



In vitro comparative survey of the effect of aqueous and alcoholic extracts of *Rosa canina* hips on *Trichomonas vaginalis* and *Candida albicans*

Yasaman Faghih Nasiri ¹, Azar Sabokbar ², Zohre Momeni ³, Somayeh Talebi ⁴

¹ MSc, Department of Microbiology, Faculty of Basic Sciences, Karaj Branch, Islamic Azad University, Karaj, Iran.

² Associate Professor, Department of Microbiology, Faculty of Basic Sciences, Karaj Branch, Islamic Azad University, Karaj, Iran.

³ Assistant professor, Department of Microbiology, Faculty of Basic Sciences, Karaj Branch, Islamic Azad University, Karaj, Iran.

⁴ PhD, Department of Microbiology, Faculty of Basic Sciences, Shahr-e-Qods Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran.

Abstract

Candida albicans and *Trichomonas vaginalis* are two common microorganisms in human sexually transmitted diseases, and drug resistance is increasing. Plant extracts are a rich source of active compounds and play an important role in the prevention and treatment of infectious diseases. For this reason, the aim of the present study is to investigate the inhibitory effect of aqueous and alcoholic extracts of rosehip (*Rosa canina* L.) fruit on *C. albicans* and *T. vaginalis* in laboratory conditions and compare it with a commercial drug. The aqueous and alcoholic extracts of rosehip fruit used in this study were prepared experimentally using water and 96% ethanol soaking. The ability of these extracts to inhibit the growth of microorganisms was evaluated using the microdilution method and the results were compared using statistical software. The results of this study indicated that concentrations of 30, 15, 7.5, 3.8, and 1.88 mg/ml of aqueous extract inhibited the growth of *Trichomonas vaginalis* by 45, 37, 20, 11, and 2%, respectively, over a period of 24 hours. While the inhibition rate increased over a period of 48 hours. Also, based on the results, it was determined that the alcoholic and aqueous extracts of rosehip fruit are not suitable for inhibiting the growth of *Candida albicans*. The results of this study determined that the fruit of the *Rosa canina* L. hips with its phytochemical compounds can be considered as a potential alternative to chemical drugs in the treatment of infections caused by *T. vaginalis*, but no favorable results were observed in dealing with *C. albicans*.

Keywords: *Rosa canina* L. hips, *Candida albicans*, *Trichomonas vaginalis*, plant extract, antimicrobial effects.

Received: 29 May 2024

Revised: 24 June 2024

Accepted: 31 August 2024

Correspondence to: Azar Sabokbar

Tel: +98 9125179417

E-mail: sabokbar@kiaau.ac.ir

Journal of Microbial World 2024, 17 (2): 140 - 151



Copyright © 2019, This article is published in Journal of Microbial World as an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License. Non-commercial, unrestricted use, distribution, and reproduction of this article is permitted in any medium, provided the original work is properly cited.



مطالعه مقایسه‌ای تاثیر عصاره آبی و الکی میوه گل نسترن بر تریکوموناس واژینالیس و کاندیدا آلیکنس در شرایط برون‌تنی

یاسمن فقیه نصیری^۱، آذر سبکبار^{۲*}، زهره مومنی^۳، سمیه طالبی^۴

^۱ کارشناس ارشد، گروه میکروبیولوژی، دانشکده علوم پایه، واحد کرج، دانشگاه آزاد اسلامی، کرج، ایران. ^۲ دانشیار، گروه میکروبیولوژی، دانشکده علوم پایه، واحد کرج، دانشگاه آزاد اسلامی، کرج، ایران. ^۳ دکتری تخصصی، گروه میکروبیولوژی، دانشکده علوم پایه، واحد شهر قدس، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران.

چکیده

کاندیدا آلیکنس و تریکوموناس واژینالیس دو میکروارگانیسم شایع در بیماری‌های مقاربتی انسان هستند که میزان مقاومت دارویی در آن‌ها رو به افزایش است. عصاره‌های گیاهی منبع غنی از ترکیبات فعال بوده و نقش مهمی در پیشگیری و درمان بیماری‌های عفونی دارند. هدف مطالعه حاضر بررسی اثر مهارکنندگی عصاره آبی و الکی میوه گل نسترن (*Rosa canina* L.) بر فعالیت کاندیدا آلیکنس و تریکوموناس واژینالیس در شرایط آزمایشگاهی و مقایسه آن با داروی تجاری است. عصاره آبی و الکی میوه گل نسترن مورد استفاده در این مطالعه به روش خیساندن با استفاده از آب و اتانول ۹۶٪ تهیه گردید. توانایی این عصاره‌ها در مهار رشد میکروارگانیسم‌ها با استفاده از روش میکرودایلوشن مورد ارزیابی و نتایج حاصل با استفاده از نرم افزار آماری مقایسه شدند. نتایج این مطالعه مشخص کرد غلظت‌های ۳۰، ۱۵، ۷/۵، ۳/۸، ۱/۸۸ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر از عصاره آبی، در مدت زمان ۲۴ ساعت به ترتیب به میزان: ۴۵، ۳۷، ۲۰، ۱۱، ۲ درصد از رشد تریکوموناس واژینالیس جلوگیری می‌کند. در حالیکه در زمان ۴۸ ساعت میزان مهارکنندگی افزایش می‌یابد. همچنین بر مبنای نتایج مشخص گردید که عصاره الکی و آبی میوه گل نسترن برای مهار رشد کاندیدا آلیکنس مناسب نمی‌باشند. نتایج این مطالعه مشخص کرد که میوه گل نسترن با داشتن ترکیبات فیتوشیمیایی می‌تواند به‌عنوان یک جایگزین بالقوه برای داروهای شیمیایی در درمان عفونت‌های حاصل از تریکوموناس واژینالیس به شمار آید اما نتایج مطلوبی در مقابله با کاندیدا آلیکنس مشاهده نشد.

کلمات کلیدی: میوه گل نسترن، کاندیدا آلیکنس، تریکوموناس واژینالیس، عصاره گیاهی، اثرات ضد میکروبی.

پذیرش مقاله: ۱۴۰۳/۶/۱۰

ویرایش مقاله: ۱۴۰۳/۴/۴

دریافت مقاله: ۱۴۰۳/۳/۹

مقدمه

منجر به خطر انتقال عفونت به دیگران می‌شود. علائم و نشانه‌های عفونت‌های مقاربتی ممکن است شامل ترشحات واژن، ترشحات آلت تناسلی، زخم در ناحیه تناسلی یا اطراف آن و درد لگن باشد (۱و۲).

عفونت‌های مقاربتی می‌توانند از طریق باکتری‌ها، قارچ‌ها، انگل‌ها و ویروس‌ها ایجاد شوند و از مهمترین آن‌ها می‌توان به

عفونت‌های مقاربتی (STIs)، عفونت‌هایی هستند که از طریق تماس جنسی از فردی به فرد دیگر منتقل می‌شوند. این عفونت‌ها اغلب در ابتدا علائمی ایجاد نمی‌کنند که همین امر

(* آدرس برای مکاتبه: گروه میکروبیولوژی، دانشکده علوم پایه، واحد کرج، دانشگاه آزاد اسلامی، کرج، ایران.
تلفن: ۰۹۱۲۵۱۷۹۴۱۷
پست الکترونیک: sabokbar@kiauo.ac.ir



ممکن است حداقل به ۶۰۰۰۰ سال قبل برگردد. استفاده از محصولات طبیعی به عنوان دارو، البته باید چالشی عظیم برای انسان‌های اولیه ایجاد کرده باشد. با این حال، انسان‌های اولیه توانستند دانش خود را در مورد مواد خوراکی و داروهای طبیعی توسعه دهند و متعاقباً، با توسعه و پیشرفت‌های فنی، داروهای جدید را تولید کردند. امروزه یکی از استراتژی‌های مهم سازمان جهانی بهداشت، تقویت نقش طب سنتی با تاکید بر اهمیت ترویج و گنجاندن استفاده از گیاهان دارویی در سیستم‌های بهداشتی کشورهای عضو است که داروهای مکمل و جایگزین مختلفی را برای داروهای شیمیایی با اثرات نامطلوب نشان می‌دهند (۸).

امروزه استفاده از گیاهان دارویی مورد توجه مجدد قرار گرفته است و اولین راهکار درمانی برای ۸۰ درصد کشورهای در حال توسعه است. در این میان گیاهان دارویی به خصوص مواردی که خاصیت ضد میکروبی آنها در مطالعات دیگر مشخص شده توجه محققان را به خود جلب کرده است. در مطالعات گذشته اثرات ضد تریکومونیایی و ضد کاندیدیایی چند گونه گیاهی گزارش شده است اما مطالعه برای یافتن ترکیبات جدید همچنان نیاز به مطالعات بیشتری دارد (۹).

خانواده گل سرخیان (*Rosaceae*)، یک خانواده گلدار متوسط شامل ۴۸۲۸ گونه شناخته شده در ۹۱ جنس است. اعضای این خانواده بیشتر گونه‌های خزان کننده هستند اما گونه‌های همیشه سبز نیز در آنها مشاهده می‌شود. همچنین این خانواده دارای گستره جهانی هستند اما در نیمکره شمالی بیشترین تنوع را دارند. بسیاری از محصولات مهم اقتصادی از جمله میوه‌های خوراکی مختلف مانند سیب، گلابی، به، زردآلو، آلو، گیلاس، هلو، تمشک، توت فرنگی، میوه‌های گل نسترن، زالزالک و بادام از این خانواده به دست می‌آیند. این خانواده همچنین شامل درختان و درختچه‌های زینتی محبوب مانند گل رز، خارهای آتشین و گل نسترن است (۱۰).

گیاه گل نسترن با نام علمی *Rosa canina* یک گونه کوهی متغیر و رز وحشی بومی اروپا، شمال غربی آفریقا و غرب آسیا

کلامیدیا، سوزاک، سیفلیس، تبخال تناسلی، ایدز، کاندیدیازیس و تریکومونیاژیس اشاره کرد که بسیاری از این بیماری‌ها توسط درمان‌های آنتی بیوتیکی قابل درمان هستند (۳).

کاندیدیازیس و تریکومونیاژیس دو مورد از مهمترین و شایع‌ترین عفونت‌های مقاربتی هستند و علائمی مشابه هم نیز ایجاد می‌کنند. تریکومونیاژیس یک عفونت مقاربتی است که توسط انگل *تریکوموناس واژینالیس* ایجاد شده و از طریق رابطه جنسی واژینال، دهانی یا مقعدی پخش شود. حدود ۷۰ درصد از افراد در صورت ابتلا علائمی ندارند و علائم معمولاً ۵ تا ۲۸ روز پس از مواجهه اولیه شروع می‌شوند. علائم می‌تواند شامل خارش در ناحیه تناسلی، ترشحات رقیق بدبو، سوزش ادرار و درد در هنگام رابطه جنسی باشد. ابتلا به تریکومونیاژیس خطر ابتلا به سایر بیماری‌های جنسی از جمله ایدز را افزایش داده و ممکن است در دوران بارداری عوارضی ایجاد کند (۴).

کاندیدا آلبیکنس نیز مسئول بیش از ۸۵ درصد عفونت‌های مخمری واژن است. کاندیدیازیس علامت بالینی خاصی ندارد و می‌تواند با علامتی مانند خارش، سوزش، ترشحات پنیری و مقاربت دردناک تظاهر نماید (۵). در حال حاضر مناسب‌ترین و در دسترس‌ترین دارو برای درمان تریکومونیاژیس و کاندیداژیس، به ترتیب مترونیدازول و فلوکونازول است، اما در سال‌های اخیر گزارش‌هایی مبنی بر مقاومت میکروارگانیسم‌ها به این داروها، گزارش شده است. اینگونه موارد ضرورت یافتن داروی جایگزین را برای درمان مشخص می‌کند (۶).

طب سنتی بخش مهم و اغلب دست کم گرفته شده مراقبت‌های بهداشتی را در سراسر جهان نشان می‌دهد. شیوه‌های اتنومدیکال از تجربه مردم محلی ناشی می‌شود که در طول قرن‌ها داروهای را برای مقابله با طیف گسترده‌ای از بیماری‌ها و انتقال دانش ایجاد کرده‌اند. استفاده از گیاهان به‌عنوان دارو برای درمان بیماری‌ها می‌تواند یک کاندید بالقوه به‌منظور رفع عوارض پرخطر داروهای شیمیایی باشد (۷).

با توجه به سوابق فسیلی، استفاده انسان از گیاهان به‌عنوان دارو

سویه‌های دانشگاه آزاد اسلامی واحد کرج و کاندیدا آلبیکنس ATCC 10231 (PTCC 5027) از شرکت ابوسینا تهیه شد.

الف) تهیه عصاره آبی: عصاره آبی به روش خیساندن تهیه شد. ابتدا مقدار ۵۰ گرم از میوه گل نسترن آسیاب شده را که به صورت پودر درآمده در یک بشر ریخته و مقدار ۵۰۰ میلی‌لیتر آب مقطر به آن اضافه گردید. سپس بشر با فویل آلومینیومی پوشانده و به مدت ۲۴ ساعت روی دستگاه هیتر با دمای ۱۰۰ درجه سلسیوس جوشانده شد. پس از آن بشر در محیط قرار گرفت تا ترکیبات داخل آن ته نشین شده و مخلوط سرد شود. محلول رویی به یک بشر تمیز منتقل و پس از تقسیم در لوله فالکن با به مدت ۵ دقیقه در ۸۰۰ g سانتریفیوژ شد. برای جدا کردن ناخالصی‌ها به طور کامل این کار سه بار تکرار شد. عصاره حاصل با استفاده از کاغذ واتمن شماره ۴ (Whatman, England) صاف و در نهایت با استفاده از سرنگ و فیلتر سر سرنگی در شرایط استریل به میکروتیوب منتقل و در فریزر منفی ۲۰ درجه سلسیوس نگهداری شد. غلظت ماده حاصل ۷۰ میلی گرم بر میلی‌لیتر بود (۱۴).

ب) تهیه عصاره الکلی: مقدار ۵۰ گرم میوه گل نسترن آسیاب شده که به صورت پودر درآمده بود در یک بشر ریخته و سپس مقدار ۵۰۰ میلی‌لیتر اتانول ۹۶ درصد به آن اضافه شد. بشر بر روی هیتر با دمای ۵۰ درجه سلسیوس قرار گرفت و با استفاده از مگنت به خوبی مخلوط شد. پس از گذشت یک ساعت در دمای محیط و بر روی شیکر قرار گرفت. پس از گذشت ۲۴ ساعت محلول را از روی شیکر برداشته شد. محلول رویی را در یک بشر تمیز ریخته و پس از تقسیم در لوله فالکن با دور ۸۰۰ g به مدت ۵ دقیقه سانتریفیوژ شد. برای جدا کردن ناخالصی‌ها، این کار سه بار تکرار شد. عصاره حاصل با استفاده از کاغذ واتمن شماره ۴ (Whatman, England) صاف و درون پلیت شیشه‌ای ریخته شد. پلیت‌ها را به مدت ۲۴ ساعت درون انکوباتور ۳۷ درجه قرار گرفت تا الکل خارج شود. عصاره الکلی خشک شده میوه گل نسترن که در ته ظرف رسوب کرده بود با استفاده از تیغ تراشیده شد و مقداری آب مقطر استریل به آن اضافه شد و خوب همزده شد. برای صاف کردن، عصاره

به شمار می‌رود. این گیاه یک درختچه خزان کننده است که معمولاً ارتفاع آن از ۱ تا ۵ متر متغیر است، اگرچه گاهی اوقات می‌تواند بالاتر از تاج درختان بلندتر حرکت کند. ساقه‌های آن با خارهای کوچک، تیز و قلاب دار پوشیده شده است که به بالا رفتن کمک می‌کند. برگ‌ها به شکل پنجه‌ای، دارای ۵ تا ۷ برگچه هستند. برگ‌ها وقتی کبود می‌شوند عطر خوشی دارند. گل نسترن از بهار تا تابستان شکوفا می‌شود و رنگ گل‌ها می‌تواند بین سفید تا صورتی تیره متفاوت باشند. قطر آن‌ها ۴ تا ۶ سانتی متر با پنج گلبرگ است و مانند سایر گل‌های رز، دارای شکل پنجه‌ای است (۱۱).

گلبرگ گل نسترن حاوی سطوح بالایی از آنتی اکسیدان‌ها، عمدتاً پلی فنل‌ها، ویتامین C و همچنین کاروتنوئیدها و ویتامین‌های B و E همراه با قندهای طبیعی، اسیدهای آلی و اسیدهای چرب غیراشباع چندگانه است. از میوه این گیاه برای تهیه شربت، چای و مارمالاد استفاده می‌شود. این گیاه در طبیعت برای تولید ویتامین C از میوه‌هایش، به ویژه در شرایط کمبود یا در زمان جنگ، پرورش یافته یا تشویق شده است (۱۲).

میوه‌های کاذب گل نسترن که به آن‌ها رز هیپ می‌گویند، میوه‌های انباشته‌ای هستند که از چندین آکن (میوه‌های حاوی دانه واقعی رز هیپ) تشکیل شده‌اند که توسط یک کاسبرگ گلدار بزرگ، قرمز و گوشتی محصور شده و بیش از ۲۰۰۰ سال است که به‌عنوان یک گیاه دارویی شناخته می‌شود. علاوه بر این، این گیاه شامل ترکیبات شیمیایی منحصر به فردی از جمله فلاونوئیدها، کاروتنوئیدها، اسیدهای چرب، ویتامین‌ها، عوامل آنتی‌اکسیدانی و عوامل ضدالتهابی است (۱۳). هدف اصلی ما در این مطالعه، بررسی اثر مهارکنندگی عصاره آبی و الکلی میوه گل نسترن بر روی کاندیدا آلبیکنس و تریکوموناس واژینالیس در شرایط آزمایشگاهی و مقایسه آن با داروی تجاری است.

مواد و روش‌ها

در این پژوهش انگل تریکوموناس واژینالیس از مرکز نگهداری

حاصل را در لوله آزمایش ریخته و پس از سانتریفیوژ در ۸۰۰g و مدت ۵ دقیقه با استفاده از سرنگ و فیلترهای سرسرنگی (Whatman, England) استریل شد عصاره‌های حاصل در شرایط کاملاً استریل به میکروتیوب‌ها منتقل و تا زمان استفاده در فریزر منفی ۲۰ قرار گرفت. غلظت عصاره حاصل ۶۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر بود (۱۴).

ج) تست لوله زایا: به جهت اطمینان کامل برای عدم آلودگی کاندیدا آلبیکنس، یک لوپ استریل از کشت خالص در ۵۰۰ میکرولیتر سرم جنین گاوی به خوبی همگن شد. سپس سوسپانسیون در دمای ۳۷ درجه سلسیوس گرمخانه‌گذاری گردید. پس از مدت ۴ ساعت یک قطره از سوسپانسیون بر روی لام گذاشته شد و وجود لوله زایا که نشانگر کاندیدا آلبیکنس است مورد بررسی قرار گرفت (۱۵).

د) بررسی کمترین غلظت مهارکنندگی (MIC) و کشندگی (MLC) عصاره آبی و الکلی میوه گل نسترن بر روی تریکوموناس واژینالیس: بررسی و تعیین MIC از روش میکرودايلوشن و در غلظت‌های نهایی ۱/۸۷۵، ۳/۷۵، ۷/۵، ۱۵ و ۳۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر عصاره آبی و الکلی مورد بررسی قرار گرفت. از محیط کشت TYM همراه با انگل و بدون عصاره به‌عنوان کنترل منفی استفاده شد. هر غلظت عصاره در سه چاهک پلیت و هر آزمایش سه بار تکرار شد.

ابتدا محیط کشت کامل TYM استریل (۲۰ گرم کازئین، ۱۰ گرم عصاره مخمر، ۵ گرم مالتوز، ۱ گرم آسکوربیک اسید، ۱ گرم پتاسیم کلرید، ۱ گرم بی‌کرینات پتاسیم، ۱ گرم پتاسیم دی‌هیدروژن فسفات، ۰/۵ گرم دی‌پتاسیم هیدروژن فسفات، ۰/۱ گرم سولفات آهن، ۱ گرم ال-سیستین و ۱۰۰ میلی‌لیتر سرم جنین گاوی در ۱ لیتر) و PBS استریل در داخل انکوباتور ۳۷ درجه سلسیوس قرار گرفت تا گرم شود. پس از شمارش انگل‌ها در زیر میکروسکوپ با استفاده از لام نئوبار، تعداد 6×10^6 سلول در هر میلی‌لیتر محاسبه و آماده گردید. در نهایت برای بررسی و تعیین MIC از روش میکرودايلوشن استفاده شد.

برای محاسبه MIC، بعد از ۴۸ ساعت، محتویات هر چاهک پلیت ۲۴ خانه‌ای به داخل فالکن حاوی ۱۰ میلی‌لیتر محیط کشت TYM کامل اضافه و نمونه‌ها در انکوباتور ۳۷ درجه سلسیوس قرار گرفتند. پس از گذشت ۵ روز نمونه‌ها مورد بررسی قرار گرفتند. MLC حداقل غلظتی از دارو یا عصاره است که انگل در آن هیچ رشدی نداشته باشد.

و) محاسبه میزان کمترین غلظت مهارکنندگی و کشندگی عصاره آبی و الکلی میوه گل نسترن بر روی کاندیدا آلبیکنس: برای بررسی MIC ابتدا سوسپانسیونی از قارچ کاندیدا آلبیکنس با مقدار 2×10^6 CFU/ml با استفاده از دستگاه اسپکتوفوتومتر با طول موج ۵۳۰ نانومتر و ترانس‌میشن ۷۷ درصد در محیط RPMI (زیست‌ایده، ایران) به همراه MOPS

ایران) کشت و برای ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سلسیوس گرمخانه گذاری شدند. کمترین غلظتی که قارچ در آن رشد نکرده باشد به عنوان کمترین غلظت کشندگی در نظر گرفته می شود.

ه) بررسی آماری: بررسی آماری نمونه ها با استفاده از نرم افزار GraphPad Prism version 9 با استفاده از آزمون two way anova در سطح آماری ۹۵ درصد انجام شد.

یافته ها

الف) بررسی اثر عصاره آبی میوه گل نسترن بر رشد انگل تریکوموناس واژینالیس: در این پژوهش اثر مهارتی عصاره آبی میوه گل نسترن بر روی انگل تریکوموناس واژینالیس در دو زمان ۲۴ و ۴۸ ساعت مورد بررسی قرار گرفت. به این منظور غلظت های ۳۰، ۱۵، ۷/۵، ۳/۷۵ و ۱/۸۷۵ میلی گرم بر میلی لیتر از عصاره مذکور آماده سازی شد و پس از مجاور کردن با انگل تریکوموناس واژینالیس، تعداد انگل ها از طریق لام ثوبار شمارش و با گروه کنترل مقایسه گردید.

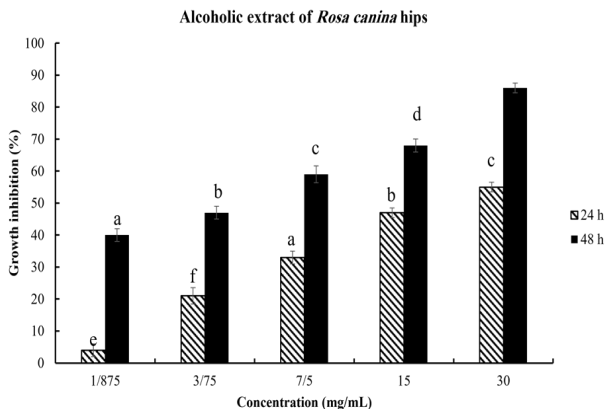
همانطور که در شکل ۱ مشاهده می شود، نتایج بررسی های آماری نشان داد که بین میزان مهارت انگل تریکوموناس واژینالیس و غلظت آبی گیاه مذکور رابطه مستقیم وجود دارد. به طوریکه با افزایش غلظت این عصاره، میزان مهارت انگل آن نیز افزایش می یابد. مطابق با نتایج به دست آمده با افزایش مدت زمان از ۲۴ ساعت به ۴۸ ساعت، میزان مهارت رشد عصاره آبی میوه گل نسترن بر روی میکروارگانیسم مورد بررسی، به میزان قابل ملاحظه ای افزایش می یابد. بر این اساس غلظت های ۳۰، ۱۵، ۷/۵، ۳/۸، ۱/۸۸ میلی گرم بر میلی لیتر از این عصاره، در مدت زمان ۲۴ ساعت به ترتیب به میزان ۴۵، ۳۷، ۲۰، ۱۱ و ۲ درصد از رشد تریکوموناس واژینالیس جلوگیری می کند. در حالیکه در زمان ۴۸ ساعت میزان بازدارندگی رشد به ترتیب در غلظت های ۳۰، ۱۵، ۷/۵، ۳/۸، ۱/۸۸ به ۷۲، ۶۰، ۵۶، ۵۲، ۲۸ درصد افزایش می یابد.

تهیه شد. برای بررسی MIC ابتدا سوسپانسیونی از قارچ کاندیدا آلبیکنس با مقدار 1×10^6 CFU/ml با استفاده از دستگاه اسپکتوفوتومتر با طول موج ۵۳۰ نانومتر و ترانس میشن ۷۷٪ در محیط RPMI به همراه MOPS تهیه و تعداد 1×10^3 -۴ حاصل شد. برای محاسبه MIC به روش زیر عمل شد:

۱- ابتدا ۱۰۰۰ میکرولیتر از محیط (2X) RPMI به چاهک اول اضافه گردید. ۲- در چاهک های ۲ الی ۱۲ نیز ۱۰۰۰ میکرولیتر محیط (1X) RPMI اضافه گردید. ۳- سپس ۱۷۰۰ میکرولیتر از عصاره آبی گل نسترن (غلظت ۶۰ میلی گرم بر میلی لیتر) به چاهک اول اضافه شد. ۴- پس از همگن کردن، ۱۰۰۰ میکرولیتر از چاهک اول به چاهک دوم، از چاهک دوم به چاهک سوم و به همین ترتیب تا چاهک نهم منتقل و در نهایت ۱۰۰۰ میکرولیتر از چاهک نهم دور ریخته شد. ۵- ۱۰۰۰ میکرولیتر از عصاره آبی (غلظت ۶۰ میلی گرم بر میلی لیتر) به چاهک شماره ۱۰ اضافه و پس از همگن کردن، ۱۰۰۰ میکرولیتر دور ریخته شد. ۶- چاهک شماره ۱۰ به عنوان کنترل منفی، چاهک شماره ۱۱ به عنوان کنترل مثبت در نظر گرفته شد. ۷- در چاهک شماره ۱۲، ۱۰۰۰ میکرولیتر DMSO (۵/۲ درصد) اضافه و پس از همگن کردن، ۱۰۰۰ میکرولیتر دور ریخته شد. ۸- از سوسپانسیون قارچی با رقت ۰/۰۰۱ به مقدار ۱۰ میکرولیتر در هر یک از چاهک ها به غیر از چاهک شماره ۱۰ اضافه شد. نمونه ها به مدت ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت در انکوباتور ۳۷ درجه سلسیوس قرار گرفتند و بعد از این زمان به منظور محاسبه میزان MIC مورد بررسی قرار گرفتند. علاوه بر این برای مقایسه اثر عصاره با داروهای تجاری موجود از فلوکونازول با غلظت نهایی ۶۴ میلی گرم بر میلی لیتر استفاده شد. این مراحل با کمی تفاوت برای عصاره الکلی نیز تکرار گردید. در مرحله ۳، ۱۰۰۰ میکرولیتر از عصاره الکلی (۶۰ میلی گرم بر میلی لیتر) به چاهک شماره ۱ اضافه گردید (۱۷).

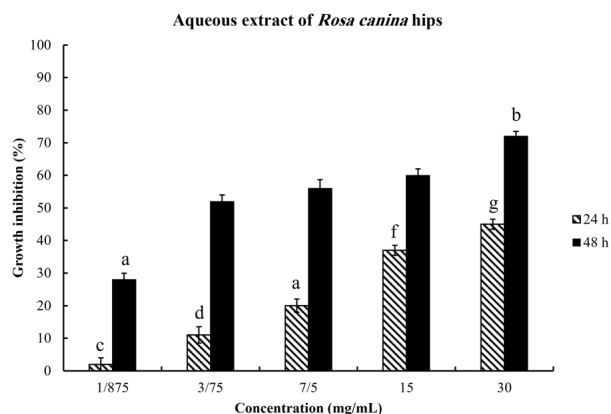
برای بررسی کمترین غلظت کشندگی عصاره آبی و الکلی گل نسترن بر روی کاندیدا آلبیکنس، چاهک MIC و یک چاهک قبل از آن بر روی محیط کشت ساپرو دکستروز آگار (ایبرسکو،

اساس بررسی‌های آماری مشخص گردید که میزان مهار رشد این میکروارگانیسم تا غلظت ۳/۸ میلی گرم بر میلی لیتر، از لحاظ آماری با گروه کنترل اختلاف معناداری را نشان می‌دهد. بنابراین حداقل غلظت مورد نیاز جهت مهار رشد این میکروارگانیسم توسط عصاره الکلی مذکور برابر با ۳/۸ میلی گرم بر میلی لیتر در مدت زمان ۲۴ ساعت می‌باشد. این در حالی است که همه غلظت‌های مورد بررسی در این آزمایش، اختلاف معناداری با گروه کنترل پس از گذشت ۴۸ ساعت نشان دادند (شکل ۲). در نتیجه غلظت ۱/۸۸ میلی گرم بر میلی لیتر از این عصاره الکلی، قادر است در مدت زمان ۴۸ ساعت، به طور معناداری از رشد انگل تریکوموناس واژینالیس جلوگیری کند. همچنین نتایج مشخص کرد که رابطه مستقیم بین میزان مهار انگل مذکور با افزایش غلظت عصاره الکلی میوه گل نسترن وجود دارد. همچنین با افزایش زمان تیمار و مجاورت انگل با عصاره مورد نظر، میزان مهار رشد آن به طور قابل توجهی افزایش می‌یابد.



شکل ۲: اثر بازدارندگی عصاره الکلی میوه گل نسترن بر انگل تریکوموناس واژینالیس در زمان‌های ۲۴ و ۴۸ ساعت. تفاوت در حروف بیانگر تفاوت معنادار در بین نمونه‌ها در سطح آماری ۹۵ درصد می‌باشد ($p\text{-value} < 0.05$).

بر اساس نتایج قابل مشاهده در جدول ۱، مشخص گردید که عصاره الکلی میوه گل نسترن نسبت به عصاره آبی آن به میزان بیشتری منجر به مهار رشد انگل تریکوموناس واژینالیس می‌شود. لازم به ذکر است از لحاظ آماری بین اثر مهاری عصاره‌ها در غلظت‌های مختلف در دو زمان ۲۴ و ۴۸ ساعت، اختلاف معنادار وجود دارد.



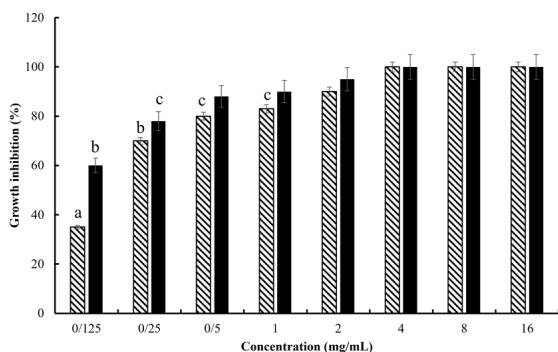
شکل ۱: اثر بازدارندگی عصاره آبی میوه گل نسترن بر انگل تریکوموناس واژینالیس در زمان‌های ۲۴ و ۴۸ ساعت. تفاوت در حروف بیانگر تفاوت معنادار در بین نمونه‌ها در سطح آماری ۹۵ درصد می‌باشد ($p\text{-value} < 0.05$).

به این ترتیب با افزایش مدت زمان مجاورت عصاره آبی میوه گل نسترن و همچنین افزایش غلظت آن، میزان اثر مهاری آن بر روی انگل تریکوموناس واژینالیس افزایش می‌یابد. با توجه به اینکه اختلاف معناداری بین مهار رشد میکروارگانیسم در دو غلظت انتهایی با گروه کنترل وجود ندارد، میزان حداقل غلظت مهارکنندگی در مدت زمان ۲۴ ساعت برابر با ۷/۵ میلی گرم بر میلی لیتر است. اما در مدت زمان ۴۸ ساعت حداقل غلظت مهاری به ۱/۸۸ میلی گرم بر میلی لیتر کاهش می‌یابد. لازم به ذکر است از لحاظ آماری بین اثر مهاری عصاره‌ها در غلظت‌های مختلف در دو زمان ۲۴ و ۴۸ ساعت، اختلاف معنادار وجود دارد.

ب) بررسی اثر عصاره الکلی میوه گل نسترن بر رشد انگل تریکوموناس واژینالیس: پس از بررسی اثر عصاره آبی میوه گل نسترن، اثر عصاره اتانولی این میوه نیز در غلظت‌های ۱۵، ۳۰، ۷/۵ و ۳/۷۵ میلی گرم بر میلی لیتر مورد بررسی قرار گرفت و پس از مجاور کردن آن با انگل تریکوموناس واژینالیس، تعداد انگل‌ها پس از ۲۴ و ۴۸ ساعت از طریق لام نتوبار شمارش و با گروه کنترل مقایسه گردید.

نتایج مشخص کرد که عصاره اتانولی میوه گل نسترن قادر است در مدت زمان ۲۴ ساعت به ترتیب در غلظت‌های ۱۵، ۳۰، ۷/۵ و ۳/۸ میلی گرم بر میلی لیتر، به میزان ۴۷، ۳۳، ۲۱ و ۴ درصد از رشد انگل تریکوموناس واژینالیس جلوگیری کند. بر

شده است. بر این اساس بر خلاف عصاره آبی و الکی میوه گل نسترن که قادر به مهار رشد حاصل از قارچ کاندیدا آلبیکنس نبود، داروی فلوکونازول به عنوان یک داروی تجاری موجود در بازار، به خوبی از رشد این میکروارگانیسم جلوگیری نمود.



شکل ۳: نمودار حاصل از درصد بازدارندگی رشد غلظت‌های مختلف فلوکونازول بر انگل تریکوموناس واژینالیس در طی ۲۴ و ۴۸ ساعت. تفاوت در حروف بیانگر تفاوت معنادار در بین نمونه‌ها در سطح آماری ۹۵ درصد است ($p\text{-value} < 0.05$).

بحث

با توجه به بروز و شیوع مقاومت به داروهای شیمیایی در میکروارگانیسم‌ها و همچنین عوارض جانبی مربوط به مصرف بیش از حد برخی از این ترکیبات، بررسی‌ها برای یافتن محصولات گیاهی بدون عارضه و دارای خواص ضد میکروبی، در حال افزایش است (۱۷). یکی از عصاره‌های گیاهی دارای خواص ضد میکروبی، میوه گل نسترن است. ترکیبات اصلی نسترن وحشی شامل ویتامین‌ها، مواد معدنی، کاروتنوئیدها، توکوفرول‌ها، فلاونوئیدها، فنلیک اسید، اسکوربیک اسید، هیدروآسکوربیک اسید (ویتامین C)، آنتی سیانیدین‌ها، تانن، پکتین، قندها، اسیدهای آلی، اسیدهای آمینه و روغن‌های اساسی می‌باشد (۱۹).

مطالعات مختلفی در زمینه بررسی اثرات ضد میکروبی میوه گل نسترن علیه میکروارگانیسم‌های مختلف انجام گرفته است. اثر غلظت‌های مختلف عصاره اکالیپتوس بر انگل تریکوموناس واژینالیس در سال ۱۳۹۲ توسط حسینی و همکاران در شرایط آزمایشگاهی بررسی شده است. نتایج به دست آمده نشان داد که

جدول ۱: مقایسه بازدارندگی رشد عصاره آبی و الکی میوه گل نسترن بر تریکوموناس واژینالیس در زمان‌های ۲۴ و ۴۸ ساعت.

درصد بازدارندگی				غلظت (میلی گرم بر میلی لیتر)
۴۸ ساعت		۲۴ ساعت		
الکی	آبی	الکی	آبی	
۴۰±۴	۲۸±۴	۴±۰/۵	۲	۱/۸۷۵
۵۲±۲	۴۷±۱	۲۱±۱	۱۱±۱	۳/۷۵
۵۹±۵	۵۶	۳۳±۴	۲۰±۰/۵	۷/۵
۶۸±۵	۶۰±۴	۴۷±۲	۳۷±۱	۱۵
۸۶±۴	۷۲±۲	۵۵±۳	۴۵±۲	۳۰
۰/۰۴۲		۰/۰۰۶		P-Value

(ج) بررسی اثر عصاره‌های آبی و الکی میوه گل نسترن بر روی کاندیدا آلبیکنس: اثرات ضد میکروبی عصاره‌های آبی و الکی حاصل از میوه گل نسترن بر روی قارچ کاندیدا آلبیکنس نیز مورد بررسی قرار گرفت. در این آزمایش مشخص گردید که این عصاره‌ها اثری بر روی قارچ کاندیدا آلبیکنس ندارند و نسبت به گروه کنترل تفاوت معناداری مشاهده نشد. بر مبنای نتایج مشخص گردید که عصاره الکی و آبی حاصل برای مهار رشد این میکروارگانیسم مناسب نمی‌باشد.

(د) بررسی اثر مهاری داروی فلوکونازول بر روی کاندیدا آلبیکنس: به منظور بررسی حداقل غلظت مهار کننده از داروی فلوکونازول، غلظت‌های ۶۴، ۳۲، ۱۶، ۸، ۴، ۲، ۱، ۰/۵، ۰/۲۵ و ۰/۱۲۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر از دارو تهیه شد و بر روی قارچ کاندیدا آلبیکنس اثر داده شد. نتایج نشان داد که این دارو در غلظت ۴ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر به طور کامل از رشد میکروارگانیسم جلوگیری می‌کند و این غلظت به عنوان حداقل غلظت مهار کننده از رشد کاندیدا آلبیکنس در نظر گرفته می‌شود. همچنین از لحاظ آماری بین کلیه غلظت‌های مورد بررسی و گروه کنترل اختلاف معناداری وجود دارد. نتایج حاصل از این آزمایش در شکل ۳ نشان داده شده است. همانطور که در شکل قابل مشاهده است، در غلظت ۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر از دارو، بیش از ۹۰ درصد از رشد قارچ جلوگیری

آزمایشگاهی عصاره‌های این گیاه نشان می‌دهد که به طور موثری آپوپتوز را در تریکوموناس واژینالیس بین ۱۰۰ تا ۵۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر پس از ۴۸ ساعت بدون سمیت روی سلول‌های خونساز القا می‌کند. بر اساس این مطالعه، عصاره زرین گیاه باعث مرگ برنامه ریزی شده در انگل تریکوموناس واژینالیس می‌شود و از عصاره آن می‌توان برای تولید داروهای ضد تریکومونال استفاده کرد (۲۲). در مطالعه ما نیز مشخص شد عصاره‌های آبی و الکلی میوه گل نسترن دارای پتانسیل بالقوه برای از بین بردن و مهار رشد انگل تریکوموناس واژینالیس هستند و می‌توان با تحقیقات بیشتر از این ماده خوراکی و مهم در طب سنتی ایران برای مقابله با تریکومونازیس استفاده کرد.

همچنین در رابطه با اثرات ضد کاندیدایی ترکیبات مختلف مطالعات بسیاری انجام شده است. در طی یک مطالعه اثر عصاره اتانولی *Avicennia marina*، گیاه *Fagonia indica*، *Salvadora*، *Portulaca oleracea*، *Lawsania inermis*، *Asphodelus tenuifolius* و *Ziziphus spina-Christi, persica* را در غلظت‌های ۲۵، ۵۰ و ۱۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر بر روی کاندیدا آلبیکنس بررسی کردند. نتایج مشخص کرد که عصاره الکلی گیاهان درخت حرا، گیاه اسپند رومی و سدر هیچ اثر مهاری بر روی کاندیدا آلبیکنس ندارند. اما عصاره اتانولی سایر گیاهان موثر بوده و دارای فعالیت مهاری بر این میکروارگانیزم هستند (۲۳). در این پژوهش نیز اثر غلظت‌های مختلف عصاره‌های آبی و الکلی میوه گل نسترن در دو زمان ۲۴ و ۴۸ ساعت بر کاندیدا آلبیکنس بررسی گردید و در نهایت نتایج نشان داد هیچ یک از عصاره‌های تهیه شده در مهار این میکروارگانیزم تاثیر نداشته و تفاوتی با نمونه کنترل نداشتند. همچنین در طی مطالعه دیگری دودانا و همکاران در سال ۲۰۱۸، اثر عصاره آبی و الکلی برگ چای، پیاز، نعنا، گل جاوید و آلوورا را بر روی کاندیدا آلبیکنس کردند. نتایج نشان داد که تنها عصاره آبی برگ چای دارای خاصیت ضد کاندیدایی است. همچنین غلظت ۱۰۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر عصاره‌های الکلی همه‌ی گیاهان مورد بررسی، دارای اثرات ضد کاندیدایی

این عصاره پس از ۲۴ ساعت در غلظت ۱۲/۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر ۸۰ درصد مهار رشد داشت. عصاره الکلی در غلظت ۲۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر پس از ۲۴ ساعت ۱۰۰ درصد مهار رشد و عصاره اتیل استات ۲۴ ساعت پس از کشت با حداقل غلظت ۱۲/۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر دارای ۱۰۰ درصد مهار رشد بودند. همچنین عصاره آبی اکالیپتوس در غلظت ۵۰ میلی‌گرم در میلی‌لیتر به ترتیب ۸۰ درصد و ۱۰۰ درصد مهار رشد را پس از ۴۸ و ۷۲ ساعت علیه تریکوموناس واژینالیس نشان داد (۲۰). ما در مطالعه خود دریافتیم که غلظت ۳۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر از عصاره آبی میوه گل نسترن پس از ۴۸ ساعت، ۷۲ درصد از رشد این انگل جلوگیری می‌کند. همچنین عصاره الکلی این گیاه در غلظت و مدت زمان مشابه بیش از ۸۶ درصد از رشد این انگل جلوگیری می‌کند. همچنین غلظت‌های کمتر از ۱/۸۷۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر از عصاره آبی و الکلی این گیاه پس از ۴۸ ساعت به ترتیب ۲۸ و ۴۰ درصد از رشد تریکوموناس واژینالیس جلوگیری می‌کند.

در سال ۲۰۲۰ لوانو و همکاران، اثر ضد تریکومونایی عصاره متانولی برگ و ساقه گیاه *Argemone mexicana* را که دارای ماده موثره بربرین است با مترونیدازول به عنوان شاهد استاندارد مقایسه کردند. مقادیر IC50 عصاره ساقه و برگ این گیاه علیه انگل مذکور به ترتیب ۷۰/۸ و ۶۷/۲ میکروگرم در میلی‌لیتر بود. اما مقادیر به دست آمده برای IC50 مترونیدازول، برابر ۱ میکروگرم در میلی‌لیتر مشاهده شد (۲۱). در این مطالعه نیز نتایج مشخص کرد که کمترین غلظت کشنده میوه گل نسترن برای عصاره آبی و الکلی ۱/۸۸ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر در ۴۸ ساعت است. علاوه بر این، IC50 عصاره آبی برابر با بیش از ۳۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر در ۲۴ ساعت و ۳/۸ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر در ۴۸ ساعت بود. همچنین IC50 عصاره الکلی نیز به ترتیب ۳۰ و ۷/۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر در ۲۴ و ۴۸ ساعت بود. در مطالعه دیگری توسط دهکردی و همکاران در سال ۲۰۲۲، القای آپوپتوز توسط عصاره هیدروالکلی و متانولی گیاه *Dracocephalum kotschyi* بر روی تریکوموناس واژینالیس بررسی شد. ارزیابی خواص ضد تریکومونال در شرایط

بودند (۲۴). در این مطالعه غلظت‌های مختلف از عصاره‌های آبی و الکلی میوه گل نسترن تهیه گردید و در دو زمان ۲۴ و ۴۸ ساعت به محیط کشت حاوی کاندیدا آلبیکنس اضافه گردید. در نهایت نتایج نشان داد هیچ کدام از عصاره‌های تهیه شده در مهار این میکروارگانیسم تاثیر نداشته و تفاوتی با نمونه کنترل نداشته است.

نتیجه گیری

کاندیدا آلبیکنس و تریکوموناس واژینالیس دو میکروارگانیسم شایع در بیماری‌های مقاربتی انسان هستند که میزان مقاومت دارویی در آنها رو به افزایش است. عصاره‌های گیاهی به دلیل عدم داشتن عوارض جانبی و همچنین عدم ایجاد مقاومت دارویی، از گزینه‌های مناسب برای درمان این دو عفونت هستند. در این پژوهش عصاره آبی و الکلی میوه گل نسترن تهیه شد و فعالیت مهاري آنها علیه این دو میکروارگانیسم بررسی گردید. علی‌رغم اثر مهاري مناسب عصاره‌های گیاهی مذکور علیه تریکوموناس واژینالیس، اما هیچ گونه اثر مهاري از این عصاره‌ها علیه قارچ کاندیدا آلبیکنس مشاهده نگردید. پیشنهاد می‌گردد عصاره گیاهان دیگر نیز بر روی تریکوموناس واژینالیس و کاندیدا آلبیکنس تست گردد.

تشکر و قدردانی

بدین وسیله از معاونت محترم پژوهش و فناوری دانشگاه آزاد اسلامی واحد کرج، تشکر و قدردانی می‌گردد.

ملاحظات اخلاقی

نویسندگان این مقاله تمامی نکات اخلاقی از قبیل عدم سرقت ادبی، انتشار همزمان، تحریف داده‌ها و داده سازی را رعایت نموده‌اند.

تعارض منافع

وجود ندارد.

References

1. Unemo M, Bradshaw CS, Hocking JS, de Vries HJ, Francis SC, Mabey D, et al. Sexually transmitted infections: challenges ahead. *The Lancet infectious diseases*. 2017;17(8):e235-e79.
2. Safayi M. Optimization of synthesis of alginate/silica/magnesium oxide nanocomposite as an antifungal compound. *The world of microbes*. 2024; 29-37.
3. Williamson DA, Chen MY. Emerging and reemerging sexually transmitted infections. *New England Journal of Medicine*. 2020;382(21):2023-32.
4. Yenidunya S, Hatlas H, Bayrak R. To determine of the prevalence of Bacterial Vaginosis, Candida sp, mixed infections (Bacterial Vaginosis+ Candida sp), *Trichomonas Vaginalis*, Actinomyces sp in Turkish women from Ankara, Turkey. *Ginekologia polska*. 2012;83(10).
5. Pappas PG, Lionakis MS, Arendrup MC, Ostrosky-Zeichner L, Kullberg BJ. Invasive candidiasis. *Nature Reviews Disease Primers*. 2018;4(1):1-20.
6. Paladine HL, Desai UA. Vaginitis: diagnosis and treatment. *American family physician*. 2018;97(5):321-9.
7. Ghavam M. In vitro biological potential of the essential oil of some aromatic species used in Iranian traditional medicine. *Inflammopharmacology*. 2022;30(3):855-74.
8. Šantić Ž, Pravdić N, Bevanda M, Galić K. The historical use of medicinal plants in traditional and scientific medicine. *Psychiatria Danubina*. 2017;29(suppl. 4):69-74.
9. Noor F, Tahir ul Qamar M, Ashfaq UA, Albutti A, Alwashmi AS, Aljasir MA. Network pharmacology approach for medicinal plants: review and assessment. *Pharmaceuticals*. 2022;15(5):572.
10. García-Oliveira P, Fraga-Corral M, Pereira A, Lourenço-Lopes C, Jimenez-Lopez C, Prieto M, et al. Scientific basis for the industrialization of traditionally used plants of the Rosaceae family. *Food chemistry*. 2020;330:127197.
11. Selahvarzian A, Alizadeh A, Baharvand PA, Eldahshan OA, Rasouljan B. Medicinal Properties of Rosa canina L. *Herbal Medicines Journal (Herb Med J)*. 2018:77-84.
12. Gruenwald J, Uebelhack R, Moré MI. Rosa canina–Rose hip pharmacological ingredients and molecular mechanisms counteracting osteoarthritis–A systematic review. *Phytomedicine*. 2019;60:152958.
13. Živković J, Stojković D, Petrović J, Zdunić G, Glamočlija J, Soković M. Rosa canina L.–new possibilities for an old medicinal herb. *Food & function*. 2015;6(12):3687-92.
14. Saboor A, Pourbarat F, FALLAH HH. Comparison of different extraction methods for optimizing antioxidant compounds in *Origanum majorana* L. *Journal of shahid sadoughi university of medical sciences and health services*. 2014;21(6):693-704.
15. Arora D, Saini S, Gupta N. Evaluation of germ tube test in various media. *Indian journal of pathology & microbiology*. 2003;46(1):124-6.

16. Matini M, Bakhtiarnejad S, Dastan D, Maghsood AH, Fallah M. In-vitro efficacy of *Plantago lanceolata* L. extracts on *Trichomonas vaginalis*. Journal of Arak University of Medical Sciences. 2017;20(6):74-82.
17. Gavanji S, Larki B. Comparative effect of propolis of honey bee and some herbal extracts on *Candida albicans*. Chinese journal of integrative medicine. 2017;23(3):201-7.
18. Abdizade S, Momeni Z, Farhadi M. Comparison of the in vitro effect of metronidazole with *Pseudomonas aeruginosa* pyocyanin on *Trichomonas vaginalis*. The world of microbes.2023:16.
19. Yayintas OT, Demir N, Canbolat F. Characterization, biological activity, and anticancer effect of green-synthesized gold nanoparticles using *Nasturtium officinale* L.. BMC Complement Med Ther. 2024 24.
20. Hassani S, Asghari G, Yousefi H, Kazemian A, Rafieiean M, Darani HY. Effects of different extracts of *Eucalyptus camaldulensis* on *Trichomonas vaginalis* parasite in culture medium. Advanced biomedical research. 2013;2.
21. Elizondo-Luevano JH, Verde-Star J, González-Horta A, Castro-Ríos R, Hernández-García ME, Chávez-Montes A. In vitro effect of methanolic extract of *Argemone mexicana* against *Trichomonas vaginalis*. The Korean Journal of Parasitology. 2020;58(2):135.
22. Chelgerdi Dehkordi B, Karimi-Dehkordi M, Khamesipour F. Induction of apoptosis by hydroalcoholic and methanolic extract of *Deracocephalum kotschy* on *Trichomonas vaginalis*. Journal of Parasitic Diseases. 2022:1-9.
23. Soliman SS, Semreen MH, El-Keblawy AA, Abdullah A, Uppuluri P, Ibrahim AS. Assessment of herbal drugs for promising anti-*Candida* activity. BMC complementary and alternative medicine. 2017;17(1):1-9.
24. Doddanna SJ, Patel S, Sundarrao MA, Veerabhadrapa RS. Antimicrobial activity of plant extracts on *Candida albicans*: An in vitro study. Indian Journal of Dental Research. 2013;24(4):401.