اختبار تأثير أوراق نبات الحناء على بعض سلالات البكتيريا

عبد المنعم صنع الله, فاطمة فوزي اميمة, حليمة محمد الرائس
كلية التقنية الطبية – مصراته

ملخص

الحناء نبتة شجيرية, كثيرة الفروع, دائمة الخضرة، يصل طولها إلى ثلاثة أمتار, تنمو في البيئات الاستوائية لقارة إفريقيا, و حول البحر الابيض المتوسط. تستخدم مكوناتها في انحاء متفرقة من العالم, كمصدر متوارث للزينة, و التداوي من بعض الامراض. احتواء هذا النبات على كميات وافرة من المواد الحيوية الفعالة يجعل منه أحد النباتات البارزة, و المستخدمة للعلاج من بين تلك التي يستخدمها الانسان. إلى جانب فعاليتها في علاج بعض الامراض العضوية, فقد اظهرت مكونات الحناء تأثيرا مضادا للأحياء الدقيقة. اجريت الدراسة الحالية, باستخدام طريقة انتشار القرص و طريقة انتشار حفر الآجار, لاختبار تأثير أوراق الحناء على بعض البكتيريا الممرضة, و المعزولة من حالات سريرية و هي: *ستافيلوكوكس اوريس* و *سودوموناس ايروجينوزا* و جنس بروتيوس و *الاشريشياء كولاي*. تبين أن لمسحوق و منقوع أوراق الحناء تأثيرا معتبرا ضد البكتيريا موجبة و سالبة جرام المختبرة, لا سيما الموجبة منها, حيث كان التأثير عليها أبين و أظهر. هذه النتائج تؤيد الدراسات السابقة و تدعم استخدام و تطوير مكونات نبات الحناء كمضاد بكتيري بديل.

مقدمة

ازدياد معدل مقاومة الأحياء الدقيقة للمضادات المستخدمة, لا يزال يثير قلق الكثير من المختصين في هذا المجال, حول العالم [1-4], حيث يعزى ذلك إلى الاستخدام غير المناسب للمضادات الميكروبية في مجالي الطب البشري [5], و البيطري [6، 7], و ينذر بوجود حاجة ملحة لتطوير تلك المضادات, أو ايجاد بدائل لها, لمجابهة الانماج المستعصية. لعل أقرب المصادر للبحث عن مضادات ميكروبية فعالة هي النباتات, حيث كانت لصيقة بحياة الانسان في حضاراته القديمة لأكثر من 9000 سنة, كمصدر مهم للتداوي من الادواء المختلفة [8، 9]. لازالت الأدوية العشبية في طلب كبير, سواءً كان ذلك في الدول المتقدمة, أو النامية, في مجال الرعاية الصحية الاولية, لاتساع فعاليتها الحيوية, و الطبية, و أمانها, و قلة تكلفتها [10، 11].

وفقا لدراسة تحليلية حول مصادر الادوية المستخدمة لعلاج الامراض, فان 122 مركب يستخدم في الصناعات الدوائية, استخلصت من 94 نوع من النباتات, و أن 80% من هذه النباتات يستخدم اصلا كعلاج تقليدي [12]. على الرغم من أن الادوية نباتية المصدر تمثل 25-50% من الادوية المستخدمة, إلا أنه لا يوجد منها ما يستخدم كمضاد للميكروبات [13]. تنتج النباتات مجموعات متنوعة من المركبات التي يمكن أن تكون بمثابة أدوية مضادة للكائنات الحية الدقيقة الممرضة [14]. لذا, فقد تسارعت وتيرة البحث عن الادوية المشتقة من النباتات في السنوات الأخيرة, حيث يقوم علماء النبات، و الاحياء الدقيقة، و الكيمياء بالتفتيش في الأرض عن المواد الكيميائية النباتية, و التي يمكن أن تسهم في تطوير علاج الأمراض المعدية.

تعد مكونات شجيرة الحناء *Lawsonia inermis*, من أوراق, و زهور، و بذور، و جذور, و لحاء سيقان في مختلف أنحاء العالم من العقاقير الطبيعية المهمة. إلى جانب استخدامها في مستحضرات التجميل، فإن الحناء لازالت تستخدم في الطب العربي التقليدي لعلاج مجموعة متنوعة من الأمراض كالتهاب المفاصل, و السكري, و القرحة, و الاسهال, و الصداع, و الحمى، و أمراض أخرى [9، 15], و في ليبيا تستخدم الحناء لعلاج الصداع, و قرحة المعدة, و الجروح, و أمراض جلدية مختلفة.

تتسم النباتات باحتوائها على مجموعة واسعة من المركبات الثانوية، مثل الفلافونويدات Flavonoids [16] و التانينات Tannins، و القلويدات Alkaloids, و التيربينويدات Terpenoids, و التي اظهرت تأثيرات مضادة للميكروبات [13]. اضافة إلى ذلك, فمن مكونات الحناء الأساسية هي 2-Hydroxynapthoquinone (Lawsone) و Mannite، و الهلام, و حمض الغالك Gallic acid, إلا أن المكون البارز و الذي يعزى اليه النشاط الحيوي هو (Lawsone), و الذي يشكل ما لا يزيد عن 1.5 % من مادة الحناء, و يمتلك سعة ترابطية عالية مع البروتينات [17].

أظهرت الدراسات الحديثة فعالية مكونات نبات الحناء الحيوية, بامتلاكها تأثيرات مضادة للبكتيريا [14، 18-22], و الفطريات [14، 23-25], و الطفيليات [26], و تأثيرات مضادة للسرطانات [28، 29], كما أن لها تأثيرات مسكنة للأعصاب, و مضادة للالتهاب [30], و خافضة للحرارة [31], و خافضة لسكر الدم [32], و مضادة للأكسدة, و منظمة للمناعة [33], و ملئمة للجروح [34، 35]. أما عن الآثار السمية التي يمكن أن تنشأ عن استهلاك مكونات الحناء,

فقد أشارت دراسات أجريت على جرذان المختبرات إلى أن الاستعمال الخارجي [36], و الداخلي [37، 38] لها آمنا و لا اشكال فيه, إلا أن تلقي جرعات كبيرة, قدرت بحوالي 1000 ملجم/ كجم من البذور [39] أو الأوراق [40] لمدة شهر تقريبا, أدت إلى ظهور علامات التسمم.

لاختبار فعالية الحناء الحيوية, فقد اختبرت مكوناتها في هيئات متعددة, كمسحوق جاف [19], أو استخلصت مكوناتها الكيميائية, باستخدام مذيبات مختلفة, كالميثانول [41، 42], و الكلوروفورم [41، 42], و الهيكسين [17، 43], و الإيثايل إسيتيت [18], و الإيثانول [19، 44], و الاسيتون [37], و الماء [41، 42], و إثير البترول [45], و داي ميثايل سلفوكسيد [46]. هذه دراسة أولية, تهدف إلى اختبار تأثير أوراق الحناء, المضاد للبكتيريا, في هيئة طحين جاف, و منقوع, كما لو كانت تستخدم في الطب التقليدي, دون اللجوء إلى طرق الاستخلاص الاخرى المكلفة و المستهلكة للوقت.

المواد و طرق العمل

استخدمت في هذه الدراسة طريقة انتشار القرص لاختبار مستخلص أوراق الحناء المائي, و طريقة انتشار حفرة الآجار لاختبار طحين الأوراق [47], لاختبار تأثير أوراق الحناء المضاد للبكتيريا. استخدم أجار مولر هنتون (OXOID) كوسط مناسب لاختبار فعالية الحناء في كلتا الطريقتين.

استخدمت أوراق الحناء المتوفر تجاريا في هيئتها الكاملة و مطحونة, كما استخدمت أوراق خضراء طازجة بعد تجفيفها في الظل. حُضّرت مستخلصات أوراق الحناء, بتركيز 10%, بنقعها في ماء مقطر, و اختبرت فعاليتها خلال ساعة من نقعها, ثم تركت, و اختبرت مرة اخرى بعد اسبوع. باعتبار أن قرص ورق الترشيح (قطر 6 ملم, (Whatman, No. 1)) يستوعب تقريبا 100 ميكرولتر من المستخلص, فإن كمية مادة الحناء في القرص لا تتعدى 10 ملجم. أما الطحين الجاف للأوراق, فقد استخدم بأوزان 5 و 10 و 15 ملجم/حفرة.

تم الحصول على السلالات البكتيرية الممرضة, *ستافيلوكوكس اوريس* و *ستافيلوكوكس ابيديرميدس* و بروتيوس و *سودوموناس ايروجينوزا* و *الاشريشيا كولاي*, و المعزولة من حالات سريرية, من مختبر مصراته المركزي. أعيد زرع البكتيريا على الاوساط الخاصة بها لغرض تنشيطها و اعادة تعريفها, ثم حضرت معلقات بكتيرية, في محلول ملحي منظم, مطابقة لمعيار ماكفرلاند 0.5 , من المستعمرات النامية. بملء ماسحة قطنية, وزع كل معلق بكتيري على طبق أجار مولر هنتون الخاص به, ثم جعلت حفر دائرية,

بقطر 6 ملم تقريبا, بمسافات منتظمة على طبق الاجار, و وضع فيها كميات محددة من مسحوق أوراق الحناء. مقابل ذلك, ففي طريقة انتشار القرص, وضعت أقراص ورق الترشيح, المشبعة بمستخلص الحناء المائي على سطح الاجار, بعد توزيع المعلقات البكتيرية. وضعت الاطباق المزروعة في حاضنة المعمل عند 37°م إلى اليوم التالي, ثم فحصت, و دونت أقطار مناطق التثبيط. أنجزت كل هذه الاجراءات في جو خال من التلوث.

النتائج و المناقشة

بالنظر إلى النتائج الناجحة, و الباهرة للتداوي بأوراق نبات الحناء من الجروح البالغة, و الاخماج الجلدية, لا سيما في علاج الحيوانات, و كذلك إلى سرعة التئام الجروح, و شفاءها في فترات أقصر مما لو استخدمت فيه المطهرات التجارية الاخرى, كاليود و الكحول و فوق اكسيد الهيدروجين و صبغة الجنشيان البنفسجي (بيانات غير منشورة). لذلك فقد أُجريت الدراسة الحالية للتحقق من تأثير أوراق الحناء, في هيئة طحين جاف, و مستخلص مائي, كما لو كانت تستخدم في الطب البديل.

تحتوي أوراق الحناء الجافة على تركيز أعلى من المواد الفعالة, عنها في الاوراق الغضة [48], لهذا استخدمت الأوراق الجافة في الدراسة الحالية, على هيئة طحين جاف, كما استخدمت لإعداد مستخلص مائي للمواد الفعالة, لاختبار تأثيرها المضاد على البكتيريا.

كشفت نتائج الدراسة أن طحين أوراق الحناء الجافة أظهر نشاطا مضادا لكل السلالات البكتيرية المختبرة, عند وزن 15 ملجم من المادة الخام, مع وجود تباين بسيط في قوة التأثير بين السلالات (جدول 1). أظهرت الدراسة أيضا أن البكتيريا *ستافيلوكوكس اوريس* أكثر حساسية لتأثير المواد الفعالة بأوراق الحناء من البكتيريا سالبة جرام, حيث وجد أن 5 ملجم من طحين الأوراق أحدث تثبيطا بقطر 10ملم (جدول 2). إلا أن نفس الكمية لم تؤدي إلى أي مفعول ضد البكتيريا سالبة جرام.

جدول 1. تأثير مسحوق أوراق الحناء (15 ملجم) على البكتيريا المشار إليها (الاقطار مقاسة بالملم)

البكتيريا المختبرة	قطر منطقة التثبيط
Staphylococcus aureus	15
Staphylococcus epidermidis	15
Escherichia coli	14
Proteus	16
Pseudomonas aeruginosa	14

جدول 2. تأثير مسحوق أوراق الحناء بكميات مختلفة على *ستافيلوكوكس اوريس* (الاقطار مقاسة بالملم و الكميات بالملجم)

الكمية	قطر منطقة التثبيط
5	10
10	15

في دراسة مشابهة حول اختبار فعالية أوراق الحناء, و بذورها, تبين أن المسحوق الجاف للأوراق كان له التأثير الافضل في القضاء على البكتيريا من بين المستخلصات الاخرى المستخدمة [19]. كما أشارت هذه الدراسة, و غيرها إلى التأثير الفعال لأوراق نبات الحناء ضد البكتيريا موجبة, و سالبة جرام [14، 17، 19، 20، 49، 50].

أما مستخلص أوراق الحناء, و الذي حُضّر بتركيز 10% (100ملجم/ مل), فلم يظهر أي تأثير ضد أي سلالة من البكتيريا عند اختباره خلال ساعة من نقع مسحوق الأوراق بالماء, بينما كان تأثيره فعالا فقط ضد *ستافيلوكوكس اوريس* و *ستافيلوكوكس ابيديرميدس*, بعد بضعة أيام من اعداد منقوع الأوراق, حيث كان قطر التثبيط 15 ملم. هذا يدل على عدم كفاية الوقت المتاح لذوبان المواد الفعالة في الماء في الاختبار الاول, و عند ترك منقوع أوراق الحناء لأسبوع, كان ذلك كافيا لذوبان تلك المواد, و تثبيطها للبكتيريا المشار إليها. باعتبار أن قرص ورقة الترشيح يسع 100 ميكرولتر من المستخلص

المائي, فإن كمية المادة الفعالة به كانت محدودة, أي لم تتعدى 10 ملجم, و هذا ما جعل تأثيره محدودا على البكتيريا موجبة جرام (الأكثر حساسية), دون سالبة جرام.

في هذا الصدد, وجدت دراسة أن منقوع أوراق الحناء في الماء, ليوم و ليلة, كان فعالا و الافضل من بين باقي المستخلصات, ضد سلالات بكتيرية مختلفة, بما في ذلك سالبة الجرام [42], و هذا أثبت كفاية الوقت المتاح لذوبان المواد الفعالة, أما تأثير المستخلص المائي على البكتيريا موجبة و سالبة جرام, فيعود ذلك إلى وضع كميات كبيرة نسبيا (75 ملجم) من المستخلص المائي في حفر الاجار, مقارنة بالكمية المستخدمة في الدراسة الحالية (10 ملجم). كما ذكرت دراستين اخريين أن الاقراص المحتوية على 20 ملجم, 25 ملجم من مستخلص أوراق الحناء المائي نشأ عنها تثبيط نمو *ستافيلوكوكس اوريس* بقطر 9 ملم [37], و 11 [51] ملم على التوالي.

ذكر سوكانيا و من معه في دراسة قاموا بها, بأن الاقراص المحتوية على 25 ملجم من المستخلص المائي لأوراق الحناء كان تأثيره ضعيفا جدا و محدودا على *ستافيلوكوكس اوريس*, دون غيرها من البكتيريا المختبرة [52]. قد يرجع ذلك إلى خلل في طريقة الاستخلاص التي أجريت, و عدم اكتمال ذوبان المواد الفعالة بالماء.

اختلفت نتائج تأثيرات الحناء الحيوية في القضاء على البكتيريا باختلاف الدراسة, فكشفت إحدى الدراسات أن استخدام المسحوق الجاف لأوراق الحناء كان الأكثر كفاءة في ابادة البكتيريا [19], و هكذا فضلت دراسات اخرى استخدام مستخلص الميثانول [17، 44، 53، 54] من بين باقي المستخلصات, أو مستخلص الإيثانول [44، 49، 55-58], أو مستخلص الماء [41، 42، 45، 59], أو إثير البترول [45], أو الإيثايل إسيتيت [18، 49], أو الكلوروفورم [57], او الاسيتون [60]. يرجح اختلاف نتائج هذه الدراسات إلى اختلاف خطوات طرق استخلاص المواد الفعالة, و عدم توحيد معاييرها, أو اختلاف اجراءات اختبار حساسية البكتيريا لتلك المستخلصات.

خلصت هذه الدراسة إلى أن أوراق نبات الحناء لها تأثيرا مضادا للبكتيريا, موجبة, و سالبة جرام, سواءً كان في صورة طحين جاف, أو مستخلص مائي, إلا أنها أبدت أكثر فعالية ضد البكتيريا الموجبة. هناك حاجة إلى دراسة معمقة لعزل المواد الفعالة و توصيفها و تحديد آلية عملها.

1. Smith, P., M.P. Hiney, and O.B. Samuelsen, Bacterial resistance to antimicrobial agents used in fish farming: A critical evaluation of method and meaning. *Annual Review of Fish Diseases*, 1994. **4**: p. 273-313.

2. Ventola, C.L., The antibiotic resistance crisis: Part 1: Causes and threats. *Pharmacy and Therapeutics*, 2015. **40**(4): p. 277-283.

3. Schindler, B.D. and G.W. Kaatz, Multidrug efflux pumps of gram-positive bacteria. *Drug Resistance Updates*, 2016. **27**: p. 1-13.

4. Guzmán-Blanco, M., J.M. Casellas, and H. Silva Sader, Bacterial resistance to antimicrobial agents in latin america: The giant is awakening. *Infectious Disease Clinics of North America*, 2000. **14**(1): p. 67-81.

5. Cantón, R., J.P. Horcajada, A. Oliver, P.R. Garbajosa, and J. Vila, Inappropriate use of antibiotics in hospitals: The complex relationship between antibiotic use and antimicrobial resistance. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, 2013. **31**(4): p. 3-11.

6. Khachatourians, G.G., Agricultural use of antibiotics and the evolution and transfer of antibiotic-resistant bacteria. *Canadian Medical Association Journal*, 1998. **159**(9): p. 1129-1136.

7. Angulo, F.J., N.L. Baker, S.J. Olsen, A. Anderson, and T.J. Barrett, Antimicrobial use in agriculture: Controlling the transfer of antimicrobial resistance to humans. *Semin Pediatr Infect Dis*, 2004. **15**(2): p. 78-85.

8. Madhava Chetty, K., K. Sivaji, and K. Tulasi Rao, Flowering plants of chittoor district. *Andhra Pradesh, India*, 2013. **3**: p. 850.

9. Chaudhary, G., S. Goyal, and P. Poonia, *Lawsonia inermis* linnaeus: A phytopharmacological review. *International Journal of Pharmaceutical Sciences and Drug Research*, 2010. **2**(2): p. 91-98.

10. Cragg, G.M., D.J. Newman, and K.M. Snader, Natural products in drug discovery and development. *Journal of Natural Products*, 1997. **60**(1): p. 52-60.

11. Bauer, A. and M. Bronstrup, Industrial natural product chemistry for drug discovery and development. *Natural Product Reports*, 2014. **31**(1): p. 35-60.

12. Fabricant, D.S. and N.R. Farnsworth, The value of plants used in traditional medicine for drug discovery. *Environmental Health Perspectives*, 2001. **109**(Suppl 1): p. 69-75.

13. Cowan, M.M., Plant products as antimicrobial agents. *Clinical Microbiology Reviews*, 1999. **12**(4): p. 564-582.

14. Rizvi, Z., F. , R .Mukhtar, M. Chaudhary, F., and M. Zia, Antibacterial and antifungal activities of *Lawsonia inermis*, *Lantana camara* and *Swertia angustifolia. Pak. J. Bot.*, 2013. **45**(1): p. 275-278.

15. Lekouch, N., A. Sedki, A. Nejmeddine, and S. Gamon, Lead and traditional moroccan pharmacopoeia. *Science of The Total Environment*, 2001. **280**(1–3): p. 39-43.

16. Tsuchiya, H., et al., Comparative study on the antibacterial activity of phytochemical flavanones against

methicillin-resistant staphylococcus aureus. *J Ethnopharmacol*, 1996. **50**(1): p. 27-34.

17. Mastanaiah, J., N.B. Prabhavathi, and B. Varaprasad, Invitro antibacterial activity of leaf extracts of *lawsonia inermis*. *International Journal of PharmTech Research*, 2011. **3**(2): p. 1045-1049.

18. Ali, N.A.A., W.D. Jülich ،C. Kusnick, and U. Lindequist, Screening of yemeni medicinal plants for antibacterial and cytotoxic activities. *Journal of Ethnopharmacology*, 2001. **74**(2): p. 173-179.

19. Habbal, O.A., A.A. Al-Jabri, A.H. El-Hag, Z.H. Al-Mahrooqi, and N.A. Al-Hashmi, In–vitro antimicrobial activity of *Lawsonia inermis* linn (henna). A pilot study on the omani henna. *Saudi Med J*, 2005. **26**(1): p. 69-72.

20. Raja, W., M. Ovais, and A. Dubey, Phytochemical screening and antibacterial activity of *Lawsonia inermis* leaf extract .*International Journal of Microbiological Research*, 2013. **4**(1): p. 33-36.

21. Rahmoun, N.M., Z. Boucherit-Atmani, M. Benabdallah, K. Boucherit, D. Villemin, and N. Choukchou-Braham, Antimicrobial activities of the henna extract and some synthetic naphthoquinones derivatives. *American Journal of Medical and Biological Research*, 2013. **1**(1): p. 16-22.

22. Habbal, O., et al., Antibacterial activity of *Lawsonia inermis* linn (henna) against *Pseudomonas aeruginosa*. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine* :(3)1 .2011 ،p. 173-176.

23. Singh, V.K. and D.K. Pandey, Fungitoxic studies on bark extract of *Lawsonia inermis* against ringworm fungi. *Hindustan Antibiot Bull*, 1989. **31**(1-2): p. 32-5.

24. Tripathi, R.D., H.S. Srivastava, and S.N. Dixit, A fungitoxic principle from the leaves of *Lawsonia inermis* lam. *Experientia*, 1978. **34**(1): p. 51-2.

25. Rahmoun, N., Z. Boucherit-Otmani, K. Boucherit, M. Benabdallah, and N. Choukchou-Braham, Antifungal activity of the algerian *Lawsonia inermis* (henna). *Pharm Biol*, 2013 . :(1)51p. 131-5.

26. Okpekon, T., et al., Antiparasitic activities of medicinal plants used in Ivory coast. *Journal of Ethnopharmacology*, 2004. **90**(1): p. 91-97.

27. El Babili, F., A. Valentin, and C. Chatelain, *Lawsonia inermis*: Its anatomy and its antimalarial, antioxidant and human breast cancer cells mcf7 activities. *Pharmaceut Anal Acta*, 2013. **4**(1): p. 203-308.

28. Dasgupta, T., A.R. Rao, and P.K. Yadava, Modulatory effect of henna leaf (*Lawsonia inermis*) on drug metabolising phase i and phase ii enzymes, antioxidant enzymes, lipid peroxidation and chemically induced skin and forestomach papillomagenesis in mice. *Mol Cell Biochem*, 2003. **245**(1-2): p. 11-22.

29. Nesa, L., et al., Evaluation of analgesic, anti-inflammatory and cns depressant activities of methanolic extract of *Lawsonia inermis* barks in mice. *Avicenna Journal of Phytomedicine*, 201 :(4)4 .4p. 287-296.

30. Ali, B., H., A. Bashir, K., and M. Tanira, O., Antiinflammatory, antipyretic and analgesic effects of *Lawsonia inermis* l. (henna) in rats. *Pharmacol*, 1995. **51**: p. 356-363.

31. Syamsudin, I. and H. Winarno, The effect of inai (*Lawsonia inermis* linn) leaves extract on blood sugar level: An experimental study. *Research Journal of Pharmacology*, 2008. **2**(2): p. 20-23.

32. Mikhaeil, B.R., F.A. Badria, G.T. Maatooq, and M.M. Amer, Antioxidant and immunomodulatory constituents of henna leaves. *Z Naturforsch C*, 2004. **59**(7-8): p. 468-76.

33. Nayak, B.S., G. Isitor, E.M. Davis, and G.K. Pillai, The evidence based wound healing activity of *Lawsonia inermis* linn. *Phytother Res*, 2007. **21**(9): p. 827-31.

34. Muhammad, H., S. and S. Muhammad, The use of *Lawsonia inermis* linn. (henna) in the management of burn wound infections. *African Journal of Biotechnology*, 2005. **4**: p. 934-937.

35. Kirkland, D. and D. Marzin, An assessment of the genotoxicity of 2-hydroxy-1,4-naphthoquinone, the natural dye ingredient of henna. *Mutat Res*, 2003. **537**(2): p. 183-99.

36. Gull, I., M. Sohail, M.S. Aslam, and M.A. Athar, Phytochemical, toxicological and antimicrobial evaluation of *Lawsonia inermis* extracts against clinical isolates of pathogenic bacteria. *Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials*, 2013. **12**: p. 36-36.

37. Kaur, M., et al., Toxicity profile of ethanolic extract of *Lawsonia inermis* leaves in albino wistar rats. *World journal of*

pharmacy and pharmaceutical sciences, 2014. **3.**(5): p. 835-848.

38. Abdelgadir, E., H. , R. Ahmed, H., S. Adam, I., Y. , and A. Husein, M. , Evaluation of toxicological activity (acute and sub-chronic toxicities) of the aqueous extract of *Lawsonia inermis* seeds on wistar rats. *J. Pharmacol. Toxicol*, 2010. **5**(7): p. 324-333.

39. Alferah, M., A., Z. , Toxicity induced histological changes in selected organs of male (wistar) rats by *Lawsonia inermis* leaf extract. *European Journal of Medicinal Plants*, 2012. **2**(2): p. 151-158.

40. Sharma, K., K., R. Saikia, J. Kotoky, J. Kalita ،C., and R. Devi, Antifungal activity of *solanum melongena* l, *Lawsonia inermis* l. And *justicia gendarussa* b. Against dermatophytes. *International Journal of PharmTech Research*, 2011. **3**(3): p. 1635-1640.

41. Saadabi, A., Evaluation of *Lawsonia inermis* linn .)sudanese henna) leaf. Extracts as an antimicrobial agent. *Research Journal of Biological Sciences*, 2007. **2**(4): p. 419-423.

42. Natarajan V, Mahendraraja S, and Menon T, Antidermatophytic activities of *Lawsonia alba. Biomedicine* 2000. **20**(4): p. 243-245.

43. Parekh, J. and S. Chanda, In vitro screening of antibacterial activity of aqueous and alcoholic extracts of various indian plant species against selected pathogens from enterobacteriaceae. *African Journal of Microbiology Research*, 2007. **1**(6): p. 92-9.9

44. Sudharameshwari, K. and J. Radhika, Antibacterial screening of aegle marmelos, *Lawsonia inermis* and *Albizzia libbeck. African Journal of Traditional, Complementary, and Alternative Medicines*, 2007. **4**(2): p. 199-204.

45. Rahmoun, M.N., et al., Antimicrobial screening of the Algerian *Lawsonia inermis* (henna). *Der Pharma Chemica*, 2010. **2**(6): p. 320-326.

46. Balouiri, M., M. Sadiki, and S.K. Ibnsouda, Methods for in vitro evaluating antimicrobial activity: A review. *Journal of Pharmaceutical Analysis* :(2)6 .2016 ،p. 71-79.

47. Romero, C.D., S.F. Chopin, G. Buck, E. Martinez, M. Garcia, and L. Bixby, Antibacterial properties of common herbal remedies of the southwest. *J Ethnopharmacol*, 2005. **99**(2): p. 253-7.

48. Jeyaseelan, E.C., S. Jenothiny, M.K. Pathmanathan, and J.P. Jeyadevan, Antibacterial activity of sequentially extracted organic solvent extracts of fruits, flowers and leaves of *Lawsonia inermis* l. From jaffna. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, 2012. **2**(10): p. 798-802.

49. Jothiprakasam, V., S. Ramesh, and S.K. Rajasekharan, Preliminary phytochemical screening and antibacterial activity of *Lawsonia inermis* linn (henna) leaf extracts against reference bacterial strains and clinically important ampc βeta-lactamases producing proteus mirabilis. *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*, 2012. **5**(1): p. 219-222.

50. Elmanama, A.A., A.A. Alyazji, and N.A. Abu Gheneima, Antibacterial, antifungal and synergistic effect of *Lawsonia inermis*, punica granatum and hibiscus sabdariffa. *Annals of Alquds Medicine* 2011. **7**: p. 33-41.

51. Sukanya, S.L., J. Sudisha, P. Hariprasad, S.R. Niranjana, H.S. Prakash, and S.K. Fathima, Antimicrobial activity of leaf extracts of indian medicinal plants against clinical and phytopathogenic bacteria *African Journal of Biotechnology*, 2009. **8**(23): p. 6677-6682.

52. Rayavarapu, K., A., D. Kaladhar, and S. Kumar, S., Evaluation of antimicrobial activity of *Lawsonia inermis* (henna) on aquapathogens. *JPBMS*, 2011. **7**(2.(

53. Triveni, A.G., S.K. Mendem ،C.T. Shivannavar, and S.M. Gaddad, Antibacterial and anti-biofilm activities of crude extracts of *Lawsonia inermis* against methicillin resistant staphylococcus aureus. *Asian Journal of Pharmaceutical and Clinical Research*, 2016. **9**(6): p. 263-265.

54. Al–Rubiay, K.K., N.N. Jaber, B.H. Al-Mhaawe, and L.K. Alrubaiy, Antimicrobial efficacy of henna extracts. *Oman Medical Journal*, 2008. **23**(4): p. 253-256.

55. Nagarajan, M., S. Rajasekaran, and K. Ganesh, S. , Antibacterial activity of *Lawsonia inermis* l. *International Journal of Modern Biology and Medicine*, 2013. **4**(3): p. 169-175.

56. Musa, A., E. , et al., Evaluation of antimicrobial activity of *Lawsonia inermis* (henna) against microbial strains isolated from goat skin/leather. *JALCA*, 2011. **10**(6): p. 170-1.75

57. Dahake, P.R. and S.I. Kamble, Study on antimicrobial potential and preliminary phytochemical screening of lawsonia inermis linn. *IJPSR* 2015. **6**(8): p. 3344-50.

58. Merdaw, M., A. , Inhibition of bacterial growth by *Lawsonia inermis* (henna) leaf extracts in vitro. *Ibn Al-Haitham J. For Pure & Appl. Sci.*, 2009. **22**(4.(

59. Al-Daamy, A.A.K., A. Abdul Hassan, and A. Mahmood, Study of antibacterial activity of *Lawsonia inermis* leaf extract. *JOCMS*, 2016. **7**(2): p. 103-106.