

بررسی اثر ضدباکتری زخم‌پوش عمل‌آوری شده با عصاره حنا

Investigating the antibacterial effect of wound healing with Henna extract

احمد صفامهر^۱، لاله قاسمی مبارکه^{۱*}، پوران‌دخت گلکار^۲، افسانه ولی پوری^۱

۱- اصفهان، دانشگاه صنعتی اصفهان، دانشکده مهندسی نساجی، ۸۴۱۵۶-۸۳۱۱۱

۲- اصفهان، دانشگاه صنعتی اصفهان، پژوهشکده زیست فناوری و مهندسی زیستی، ۸۴۱۵۶-۸۳۱۱۱

چکیده

از مهم‌ترین ویژگی زخم‌پوش‌ها خاصیت ضدباکتری آن است، که در برخی گیاهان نیز مشاهده می‌شود. هدف از این پژوهش تهیه یک زخم‌پوش مقاوم در برابر باکتری با استفاده از حنا به عنوان یک عامل طبیعی زیست فعال است. برگ گیاه حنا خالص، آسیاب شده و عصاره آن به وسیله اتانول استخراج و به منظور اعمال خواص ضدباکتری، پارچه‌های پنبه‌ای و پلی‌استر به عصاره برگ حنا به روش رمق‌کشی آغشته شدند و خاصیت ضدباکتری عصاره حنا بر روی دو پارچه مقایسه شد. ارزیابی اثر ضد میکروب زخم‌پوش‌ها به صورت کمی توسط آزمون نفوذ دیسک طبق استاندارد AATCC 190-100 در برابر باکتری گرم مثبت استافیلوکوکوس اورئوس و گرم منفی اشرشیاکلی انجام شد. یافته‌های به دست آمده حاکی از آن است که پارچه پنبه‌ای آغشته شده با عصاره حنا خاصیت ضدباکتری قابل قبولی در مقابل باکتری‌های گرم مثبت دارد درحالی‌که در برابر باکتری‌های گرم منفی اثر مطلوبی از خود نشان نمی‌دهد. همچنین بستر پلی‌استر آغشته شده با عصاره حنا هیچگونه خاصیت ضدباکتری در برابر باکتری‌های گرم مثبت و گرم منفی نشان نداد، که دلیل آن را می‌توان به دمای بالایی که در آغشته‌سازی پلی‌استر با عصاره حنا استفاده شده است نسبت داد.

مقدمه

خوبی هستند که می‌توانند در صنایع مختلف استفاده

شوند [۱].

گیاه حنا با نام علمی لاوسونیا اینر میس متعلق به خانواده موردسانان و به صورت یک درختچه گل‌دهنده است

که در مناطق مختلف دنیا از جمله ایران کشت می‌شود [۳]. درختچه حنا در مناطق مختلف جنوبی ایران

از جمله اطراف بندرعباس و بوشهر، استان سیستان و بلوچستان (اطراف چابهار)، استان کرمان (کرمان، بم و

نرماشیر)، استان خوزستان (اطراف اهواز) و یزد رویش دارد. از برگ حنا بیشتر به دلیل خاصیت رنگ‌زایی خوبی

که دارد استفاده می‌شود و از دیرباز برای رنگ کردن مو، انگشتان و دست و پا مورد استفاده قرار گرفته است

[۴]. ترکیب اصلی موجود در گیاه حنا که منجر به ایجاد

استفاده از گیاهان دارویی با خواص طبیعی از دیرباز

در درمان بسیاری از بیماری‌ها کاربرد داشته است [۱]. بعد از ظهور داروهای صنعتی و با توجه به سرعت

بهبود بیماری‌ها توسط این داروها توجه به گیاهان دارویی کاهش پیدا کرد ولی امروزه با توجه به عوارض

جانبی موجود در داروهای شیمیایی و همچنین ارزان بودن، دسترسی آسان و راحتی مصرف، گیاهان دارویی

دوباره مورد توجه مردم قرار گرفته‌اند. از این رو محققان در سال‌های اخیر گیاهان مختلفی را مورد ارزیابی قرار

داده‌اند تا به خواص دارویی موجود در آن پی ببرند و آن‌ها را جایگزین داروهای صنعتی کنند [۲]. گیاهان دارویی

با داشتن متابولیت‌های ثانویه دارای اثرات دارویی بسیار

کلمات کلیدی

زخم‌پوش،

عصاره حنا،

ضدباکتری،

استافیلوکوکوس اورئوس،

اشرشیا کلی

* مسئول مکاتبات، پیام نگار: laleh.ghasemi@cc.iut.ac.ir

حنا استخراج و سپس دو پارچه مختلف پنبه و پلی‌استر با این عصاره آغشته و خاصیت ضدباکتری آن بر روی این دو بستر مورد بررسی و مقایسه قرار گرفت.

تجربیات

مواد

در این پژوهش، برگ حنا از مزارع یزد، اتانول از شرکت مرک آلمان، پارچه پلی‌استر و پارچه پنبه‌ای از شرکت یزدباف تهیه شد و باکتری‌های گرم منفی (AATCC-25922) اشرشیا کلی و گرم مثبت (AATCC-25923) استافیلوکوکوس اورئوس برای آزمون ضدباکتری مورد استفاده قرار گرفت.

روش‌ها

استخراج عصاره برگ حنا

ابتدا برگ حنا خشک، تمیز، آسیاب و تبدیل به پودر شد. سپس ۱۵۰ گرم از پودر حنا به دقت وزن شده و ۶۰۰ میلی‌لیتر اتانول (۵۰٪) به آن اضافه شد. ترکیب به خوبی هم‌زده شد تا مخلوط یکنواخت شود. سپس مخلوط حاصله به مدت ۳ روز در دمای اتاق نگهداری شد و پس از آن توسط کاغذ صافی و روش صاف کردن به کمک قیف بوختر، عصاره حاصله، صاف و محلول حاصله به عنوان عصاره حنا استفاده شد. عصاره موجود به مدت ۱ روز در دمای ۴۰ درجه سانتی‌گراد قرار گرفت، پس از آن عصاره باقی‌مانده در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد برای استفاده در مراحل بعدی نگهداری شد [۱۳].

آغشته‌سازی پارچه‌ها توسط عصاره حنا

آغشته‌سازی پارچه‌های پنبه‌ای و پلی‌استر توسط عصاره حنا به روش رمق‌کشی انجام شد. در این روش پارچه‌های پنبه‌ای و پلی‌استر به همراه عصاره حنا، درون کیپسول‌های دستگاه رنگرزی خودکار شرکت Data color، مدل AHIVA 1000 قرار داده شد. نسبت حجم عصاره به وزن پارچه (L:R)، ۱:۲۰۰ انتخاب گردید. بدین صورت که به ازای ۰/۱ گرم پارچه ۲۰ میلی‌لیتر عصاره استفاده شد. رمق‌کشی پارچه‌های پنبه‌ای و پلی‌استر به مدت ۱ ساعت به ترتیب در دمای ۱۰۰ و ۱۳۰ درجه سانتی‌گراد در دستگاه رنگرزی صورت گرفت و سپس پارچه‌ها شست و شو داده شدند.

پارچه پنبه‌ای نیز به روش رمق‌کشی تحت شرایط ذکر شده در زیر توسط عصاره حنا آغشته شد.

(۱) پارچه پنبه‌ای غوطه‌ور در عصاره حنا در دمای محیط به مدت ۶۰ دقیقه.

(۲) پارچه پنبه‌ای غوطه‌ور در عصاره حنا در دمای محیط به مدت ۲۴ ساعت.

(۳) پارچه پنبه‌ای غوطه‌ور در عصاره حنا در دمای جوش به مدت ۶۰ دقیقه.

خاصیت رنگی در آن می‌شود، لاوسون با فرمول شیمیایی ۲-هیدروکسی ۴، ۱-نفتو کوئینون می‌باشد، که این ترکیب شیمیایی به عنوان یکی از رنگ‌های شناخته شده با شماره کالرایندکس CI. 75480 است و حدود ۰/۵-۱/۵ درصد از ترکیب شیمیایی برگ حنا را تشکیل می‌دهد. وارکیز و همکارانش (۲۰۱۰) در تحقیقات خود نشان دادند که برگ حنا علاوه بر مشتقات نفتو کوئینون دارای ترکیبات مختلف فنولیکی، کومارینی، تانی، آلیفاتیکی و ترینوئیدی نیز می‌باشد [۵].

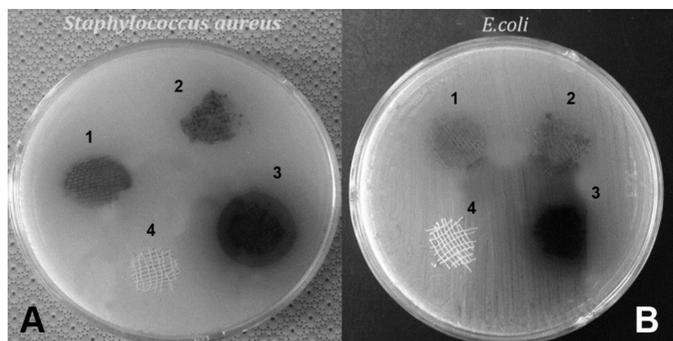
از جمله خواص مهم حنا می‌توان به محافظت در برابر پرتو فرابنفش (UV)، خاصیت ضد اکسیدکنندگی و خواص دارویی آن از جمله خواص ضدباکتری، ضدتوموری، ضدکرم‌های انگلی، ایمن‌سازی، بهبود دهنده زخم و خواص ضد میکروبی اشاره نمود [۶، ۷، ۳]. باکتری‌ها از دسته ریزجاندارهای فراوان موجود در طبیعت می‌باشند و می‌توان آن‌ها را به عنوان مهم‌ترین عامل بیماری دانست [۸].

با گذشت زمان و استفاده از آنتی‌بیوتیک‌ها و مواد ضدباکتری، ریزجاندارها، از جمله باکتری‌ها روز به روز در برابر این مواد مقاوم‌تر می‌شوند به طوری که این مواد دیگر اثری بر روی ریزجاندارها نخواهند گذاشت و ما را نیازمند به آنتی‌بیوتیک‌های قوی‌تر می‌سازند و نظر به اینکه خود این مواد نیز عوارض جانبی زیادی به همراه خواهند داشت از این رو دانشمندان به دنبال راهکارهای دیگری برای مقابله با این ریزجاندارها هستند که یکی از این راهکارها استفاده از گیاهان دارویی با خاصیت ضدباکتری می‌باشد. مهم‌ترین مزیت گیاهان دارویی در مقایسه با آنتی‌بیوتیک‌ها این است که با گذشت زمان باکتری‌ها قادر به مقاومت در برابر آن‌ها نیستند و برخلاف آنتی‌بیوتیک‌ها عوارض جانبی ندارند [۹].

پنبه یکی از با ارزش‌ترین الیاف موجود در جهان است. الیاف پنبه به دلیل دارا بودن گروه‌های هیدروکسیل جزو الیاف آب‌دوست محسوب می‌شوند از این رو با توجه به اینکه این الیاف قادر به جذب ترشحات زخم می‌باشند به عنوان بستری مناسب برای زخم‌پوش‌ها مورد توجه قرار گرفته‌اند [۱۰]. همچنین الیاف پلی‌استر امروزه به عنوان پرکاربردترین الیاف در منسوجات شناخته شده است. این الیاف به دلیل وجود گروه‌های آب‌گریز، جزء الیاف آب‌گریز محسوب می‌شود ولی به دلیل خاصیت فتیله‌ای این قابلیت را دارد که ترشحات موجود در زخم را منتقل کند، از این رو از پلی‌استر نیز در زخم‌پوش‌ها استفاده می‌شود [۱۱].

امروزه در زخم‌پوش‌ها استفاده از عناصر و ترکیبات شیمیایی که خاصیت ضدباکتری و قدرت بالایی در کند کردن و توقف فعالیت ریزجاندارها دارند مورد توجه قرار گرفته است. از جمله مواد طبیعی که امروزه با توجه به خواص ضد میکروبی و ضد التهابی در زخم‌پوش‌ها مورد استفاده قرار می‌گیرد می‌توان به عسل اشاره نمود که به بهبود هر چه بهتر و سریع‌تر زخم کمک می‌کند [۱۵].

خواص ضدباکتریایی برگ حنا در مطالعات پیشین مورد بررسی قرار گرفته است اما تاکنون مطالعه‌ای در خصوص اثر ضدباکتریایی آن بر روی پارچه منتشر نشده است [۱۲]. با توجه به اهمیت زخم‌پوش‌های ضدباکتری از یک طرف و مورد توجه قرار گرفتن ترکیبات طبیعی به جای ترکیبات شیمیایی از طرف دیگر در این پژوهش ابتدا عصاره برگ



شکل ۱- هاله عدم رشد باکتری، (A) استافیلوکوکوس اورئوس و (B) اش‌ریشیا کلی در حضور پارچه پنبه‌ای آغشته شده به عصاره حنا، (۱) دمای محیط به مدت ۱ ساعت، (۲) دمای محیط به مدت ۲۴ ساعت، (۳) دمای جوش به مدت ۱ ساعت، (۴) نمونه پنبه خام.

است [۱۴] و با توجه به اینکه هاله عدم رشد برای حنا حدود ۱۸ میلی‌متر می‌باشد (جدول ۱)، این مقدار برای حنا به عنوان یک ماده طبیعی، اثر ضدباکتری قابل توجه است. همانطور که نتایج نشان می‌دهد روش آغشته‌سازی تاثیر قابل توجهی بر خاصیت ضدباکتری نهایی دارد و پارچه پنبه‌ای عمل‌شده با عصاره حنا در دمای جوش خاصیت ضدباکتری بیشتری را نشان داده که دلیل این امر را می‌توان به نفوذ بیشتر عصاره حنا به پارچه پنبه‌ای در دمای جوش نسبت به دمای محیط نسبت داد. با توجه به اینکه لیف پنبه دارای ساختار بلوری است به نظر می‌رسد که نفوذ عصاره حنا به داخل پارچه در دمای محیط قابل توجه نبوده و در نتیجه پارچه‌های پنبه‌ای آغشته شده در این دما خاصیت ضدباکتری نشان نداده‌اند.

خاصیت ضدباکتری پارچه پلی‌استر آغشته‌شده با حنا

نتایج آزمایش‌های انجام شده نشان داد که قراردادن پارچه پنبه‌ای به مدت ۱ ساعت در دمای جوش خاصیت ضدباکتری خوبی را در این بستر ایجاد می‌کند. در مورد پارچه پلی‌استر مقدار جذب عصاره به پارچه در دمای جوش بسیار ناچیز بود که می‌توان دلیل آن را به ساختار فشرده و آب‌گریز پلی‌استر نسبت داد. با توجه به این موضوع، پارچه در محلول عصاره حنا در دمای ۱۳۰ درجه سانتی‌گراد که برای رنگرزی پارچه پلی‌استر نیز به کار می‌رود قرار گرفت. نتایج حاصل از آزمون ضدباکتری بستر پلی‌استر و پنبه‌ای در مقابل باکتری‌های

جدول ۲- قطر هاله عدم رشد باکتری استافیلوکوکوس اورئوس و اش‌ریشیا کلی برای نمونه‌های مختلف.

نمونه	استافیلوکوکوس اورئوس (mm)	اش‌ریشیا کلی (mm)
پارچه پنبه‌ای آغشته شده به حنا در دمای جوش	۱۸	عدم رشد هاله
پارچه پلی‌استر آغشته شده به حنا در دمای ۱۳۰ درجه سانتی‌گراد	عدم رشد هاله	عدم رشد هاله
نمونه پلی‌استر خام	عدم رشد هاله	عدم رشد هاله

بررسی خواص ضدباکتری بسترهای مختلف

برای بررسی خواص ضدباکتری پارچه‌های پنبه و پلی‌استر غوطه‌ور شده در عصاره حنا، آزمون ضدباکتری روی نمونه‌های ذکر شده به روش نفوذ دیسک انجام شد [۱۷]. ابتدا سوپه‌های باکتری گرم مثبت و منفی تهیه و سپس به محیط کشت اضافه شدند و نمونه‌ها به شکل دیسک‌هایی به قطر ۱۰ سانتی‌متر تهیه و بر روی سطح آگار قرار داده شدند. سپس محیط‌های کشت درون انکوباتور به مدت ۲۴ ساعت قرار داده شد و پس از آن هاله عدم رشد به وسیله خط کش اندازه‌گیری شد.

نتایج و بحث

بررسی خاصیت ضدباکتری حنا بر روی پارچه پنبه‌ای

نتایج حاصل از آزمون ضدباکتری پارچه پنبه‌ای در مقابل باکتری‌های گرم مثبت و گرم منفی به ترتیب در شکل ۱-a و ۱-b نشان داده شده است. جدول ۱ نیز نتایج اندازه‌گیری هاله عدم رشد را نشان می‌دهد. همانطور که از شکل ۱ و جدول ۱ مشخص است، پارچه آغشته‌شده به عصاره حنا در دمای محیط و به مدت ۶۰ دقیقه و نیز به مدت ۲۴ ساعت، توانایی تخریب باکتری‌ها را نداشته است و باکتری‌ها نسبت به این شرایط مقاوم می‌باشند و هاله عدم رشد مشاهده نشد. پارچه آغشته شده در دمای جوش و به مدت ۱ ساعت، قادر به جلوگیری از رشد باکتری گرم مثبت (AATCC-25923) استافیلوکوکوس اورئوس می‌باشد و به وضوح هاله عدم رشد باکتری مشاهده شد. همچنین این نمونه خاصیت ضدباکتری در برابر باکتری گرم منفی (AATCC-25922) اش‌ریشیا کلی را نداشت و هاله عدم رشد مشاهده نشد. در واقع باکتری گرم منفی در مقابل اثر ضدباکتری عصاره حنا مقاوم است. در مورد اکثر رنگ‌های گیاهی با خاصیت ضدباکتری نیز مشاهده شده است که فقط قادر به جلوگیری از رشد باکتری‌های گرم مثبت هستند و اثر ضدباکتری این مواد طبیعی در برابر باکتری‌های گرم منفی بسیار ضعیف‌تر از باکتری‌های گرم مثبت می‌باشد، که از جمله این مواد طبیعی می‌توان به عصاره بومادران اشاره نمود [۱۶].

هاله عدم رشد آنتی‌بیوتیک کوتریموکسازول که مشابه عصاره حنا فقط بر روی باکتری گرم مثبت اثر دارد ۳۰ میلی‌متر گزارش شده

جدول ۱- قطر هاله عدم رشد باکتری استافیلوکوکوس اورئوس و اش‌ریشیا کلی در حضور پارچه پنبه‌ای آغشته شده به عصاره حنا در شرایط مختلف.

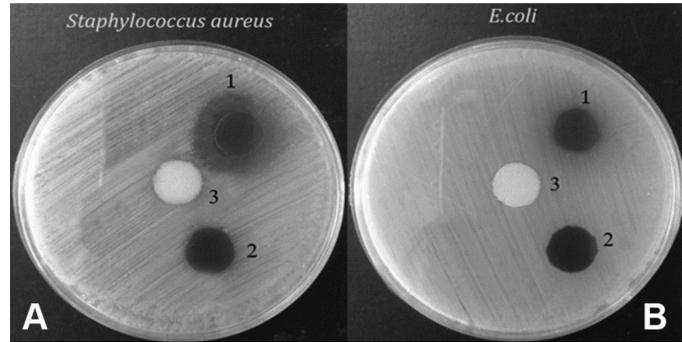
نمونه	استافیلوکوکوس اورئوس (mm)	اش‌ریشیا کلی (mm)
دمای محیط به مدت ۲۴ ساعت	عدم رشد هاله	عدم رشد هاله
دمای محیط به مدت ۱ ساعت	عدم رشد هاله	عدم رشد هاله
دمای جوش به مدت ۱ ساعت	۱۸	عدم رشد هاله
نمونه پنبه خام	عدم رشد هاله	عدم رشد هاله

می‌توان به از بین رفتن ماده موثره موجود در عصاره حنا (لاوسون) در دمای ۱۳۰ درجه سانتی‌گراد نسبت داد.

نتیجه‌گیری

در این پژوهش از عصاره حنا به عنوان یک ماده طبیعی برای ضدباکتری کردن دو پارچه پنبه‌ای و پلی‌استر، با توجه به کاربرد این دو بستر در زخم‌پوش‌ها، استفاده شد و اثر ضدباکتری عصاره حنا بر روی این دو پارچه مقایسه گردید.

نتایج به دست آمده نشان داد که نوع بستر و روش آوردن عصاره بر روی پارچه تاثیر قابل توجهی در خاصیت ضدباکتری نهایی دارد و همچنین عصاره حنا فقط قادر به مقاومت در برابر باکتری گرم مثبت استافیلوکوکوس اورئوس بوده و مقاومتی در برابر باکتری گرم منفی اشرشیا کلی از خود نشان نداد. پارچه پنبه‌ای آغشته‌شده به عصاره حنا در دمای جوش خاصیت ضدباکتری در برابر باکتری گرم مثبت نشان داد در حالیکه پارچه پلی‌استر عمل‌شده با عصاره حنا در دمای ۱۳۰ درجه سانتی‌گراد هیچ خاصیت ضدباکتری نشان نداد که دلیل آن را می‌توان به از بین رفتن احتمالی ماده موثره لاوسون موجود در حنا در دمای بالا نسبت داد.



شکل ۲- هاله عدم رشد باکتری، (A) استافیلوکوکوس اورئوس و (B) اشریشیا کلی در حضور در حضور، (۱) پارچه پنبه‌ای آغشته‌شده به عصاره حنا در دمای جوش، (۲) پارچه پلی‌استر آغشته‌شده به عصاره حنا در دمای ۱۳۰ درجه سانتی‌گراد و (۳) نمونه پلی‌استر خام.

گرم مثبت و گرم منفی به ترتیب در شکل ۲-a و ۲-b نشان داده شد. جدول ۲ نیز نتایج حاصل از اندازه‌گیری هاله عدم رشد را نشان می‌دهد.

نتایج آزمایشات انجام شده نشان داد که علی‌رغم جذب بیشتر عصاره حنا در دمای ۱۳۰ درجه سانتی‌گراد بر روی بستر پلی‌استر در مقایسه با بستر پنبه‌ای، این نمونه در مقابل هیچ یک از دو باکتری مقاومتی از خود نشان نداد و هاله عدم رشدی مشاهده نگردید که دلیل آن را

مراجع

- Raut, J. S., & Karuppaiyl, S. M., A status review on the medicinal properties of essential oils, *Ind Crops Prod*, 62, 250-264, 2014.
- Uma, D. B., Ho, C. W., & Wan Aida, W. M., Optimization of extraction parameters of total phenolic compounds from henna (*Lawsoniainermis*) leaves, *Sains Malays*, 39, 119-128, 2010.
- Habbal, O. A., Al-Jabri, A. A., El-Hag, A. H., Al-Mahrooqi, Z. H., & Al-Hashmi, N. A., In-vitro antimicrobial activity of *Lawsoniainermis* Linn (henna). A pilot study on the Omani henna, *Saudi med. j*, 26, 69-72, 2005.
- Ogunbinu, A.O., Ogunwande, I.A., Walker, T.M. and W. N. Setzer, Study on the Essential Oil of *Lawsoniainermis-Lythraceae*, *J ESSENT OIL BEAR PL*, 10, 184 -188, 2007.
- Varghese, K. J., Silvipriya, K. S., Resmi, S., & Jolly, C. I. *Lawsoniainermis* (Henna): A natural dye of various therapeutic uses-A review. *Inventi Impact: Cosmeceuticals*. Vol. 2010. Article ID-Inventi: Cc/3/10, 2010.
- Yusuf, M., Ahmad, A., Shahid, M., Khan, M. I., Khan, S. A., Manzoor, N., & Mohammad, F, Assessment of colorimetric, antibacterial and antifungal properties of woollen yarn dyed with the extract of the leaves of henna (*Lawsoniainermis*). *J CLEAN PROD*, 27, 42-50, 2012.
- Muhammad, H. S., & Muhammad, S, The use of *Lawsoniainermis* Linn. (henna) in the management of burn wound infections. *Afr. J. Biotechnol*, 4, 2005.
- Khalaphallah, R., & Soliman, W. S, Effect of henna and roselle extracts on pathogenic bacteria. *Asian Pac J Trop Dis*, 4, 292-296, 2014.
- Habbal, O., Hasson, S. S., El-Hag, A. H., Al-Mahrooqi, Z., Al-Hashmi, N., Al-Bimani, Z., Al-Jabri, A. A, Antibacterial activity of *Lawsoniainermis* Linn (Henna) against *Pseudomonas aeruginosa*. *Asian Pac J Trop Biomed*, 1, 173, 2011.
- Eichhorn, Stephen, J. W. S. Hearle, M. Jaffe, and T. Kikutani, eds., *Handbook of Textile Fibre Structure: Volume 2: Natural, Regenerated, inorganic and Specialist Fibres*. Elsevier, 2009.
- Patnaik, A., Rengasamy, R. S., Kothari, V. K., & Ghosh, A., Wetting and wicking in fibrous materials. *Text. Prog*,

- 38,1-105, 2006.
12. Al-Rubiay, K. K., Jaber, N. N., Al-Mhaawe, B. H., & Al-rubaiy, L. K., Antimicrobial efficacy of henna extracts. *Oman Med. J.*, 23,253, 2008.
 13. Habbal, O., Hasson, S. S., El-Hag, A. H., Al-Mahrooqi, Z., Al-Hashmi, N., Al-Bimani, Z., Al-Jabri, A. A., Antibacterial activity of Lawsoniainermis Linn (Henna) against *Pseudomonas aeruginosa*. *Asian Pac J Trop Biomed*, 1,173,2011.
 14. [14] Baghersad, S., Mansurnezhad, R., Ghasemi-Mobarakeh, L., Molahosseini, H., & Morshed, M., Coating of Silk Fabric Using PVA/Ciprofloxacin Hcl Nanofibers for Biomedical Applications. *UlūmvaTiknuluzhī-iPulīmir*, 29, 171-184, 2016.
 15. RafizadehZaeem, N., Khajavi, R., Assgharpour, Z., & Rahimi, M. K., Polypropylene Fabric Coated with Lipid-Carboxymethyl Cellulose- Nanosilver Emulsion for Wound Dressing, *J. Apparel and Textile Science and Technology*, 19, 2151-7162, 2017.
 16. Mohammadi-Sichani, M., Amjad, L., & Mohammadi-Kamalabadi, M, Antibacterial activity of methanol extract and essential oil of *Achilleawilhelmsii* against pathogenic bacteria. *Zahedan. J. Res. Med. Sci*, 13,14-9, 2011.
 17. American Association of Textile Chemists and Colorists. Disc diffusion method for antimicrobial activity procedure. *AATCC* 100-190.

