

---

Ana Kocić

# Sinergističko dejstvo ekstrakta belog luka (*Allium sativum*) i amfotericina B na gljivu *Candida Albicans*

---

Kandidijaza je infekcija koju izazivaju gljive roda *Candida*, prevashodno *Candida albicans*. Najčešće se za sistemsko lečenje kandidijaze koristi amfotericin B koji uprkos svojoj efikasnosti ima mnogo neželjenih dejstava. Beli luk (*Allium sativum*) sadrži veliki broj organosulfidnih jedinjenja koji takođe imaju antimikotsko dejstvo. Ranijim istraživanjima je pokazano sinergističko dejstvo nekih organosulfidnih jedinjenja sa amfotericinom B, te je fokus ovog rada bio ispitivanje sinergizma amfotericina B i ekstrakta belog luka na *C. albicans* chequerboard metodom. Ekstrakt belog luka ekstrahovan je tečno-tečnom ekstrakcijom, potom je uparen i određen mu je sastav tankoslojnom hromatografijom (TLC). Identifikovani su samo produkti raspadanja najzastupljenijih jedinjenja zbog modifikacije protokola i nestabilnosti organosulfidnih jedinjenja. Zatim je određena minimalna inhibitorna koncentracija (MIC) ekstrakta i amfotericina B, koja je iznosila 19.4 µg/mL i 25µL/mL, respektivno. Ispitan je sinergizam i izračunat indeks frakcionalnih inhibitornih koncentracija (FIC) koji iznosi 2, što ukazuje na indiferentno dejstvo ove dve supstance. Takav odnos može se objasniti nestabilnošću organosulfidnih jedinjenja i time što je korišćen izolovani, potencijalno rezistentni soj *C. albicans*. Iako je tankoslojnom hromatografijom pokazano da je u metanolnom ekstraktu došlo do raspadanja organosulfida, iz rezultata se može zaključiti da bi čak i nastali produkti mogli imati antimikotsko dejstvo.

---

## Uvod

*Candida albicans* je gljiva roda *Candida* koja naseljava usnu duplju, genitalni i gastrointestinalni trakt pa stoga kod imunokompromitovanih pacijenata (npr. pacijenti inficirani HIV-virusom, oboleli od kancera, oni koji su bili podvrgnuti transplantaciji ili se nalaze na intenzivnoj nezi) izaziva oportunističku infekciju – kandidijazu (Kerawala i Newlands 2010). U uslovima oslabljenog imunskog sistema, *C. albicans* prelazi u invazivnu formu: ubrzano se razmnožava i stvara vlaknaste kolonije – pseudohife (Chandra i Mukherjee 2015). Posebno veliki problem predstavljaju kolonije

---

Ana Kocić (1999),  
Smederevo,  
Sinđelićeva 2A/58,  
učenica 3. razreda  
Gimnazije u  
Smederevu

MENTOR:  
Stefan Maksimović,  
student Medicinskog  
fakulteta Univerziteta  
u Beogradu

koje formiraju biofilmove na medicinskim uređajima i implantima (kateteri, srčani zalisci, kontraceptivna sredstva). Takve infekcije teške su za lečenje jer su njeni izazivači često rezistentni na antimikotike i najčešće se problem rešava uklanjanjem implanta (Donlan 2001).

Amfotericin B je antimikotik koji se najčešće koristi za lečenje kandidijaze. Prilikom lečenja amfotericinom B može se javiti veliki broj neželjenih dejstava kao što su oštećenja bubrega i jetre, srčane aritmije, reakcije na koži, hipotenzija i snižena temperatura (Laniado-Laborin i Cabrales-Vargas 2009). Građu ćelijske membrane i kod ljudi i kod gljiva, između ostalog, čine i steroli (holesterol kod ljudi i ergosterol kod gljiva) koji su ciljno mesto amfotericina B. Amfotericin B vezujući se za sterole povećava propustljivost ćelijske membrane i formira pore kroz koje zatim prolaze katjoni ( $K^+$ ,  $Na^+$ ,  $Mg^{2+}$ ) (Mesa-Arango *et al.* 2012). Međutim, amfotericin B ima veći afinitet za ergosterol nego za holesterol, pa samim tim izaziva inhibiciju rasta gljiva, a za ljude je toksičan samo u većim koncentracijama. Reaktivnost amfotericina B zavisi od doze i koncentracije sterola u ćelijskoj membrani (Baginski i Czub 2009). Takođe, amfotericin B izaziva i oksidativni stres u ćeliji, ali nije još dokazano u kojoj meri oksidativna oštećenja utiču na njegovo antimikotsko dejstvo (Mesa-Arango *et al.* 2012; Baginski i Czub 2009).

Beli luk (*Allium sativum*) je poznat kao biljka sa značajnim antimikrobnim dejstvom. Pokazano je da on takođe ima dejstvo i na gljive za šta su najzaslužnije njegove organosulfidne komponente kao što su: tiosulfinati, dialil, metil alil i dimetil mono-, di-, tri-, tetra-, penta- i heksasulfidi, vinilditiini i (E)- i (Z)-ajoen (Lawson *et al.* 1990), među kojima su dialil-tiosulfinat (alicin) i (E)- i (Z)-ajoen najvažniji (Yoshida *et al.* 1987; Kim *et al.* 2012). Sveži koncentrovani ekstrakt belog luka sadrži 34% alicina, 44% tiosulfunata i 20% vinilditiina (Davis *et al.* 1994). Alicin je, prema dosadašnjim istraživanjima, komponenta koja je najzaslužnija za inhibiciju rasta gljiva, koja se na primeru *C. albicans* ogleda u inhibiciji stvaranja spora i rasta pseudohifa, kao i inhibiciji sinteze proteina (Davis *et al.* 1994; Yamada *et al.* 1997; Adetumbi *et al.* 1986). Pokazano je da alicin značajno povećava efekat amfotericina B na *C. albicans*, i to prvenstveno stvaranjem oksidativnog stresa na ćelijskoj membrani kao što je npr. peroksidacija njenih fosfolipidnih komponenti što značajno umanjuje rezistentnost *C. albicans* (An *et al.* 2009). Alicin i ajoen slično deluju na enzime s obzirom na to da ajoen nastaje spajanjem dva molekula alicina (Yoshida *et al.* 1987). Broj disulfidnih veza takođe značajno utiče na antimikotsko svojstvo organosulfidnih komponenti belog luka (npr. dialil-disulfid ima znatno veće antimikotsko dejstvo u odnosu na dialil-monosulfid na *C. albicans*) (Tsao i Yin 2001). Dialil-trisulfid i dialil-tetrasulfid su organosulfidne komponente ekstrakta čije su minimalne inhibitorne koncentracije (engl. Minimal Inhibitory Concentration – MIC) bliske onima kod prosečnog antimikotika (Tsao i Yin 2001), ali njih ima u najmanjim količinama u ekstraktu (4-5 mg/mL u odnosu na 348 mg/mL koliko ima alicina). Već je dokazano sinergističko dejstvo između ekstrakta belog luka i amfotericina B, ali na drugoj vrsti gljive (*C. neoformans*), pri

čemu je FIC indeks bio 0.5 (Davis *et al.* 1994). Sinergističko dejstvo celokupnog ekstrakta i amfotericina B na *C. albicans* još nije ispitano.

Cilj ovog rada je ispitivanje sinergizma celokupnog ekstrakta belog luka i amfotericina B na *C. albicans*. Pri smanjenim koncentracijama amfotericina B u kombinaciji sa ekstraktom očekuje se veća inhibicija rasta *C. albicans* u odnosu na amfotericin B pojedinačno.

## Materijal i metode

**Ekstrakcija.** Oljušteno je, očišćeno i isečeno 6 kg belog luka i poplunjeno u 1 L metanola na 44 h, a zatim je smeša iscedena kroz gazu. Sakupljeno je 2 L smeše od čega je 800 mL centrifugirano 45 minuta na 3500 rpm, a suvi ostatak je bačen. Dobijeno je 400 mL relativno bistrog homogenog rastvora.

Rađene su dve tečno-tečne ekstrakcije. Ekstrakt je bio podeljen na dva dela pri čemu je u prvoj ekstrakciji kao nepolarna faza korišćen dietil-etar, a u drugoj etil-acetat. Očekivane supstance su se nalazile u nepolarnoj fazi zbog relativno dugih ugljovodoničnih nizova i disulfidnih mostova. Preostala voda je sakupljena anhidrovanim natrijum-disulfatom ( $\text{Na}_2\text{SO}_4$ ). Ekstrakcija je rađena po modifikovanom protokolu Bock *et al.* (1982).

**Kultivacija.** Za kultivisanje *C. albicans* korišćen je Chromogenic Candida Agar – CCA. Uzet je bris iz usne duplje sa unutrašnje strane obraza i jezika 4 različite osobe i uzorci su zatim naneti na selektivnu podlogu i ostavljeni na 37° u inkubatoru. Nakon 72 h, kolonije su presejane u tečnu podlogu – YPD (Yeast Peptone Dextrose).

**Tankoslojna hromatografija** (eng. Thin Layer Chromatography, TLC). Ekstrakt u dietil-etru je filtriran i uparen kao priprema za TLC koji je rađen po modifikovanom protokolu Lawson-a (1990) sa različitim mobilnim fazama (heksan, etil-acetat, heksan : etil-acetat (6 : 4)).

Napravljeno je 10 mL rastvora acetona i vode (3 : 2) i rastvoreno je 0.5 mL uparenog dietil-etarskog ekstrakta belog luka. Zatim je ovaj rastvor kuvan u vodenom kupatilu na 80-85° 10 h. Taj rastvor je nanešen na TLC pločicu, a razvijanje je vršeno sa različitim mobilnim fazama (etil-acetat, etil-acetat:petroletar u različitim odnosima (6 : 4, 4 : 6, 3 : 7)).

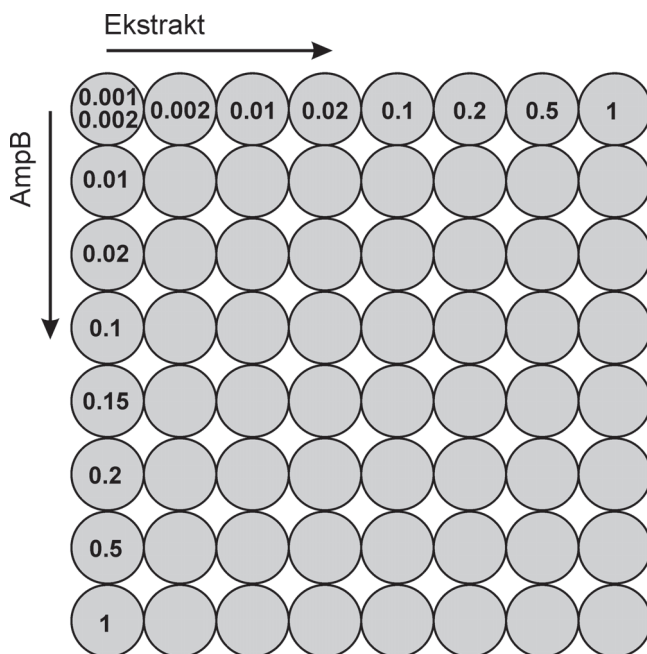
**Minimalna inhibitorna koncentracija** (eng. Minimal Inhibitory Concentration, MIC). Prethodno ekstrahovani rastvor belog luka u etil-acetatu je profiltriran da bi se odvojio od natrijum-sulfata i uparen do suva. Pri tome je dobijeno 38.78  $\mu\text{L}$  ekstrakta. Zatim je ekstrakt rastvoren u dimetil-sulfoksidu i vodi (1 : 1) i vorteksovan. Ekstrakt belog luka rastvoren u DMSO-u je zatim u 50%-nom DMSO-u dodatno razblažen 2, 5, 10, 50, 100 i 500 puta. Rastvori amfotericina su pravljani u sledećim koncentracijama u 50% DMSO-u: 5, 2.5, 1, 0.5, 0.1, 0.05 i 0.01 mg/mL. Tih 8 koncentracija su korišćene za određivanje MIC-a po modifikovanom protokolu Xie *et al.* (2012).

**Sinergizam.** Iste koncentracije koje su korišćene za određivanje MIC-a, korišćene su i za određivanje sinergističkog dejstva između eks-

trakta belog luka i amfotericina B. Rađena je chequerboard metoda po protokolu Hsieh *et al.* (1993). Chequerboard metoda se zasniva na tretiranju mikroorganizama kombinacijom supstanci u različitim koncentracijama, a nakon toga se računa indeks frakcionalnih inhibitornih koncentracija (engl. Fractional Inhibitory Concentration, FIC) kao numerički pokazatelj sinergizma u oblastima gde je inhibicija ispod 20% u odnosu na prosečni rast *C. albicans* u negativnoj kontroli. Serijska razblaženja ekstrakta belog luka poređana su horizontalno, od najmanje do najveće, pri čemu su koncentracije redom 0.001, 0.002, 0.01, 0.02, 0.1, 0.2, 0.5 i 1 u odnosu na štok rastvor, dok su serijska razblaženja amfotericina B (ampB na slici 1) poređana vertikalno takođe od najmanje do najveće sa koncentracijama redom 0.002, 0.01, 0.02, 0.1, 0.15, 0.2, 0.5 i 1 u odnosu na štok rastvor. FIC indeks se računa po sledećoj jednačini:

$$\text{FICindex} = \text{FICext} + \text{FICampB} = \text{ext}/\text{MIC}(\text{ext}) + \text{ampB}/\text{MIC}(\text{ampB})$$

pri čemu je ext koncentracija ekstrakta belog luka, ampB koncentracija amfotericina B, MICext i MICampB su minimalne inhibitorne koncentracije ekstrakta belog luka i amfotericina B, a FICext i FICampB frakcionalne inhibitorne koncentracije istih supstanci.



Slika 1. Prikaz ispitivanja sinergizma chequerboard metodom, gde su naznačena polja bunarići mikrotitar ploče, a brojevi serijska razblaženja antimikotika

Figure 1. Scheme of synergism testing with the chequerboard method, where the fields shown are wells of a 96-well plate and the numbers represent serial dilutions of both of the antimicrobics

U različitim radovima, različito se interpretira vrednost FIC indeksa. Najčešća se za vrednost uzajamne interakcije uzima FIC indeks  $\leq 0.5$ , a za antagonizam  $\geq 2$  ili  $\geq 4$  (Hsieh *et al.* 1993).

## Rezultati

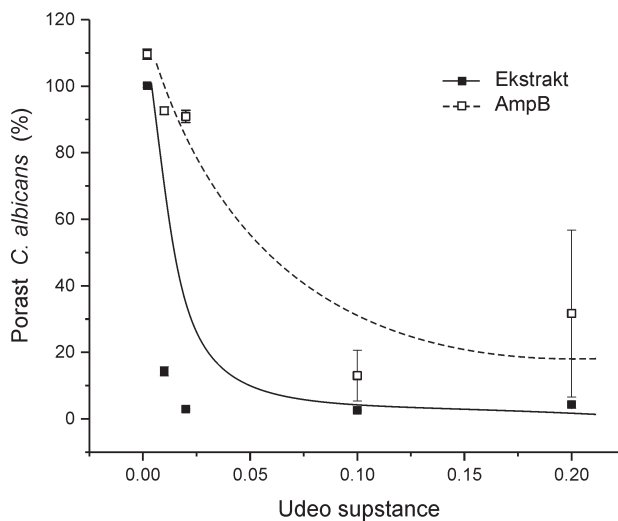
Rezultati TLC-a nisu dali jednoznačan odgovor (slika 2). U etil-acetatu kao mobilnoj fazi, Rf vrednosti (E) i (Z)-ajoena treba da su 0.45 i 0.52, respektivno (Lawson *et al.* 1990), ali u našem eksperimentu nisu detektovane nikakve susptance na tim Rf vrednostima, već samo produkti raspadanja organosulfidnih komponenti ekstrakta sa Rf vrednostima 0.72, odnosno 0.89.



Slika 2. TLC ploča sa Rf vrednošću jedne od produkata raspadanja organosulfidnih komponenti ekstrakta

Figure 2. TLC plate with the Rf value of one of the products of decomposition of the organosulphide components of the extract

MIC je određen u rasponu koncentracija razblaženog ekstrakta i amfotericina B: 5, 10, 50, 100 i 500 puta. Rast je procentualno određen u odnosu na prosečnu apsorbancu negativne kontrole, koja predstavlja *C. albicans* koja nije tretirana nijednim od antimikotika. Prema protokolu, za minimalnu inhibitornu koncentraciju se uzima redukcija rasta ispod 20%, koja je dostignuta već pri 19.4  $\mu\text{g/mL}$  za ekstrakt, a za amfotericin B pri 25  $\mu\text{g/mL}$ .



Slika 3. Porast *C. albicans* za različite koncentracije antimikotika. Error-barovima je označena standardna greška srednje vrednosti, a krivama provizorno naznačena funkcionalna zavisnost.

Figure 3. The growth of *C. albicans* in percentages, depending on the different antimicotic concentrations. Error bars show the standard error of mean value, while the curves approximately indicate the functional dependence.

Pri određivanju sinergističkog dejstva, izračunato je da je FIC indeks 2, što pokazuje da između ova dva antimikotika ne postoji interakcija, odnosno da su barem indiferentni, dok za antagonizam ne može da se tvrdi. Od trenutka kada je postignut MIC za ekstrakt ili amfotericin B, možemo posmatrati samo da li postoji značajnija inhibicija rasta kada su supstance kombinovane u odnosu na to kada su same. Međutim, značajnija inhibicija rasta ne postoji, pa su upravo oblasti MIC-a za obe supstance korišćene za računanje FIC-indeksa (dve vrednosti obeležene u tabeli 1).

Tabela 1. Procentualno izražena inhibicija rasta pri određivanju sinergizma

Amfotericin B	Ekstrakt						
	0.002	0.01	0.02	0.1	0.2	0.5	1
0.002	108.6	10.6*	0	0	0	4.3	0
0.01	107.3	6.3	2.6	0.2	0	12.1	0
0.02	100.4	7.1	1.5	1.8	0.6	5.2	0
0.1	6.8*	27.2	2.0	4.3	4.5	12.0	0
0.2	0	0	0	0	0	0	0
0.5	0	0	0	0	0	0	3.7
1	0	0	0	0	0	0	6.1

Razblaženja u mikrotitar ploči u odnosu na štok rastvor za amfotericin B prikazana su vertikalno, a za ekstrakt horizontalno, oba u rastućem poretku, od najmanje do najveće; obeležena polja (\*) su vrednosti uzete za računanje sinergizma za obe supstance

FIC supstanci se računa kao količnik koncentracije supstanci u polju koje pokazuje delimičnu inhibiciju odmah pre polja sa maksimalnom i MIC-a te iste supstance.  $FIC_{index} = FIC_{ext} + FIC_{ampB} = \frac{ext}{MIC(ext)} + \frac{ampB}{MIC(ampB)} = \frac{0.0194}{0.0194} + \frac{0.025}{0.025} = 1 + 1 = 2$ . Kod ekstrakta belog luka je korišćena koncentracija od 0.01 u odnosu na koncentraciju štoka odnosno 0.0194 mg/mL, a tolika je i minimalna inhibitorna koncentracija ove supstance pa je FIC ekstrakta 1. Kod amfotericina B korišćena je koncentracija od 0.1 u odnosu na koncentraciju štoka, odnosno 0.025 mg/mL, što je takođe i minimalna inhibitorna koncentracija ove supstance pa je FIC amfotericina B 1. Sabiranjem ove dve vrednosti FIC-a dobija se FIC indeks.

## Diskusija

U dosadašnjim istraživanjima pokazano je da je na TLC-u u etil-acetatu kao mobilnoj fazi moglo jasno da se odvoji bar 5 različitih jedinjenja ekstrakta (od čega su 4 imala fungicidno dejstvo) (Davis *et al.* 1994), međutim mi smo uočili 2 trake sa jedinjenjima čije Rf vrednosti nisu odgovarale Rf vrednostima iz istraživanja do sada. S obzirom na to da je korišćen modifikovani protokol za ekstrakciju, a da su tražene organo-

sulfidne komponente nestabilne (pogotovo alicin), moguće je da su uočene trake-produkti njihovog raspadanja.

U ranijim ispitivanjima, pokazano je da je ekstrakt belog luka i do 60 puta manje potentan od amfotericina B (Davis *et al.* 1994), dok naši rezultati pokazuju da se i pri veoma niskim koncentracijama ekstrakta dostiže inhibicija rasta. Ovakve razlike mogu se objasniti time da smo koristili svežiji ekstrakt (6 dana nakon ekstrakcije), a u tom radu se takođe navodi da potentnost ekstrakta s vremenom opada zbog nestabilnosti organosulfidnih jedinjenja.

Takođe, može se zapaziti da trend rasta ne opada linearno što je možda posledica širokog opsega koncentracija. MIC može biti drugačiji u približnijem spektru koncentracija.

Iako je do sada pokazano da dolazi do sinergističkog efekta alicina kao najaktivnije komponente ekstrakta sa amfotericinom B (An 2009), naši rezultati odstupaju. Alicin u ekstraktu nije detektovan, mada svi produkti njegovog raspadanja zadržavaju antimikrobno dejstvo. U dobijenom ekstraktu nisu detektovani dialil-trisulfid i dialil-tetrasulfid zbog nestabilnosti i malih količina u kojima se inače nalaze u belom luku (Davis *et al.* 1994), pa se pretpostavlja da je njihovo odsustvo takođe uticalo na smanjenu interakciju. Morfološke razlike između *Cryptococcus neoformans* i *Candida albicans* koje se najviše ogledaju u prisustvu kapsule kod *C. neoformans* potencijalno predstavljaju razlog različitosti dosadašnjih istraživanja sa našim rezultatima.

Takođe, poreklo soja koje je korišćeno u našem istraživanju se dovodi u vezu sa eventualnom rezistencijom *C. albicans* na jedinjenja iz belog luka, imajući u obzir zastupljenost ovih jedinjenja u dnevnoj ishrani populacije iz koje je izolovan soj.

## Zaključak

Naši rezultati pokazuju da ekstrakt belog luka i amfotericin B nemaju zajedničko dejstvo na izolovani soj *C. albicans*. Indiferentno dejstvo supstanci najverovatnije potiče od nestabilnosti alicina i dialil-sulfida i moguće rezistencije soja. Dalja istraživanja bi trebalo da uzmu u obzir korišćenje manjeg opsega koncentracija i komercijalnog soja *C. albicans* za ispitivanje sinergističkog dejstva. Takođe, u daljim istraživanjima se treba baviti razlikom između delovanja ekstrakta belog luka na *C. neoformans* i *C. albicans*, a zatim treba ispitati postoji li rezistencija komensalnih sojeva *C. albicans* na organosulfidne komponente belog luka.

## Literatura

- Adetumbi M., Javor G. T., Lau B. H., 1986. *Allium sativum* (Garlic) Inhibits lipid synthesis by *Candida albicans*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, **30**: 499.

- An M., Shen H., Cao Y., Zhan J., Cai Y., Wang R., Jiang Y. 2009. Allicin enhances the oxidative damage effect of amphotericin B against *Candida albicans*. *International Journal of Antimicrobial Agents*, **33**: 258.
- Baginski M., Czub J. 2009. Amphotericin B and its new derivatives—mode of action. *Current Drug Metabolism*, **10** (5): 459.
- Bock H., Mohmand S., Hirabayashi T., Semkow A. 1982. Gasphasen-Reaktionen, 30. Thioacrolein: Das stabilste C<sub>3</sub>H<sub>4</sub>S-Isomere und sein PE-spektroskopischer Nachweis in der Gasphase. *Chemische Berichte*, **115**: 1339.
- Chandra J., Mukherjee P. K. 2015. *Candida* biofilms: development, architecture, and resistance. **Microbiology Spectre**, **3** (4): 2.
- Davis L. E., Shen J., Royer R. E. 1994. *In vitro* synergism of concentrated *Allium sativum* extract and amphotericin B against *Cryptococcus neoformans*. *Planta Medica*, **60**: 546.
- Donlan R. M. 2001. Biofilm formation: a clinically relevant microbiological process. *Clinical Infectious Diseases*, **33** (8): 1387.
- Hsieh M. H., Yu C. M., Yu V. L., Chow J. W. 1993. Synergy assessed by checkerboard. A critical analysis. *Antimicrobial Susceptibility Studies*, **16**: 343
- Kerawala C., Newlands C. 2010. *Oral and maxillofacial surgery*. Oxford University Press, str. 446-47.
- Kim Y-S., Kim K. S., Han I., Kim M-H., Jung M. H., Park H. K. 2012. Quantitative and Qualitative Analysis of the Antifungal Activity of Allicin Alone and in Combination with Antifungal Drugs. *PLoS ONE*, **7** (6): 1-8
- Laniado-Laborin R., Cabrales-Vargas M. N. 2009. Amphotericin B: side effects and toxicity. *Revista Iberoamericana de Micología*, **26** (4): 223.
- Lawson L. D., Wang Z. Y. J., Bronwyn G. 1990. Identification and HPLC quantitation of the sulfides and dialk(en)yl thiosulfonates in commercial garlic products. *Planta Medica*, **56**: 363.
- Mesa-Arango A. C., Scorzoni L, Zaragoza O. 2012. It only takes one to do many jobs: Amphotericin B as antifungal and immunomodulatory drug. *Fungi and Their Interactions*, **3**: 286.
- Tsao S. M., Yin M. C. 2001. *In-vitro* antimicrobial activity of four diallyl sulphides occurring naturally in garlic and Chinese leek oils. *Journal of Medical Microbiology*, **50**: 646.
- Xie J. L., Singh-Babak S. D., Cowen L. E. 2012. Minimum Inhibitory Concentration (MIC) Assay for Antifungal Drugs. *Bio-protocol*, **2** (20): e252.
- Yamada Y., Azuma K. 1997. Evaluation of the *in vitro* antifungal activity of allicin. *Antimicrobial Agents Chemotherapy*, **11**: 743.



Yoshida S., Kasuga S., Hayashi N., Ushiroguchi T., Matsuura H., Nakagawa S., 1987. Antifungal activity of ajoene derived from garlic. *Applied And Environmental Microbiology*, **53** (3): 615.

---

Ana Kocić

## Testing the Synergistic Effect of Garlic Extract and Amphotericin B Against *C. albicans*

Candidiasis is a fungal infection caused by the *Candida* genus, mostly *Candida albicans*, an opportunistic fungus that is often found in the human oral cavity. Amphotericin B is commonly used for the systemic treatment of candidiasis, but despite its efficiency it is linked to various side effects (kidney and liver damage, anorexia, high temperature, low blood pressure, nausea, headache etc.). Garlic (*Allium sativum*) contains a substantial amount of organosulphide compounds which also have antimicrobial activity. These are thiosulfonates; diallyl, methyl allyl and dimethyl mono-, di-, tri-, tetra-, penta- and hexasulphides; vinylidithiines; and (E)- and (Z)-ajoene. Synergistic properties have previously been shown for organosulphide compounds and amphotericin B, and the focus of this study was to evaluate the possible synergism of garlic extract and amphotericin B against *C. albicans* using the checkerboard method. The checkerboard method is based on microorganism treatment with the combination of substances in different concentrations and calculation of the Fractional Inhibitory Concentrations (FICs) in wells where the inhibition of growth was under 20%, compared with the average growth of *C. albicans* in the negative control.

Garlic extract was prepared with liquid-liquid extraction, subsequently evaporated, and Thin Layer Chromatography (TLC) was used to determine which compounds were found in the extract. However, only decomposed products of the main substances were identified due to protocol modification and compound instability. Minimal Inhibitory Concentration (MIC) was determined for the garlic extract and amphotericin B, which was 19 µg/mL and 25 µg/mL respectively. After that, synergism was tested with the FIC index (Fractional Inhibitory Concentration index) as its mathematical indicator. The calculated FIC index was 2, which implies an indifferent effect of these substances. The indifferent relationship of the garlic extract and amphotericin B potentially implies different molecular mechanisms by which these substances exhibit antimicrobial effects. Furthermore, it is concluded that an antimicrobial effect is possible, despite TLC showing organosulphide decomposition in the methanolic extract.

