

بررسی فعالیت ضد باکتریایی عصاره های آبی و اتانولی حنا علیه استافیلوکوکوس اورئوس و سودوموناس آئروژینوزا

مهدی بهدانی^۱ - کیارش قزوینی^۲ - علیرضا محمدزاده^۳ - علی صادقان^۴

چکیده

زمینه و هدف: حنا گیاه کوچکی است که دارای خاصیت درمانی شناخته شده ای می باشد. به طوری که در زمانهای گذشته از این گیاه جهت بهبود زخمهای پوستی استفاده می نمودند. در این مطالعه ما فعالیت ضد میکروبی عصاره ی حنا را بر علیه باکتری های استافیلوکوکوس اورئوس (باکتری گرم مثبت) و سودوموناس آئروژینوزا (باکتری گرم منفی) با پایین ترین غلظتی که از رشد میکروارگانیسم ها جلوگیری می کند (MIC)، بررسی نمودیم.

روش تحقیق: در بررسی فعالیت ضد میکروبی عصاره ی حنا از ۲۵ نمونه بالینی استافیلوکوکوس اورئوس و ۲۵ نمونه سودوموناس آئروژینوزا استفاده گردید. عصاره های حنا مورد استفاده در این آزمایش شامل عصاره ی آبی و عصاره ی اتانولی بودند که فعالیت ضد میکروبی عصاره ها توسط آزمایش رقیق سازی آگار انجام گرفت.

یافته ها: نتایج، محدوده وسیعی از فعالیت عصاره های آبی و اتانولی حنا علیه باکتری های استفاده شده را نشان دادند. به طوری که MIC 50 به ترتیب برای استافیلوکوکوس اورئوس و سودوموناس آئروژینوزا در عصاره آبی ۲/۵ mg/ml و ۱۰ mg/ml و در عصاره اتانولی ۳ mg/ml و ۳/۵ mg/ml می باشد.

نتیجه گیری: یافته های این مطالعه استفاده از حنا را در درمان عفونت های پوست و زخم پیشنهاد می نماید و همچنین به نظر می رسد که این ماده طبیعی می تواند عامل امید بخش در پیشگیری و درمان بیماریهای پوستی باشد.

کلید واژه ها: حنا؛ فعالیت ضد میکروبی؛ استافیلوکوکوس اورئوس؛ سودوموناس آئروژینوزا

افق دانش؛ فصلنامه دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی درمانی گناباد (دوره ۱۵؛ شماره ۲؛ تابستان سال ۱۳۸۸)

دریافت: ۱۳۸۷/۷/۲۰ اصلاح نهایی: ۱۳۸۸/۶/۱۲ پذیرش: ۱۳۸۸/۶/۱۸

۱- دانشجوی دکتری بیوتکنولوژی پزشکی، انستیتو پاستور تهران

۲- استادیار، گروه آموزشی میکروب شناسی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی مشهد

۳- نویسنده مسؤول؛ دانشجوی دکتری باکتری شناسی پزشکی، مربی، گروه آموزشی علوم آزمایشگاهی، دانشگاه علوم پزشکی گناباد

آدرس: گناباد- دانشکده پیراپزشکی- دانشگاه علوم پزشکی - گروه آموزشی علوم آزمایشگاهی

تلفن: ۰۵۳۳-۷۲۲۳۰۲۸ نمابر: ۰۵۳۳-۷۲۲۳۸۱۴ پست الکترونیکی: alm13604@gmail.com

۴- استاد، گروه آموزشی میکروب شناسی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی مشهد

مقدمه

این عقیده که برخی از گیاهان دارای قابلیت درمانی هستند به سالها قبل بر می گردد. بعضی از این فرآورده های طبیعی شامل موادی هستند که ما به طور رایج آنها را به عنوان عوامل ضد میکروبی می شناسیم و مورد استفاده قرار می دهیم (۱). از سوی دیگر مقاومت باکتری ها به آنتی بیوتیک ها روز به روز در حال افزایش است که این مسئله باعث می شود تا بشر به فکر جایگزین کردن عوامل ضد میکروبی مؤثر و با عوارض جانبی کمتر به جای مواد ضد میکروبی با اثر کمتر و عوارض نا خواسته بیشتر باشد.

حنا گیاه کوچکی است که در ایران، عربستان، آفریقای شمالی و هندوستان رشد نموده و در این کشورها خاصیت درمانی حنا شناخته شده است، اما به طور سنتی از حنا برای رنگ کردن بدن استفاده می شود. حنا حاوی مانیتول، اسید تانیک، موسیلاژ و گالیک اسید می باشد، اما مهمترین ماده تشکیل دهنده آن ۲- هیدروکسی ناپتو کونیون یا Lawson است که به عنوان یک عامل فعال زیستی شناخته شده است. Lawson ماده اصلی مربوط به خاصیت رنگی حنا می باشد (۲،۳).

استافیلوکوکوس اورئوس یک باکتری گرم مثبت پاتوژن می باشد و به عنوان مهمترین عامل عفونت های پوست و بافت های زیرین آن در انسان می باشد. سودوموناس آئروژینوزا نیز باکتری گرم منفی و پاتوژن است و عامل اصلی عفونت های شدید در سوختگی ها می باشد. این دو باکتری معمولاً به آنتی بیوتیک های متداول مقاوم هستند و این ویژگی، انتخاب درمان مناسب را محدود می کند (۳،۴). با این حال به نظر می رسد دسترسی به آنتی بیوتیک های سنتتیک با فعالیت ضد باکتریایی مناسب علیه این دو باکتری در آینده نزدیک امکان پذیر نخواهند بود.

مطالعات آزمایشگاهی مختلفی مشخص نمودند که برخی از عصاره های گیاهی اثر باکتری کشی قوی بر ضد باکتریها دارند (۵-۸). با توجه به استفاده معمول گیاه حنا در طب سنتی برای درمان بیماری های پوستی فرضیه بررسی تأثیر مناسب عصاره های حنا بر روی دو باکتری عامل عفونت های پوستی مطرح گردید. لذا در این مطالعه اثر

ضد میکروبی عصاره های آبی و اتانولی حنا بر روی باکتری های استافیلوکوک اورئوس و سودوموناس آئروژینوزا و نیز تعیین حداقل غلظت ممانعت کننده از رشد میکروارگانیسم (MIC)^۱ مورد بررسی قرار گرفته است.

روش تحقیق

تهیه عصاره های آبی و الکلی حنا: حنای مورد مطالعه در این پژوهش از استان یزد تهیه گردید و شامل برگهای حنا بود که در مجاورت هوا خشک شدند. در این مطالعه عصاره حنا به دو روش تهیه گردید:

۱- عصاره آبی: ۳۰ میلی لیتر آب مقطر به ۳ گرم پودر حنا اضافه گردید و به مدت ۲۴ ساعت بر روی شیکر قرار گرفت. محلول مورد نظر جهت حذف ذرات بزرگتر دکانته و ذرات کوچکتر با عبور از صافی غشائی ۰/۴۵ pm حذف گردیدند (روش نفوذی اصلاح شده). عصاره حاصل در مجاورت هوا به سرعت خشک شد و پودر خشک حاصل پس از توزین در آب مقطر حل گردیده و به عنوان عصاره آبی مورد استفاده قرار گرفت.

۲- عصاره اتانولی: این عصاره به روش برگشتی در دستگاه سوکسله تهیه شد (۸). در این روش اتانول به شیوه برگشتی و به عنوان حلال تحت فشار کم در یک دستگاه چرخشی تبخیر گردید تا عصاره حاصل گردد. عصاره حاصل توزین و جهت بررسی فعالیت ضد میکروبی مورد استفاده قرار گرفت.

سویه های باکتریایی: باکتری های مورد استفاده در این پژوهش از بیماران مراجعه کننده به آزمایشگاه میکروب شناسی بیمارستان قائم (عج) شهر مشهد کشت شدند. این باکتری ها شامل ۲۵ ایزوله استافیلوکوکوس اورئوس و ۲۵ ایزوله سودوموناس آئروژینوزا می باشد. در تست حساسیت ضد میکروبی انجام شده اکثر باکتریهای ایزوله شده بر علیه بسیاری از آنتی بیوتیک ها مقاوم بودند. همچنین ۱۰ ایزوله استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس و ۱۰ ایزوله اشیریشیا کولی در این مطالعه به عنوان کنترل مکمل مورد استفاده قرار گرفتند.

1- Minimum Inhibitory Concentration

غلظت $7/5 \text{ mg/ml}$ از رشد تمام ایزوله های استافیلوکوکوس اورئوس و سودوموناس آئروژینوزا جلوگیری نمود. MIC_{90} و MIC_{50} حداقل غلظت های ممانعت کننده از رشد عصاره ها هستند که به ترتیب سبب جلوگیری از رشد 50% و 90% ایزوله ها می شوند. MIC_{50} عصاره آبی حنا برای استافیلوکوکوس اورئوس و سودوموناس آئروژینوزا به ترتیب $2/5 \text{ mg/ml}$ و 10 mg/ml بود، در صورتی که این نتیجه برای عصاره اتانولی حنا به ترتیب 3 mg/ml و $3/5 \text{ mg/ml}$ بدست آمد. MIC_{90} عصاره آبی حنا برای استافیلوکوکوس اورئوس و سودوموناس آئروژینوزا به ترتیب $6/8 \text{ mg/ml}$ و 18 mg/ml بود، و این نتیجه برای عصاره اتانولی حنا به ترتیب $6/8 \text{ mg/ml}$ و $6/7 \text{ mg/ml}$ حاصل شد. در باکتری های کنترل استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس و اشریشیاکلی نتایج MIC_{50} در عصاره های آبی و اتانولی به ترتیب $2/7 \text{ mg/ml}$ و 10 mg/ml در عصاره آبی و 1 mg/ml و $3/7 \text{ mg/ml}$ در عصاره اتانولی بود. در این مطالعه میزان MBC عصاره ها با MIC برابر بود، به طوری که همان غلظتی که باعث ممانعت از رشد باکتری ها می شود سبب کشته شدن باکتری ها نیز می گردد.

بحث

همانطور که در قسمت نتایج مشخص شد عصاره آبی حنا فعالیت ضد میکروبی کمی را بر علیه باکتری گرم منفی مانند سودوموناس آئروژینوزا و اشریشیاکلی دارد، با این حال این عصاره دارای فعالیت ضد میکروبی بسیار خوبی بر علیه گونه های استافیلوکوک به عنوان باکتری های گرم مثبت می باشد. در مطالعه ای که توسط محمد و همکاران انجام شد نتایج مشابهی بدست آمد (۱۰). همچنین در مطالعه مشابه که توسط هبال در عمان انجام گرفت نیز تأثیر عصاره حنا در از بین بردن باکتری های استافیلوکوکوس اورئوس و سودوموناس آئروژینوزا به اثبات رسید (۱۱).

تعیین فعالیت ضد میکروبی: فعالیت ضد میکروبی عصاره ها توسط آزمایش رقیق سازی آگار^۱ و بر اساس توصیه NCCLS و هر کدام دو بار انجام شد. به طور خلاصه، ۱۵ میلی لیتر محیط مولر- هینتون آگار با غلظت های مختلف از عصاره های حنا مخلوط شد و به آن 10^4 CFU/ml از هر نمونه باکتری مورد نظر تلقیح گردید. پلیت ها در دمای 37°C درجه سانتیگراد به مدت ۲۴ ساعت انکوبه گردیدند. حداقل غلظت مهار کنندگی (MIC) به عنوان کمترین غلظت هر عصاره که از رشد باکتری بر روی محیط کشت جلوگیری می کند، تعیین گردید.

در مرحله بعدی از روش رقیق سازی مایع^۲ جهت تعیین حداقل غلظت کشندگی عصاره های حنا استفاده شد. جهت انجام این آزمایش حجم های یکسان از هر سوسپانسیون باکتریایی شامل 10^5 CFU/ml به محیط مولر- هینتون براث حاوی غلظتهای مختلف از عصاره های حنا تلقیح گردید. سپس محیطهای کشت در دمای 37°C درجه سانتیگراد به مدت ۲۴ ساعت انکوبه شدند. متعاقباً ۱۰۰ میکرولیتر از هر محیط کشت مایع بر روی محیط مولر- هینتون آگار کشت داده شد و مجدداً در دمای 37°C درجه سانتیگراد به مدت ۲۴ ساعت انکوبه شدند. حداقل غلظت کشندگی (MBC)^۳ به عنوان کمترین غلظت عصاره حنا که به طور کامل باعث مرگ باکتریها گردید و هیچ گونه رشدی مشاهده نشد، تعیین شد.

یافته ها

نتایج فعالیت های ضد میکروبی عصاره های آبی و الکلی حنا بر روی گونه های باکتریایی در جداول ۱ و ۲ نشان داده شده است.

عصاره آبی با غلظت $7/5 \text{ mg/ml}$ قادر است از رشد هر ۲۵ ایزوله استافیلوکوکوس اورئوس جلوگیری کند در حالی که همین غلظت از رشد هیچ یک از ایزوله های سودوموناس آئروژینوزا جلوگیری نمی کند. در مقایسه عصاره اتانولی با

1- Agar Dilution Assay

2- Broth Dilution Method

3- Minimum Bactericidal Concentration(MBC)

جدول ۱: فعالیت ضد باکتریایی عصاره های حنا علیه استافیلوکوکوس اورئوس

عصاره	غلظت (mg/ml)	تعداد نمونه باکتری های مهیار نشده	تعداد نمونه باکتری های مهیار شده	MIC50 (mg/ml)	MIC90 (mg/ml)
عصاره آبی	۰/۷۵	۲۱	۴	۲/۵	۶/۸
	۱/۲۵	۲۱	۴		
	۲/۵	۱۲	۱۳		
	۵	۸	۱۷		
	۷/۵	۰	۲۵		
عصاره اتانولی	۰/۷۵	۲۵	۰	۳	۶/۸
	۱/۲۵	۲۵	۰		
	۲/۵	۸	۱۷		
	۵	۴	۲۱		
	۷/۵	۰	۲۵		

جدول ۲: فعالیت ضد باکتریایی عصاره های حنا علیه سودوموناس آئروژینوزا

عصاره	غلظت (mg/ml)	تعداد نمونه باکتری های مهیار نشده	تعداد نمونه باکتری های مهیار شده	MIC50 (mg/ml)	MIC90 (mg/ml)
عصاره آبی	۰/۷۵	۲۵	۰	۱۰	۱۸
	۱/۲۵	۲۵	۰		
	۲/۵	۲۵	۰		
	۵	۲۵	۰		
	۷/۵	۲۵	۰		
	۳۰	۰	۲۵		
عصاره اتانولی	۰/۷۵	۲۵	۰	۳/۵	۶/۷
	۱/۲۵	۲۵	۰		
	۲/۵	۲۵	۰		
	۵	۸	۱۷		
	۷/۵	۰	۲۵		

با این حال عصاره الکلی حنا فعالیت ضد میکروبی خوبی را بر علیه هر دو باکتری استافیلوکوک اورئوس و سودوموناس آئروژینوزا و نیز دو باکتری کنترل استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس و اشرشیاکلی از خود نشان داد.

این مطالعه مشخص کرد که اجزای حنای استخراج شده به وسیله حلال آلی (اتانول) دارای فعالیت ضد میکروبی بهتری نسبت به اجزای حنای استخراج شده توسط حلال آبی (آب مقطر) می باشد. قابل توجه است که باکتری های مورد

نتیجه گیری

حنا ماده ای طبیعی و غیرسمی و فاقد اثرات شدید است و با توجه به سایر مزیت های آن از جمله ارزانی و در دسترس بودن آن برای مردم کشورهای در حال توسعه می تواند به عنوان یک شانس واقعی برای درمان و پیشگیری عفونت های پوستی مطرح شود. در این مطالعه ما گام اول در ارزیابی قابلیت ضد میکروبی حنا را برداشتیم به نظر می رسد در گام های بعدی بایستی اجزای تشکیل دهنده حنا تجزیه شود و هرکدام به تنهایی از نظر اثرات ضد میکروبی مورد بررسی قرار گیرد. همچنین ارزیابی کلینیکی برای پی بردن به امکان استفاده از حنا به عنوان یک ماده ارزان و با اثرات سوء کم برای پیشگیری و درمان عفونت های پوستی به خصوص در مواردی که مقاومت دارویی و خطر عفونت مجدد در آن بالا است مورد نظر می باشد.

تشکر و قدردانی

بدینوسیله از آقای دکتر حمید صادقیان که در تهیه عصاره اتانولی ما را یاری نمودند، تشکر می نماییم.

استفاده در این پژوهش همگی از ایزوله های بیمارستانی بوده و به اغلب آنتی بیوتیک های مورد استفاده نیز دارای مقاومت بودند، و عصاره های حنا توانستند از رشد این باکتری ها جلوگیری نمایند.

مطالعات مختلف نشان می دهند که حنا دارای فعالیت ضد میکروبی وسیعی علیه بسیاری از باکتریهای گرم مثبت، گرم منفی و همچنین مایکوباکتریوم ها می باشد (۱۲). مطالعه حاضر با توجه به استفاده سنتی حنا در رنگ آمیزی و قابلیت میکروب زدایی آن طرح ریزی شد لذا در آن قابلیت ضد میکروبی عصاره حنا در از بین بردن دو باکتری عامل عفونت های پوستی مورد بررسی قرار گرفت. نتایج نشان داد که عصاره ها قادر به مهار کردن رشد این میکرو ارگانیسم ها می باشند و به این جهت استفاده از حنا می تواند در درمان عفونت های زخم و پوست مورد پیشنهاد قرار گیرد. استفاده از حنا در درمان عفونت های پوست ممکن است عوارض ناشی از استفاده از مرهم های پوستی از قبیل نیترا نقره که باعث کاهش سدیم و کاهش پتاسیم خون می شوند و یا عارضه درد ناشی از سولفامیلین را کاهش دهد.

References:

- 1- Rios JL, Recio MC. Medicinal plants and antimicrobial activity. *Journal of Ethnopharmacology* 2005; 100: 80-84.
- 2- Torkelson AR. The Cross Name Index to Medicinal Plants. CRC Press Inc., Boca Raton, FL 1999; (1): 300-322.
- 3- Duke JA. Handbook of Medicinal Herbs. CRC Press Inc. Boca Raton 2002: 374-375.
- 4- Moniri R., Mosayebi Z, Movahedian AH, Mossavi GhA. Increasing Trend of Antimicrobial Drug-Resistance in *Pseudomonas aeruginosa* Causing Septicemia. *Iranian Journal of Public Health* 2006; 35: 58-62.
- 5- Bal AM., Gould I.M. Antibiotic resistance in *Staphylococcus aureus* and its relevance in therapy. *Expert Opinion on Pharmacotherapy* 2005; 6: 2257-2269.
- 6- Samy RP, Ignacimuthu S, Sen A. Screening of 34 Indian medicinal plants for antibacterial properties. *Journal of Ethnopharmacology* 1998; 62: 173-182.
- 7- Dupont, S, Caffin N, Bhandari B, Dykes G.A. In vitro antibacterial activity of Australian native herb extracts against food-related bacteria. *Food Control* 2006; 17: 929-932.
- 8- Lin J, Opoku AR., Geheeb-Keller M, Hutchings AD, Terblanche S.E., Jager AK, Van Staden J. Preliminary screening of some traditional Zulu medicinal plants for anti-inflammatory and anti-microbial activities. *Journal of Ethnopharmacology* 1999; 68: 267-274.

- 9- National Committee for Clinical Laboratory Standards. Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically. Approved Standards. NCCLS Document M7-A5. National Committee for Clinical Laboratory Standards, Wayne, Pa. 2001.
- 10- Muhammad HS, Muhammad S. The use of *Lawsonia inermis* linn(henna) in the management of burn wound infections. *African Journal of Biotechnology* 2005; 4: 934-937.
- 11- Habbal OA, Al-Jabri AA, El-Hag AH, Al-Mahrooqi ZH, Al-Hashmi, NA. In-vitro antimicrobial activity of *Lawsonia inermis* Linn (henna). A pilot study on the Omani henna. *Saudi Medical Journal* 2005; 26(1):69-72.
- 12- Habbal OA, Al-Jabri AA, El-Hag, AG. Antimicrobial properties of *Lawsonia inermis* (henna): a review. *Australian Journal of Medical Herbalism* 2007.

Antibacterial activity of Henna extracts against *Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas aeruginosa*

M. Behdani¹, K. Ghazvini², AR. Mohammadzadeh³, A. Sadeghian⁴

Abstract

Background and Aim: Henna is a small shrub known for healing attributes. In this study we evaluate the antimicrobial activity of Henna extract against *Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas aeruginosa* by detecting the lowest concentration that inhibits the growth of the microorganism.

Materials and Methods: The antimicrobial activities of Henna extracts were determined against twenty five isolates of *Staphylococcus aureus* and 25 isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. Primarily the antimicrobial activity of the extracts was determined using agar dilution assay, as recommended by the National Committee for Clinical Laboratory Standard (NCCLS).

Results: The results demonstrate a wide range of activities of the different extracts against the bacteria tested. MIC₅₀ for *Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas aeruginosa* in watery extract was 2.5 mg/ml and 10 mg/ml and in ethanolic extract was 3 mg/ml and 3.5 mg/ml respectively.

Conclusion: These findings support the use of Henna in the treatment of skin and wound infection. Also Henna appears to be a promising agent for prophylaxis against skin disease.

Keywords: Henna; *Lawsonia intermis*; Antibacterial Activity; *Staphylococcus aureus*; *Pseudomonas aeruginosa*

Ofogh-e-Danesh. GMUHS Journal. 2009; Vol. 15, No. 3

1- Ph.D student in Medical Biotechnology, Pasteur Institute of Iran, Tehran, Iran.

2- Assistant Professor, Ph.D in Medical Microbiology, Mashhad University of Medical Sciences, Mashhad, Iran.

3- Corresponding Author; Ph.D Student in Medical Bacteriology, Gonabad University of Medical Sciences, Gonabad, Iran.

Tel: +98- 533-7223814

Fax: +98- 5333-7223814

Email: alm13604@gmail.com

4- Professor, Ph.D in Medical Microbiology, Mashhad University of Medical Sciences, Mashhad, Iran.