

Anti fungal activities of fresh garlic extract on candida albicans

M.M. Fani, DDS¹ A.M. Araghizadeh, DDS²

Assistant Professor Department of Oral Medicine , School of Dentistry¹ , Shiraz University of Medical Sciences, Shiraz, Iran , Assistant Professor Department of Community Medicine² , Hormozgan University of Medical Sciences , Bandar Abbas , Iran.

(Received 5 Mar, 2008 Accepted 28 Apr, 2009)

ABSTRACT

Introduction: Denture stomatitis is one of the most problem in denture wearers and related to candida albicans. In This study we aimed to determine garlic extract as an antifungal agent in oral candidiasis.

Methods: Candida albicans growth in CHROM Agar was made serial dilution from 16 to 512 mg l⁻¹ from fresh garlic extract and measured minimum Inhibitory Concentration. Normal saline was used as control.

Results: Garlic extract showed antifungal activities in 32 mg l⁻¹ concentration, where clotrimazol showed its antifungal activity in 64 mg l⁻¹ concentration and both Amphotericin and Nystatin showed their activities in 128 mg l⁻¹ concentration.

Conclusion: Garlic extract in invitro studies is more than Nystatin, Amphotericin and clotrimazol, even though, all of the one effective in higher than 128 mg l⁻¹ concentration.

Key words: Candida Albicans – Garlic – Antifungal Agents

Correspondence:
M. M. Fani, DDS.
Department of Oral
Medicine, School of
Dentistry, Shiraz University
of Medical Sciences.
Shiraz, Iran
Tel: +98 9171118583
Email:
fanim@sums.ac.ir

بررسی خاصیت ضدقارچی عصاره تازه سیر بر کاندیدا آلیکانس

دکتر محمد مهدی فانی^۱ دکتر عبدالمهدی عراقی زاده^۲

^۱ استادیار بیماریهای دهان، دانشگاه علوم پزشکی شیراز^۲ استادیار گروه پزشکی اجتماعی، دانشگاه علوم پزشکی هرمزگان

مجله پزشکی هرمزگان سال سیزدهم شماره سوم پاییز ۸۸ صفحات ۱۵۵-۱۵۱

چکیده

مقدمه: کاندیدا آلیکانس عامل یکی از متداولترین ضایعات دهانی (Denture stomatitis) در بیماران استفاده‌کننده از دندان مصنوعی می‌باشد که با توجه به بررسی‌های بعمل آمده در مورد خاصیت ضدقارچی عصاره سیر، این خاصیت در مقایسه با خاصیت آنتی‌فانگال داروهای نیستاتین، کلوتریمازول و آمفوتریسین سنجیده شد.

روش کار: در این مطالعه تجربی، با استفاده از کاندیدا آلیکانس استاندارد که به محیط کشت CHROM Agar *Candida* اضافه گشته بود، غلظتهای رقیق شده سریال از ۱۶ الی ۱^{-۱} ۵۱۲ mg اضافه گردید و مینیمم بازدارندگی مربوطه به هر دارو و عصاره سیر اندازه‌گیری شد. از نرمال سالین بعنوان کنترل استفاده شد.

نتایج: عصاره سیر حتی تا غلظت کم ۳۲ mg^{-۱} نیز خاصیت ضدقارچی دارد. اما کلوتریمازول فقط تا غلظت ۱^{-۱} ۶۴ mg می‌تواند از رشد کاندیدا جلوگیری نماید. آمفوتریسین و نیستاتین نیز تا غلظت ۱^{-۱} ۱۲۸ mg خاصیت ضدقارچی دارند.

نتیجه‌گیری: قدرت ضدقارچی عصاره تازه سیر در آزمایش مطالعات آزمایشگاهی از داروهای نیستاتین، آمفوتریسین و کلوتریمازول بیشتر است اگر چه در غلظتهای ۱^{-۱} ۱۲۸ mg و بیشتر همگی مؤثر می‌باشند.

کلیدواژه‌ها: کاندیدا آلیکانس - سیر - عوامل ضدقارچ

نویسنده مسئول:
دکتر محمد مهدی فانی
بخش بیماریهای دهان - دانشکده
دندانپزشکی دانشگاه علوم پزشکی
شیراز
شیراز - ایران
تلفن: +۹۸ ۹۱۷۱۱۸۵۸۲
پست الکترونیکی:
fanim@sums.ac.ir

دریافت مقاله: ۸۶/۱۲/۱۵ اصلاح نهایی: ۸۸/۲/۱ پذیرش مقاله: ۸۸/۲/۸

Klebsiella Pneumonia Pseudomonas aeruginosa

و *Mycobacterium tuberculosis* نیز خاصیت مهاری دارد (۷، ۸). خاصیت ضدقارچی (۹) و ضد ویروس (۱۰) نیز در مورد عصاره سیر گزارش شده است.

کاندیدا آلیکانس عامل اصلی ایجاد کاندیدای دهانی در بیماران استفاده‌کننده از دندان مصنوعی می‌باشد. درمان‌های متداولی جهت رفع کاندیدای دهانی پیشنهاد شده است که عمدتاً مبتنی بر استفاده از داروهای ضدقارچی مانند نیستاتین، آمفوتریسین و کلوتریمازول می‌باشد که عموماً مدتی مؤثر بوده و ناراحتی دهانی در بسیاری از موارد مجدداً عود می‌نماید (۱۱).

با توجه به مقالاتی که در مورد خاصیت ضدقارچی عصاره سیر منتشر شده‌اند، در این پژوهش مقرر شد که خاصیت ضدقارچی آلیسین موجود در عصاره سیر با خاصیت ضدقارچی ۳ داروی متداول نیستاتین، آمفوتریسین و کلوتریمازول اندازه‌گیری شود و با نرمال سالین بعنوان گروه کنترل مقایسه گردد.

مقدمه:

سیر با نام علمی "Allium sativum" یکی از بیشترین تحقیقات گیاهی دارویی را تاکنون به خود اختصاص داده است که از زمانهای قدیم در طب سنتی یونانی - چینی و ایرانی تجویز می‌شده است (۱).

بوی کاملاً مشخص و متمایز سیر به دلیل وجود ماده آلیسین و فعالیت آنزیمی بنام آلیناز "allinase" که حاوی مواد سولفوروی مانند Cystein sulfoxid می‌باشد، است و متعاقب بریدن و فشردن حبه تازه آن بدست می‌آید (۲).

اگرچه وجود برخی تیوسولفیناتهای دیگر موجود در سیر نیز در خاصیت درمانی آن ذکر شده است (۳).

مقالات متعددی به خاصیت ضدباکتریال عصاره سیر اشاره کرده‌اند که در همگی آنان آلیسین و مشتقات دیگر سولفوروی موجود در سیر باعث خاصیت جلوگیری از رشد میکروب‌های گرم مثبت یا منفی از قبیل *Enterobacter*، *Micrococcus*، *Pseudomonas*، *Lactobacillic*، *Klebsiella*، *Escherichia*، *Helicobacteria*، *Protevs*، *Shigella*، *Salmonella* شده است (۴-۶). عصاره سیر همچنین بر روی ارگانیزم‌هایی از قبیل

روش کار:

تهیه عصاره تازه سیر:

مقدار ۸۰ گرم از حبه‌های تازه سیر مطابق با روش Bakri (۱۲) پس از له شدن به صورت هموژنیزه در ۱۰۰ میلی‌لیتر نرمال‌سالین استریل سانتریفیوژ گردید و از فیلترواتن شماره یک عبور داده شد. با در نظر گرفتن مواد غیرمحلول حاصله نسبت به وزن سیر اولیه، غلظت عصاره بدست آمده (W/V) ۶۴٪ در نظر گرفته شد.

محلول فوق تا زمان استفاده در دمای ۷۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری گردید. غلظت دقیق آلیسین موجود در محلول فوق بوسیله واکنش با 4-Mercapto pyridine با کمک دستگاه اسپکتروفوتومتریک و مطابق با تکنیک Miron (۱۳) عدد ۲۶۰ mg/ml اندازه‌گیری شد. همچنین از کاندیدا آلیکانس استاندارد شماره GDH2346 و محیط کشت CHROM agar candida (محصول فرانسه) و Corn meal agar حاوی Salivarious - Bacitracin جهت تست Serial tube استفاده گردید.

محیطهای کشت بدست آمده به ۵ گروه A (برای آمفوترسین)، C برای کلوتریمازول، N برای نیستاتین، G برای عصاره سیر و S برای نرمال سالین تقسیم گردید. که هر گروه نیز حاوی ۶ تیوب با غلظتهای به ترتیب 1^{-1} ۵۱۲mg، ۲۵۶، ۱۲۸، ۶۴، ۳۲، ۱۶ از داروهای موردنظر آزمایش بودند. با تکنیک Bauer (۱۴) به هر تیوب مقدار (۰/۲۵ml) از محلول حاوی کاندیدا آلیکانس را اضافه نمودیم و با رعایت دستورات (National committee of clinical laboratory NCCLS standards) پس از ۷۲ ساعت بوسیله دستگاه اسپکتروفوتومتر غلظت هر تیوب جهت امکان رشد کاندیدا آلیکانس بررسی گردید و کمترین غلظت از هر دارو که توانایی جلوگیری از رشد

کاندیدا را داشته است، بعنوان Minimum (MIC) Inhibitory concentration در نظر گرفته شد و یافته‌های این تحقیق با کمک تست استیوندت آنالیز آماری گردید.

نتایج:

اندازه‌گیری MIC در تیوبهای با غلظت متفاوت نشانگر این است که همگی داروهای نیستاتین، آمفوترسین، کلوتریمازول همراه با عصاره سیر تا غلظت 1^{-1} ۱۲۸mg توانایی جلوگیری از رشد کاندیدا آلیکانس را دارند. نرمال‌سالین که بعنوان کنترل در مطالعه دخالت داده شده است، در هیچ غلظتی حتی 1^{-1} ۵۱۲mg خاصیت ضدقارچی را در محیط کشت نشان نداد. در غلظت 1^{-1} ۶۴mg فقط کلوتریمازول از بین داروهای ضدقارچی توانایی جلوگیری از رشد کاندیدا را دارد. در این غلظت عصاره سیر نیز خاصیت آنتی‌فانگال خود را حفظ کرد اما داروهای نیستاتین و آمفوترسین در این غلظت توانایی جلوگیری از رشد کاندیدا آلیکانس را ندارند. در غلظت 1^{-1} ۳۲mg کلوتریمازول نیز خاصیت کشندگی خود را از دست داده و در این غلظت کاندیدا آلیکانس در تیوب رشد نمود اما حتی در این غلظت نیز عصاره سیر توانایی جلوگیری از رشد (MIC) خود را حفظ نمود. در غلظت 1^{-1} ۱۶mg در تمامی تیوبهای مورد مطالعه کاندیدا آلیکانس رشد نموده و باعث ایجاد کروت در تیوب هنگام بررسی با دستگاه اسپکتروفوتومتر گردید.

جدول شماره ۱-

غلظت هر تیوب $mg 1^{-1}$	نرمال سالین (S)	عصاره سیر (G)	کلوتریمازول (C)	نیستاتین (N)	آمفوترسین (A)
۵۱۲	-	+	+	+	+
۲۵۶	-	+	+	+	+
۱۲۸	-	+	+	+	+
۶۴	-	+	+	-	-
۳۲	-	+	-	-	-
۱۶	-	-	-	-	-

+ توانایی جلوگیری از رشد کلونی‌های کاندیدا آلیکانس

- عدم توانایی از رشد کلونی‌های کاندیدا آلیکانس

بحث و نتیجه گیری:

کاندیدا آلبیکانس به همراه ۳ سوژ دیگر خود (یعنی کاندیدا پاراپزیلوزیس، گراناتا و تروپیکالیس) متداولترین مشکل بیماران استفاده کننده از دست دندان مصنوعی یعنی (Denture stomatitis) را ایجاد می کند (۱۵). درمانهای معمول جهت از بین بردن کاندیدیازیس دهانی عموماً بر پایه استفاده از داروهای ضدقارچ نیستاتین، کلوتریمازول و آمفوتریسین β می باشد که در برخی موارد با برگشت ضایعه نیز همراه می گردد (۱۱). با توجه به استقبال عموم بیماران از داروهای با منشأ گیاهی (Herbal medicine) جهت درمان مشکلات خود و خصوصاً با توجه به پیشینه تاریخی استفاده از خواص دارویی سیر در طب سنتی، استفاده از عصاره سیر به منظور رفع کاندیدیازیس دهانی مورد توجه محققین می باشد.

در این پژوهش، با توجه به یافته های بدست آمده از مطالعه حاصل، مشخص می گردد که در بین سه داروی مورد آزمایش، کلوتریمازول از نیستاتین و آمفوتریسین خاصیت ضدقارچی بیشتری دارد به طوری که حتی در غلظت 64mg^{-1} نیز توانایی خود را حفظ نموده است. همچنین مشخص شد که نیستاتین و آمفوتریسین از نظر خاصیت ضدقارچی در یک رده می باشند و هر دوی آنها تا غلظت 128mg^{-1} توانایی آنتی فانگال دارند اما در غلظتهای کمتر از این، مؤثر نمی باشند. نکته حائز اهمیت این مطالعه، مؤثر بودن عصاره سیر حتی بیشتر از داروی کلوتریمازول است و در غلظت 128mg^{-1} نیز که کلوتریمازول قدرت خود را از دست می دهد، عصاره سیر توانایی جلوگیری از رشد کاندیدا آلبیکانس را حفظ نموده است ($P < 0.05$).

در غلظتهای کم (16mg^{-1}) دیگر نه عصاره سیر و نه هیچ کدام از ۳ داروی فوق آنتی فانگال نمی باشند و در غلظتهای بالا تا 512mg^{-1} همگی از رشد کاندیدا ممانعت

می نمایند. در گروه کنترل که از غلظتهای سریال نرمال سالین استفاده شده بود، کاندیدا آلبیکانس حتی در غلظت 512mg^{-1} نیز رشد نموده بود که این مطلب نیز قابل پیش بینی بوده است.

در این مطالعه *in vitro* خاصیت ضد قارچی سیر تأیید گردید و این یافته با نتیجه مطالعات دیگری که در مورد خاصیت آنتی باکتریال، آنتی فانگال و آنتی ویرال عصاره سیر انجام گرفته بود، همخوانی دارد (۱۸-۱۶). علاوه بر این، در مطالعات *in vivo* که بر روی حیوانات آزمایشگاهی صورت گرفته است، تأثیر عصاره سیر حتی بر میکروب *Staph.aureus* مقاوم به متی سیلین (۱۹) و یا بر روی ویروسهای Cytomegal نیز تأیید شده است (۲۰).

به طور خلاصه یافته های این مطالعه مشخص می نماید که عصاره تازه سیر به طور معنی داری توانایی ضدقارچی دارد و اگر فرم ژل یا دهانشویه توسط کارخانه های بهداشتی تولید شود، امکان استفاده درمانی در عفونتهای کاندیدای دهان را دارد. اگرچه عوارض جانبی (توکسیک بودن در کبد، کلیه و یا مغز استخوان) نیز باید مدنظر قرار گیرد و عوارضی مانند استفراغ، سرگیجه و اسهال نیز در حالت استفاده اورال آن گزارش شده است (۲۱).

سپاسگزاری:

انجام این تحقیق با مساعدت معاونت محترم پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی شیراز انجام شده است که بدینوسیله قدردانی می گردد.

References**منابع**

1. Fataneh F. Anti-fungal activity of herbal extract in vitro. 1st ed. Isfahan: Isfahan University of Medical Sciences: 1991;85-93 [Persian]
2. Ross ZM, O'Gara EA, Hill DJ, Sleightholme HV, Maslin DJ. Antimicrobial properties of garlic oil against human enteric bacteria: Evaluation of methodologies and comparisons with garlic oil sulfides and garlic powder. *Appl Environ Microbiol.* 2001;67:475-480.
3. Ellmore GS, Feldberg RS. Alliin lyase localization in bundle sheaths of the garlic clove (*Allium Sativum*). *American Journal of Botany.* 1994;81:89-94.

4. Martin KW, Ernst E. Herbal medicines for treatment of bacterial infections: a review of controlled clinical trials. *J Antimicrob Chemother.* 2003;51:241-246.
5. Ankri S, Mirelman D. Antimicrobial properties of allicin from garlic. *Microbes Infect.* 1999;1:125-129.
6. Sivam GP, Lampe JW, Ulness B, Swanzy SR, Potter JD. Helicobacter pylori-in vitro susceptibility to garlic (*Allium Sativum*) extract. *Nutr Cancer.* 1997;27:118-121.
7. Jonkers D, Sluimer J, Stobberingh E. Effect of garlic on vancomycin-resistant enterococci. *Antimicrob Agents Chemother.* 1999;43:3045.
8. Jain RC. Antitubercular activity of garlic oil. *Indian J Pathol Microbiol.* 1998;41:131.
9. Ghannoum MA. Inhibition of candida adhesion to buccal epithelial cells by an aqueous extract of *Allium sativum* (garlic). *J Appl Bacteriol.* 1990;68:163-169.
10. Weber ND, Andersen DO, North JA, Murray BK, Lawson LD, Hughes BG. In vitro virucidal effects of *Allium sativum* (garlic) extract and compounds. *Planta Med.* 1992;58:417-423.
11. Maver-Biscanin M, Mrvavak-Stipetic M, Jerolimov V. Effect of low-level laser therapy on candida albicans growth in patients with Denture stomatitis. *Photomed Laser Surg.* 2005;23:328-332.
12. Bakri IM, Douglas CW. Inhibitory effect of garlic extract on oral bacteria. *Arch Oral Biol.* 2005;50:645-651.
13. Miron T, Shin I, Feigenblat G, Weiner L, Mirelman D, Witchek M, et al. A spectrophotometric assay for allicin, alliin and alliinase (alliin lyase) with a chromogenic thiol: Reaction of 4-mercaptopyridine with thiosulfates. *Anal Biochem.* 2002;307:76-83.
14. Roche J, Parker SJ, McAdam L, editors. Laboratory methods for detection of antibacterial resistance. In: Forbes BA, Sahm DF, Weissfeld AS. Baily and Scott's diagnostic microbiology. Stlouis: Mosby Inc; 1998:250-272.
15. Maver-Biscanin M, Mravak-Stipetic M, Jerolimov V, Biscanin A. Fungicidal effect of diode laser irradiation in patients with Denture stomatitis. *Laser Surg Med.* 2004;35:259-262.
16. Chowdhury Ak, Ahsan M, Islam SN, Ahmeh ZU. Efficacy of aqueous extract of garlic and allicin in experimental shigellosis in rabbits. *Indian J Med Res.* 1991;93:33-36.
17. Young k. Preliminary clinical observation on 17 cases of pulmonary tuberculosis treated by the intrabronchial administration of garlic juice. *Shandong Yi Kan.* 1959;21:24-25.
18. Jarvinen H, Tenovuo J, Huovinen P. In vitro susceptibility of streptococcus mutans to chlorhexidine and six other antimicrobial agents. *Antimicrob Agents Chemother.* 1993;37:1158-1159.
19. Tsao SM, Hsu CC, Yin MC. Garlic extract and two diallyl sulphide inhibit methicillin-resistant staphylococcus aureus infection in BALB/cA mice. *J Antimicrob Chemother.* 2003;52:974-980.
20. Fang F, Li H, Cui W, Dong Y. Treatment of hepatitis caused by cytomegalovirus with allitridin injection: An experimental study. *J Tongji Med Univ.* 1999;19:271-274.
21. Davis LE, Shen Jk, Cai Y. Antifungal activity in human cerebrospinal fluid and plasma after intravenous administration of *Allium Sativum*. *Antimicrob Agents Chemother.* 1990;34:651-653.