فصلنامه (علمی – پژوهشی)
زیست شناسی تکوینی
سال دوازدهم، شماره ۱، زمستان ۱۳۹۸ ص. ۱-۱۲

مقاله پژوهشی

مقایسه اثر عصاره آبی و اتانولی کرفس (Apium gavelens) در جلوگیری از رشد آسپرژیلوس فلاووس، ترایکوفایتون روبروم و کاندیدا آلبیکنس در شرایط in vitro

رباب ابراهیمی[۱]، سیدجمال هاشمی[۲*]، روشنک داعی[۲]، صادق خداویسی[۲]، پگاه آردی[۱]، شیما پارسای[۱]

[۱] دانشکده بهداشت، دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران، ایران
[۲] گروه قارچ شناسی پزشکی، دانشکده بهداشت، دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران، ایران

[*] Email: sjhashemi@tums.ac.ir

تاریخ دریافت: ۹۸/۰۶/۲۵ تاریخ پذیرش: ۹۸/۱۰/۱۹

چکیده

امروزه تعداد زیادی از داروهای ضد قارچی در دنیا تولید می‌شوند، اما مسئله اصلی مقاومت دارویی به این درمان‌ها می‌باشد و به همین دلیل یافتن درمان‌های جدید و یا موادی که اثر ضد قارچی داشته باشند همواره مورد توجه پژوهشگران حوزه‌های مختلف می‌باشد. لذا در این تحقیق به بررسی اثرات ضد قارچی عصاره کرفس بر روی قارچ های مخمری جنس کاندیدا آلبیکنس، درماتوفیت‌ها (ترایکوفایتون روبروم) و ساپروفیت‌ها (آسپرژیلوس فلاووس) در شرایط آزمایشگاهی پرداخته شده است. در این مطالعه آزمایشگاهی، عصاره‌هاي آبی و الکلی کرفس با روش خیساندن تهیه شدند. فعالیت ضدقارچی عصاره الکلی و آبی گیاه کرفس با استفاده از روش انتشار در دیسک و انتشار در چاهک برای ۳ نوع قارچ آسپرژیلوس فلاووس، ترایکوفایتون روبروم و کاندیدا آلبیکنس با ۳ بار تکرار ارزیابی گردید. حداقل غلظت مهارکنندگی (MIC) و حداقل غلظت کشندگی (MFC) نیز به روش می‌کرود ایلیشین تعیین گردید. نتایج نشان داد عصاره اتانولی گیاه کرفس در مقایسه با عصاره آبی در شرایط آزمایشگاهی اثر بازدارندگی بیشتري برسویه‌های مورد مطالعه دارد. در نتیجه عصاره اتانولی گیاه کرفس از اثر ضد قارچی بیشتری برخوردار است.

کلیدواژه‌ها: عصاره آبی و الکلی کرفس، کاندیدا آلبیکنس، آسپرژیلوس فلاووس، ترایکوفایتون روبروم.

مقدمه

بیماری‌های قارچی در مورد انسان به عنوان پدیده بزرگ قرن بیستم و بیست ویکم شناخته شده است. استفاده از کورتیکو استروئیدها و داروهای ضد میکروبی در طب بالینی، باعث افزایش فراوانی بیماری‌های قارچی شده است. تجویز عوامل ضد میکروبی و استفاده از وسایل پزشکی در بیمارانی که وضعیت وخیمی از نظر سیستم ایمنی دارند موجب شده است که این بیماران نسبت به بیماری‌های قارچی حساسیت ویژه‌ای پیدا کنند [۹،۲۶]. گیاهان دارویی در درمان سنتی بسیاری از بیماری‌ها استفاده می‌شود. استفاده از گیاهان دارویی در میان مردم و پزشکان برای درمان بیماری‌ها متداول است و بسیاری از بیماری‌های عفونی و غیر عفونی با داروهای گیاهی درمان شده‌اند. امروزه، به دلیل افزایش روزافزون مقاومت باکتری‌ها و

قارچ‌ها به ترکیبات ضدمیکروبی، همچنین عوارض جانبی بالای ناشی از مصرف داروهای شیمیایی، توجه محققان به گیاهان دارویی و ترکیبات ضد میکروبی طبیعی جهت درمان عفونت‌ها افزایش یافته است [۳۲] NAZA بیماران دارای نقص سیستم ایمنی نظیر بیماران مبتلا به ایدز و افراد دریافت کننده پیوند بروز می‌نماید. گونه‌های مختلف آسپرژیلوس نه تنها از جنبه عفونت‌زایی بلکه از لحاظ مقاومت دارویی نیز حائز اهمیت هستند علیرغم توسعه داروهای ضد قارچی در دهه‌های اخیر هنوز طیف درمان های مؤثر محدود بوده و سمیت و مسایل فارماکوکنتیک مرتبط با آن‌ها مشکل‌ساز است. گونه‌های متعددی از قارچ‌ها مقاومت در شرایط آزمایشگاهی و هم مقاومت در شرایط بالینی به عوامل ضدقارچی را نشان می‌دهند در صورتی که در گذشته متعلق به گونه های حساس بودند [۲۲،۲۳].

کاندیدا آلبیکنس از شایع‌ترین قارچ‌های فرصت طلب مسبب عفونت قارچی است که انتشار جهانی دارد و بر روی میوه و سبزیجات یافت می‌شود و مخمر اندوژن دستگاه گوارش و سطوح مخاطی بدن بوده اگر چه معمولا به تعداد کمی در پوست انسان وجود دارد ولی در پوست آسیب دیده به سرعت کلونیزه می‌شود. همچنین به صورت حاد تحت حاد و مزمن، در پوست، ناخن، مخاط واژن، ریه و دستگاه گوارش به صورت سیستمیک همراه با سپتی سمی، اندوکاردیت و مننژیت مشاهده می‌شود [۱۸]. تریکوفایتون روبروم یک درماتوفیت انسان دوست با انتشار جهانی و از عوامل شایع کچلی در انسان بخصوص کچلی کشاله ران پا و دست در همه نواحی دنیا می‌باشد. غفونت حاصله از تریکوفایتون روبروم مزمن بوده و در بعضی از افراد تا آخرعمر ادامه می یابد و معمولا موها را مورد حمله قرار نمی‌دهد ولی در صورت تهاجم عفونت از نوع اکتواندوتریکس است [۱۹]. با توجه به اهمیت روزافزون گیاهان دارویی به‌عنوان جایگزین آنتی‌بیوتیک‌ها، وجود چندین ترکیب فعال ضد قارچی درکرفس همچون فلاونوئیدها به شکل apigenin و quercetrin ٪۱۷، ساپونین ٪۰/۳۶، تانن ۱٪، لیمونن، سدانولین، کومارین و ٪۰/۳۳ که با آسیب رساندن به دیواره سلولی قارچ مؤثر است [۱۴]. در این تحقیق به بررسی اثرات ضد قارچی عصاره آبی و الکلی کرفس بر روی قارچ‌های مخمری جنس کاندیدا آلبیکنس، درماتوفیت‌ها (ترایکوفایتون روبروم) و ساپروفیت‌ها (آسپرژیلوس فلاووس) در شرایط آزمایشگاهی پرداخته شده است.

مواد و روش‌ها

کلیه مراحل انجام آزمایش از جمله تهیه عصاره، تهیه سوسپانسیون و انجام آزمایشات مربوطه در آزمایشگاه قارچ شناسی دانشکده بهداشت دانشگاه علوم پزشکی استان تهران انجام شده است.

تهیه عصاره کرفس

در این بررسی از اندام هوایی گیاه کرفس تهیه شده از فروشگاه معتبر استان تهران و تایید شده توسط دانشکده داروسازی دانشگاه تهران استفاده شدکه پس از تمیز شدن در شرایط مناسب و در سایه خشک، سپس توسط آسیاب پودر گردید. جهت تهیه عصاره‌هاي آبی و الکلی به روش خیساندن (Maceration) ۱۰۰گرم از برگ‌هاي پودر شده گیاه به ارلن حاوي ۵۰۰ میلی لیتر آب مقطر و اتانول ۹۶ درجه (به طور جداگانه) اضافه شد و ارلن به مدت ۷۲ ساعت در دماي اتاق بر روي دستگاه همزن مغناطیسی قرار گرفت تا استخراج عصاره به‌طور کامل انجام گیرد. سپس مخلوط حلال و گیاه توسط صافی از هم جدا شد تا عصاره‌هاي اولیه به دست آید. عصاره هاي اولیه حاصل به مدت ۱۰دقیقه در ۳۰۰۰ دور بر دقیقه سانتریفیوژ شد. سپس عصاره حاصل در بن ماری ۴۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۴۸ ساعت قرار گرفت تا حلال آن‌ها تبخیر و عصاره‌هاي تغلیظ شده به دست آمد. عصاره‌هاي تغلیظ شده در ظرف تیره استریل غیر قابل نفوذ نسبت به هوا و نور ریخته شد و تا زمان مصرف در ۴درجه سانتی‌گراد نگهداري شدند [۱۵].

جمع‌آوری نمونه‌های قارچی: نمونه قارچی کاندیدا آلبیکنس وآسپرژیلوس فلاووس به کار رفته در این تحقیق از کلکسیون آزمایشگاه مولکولار بیولوژی دانشکده بهداشت دانشگاه علوم پزشکی تهران وارد مطالعه شد. این ایزوله‌ها در

مطالعات قبلی از نمونه‌های بالینی گرفته شده از بیماران مبتلا به غفونت‌های قارچی جمع‌آوری و نگهداری شده بودند.نمونه قارچی تریکوفایتون روبروم از نمونه‌های بالینی بیماران مشکوک به عفونت قارچی مراجعه کننده به آزمایشگاه قارچ پزشکی دانشکده بهداشت دانشگاه علوم پزشکی تهران جمع‌آوری شد به این ترتیب که از کشت‌های مثبت از نظر قارچ ترایکوفایتون روبروم تعدادی انتخاب گردید و پس از انجام تست‌های تکمیلی (بررسی میکروسکوپی به روش اسلاید کالچر تست فیزیولوژیک اوره آگار) کلنی‌هایی که جهت تایید بهترین مشخصات را داشتند به عنوان نمونه ما انتخاب نهایی شدند.

تهیه سوسپانسیون: از سویه‌های قارچی مذکور که در محیط‌کشت سابورو دکستروز آگار رشد کرده‌اند ۳-۲ کلنی برداشته و به لوله آزمایش حاوی سرم فیزیولوژی استریل اضافه کرده کاملا مخلوط گردید سپس کدورت آن با لوله استاندارد نیم مک فارلند تنظیم گردید. براي به دست آوردن سوسپانسیون‌هاي یکنواخت از غلظت‌هاي قارچی، تعداد سلول‌هاي قارچی براي سوسپانسیون تهیه شده از سویه کاندیدا آلبیکنس با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر در طول موج ۵۳۰ نانومتر و با میزان عبور نور ۷۷%-۷۵ تقریباً حاوي 10^5 سلول و براي آسپرژیلوس فلاووس و ترایکوفیتون ربروم با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر در طول موج ۶۳۰ نانومتر و با میزان عبور نور ۸۲%-۷۸، حدود 10^6 سلول تخمین زده شد.

ارزیابی خاصیت ضدقارچی عصاره آبی و الکلی کرفس با دو روش

الف: انتشار در دیسک (disck diffusion): در این روش از دیسک‌های بلانک استفاده گردید به این صورت که بر اساس غلظت‌های مختلف از عصاره آبی و الکلی کرفس تهیه شد. برای تهیه غلظت‌ها از اتانول (برای عصاره الکلی کرفس) و از آب مقطر (برای عصاره آبی کرفس) استفاده شد که در پنج لوله ۵۰۰ میکرو لیتر اتانول ریخته و ۵۰۰ میکرو لیتر عصاره اولیه کرفس را به لوله اضافه کرده و بعد از شیک شدن دوباره ۵۰۰ میکرو لیتر از لوله شماره یک را به لوله شماره دو اضافه کرده و تا پایان لوله پنج این کار انجام گردید. ۵۰۰ میکرولیتر را دور ریخته که بر این اساس غلظت‌هایی از ۵۰۰، ۲۵۰، ۵/۱۲۵٬۶۲، ۲۵/۳۱ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر تهیه شد و از این غلظت‌ها بر روی دیسک‌های بلانک در سه مرحله و در هر مرحله ۵۰ میکرولیتر ریخته بعد در زیر هود صبر کرده عصاره‌ها جذب دیسک شوند. همین روش را برای تهیه رقت از عصاره آبی نیز تکرار شد. همچنین از دیسک حاوی فلوکونازول (کاندیداآلبیکنس)، ایتراکونازول (آسپرژیلوس فلاووس) و تربینافین (تریکوفایتون روبروم) به عنوان کنترل مثبت و از دیسک فاقد فلوکونازول، ایتراکونازول و تربینافین به‌عنوان کنترل منفی استفاده گردید. سپس یک لوپ از سوسپانسیون کشت استاندارد هر سوش قارچ روی محیط سابورو آگار دکستروز کشت داده شد و دیسک‌های حاوی عصاره‌ها در جای مشخص و در فواصل مناسب جای گذاری می شوند. بعد محیط‌کشت به مدت ۲۴ تا ۴۸ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد گذاشته شد. پس از این مدت قطرعدم هاله رشد برای غلظت‌های مختلف بر حسب میلی متر گزارش و مقایسه شدند [۲۱].

ب: انتشاردر چاهک (well diffusion): محیط‌کشت سابورو دکستروز آگار را در شرایط استریل تهیه کرده و داخل پلیت استریل تقسیم می‌کنیم و بعد از ۲۴ ساعت از منعقد شدن محیط‌ها به طور جداگانه یک لوپ از سوسپانسیون کشت استاندارد هر سوش قارچ روی محیط سابورو آگاردکستروز کشت داده شدند، سپس با انتهای پیپت پاستور استریل ۷ چاهک به قطر ۰/۶سانتی متر در پلیت ایجاد کردیم و۵۰ میکرولیتر از غلظت‌های ۵۰۰، ۲۵۰، ۱۲۵ ۵/٬۶۲، ۲۵/۳۱ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر آبی کرفس داخل هرکدام از چاهک‌ها ریخته شد. چاهک‌های ۶و ۷ نیز به عنوان کنترل مثبت (حاوی فلوکونازول برای کاندیدا آلبیکنس یا ایتراکونازول برای آسپرژیلوس فلاووس یا تربینافین برای تریکوفایتون) و کنترل منفی (فاقد دارو) بودند. همین روش برای غلظت‌های عصاره الکلی کرفس تکرار شد. سپس پلیت‌های چاهک گذاری شده در ۳۷ درجه قرارشد و نتایج حاصله از رشد قارچ‌ها روزانه بررسی شدند. برای کاندیدا آلبیکنس، آسپرژیلوس فلاووس و تریکوفایتون روبروم قطر

هاله عدم رشد پس از رشد پلیت کنترل منفی اندازه‌گیری و ثبت گردید(۲۰).

همچنین برای تعیین حداقل غلظت بازدارنده عصاره (MIC) و حداقل غلظت کشندگی عصاره (MFC) به روش میکرودایلوشن براساس پروتکل CLSI از محیط RPMI استفاده شد [۲۱].

در این روش به‌منظور ارزیابی اثر ضدقارچی عصاره الکلی کرفس، میکروپلیت‌هاي ۹۶خانه‌اي ته صاف به ابعاد ۸×۱۲ استفاده شد. درهر سري دو چاهک آخر به عنوان کنترل مثبت و کنترل منفی در نظر گرفته شد که چاهک کنترل مثبت محتوي ۱۰۰ میکرولیتر از محیط‌کشت RPMI^{1640} و ۱۰۰میکرو لیتراز سوسپانسیون قارچی رقیق شده و چاهک کنترل منفی محتوي ۲۰۰ میکرولیتر از محیط‌کشت RPMI^{1640} بود. در چاهک اول به میزان۲۰۰ میکرو لیتراز عصاره الکلی کرفس ریخته و در چاهک دوم تاچاهک ده، ۲۰۰ میکرو لیتر محیط‌کشت RPMI^{1640} ریخته و سپس به چاهک دوم ۱۰۰میکرو لیتر از عصاره الکلی کرفس افزوده در نهایت بعد از شیکر کردن از چاهک شماره دو ۱۰۰ میکرو لیتراز محلول (عصاره + RPMI) را برداشته و به چاهک شماره سه افزوده دور می‌ریزیم و به همین ترتیب تا چاهک شماره ده پیش می‌رویم که در نهایت بعد از شیکر کردن از لوله شماره ده ۱۰۰ میکرولیتر محلول را دور می‌ریزیم. سپس در هر چاهک ۱۰۰میکرولیتر از سوسپانسیون قارچ مورد نظر افزوده شد و با حرکت رفت و برگشت پیپت مخلوط گردید. رقت‌هاي عصاره الکی کرفس در مجاورت قارچ‌ها به ترتیب برابر ۵۱۲μg/ml، ۲۵۶، ۱۲۸،۶۴، ۳۲، ۱۶، ۸، ۴، ۲، ۱ بود. در میکروپلیت دوم عصاره الکلی کرفس را ۱به ۵۰۰ رقیق کرده در چاهک اول به میزان ۱۰۰ میکرو لیتراز عصاره الکلی کرفس ریخته و در چاهک دوم تاچاهک ده، ۱۰۰ میکرولیتر محیط‌کشت RPMI^{1640} ریخته و سپس به چاهک دوم ۱۰۰ میکرولیتر از عصاره الکلی کرفس افزوده در نهایت بعد از شیکر کردن از چاهک شماره دو ۱۰۰ میکرو لیتراز محلول (عصاره + RPMI) را برداشته وبه چاهک شماره سه افزوده دور می‌ریزیم و به همین ترتیب تا چاهک شماره ده پیش می‌رویم که در نهایت بعد از شیکر کردن ازلوله شماره ده ۱۰۰ میکرو لیتر محلول را دور می‌ریزیم. سپس در هر چاهک ۱۰۰ میکرو لیتراز سوسپانسیون قارچ مورد نظرافزوده شد و با حرکت رفت و برگشت پیپت مخلوط گردید. رقت‌هاي عصاره الکی کرفس درمجاورت قارچ‌ها به ترتیب برابر mg/ml 128×10^3 ,$64+10^3$,$32+10^3$,16×10^3 ,8×10^3، 4×10^3 ،$2+10^3$، 1×10^3 ،0.5×10^3 بود. هر دو میکروپلیت‌ها بدون هیچگونه حرکتی در دماي 35 درجه سانتی‌گراد انکوبه شد. زمانی که لوله کنترل کدر شد ؛نتایج تست خوانده شد بدلیل رنگی بودن عصاره، کدورت با چشم قابل دیدن نبود، در نتیجه کدورت یا باید با خواندن OD (Optical Density) دردستگاه ELISA Reader قرائت می گردید و یا از هر یک در محیط‌کشت SDA داده ومجددا محیط‌ها را در ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه نموده و پس از ۲۴ ساعت تشکیل یا عدم تشکیل کلونی با دید مستقیم بررسی شد و با پلیت‌هاي کنترل مثبت و منفی مقایسه شد. در این مطالعه از روش دوم استفاده شد. پس از طی این مدت عصاره که فاقد رشد قارچ بوده و فاقد کدورت به‌عنوان حداقل غلظت مهارکنندگی رشد قارچ (MIC) در نظر گرفته شد. سپس چاهکی که حاوي کمترین غلظت عصاره بود مقدار ۲۰ میکرولیتر روی سابرو دکستروز آگار کشت داده و به مدت ۲۴ ساعت در ۳۷ درجه قرار می‌دهیم. کمترین غلظت از عصاره که رشد قارچ مشاهده نشد به‌عنوان (MFC) این عصاره در نظر گرفته شد [۲۱].

جمع‌آوری نتایج، آنالیز و گزارش آن‌ها: جمع‌آوری نتایج با استفاده از کامپیوتر در جداول و نرم‌افزارهای excel و spss جهت آنالیز استفاده شد.همچنین با توجه به متغیرها از آزمون های کیفی (کای دو) و من یو ویتنی استفاده شد. داده‌ها با اطمینان ۹۵% و در سطح معناداری $P<0.05$ بررسی شد.

نتایج

در این مطالعه اثرات ضدقارچی عصاره‌هاي آبی و الکلی کرفس بر روي رشد سه گونه کاندیدا آلبیکنس، آسپرژیلوس فلاووس و تریکوفایتون روبروم با ۳ روش دیسک گذاری، چاهک گذاری با ۳ بار تکرار و روش میکرودایلوشن براي تعیین MIC و MFC بررسی شد. و نتایج زیر به دست آمد.

الف- قطر هاله عدم رشد قارچی درروش انتشار در دیسک

قطر هاله عدم رشد قارچی درروش دیسک‌گذاری در مورد دو گونه قارچ کاندیدا آلبیکنس،آسپرژیلوس فلاووس با تاثیر عصاره آبی و الکلی کرفس با سه مرتبه تکرار صفر بوده و حساسیتی مشاهده نگردید. قطر هاله عدم رشد قارچی دراین روش در مورد قارچ تریکوفایتون روبروم با تاثیر عصاره آبی کرفس با سه مرتبه تکرار در غلظت‌های ۵۰۰،۲۵۰،۶۲،۱۲۵/۵،۳۱/۲۵ میلی‌گرم/میلی‌لیتر به ترتیب برابر با ۲۵،۲۵،۱۷،۲۴،۲۵ میلی متر و با تاثیر عصاره الکلی کرفس با سه بار بررسی بر روی ترایکوفایتون روبروم قطرهاله عدم رشد در غلظت‌های ۲۵/۳۱، ۵/۱۲۵، ۶۲، ۲۵۰، ۵۰۰ میلی‌گرم/میلی‌لیتر به ترتیب برابر با ۲۵،۲۴،۸،۲۵،۲۵ میلی متر محاسبه شد (جدول ۱).

ب- قطر هاله عدم رشد قارچی درروش انتشار در چاهک

قطر هاله عدم رشد قارچی درروش چاهک گذاری در مورد گونه کاندیدا آلبیکنس،آسپرژیلوس فلاووس با تاثیر عصاره آبی کرفس با سه بار تکرار صفر بوده و دلیل بر عدم حساسیت دو گونه قارچ مذکور نسبت به عصاره آبی کرفس می‌باشد. با تاثیر عصاره الکلی کرفس با سه بار بررسی بر روی قارچ کاندیدا آلبیکنس قطرهاله عدم رشد در غلظت‌های ۵۰۰،۲۵۰،۶۲،۱۲۵/۵،۳۱/۲۵ میلی‌گرم/ میلی لیتر به ترتیب برابر با ۹،۱۷،۲۵،۲۶،۲۸ میلی متر و با تاثیر عصاره الکلی کرفس با سه بار بررسی بر روی آسپرژیلوس فلاووس قطرهاله عدم رشد در غلظت‌های ۵۰۰،۲۵۰،۶۲،۱۲۵/۵،۳۱/۲۵ میلی‌گرم/ میلی‌لیتر به ترتیب برابر با ۱۵،۱۳،۱۵،۱۵،۱۳ میلی‌متر محاسبه شد. قطر هاله عدم رشد قارچی ترایکوفایتون روبروم نسبت به عصاره آبی کرفس در غلظت‌های ۵۰۰،۲۵۰،۶۲،۱۲۵/۵،۳۱/۲۵ میلی‌گرم/میلی‌لیتر به ترتیب برابر با ۲۳،۲۳،۲۲،۲۵،۲۵ میلی متر و با تاثیر عصاره الکلی کرفس با سه بار بررسی بر روی ترایکوفایتون روبروم قطرهاله عدم رشد در غلظت‌های ۵۰۰،۲۵۰،۶۲،۱۲۵/۵،۳۱/۲۵ میلی‌گرم/میلی‌لیتر به ترتیب برابر با ۲۲،۲۳،۲۰،۲۵،۲۵ میلی متر محاسبه شد (جدول ۲).

جدول ۱ - میزان اثر ضد قارچی عصاره آبی واتانولی کرفس در غلظت‌هاي مشخص به روش ديسك بلانك روي محيط SDA حاوي قارچ هاي مورد مطالعه (disk diffusion) (p<0.05)

عصاره آبی واتانولی کرفس در غلظت‌های مشخص بردیسک بلانک روی محیط SDA												
			غلظت‌های عصاره						تست آماری			
نوع عصاره	میکروارگانیسم	۵۰۰ میلی گرم در میلی لیتر	۲۵۰ میلی گرم در میلی لیتر	۶۲ میلی گرم در میلی لیتر	۵/۱۲۵ میلی گرم در میلی لیتر	۲۵/۳۱ میلی گرم در میلی لیتر	significant	P value	کنترل مثبت ۵۰ میلی گرم در میلی لیتر حاوی داروی ضد	کنترل کفی فاقد قارچی	داروی ضد قارچی
اتانولی	کاندید اآلبیکنس	–	–	–	–	–	–	–	۳۰ (فلوکونازول)	–	–
اتانولی	آسپرژیلوس فلاوس	–	–	–	–	–	–	–	۲۰ (ایتراکونازول)	–	–
اتانولی	تریکوفایتون روبروم	۲۵±۲	۲۵±۳/۶۰	۸±۱	۲۴±۳/۶۰	۲۵±۳/۴۶	***	<0.0001	۱۵ (تریبنافین)	–	–
آبی	کاندیدااآلبیکنس	–	–	–	–	–	–	–	۲۸ (فلوکونازول)	–	–
آبی	آسپرژیلوس فلاووس	–	–	–	–	–	–	–	۲۰ (ایتراکونازول)	–	–
آبی	تریکوفایتون روبروم	۲۵±۲	۲۵±۰/۵۷	۱۷±۱/۵۲	۲۴±۲/۶۴	۲۵±۱	***	<0.0001	۱۸(تریبنافین)	–	–

- میانگین قطر هاله عدم رشد در 3بار بررسی ± نحراف معیار
- علامت (–) نشان دهنده عدم وجود فعالیت ضد فارچي عصاره هاي آبی و الکلی گیاه کرفس می‌باشد.
- ***considered extremely significant

- به منظور تجزیه و تحلیل آماري از نرم‌افزار (SPSS Inc., Chicago, IL, version 20) استفاده گردید، داده‌ها به صورت میانگین±انحراف معیار یا درصد ذکر گردیدند. آزمون‌هاي آماري $\chi 2$ و ANOVA از / بر روي داده‌ها انجام شد و $P < 0.05$ لحاظ آماري اختلاف معنی‌دار در نظر گرفته شد.

جدول۲- میزان اثر ضد قارچی عصاره آبی و اتانولی کرفس در غلظت‌هاي مشخص به روش چاهک (Well diffusion) روي محیط SDA حاوي قارچ‌هاي مورد مطالعه ($p<0.05$)

نوع عصاره	میکروارگانیسم	غلظت عصاره آبی والکلی کرفس(میلی گرم برمیلی لیتر) برچاهک های ایجاد شده روی محیط SDA: ۵۰۰ میلی گرم در میلی لیتر	۲۵۰ میلی گرم در میلی لیتر	۶۲ میلی گرم در میلی لیتر	۳۱/۲۵ میلی گرم در میلی لیتر	۱۵/۶۲ میلی گرم در میلی لیتر	تست آماری: Significant	P value	کنترل مثبت ۵۰ میلی گرم درمیلی لیتر حاوی داروی ضد قارچی	کنترل منفی فاقد داروی ضد قارچی
اتانولی	کاندیداآلبیکنس	۲۸±۲	۲۶±۱	۲۵±۱/۷۳	۱۷±۲/۶۴	۹±۱/۷۳	***	<0.0001	۳۰ (فلوکونازول)	-
اتانولی	آسپرژیلوس فلاوس	۱۳±۱	۱۵±۱	۱۵±۰	۱۳±۱	۱۵±۲	Ns	0.1029	۲۰ (ایتراکونازول)	-
اتانولی	تریکوفایتون روبروم	۲۵±۰	۲۵±۲	۲۰±۲	۲۳±۲	۲۲±۲/۵۰	*	0.0295	۱۸ (تربینافین)	-
آبی	کاندیداآلبیکنس	-	-	-	-	-	-	-	۳۰ (فلوکونازول)	-
آبی	آسپرژیلوس فلاووس	-	-	-	-	-	-	-	۲۰ (ایتراکونازول)	-
آبی	تریکوفایتون روبروم	۲۵±۳/۴۶	۲۵±۱	۲۱±۱/۷۰	۲۳±۲/۶۴	۲۳±۱	Ns	0.2287	۲۰ (تربینافین)	-

- میانگین قطر هاله عدم رشد در 3بار بررسی ± نحراف معیار
- علامت (-) نشان دهنده عدم وجود فعالیت ضد فارچي عصاره هاي آبی و الکلی گیاه کرفس می باشد.
- ***considered extremely significant
- considered significant
- Ns: considered not significant.
- به منظور تجزیه و تحلیل آماري از نرم افزار(SPSS Inc., Chicago, IL, version 20) استفاده گردید، داده ها به صورت میانگین±انحراف معیار ذکر گردیدند. آزمون‌هاي آماري $\chi 2$ و ANOVA بر روي داده ها انجام شد و $P < 0.05$ ازلحاظ آماري اختلاف معنی‌دار در نظر گرفته شد.

ج- نتایج M^{IC} و MFC

نتایج M^{IC} و MFC براي هر یک از عصاره هاي آبی و الکلی به ترتیب در جدول۳-۱آمده است. جدول ۳-۱ بیانگر حداقل غلظت ضدقارچی و حداقل غلظت مهارکنندگی عصاره‌هاي آبی و الکلی عصاره کرفس بر روي سه گونه کاندیدا آلبیکنس، آسپرژیلوس فلاووس و تریکوفایتون روبروم است که نشان می‌دهد کاندیدا آلبیکنس و آسپرژیلوس فلاووس به ترتیب نسبت به عصاره آبی مقاومت نشان داده و و تریکوفایتون روبروم نسبت به عصاره آبی، کاندیدا آلبیکنس، آسپرژیلوس فلاووس و تریکوفایتون روبروم هر سه گونه نسبت به عصاره الکلی حساسیت نشان داده‌اند. MIC وMFCعصاره الکلی برگ گیاه کرفس براي کاندیداآلبیکنس ۸۰۰۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر و براي آسپرژیلوس فلاووس ۲۰۰۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر و براي تریکوفایتون روبروم ۶۴۰۰۰ میلی‌گرم بر میلی لیتر بود، در حالی که MIC و MFC عصاره آبی براي تریکوفایتون روبروم ۱۶۰۰۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر و براي کاندیدا آلبیکنس و آسپرژیلوس فلاووس حساسیتی مشاهده نشده بود. همانگونه که مشاهده می‌شود عصاره الکلی در غلظت کمتري قادر به مهار کردن و نابود کردن قارچ های مورد آزمون بود (جداول ۳).

جدول ۳-۱ نتایج حداقل غلظت مهارکنندگی رشد(MIC) و حداقل غلظت کشندگی (MBC) عصاره‌های اتانولی و آبی عصاره کرفس برقارچ‌های کاندیدا آلبیکنس،آسپرژیلوس فلاووس و تریکوفایتون روبروم به روش میکرودایلوشن

کنترل منفی	کنترل مثبت	غلظت عصاره آبی واتانولی کرفس(میلی گرم برمیلی لیتر) در میکروپلیت											میکروارگانیسم	نوع عصاره
		۵۰۰		۲۵۶		۱۲۸	٦٤	۳۲	۱٦	۸	٤	۲	۱	
–	+	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	اتانولی
–	+	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	اتانولی
–	+	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	اتانولی
–	+	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	آبی
–	+	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	آبی
–	+	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	آبی

+: رشد قارچ – : عدم رشد قارچ

جدول ۳-۲ نتایج حداقل غلظت مهارکنندگی رشد(MIC) و حداقل غلظت کشندگی (MBC) عصاره‌های الکی و آبی عصاره کرفس بر قارچ‌های کاندیدا آلبیکنس، آسپرژیلوس فلاووس و تریکوفایتون روبروم به روش میکرودایلوشن

کنترل منفی	کنترل مثبت	غلظت عصاره آبی والکلی کرفس(میلی گرم برمیلی لیتر) در میکروپلیت											میکروارگانیسم	نوع عصاره
		256×10^3	128×10^3	64×10^3	32×10^3	16×10^3	8×10^3	4×10^3	2×10^3	1×10^3	500			
–	+	+	+	+	+	+	--	–	–	–	–		کاندیدا آلبیکنس	اتانولی
–	+	+	+	+	+	+	+	+	--	–	–		آسپرژیلوس‌فلاووس	اتانولی
–	+	+	+	--	–	–	–	–	–	–	–		ترایکوفایتون روبروم	اتانولی
–	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+		کاندیدا آلبیکنس	آبی
–	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+		آسپرژیلوس‌فلاووس	آبی
–	+	+	+	+	+	--	–	–	–	–	–		ترایکوفایتون روبروم	آبی

+: عدم رشد -: رشد

بحث

Apium graveolens L. (کرفس وحشی)، متعلق به خانواده Apiaceae ، یک کریستال hemicryptophyte است. گیاه زراعی گیاهی سالانه یا دوسالانه است که به‌طور گسترده به عنوان ادویه و چاشنی در مواد غذایی مورد استفاده قرار می‌گیرد. طیف گسترده ای از فعالیت های بیولوژیکی به A. gorolens نسبت داده شده است. این فعالیت ها شامل فعالیت ضد میکروبی، لارو کشنده ،محافظت کننده کبدی، پتانسیل دفع سمی ،حشره کش و خاصیت ضد فشار خون است.

نتایج حاصل از این مطالعه نشان داد گونه کاندیدآلبیکنس و آسپرژیلوس فلاووس در روش دیسک‌گذاری نسبت به غلظت‌های ۲۵/۳۱،۵/۱۲۵،۶۲،۲۵۰،۵۰۰ میلی‌گرم در میلی‌لیتر عصاره آبی و الکلی حساسیتی نداشته و هاله‌ای

تشکیل نشد.درصورتی که در این روش هر دو عصاره آبی والکلی کرفس در افزایش قطر هاله عدم رشد قارچ تریکوفایتون روبروم در غلظت‌های ۲۵/۳۱،۵/۱۲۵،۶۲،۲۵۰،۵۰۰ میلی گرم درمیلی لیتر موثر بودند.در مورد گونه تریکوفایتون روبروم اثرعصاره آبی و الکلی کرفس بر روی قطر هاله عدم رشد در غلظت‌های ۲۵/۳۱،۵/۱۲۵،۶۲،۲۵۰،۵۰۰ میلی‌گرم در میلی‌لیتر به طور معناداري بیشتر است. (P<0.001).

گونه کاندیدآلبیکنس و آسپرژیلوس فلاووس در روش چاهک‌گذاری نسبت به غلظت‌های ۲۵/۳۱،۵/۱۲۵،۶۲،۲۵۰،۵۰۰ میلی‌گرم در میلی‌لیتر عصاره آبی حساسیتی نداشته و هاله‌ای تشکیل نشد. در صورتی که دراین روش اثرعصاره الکلی کرفس بر روی گونه کاندیدا آلبیکنس،آسپرژیلوس فلاووس و تریکوفایتون روبروم موثر بوده و هاله تشکیل گردید که دلیل برحساسیت قارچ های مذکور نسبت به این نوع عصاره بود. در مورد گونه کاندیدا آلبیکنس وتریکوفایتون روبروم اثرعصاره الکلی کرفس بر روی قطر هاله عدم رشد در غلظت‌های ۲۵/۳۱،۵/۱۲۵،۶۲،۲۵۰،۵۰۰ میلی‌گرم در میلی‌لیتر به طور معناداري بیشتر است (P<0.001).ولی در مورد گونه آسپرژیلوس فلاووس، اثرعصاره الکلی کرفس در همین غلظت‌ها بر روی قطر هاله عدم رشد تفاوت معناداري مشاهده نشد(P>0.05) . اثر عصاره الکلی نسبت به عصاره آبی در افزایش قطر هاله عدم رشد موثرتر بود.ولی در مورد تریکوفایتون روبروم هر دو عصاره آبی و الکلی در افزایش قطر هاله عدم رشد موثر بود و اثرات عصاره آبی و الکلی در ایجاد هاله عدم رشد تقریبا مشابه بودند با این تفاوت که دراثر عصاره آبی در افزایش قطر هاله عدم رشد در غلظتهای ۲۵/۳۱،۵/۱۲۵،۶۲،۲۵۰،۵۰۰ میلی‌گرم در میلی‌لیتر تفاوت معنی دار مشاهده نشد.(P>0.05). ولی دراثر عصاره الکلی در افزایش قطر هاله عدم رشد در غلظت‌های مذکور تفاوت معنی دار مشاهده شد (P<0.05).

یک مطالعه مشابه توسط Rachmawati در سال (2014) نشان داد که غلظت ازعصاره اتانولی برگ‌های کرفس (*Apium graveolens*) بر رشد *Candida. albicans* در شرایط آزمایشگاهی تأثیر می‌گذارد غلظت عصاره اتانول برگ‌های کرفس 80 (*Apium graveolens*) ٪ بیشترین تأثیر را در مهار رشد کاندیدا آلبیکنس در مقایسه با غلظت ۰٪ ، ۲۰٪ و ۸۰٪ دارد [۲۴]. نتایج مطالعه ما تاحدودي با مطالعه Rachmawati و همکارانش هم راستا است که نشان داد، عصاره اتانولی کرفس اثر ضدقارچی بر روي کاندیدا آلبیکنس دارد. البته در مطالعه مذکور از برگ گیاه کرفس استفاده شده است.

اعتقاد بر این است که کرفس (*Apium graveolens*) حاوی مواد ضد قارچی مختلفی مانند فلاونوئید (۱/۷٪) ، ساپونین (۰/۳۶٪)، تانن (۱٪) و روغن‌های اساسی (۰/۳۳٪) است (۲۸). فلاونوئید دارای خاصیت دفع پروتئین بوده و با افزایش نفوذپذیری غشای سلول‌های قارچی عمل می‌کند و با اتصال به پروتئین‌ها از طریق پیوندهای هیدروژن باعث ایجاد اختلال در ساختار پروتئین می شوند و در نهایت منجر به لیز سلولی و مرگ سلول می شود (۲۷،۷). مشتق دیگر این فلاونوئید، apignenin است ،یک جزء محلول در آب که فعالیت ضد قارچی نسبت به C. albicans وM. furfur دارد(۲۵،۲۷). همچنین، روغن‌های اساسی کرفس مانند لیمونن و ساپونین نیز دارای فعالیت‌های ضد قارچی علیه *C. albicans* و *M. furfur* هستند [۲۸،۷].

لیمونن یک ترپن است که با اتانول استخراج شده و اعتقاد بر این دارد که یکپارچگی غشای سلولی قارچی را مختل می‌کند و منجر به مختل کردن فعالیت متابولیک و در نهایت باعث مرگ سلولی می‌شود [۳۰،۱۱،۶]. ساپونین مواد شوینده طبیعی و قادر به مختل در یکپارچگی چربی لایه لیپید غشای سلول قارچی است [۲۷،۱۶،۷]. توانایی کرفس در مهار رشد قارچ مشابه میکونازول است که از بیوسنتز ارگسترول آن جلوگیری می‌کند، باعث لیز سلول و حمله مستقیم به غشای سلول قارچی می‌شود [۳۰].

برونو مارونگیو وهمکارانش مطالعه جداسازی بخش فرار از*Apium graveolens L* با استخراج دی اکسید کربن فوق بحرانی و هیدرودیداسیون :ترکیب شیمیایی و فعالیت ضد قارچ را انجام دادندکه در این مطالعه، ترکیب ترکیبات

فرار.*Apium graveolens L* را که در جمعیت‌های طبیعی پرتغال و ایتالیا جمع آوری شده بود پتانسیل‌های ضد قارچی آنها را ارزیابی می‌کنند. ترکیب روغن هاي فرار به دست آمده از طریق هیدروستیلاسیون و فعالیت ضد قارچي آنها گزارش شده است. روغن‌ها با استفاده از دستگاه آشکارساز یونیزاسیون شعله کروماتوگرافی گازی و روش های طیف سنجی جرمی کروماتوگرافی- جرم مورد بررسی قرار گرفتند و ترکیب آنها با عصاره های فرار جدا شده توسط CO فوق بحرانی مقایسه شد. تنوع شیمیایی در عصاره‌ها بسته به منشاء گیاهان و روش استخراج مشاهده شد. نتایج نشان داد که حضور سدانانولید ، نئوسنیدیلید و نئوفیتادین به عنوان اجزای اصلی وجود دارد. از حداقل غلظت مهاری (MIC) و حداقل غلظت کشنده برای ارزیابی فعالیت ضدقارچی روغن‌ها در برابر *Candida albicans, Candida tropicalis, Candida krusei, Candida guilliermondii, Candida parapsilosis, Cryptococcus neoformans, Trichophyton rubrum, Trichophyton mentagrophytes, T. mentagrophytes var. interdigitale, Trichophyton verrucosum, Microsporum canis, Microsporum gypseum, Epidermophyton floccosum, Aspergillus niger, Aspergillus fumigatus and Aspergillus flavus* استفاده شد. روغن موجود در ایتالیا که غنی از نئوفیتادین است فعال تر است و مقادیر MIC آن بین ۰/۰۴-۰/۶۴ میکرولیتر میلی لیتر است [۳].

همچنین نتایج مطالعه ما تاحدودي با مطالعه برونو مارونگیو و همکارانش در در ایتالیا هم راستا است که نشان داد، روغن گیاه کرفس اثر ضدقارچی بر رویکاندیدا آلبیکنس،آسپرژیلوس فلاووس و تریکوفایتون روبروم دارد. البته در مطالعه مذکور از روغن گیاه کرفس استفاده شده است.

رودی چاندرا و همکارانش فعالیت ضد قارچ عصاره گیاه کرفس (*Apium graveolens L.*) در برابر کاندیدا آلبیکنس درشرایط *in vitro* را انجام دادند.هدف از این مطالعه اثبات فعالیت ضد قارچی عصاره گیاه کرفس در مقابل کاندیدا آلبیکنس بود. روشی که استفاده شد مشاهده مناطق مهار کننده، "انتشار دیسک" است که در اثر غلظت عصاره گیاه کرفس (*Apium graveolens* L.) و نیستاتین در برابر کاندیدا آلبیکنس ایجاد شد. سپس منطقه مهار اندازه گیری شد. نتیجه بدست آمده نشان داد که تشکیل مناطق مهار با قطر متوسط ۹/۹ میلی‌متر است. در تست حساسیت که در آن نیاستاتین به عنوان کنترل کننده مثبت عمل می‌کند، به طور متوسط منطقه مهار ۲۹/۳ میلی‌متر به دست آمد. بنابراین می‌توان گفت که عصاره گیاه کرفس دارای فعالیت ضد قارچ در برابر کاندیدا آلبیکنس در شرایط in vitro است(۳۰). برخلاف نتایج مطالعه حاضر، در نتایج ما مشخص گردید که هیچ گونه مهار رشدي توسط عصاره آبی والکلی کرفس به روش دیسک گذاری بعد از 48 ساعت بر روي کاندیدا آلبیکنس ایجاد نشده است. ممکن است این تفاوت به سبب بومی بودن گیاه کرفس باشد. با توجه به این که شرایط جغرافیایي بر مقدار و حتي نـوع متابولیت ها موثر است، استخراج عصاره گیاهان در مناطق مختلف رشد آنها مي‌تواند نتایج متفاوتي داشته باشد [۴].

جین و آگراول (2002) فعالیت‌های ضد قارچی بخار فرار چند روغن اساسی در برابر قارچ ها را نشان دادنداگرچه ماهیت دقیق مهار رشد مالاسزیا فورفور دیگری فعالیت ضد قارچی بخار فرار روغن اسانس کرفس را در برابرناشی از بخار ناپایدار شرح داده نشده است، ترکیبات فرار روغن‌های اساسی ممکن است انواع وقایع متابولیک سلولی را تحت تأثیر قرار دهند. فریس و همکاران، ۱۹۷۳ (روغن‌های ضروری به طور گسترده‌ای در پزشکی سنتی و صنایع آرایشی مورد استفاده قرار می‌گیرند، اما تنها در سال‌های اخیر به عنوان یک عامل ضدمیکروبی و قارچی بالقوه شناخته شده‌اند. تحقیقات بیشتری برای بررسی مکانیسم فعالیت ضد قارچی اسانس کرفس و بخارهای فرار آن مورد نیاز خواهد بود .چنین مطالعاتی ممکن است منجر به کاربرد داروهای ضد قارچ در آروماتراپی و فرمولاسیون های آرایشی شود [۵].

نتایج ما نشان می‌دهد که عصاره فرار *Apium graveolens L.* ممکن است در معالجه بالینی بیماری‌های قارچی مفید باشد. با توجه به این نتایج، روغن و عصاره *Apium*

graveolens L. می‌تواند برای درمان کاندیدیازیس، درماتوفیتوزیس‌ها و آسپرژیلوزیس‌ها استفاده شود. و همچنین استفاده از روغن *Apium graveolens L* را به عنوان ماده نگهدارنده در ذخیره سازی محصولات، به دلیل توانایی آن در مهار رشد آسپرژیلوس عنوان کرد. با توجه به این که شرایط جغرافیایي بر مقدار و حتي نـوع متابولیت ها موثر است، استخراج عصاره گیاهان در مناطق مختلف رشد آنها مي‌تواند نتایج متفاوتي داشته باشد.

نتیجه گیری

نتایج حاصل از این مطالعه نشان داد عصاره هاي آبی کرفس بر دو گونه قارچ کاندیدا آلبیکنس و آسپرژیلوس فلاووس اثر ضدقارچی ندارد ولی عصاره آبی کرفس برروی تریکوفایتون روبروم اثر ضد قارچی دارد. عصاره الکلی کرفس نسبت به نوع آبی آن اثر بیشتري بر روي قطر هاله عدم رشد گونه کاندیدا آلبیکنس و آسپرژیلوس فلاووس دارد، در مورد اثرات عصاره آبی و الکلی کرفس روی تریکوفایتون روبروم تفاوت معنی داري وجود نداشت. در ادامه لازم است مطالعات بیشتري در شرایط *in vitro* انجـام شـود تـا بتـوان ایـن عصاره را به عنوان یک ماده ضد قارچی طبیعـی و جدیـد معرفی کرد.

تشکر و قدردانی

بدین وسیله از اساتید و پرسنل محترم دانشکده بهداشت دانشگاه علوم پزشکی تهران که با یاریها و راهنمایي‌هاي بي‌چشمداشت‌شان در فراهم نمودن مواد لازم و انجام آزمایش‌ها ما را یاري کردند، تشکر و قدردانی می‌شود.

منابع

[1] Al-Snafi A. E. 2014, The Pharmacology of Apium graveolens. A Review. International Journal for Pharmaceutical Research Scholars (IJPRS), 3(1): 15-19

[2] Blumental M., Cladbery A., Brinkman J., Newton M.A. 2007, Herbal medicine: expanded commission E Monographs. Integ Med Communicat, 15: 78-83

[3] Cmarongiu B., Piras A., Porcedda S., Falconieri D., Maxia A., Frau M. A., Gonçalves M. J., Cavaleiro C., Salgueiro L. 2012, Isolation of the volatile fraction from Apium graveolens L. (Apiaceae) by supercritical carbon dioxide extraction and hydrodistillation: Chemical composition and antifungal activity, 27(17): 567-574

[4] Chandra R., Winata T., Evacuasiany E. 2011, The antifungal activity of celery herb extracts (Apiumgraveolens L.) against *Candida albicans* invitro.Jurnal Medika Planta 1(3).

[5] Chee, H.Y. and Lee MH., 2009, In vitro activity of celery essential oil against *Malassezia furfur*. Microbiology, 37(1): 67-68.

[6] Cushnie LA. 2005, Antimicrobial Activity of Flavonoids. Int J Antimicrob Agents. 26: 343-356.

[7] Denning D.W., Ribaud P., Milpied N., Caillot D., Herbrecht R., Thiel E. 2002, Efficacy and safety of voriconazole in the treatment of acute invasive aspergillosis. Clin Infect Dis, 34(5): 563-71.

[8] Eaton DL, Groopman JD. 1994, The toxicology of aflatoxins. Academic Press New York. 383-426.

[9] Hashemi S, Zaini F, Shidfar MR, Daei R , Geramishoar M,Zibafar E, Ahmadi B, Hosseinpour L. 2009, Study and identification of the ethiological agents onychomycosis in 171 patients in Tehran.A. The 7th National and 2nd Regional Congress of Parasitology and Parasitic Diseases in Iran,

[10] Rohdiana I., Hermawati S., dan D. H. 2014, Uji Potensi Antifungi Perasan Daun Seledri (Apium graveolens L) Terhadap

Aspergilllus terreus Secara In Vitro. 6(1): 37-42.

[11]Khare CP. 2007, Indian Medicinal Plants: An Illustrated Dictionary. New York, USA: Springer Science; 12-14

[12]Kitajima J., Ishikawa T., Satoh M. 2003, Polar constituents of celery seed. Phytochem, 64 (5): 1003-11.

[13]Kolarovic J., Popovic M., Zlinska J., 2010, Antioxidant activities of celery and parsley juices in rats treated with doxorubicin. Molecules, 3;15(9):6193-204.

[14]Kooti V, Ghasemiboroon M, Ahangarpoor A, Hardani A, Amirzargar A, Asadi-Samani M. 2014, The Effect of Hydro-Alcoholic Extract of Celery on Male Rats in Fertility Control and Sex Ratio of Rat Offspring. JBUMS, 16 (4): 43-49.

[15]Majidah D., Fatmawati D.W.A., Gunadi A, 2014, Daya Antibakteri Ekstrak Daun Seledri (Apium graveolens L.) terhadap Pertumbuhan *Streptococcus mutans* sebagai Alternatif Obat Kumur (Antibacterial Activity of Celery Leaves Extract [Apium graveolens L.] against *Streptococcus mutans* as an Alternative. Artik Ilm Has Penelit Mhs. 23:54-59

[16]Manuel RJ, Kibbler CC., 1998, The epidemiology and prevention of invasive aspergillosis. *J Hosp Infect,* 39(2):95-109.

[17]Medical Mental Medicine Comprehensive 2413. Author: Dr. Farideh Zanee, Dr. Seyyed Ali Mahbod, Dr. Massoud Imam. Release Date: 1392. Publisher: Tehran University. Vol.1: 385-386.

[18]Medical Mental Medicine Comprehensive 2413.Author: Dr. Farideh Zanee, Dr. Seyyed Ali Mahbod, Dr. Massoud Imam. Release Date: 1392. Publisher: Tehran University Vol. 1: 183-184.

[19]Nabipour F., Dousti B., 2018, The comparison of the antifungal effects of various extracts *Onosma Chlorotricum* on *Candida albicans* and *Candida glaberata* with two antibiotics fluconazole and nystatin. Yafte, 20(1): 12-22.

[20]Perfect J.R., Schell W.A., 1996, The new fungal opportunists are coming. *Clin Infect Dis*., 22 (2): 112-8.

[21]Pfaller M.A., Diekema D.J., Messer S.A., Boyken L., Hollis R.J., Jones R.N., 2003, International Fungal Surveillance Participant Group.In vitro activities of voriconazole, posaconazole, and four licensed systemic antifungal agents against *Candida species* infrequently isolated from blood. *J Clin Microbiol* 41(1):78-83.

[22]Rachmawati I., 2014, Pengaruh konsentrasi ekstrak etanol daun seledri (Apium graveolens) terhadap hambatan pertumbuhan *Candida albicans* In Vitro. Fak Kedokt gigi Univ muhammadiyah Surakarta. 23 (34):12-16

[23]Rashin M., Ayat Nasrollahi O., Norbakhsh F., Rezaie S., Hosseinjani H. A., 2012, survey of the effect of licorice plant extract on *aflR* gene expression aflatoxin production in *Aspergillus paraziticus* via Real-time PCR. Modares J Med Sci, 15 (3): 63-77.

[24]Saxena M., Saxena J., Nema R., Singh G.A.,2013, Phytochemistry of Medicinal Plants. J Pharmacog Phytochem, 1(6): 168-182.

[25]Santoso D., Purwantini I., 2003, Aktivitas Antifungi (*Candida albicans*) Beberapa Tanaman Yang Secara Empirik Digunakan Sebagai Obat Keputihan. J Bahan Alam Indones, 2(3): 109-111.

[26]Salehi M., Hashemi Karuie M., Nasrolahi Omran A., Mobini M., Hedari M.A., 2015, Antifungal activity of in vitro aqueous and

alcoholic extracts of Barije root (Ferula gummosa). Journal of Birjand Univ of Med Sci, 21 (4): 444-450.

[27] Spanakis E.K., Aperis G., Mylonakis E., 2006, New agents for the treatment of fungal infections: clinical efficacy and gaps in coverage. Clin Infect Dis, 43(8): 1060-8.

[28] Sufiyan Fazal S, Singla RK.,2012, Review on the Pharmacognostical & Pharmacological Characterization of Apium Graveolens Linn. Indo Glob J Pharm Sci. 2012; 2(1): 36-42.

[29] Uma K., Huang X., Kumar B.A., 2017, Antifungal effect of plant extract and essential oil. Chin J Integr Med. 23(3): 233-239.

[30] Zargari A. [Iranian medicinal plants]. 6th ed. Tehran: Tehran University;1997. P. 243.

Comparison of the effect of watery and alcoholic Celery (Apium graveolens) extraction on the growth of Aspergillus flavus, Trichophyton rubrum and Candida albicans : in vitro

Ebrahimi R.[1], Hashemi S. J.[2*], Daei R.[2], Khodavisi S.[2], Ardi P.[1], Parsay Sh.[1]

[1] Public Health, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran
[2] Medical mycology, School of Public Health, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran

[*] Email: sjhashemi@tums.ac.ir

Received: 16 September 2019 Accepted: 19 January 2020

Abstract

Nowadays, a large number of antifungal drugs are produced in the world, but the main issue of drug resistance to these treatments is BASHDV, therefore, new findings or materials that have antifungal effect have always been considered for researchers in different fields.Therefore, this study the antifungal effects of celery extract on the yeast fungi of *Candida albicans, Dermatophyte (Trichophyton rubrum) and sproblons (Aspergillus flavus)* have been investigated in laboratory conditions. In this experimental study, watey and alcoholic extracts of celery were prepared by maceration method. Antifungal activity of alcoholic and watery extract of the celery plant was evaluated using application diffusion in disk and well diffusion for 3 types of *Aspergillus flavus, Trichophyton, and Candida albicans* with three replications. Minimum inhibitory concentration (MIC) and minimum bactericidal concentration (MFC) by Microdilishin method were determined. The results were analyzed using one-way anova. The results showed that the alcoholic extract of the celery plant in comparison with the watery extract has a more inhibitory effect on the laboratory conditions. As a result, the alcoholic extract of the celery plant has a greater antifungal effect.

Keywords: watery and alcoholic *extract of of Apium graveolens, Candida albicans, Aspergillus flavus, Trichophyton rubrum*.