

## Anti(myco)bacterial and Antifungal Activities of Seed Pods of Four *Vincetoxicum* Taxa Growing in Turkey

Sevda Guzel (Corresponding author)  
Department of Pharmacognosy, Faculty of Pharmacy  
Mersin University, 33169, Mersin, Turkey  
E-mail: guzelsevda@mersin.edu.tr

Mahmut Ulger  
Department of Pharmaceutical Microbiology, Faculty of Pharmacy  
Mersin University, 33169, Mersin, Turkey  
E-mail: mahmutulger@mersin.edu.tr

Gamze Kokdil  
Department of Pharmacognosy, Faculty of Pharmacy  
Mersin University, 33169, Mersin, Turkey  
E-mail: gkokdil@gmail.com

### Abstract

The anti(myco)bacterial and antifungal effects of ethanolic extracts obtained from seed pods of four *Vincetoxicum* taxa (*V. canescens* subsp. *canescens*, *V. canescens* subsp. *pedunculata*, *V. fuscatum* subsp. *fuscatum* and *V. parviflorum*) were examined against two Gram (+) bacterial strains [*Staphylococcus aureus* (ATCC 25925), *Bacillus subtilis* (ATCC 6633)], three Gram (-) bacterial strains [*Acinetobacter baumannii* (ATCC 02026), *Escherichia coli* (ATCC 25923), *Aeromonas hydrophila* (ATCC 95080)] and *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv, and three fungal strains [*Candida glabrata* (ATCC 90030), *Candida tropicalis* (ATCC 750), *Candida parapsilosis* (ATCC 22019)] by using the broth microdilution method. As reference antimicrobial agents Ampicillin, Ethambutol, Isoniazid and Fluconazole were used. Against *A. baumannii* all the tested extracts exhibited significant antibacterial activity with MIC values ranging from 31.25 to 62.5 µg/ml when compared to reference drug Ampicillin (MIC value: 125 µg/ml). Especially, the extract of seed pods of *V. fuscatum* subsp. *fuscatum* was found the most effective extract against *A. baumannii* (MIC value: 31.25 µg/ml).

**Keywords:** Anti(myco)bacterial activity, Antifungal activity, *Vincetoxicum*, Seed pod, Extract.

## Türkiye'de Yetişen Dört *Vincetoxicum* Taksonunun Tohum Zarflarının Anti(miko)bakteriyal ve Antifungal Aktiviteleri

### Özet

Dört *Vincetoxicum* taksonunun (*V. canescens* subsp. *canescens*, *V. canescens* subsp. *pedunculata*, *V. fuscatum* subsp. *fuscatum* ve *V. parviflorum*) tohum zarflarından elde edilen etanol ekstraktlerinin anti(miko)bakteriyal ve antifungal etkileri iki Gram (+) bakteri suşu [*Staphylococcus aureus* (ATCC 25925), *Bacillus subtilis* (ATCC 6633)], üç Gram (-) bakteri suşu [*Acinetobacter baumannii* (ATCC 02026), *Escherichia coli* (ATCC 25923), *Aeromonas hydrophila* (ATCC 95080)] ve *Mycobacterium*

*tuberculosis* H37Rv, ve üç fungal suşu [*Candida glabrata* (ATCC 90030), *Candida tropicalis* (ATCC 750), *Candida parapsilosis* (ATCC 22019)] karşı Sıvı Mikrodilüsyon Yöntemi kullanılarak test edilmiştir. Referans antimikrobiyal ilaçlar olarak Ampisilin, Etambutol, İzoniazid ve Flukonazol kullanılmıştır. *A. baumannii*'ye karşı test edilen tüm ekstreler 31.25-62.5 µg/ml aralığında MİK değerleri ile referans ilaç Ampisilin ile karşılaştırıldığında (MİK değeri: 125 µg/ml) belirgin antibakteriyal aktivite göstermiştir. Özellikle *V. fuscum* subsp. *fuscum*'un tohum zarflarından elde edilen etanol ekstresi *A. baumannii*'ye karşı en etkili ekstre olarak bulunmuştur (MİK değeri: 31.25 µg/ml).

**Anahtar Kelimeler:** Anti(miko)bakteriyal aktivite, Antifungal aktivite, *Vincetoxicum*, Tohum zarfı, Ekstre.

## 1. Giriş

Mikroorganizmaların neden olduğu bulaşıcı hastalıklar, ilaca dirençli suşlar nedeniyle dünya genelinde önemli sağlık sorunları haline gelmiştir (Ngezahayo ve ark. 2017, Shamsizadeh ve ark. 2017). Mikroorganizmaların kendilerine karşı kullanılan antimikrobiyal ilaçlara karşı direnç geliştirme potansiyelleri, sentetik ilaçların yüksek maliyetleri ve istenmeyen yan etkileri (Ngezahayo ve ark. 2017, Paşca ve ark. 2017, Uma ve ark. 2017) nedeniyle enfeksiyon hastalıkları ile etkili mücadelede farklı hareket mekanizmalarına sahip yeni antimikrobiyal ajanların keşfine ihtiyaç duyulmaktadır (Ngezahayo ve ark. 2017). Günümüzde düşük maliyetli yeni antimikrobiyal ajanların keşfinde en popüler yöntem tıbbi bitkilerin kaynak olarak kullanılmasıdır (Uma ve ark. 2017, Ayoub ve ark. 2014).

Bitkiler geleneksel kullanımları, fitokimyasal özellikleri ve farmakolojik etkileri nedeniyle uzun zamandan beri dikkati çekmektedir (Paşca ve ark. 2017). Bitkilerin terapötik etkileri üzerine pek çok çalışma olup yapılan araştırmalar kapsamında Dünya Sağlık Örgütü (DSÖ) tarafından zatürre, diyare, ülser, soğuk algınlığı, bronşit ve solunum yolu hastalıkları gibi çok çeşitli hastalıkların tedavisinde kullanılan 20.000'den fazla tıbbi bitki listelenmiştir (Siddiqui ve ark. 2016). Ayrıca literatür verilerine göre mevcut antimikrobiyal ajanların % 40'ı doğal kaynaklıdır (Ayoub ve ark. 2014).

*Vincetoxicum* N.M. Wolf cinsi (Apocynaceae; subfamilya Asclepiadoideae) (DiTommaso ve ark. 2004, Heywood ve ark. 2007) yaklaşık 100 türü içeren Asya, Avrupa, Japonya (Liede 1996) ve Kuzey Amerika'da (Leimu 2004) yayılış gösteren bir cinistir. *Vincetoxicum* cinsine ait türlerin yaprakları, kökleri ve kuru tohumları çeşitli tıbbi özellikleri nedeniyle geleneksel tıpta kullanılmaktadır (Sliumpaite ve ark. 2013). *V. hircinaria* Medicus, *V. nigrum* (L.) Moench ve *V. stocksii* Ali & Khatoon türleri geleneksel olarak Avrupa ve Çin tedavi sistemlerinde nevroz, sıtma, skofula, yaralanma, rüptür, ateş, uyuz ve yara tedavilerinde kullanılmakta (DiTommaso ve ark. 2004, Sliumpaite ve ark. 2013, Mansoor ve ark. 2011); ekspektoran, diüretik, emetik (Lavault ve ark. 1999, Pavela 2010a), antilayşmanyal (Mansoor ve ark. 2011), antitümör (DiTommaso ve ark. 2004, Nowak ve Kisiel 2000), laksatif ve diyaforetik (DiTommaso ve ark. 2004) etkileri bilinmektedir. Pakistan'da *V. stocksii* türünden elde edilen lapa yara ve eksternal kanserlerin tedavisinde kullanılmaktadır (Mansoor ve ark. 2011). *V. hircinaria* türünün kökleri veteriner hekimlikte ödem ve bazı hastalıkların tedavisinde kullanılmaktadır (DiTommaso ve ark. 2004). Fransa'da "domptevenin" ismiyle bilinen bu tür emetik ve ekspektoran özellikleri nedeniyle kullanılırken (Lavault ve ark. 1994), İtalya'da tüm bitki ve köklerinden elde edilen infüzyon ve dekoksasyonlar zehirlenmelere karşı antidot olarak kullanılmaktadır (Coassini-Locar ve Poldini 1988). Türkiye'de "Kırlangıç kuyruğu ve Panzehir otu" olarak bilinmekte olup köklerin emetik etkisi rapor edilmiştir (Baytop 1984). Doğu Anadolu Bölgesi'nde *V. canescens* (Willd.) Decne. subsp. *canescens* lokal olarak "Zilasur ve Zehir otu" olarak bilinmekte (Altundağ ve Öztürk 2011, Tuzlacı ve Doğan 2010) ve öğütülmüş bitki kısımları dışarıdan uyuz (Altundağ ve Öztürk 2011) ve fungal enfeksiyonların (Altundağ ve Öztürk 2011, Tuzlacı ve Doğan 2010) tedavisinde kullanılmaktadır.

Bu güne kadar yapılan fitokimyasal çalışmalar bu cinse ait türlerin tüm kısımlarında terpenler (Lavault ve ark. 1999, Nowak ve Kisiel 2000), fenantroindolizidin alkaloidleri (Staerk ve ark. 2002, Mogg ve ark. 2008, Gibson ve ark. 2011), steroidler (Nowak ve Kisiel 2000) ve şekerler (Stöckel ve ark. 1969, Güzel ve ark. 2015a); köklerinde asetofenon, uçucu bileşikler (Lavault ve ark. 1999), nişasta (Güzel ve ark. 2015a) ve saponinler (Tanker ve ark. 2004, Güzel ve ark. 2015a); toprak üstü kısımlarında alkanoller (Nowak ve Kisiel 2000) ve tanen (Güzel ve ark. 2017) bulunduğunu göstermiştir. Ayrıca steroidal glikozitler (Nowak ve Kisiel 2000, Pavela 2010a) ve flavonoidler (Zaidi ve Crow 2005, Pavela 2010a) de rapor edilen diğer sekonder bileşiklerdir.

Bu güne kadar yapılan çalışmalarda *V. stocksii* türünün antifungal, antibakteriyal (Mansoor ve ark. 2011, Zaidi ve Crow 2005), antilaysmanyal ve antimalaryal aktiviteleri (Mansoor ve ark. 2011), *V. rossicum* (Kleo.) Barb. ve *V. nigrum* türlerinin antifungal ve antibakteriyal aktiviteleri (Mogg ve ark. 2008, Gibson ve ark. 2011), *V. lutea* L. türünün antioksidan aktivitesi (Sliumpaite ve ark. 2013) bildirilmiştir. Ayrıca *Vincetoxicum* cinsine ait çeşitli türlerin sitotoksik (Staerk ve ark. 2000, Staerk ve ark. 2002), böcekler üzerine antifeedant ve büyüme inhibisyonu (Pavela ve ark. 2010b, Güzel ve ark. 2015a, Güzel ve ark. 2017) etkileri de çeşitli araştırmacılar tarafından rapor edilmiştir.

Türkiye'de *Vincetoxicum* cinsi Asclepiadoideae alt familyasının en büyük cinsi olup 3'ü endemik (*V. canescens* (Willd.) Decne. subsp. *pedunculata* Browicz, *V. fuscatum* (Hornem.) Reichb. subsp. *boissieri* (Kusn) Browicz ve *V. parviflorum* Decne.) olmak üzere 10 takson ile temsil edilmektedir (Browicz 1978, Tanker ve ark. 2004). Türkiye'de yetişen *Vincetoxicum* cinsine ait bazı türler üzerinde ilk fitokimyasal (Güzel ve ark. 2017, Güzel ve ark. 2015a) ve biyoaktivite çalışmaları (*Spodoptera littoralis* ve *Leptinotarsa decemlineata* türlerine karşı antifeedant aktivite (Güzel ve ark. 2017, Güzel ve ark. 2015a) ve *Aspergillus fumigatus* türüne karşı antifungal aktivite (Güzel ve ark. 2015b)) grubumuz tarafından yapılmıştır. Literatür taramaları *Vincetoxicum* cinsinin tohum zarfları üzerine herhangi bir biyoaktivite çalışmasının olmadığını göstermiştir. Bu nedenle bu çalışmada; ikisi endemik olan dört *Vincetoxicum* taksonunun (*V. canescens* subsp. *canescens*, *V. canescens* subsp. *pedunculata*, *V. fuscatum* subsp. *fuscatum* (Hornem.) Reichb. ve *V. parviflorum*) tohum zarflarından elde edilen etanol ekstraktlarının iki Gram (+) bakteri suşuna [*Staphylococcus aureus* (ATCC 25925) ve *Bacillus subtilis* (ATCC 6633)], üç Gram (-) bakteri suşuna [*Acinetobacter baumannii* (ATCC 02026), *Escherichia coli* (ATCC 25923) ve *Aeromonas hydrophila* (ATCC 95080)], *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv ve 3 fungal suşa [*Candida glabrata* (ATCC 90030), *Candida tropicalis* (ATCC 750) ve *Candida parapsilosis* (ATCC 22019)] karşı *in vitro* antimikrobiyal aktivitelerinin araştırılması amaçlanmıştır.

## 2. Materyal ve Metot

### 2.1. Kullanılan Kimyasallar

Izoniazid (Sigma, I3377), Flukonazol (Sigma, F8929), Etambutol (Sigma, E4630), RPMI 1640 Besiyeri (Sigma, R6504), 3-(N-morfolino)-propansülfonik asit (MOPS, Sigma, M1254), Resazurin sodyum tuzu (Sigma R7017), Etanol ve Dimetil sülfoksit (DMSO) Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA) firmasından; Middlebrook 7H9 sıvı besiyeri, kasiton, gliserol ve oleik asit-albümin-dekstroz-katalaz Becton Dickinson (Sparks, MD, USA) firmasından satın alınmıştır. Kullanılan tüm çözeltiler deney sırasında taze hazırlanmış ve distile su kullanılmıştır.

### 2.2. Mikroorganizmalar

Bakteri suşları *Staphylococcus aureus* (ATCC 25925), *Bacillus subtilis* (ATCC 6633), *Escherichia coli* (ATCC 25923), *Acinetobacter baumannii* (ATCC 02026), *Aeromonas hydrophila* (ATCC 95080), *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv ve fungal suşlar *Candida glabrata* (ATCC 90030), *Candida tropicalis* (ATCC 750) ve *Candida parapsilosis* (ATCC 22019) Refik Saydam Hıfzısıhha Enstitüsü'nden (Ankara, Türkiye) temin edilmiştir.

### 2.3. Bitki Materyali

Çalışmada kullanılan bitkiler Türkiye'nin farklı bölgelerinde, doğal habitatlarından uygun toplama zamanlarında toplanmış, Dr. Sevda Güzel ve Dr. Ahmet İlçim (Biyoloji Bölümü, Fen-Edebiyat Fakültesi, Mustafa Kemal Üniversitesi, Antakya, Türkiye) tarafından teşhis edilmiştir. Bitki materyallerine ait herbaryum örnekleri Mustafa Kemal Üniversitesi herbaryumunda saklanmakta olup örneklere ait bilgiler ve herbaryum numaraları Tablo 1'de verilmiştir.

### 2.4. Ekstraksiyon prosedürü

Gölgede kurutulmuş tohum zarfları tohumlarından ayrıldıktan sonra değirmende (Retsch SK 100, Retsch GmbH, Haan, Almanya) toz edilmiştir. Toz bitki materyali %96'lık etanolla (100 g bitki materyali: 500 ml etanol) ultrasonik karıştırıcıda (Bandelin Sonorex, Bandelin Elektronik GmbH & Co.KG, Berlin, Almanya) 30 dakika karıştırılmış ve ardından oda sıcaklığında bir gece karıştırıcıda (Stirrer DLS-Velp Scientifica, İtalya) karıştırılarak bekletilmiştir (Mogg ve ark. 2008). Daha sonra süspansiyon Whatman No.1 filtre

kağıdından geçirilerek süzölmüş ve kalan artık üzerine etanol eklenerek aynı işlem iki kez daha tekrarlanmış, süzölmüştür. Süzöntöler birleştirilmiş ve çözücü düşük sıcaklık altında rotary-evaporatörde (Heidolph-Rotary TLR 1000, Heidolph Instruments GmbH & Co.KG, Schwabach, Almanya) uçurulmuş, elde edilen ekströler kullanılarına kadar +4°C'de karanlıkta saklanmıştıır.

### 2.5. Antibakteriyal Aktivite Testi

Dört *Vincetoxicum* taksonunun tohum zarflarından elde edilen etanol ekströleri iki Gram (+) (*S. aureus* ve *B. subtilis*) ve üç Gram (-) (*E. coli*, *A. baumannii* ve *A. hydrophila*) standart bakteri suşuna karşı Sıvı Mikrodilüsyon Yöntemi kullanılarak *in vitro* antibakteriyal aktiviteleri için test edilmiştir. Geniş spektrumlu yarı sentetik penisilin olan Ampisilin çalışmada referans antibakteriyal ilaç olarak kullanılmıştır. Her bir etanol ekstresi DMSO'da çözümlenerek 2000 µg/ml konsantrasyonda hazırlanmıştır. Steril mikropalak kuyularına Mueller-Hinton sıvı besiyerinden ve çözümlenmiş bitki ekströlerinden eklenmiştir. Bir seri seyreltme işlemi sonucu test edilecek ekströlerin konsantrasyonları 1000, 500, 250, 125, 62.5, 31.25, 15.62, 7.8, 3.9 ve 1.9 µg/ml olarak ayarlanmıştıır (Erşen ve ark. 2017). Her bir standart bakteri suşundan ayrı bir steril tüpte 0.5 McFarland yoğunluğunda bakteri süspansiyonu hazırlanmış ve bu süspansiyon daha sonra steril distile su ile 1:20 oranında seyreltilmiştir. Bu süspansiyondan besiyeri ve ekstre bulunan her bir kuyuya 10 µl ilave edilmiştir. Böylece kuyulardaki son bakteri yoğunluğu 5x10<sup>5</sup> CFU/ml'ye ayarlanmıştıır (CLSI 2012). Bu işlem standart ilaç Ampisilin içinde ayrıca yapılarak aynı seyreltme serisi elde edilmiştir. Sadece besiyeri içeren kuyularda ekströler ile aynı seyreltme serisi hazırlanarak çözücünün (DMSO) mikrobiyal büyüme etkisi de test edilmiş ve çözücünün test edilen mikroorganizmalar üzerinde herhangi bir büyüme etkisinin olmadığı tespit edilmiştir. Deneyler iki tekrarlı yapılmış ve her bir ekströnin minimum inhibitör konsantrasyon (MİK) değeri belirlenmiştir (Erşen ve ark. 2017).

### 2.6. Antimikobakteriyal Aktivite Testi

Ekstreler *M. tuberculosis* H37Rv standart suşuna karşı Resazurin Mikropalak Yöntemi kullanılarak *in vitro* antimikobakteriyal aktiviteleri için test edilmiştir (Nateche ve ark. 2006).

1. Besiyeri: Bu yöntemde %0.1 kaziton, %0.5 gliserol ve %10 oleik asit-albümin-dekstroz-katalaz ile zenginleştirilmiş Middlebrook 7H9 besiyeri bazlı 7H9-S besiyeri kullanılmıştıır.

2. Resazurin: Resazurin çalışma solüsyonu distile su ile %0.01 (a/h) konsantrasyonda hazırlanmış ve 0.22 µm çapındaki membran filtreden (Ministar, Sartorius Stedim Biotech GmbH, Goettingen, Almanya) geçirilerek steril edilmiştir.

3. Resazurin Mikropalak Yöntemi: Çalışmada, küçük değışiklikler yapılmakla birlikte Nateche ve ark.(2006)'nın kullandığı yöntem referans alınmıştır. Çalışma çift tekrarlı yapılmıştır. Referans ilaçlar olarak İzoniazid ve Etambutol kullanılmıştıır. Ekstrelerin ve referans ilaçların ayrı ayrı 2000 µg/ml konsantrasyonda stok solüsyonları DMSO ile hazırlanmış ve 0.22 µm çapında membran filtrelerden geçirilerek steril edilmiştir. Hazırlanan solüsyonların iki kat seri seyreltmeleri 96 kuyulu mikropalaklarda 100 µl 7H9-S besiyeri ile yapılmış ve böylece 250-0.12 µg/ml son konsantrasyon değeri elde edilmiştir. Çalışılan her bir plağa standart antibiyotik içermeyen bir üreme kontrolü ve inokulum içermeyen bir sterilite kontrolü ilave edilmiştir. Löwenstein-Jensen besiyerinde üreyen H37Rv kolonilerinden bir öze dolusu alınarak, içerisinde bir miktar steril cam boncuk bulunan 5 ml 7H9-S besiyerinde süspanse edilmiş; hazırlanan bu süspansiyon 2 dakika boyunca vorteks ile karıştırılmış ve daha sonra 30 dakika boyunca hareket ettirilmeden bekletilerek büyük partiköllerin ve besiyeri kalıntılarının dibe çökmesi sağlanmıştıır. Süre sonunda süpernatant yeni bir steril tüpe aktarılmış ve besiyeri ile McFarland no:1 bulanıklık değeriinde süspansiyon hazırlanmıştır. Hazırlanan bu süspansiyon daha sonra yine 7H9-S besiyeri ile 1:20 oranında dilüe edilmiştir. Hazırlanan son süspansiyondan 100 µl plak kuyularına ilave edilmiş ve plaklar parafilm ile kapatılarak 37°C'de normal atmosferde 7 gün boyunca inkübasyona bırakılmıştıır. İnkübasyon sonunda bütün kuyulara 30 µl resazurin çalışma solüsyonu ilave edilerek plaklar 1 gün daha inkübasyona bırakılmış ve sonuçlar görsel olarak değerlendirilmiştir. Resazurin renginin maviden pembeye dönmesi resazurin redükte olduğunu, yani ilgili kuyuda bakteri üremesi olduğunu göstermektedir. Çalışma sonunda MİK değeri, maviden pembeye renk değışimini engelleyen en düşük konsantrasyon değeri olarak belirlenmiştir.

### 2.7. Antifungal Aktivite Testi

Ekstrelerin *in vitro* antifungal aktiviteleri *C. glabrata*, *C. tropicalis* ve *C. parapsilosis* fungal suşlarına karşı NCCLS M27-A2 (NCCLS 2002) standart protokolü kullanılarak Sıvı Mikrodilüsyon Yöntemi ile test edilmiştir (Sönmez ve ark. 2010, Güzeldemirci ve Küçükbaşmacı 2010). Referans antifungal ilaç olarak sentetik triazol olan Flukonazol seçilmiştir. Çalışmada 0.165 M 3-(N-morfolino)-propansülfonik asit ile pH'sı 7.0'a ayarlanmış RPMI 1640 besiyeri kullanılmıştır. Standart suşların RPMI 1640 besiyerinde önce 1:100 daha sonra 1:20 seyreltilmiş, çalışma süspansiyonları hazırlanmıştır. Etanol ekstreleri ve standart ilacın ayrı ayrı 1000 µg/ml konsantrasyonda stok solüsyonları DMSO'da hazırlanmış ve 0.22 µm çapındaki membran filtreden geçirilerek steril edilmiştir. Hazırlanan solüsyonların ve standart ilacın iki kat seri seyreltmeleri 96 kuyulu mikropklarda RPMI 1640 besiyeri ile yapılmış ve böylece 250-0.12 µg/ml son konsantrasyon değerleri elde edilmiştir. Çalışılan her bir plağa standart antibiyotik içermeyen bir üreme kontrolü ve inokulum içermeyen bir sterilite kontrolü ilave edilmiştir. Çalışılan her bir kuyuya hazırlanan inokulum süspansiyonundan 100 µl eklenmiş, plaklar 35°C'de normal atmosferde 48 saat inkübasyona bırakılmış ve süre sonunda sonuçlar görsel olarak değerlendirilmiştir. MİK değerleri test edilen ekstrelerin üremeyi inhibe ettiği en düşük konsantrasyon değeri olarak belirlenmiştir.

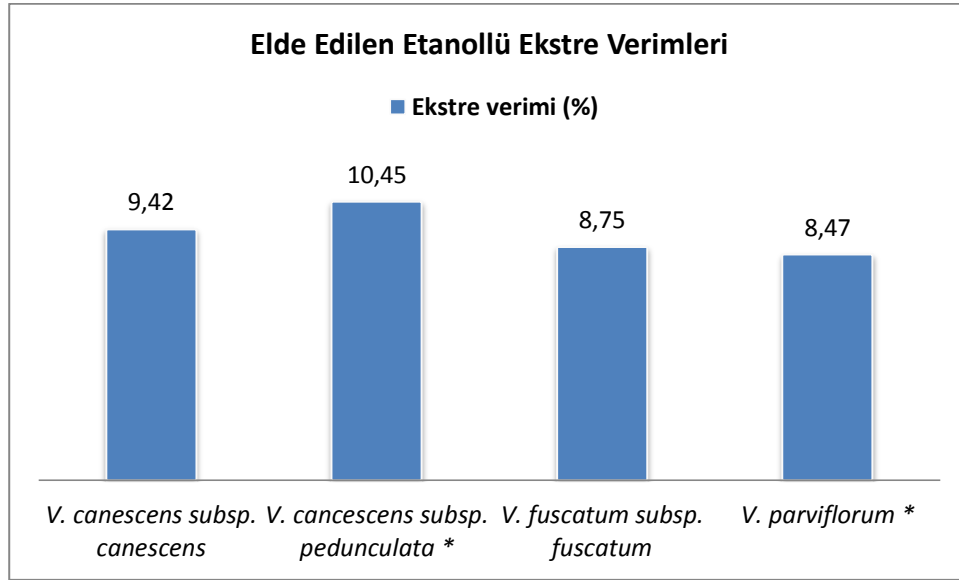
### 3. Sonuç ve Tartışma

Türkiye'de yetişen ikisi endemik, dört *Vincetoxicum* taksonunun (*V. canescens* subsp. *canescens*, *V. canescens* subsp. *pedunculata*, *V. fuscatum* subsp. *fuscatum* ve *V. parviflorum*) tohum zarflarından elde edilen etanol ekstreleri antibakteriyal aktiviteleri için iki Gram (+) bakteri (*S. aureus*, *B. subtilis*) ve üç Gram (-) bakteri (*A. baumannii*, *E. coli*, *A. hydrophila*) ve *M. tuberculosis* standart suşlarına karşı ve antifungal aktiviteleri için üç standart fungal suşa (*C. glabrata*, *C. tropicalis*, *C. parapsilosis*) karşı test edilmiştir. Çalışılan taksonlara ait detaylı bilgiler Tablo 1'de, elde edilen etanollü ekstre verimleri (% verim) ise Şekil 1'de verilmiştir. Antibakteriyal (Erşen ve ark. 2017) ve antifungal (NCCLL 2002, Sönmez ve ark. 2010, Güzeldemirci ve Küçükbaşmacı 2010) aktiviteler Sıvı Mikrodilüsyon Yöntemi ve antimikobakteriyal aktivite Resazurin Mikropklak Yöntemi (Nateche ve ark. 2006) kullanılarak çalışılmıştır. Çalışmada Ampisilin, Etambutol, İzoniazid ve Flukonazol referans antimikrobiyal ilaçlar olarak seçilmiş olup anti(miko)bakteriyal ve antifungal aktivite sonuçları sırasıyla Tablo 2 ve 3'de verilmiştir.

Tablo 1. Çalışılan taksonların fitocoğrafik orjinleri, lokalitesi, yüksekliği ve herbaryum numaraları.

Takson	Endemik takson <sup>a</sup>	Fitocoğrafya <sup>a</sup>	Lokalite <sup>a</sup>	Yükseklik (m)	Herbaryum numarası
<i>V. canescens</i> subsp. <i>canescens</i> (Willd.) Decne.	-	İran-Turan elementi	C6: Kahramanmaraş: Engizek Dağı, Küçükcerit Köyü	1.000	MKUH 1283
<i>V. canescens</i> (Willd.) Decne. subsp. <i>pedunculata</i> Browicz	Endemik	Doğu Akdeniz elementi	B3: Afyon: Dinar; Kumalar Dağı, Haydarlı, Yeniköy	1.500-1.600	MKUH 1284
<i>V. fuscatum</i> subsp. <i>fuscatum</i> (Hornem.) Reichb.	-	Bilinmiyor	B6: Kayseri: Pınarbaşı; Kavak Köyü üzeri, Hınzır Dağı.	1.800	MKUH 1315
<i>V. parviflorum</i> Decne.	Endemik	İran-Turan elementi	A7: Trabzon.	1.200	MKUH 1334

<sup>a</sup>Türkiye Florasına göre düzenlenmiştir.



Şekil 1. Çalışılan türlerin tohum zarflarından elde edilen etanollü ekstre verimleri (%).

Antibakteriyal aktivite sonuçları, çalışılan ekstrelerin test edilen tüm bakteri suşlarına karşı 250-31.25 µg/ml aralığında MİK değerleri ile antibakteriyal aktiviteyi olduğunu göstermiştir. Referans ilaç Ampisilin (MİK değeri: 125 µg/ml) ile karşılaştırıldığında test edilen ekstrelerin tamamı Gram (-) bakteri olan *A. baumannii*'ye karşı 31.25-62.5 µg/ml MİK değerleri ile etkili bulunmuştur. Özellikle *V. fuscatum subsp. fuscatum*'dan elde edilen etanol ekstresi 31.25 µg/ml MİK değeri ile en yüksek aktiviteyi göstermiştir (Tablo 2). *B. subtilis* standart suşuna karşı ekstrelerin etkinliği değerlendirildiğinde *V. parviflorum* türünün etanol ekstresi 31.25 µg/ml MİK değeri ile en yüksek aktiviteyi göstermiş, test edilen diğer ekstrelerin MİK değeri ise 62.5 µg/ml olup ekstrelerin etkinliği referans ilaç Ampisilin'le (MİK değeri: 0.9 µg/ml) karşılaştırıldığında düşük bulunmuştur (Tablo 2).

Antimikobakteriyal aktivite sonuçları test edilen tüm ekstrelerin *M. tuberculosis*'e karşı 31.25 µg/ml MİK değeri ile etkili olduğunu göstermiştir. Fakat etkinlik değeri, sırasıyla 0.97 ve 1.95 µg/ml MİK değerlerine sahip referans ilaçlar İzoniazid ve Etambutol ile karşılaştırıldığında düşük bulunmuştur (Tablo 2).

Antifungal aktivite sonuçları, çalışılan tüm türlerin test edilen standart fungal suşlara karşı 125-31.25 µg/ml aralığında çeşitli MİK değerleri ile etkili olduğunu göstermiştir. *V. canescens subsp. pedunculata* ve *V. fuscatum subsp. fuscatum*'un etanol ekstreleri 31.25 µg/ml MİK değeri ile *C. glabrata*'ya karşı daha etkili olmasına rağmen referans ilaç Flukonazol ile karşılaştırıldığında (MİK değeri: 3.90 µg/ml) etkinliği düşüktür. *C. tropicalis* ve *C. parapsilosis*'e karşı 31.25 µg/ml MİK değeri ile *V. canescens subsp. canescens*'in etanol ekstresi antifungal etkili olup Flukonazol ile karşılaştırıldığında (MİK değerleri: 15.62 ve 3.90 µg/ml, sırasıyla) etkinliği düşüktür (Tablo 3).

Türkiye'de yetişen ve üçü endemik beş *Vincetoxicum* taksonu (*V. canescens subsp. canescens*, *V. canescens subsp. pedunculata*, *V. fuscatum subsp. fuscatum*, *V. fuscatum subsp. boissieri* ve *V. parviflorum*) üzerinde yaptığımız fitokimyasal taramalar sonucunda alkaloid, flavonoid, şekerler, kardioaktif glikozitler, tanen (Güzel ve ark. 2017), steroidal glikozitler, şekerler ve nişasta (Güzel ve ark. 2015a) içerdikleri tespit edilmiştir. Literatür bilgileri flavonoidler, fenolik asitler, tanenler, saponinler, alkaloidler, terpenler, uçucu yağlar (Arif ve ark. 2011, Cowan 1999), polisakkaritler ve sterollerin (Bajpai 2016) antimikrobiyal özelliklerinin olduğunu göstermiştir. Bu nedenle çalışmada geniş aralıkta polar bileşikleri çözen (Kowalczyk ve ark. 2013); fenolikler, alkaloidler, steroller ve terpenler için uygun bir çözücü (Cowan 1999) olan etanol ekstraksiyon için seçilmiştir.

Tablo 2. Bakteriyal suşlara karşı test edilen ekstrelerin ve referans ilaçların MİK değerleri (µg/ml).

Takson	Bakteri suşları					
	<i>Staphylococcus aureus</i> (ATCC 25925)	<i>Bacillus subtilis</i> (ATCC 6633)	<i>Acinetobacter baumannii</i> (ATCC 02026)	<i>Escherichia coli</i> (ATCC 25923)	<i>Aeromonas hydrophila</i> (ATCC 95080)	<i>M. tuberculosis</i> H37RV
<i>V. canescens</i> subsp. <i>canescens</i>	125	62.5	62.5	250	250	31.25
<i>V. canescens</i> subsp. <i>pedunculata</i> *	125	62.5	62.5	125	250	31.25
<i>V. fuscatum</i> subsp. <i>fuscatum</i>	125	62.5	31.25	250	250	31.25
<i>V. parviflorum</i> *	125	31.25	62.5	250	250	31.25
<b>Referans ilaç</b>						
Ampisilin	31.25	0.9	125	15.62	31.25	-
Izoniazid	-	-	-	-	-	0.97
Etambutol	-	-	-	-	-	1.95

Çalışma iki tekrarlı yapılmış ve MİK değerleri belirlenmiştir. \*: Endemik -: Test edilmedi

Tablo 3. Fungal suşlara karşı test edilen ekstrelerin ve referans ilacın MİK değerleri (µg/ml).

Takson	Fungal suşlar		
	<i>Candida glabrata</i> (ATCC 90030)	<i>Candida tropicalis</i> (ATCC 750)	<i>Candida parapsilosis</i> (ATCC 22019)
<i>V. canescens</i> subsp. <i>canescens</i>	62.5	31.25	31.25
<i>V. canescens</i> subsp. <i>pedunculata</i> *	31.25	62.5	62.5
<i>V. fuscatum</i> subsp. <i>fuscatum</i>	31.25	62.5	62.5
<i>V. parviflorum</i> *	62.5	62.5	125
<b>Referans ilaç</b>			
Flukonazol	3.90	15.62	3.90

Çalışma iki tekrarlı yapılmış ve MİK değerleri belirlenmiştir. \*: Endemik

Literatür taramalarında *Vincetoxicum* cinsine ait bazı türlerin antimikrobiyal aktivitesi üzerine az sayıda çalışma olduğu görülmüştür (Mogg ve ark. 2008, Zaidi ve Crow 2005, Güzel ve ark. 2015b, Bazzaz ve Haririzadeh 2003). Bazzaz ve Haririzadeh (2003) *V. pumilum* Decne. türünden elde ettikleri metanol ekstresini *B. subtilis*, *S. aureus*, *E. coli* ve *Candida albicans*'ın da içerisinde olduğu bir grup mikroorganizmaya karşı silindir plak yöntemi kullanarak test etmiş ve ekstrenin *C. albicans*'a karşı belirgin antifungal aktivitesi olduğunu; bakteri suşlarına karşı ise etkili olmadığını göstermiştir (Bazzaz ve Haririzadeh 2003). Zaidi ve Crow (2005) *V. stocksii* türünden elde ettikleri metanol ekstresinin çeşitli fraksiyonlarını (etil asetat, hekzan, bütanol, kloroform ve su) *C. albicans*'ında içerisinde olduğu 12 fungal suşa ve *B. subtilis*, *E. coli* ve *S. aureus*'un da içerisinde olduğu 12 bakteriyel suşa karşı agar difüzyon ve disk difüzyon yöntemleri ile antimikrobiyal aktiviteleri için test etmiş ve ekstrenin *B. subtilis* ve *C. albicans*'a karşı belirgin aktivite olduğunu, *E. coli*'ye karşı ılımlı aktivite gösterdiğini, *S. aureus* karşı ise aktif olmadığını tespit etmiştir (Zaidi ve Crow 2005).

Mogg ve ark. (2008) *V. rossicum* türünün kök, taze yaprak ve olgun meyvelerinden elde ettikleri etanol ekstresinin bazı bakteri ve funguslara karşı antimikrobiyal aktivitesini araştırmış ve bitkinin antimikrobiyal etkisi olduğunu ayrıca kök ekstresinin de yaprak ekstresinden daha etkili olduğunu bulmuştur (Mogg ve ark. 2008). Güzel ve ark. (2015b) tarafından yapılan bir çalışmada beş *Vincetoxicum* taksonunun kök ve toprak üstü kısımlarından elde edilen artan polaritedeki ekstrelerin (Diklorometan, Diklorometan: Metanol (1:1), Metanol ve Total Etanol) *A. fumigatus*'a karşı 1 mg/ml konsantrasyonda agar dilüsyon yöntemi kullanılarak antifungal aktivitesine bakılmış ve test edilen 40 ekstre içerisinde *V. parviflorum*'un kök ve toprak üstü kısımlarından ve *V. canescens* subsp. *canescens*'in köklerinden elde edilen diklorometan ekstrelerinin % 45.86 inhibisyon değeri ile en yüksek etkiyi gösterdiği bildirilmiştir (Güzel ve ark. 2015b).

Çeşitli araştırmalara göre Gram (-) bakteriler Gram (+) bakterilere göre daha dirençli olup (Bajpai 2016, Pirbalouti ve ark. 2010) hücre duvarlarının yapısı da daha farklı ve komplekstir. Bu durum makromoleküllerin alımını farklı şekilde etkilemektedir (Alimpić ve ark. 2017). Ayrıca Gram (-) bakteriler Gram (+) bakterilere göre doğal bileşiklere daha dirençlidir. Gram (-) bakterilerin lipopolisakarit içeren hidrofilik yapıdaki hücre duvarı hidrofobik yağlar, steroidler ve bitki ekstrelerinin emilimini ve hedef hücre zarında birikimini inhibe etmektedir. Bu durum Gram (+) bakterilerin doğal ürünlere karşı Gram (-) bakterilere göre daha hassas olmasını da açıklamaktadır (Bajpai 2016).

Bu araştırma *Vincetoxicum* cinsinin tohum zarfları üzerine yapılan ilk biyoaktivite çalışmasıdır. Çalışmada; test edilen ekstrelerin, kullanılan antibakteriyel ilaçlara karşı direnç geliştirme yeteneğinde olan ve Dünya genelinde ciddi sağlık sorunlarına yol açan Gram (-) nozokomiyal patojen, *A. baumannii*'ye (Lean ve Yeo 2017) karşı 62.5-31.25 µg/ml aralığında MİK değerleri ile referans ilaç Ampisiline göre (MİK değeri: 125 µg/ml) yüksek aktivite olduğu gösterilmiştir. Test edilen ekstreler arasında *V. fuscatum* subsp. *fuscatum*'un etanol ekstresi 31.25 µg/ml MİK değeri ile belirgin yüksek etkilidir. Bu mikroorganizma yoğun bakım ünitelerinde görülen enfeksiyonlar nedeniyle dikkatleri çekmekte olup ayrıca geniş aralıkta enfeksiyonlardan da (bakteriyemi, idrar yolu enfeksiyonları, menenjit, kan dolaşımı enfeksiyonları, vantilatör kaynaklı zatürre ve cerrahi yara enfeksiyonları) sorumludur (Shamsizadeh ve ark. 2017). Çalışma sonunda elde edilen bulgular *Vincetoxicum* cinsine ait dört bitkinin *A. baumannii*'nin neden olduğu enfeksiyonların tedavisinde umut verici antimikrobiyal ajan olabileceğini göstermektedir.

Sonuç olarak Dünya genelinde yaygın olmaları ve ciddi enfeksiyonlardan sorumlu olmaları nedeniyle bu çalışma için seçilen mikroorganizmalara karşı test edilen dört taksonun antimikrobiyal aktivite sonuçları, ileri araştırmalar yapılarak bu bitkilerin enfeksiyon hastalıklarının tedavisinde antimikrobiyal ajan olarak kullanılmalarının uygun olup olmayacağını değerlendirilmesi gerekliliğini ortaya koymaktadır. Özellikle yüksek aktivite gösteren taksonların ilk aşamada değerlendirilmesi uygun olacaktır. Bu amaçla; farklı mikroorganizmaların taranması, en etkili ekstreler için etkiden sorumlu bileşikler, ekstre bileşik etkinliğinin karşılaştırılması, hayvan deneyleri, etki mekanizmaları ve toksisite testlerinin de ileri aşamalarda yapılması gereklidir.

### **Teşekkür**

Bitki örneklerinin teşhisi sırasında değerli katkılarını esirgemeyen Sayın Dr. Ahmet İlçim'e (Biyoloji Bölümü, Fen-Edebiyat Fakültesi, Mustafa Kemal Üniversitesi, Antakya, Türkiye) teşekkür ederiz.

### **Kaynaklar**

Alimpić A, Knežević A, Milutinović M, Stević T, Šavikin K, Stajić M, Marković S, Marin P,



- Matevski V, Duletić-Laušević S (2017). Biological activities and chemical composition of *Salvia amplexicaulis* Lam. extracts. *Industrial Crops and Products* 105: 1-9. DOI: 10.1016/j.indcrop.2017.04.051.
- Altundağ E, Öztürk M (2011). Ethnomedicinal studies on the plant resources of east Anatolia, Turkey. *Procedia, Social and Behavioral Sciences* 19: 756-777. DOI: 10.1016/j.sbspro.2011.05.195.
- Arif T, Mandal TK, Dabur R (2011). 9. *Natural products: Anti-fungal agents derived from plants*. In: Mishra B.B., ed., *Opportunity, Challenge and Scope of Natural Products in Medicinal Chemistry*, Research Signpost, Kerala, 283-311.
- Ayoub IM, El-Shazly M, Lu MC, Singab ANB (2014). Antimicrobial and cytotoxic activities of the crude extracts of *Dietes bicolor* leaves, flowers and rhizomes. *South African Journal of Botany* 95: 97-101. DOI: 10.1016/j.sajb.2014.08.012.
- Bajpai VK (2016). Antimicrobial bioactive compounds from marine algae: A mini review. *Indian Journal of Geo-Marine Sciences* 45(9): 1076-1085.
- Baytop T (1984). *Türkiye’de bitkiler ile tedavi geçmişte ve bugün*. (İlaveli 2. Baskı), İstanbul Üniversitesi Eczacılık Fakültesi, Nobel Tıp Kitap Evleri, İstanbul, 372.
- Bazzaz F, Haririzadeh G (2003). Screening of Iranian plants for antimicrobial activity. *Pharmaceutical Biology* 41(8): 573-583. DOI: 10.1080/13880200390501488.
- Browicz K (1978). *Vincetoxicum* N.M. Wolf. In: Davis P.H., ed., *Flora of Turkey and the East Aegean Islands*, Edinburgh, 163-173.
- CLSI (2012). *Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically*; Approved Standard-Ninth Edition. CLSI document M07-A9. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute.
- Coassini-Lokar L, Poldini L (1988). Herbal remedies in the traditional medicine of the Venezia Giulia Region (North East Italy). *Journal of Ethnopharmacology* 22: 231-278. DOI: 10.1016/0378-8741(88)90238-3.
- Cowan MM (1999). Plant products as antimicrobial agents. *Clinical microbiology reviews* 12(4): 564-582.
- DiTommaso A, Lawlor FM, Darbyshire SJ (2004). The biology of invasive alien plants in Canada 2. *Cynanchum rossicum* (Kleopow) Borhidi (= *Vincetoxicum rossicum* (Kleopow) Barbar.) and *Cynanchum louseae* (L.) Kartesz&Gandhi (= *Vincetoxicum nigrum* (L.) Moench). *Canadian Journal of Plant Science* 85: 243-263. DOI: 10.4141/P03-056.
- Erşen D, Ülger M, Mangelinckx S, Gemili M, Şahin E, Nural Y (2017). Synthesis and anti(myco)bacterial activity of novel 5,5- diphenylpyrrolidine N-aryolthiourea derivatives and a functionalized hexahydro-1H-pyrrolo(1,2-c)imidazole. *Medicinal Chemistry Research* 26: 2152-2160. DOI: 10.1007/s00044-017-1907-9.
- Gibson DM, Krasnoff SB, Biazzo J, Milbrath L (2011). Phytotoxicity of antofine from invasive Swallow-Worts. *Journal of Chemical Ecology* 37: 871-879. DOI: 10.1007/s10886-011-9994-4.
- Güzel S, Pavela R, Kökdil G (2015a). Phytochemistry and antifeedant activity of root extracts from some *Vincetoxicum* taxa against *Leptinotarsa decemlineata* and *Spodoptera littoralis*. *Journal of Biopesticides* 8(2): 128-140.
- Güzel S, Pavela R, Kökdil G (2015b). Evaluation of antifungal effect of different polarity extracts

- from five *Vincetoxicum* taxa against *Aspergillus fumigatus*. International Anatolian Academic Online Journal / Health Science Journal 3(2): 1-9.
- Güzel S, Pavela R, İlçim A, Kökdil G (2017). Phytochemical composition and antifeedant activity of five *Vincetoxicum* taxa against *Spodoptera littoralis* and *Leptinotarsa decemlineata*. Marmara Pharmaceutical Journal 21(4): 872-880. DOI: 10.12991/mpj.2017.28.
- Güzeldemirci NU, Küçükbasmacı Ö (2010). Synthesis and antimicrobial activity evaluation of new 1,2,4-triazoles and 1,3,4-thiadiazoles bearing imidazo(2,1-b)thiazole moiety. European Journal of Medicinal Chemistry 45: 63-68. DOI: 10.1016/j.ejmech.2009.09.024.
- Heywood VH, Brummitt RK, Culham A, Seberg O (2007). *Flowering plant families of the world*. Firefly Books, Oxford University Press, New York, 38-40.
- Kowalczyk D, Świeca M, Cichocka J, Gawlik-Dziki U (2013). The phenolic content and antioxidant activity of the aqueous and hydroalcoholic extracts of hops and their pellets. Journal of the Institute of Brewing 119: 103-110.
- Lavault M, Richomme P, Bruneton J (1994). New phenantroindolizidine N-oxides alkaloids isolated from *Vincetoxicum hirundinaria* Medic. Pharmaceutica Acta Helvetiae 68: 225-227.
- Lavault M, Richomme P, Bruneton J (1999). Acetophenones and new pregnane glycosides from the roots of *Vincetoxicum hirundinaria*. Fitoterapia 70: 216-220.
- Lean SS, Yeo CC (2017). Small, enigmatic plasmids of the nosocomial pathogen, *Acinetobacter baumannii*: good, bad, who knows? Frontiers in Microbiology 8: 1547. DOI: 10.3389/fmicb.2017.01547.
- Leimu R (2004). Variation in the mating system of *Vincetoxicum hirundinaria* (Asclepiadaceae) in peripheral island populations. Annals of Botany 93: 107-113. DOI: 10.1093/aob/mch012.
- Liede S (1996). *Cynanchum-Rhodostegiella-Vincetoxicum-Tylophora* (Asclepiadaceae): new considerations on an old problem. Taxon 45: 193-211. DOI: 10.2307/1224660.
- Mansoor A, Ibrahim MA, Zaidi MA, Ahmed M (2011). Antiprotozoal activities of *Vincetoxicum stocksii* and *Carum copticum*. Bangladesh Journal of Pharmacology 6: 51-54. DOI: 10.3329/bjp.v6i1.8442.
- Mogg C, Petit P, Cappuccino N, Durst T, McKague C, Foster M, Yack JE, Arnason JT, Smith ML (2008). Test of the antibiotic properties of the invasive vine *Vincetoxicum rossicum* against bacteria, fungi and insects. Biochemical Systematics and Ecology 36: 383-391.
- Nateche F, Martin A, Baraka S, Palomino JC, Khaled S, Portaels F (2006). Application of the resazurin microtitre assay for detection of multidrug resistance in *Mycobacterium tuberculosis* in Algiers. Journal of Medical Microbiology 55: 857-860. DOI: 10.1099/jmm.0.46513-0.
- NCCLS (2002). Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Yeasts; Approved Standard (2nd ed.). NCCLS document M27-A2 (ISBN 1-56238-469-4). NCCLS, 940 West Valley Road, Suite 1400, Wayne, Pennsylvania, 19087-1898 USA.
- Ngezahayo J, Ribeiro SO, Fontaine V, Hari L, Stévigny C, Duez P (2017). *In vitro* study of five herbs used against microbial infections in Burundi. Phytotherapy Research 31: 1571-1578. DOI: 10.1002/ptr.5887.
- Nowak R, Kisiel W (2000). Hancokinol from *Vincetoxicum officinale*. Fitoterapia 71: 584-586. DOI: 10.1016/S0367-326X(00)00157-X.

- Paşca C, Mărghitaş L, Dezmirean D, Bobiş O, Bonta V, Chirilă F, Matei I, Fit N (2017). Medicinal plants based products tested on pathogens isolated from Mastitis Milk. *Molecules* 22: 1473-16. DOI: 10.3390/molecules22091473.
- Pavela R (2010a). Antifeedant activity of plant extracts on *Leptinotarsa decemlineata* Say. and *Spodoptera littoralis* Bois. larvae. *Industrial Crops and Products* 32: 213-219. DOI: 10.1016/j.indcrop.2010.04.010.
- Pavela R, Sajfrtova M, Sovova H, Barnet M, Karban J (2010b). The insecticidal activity of *Tanacetum parthenium* (L.) Schultz Bip. extracts obtained by supercritical fluid extraction and hydrodistillation. *Industrial Crops and Products* 31: 449-454. DOI: 10.1016/j.indcrop.2010.01.003.
- Pirbalouti AG, Jahanbazi P, Enteshari S, Malekpoor F, Hamed B (2010). Antimicrobial activity of some Iranian medicinal plants. *Archives of Biological Science Belgrade* 62(3): 633-642. DOI: 10.2298/ABS1003633G.
- Shamsizadeh Z, Nikaeen M, Esfahani BN, Mirhoseini SH, Hatamzadeh M, Hassanzadeh A (2017). Detection of antibiotic resistant *Acinetobacter baumannii* in various hospital environments: potential sources for transmission of *Acinetobacter* infections. *Environmental Health and Preventive Medicine* 22: 44-47. DOI: 10.1186/s12199-017-0653-4.
- Siddiqui W, Sharangi AB, Singh JP, Thakur PK, Ayala-Zavala JF, Singh A, Dhua RS (2016). Antimicrobial properties of teas and their extracts *in vitro*. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* 56(9): 1428-1439. DOI: 10.1080/10408398.2013.769932.
- Sliumpaite I, Murkovic M, Zeb A, Venskutonisa PR (2013). Antioxidant properties and phenolic composition of swallow-wort (*Vincetoxicum lutea* L.) leaves. *Industrial Crops and Products* 45: 74-82. DOI: 10.1016/j.indcrop.2012.11.036.
- Sönmez M, Çelebi M, Berber I (2010). Synthesis, spectroscopic and biological studies on the new symmetric Schiff base derived from 2,6-diformyl-4-methylphenol with N-aminopyrimidine. *European Journal of Medicinal Chemistry* 45: 1935-1940. DOI: 10.1016/j.ejmech.2010.01.035.
- Staerk D, Christensen J, Lemmich E, Duus J, Olsen CE, Jaroszewski JW (2000). Cytotoxic activity of some phenanthroindolizidine N-Oxide alkaloids from *Cynanchum vincetoxicum*. *Journal of Natural Products* 63: 1584-6.
- Staerk D, Lykkeberg AL, Christensen J, Budnik BA, Abe F, Jaroszewski JW (2002). *In vitro* cytotoxic activity of phenanthroindolizidine alkaloids from *Cynanchum vincetoxicum* and *Tylophora tanakae* against drug-sensitive and multidrug-resistant cancer cells. *Journal of Natural Products* 65: 1299-1302. DOI: 10.1021/np0106384.
- Stöckel K, Stöcklin W, Reichstein T (1969). Die glucoside von *Vincetoxicum hirundinaria* MEDIKUS.1. Mitteilung: Isolierung und Spaltprodukte. *Glucoside und Aglucon*. 316 Mitteilung. *Helvetica Chimica Acta* 52: 1175-1202.
- Tanker N, Koyuncu M, Coşkun M (2004). *Farmasotik botanik*. Ankara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi, Ankara, 294.
- Tuzlacı E, Doğan A (2010). Turkish folk medicinal plants, IX: Ovacık (Tunceli). *Marmara Pharmaceutical Journal* 14: 136-143. DOI: 10.12991/201014449.
- Uma K, Xin H, Kumar BA (2017). Antifungal effect of plant extract and essential oil. *Chinese Journal of Integrative Medicine* 23(3): 233-239. DOI: 10.1007/s11655-016-2524-z.

Zaidi MA, Crow JSA (2005). Biologically active traditional medicinal herbs from Balochistan, Pakistan. *Journal of Ethnopharmacology* 96: 331-334. DOI: 10.1016/j.jep.2004.07.023.