrata*, *C.tropicalis*, *C.krusei*, *C.guilliermondii*, *C.parapsilosis*, *C.pelliculosa*), *Trichosporon asahii* ve *Trichophyton rubrum* klinik izolatları olmak üzere toplam 10 suş üzerinde denendi.

Bütün mantarlar, patates dekstroz agarda (Oxoid, İngiltere) 28°C'de 48 saat boyunca inkübe edilerek üretildi. Saf olarak üretilen kültürlerden 2-3 koloni alınarak %0.9 steril serum fizyolojik içine aktarıldı ve bulanıklığı 0.5 McFarland standardına eşitlendi. Bu şekilde, içinde ortalama 1.5×10^8 cfu/ml hücre bulunan süspansiyonlar elde edildi.

Antifungal duyarlılık testi için, boş, steril, standart antibiyotik disklerine 4 mg bitki ekstraktının emdirilmesiyle hazırlanan diskler kullanıldı⁸ ve disk difüzyon yöntemi "British Society for Antimicrobial Chemotherapy" tarafından önerildiği şekilde uygulandı¹⁴. Pozitif kontrol olarak standart flukonazol diski kullanıldı. Sonuçlar, minimal inhibitör konsantrasyon (MİK) ve minimal fungusidal konsantrasyon (MFK) değerleri ile de desteklendi.

MİK ve MFK değerlerinin saptanmasında buyyon mikrodilüsyon yöntemi kullanıldı¹⁵. Kısaca, 96 çukurlu mikropklarda dH₂O ve etanol ile elde edilen ekstraktların geniş aralıkta (160-0.312 µg/ml) seri sulandırımı hazırlandı ve yöntem önceden tarif edildiği gibi uygulandı¹⁵. Görsel olarak yapılan değerlendirmede, kontrol çukuruna göre mantar üremesinin %80'inin inhibe edildiği en düşük konsantrasyon, MİK değeri olarak kabul edildi. Mikrodilüsyon yöntemi sonucunda bulanıklık görülmeyen sulandırım çukurlarından alınan 100'er µl örnek Sabouraud dekstroz agar plaklarına ekildi ve mantar kolonilerinin görülmediği en düşük konsantrasyon MFK olarak kabul edildi.

Çalışmada, ekstraksiyon için kullanılan çözücüler ve boş steril antibiyotik diskleri negatif kontrol olarak kullanıldı. Tüm testler paralel olarak üçer kez tekrarlandı.

İstatistiksel analiz için MACANOVA (Version 5.05) programı kullanıldı; $p < 0.05$ değeri istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

BULGULAR

Çalışmamızda, *O.spinosa* L. külünün dH_2O ve etanol ekstraktlarının *C.albicans* standart suşuna, etanol ekstraktının ise *C.glabrata* klinik izolatına antifungal etki gösterdiği saptanmış; diğer *Candida* suşları ile *T.asahii* ve *T.rubrum* suşlarına karşı herhangi bir antifungal etki gözlenmemiştir (2/10). Antifungal etkinin saptandığı suşlar için disk difüzyon testi, MİK ve MFK sonuçları Tablo 1'de, disk difüzyon testine ait görünümler Resim 1'de verilmiştir.

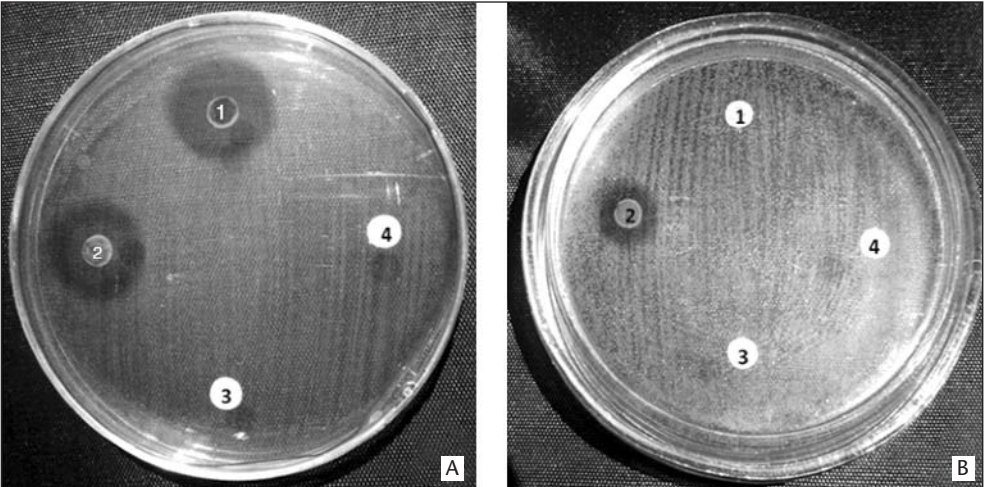
TARTIŞMA

Son yıllarda fırsatçı mantar enfeksiyonlarının morbidite ve mortalitesindeki artış ve invazif mantarların antifungal ajanlara karşı hızla geliştirdikleri direnç sorunu, çeşitli bitki-

Tablo 1. *O.spinosa* Külünün Antifungal Etki Gösterdiği Suşlardan Elde Edilen Sonuçlar

<i>O.spinosa</i>	<i>Candida albicans</i> ATCC 95071			<i>Candida glabrata</i>		
	DD (mm)	MİK ($\mu\text{g/ml}$)	MFK ($\mu\text{g/ml}$)	DD (mm)	MİK ($\mu\text{g/ml}$)	MFK ($\mu\text{g/ml}$)
dH_2O	16.00 ± 0.34	1.25 ± 0.00	1.25 ± 0.00	N	N	N
Etanol	15.00 ± 0.00	1.25 ± 0.00	1.25 ± 0.00	10.00 ± 0.00	5.00 ± 0.00	40.00 ± 0.00

DD: Disk difüzyon testi, MİK: Minimal inhibitör konsantrasyon, MFK: Minimal fungusidal konsantrasyon, N: Etki yok, dH_2O : Distile su.



Resim 1. Disk difüzyon testi sonuçları A) *Candida albicans* ATCC 95071, B) *Candida glabrata* [Disk 1: *O.spinosa* su ekstraktı, Disk 2: *O.spinosa* etanol ekstraktı, Disk 3: dH_2O (Kontrol), 4: Etanol (Kontrol)].

lerden elde edilen preparatların yeni antifungaller olarak kullanıldığı geleneksel tedavi alternatifini gündeme getirmiştir^{1,7,15-17}.

Ülkemizde, Anadolu'nun birçok bölgesinde yaygın olarak bulunan kayışkıran otu (*O. spinosa* L), 30-60 cm yükseklikte, kuvvetli köklü, dikenli, pembe çiçekli, odunlu ve çok yıllık bir bitkidir⁵. Bu bitkinin, kuvvetli diüretik etkisi nedeniyle hipertansiyon ve idrar yolu enfeksiyonlarında; yara iyi edici etkisi nedeniyle de deri hastalıklarının tedavisindeki kullanımı, halk arasında eski zamanlardan beri söz konusudur⁴. Nitekim yapılan çalışmalarda, *Onosis* türlerinin ononin, homopterokarpın ve bir glikozid olan spinonin gibi biyoaktif kimyasallar içerdiği ve antibakteriyel, antifungal, antipiretik, antiinflamatuvar ve antiseptik özellik gösterdiği bildirilmiştir^{1,6,8,10,18}.

O. spinosa (OS)'nın geleneksel tedavi amacıyla kullanılan kısımları genellikle kök ve aerial kısımlarıdır. Ancak ülkemizde bazı bölgelerde, yerel halkın yaptığı uygulama olan OS külünün kullanılması ile ilgili bilimsel bir veriye rastlanmamıştır. Sunulan bu çalışmada, OS külünün in vitro antifungal etkisinin araştırılması amacıyla, steril dH₂O ve etanol içinde hazırlanan ekstraktların aktivitesi, *C. albicans* ATCC 95071 suşu ile 9 farklı klinik izolat üzerinde denenmiştir. Çalışmamızda, OS külünün hem su hem de etanol ekstraktlarının *C. albicans* standart suşuna karşı etkisi olduğu saptanmış; bir *C. glabrata* klinik izolatı üzerindeki etkinin, sadece etanol ekstraktı ile oluşturulduğu gösterilmiştir (Tablo I). Buna karşın diğer klinik *Candida* spp. suşları ile *T. asahii* ve *T. rubrum* suşlarına karşı herhangi bir antifungal etki belirlenmemiştir.

Klinik öneme sahip mantarların, antifungal ilaçlara karşı in vitro duyarlılığının saptanmasında rutin ya da araştırma amaçlı olarak kullanılan birçok yöntem bulunmakla birlikte, çoğunun uygulama ve değerlendirme aşamasında hala tam olarak bir standardizasyon sağlanamamıştır¹⁹. Bu sorun, ekstraksiyon aşaması gerektiren bitkisel preparatların kullanıldığı testler için daha da ciddi boyutlardadır. Son yıllarda, tıbbi değeri olan bitkilerden elde edilen ekstraktların antimikrobiyal etkilerinin araştırılması ile ilgili çalışmalar hız kazanmıştır; ancak bu çalışmalar arasında büyük metodolojik farklılıklar vardır. Bunlar arasında; test edilen bitkisel yapılar (yağ, kök, yaprak, çiçek vb.), kullanılan ekstraksiyon ve saflaştırma yöntemleri, ekstrakte edilen fraksiyonlar, çözücüler (su, eter, etanol, metanol, bütanol vb.), antimikrobiyal duyarlılık yöntemleri (disk difüzyon, agar dilüsyon, buyyon mikrodilüsyon, kolorimetre vb.), sulandırım konsantrasyonları, fitokimyasalların stabiliteyi, kullanılan mikroorganizmalar ve kültür koşulları (besiyeri, inkübasyon süresi ve ısı vb.) gibi çok sayıda değişken sayılabilir^{1,16}. Literatür incelendiğinde -ulaşılabilirdiği kadarıyla-, bitki ekstraktlarının in vitro aktivitelerinin araştırıldığı az sayıda çalışmada "Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI)"un önerdiği yöntemin kullanıldığı; bunların da diğer tıbbi bitkilere göre daha iyi bilinen ve daha çok çalışılan çay ağacı yağı (tea tree oil) ile ilgili olduğu görülmüştür^{20,21}. Bu nedenlerden dolayı, bu tip çalışmalarda standart ya da referans bir yöntemden söz etmek olası görünmemektedir^{1,16}.

Çalışmamızda, OS külünün antifungal etkisinin araştırılmasında, disk difüzyon⁸ ve buyyon mikrodilüsyon yöntemleri¹⁵, ilgili kaynaklardan modifiye edilerek uygulanmıştır. Mahasneh ve El-Oqlah⁸ tarafından gerçekleştirilen benzer bir çalışmada da, OS de dahil olmak üzere çeşitli bitkilerden farklı çözücüler (su, eter, etanol, bütanol) kullanılarak hazırlanan ekstraktların antibakteriyel ve antifungal etkileri disk difüzyon yöntemiyle araştır-

rlmiştir. Bu çalışmacılar, yakmadan hazırladıkları OS bitki ekstraktı içeren disklerle (4 mg/disk), bakteri suşlarına (*Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus*) karşı yüksek (> 8 mm); mantarlara (*Aspergillus flavus*, *Fusarium moniliforme*, *C.albicans*) karşı ise orta düzeyde (6-8 mm) inhibisyon zonu saptamışlardır. Bizim çalışmamızda aynı miktarda ekstrakt içeren diskler kullanıldığı halde, OS külünün etanol ekstraktının, yakılmamış bitkinin etanol ekstraktından yaklaşık 2.5 kat, eter ekstraktından ise yaklaşık 3 kat daha büyük zon oluşturduğu izlenmiştir. Mahasneh ve El-Oqlah⁶ ayrıca OS bütanol ekstraktlarının diğer çözücülerle kıyaslandığında en iyi antibakteriyel ve antifungal etkiyi gösterdiğini de vurgulamıştır. Ülkemizde Çitoğlu ve Altanlar¹⁰, Ankara'nın Kızılcahamam bölgesinden topladıkları OS aerial kısımlarından %75 akuöz etanol ekstraktları hazırlamışlar ve çeşitli bakteri ve mayaların standart suşlarına (*E.coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *B.subtilis*, *S.aureus*, *C.albicans*, *C.glabrata*, *C.krusei*) karşı antimikrobiyal etkisini disk difüzyon yöntemiyle araştırmışlardır. Bu araştırmacılar, OS ekstraktlarının *C.albicans* ve *C.krusei* suşları üzerine, 16 mm'lik zon çapı ile iyi bir inhibitör etki gösterdiğini bildirmişlerdir. Bizim çalışmamızda, OS külünün dH₂O ve etanol ekstraktları, *C.albicans* standart suşu için sırasıyla 16 ve 15 mm'lik inhibisyon zonu oluşturmuş; buna karşın *C.glabrata* klinik izolatına karşı dH₂O ekstraktı herhangi bir etki göstermezken, etanol ekstraktının 10 mm'lik zon oluşturduğu izlenmiştir (Resim 1).

Bitki ekstraktlarının antimikrobiyal etkilerinin araştırılmasında, disk difüzyon testinin yanı sıra bazı araştırmacılar da mikrodilüsyon yöntemini kullanmakta ve sonuçları MİK ve MFK değerleri üzerinden yorumlamaktadırlar. Ancak bu çalışmalarda, kullanılan bitki türleri ve biyoaktivitelerinin, ekstraksiyon yöntemlerinin, sulandırım konsantrasyonlarının ve test edilen mantar türlerinin büyük farklılık göstermesi nedeniyle oldukça geniş bir aralıkta (0.5-> 1000 mg/ml) MİK değerleri bildirilmektedir^{13,15,17,20-24}. Örneğin; Ofori-Kwakye ve arkadaşları²⁴, bir Afrika bitkisinin metanol ekstraktı ile *C.albicans*'a karşı elde ettikleri MİK değerini 45-50 mg/ml; Asres ve arkadaşları²³ başka bir Afrika bitkisinin aseton ekstraktı ile *C.albicans*'a karşı elde ettikleri MİK değerini 400 mg/ml olarak vermektedir. Hammer ve arkadaşları²⁰, çay ağacı yağının aktivitesini 106 dermatofit ve 78 filamentöz mantara karşı araştırmış ve MİK değerlerini %0.004 ile %0.25, MFK değerlerini %< 0.03 ile %8.0 arasında saptamıştır. Bu araştırmacılar, birçok izolat üzerinde çay ağacı yağının inhibitör veya sidal etkisinin konsantrasyona göre farklılık gösterdiğini ifade etmişlerdir²⁴. Fungisidal etki gösteren ajanların MFK ve MİK değerleri birbirine yakınken, fungustatik etki gösteren ajanların MİK değerleri MFK değerlerinden daha düşüktür. Klinik yanıt ile korelasyon ve güvenilir bir in vivo terapötik etki için MFK değerlerinin dikkate alınması gerektiği ifade edilmektedir¹⁹. Çalışmamızda *C.albicans* standart suşu için OS külünün dH₂O ve etanol ekstraktlarının MİK ve MFK değerleri eşit bulunmuş (1.25 µg/ml) ve etkinin fungusidal olduğu düşünülmüştür. Buna karşın *C.glabrata* klinik izolatı için, OS külünün etanol ekstraktının MİK ve MFK değerleri (sırasıyla; 5.00 ve 40.00 µg/ml) arasında önemli fark bulunduğundan fungustatik etki gösterdiği söylenebilir.

Sonuç olarak, sınırlı sayıda mantar izolatı ile gerçekleştirdiğimiz bu çalışmada elde edilen ön bulgular, cilt enfeksiyonlarının geleneksel tedavisinde kullanılan OS külünün bazı *Candida* suşları üzerinde antifungal etkisi olduğunu düşündürmekle birlikte, bu verilerin daha kapsamlı ve ileri çalışmalarla desteklenmesi gerektiği açıktır.

KAYNAKLAR

1. Gurib-Fakim A. Medicinal plants: traditions of yesterday and drugs of tomorrow. *Mol Aspects Med* 2006; 27: 1-93.
2. Samy RP, Gopalakrishnakone P. Therapeutic potential of plants as antimicrobials for drug discovery. *Evid Based Complement Alternat Med* 2008; 7: 283-94.
3. Baytop T. *Therapy with Medicinal Plants in Turkey (Past and Present)*. 1999, 2nd ed. Nobel Medicine Publication, Istanbul.
4. <http://www.dogaltedavi.org/v/kayiskiran2.jpg.html>
5. <http://www.saglikbilimi.com/kayiskiran-koku/>
6. Barrero AF, Sánchez JF, Rodríguez I, Maqueda M. Use of alkenylresorcinols from *Ononis speciosa* as synthetic precursors of compounds with potential biological activity. *J Nat Prod* 1993; 56: 1737-46.
7. Jones FA. Herbs - useful plants. Their role in history and today. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 1996; 8: 1227-31.
8. Mahasneh AM, El-Oqlah AA. Antimicrobial activity of extracts of herbal plants used in the traditional medicine of Jordan. *J Ethnopharmacol* 1999; 64: 271-6.
9. Gruenwald J, Brendler T, Jaenike C. *PDR for Herbal Medicines*. 2001. Medicinal Economic Company, New York.
10. Citoglu G, Altanlar N. Antimicrobial activity of some plants used in folk medicine. *J Fac Pharm, Ankara* 2003; 32: 159-63.
11. Yılmaz BS, Ozbek H, Citoğlu GS, Uğraş S, Bayram I, Erdoğan E. Analgesic and hepatotoxic effects of *Ononis spinosa* L. *Phytother Res* 2006; 20: 500-3.
12. Al-Bakri AG, Afifi FU. Evaluation of antimicrobial activity of selected plant extracts by rapid XTT colorimetry and bacterial enumeration. *J Microbiol Methods* 2007; 68: 19-25.
13. Talib WH, Mahasneh AM. Antimicrobial, cytotoxicity and phytochemical screening of Jordanian plants used in traditional medicine. *Molecules* 2010; 15: 1811-24.
14. British Society for Antimicrobial Chemotherapy (BSAC). 2003. Available from: www.bsac.org.uk/_db/_documents/version215_nov_2003_.pdf
15. Meng F, Zuo G, Hao X, et al. Antifungal activity of the benzo[c]phenanthridine alkaloids from *Chelidonium majus* Linn against resistant clinical yeast isolates. *J Ethnopharmacol* 2009; 125: 494-6.
16. Cowan MM. Plant products as antimicrobial agents. *Clin Microbiol Rev* 1999; 12: 564-82.
17. Webster D, Taschereau P, Belland RJ, Sand C, Rennie RP. Antifungal activity of medicinal plant extracts; preliminary screening studies. *J Ethnopharmacol* 2008; 115: 140-6.
18. Kirmizigül S, Gören N, Yang SW, Cordell GA, Bozok-Johansson C. *Spinonin*, a novel glycoside from *Ononis spinosa* subsp. *leiosperma*. *J Nat Prod* 1997; 60: 378-81.
19. Rex JH, Pfaller MA, Walsh TJ, et al. Antifungal susceptibility testing: practical aspects and current challenges. *Clin Microbiol Rev* 2001; 14: 643-58.
20. Hammer KA, Carson CF, Riley TV. In vitro activity of *Melaleuca alternifolia* (tea tree) oil against dermatophytes and other filamentous fungi. *J Antimicrob Chemother* 2002; 50: 195-9.
21. Vazquez JA, Arganoza MT, Boikov D, Vaishampayan JK, Akins RA. In vitro susceptibilities of *Candida* and *Aspergillus* species to *Melaleuca alternifolia* (tea tree) oil. *Rev Iberoam Micol* 2000; 17: 60-3.
22. Thirach S, Tragoolpua K, Punjaisee S, Khamwan C, Jatisatien C, Kunyanone N. Antifungal activity of some medicinal plant extracts against *Candida albicans* and *Cryptococcus neoformans*. *Acta Horticulturae* 2003; 597: 217-21.
23. Asres K, Mazumder A, Bucar F. Antibacterial and antifungal activities of extracts of *Combretum molle*. *Ethiop Med J* 2006; 44: 269-77.
24. Ofori-Kwakye K, Kwapong AA, Adu F. Antimicrobial activity of extracts and topical products of the stem bark of *Spathodea campanulata* for wound healing. *Afr J Tradit Complement Altern Med* 2009; 6: 168-74.