

ارزیابی فعالیت ضد قارچی عصاره الکلی کلاله و سافرانول گیاه زعفران بر روی رشد کاندیدا آلبیکنس و کاندیدا دابلینینسیس در شرایط آزمایشگاهی

نویسندگان :

مریم رودباری ، گروه قارچ شناسی پزشکی، دانشکده پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران. ایران .
شهلا رودبار محمدی* ، گروه قارچ شناسی پزشکی، دانشکده پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران. ایران .
منیره حاجی مرادی ، گروه ایمنی شناسی پزشکی، دانشکده پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران. ایران .
مجتبی تقی زاده ارمکی ، گروه قارچ شناسی پزشکی، دانشکده پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران. ایران .
فاطمه قاسمی سخا ، کارشناس ارشد فیزیولوژی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد دامغان. ایران .
محمود وحیدی ، گروه قارچ شناسی پزشکی، دانشکده پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران. ایران .

مجله دانشگاه علوم پزشکی چهارم، دوره هفتم، شماره دو، پاییز ۸۸

چکیده :

مقدمه : گونه های کاندیدا قارچ های فرصت طلبی هستند که در بیماران با نقص ایمنی، بیماری های قارچی مهاجم را سبب می شوند. زعفران گیاهی با اثرات درمانی متعدد از قبیل فعالیت ضد قارچی مطرح است. در این تحقیق اثرات ضد قارچی عصاره الکلی و سافرانول گیاه زعفران بر رشد کاندیدا آلبیکنس و دابلینینسیس ارزیابی شد .

مسواد و روش تحقیق : عصاره الکلی و سافرانول زعفران با روش میکرو دایلوژن بر روی کاندیدا آلبیکنس و دابلینینسیس اثر داده شد. بدین منظور غلظت های ۵۰۰ و ۲۵۰ و ۱۲۵ و ... میکرو گرم در میلی لیتر از عصاره الکلی زعفران و غلظت های ۲۵ و ۱۲ و ۶/۲۵ میکرو گرم در میلی لیتر از سافرانول تهیه و بر تعداد مشخصی از دو گونه کاندیدا اثر داده شد. تست حداقل غلظت مهار کننده گی (MIC) و حداقل غلظت کشندگی (MFC) در محیط سابورو ارزیابی شد .

یافته ها : میزان حداقل غلظت مهار کننده عصاره الکلی کلاله زعفران برای کاندیدا آلبیکنس ۲۵۰ میکرو گرم در میلی لیتر و برای کاندیدا دابلینینسیس ۱۲۵ میکرو گرم در میلی لیتر بود و MFC برای کاندیدا آلبیکنس ۵۰۰ میکرو گرم در میلی لیتر و برای کاندیدا دابلینینسیس ۱۲۵ میکرو گرم در میلی لیتر است . هم چنین حداقل غلظت مهار کننده سافرانول زعفران برای کاندیدا آلبیکنس ۱۲/۵ میکرو گرم در میلی لیتر و برای کاندیدا دابلینینسیس ۶/۲۵ میکرو گرم در میلی لیتر بود .

نتیجه گیری : به نظر می رسد عصاره الکلی و سافرانول رشد دو گونه کاندیدا آلبیکنس و دابلینینسیس را مهار می کنند، اما سافرانول اثرات ضد قارچی قوی تری نسبت به عصاره زعفران داشته و کاندیدا دابلینینسیس نیز از کاندیدا آلبیکنس حساس تر است . بنابراین عصاره الکلی کلاله و سافرانول زعفران به عنوان مهار کننده های رشد کاندیدا در درمان عفونت های قارچی مطرحند .

واژه گان کلیدی : کاندیدا آلبیکنس، کاندیدا دابلینینسیس، عصاره الکلی کلاله و سافرانول زعفران، اثرات ضد قارچی

پست الکترونیک : sh.mohammadi@modares.ac.ir

* نویسنده مسئول ، آدرس : تهران ، دانشکده علوم پزشکی ، دانشگاه تربیت مدرس

تلفن : ۴۰ ۸۴۵ ۸۲۸-۰۲۱ همراه : ۶۸ ۳۱-۰۹۱۲

تاریخ دریافت : ۸۷/۱/۱ تاریخ پذیرش : ۸۸/۹/۲۵

مقدمه:

بیماری های قارچی از جمله بیماری های شایع در جهان هستند که با اجتماعی و مالی فراوانی را به جوامع انسانی تحمیل می کنند. یک سوم زنان در طی دوران باروری و نیمی از زنان تا پایان عمر حداقل یک بار عفونت های واژنیت کاندیدیایی را تجربه می کنند [۱]. کاندید یازیس توسط گونه های کاندیدا رخ می دهد و گونه های مختلف کاندیدا به صورت هم زیست در مجاری مخاطی و گوارشی بدن وجود داشته و در شرایطی که مقاومت میزبان به صورت موضعی و یا سیستمیک دچار اختلال می گردد به صورت پاتوژن عمل می کنند [۲]. آنتی بیوتیک های مصنوعی (سنتتیک) علیرغم نقش مهمی که در درمان دارند سبب بروز مقاومت های دارویی نیز می شوند. بنابراین امروزه بیش تر پژوهش ها به سمت استفاده از گیاهان دارویی معطوف شده است. به منظور دستیابی به مواد طبیعی داروی با خواص ضد قارچی، عصاره های گیاهی و اسانس ها مورد توجه محققین می باشند. به همین منظور در این تحقیق، اثرات ضد قارچی عصاره های الکلی کلاله زعفران و ساfranول این گیاه مورد ارزیابی قرار گرفت. گیاه زعفران با نام علمی *Crocus sativum* جز خانواده زنبق، رده تک لپه ای ها می باشد که در مناطق مختلف قدرت رویش دارد. که به نام های زعفران، حاوی، جادی، لرکیماس، اذن در لغت نامه ها و فرهنگ ها انسان ها قرار گرفته است. زعفران گیاه پیاز دار چند ساله است که تا حدود ۱۰ تا ۳۰ سانتی متر ارتفاع دارد. گل زعفران به نام زعفران (*Rose of the saffron*) نامیده می شود، درون گل خامه قرار دارد. یک فیلانث طولیل سفید رنگ بانوک نارنجی که به یک کلاله قرمز رنگ ۲ شاخه ای به طول ۲/۵ تا ۳ سانتی متر منتهی می شود. کلاله پس از خشک شدن محصول تجاری زعفران را تشکیل می دهد [۳]. هر کلاله حدود ۲ میلی گرم وزن دارد و اندازه آن بیانگر مرغوبیت

خاک و شرایط آب و هوایی است [۴]. در ایران از هر ۳ کیلوگرم گل شکسته شده بین ۴۰ تا ۴۵ گرم زعفران خشک تولید می شود [۵].

زعفران به عنوان یکی از گیاهان دارویی مهم در هندوستان بوده است که از آن به عنوان تقویت کننده قلب، پاد زهر قوی داروی نشاط آور، تقویت کننده کبد و اعصاب، درمان آکنه و جوش، بیماری های پوستی، خونریزی مغزی و آرتروز، آسم، سل ریوی، سینه درد، سوء هاضمه، دهان شویه، آب مروارید، انسداد مجاری صفراوی و ... استفاده می شود [۶ و ۷]. عمده ترین ترکیبات موجود در کلاله شامل کربوهیدرات ها، مواد معدنی، ویتامین، چربی، رنگ ریزه، متروژوئیدی تلخی به نام پیکروکروسین و ترکیبات فرار می باشد.

در بررسی های انجام شده توسط محققین مختلف در سال ۲۰۰۳ از جمله Lampe بر این عقیده و باور می باشند که ترکیبات و ساختارهای شیمیایی از گیاهان مختلف که به عنوان افزودنی هایی گیاهی در غذاها مصرفی می شوند. نقش مهمی در سلامت افراد ایفا می کنند. در بدن انسان این ترکیبات طبیعی دارای نقش های مختلفی می باشند از جمله خواص ضد اکسیدانسی، تعدیل آنزیم ها، تعدیل متابولیسم استروئیدها در بدن، اثرات ضد ویروسی، ضد میکروبی علیه طیف وسیعی از میکروارگانیسم های بیماری زا [۳ و ۹].

در این تحقیق به بررسی اثرات ضد قارچی از عصاره های الکلی کلاله زعفران و ساfranول بر روی مهار رشد دو گونه کاندیدا استفاده شده است. از آنجایی که زعفران یک چاشنی غذایی سنتی در ایران مصرف دارد و با توجه به سابقه اثرات ضد میکروبی آن لذا در این تحقیق با استفاده از روش مداخله ای، بر آن شدیم خواص ضد قارچی زعفران را علیه دو گونه پراهمیت کاندیدا برای اولین بار در ایران با استفاده از زعفران زندی قائنات مشهد در دانشگاه تربیت مدرس در طی

سال ۱۳۸۷ ارزیابی نمائیم .

مواد و روش تحقیق :

الف) تهیه عصاره های الکلی کلاله زعفران و ساfranول :

برای تهیه عصاره الکلی کلاله از روش خیساندن استفاده شد. ۴ گرم از کلاله زعفران پودر و سپس داخل ظرف شیشه ای تیره ریخته و به آن ۵۰۰ میلی لیتر اتانول ۸۰ درجه افزوده شد. بعد از ۲۴ ساعت محتویات ظرف سانتریفوژ و رسوبات جدا گردید. با کمک دستگاه حذف حلال در خلاء در دمای ۵۰ درجه سانتی گراد اتانول حذف شد و عصاره تغلیظ شده برای خشک شدن به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۵۰ درجه سانتی گراد قرار گرفت و پس از خشک شدن کامل در فریزر ۲۰- درجه سانتی گراد تا زمان استفاده نگهداری شد. ساfranول دارای فرمول بسته $C_{17}H_{11}$ می باشد و حدود ۰/۲ درصد وزن مولکولی زعفران را تشکیل می دهد. این ترکیب در زعفران تازه وجود ندارد و غلظت آن در زعفران خشک شده به شرایط خشک کردن و ذخیره سازی بستگی دارد که در این تحقیق به صورت آماده از شرکت سیگما خریداری شد. ساfranول به صورت آماده از شرکت سیگما خریداری شد. و به صورت مداخله ای بر روی جمعیت 1×10^3 سلول قارچی دو گونه کاندیدا قارچی اثر داده شده است.

ب) تهیه سوسپانسیون قارچی :

ابتدا قارچ کاندیدا آلبیکنس سویه استاندارد ATCC ۱۰۳۲۱ کاندیدا دابلی بنسیس CD ۳۶ پس از خریداری از مرکز پژوهش های علمی - صنعتی بر روی محیط ساپورو دکستروز آگار حاوی کلرامفنیکل کشت داده شد و به مدت ۲۴ ساعت در انکوباتور $37^{\circ}C$ قرار گرفت. پس از گذشت این زمان و رشد مخمرهای کاندیدا از مخمرهای کاندیدا آلبیکنس و دابلینینسیس، سوسپانسیون قارچی حاوی 1×10^3 سلول مخمیری تهیه شد. بدین ترتیب که ابتدا در یک میکروتیوب یک میلی لیتری مقدار ۵۰۰ لا مبداء PBS استریل ریخته شد. سپس در کنار شعله و زیر هود با استفاده از یک

آس استریل مقدار کمی از مخمرهای رشد یافته روی محیط ساپورو را با ملایمت از محیط کشت برداشته شد و درون میکروتیوب منتقل گردید. پس از مخلوط شدن مخمر در بافر با استفاده از لام نتوبار تعداد سلول های مخمیری با میکروسکوپ نوری شمارش گردید. در صورت غلیظ بودن از استوک اولیه سوسپانسیون رقیق تری تهیه شد.

ج) تعیین حداقل غلظت مهار کننده (MIC) :

به منظور بررسی اثرات ضد قارچی عصاره الکلی کلاله زعفران و هم چنین ساfranول، تعیین MIC مواد مذکور به روش میکرودایلوشن (رقت سازی در لوله) مطابق استاندارد Nccls انجام شد [۸].

روش انجام تست میکرودایلوشن :

سوسپانسیون قارچی طبق روش توضیح داده شده در بند (ب) به میزان 1×10^3 شمارش و تهیه شده و هم چنین از عصاره الکلی کلاله زعفران رقت های ۵۰، ۲۵، ۱۲۵، ۷۵، ۳۲ میکروگرم در میلی لیتر و از ساfranول که به صورت آماده و مایع از شرکت سیگما خریداری شده بود رقت های تهیه ۲۵، ۱۲/۵، ۶/۲۵، ۳/۱۵، ۱/۷۵ میکروگرم در میلی لیتر شد.

به منظور تعیین MIC پس از رقت سازی از عصاره های مورد نظر برای هر عصاره به ازای هر گونه قارچ کاندیدا، از یک سری ده تایی لوله آزمایش استفاده شد. بدین صورت که هشت لوله برای غلظت های مختلف عصاره ها و شامل محیط بود و برات و سوسپانسیون قارچی و عصاره ها و یک لوله کنترل منفی (شامل قارچ، محیط کشت و PBS بدون حضور عصاره ها و یک لوله کنترل مثبت شامل یک داروی ضد قارچی (کلوتریمازول) با غلظت یک میلی گرم در میلی لیتر به عنوان شاهد دارویی استفاده گردید.

روش انجام تست بدین صورت بود که ابتدا محیط ساپورو برات تهیه شد. سپس اتوکلاو گردید و در یخچال نگه داری شد و برای هر بار انجام آزمایش از

سه بار تکرار شد.

یافته ها:

نتایج بدست آمده نشان داد که میزان MIC سافرانول برای کاندیدا آلبیکنس ۱۲/۵ میکروگرم در میلی لیتر و برای کاندیدا دابلینینسیس ۶/۲۵ میکروگرم در میلی لیتر و میزان MIC عصاره الکلی کلانه زعفران برای کاندیدا آلبیکنس ۲۵۰ میکروگرم در میلی لیتر و برای کاندیدا دابلینینسیس ۱۲۵ میکروگرم در میلی لیتر بود. پس از تعیین MFC بعد از ۲۴ ساعت انکوباسیون نمونه ها و شمارش تعداد کلنی ها ایجاد شده که نشان دهنده اثرات مهارتی عصاره الکلی کلانه زعفران و سافرانول روی رشد کاندیدا آلبیکنس سویه استاندارد ATCC ۱۰۳۲۱ و کاندیدا دابلینینسیس ۳۶CD بود. میزان MFC در عصاره کلانه الکلی زعفران برای کاندیدا آلبیکنس ۵۰۰ میکروگرم در میلی لیتر و برای کاندیدا دابلینینسیس ۱۲۵ میکروگرم در میلی لیتر بوده است. میزان MFC در سافرانول برای کاندیدا آلبیکنس ۲۵ میکروگرم در میلی لیتر و برای کاندیدا دابلینینسیس ۶/۲۵ میکروگرم در میلی لیتر بوده است.

تعداد کلنی های مخمری رشد یافته روی محیط جامد سابورو از لوله های آزمایش حاوی رقت های مختلف عصاره های مختلف کلانه و سافرانول نشان داد که بیش ترین تعداد کلنی در کم ترین رقت (لوله انتهایی که پایین ترین غلظت عصاره را داشتند) در سافرانول برای کاندیدا آلبیکنس حدود ۳۰ کلنی بوده و برای دابلینینسیس ۱۴ کلنی که در محدوده MIC به تعداد ۲-۰ کلنی کاهش یافته بود. هم چنین بیش ترین تعداد کلنی در کم ترین رقت، در عصاره الکلی کلانه برای کاندیدا آلبیکنس حدود ۴۰ کلنی بوده و برای دابلینینسیس ۲۰ کلنی که در محدوده MIC به تعداد ۳-۱ کلنی کاهش یافته بود جدول (۱).

بحث و نتیجه گیری:

در سال های اخیر عفونت های قارچی سیستمیک ایجاد شده توسط گونه های کاندیدا به دلیل افزایش

آن استفاده شد. در زیر هود و تحت شرایط استریل به هر یک از لوله های آزمایش حدود نیم میلی لیتر محیط کشت استریل اضافه گردید و سپس نیم میلی لیتر از غلظت ۵۰۰ میکروگرم در میلی لیتر عصاره الکلی زعفران و غلظت ۲۵ میکروگرم در میلی لیتر سافرانول به اولین لوله ها به طور مجزا افزوده گردیده در ادامه از لوله اول مقدار نیم میلی لیتر به لوله بعدی افزوده شد و این عمل تا لوله آخر تکرار شد تا در نهایت از لوله آخر نیم میلی لیتر به بیرون منتقل گردید و بدین ترتیب رقتی از عصاره های مختلف کلانه ۱۲۵، ۷۵، ۳۲، ۵۰۰، ۲۵۰ میکروگرم در میلی لیتر و سافرانول ۲۵، ۱۲/۵، ۶/۲۵، ۳/۱۵، ۱/۷۵ میکروگرم در میلی لیتر تهیه شد. در نهایت سوسپانسیون قارچی به حجم ۰/۵ میلی لیتر حاوی 1×10^2 عدد سلول مخمیری به تمام سری رقت های موجود افزوده گردید. به عنوان کنترل منفی از محیط کشت و سوسپانسیون مخمیری بدون حضور عصاره های الکلی سافرانول و کلانه زعفران استفاده شد، حجم نهایی هر یک از لوله ها در نهایت یک میلی لیتر بود.

سپس تمامی لوله ها به مدت ۲۴ ساعت در 37°C انکوبه گردیدند. پس از طی ۲۴ ساعت، کدورت لوله ها و رشد مخمرها مورد ارزیابی قرار گرفت و لوله ای با کم ترین غلظت عصاره که فاقد رشد کاندیدا بود و کدورتی مشاهده نشد به عنوان MIC آن عصاره در نظر گرفته شد. جهت ارزیابی و تعیین حداقل غلظت کشندگی (MFC) محتوی تمام لوله ها روی محیط جامد سابورو دکستروز آگار کشت داده شدند. بدین ترتیب که ۱۰ لامبدا از نمونه درون لوله ها را برداشت نموده و به پلیت های حاوی سابورو دکستروز آگار جامد حاوی کلرامفنیکل منتقل شد و به مدت ۲۴ ساعت دیگر در انکوباتور 37°C انکوبه گردیدند. بالاترین رقت موجود از عصاره که فاقد رشد کاندیدا آلبیکنس بر روی محیط کشت جامد سابورو دکستروز آگار بود به عنوان MFC آن عصاره در نظر گرفته شد تمام آزمایش ها

جدول (۱) : بررسی مقایسه ای MIC و MFC عصاره های الکلی کلانه زعفران و ساfranول بر روی دو گونه قارچی کاندیدا آلبیکنس و کاندیدا دابلینسیس

کاندیدا دابلینسیس		کاندیدا آلبیکنس		عصاره الکلی کلانه زعفران
MIC میکروگرم در میلی لیتر	MFC میکروگرم در میلی لیتر	MIC میکروگرم در میلی لیتر	MFC میکروگرم در میلی لیتر	
۱۲۵	۱۲۵	۲۵۰	۵۰۰	
۶/۲۵	۶/۲۵	۱۲/۵	۲۵	ساfranول

می توان چنین اظهار داشت که زعفران دارای اثرات ضد میکروبی علیه هلیکوباکتر می باشد [۱۱]. با توجه به نتایج تحقیق حاضر که حاکی از اثرات ضد قارچی قابل توجه عصاره الکی زعفران و ساfranول در جلوگیری از رشد کاندیدا آلبیکنس و دابلینسیس در محیط *In vitro* بود. می توان امیدوار بود که از این ترکیبات طبیعی در تحقیقات آتی استفاده شود. امروزه گونه های کاندیدا غیر آلبیکنس در ایجاد بیماری های مختلفی نقش دارند از جمله کاندیدا دابلینسیس که در بسیاری از خصوصیات فنوتایپی مانند تولید کلامیدوسپور و جرم تیوب همانند کاندیدا آلبیکنس می باشد، که اگر چه رابطه بسیار نزدیکی با کاندیدا آلبیکنس دارد اما از نظر اپیدمیولوژیکی، فاکتورهای ویروانس و مقاوم بودن به داروی ضد قارچی فلوکونازول از کاندیدا آلبیکنس متمایز می شود [۱۲ و ۱۳]. اینگونه کاندیدا در کاندیدوز دهانی افراد HIV و در ایجاد کاندیدوز اریتماتوز رُتریوال مؤثر می باشد [۱۴ و ۱۵]. نتایج حاصل از این تحقیق نشان داد که ساfranول اثرات مهار کننده بیشتری نسبت به عصاره الکی زعفران داشته، چون دارای MIC کمتری نسبت به عصاره الکی بوده است. در این مطالعه کاندیدا دابلینسیس نسبت به اثر ضد قارچی ساfranول و عصاره الکی حساس تر از کاندیدا آلبیکنس بوده است. این حساسیت بیشتر می تواند به متفاوت بودن

بیماری های سرکوب کننده ایمنی از قبیل ایدز، اختلالات هماتولوژیک، بدخیمی ها و بروز مقاومت های آنتی بیوتیکی در مقابل داروهای رایج مورد استفاده، افزایش یافته است [۹]. به همین منظور یافتن ترکیباتی که بتوانند جایگزین مناسب برای آنتی بیوتیک ها و داروهای ضد قارچی رایج باشند از موضوع های مورد بحث در این زمینه می باشد در مطالعه ای که توسط SENGUL و همکاران در سال ۲۰۰۹ صورت گرفت اثرات ضد میکروبی و ضد اکسید آنتی گیاهان مختلف از جمله زعفران مورد ارزیابی قرار گرفت. در این بررسی اثرات ضد میکروبی عصاره های متانولی گیاه زعفران و چندین گیاه دیگر در مقابل ۱۰ میکروارگانیسم از جمله باسیل های گرم مثبت مثل باسیلوس ها، سودوموناس ها، سالمونلا ها، استرپتوکوک پیوژن، اشرشیاکلی، قارچ ها از جمله کاندیدا آلبیکنس، اسپرژیلوس ها، پنی سیلوم ها، در ماتوفیت ها، می باشند و می توان از این ترکیبات طبیعی علیه طیف وسیعی از بیماری های میکروبی در مان سود جست [۱۰]. در مطالعه نخی و همکاران در سال ۲۰۰۸ زعفران و ترکیبات مهم آن از جمله کروسین و ساfranول آن بر روی مهار رشد باکتری هلیکوباکتر پیلوری مورد ارزیابی قرار گرفت. نتایج حاصل از این بررسی نشان داد که عصاره های آبی و متانولی این گیاه روی مهار رشد باکتری هلیکوباکتر مؤثر بوده است. بنابراین

نیز اهمیت و جایگاه خود را پیدا کرده است و استفاده از دارو با منشای گیاهی با عنوان یک رویکرد جدید در جامعه ما مطرح باشد.

از آنجایی که استفاده از این گیاه به عنوان یک ماده غذایی ارزشمند در جامعه فعلی پذیرش عمومی دارد و از آنجایی که خواص ضد قارچی این گیاه بر روی رشد قارچ های مورد مطالعه دارای خواص مطلوبی می باشد و با توجه به اهمیت شیوع عفونت های قارچی در جامعه امروز امید است که این پژوهش، بستر مناسب تحقیقات آتی در ساخت و تولید اشکال مختلف دارویی مناسب و مؤثر انجام پذیرد تا ضمن غلبه بر مقاومت های دارویی از خروج سرمایه های کشور جهت خرید داروهای ضد قارچی ممانعت به عمل آمده باشد.

درصد ترکیبات و نوع ترکیبات دیواره سلولی و غشای قارچی و فاکتورهای ویرولاسی مربوط باشد که در کاندیدا دابلینینسیس، به مراتب کمتر از کاندیدا آلبیکنس بوده است. عوامل متعددی مانند روش عصاره گیری نوع میکروارگانیسم می تواند روی خواص مهارتی رشد یک ماده مؤثر باشد. استخراج از گیاه حداقل به سه روش قابل انجام است. ۱- تقطیر گیاه با آب و بخار، ۲- استخراج مواد توسط حلال های شیمیایی، ۳- فشردن گیاه در حرارت معمول که در این بررسی از بهترین حلال جهت دستیابی بر خواص ضد قارچی مناسب کلانه زعفران استفاده شد. مواد شیمیایی مستخرج از گیاهان با عنوان ترکیبات ضد میکروبی به علت دارا بودن عوارض جانبی کمتری و یا عدم عوارض جانبی در کشور ما

REFERENCES :

منابع :

- 1) Richters, Ruddph P, Messer Sh. Antifungal susceptibilities of candida species causing vulvovaginitis and Epidemiology of Recurrent cases. journal of clinical Microbiology. 2005; 43(5): 2155-62.
- 2) Appleton SS: Candidiasis: Pathogenesis, clinical characteristics, and treatment. J calif Dent Assoc. 2000; 28(12): 442-8.
- 3) Lampe J. Spicing up a vegetation diet: chemopreventive effects of phytochemical. Amjcin Nutr 2003; 78(3sapp): 5795-5835.
- 4) Tarantilis PA, Polissiou M, Manfait M. Separation of picrocrocin, cis-tfancrocins and safranal of saffron using high-perfonnance liquid chromatography with photodiode-array detection- Journal of Chromatography A, 1994; 664(1): 55-61.
- 5) Balin K, Pratt L. Oxygen modulates the growth of skin fibroblasts. Invitro cellular and Developmental Biology-Animal. 2002; 38(5): 305-310.
- 6) Kafi M. Saffron production, processing and use science publishers, Inc 2006.244 pages.
- 7) Lozano P, Castellar MR, Simancas M J, et al. Quantitative high performance Liquid

- chromatographic method to analyze commercial saffron (*Crocus sativus* L) products. *Journal of Chromatography A*, 1999; 830: 477-483.
- 8) Pujol I, Caplla J, Fernandez-Torres B, et al. Use of the sensitive colorimetric microdilution Panel for antifungal susceptibility testing of dermatophytes. *J. Clin. Microbiol.* 2002; 40(7): 2614-2621.
- 9) Boerlin P, Boerlin-PF, Ddurussel C, et al. Cluster of atypical *Candida* isolates in a group of Human immunodeficiency virus positive drug users *J. Clin. Microbiol.* 1995; 33: 1129-1135.
- 10) Sengul M, Ylidiz H, Gungor N, et al. total phenolic content, antioxidant and antimicrobial activities of some medicinal plants *pak. j. pharm. sci.* 22, 2009; 22(1): 102-6.
- 11) Nakhaei M, Khaje-karamoddin M, Ramezani M, Inhibition of *Helicobacter pylori* growth in vitro by saffron (*Crocus sativus* L.) *Iran j basic Med sci*, 2008; 11(2): 91-6.
- 12) Davis LE, Shields CE, Merz WG. Use of a commercial reagent leads to reduced Germ tube production by *Candida dubliniensis*. *J. Clin. Microbiol.* 2005; 43(5): 2483-6.
- 13) Staib F, Arasteh K. Chlamyospore formation on Staib agar. Observations made before *Candida dubliniensis* was described. *Mycoses*; 2001; 44(1-2): 23-7.
- 14) Ruesga MT, Ceballos L, Quinds G. Prevalence of oral lesions by *Candida* sp, Their varieties and serotypes in a population of patient with AIDS under a Highly active antiretroviral therapy. *Rev. Iberoam. Micol.* 1998; 15(3): 141-5.
- 15) Chen jvv, Flai TZC, Sexton j. Association of dental health parameter with oral lesion prevalence in human immunodeficiency virus-infected Romanian children. *pediatric Dentistry.* 2003; 25(5): 479-484.

Evaluation of antifungal activity of alcoholic extract and safranol of *Crocus sativum* on *Candida albicans* and *Candida dubliniensis* growth in vitro.

Roudbary M,¹Roudbar Mohammadi Sh,²Hajimoradi M,³Taghizadeh Armaki M,⁴Ghasemi Sakha F,⁵Vahidi M⁶

1- Dept. of Mycology, School of Medical Sciences, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran.

2- Dept. of Mycology, School of Medical Sciences, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran.

3- Dept. of Emenology, School of Medical Sciences, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran.

4- Dept. of Mycology, School of Medical Sciences, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran.

5- Dept of MSc Physiology, Schoo of Azad, Damghan. Iran.

6- Dept of Department of Mycology, School of Medical Sciences, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran.

(Received 27 Apr, 2008 Accepted 13 Sep, 2009)

A b s t r a c t :

Introduction: *Candida* species are opportunistic fungi and can transform into pathogenic form in favorable conditions such as in immune-compromised patients, causing invasive fungal disease. The *Crocus sativum* is reported to have several therapeutic effects including antifungal activity. In this research, the antifungal effects of alcoholic extract and safranol of *Crocus sativum* on *Candida albicans* and *Candida dubliniensis* growth were assessed.

Materials and Methods: In this study, the effect of alcoholic extract and safranol of *Crocus sativum* on *Candida albicans* (standard strain ATCC10321) and *Candida dubliniensis* (standard strain CBS7987CD36) was assessed by micro-dilution broth method. Concentrations of 500, 250, 125, ... and 25, 12.5, 6.25, ... $\mu\text{g/ml}$ of alcoholic extract and safranol of *Crocus sativum* were prepared for MIC (Minimum Inhibitory Concentration) test, respectively. MIC and MFC (Minimal Fungicide Concentration) were evaluated.

Results: Our results showed that MIC of alcoholic *Crocus sativum* extract for *Candida albicans* was 250 $\mu\text{g/ml}$ and that of *Candida dubliniensis* was 125 $\mu\text{g/ml}$. MIC of safranol for *Candida albicans* was 12.5 $\mu\text{g/ml}$ and that of *Candida dubliniensis* was 6.25 $\mu\text{g/ml}$ for *Candida dubliniensis*. MFC of alcoholic extract for *Candida albicans* was 500 $\mu\text{g/ml}$ and that of *Candida dubliniensis* was 125 $\mu\text{g/ml}$. MFC of safranol for *Candida albicans* and *Candida dubliniensis* were 25 $\mu\text{g/ml}$

and 6.25 µg/ml, respectively.

Conclusion: The present study was conducted to evaluate the antifungal effect of alcoholic extract and safranin of *Crocus sativum* against *Candida albicans* and *Candida dubliniensis* by microdilution method in vitro. It seems that alcoholic extract and safranin of *Crocus sativum* could inhibit *Candida albicans* and *Candida dubliniensis* growth; however, according to the results, safranin had more antifungal activity than alcoholic extract and *Candida dubliniensis* was more sensitive than *Candida albicans*. Thus, it is concluded that *Crocus sativum* can be used as an inhibitor of *Candida* species growth in clinical trials, especially in treatment of patients with fungal infection as natural drug.

Key Words: *Candida albicans*, *Candida dubliniensis*, alcoholic extract and safranin of *Crocus sativum*, antifungal.