

Antifungal Effect of Henna Methanolic Extract on *Candida Albicans* Strains Isolated from Patients with Oral Candidiasis

Niloufar Ariyana¹
Fatemeh Rashidi Meybodi²
Arezu Tahmourespour³
Peyman Biparva⁴

1. Graduated of Dentistry, School of Dentistry, Islamic Azad University, Isfahan (Khorasgan) Branch, Isfahan, Iran
2. **Corresponding Author:** Assistant Professor, Department of oral diseases, School of Dentistry, Isfahan (Khorasgan) Branch, Islamic Azad University, Isfahan, Iran.
Email: mahtab.rashidi.mr@gmail.com
3. Assistant Professor, Department of Microbiology, School of Dentistry, Isfahan (Khorasgan) Branch, Islamic Azad University, Isfahan, Iran.
4. Postgraduate Dentistry, Department of Prosthetic Dentistry, School of Dentistry, Isfahan (Khorasgan) Branch, Islamic Azad University, Isfahan, Iran.

Abstract

Introduction: Several antifungal drugs have been proposed for the treatment of oral candidiasis, each of which has advantages and side effects. The use of medicinal plants as an antifungal agent can be helpful due to the reduction of side effects caused by drugs. This study aimed to determine the antifungal effect of methanolic extract of henna on *Candida albicans* strains.

Materials & Methods: In this experimental laboratory study, one standard strain and five clinical strains of *Candida albicans* were isolated from five patients with oral candidiasis. This study was conducted in 2023 at Isfahan Islamic Azad University. Cultured candida cells were prepared, and standard fungal suspensions with a concentration of 0.5 McFarland were prepared and cultured on the surface of the sabouraud dextrose agar culture medium. To the wells, 100 microliters of the prepared extract with concentrations of 0.6, 1.25, 2.5, 5, and 10 mg/ml were added, and the plates were incubated. To the wells of the microplate, 100 microliters of henna extract dilutions were added. Then, the diameter of the microorganism Non-Growth halo and turbidity caused by growth was measured and compared. Data were analyzed with Mann-Whitney, Kruskal-Wallis, and ANOVA statistical tests ($\alpha = 0.05$).

Results: A Significant difference in the amount of turbidity caused by growth between different concentrations of extract, nystatin, and positive control in strains of *Candida albicans* was observed (p value < 0.05). There was a significant difference in growth inhibition percentage between different concentrations of extract, nystatin, and positive control in strains of *Candida albicans* (p value < 0.05).

Conclusion: The antifungal effect of henna extract in concentrations of 1.25, 2.5, 5, and 10 mg/ml was positive against *Candida albicans* isolated from patients.

Key words: Lawsonia plant; *Candida albicans*; Antifungal agents.

Received: 20.08.2024

Revised: 14.11.2024

Accepted: 24.12.2024

How to cite: Ariyana N, Rashidi Meybodi F, Tahmourespour A, Biparva P. Antifungal Effect of Henna Methanolic Extract on *Candida Albicans* Strains Isolated from Patients with Oral Candidiasis. J Isfahan Dent Sch 2025; 20(4): 300-10.

تأثیر ضدقارچی عصاره‌ی متانولی حنا بر سویه‌های کاندیدا آلبیکانس جدا شده از بیماران مبتلا به کاندیدیازیس دهان

نیلوفر آریانیا^۱ 

فاطمه رشیدی میبدی^۲

آرزو طهمورث پور^۳

پیمان بی پروا^۴

۱. دانش‌آموخته‌ی رشته‌ی دندان پزشکی، دانشکده‌ی دندان پزشکی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد اصفهان (خوراسگان)، اصفهان، ایران.
 ۲. نویسنده مسؤل: استادیار، گروه بیماری‌های دهان، دانشکده‌ی دندان پزشکی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد اصفهان (خوراسگان)، اصفهان، ایران.
 Email: mahtab.rashidi.mr@gmail.com
 ۳. دانشیار، گروه میکروبیولوژی، دانشکده‌ی دندان پزشکی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد اصفهان (خوراسگان)، اصفهان، ایران.
 ۴. دستیار تخصصی، گروه پروتزیهای دندانی، دانشکده‌ی دندان پزشکی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد اصفهان (خوراسگان)، اصفهان، ایران.

چکیده

مقدمه: داروهای ضد قارچ متعددی برای درمان کاندیدیازیس دهانی ارائه شده که هر کدام مزایا و عوارضی دارد. استفاده از گیاهان دارویی به عنوان عامل ضد قارچی، می‌تواند به دلیل کاهش عوارض ناشی از مصرف دارو کمک کننده باشد. هدف از مطالعه، بررسی تأثیر ضد قارچی عصاره‌ی متانولی حنا بر سویه‌های کاندیدا آلبیکانس بود.

مواد و روش‌ها: در این مطالعه‌ی تجربی - آزمایشگاهی، یک سویه استاندارد و ۵ سویه بالینی قارچ کاندیدا آلبیکانس، از ۵ بیمار مبتلا به بیماری کاندیدیازیس دهانی جدا شد. این مطالعه در سال ۱۴۰۲ در دانشگاه آزاد اسلامی واحد اصفهان (خوراسگان) انجام گرفت. سلول‌های کاندیدا کشت داده شد و سوسپانسیون‌های قارچی استاندارد و معادل با غلظت نیم مک‌فارلنز آماده و بر سطح محیط کشت سابارو دکستروز آگار کشت گردید. مقدار ۱۰۰ میکرولیتر از عصاره آماده شده با غلظت‌های ۰/۶، ۱/۲۵، ۲/۵، ۵، ۱۰ به چاهک اضافه و انکوبه شدند. میزان ۱۰۰ میکرولیتر از رقت‌هایی از عصاره‌ی حنا به چاهک‌های میکروپلیت اضافه شد و قطر هاله‌ی عدم رشد و کدورت ناشی از رشد اندازه‌گیری و مقایسه گردید. داده‌ها با آزمون‌های آماری Mann Whitney و Kruskal-Wallis و ANOVA آنالیز شدند ($\alpha = 0/05$).

یافته‌ها: در مقدار کدورت ناشی از رشد بین غلظت‌های مختلف عصاره‌ی حنا، نیستاتین و کنترل مثبت در سویه‌های کاندیدا آلبیکانس، تفاوت معنی‌دار وجود داشت ($p \text{ value} < 0/05$) در مقدار درصد مهار رشد بین غلظت‌های مختلف عصاره، نیستاتین و کنترل مثبت در سویه‌های کاندیدا آلبیکانس، تفاوت معنی‌دار وجود داشت ($p \text{ value} < 0/05$).

نتیجه‌گیری: تأثیر ضدقارچی عصاره‌ی حنا در غلظت‌های ۱/۲۵، ۲/۵ و ۵ بر علیه کاندیدا آلبیکانس جدا شده از بیماران مثبت بود.

کلید واژه‌ها: حنا؛ کاندیدا آلبیکانس؛ عوامل ضد قارچ.

تاریخ پذیرش: ۱۴۰۳/۱۰/۰۴

تاریخ اصلاح: ۱۴۰۳/۰۸/۲۴

تاریخ ارسال: ۱۴۰۳/۰۵/۳۰

استناد به مقاله: آریانیا نیلوفر، رشیدی میبدی فاطمه، طهمورث پور آرزو، بی پروا پیمان. تأثیر ضدقارچی عصاره‌ی متانولی حنا بر سویه‌های کاندیدا آلبیکانس جدا شده از بیماران مبتلا به کاندیدیازیس دهان. مجله دانشکده دندان پزشکی اصفهان. ۱۴۰۳؛ ۲۰: (۴) ۳۱۰-۳۰۰.

مقدمه

قارچ کاندیدا، یکی از میکروارگانیسم‌های فرصت طلب در حفره‌ی دهان بوده و از آن میان *کاندیدا آلبیکانس* به عنوان یک گونه‌ی شایع بیماری‌زا برای انسان مطرح است (۱، ۲). قارچ کاندیدا در دهان حدود ۲۵ الی ۶۵ درصد از افراد سالم یافت می‌شود. عوامل زمینه‌ساز کاندیدازیس دهانی شامل: تغییر فلور میکروبی، استفاده از آنتی‌بیوتیک‌های طیف گسترده، کورتیکواستروئیدها و سایر داروهای تضعیف‌کننده‌ی سیستم ایمنی، استفاده‌ی طولانی‌مدت از دهانشویه‌ها، دنجرها و دستگاه‌های ارتودنسی، مصرف سیگار، بهداشت ضعیف و بارداری هستند (۳). اقدام مناسب برای درمان کاندیدازیس، شناسایی عامل اتیولوژی، حذف عوامل مستعدکننده و استفاده از داروهای ضد قارچی در درمان می‌باشد.

داروهای ضد قارچ متعددی برای درمان کاندیدازیس دهانی ارائه شده است که هر کدام مزایا و عوارضی دارد. نیستاتین و آمفوتریسین B اولین گزینه‌ها برای درمان کاندیدازیس اولیه‌ی دهانی بوده و به خوبی تحمل می‌شوند. این داروها می‌توانند بر چسبندگی قارچ‌ها اثرگذار باشند (۴). گیاه درمانی، در بیماری‌ها و به ویژه بیماری‌های عفونی در سال‌های اخیر روند رو به افزایشی پیدا کرده است. بعضی از داروهای گیاهی خاصیت ضد باکتریال، ضد ویروس و ضد قارچی دارند و می‌توان در گیاهانی مانند سیر، چای سبز، زنجبیل و غیره این خاصیت‌های ضد قارچی و ویروسی را پیدا کرد (۵).

میکروبیولوژیست‌های بالینی تمایل زیادی به استفاده از این داروها جهت درمان عفونت‌ها دارند، زیرا عوارض این داروها در مقایسه با داروهای شیمیایی به طور قابل ملاحظه‌ای پایین است.

گیاه حنا با نام علمی *Lawsonia inermis* از خانواده‌ی حنا به صورت درختچه‌ای به طول ۶-۷ متر در نواحی گرمسیری آفریقا، مراکش، مصر، تونس و الجزایر و در آسیا هند، ایران و غیره می‌روید (۶). در پزشکی سنتی

گیاه حنا برای ضخیم کردن پوست کف دست و پا و رفع زخم‌های لای انگشتان پا زیر سینه و کشاله‌ی ران اثر قاطع دارد. برای درمان جذام، بهبود سوختگی‌ها، رفع جوش‌های دهان، رویاندن موی سر، درمان اکزما، خارش پوست و رفع بیدزدگی پوشاک نیز از حنا استفاده می‌شده است. همچنین بررسی‌ها نشان داده که حنا، اثر ضد باکتریایی قوی ضد قارچی و ضد تومور آنتی‌کارسینوسارک و ضد اسپاسم دارد (۷).

بسیاری از مطالعات انجام شده بر روی اسانس‌ها و داروهای گیاهی ثابت کرده‌اند که بسیاری از داروهای گیاهی خواص آنتی‌بیوتیکی بسیار مهمی از خود نشان داده‌اند (۸-۱۰). ولی در اثر ضد قارچی این داروها نتایج ضد و نقیضی وجود دارد (۱۱، ۱۲).

امیرخان و همکاران، در مقایسه‌ی اثر ضد قارچی و ضد باکتریایی میخک بر روی کلونی‌های *کاندیدا آلبیکانس* و *استرپتوکوکوس موتانس* به این نتیجه رسیدند که عصاره‌ی میخک اثر ضد باکتری بر علیه *استرپتوکوکوس موتانس* داشته و فاقد اثر ضد قارچی بر علیه *کاندیدا آلبیکانس* می‌باشد (۱۳).

دیزجیان فرد و همکاران، در بررسی اثر ضد قارچی عصاره‌ی اتانولی سیاه دانه و نیستاتین بر روی *کاندیدا آلبیکانس* به این نتیجه رسیدند که عصاره‌ی اتانولی سیاه دانه اثر مهاری مثبت بر روی قارچ *کاندیدا آلبیکانس* از خود نشان داد، ولی میزان تأثیر آن کمتر از نیستاتین است (۱۴).

Yaralizadeh و همکاران، در مقایسه‌ی اثرات *Lawsonia inermis* (حنای ایرانی) و کلوتریمازول بر *کاندیدا آلبیکانس* در موش صحرایی به این نتیجه دست یافتند که *L. inermis* (حنا) به شکل کرم واژینال می‌تواند عفونت *C. albicans* را در موش‌های ماده درمان کند (۱۵). بنابراین هدف از مطالعه‌ی حاضر، تأثیر ضد قارچی عصاره‌ی متانولی حنا بر سویه‌های *کاندیدا آلبیکانس* بود و بر اساس فرضیه‌ی صفر عصاره متانولی حنا بر سویه‌های *کاندیدا آلبیکانس* تأثیری ندارد.

مواد و روش‌ها

در این مطالعه‌ی تجربی - آزمایشگاهی، یک سویه‌ی استاندارد و ۵ سویه‌ی بالینی قارچ *کاندیدا آلبیکانس* از ۵ بیمار مبتلا به بیماری کاندیدایازیس دهانی به روش نمونه‌گیری آسان جدا شد. این سویه‌ها شامل سویه‌های C1، C2، C3، C7، C8 و CS بودند که با استفاده از عصاره‌ی متانولی حنا در غلظت‌های ۰/۳۱۲، ۰/۶۲۵، ۱/۲۵، ۲/۵، ۵ و ۱۰ mg/ml مورد تحلیل و بررسی قرار گرفت. این مطالعه در سال ۱۴۰۲ در دانشگاه آزاد اسلامی واحد اصفهان انجام شد.

بیماران مبتلا به ابتلا به هرگونه بیماری سیستمیک، سابقه‌ی بیماری التهابی مزمن، سابقه‌ی رادیوتراپی و شیمی‌درمانی، وجود علائم کاندیدای دهانی، استفاده از داروهای خوراکی، استفاده از دهانشویه‌ی آنتی‌باکتریال و فلوریده از مطالعه خارج شدند.

جهت تهیه‌ی عصاره‌ی حنا برگ

جهت تهیه‌ی عصاره‌ی حنا، برگ تازه گیاه حنا به پودر تبدیل شد و در محلول متانول خیسانده و غلیظ شدند. سلول‌های *کاندیدا آلبیکانس* در محیط کشت، کشت داده شدند و سوسپانسیون‌های قارچی استاندارد و معادل با غلظت نیم مک‌فارلنز آماده و بر سطح محیط کشت سابارود کستروز آگار به روش توپر کشت گردید. پس از جذب سوسپانسیون قارچی مقدار ۱۰۰ میکرولیتر از عصاره‌ی با غلظت ۱۰/۶، ۱/۲۵، ۲/۵، ۵، ۱۰ به چاهک پلیت اضافه گردید. گروه‌های شاهد هم شامل سوسپانسیون نیستاتین ۱۰۰۰۰۰ واحد بر میلی‌لیتر و کنترل منفی شامل سرم فیزیولوژی یا محلول نمکی بافر فسفات بود. پلیت‌ها به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه انکوبه شدند (پارس آزما، تهران، ایران).

در بررسی میزان تأثیر هر غلظت مورد استفاده بر سویه‌های کاندیدا و تعیین میزان رشد و عدم رشد همچنین تعیین MIC (Minimum Inhibitory Concentration) و MFC (Minimum fungicidal concentration) از روش میکرو دایلوژن پروتکل CLSI M27 استفاده شد. در این روش از محیط کشت سابارود کستروز براث، عصاره‌ی تهیه

شده، میکروتیتر پلیت و سوسپانسیون‌های مخمری استفاده شد. در علم میکروبیولوژی، غلظت مهارکنندگی حداقل که تحت عنوان تست MIC شناخته می‌شود، کمترین غلظت یک آنتی‌باکتری (مانند یک ضدقارچ، آنتی‌بیوتیک) می‌باشد که رشد قابل مشاهده یک میکروارگانیسم را بعد از یک شبانه روز انکوباسیون، مهار می‌کند. بعد از جداسازی کشت خالص، MIC را می‌توان روی محیط‌های کشت جامد یا آگار و یا محیط‌های کشت مایع رقیق شده، تشخیص داد.

سوسپانسیون استاندارد قارچی معادل نیم مک‌فارلند تهیه و ۱۰۰ میکرولیتر از آن به هر چاهک اضافه شد. سپس در دمای ۳۵ درجه به مدت ۱۸-۲۴ ساعت انکوبه شد و پس از آن میزان جذب نوری توسط دستگاه الیزا ریدر (ELISYS UNO, Germany) در طول موج ۵۳۰ نانومتر بررسی گردید. برای هر سویه مخمر تعداد ۱۲ چاهک در نظر گرفته شد. همچنین ستون شاهد (کنترل مثبت) حاوی تنها مخمر مورد نظر بدون افزودن عصاره‌ی حنا بود. رقت‌هایی از نیستاتین (سیگما، ایران) در سه دوز ۱۲۸، ۶۴، ۳۲ میکروگرم نیز به عنوان کنترل تأثیر مثبت و جهت تعیین MIC استفاده گردید. یک ستون نیز حاوی محیط کشت و رقت‌های عصاره بدون مخمر به عنوان کنترل منفی استفاده شد. پس از جمع‌آوری اطلاعات، نرمالیتی داده‌ها از طریق Shapiro-Wilk بررسی شد و داده‌ها با آزمون‌های Mann-Whitney، Kruskal-Wallis و One-way analysis of (ANOVA) variance در نسخه‌ی ۲۶ نرم‌افزار SPSS (version 26, IBM Corporation, Armonk, NY) تجزیه و تحلیل شدند و سطح خطا پنج درصد در نظر گرفته شد.

یافته‌ها

بر اساس آزمون Kruskal-Wallis، مقادیر کدورت ناشی از رشد بین غلظت‌های مختلف عصاره‌ی حنا، نیستاتین و کنترل مثبت در سویه‌های C1 (p value = ۰/۰۰۳)، C2 (p value = ۰/۰۰۲)، C3 (p value = ۰/۰۰۳) و C7

استفاده از غلظت‌های مختلف عصاره‌ی متانولی حنا، بر مجموع سویه‌های جدا شده از کاندیدا آلبیکانس در بیماران مبتلا به کاندیدیازیس دهان بر اساس نتیجه‌ی آزمون ANOVA، اختلاف معنی‌داری در میانگین مقدار کدورت ناشی از رشد ($p \text{ value} < 0/001$) و درصد مهار رشد ($p \text{ value} < 0/001$) بین غلظت‌های مختلف عصاره، نیستاتین و کنترل مثبت وجود داشت (جدول ۳).

در مقایسه‌ی دوتایی، مقدار کدورت ناشی از رشد در کنترل مثبت بطور معنی‌داری بیشتر از غلظت‌های ۳۱۲/۰ تا ۱۰ mg/ml عصاره و همچنین نیستاتین بود ($p < 0/05$). مقدار کدورت ناشی از رشد در نیستاتین بطور معنی‌داری کمتر از مقدار آن در غلظت‌های ۰/۳۱۲ تا ۱۰ mg/ml عصاره بود ($p \text{ value} < 0/05$). در غلظت‌های مختلف عصاره، بین دو غلظت ۵ و ۱۰ mg/ml و همچنین بین دو غلظت ۰/۳۱۲ و ۰/۶۲۵ mg/ml اختلاف معنی‌دار وجود نداشت ($p \text{ value} < 0/05$). ولی در سایر مقایسه‌های دوتایی بین غلظت‌ها، مقدار کدورت ناشی از رشد در غلظت بالاتر بطور معنی‌داری کمتر بود ($p \text{ value} < 0/05$).

مقدار درصد مهار رشد در نیستاتین بطور معنی‌داری بیشتر از غلظت‌های ۰/۳۱۲ تا ۱۰ mg/ml عصاره بوده است ($p \text{ value} < 0/05$). در غلظت‌های مختلف عصاره، بین دو غلظت ۵ و ۱۰ mg/ml و همچنین بین دو غلظت ۰/۳۱۲ و ۰/۶۲۵ mg/ml اختلاف معنی‌دار وجود نداشت ($p > 0/05$). ولی در سایر مقایسه‌های دوتایی بین غلظت‌ها، مقدار درصد مهار رشد در غلظت بالاتر بطور معنی‌داری بیشتر بود ($p \text{ value} < 0/05$) (نمودار ۱ و ۲).

البته لازم به ذکر است که در بعضی سویه‌ها تفاوت‌های جزئی مشاهده شد. بطور مثال در سویه c3 مقدار OD در غلظت ۱۰ mg/ml عصاره‌ی متانولی بطور معنی‌داری کمتر از غلظت ۰/۳۱۲ mg/ml بود و یا در سویه C8 درصد مهار رشد در غلظت ۵ mg/ml بطور معنی‌داری بیشتر از غلظت ۰/۳۱۲ mg/ml عصاره‌ی متانولی بود.

($p \text{ value} = 0/003$)، C8 ($p \text{ value} = 0/003$) و CS ($p \text{ value} = 0/002$) کاندیدا آلبیکانس، تفاوت معنی‌دار داشت (جدول ۱).

بر اساس آزمون Kruskal-Wallis، در بررسی مقادیر کدورت ناشی از رشد بین سویه‌های مختلف عصاره‌ی متانولی حنا در هر یک از غلظت‌های مختلف عصاره‌ی حنا، نتایج نشان داد در غلظت‌های ۱۰ mg/ml ($p = 0/043$)، ۵ mg/ml ($p \text{ value} = 0/042$)، ۲۵/۱ mg/ml ($p \text{ value} = 0/033$)، ۰/۶۲۵ mg/ml ($p \text{ value} = 0/031$) و ۰/۳۱۲ mg/ml ($p \text{ value} = 0/015$) تفاوت معنی‌داری وجود داشت. ولی در غلظت ۵/۲ mg/ml ($p \text{ value} = 0/121$)، مقدار کدورت ناشی از رشد بین سویه‌های مختلف کاندیدا آلبیکانس اختلاف معنی‌دار نداشت.

بر اساس آزمون Kruskal-Wallis، مقادیر درصد مهار رشد بین غلظت‌های مختلف عصاره‌ی حنا، نیستاتین و کنترل مثبت در هر سویه، بین غلظت‌های مختلف عصاره، نیستاتین و کنترل مثبت در سویه‌های C1 ($p \text{ value} = 0/005$)، C2 ($p \text{ value} = 0/003$)، C3 ($p \text{ value} = 0/005$)، C7 ($p \text{ value} = 0/005$)، CS ($p \text{ value} = 0/004$) و C8 ($p \text{ value} = 0/005$) تفاوت معنی‌دار مشاهده شد (جدول ۲).

در مقایسه‌ی مقادیر درصد مهار رشد بین سویه‌های مختلف عصاره‌ی متانولی حنا در هر یک از غلظت‌های عصاره‌ی حنا، در غلظت‌های ۱۰ mg/ml ($p \text{ value} = 0/031$)، ۵ mg/ml ($p \text{ value} = 0/018$) و ۳۱۲/۰ mg/ml ($p \text{ value} = 0/010$) اختلاف معنی‌داری در مقدار درصد مهار رشد بین سویه‌های مختلف کاندیدا آلبیکانس مشاهده شد. ولی در غلظت‌های ۲/۵ mg/ml ($p \text{ value} = 0/051$)، ۲۵/۱ mg/ml ($p \text{ value} = 0/060$)، ۰/۶۲۵ mg/ml ($p \text{ value} = 0/062$) تفاوت معنی‌داری در درصد مهار رشد عصاره بین سویه‌های مختلف کاندیدا آلبیکانس وجود نداشت.

در بررسی کدورت ناشی از رشد و درصد مهار رشد در

جدول ۱. مقادیر کدورت ناشی از رشد (OD) در استفاده از عصاره‌ی متانولی حنا بر سویه‌های جدا شده‌ی کاندیدا آلبیکنس

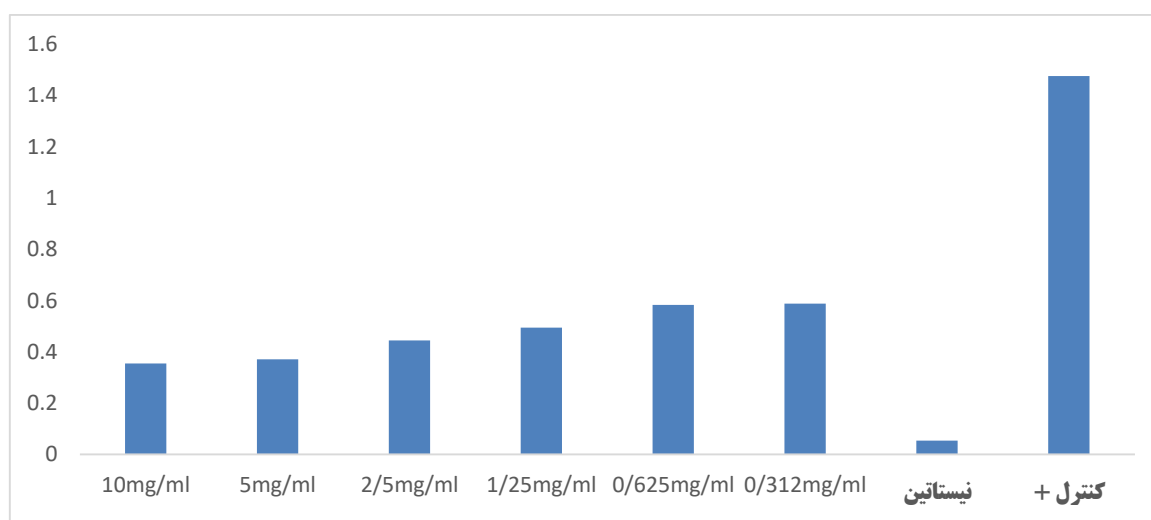
غلظت (mg/ml)	C1	C2	C3	C7	C8	CS	P value
میانگین $\pm$ انحراف معیار	میانگین $\pm$ انحراف معیار	میانگین $\pm$ انحراف معیار	میانگین $\pm$ انحراف معیار	میانگین $\pm$ انحراف معیار	میانگین $\pm$ انحراف معیار	میانگین $\pm$ انحراف معیار	
۱۰	۰/۳۶۳ $\pm$ ۰/۰۶۳	۰/۳۷۹ $\pm$ ۰/۰۲۹	۰/۲۵۳ $\pm$ ۰/۰۱۴	۰/۴۰۷ $\pm$ ۰/۰۰۶	۰/۴۰۴ $\pm$ ۰/۰۱۹	۰/۳۲۵ $\pm$ ۰/۰۱۳	۰/۰۴۳
۵	۰/۳۶۱ $\pm$ ۰/۰۰۷	۰/۳۷۹ $\pm$ ۰/۰۳۵	۰/۳۴۴ $\pm$ ۰/۰۰۶	۰/۴۳۰ $\pm$ ۰/۰۲۸	۰/۳۷۸ $\pm$ ۰/۰۲۶	۰/۳۳۲ $\pm$ ۰/۰۲۷	۰/۰۴۲
۲/۵	۰/۴۱۱ $\pm$ ۰/۰۴۲	±۴۴۳/۰ ۰/۰۳۵	۰/۴۳۷ $\pm$ ۰/۰۱۰	۰/۵۱۴ $\pm$ ۰/۰۰۶	۰/۴۴۷ $\pm$ ۰/۰۲۰	۰/۴۱۲ $\pm$ ۰/۰۴۰	۰/۱۲۱
۱/۲۵	۰/۴۷۸ $\pm$ ۰/۰۲۹	۰/۴۴۳ $\pm$ ۰/۰۱۱	۰/۴۷۳ $\pm$ ۰/۰۰۴	۰/۵۷۳ $\pm$ ۰/۰۰۳	۰/۵۲۲ $\pm$ ۰/۰۱۸	۰/۴۷۳ $\pm$ ۰/۰۵۱	۰/۰۳۳
۰/۶۲۵	۰/۵۸۴ $\pm$ ۰/۰۳۴	۰/۵۴۶ $\pm$ ۰/۰۱۰	۰/۵۸۱ $\pm$ ۰/۰۰۱	۰/۶۱۳ $\pm$ ۰/۰۶۹	۰/۶۴۸ $\pm$ ۰/۰۱۴	۰/۵۲۸ $\pm$ ۰/۰۱۰	۰/۰۳۱
۰/۳۱۲	۰/۵۹۹ $\pm$ ۰/۰۰۶	۰/۵۴۸ $\pm$ ۰/۰۱۰	۰/۵۹۴ $\pm$ ۰/۰۰۶	۰/۶۰۴ $\pm$ ۰/۰۵۲	۰/۶۵۸ $\pm$ ۰/۰۱۱	۰/۵۲۳ $\pm$ ۰/۰۰۱	۰/۰۱۵
نیستاتین	۰/۰۵۴ $\pm$ ۰/۰۱۱	۰/۰۴۶ $\pm$ ۰/۰۱۶	۰/۰۳۹ $\pm$ ۰/۰۳۴	۰/۰۶۹ $\pm$ ۰/۰۰۴	۰/۰۲۶ $\pm$ ۰/۰۰۸	۰/۰۸۸ $\pm$ ۰/۰۱۰	-
کنترل مثبت	۰/۵۳۱ $\pm$ ۰/۰۰۵	۰/۴۱۷ $\pm$ ۰/۰۰۳	۱/۵۴۰ $\pm$ ۰/۰۰۲	۱/۴۵۳ $\pm$ ۰/۰۵۸	۱/۴۹۲ $\pm$ ۰/۰۰۴	۰/۴۲۴ $\pm$ ۰/۰۵۶	-

جدول ۲. درصد مهار رشد در استفاده از عصاره‌ی متانولی حنا بر سویه‌های جدا شده‌ی کاندیدا آلبیکنس

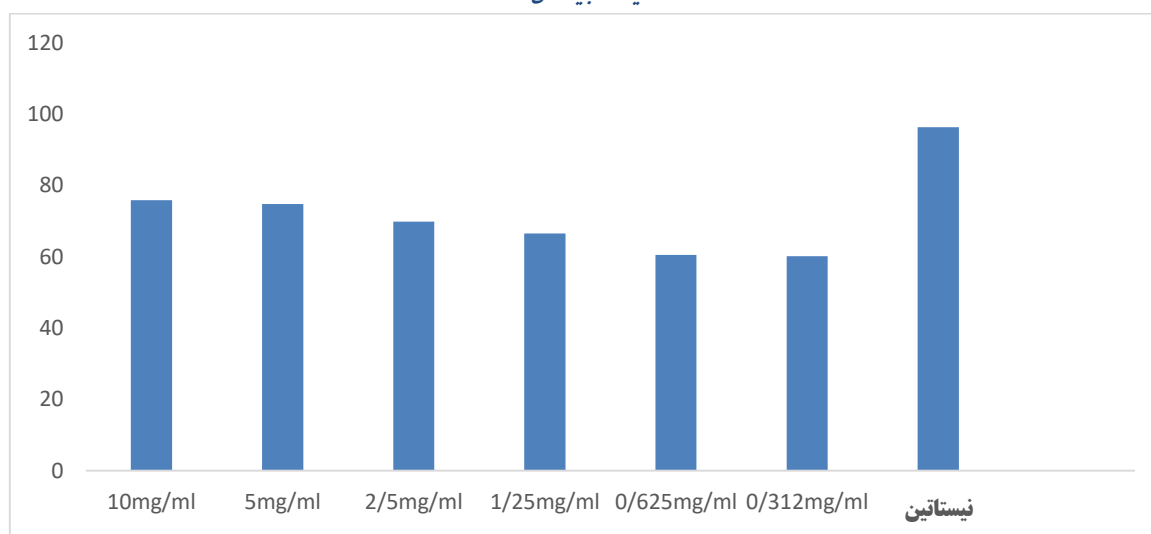
غلظت (mg/ml)	C1	C2	C3	C7	C8	CS	P value
میانگین $\pm$ انحراف معیار	میانگین $\pm$ انحراف معیار	میانگین $\pm$ انحراف معیار	میانگین $\pm$ انحراف معیار	میانگین $\pm$ انحراف معیار	میانگین $\pm$ انحراف معیار	میانگین $\pm$ انحراف معیار	
۱۰	۷۶/۳۰ $\pm$ ۴/۰۵	۷۳/۲۶ $\pm$ ۲/۰۰	۸۳/۵۸ $\pm$ ۰/۸۹	۷۱/۹۷ $\pm$ ۰/۸۰	۷۲/۹۲ $\pm$ ۱/۲۶	۷۷/۱۸ $\pm$ ۰/۴۲	۰/۰۳۱
۵	۷۶/۴۲ $\pm$ ۰/۵۳	۷۳/۲۳ $\pm$ ۰/۳۹	۷۷/۶۵ $\pm$ ۰/۳۹	۷۰/۳۳ $\pm$ ۳/۰۹	۷۴/۶۴ $\pm$ ۱/۷۲	۷۶/۶۸ $\pm$ ۱/۱۱	۰/۰۱۸
۲/۵	۷۳/۱۷ $\pm$ ۲/۶۴	۶۸/۷۴ $\pm$ ۲/۴۱	۷۱/۶۳ $\pm$ ۰/۶۹	۶۴/۵۸ $\pm$ ۱/۸۴	۷۰/۰۲ $\pm$ ۱/۳۳	۷۱/۱۰ $\pm$ ۱/۸۶	۰/۰۵۱
۱/۲۵	۹۸/۷۷ $\pm$ ۱/۷۷	۶۸/۷۴ $\pm$ ۰/۷۲	۶۹/۲۹ $\pm$ ۰/۲۲	۶۰/۵۱ $\pm$ ۱/۴۸	۶۵/۰۱ $\pm$ ۱/۲۳	۶۶/۸۳ $\pm$ ۲/۴۷	۰/۶۰
۰/۶۲۵	۶۱/۸۷ $\pm$ ۲/۱۱	۶۱/۴۷ $\pm$ ۰/۷۶	۶۲/۲۸ $\pm$ ۰/۰۲	۵۷/۸۹ $\pm$ ۳/۳۵	۵۶/۵۵ $\pm$ ۰/۹۴	۶۲/۹۰ $\pm$ ۰/۸۸	۰/۰۶۲
۰/۳۱۲	۶۰/۸۶ $\pm$ ۰/۴۸	۶۱/۳۳ $\pm$ ۰/۶۱	۶۱/۴۴ $\pm$ ۰/۳۴	۵۸/۴۶ $\pm$ ۲/۲۱	۵۵/۹۰ $\pm$ ۰/۷۴	۶۳/۲۳ $\pm$ ۱/۴۹	۰/۰۱۰
نیستاتین	۹۶/۴۷ $\pm$ ۰/۷۲	۹۶/۷۳ $\pm$ ۱/۱۰	۹۷/۴۷ $\pm$ ۲/۲۰	۹۵/۲۶ $\pm$ ۰/۴۲	۹۸/۲۳ $\pm$ ۰/۵۱	۹۳/۷۷ $\pm$ ۰/۹۶	-
P value	۰/۰۰۵	۰/۰۰۵	۰/۰۰۳	۰/۰۰۵	۰/۰۰۵	۰/۰۰۴	-

جدول ۳. کدورت ناشی از رشد و درصد مهار رشد در استفاده از عصاره‌ی متانولی حنا بر کاندیدا آلبیکانس

غلظت (mg/ml)	کدورت ناشی از رشد (OD)	درصد مهار رشد
میانگین $\pm$ انحراف معیار	میانگین $\pm$ انحراف معیار	میانگین $\pm$ انحراف معیار
۱۰	0.355 ± 0.061	$75/867 \pm 4/358$
۵	0.371 ± 0.038	$74/827 \pm 2/968$
۲/۵	0.444 ± 0.043	$69/873 \pm 3/236$
۱/۲۵	0.494 ± 0.049	$66/526 \pm 3/392$
0.625	0.583 ± 0.049	$60/491 \pm 2/854$
0.312	0.588 ± 0.048	$60/201 \pm 2/642$
نیستاتین	0.054 ± 0.025	$96/325 \pm 1/783$
کنترل مثبت	$1/476 \pm 0.057$	---
P value	< 0.001	< 0.001



نمودار ۱. مقایسه‌ی مقادیر کدورت ناشی از رشد (OD) در غلظت‌های مختلف عصاره‌ی متانولی حنا، نیستاتین و کنترل مثبت بر کاندیدا آلبیکانس



نمودار ۲. مقایسه‌ی درصد مهار رشد در غلظت‌های مختلف عصاره‌ی متانولی حنا، نیستاتین و کنترل مثبت بر کاندیدا آلبیکانس

بحث

طبق نتایج مطالعه‌ی حاضر و با رد فرضیه‌ی صفر، عصاره‌ی حنا هم به صورت آبی و هم متانولی قادر به کاهش سویه‌های *کاندیدا آلبیکانس* و درمان کاندیدیازیس دهانی می‌باشد. همچنین با افزایش غلظت عصاره‌ی حنا میزان کشندگی و مهار رشد آن در کاندیدیازیس دهانی به مراتب افزایش می‌یابد. غلظت‌های مورد بررسی عصاره‌ی حنا همچنین می‌تواند باعث مهار رشد قارچ *کاندیدا آلبیکانس* شوند. البته عصاره‌ی حنا در سویه‌های مختلف تا حدودی متفاوت بود که به نظر می‌رسد عواملی چون سن، جنس، بیماری‌های سیستمیک، سال‌های استفاده از دنجر، مصرف دخانیات شاید مصرف آنتی‌بیوتیک در حساسیت سویه‌ها به عصاره‌ی حنا مؤثر بود.

در مطالعات مختلف اثر ضد قارچی داروهای گیاهی به اثبات رسیده است. در مطالعه‌ی افشارپور و همکاران، عصاره‌ی متانولی چای سبز و سیاه در پیشگیری و احتمالاً درمان آلودگی‌های قارچی مؤثر بود (۱۶).

در مطالعه‌ی اکبری نیز عصاره‌های گیاه آویشن در کاهش سویه‌های *کاندیدا آلبیکانس* مؤثر بودند و با افزایش غلظت میزان مهارکنندگی افزایش داشت (۱۷).

در مطالعه‌ی امیرخان و همکاران، عصاره‌ی میخک اثر ضدقارچی داشت (۱۳) و در مطالعه‌ی دیزيجان فرد و همکاران، گیاه سیاه دانه، اثر مهاری مثبتی بر روی قارچ *کاندیدا آلبیکانس* داشت که نتایج مطالعات فوق با نتایج مطالعه‌ی حاضر مطابقت داشت (۱۴). ولی در مطالعه‌ی صالحی و همکاران، عصاره‌ی متانولی سماق در غلظت‌های پایین توان مهار نمونه‌های *کاندیدا آلبیکانس* را نداشت و در حداقل غلظت ۵۱۲ میلی گرم بر لیتر اثر بازدارندگی وجود داشت (۱۸).

اثرات ضد قارچی عصاره‌ی حنا در مطالعات مختلف بررسی شده است و اثر ضد باکتری را در کاهش کلنی این نوع باکتری‌ها مشاهده نمودند (۲۱-۱۹) که با نتایج مطالعه‌ی حاضر مطابقت داشت.

ترکیلات فنلی موجود گیاه حنا، پتانسیل فیزیولوژیکی بالایی دارند و به عنوان یک منبع آنتی‌اکسیدانی طبیعی به شمار می‌رود، نقش اصلی آنتی‌اکسیدان‌ها حفاظت از سلول‌ها در برابر عوامل بیماری‌زا می‌باشد. از این رو، خاصیت آنتی‌اکسیدانی بالای عصاره‌ی آبی حنا را می‌توان به مقادیر بالای فنول آن نسبت داد (۲۲).

Pasandi Pour و همکاران در بررسی خاصیت آنتی‌اکسیدانی عصاره‌های آبی برگ حنای جمع‌آوری شده از مناطق مختلف، ضمن تأکید بر تأثیر غلظت عصاره و اکوتیپ گیاه در میزان فعالیت آنتی‌اکسیدانی گزارش کردند که افزایش غلظت عصاره سبب افزایش خاصیت آنتی‌اکسیدانی می‌شود عصاره‌های آبی و متانولی حنا به طور قابل توجهی قادر به مهار رادیکال‌های آزاد DPPH و ABTS می‌باشد (۲۵-۲۳).

Raja و همکاران، در بررسی اثر ضد قارچی عصاره‌ی متانولی برگ حنا به روش دیسک دیفیوژن، وجود ترکیبات زیست فعال مختلف از جمله فلاونوئیدها را عامل فعالیت ضد قارچی این عصاره بیان نمودند (۲۶).

در مطالعه‌ی Gull و همکاران، در بررسی خاصیت ضد قارچی عصاره‌های آبی، متانولی و استونی و کلروفورمی برگ گیاه حنا بر تعدادی از باکتری‌های بیماری‌زا نشان دادند که تمامی عصاره‌ها دارای اثر ضد قارچی بر روی تمام باکتری‌های مورد مطالعه داشتند (۲۷).

Saadabi نیز با تأکید بر خاصیت بیشتر عصاره‌ی آبی برگ حنا در مقایسه با عصاره‌های متانولی و کلروفورمی بیان کردند که افزایش غلظت عصاره‌ها در جلوگیری بیشتر از رشد میکروارگانیسم‌های مورد مطالعه مؤثرتر می‌باشد که با نتایج مطالعه‌ی حاضر مطابقت داشت (۲۸).

باکتری‌های گرم مثبت نسبت به انواع گرم منفی نسبت به عصاره‌های آبی حنا، حساسیت بالاتری نشان می‌دهند که این اختلاف ناشی از تفاوت در دیواره‌ی سلولی این میکروارگانیسم‌ها می‌باشد. بطوری که غشای بیرونی باکتری‌های گرم منفی شامل ساختارهای لیپولی ساکاریدی

پیچیده‌ای است که سبب کاهش سرعت نفوذ ترکیبات ضد قارچی به داخل سلول می‌گردد. در حالیکه باکتری‌های گرم مثبت دارای لایه موکوپتیدی ساده و نفوذپذیری می‌باشند که سبب حساسیت بیشتر این باکتری‌ها به مواد ضد قارچی می‌گردد (۲۹).

در سایر مطالعات که به بررسی اثر ضد قارچی عصاره‌های گیاهی پرداخته‌اند نیز نتایج مثبتی در کاهش سویه‌های کاندیدا/آلبیکانس بیان نمودند (۱۵، ۳۰، ۳۱). در مطالعه‌ی Nawasrah و همکاران، در بررسی تأثیر ضد قارچی حنا علیه کاندیدا/آلبیکانس چسبیده به رزین اکریلیک به این نتیجه رسیدند که افزودن حنا به دنچر رزین اکریلیک می‌تواند در کنترل تکثیر کاندیدا/آلبیکانس در سطح پروتز مؤثر باشد. با این حال، اثرات آن بر خواص فیزیکی پروتز رزین اکریلیک نیاز به مطالعات بیشتری دارد (۳۲).

در بررسی‌های دوتایی مشاهده شد که عصاره‌ی حنا در سویه‌های مختلف تا حدودی متفاوت بود که به نظر می‌رسد عواملی چون سن، جنس، بیماری‌های سیستمیک، سال‌های استفاده از دنچر، مصرف دخانیات شاید مصرف آنتی‌بیوتیک در حساسیت سویه‌ها به عصاره‌ی حنا مؤثر بوده و در نتیجه آزمون تفاوت داشته‌اند.

این موضوع به بررسی‌های بالینی بیشتری را نشان می‌دهد. این مسأله بسیار حائز اهمیت است که در مطالعات آزمایشگاهی نیز سعی شود بر سویه‌های بالینی جدا شده از بیماران متمرکز گردد و عوامل مختلف مؤثر بر حساسیت به سویه‌های باکتریایی و قارچی مورد بررسی بیشتر قرار گیرد. از محدودیت‌های مطالعه، شرایط آزمایشگاهی مطالعه بود. تأثیر این یافته نیازمند انجام مطالعات in-vivo و in-vitro متعددی می‌باشد. بنابراین تحقیقات بالینی جامع و بلندمدت همراه با لحاظ کردن یا حذف پارامترهای اثرگذار پیشنهاد می‌گردد.

نتیجه‌گیری

عصاره‌ی حنا در غلظت‌های ۱/۲۵، ۲/۵، ۵ و ۱۰ mg/ml اثر ضد قارچی مناسبی بر علیه کاندیدا/آلبیکانس جدا شده از بیماران دارد. البته این تأثیر به میزان داروی شیمیایی نیست.

سپاسگزاری

از تمام کسانی که در انجام این مطالعه همکاری داشتند سپاسگزاری به عمل می‌آید.

References

1. He XY, Meurman JH, Kari K, Rautemaa R, Samaranayake LP. In vitro adhesion of Candida species to denture base materials. *Mycoses* 2006; 49(2): 80-4.
2. Thein ZM, Samaranayake YH, Samaranayake LP. Characteristics of dual species Candida biofilms on denture acrylic surfaces. *Arch Oral Biol* 2007; 52(12): 1200-8.
3. Naeini A, Jalayer Naderi N, Shokri H, Davati A, Rabiei SM. Evaluation of the Antifungal Effects of Compound Mouthwash (Cuminum cyminum, Melissa officinalis and Camellia sinensis) on Standard Strain of Candida albicans [in Persian]. *J Mashhad Dent Sch* 2015; 39(3): 273-82.
4. Sanguinetti M, Posteraro B, Romano L, Battaglia F, Lopizzo T, De Carolis E, et al. In vitro activity of Citrus bergamia (bergamot) oil against clinical isolates of dermatophytes. *J Antimicrob Chemother* 2007; 59(2): 305-8.
5. Calixto JB. Efficacy, safety, quality control, marketing and regulatory guidelines for herbal medicines (phytotherapeutic agents). *Braz J Med Biol Res* 2000; 33(2): 179-89.
6. Yosef Naanaie S. Flora of Iran: Henna (Lythraceae) [in Persian]. Tehran, Iran: Research Institute of Forests and Rangelands; 2010.

7. Habbal O, Hasson SS, El-Hag AH, Al-Mahrooqi Z, Al-Hashmi N, Al-Bimani Z, et al. Antibacterial activity of Lawsonia inermis Linn (Henna) against Pseudomonas aeruginosa. Asian Pac J Trop Biomed 2011; 1(3): 173-6.
8. Khan A, Ahmad A, Manzoor N, Khan LA. Antifungal activities of Ocimum sanctum essential oil and its lead molecules. Nat Prod Commun 2010; 5(2): 345-9.
9. Ahmad A, Khan A, Manzoor N, Khan LA. Evolution of ergosterol biosynthesis inhibitors as fungicidal against Candida. Microb Pathog 2010; 48(1): 35-41.
10. Pinto E, Pina-Vaz C, Salgueiro L, Gonçalves MJ, Costa-de-Oliveira S, Cavaleiro C, et al. Antifungal activity of the essential oil of Thymus pulegioides on Candida, Aspergillus and dermatophyte species. J Med Microbiol 2006; 55(Pt 10): 1367-73.
11. Aslanimehr M, Alizadeh A, Azmoudeh F. The effects of the grape seed extract on Streptococcus mutans and Candida albicans: An in vitro study. Avicenna J Dent Res 2020; 12(2): 35-9.
12. Purkait S, Bhattacharya A, Bag A, Chattopadhyay RR. Synergistic antibacterial, antifungal and antioxidant efficacy of cinnamon and clove essential oils in combination. Arch Microbiol 2020; 202(6): 1439-48.
13. Amirkhan S, Rashidi Meybodi F, Rafiei M, Brmar S. Comparison of the antifungal and antibacterial effects of cloves and fluconazole solution on Candida Albicans and streptococcus mutans colonies [in Persian]. J Res Dent Sci 2023; 20(3): 98-103.
14. Dizajian Fard Zanjani A, Jadidi H, Moeini P, Majzoubi S. Comparison of the effect of Nigella sativa ethanol extract and Nystatin on Candida albicans in vitro [in Persian]. J Res Dent Sci 2024; 21(2): 133-41.
15. Yaralizadeh M, Abedi P, Namjoyan F, Fatahinia M, Chegini SN. A comparison of the effects of Lawsonia inermis (Iranian henna) and clotrimazole on Candida albicans in rats. J Mycol Med 2018; 28(3): 419-23.
16. Ashrafpour M, Ghorbani A, Sefidgar A, Kazemi H, Moghaddamnia A, Kazemi S, et al. The comparison of antifungal effects of methylene chloride and methanol extracts of green and black tea on Candida Albicans [in Persian]. J Babol Univ Med Sci 2016; 18(5): 53-60.
17. Akbari S. Antifungal Activity of Thymus vulgaris L. and Origanum vulgare L. Against Fluconazol-Resistant and Susceptible Candida albicans Isolates [in Persian]. J Med Plants 2007; 6(1): 53-62.
18. Salehi M, Hadadi A, Badali H, Moosazadeh M, Ezadi Z, Aryana M, et al. In-vitro investigation of antifungal effect of sumac methanolic extract on Candida albicans [in Persian]. J Mazandaran Univ Med Sci 2021; 31(198): 175-81.
19. Behdani M, Ghazvini K, Mohammadzadeh A, Sadeghian A. Antibacterial activity of Henna extracts against Staphylococcus aureus and Pseudomonas aeruginosa [in Persian]. Intern Med Today 2009; 15(2): 46-51.
20. Alsalamah SA, Alghonaim MI, Jusstaniah M, Abdelghany TM. Anti-Yeasts, Antioxidant and Healing Properties of Henna Pre-Treated by Moist Heat and Molecular Docking of Its Major Constituents, Chlorogenic and Ellagic Acids, with Candida albicans and Geotrichum candidum Proteins [in Persian]. Life (Basel) 2023; 13(9): 1839.
21. Mirei ZS, Sadri M, Salimi A. Investigation of antimicrobial activity of polymer nanofibers using henna additive [in Persian]. Nova Biologica Reperta 2016; 3(3): 210-7.
22. Uma DB, Ho CW, Wan Aida WM. Optimization of extraction parameters of total phenolic compounds from henna (Lawsonia inermis) leaves. Sains Malaysiana 2010; 39(1): 119-28.
23. Pasandi Pour A, Farahbakhsh H. Lawsonia inermis L. Leaves aqueous extract as a natural antioxidant and antibacterial product. Nat Prod Res 2020; 34(23): 3399-403.

24. Guha G, Rajkumar V, Kumar RA, Mathew L. Antioxidant activity of Lawsonia inermis extracts inhibits chromium(VI)-induced cellular and DNA toxicity. Evid Based Complement Alternat Med 2011; 2011: 576456.
25. Shahidi F, Yazdi FT, Roshanak S, Behbahani BA, Norouzi N, Vasiee A. Antimicrobial Activity of *Lepidium draba* Extract on some Pathogenic Microorganisms “in vitro” [in Persian]. Iranian Journal of Infectious Diseases 2019; 24(85): 1-9.
26. Raja W, Ovais M, Dubey A. Phytochemical screening and antibacterial activity of Lawsonia inermis leaf extract. Int J Microbiol Res 2013; 4(1): 33-6.
27. Gull I, Sohail M, Aslam MS, Amin Athar M. Phytochemical, toxicological and antimicrobial evaluation of Lawsonia inermis extracts against clinical isolates of pathogenic bacteria. Ann Clin Microbiol Antimicrob 2013; 12: 36.
28. Saadabi MA. Evaluation of Lawsonia inermis Linn. (Sudanese henna) leaf extracts as an antimicrobial agent. Res J Biol Sci 2007; 2(4): 419-23.
29. Wilson D. Candida albicans. Trends Microbiol 2019; 27(2): 188-9.
30. Haji Fattahi F, Alirezaei S, Goodarzi H, Khalesi MA. Investigation of antifungal effect of aqueous extract of garlic on *Candida albicans* (INVITRO) [in Persian]. J Res Dent Sci 2019; 16(1): 20-6.
31. Hasan MM. Safe strategies for controlling of *Candida albicans* growth with using plant extracts. Life Science Journal 2017; 14(6): 96-99.
32. Nawasrah A, AlNimr A, Ali AA. Antifungal Effect of Henna against *Candida albicans* adhered to acrylic resin as a possible method for prevention of denture stomatitis. Int J Environ Res Public Health 2016; 13(5): 520.