



## ***Punica granatum* Linn. (nar) bitkisinin antibakteriyel etkisinin araştırılması**

Kenan Tunç<sup>1\*</sup>, Tuğba Konca<sup>1</sup>, Ayşegül Hoş<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Sakarya Üniversitesi, Fen Edebiyat Fakültesi, Biyoloji Bölümü, Sakarya

\*E-posta: [ktunc@sakarya.edu.tr](mailto:ktunc@sakarya.edu.tr)

15.05.2012 Geliş/Received, 13.12.2012 Kabul/Accepted

### **ÖZET**

Bu çalışmada, *Punica granatum* L. (Nar) bitkisi meyve kabuklarından elde edilen ekstraktların (etanol, aseton, metanol, etil asetat), *Streptococcus mitis* CNCTC 4/77, *Streptococcus salivarius* CNCTC 64/59, *Streptococcus mutans* CNCTC 8/77, *Staphylococcus epidermidis* ATCC 12228, *Staphylococcus aureus* ATCC 29213, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Salmonella abony* NCTC 6017, *Salmonella typhimurium* ATCC 14028, *Enterococcus faecalis* ATCC 29212, *Bacillus subtilis* ATCC 6633 bakteri suşlarına karşı *in vitro* ortamda antibakteriyel etkisi araştırılmıştır. Ekstraktların antibakteriyel aktivitesinin belirlenmesinde disk difüzyon metodu kullanılmıştır. Meyve kabuk ekstraktlarının meydana getirdiği en yüksek inhibisyon zon çaplarının (18-30 mm) *S. aureus* ve *S. epidermidis* bakterilerine karşı olduğu gözlenmiştir. Viridans streptokoklardan *Streptococcus mitis* bakterisine karşı bitkinin antibakteriyel etkisinin olduğu ilk kez bu çalışmada belirlenmiştir.

**Anahtar Kelimeler:** *Punica granatum* L. nar, antibakteriyel aktivite, disk difüzyon, viridans streptokoklar

## **Antibacterial activity of *Punica granatum* Linn.**

### **ABSTRACT**

In this study, it was investigated that the extracts (ethanol, acetone, methanol, ethyl acetate) obtained from fruit peels of the plant to whether has antibacterial effect against *Streptococcus mitis* CNCTC 4/77, *Streptococcus salivarius* CNCTC 64/59, *Streptococcus mutans* CNCTC 8/77, *Staphylococcus epidermidis* ATCC 12228, *Staphylococcus aureus* ATCC 29213, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Salmonella abony* NCTC 6017, *Salmonella typhimurium* ATCC 14028, *Enterococcus faecalis* ATCC 29212, *Bacillus subtilis* ATCC 6633 bacteria strains *in vitro*. The antibacterial activity of extracts was evaluated according to disc diffusion method. It has been determined that pomegranate peel's extract had the highest inhibition zone diameters (18-30 mm) against *S. epidermidis* and *S. aureus* bacteria strains. The antibacterial activity of plant against *Streptococcus mitis* is determined in this study for the first time.

**Keywords:** *Punica granatum* L., pomegranate, antibacterial activity, disc diffusion, viridans streptococci

---

\* Sorumlu Yazar / Corresponding Author

## 1. GİRİŞ (INTRODUCTION)

Tıbbi bitkilerden elde edilen ekstraktlar ve uçucu yağlar; ham veya işlenmemiş gıdaların muhafazası, farmasötik, alternatif tıp ve doğal tedavilerde kullanımı dahil pek çok uygulamanın temelini oluşturmaktadır [1]. Bitkilerin tedavi amaçlı kullanımı insanlık tarihi kadar eskidir. Geleneksel ilaç olarak kullanılan birçok bitki bulunmaktadır [2]. Mikroorganizmaların antibiyotiklere karşı direnç kazanmaları ve yeni patojen mikroorganizmaların keşfinden dolayı günümüzde araştırmacılar, tıbbi bitkilerin antimikrobiyal özelliklerini araştırmaya yönelmişlerdir [3].

Üzümü meyve olarak kategorilendirilen nar; sarı, koyu pembe veya kırmızı renkte olabilen derimsi bir kabuğa sahiptir. Meyve kabuğunun önemli farmakolojik aktivitesinin çoğu polifenol bileşiklerin varlığından kaynaklanmaktadır. Bu bileşikler; doğal koruyucu ve güçlü antioksidan olan tanen ve flavonoidlerdir. Nar kabuğunda bulunan spesifik ellagitanenler; punicalin ve punicalagin'dir. Meyvede bulunan flavonoidler; antosiyanin, flavan-3-ols, flavon ve flavonollerdir [4]. Narda major organik asitlerden sitrik asit, L-malik asit, okzalik asit olduğu; suksinik, tartarik ve kinik asitin ise daha az miktarda bulunduğu düşünülmektedir [5]. Meyve kabuğu ekstraktlarının antibakteriyel, antifungal, antiviral, antihelmintik aktivite gösterdiği bildirilmiştir [6].

Bu çalışmada; farklı çözücülerde hazırlanan *Punica granatum* L. (Nar) meyve kabuk ekstraktlarının, çeşitli bakteriler üzerinde disk difüzyon metodu ile antibakteriyel etkisinin incelenmesi amaçlanmıştır.

## 2. MATERYAL VE METOT (MATERIAL AND METHOD)

### 2.1. Materyal (Material)

Çalışmada kullanılan *Punica granatum* L. 'Nar' meyveleri Düzce ilinin Çiçekpınar köyünden 2011 yılının Ekim ayında toplanmıştır. *Punica granatum* L., Punicaceae familyasına ait bir bitkidir. Familyada sadece bir cins (*Punica*) ve baskın bir tür (*P. granatum* L.) mevcuttur [4]. Nar ağacı; Mayıs-Haziran aylarında çiçek açan, 2-5 m. yüksekliğinde, çalimsı bir ağaçtır [7].

### 2.2. Test Mikroorganizmaları (Test Microorganisms)

Çalışmada kullanılan mikroorganizma suşları; *Streptococcus mitis* CNCTC 4/77, *Streptococcus salivarius* CNCTC 64/59, *Streptococcus mutans* CNCTC 8/77, *Staphylococcus epidermidis* ATCC 12228, *Staphylococcus aureus* ATCC 29213, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Salmonella abony* NCTC 6017,

*Salmonella typhimurium* ATCC 14028, *Enterococcus faecalis* ATCC 29212, *Bacillus subtilis* ATCC 6633 olup, İstanbul Üniversitesi Mikroorganizma Kültür Koleksiyonları Araştırma ve Uygulama Merkezinden (KÜKENS) ve Gebze Yüksek Teknoloji Enstitüsü Biyoloji Bölümü Mikrobiyoloji Laboratuvarı Kültür Koleksiyonu'ndan temin edilmiştir.

### 2.3. Bitki Ekstraktlarının Hazırlanması (Preparing Extracts of the Plant)

*Punica granatum* L. meyve örneklerinin kabukları 7 gün boyunca gölgede kurutulduktan sonra toz haline getirilmiştir. Toz materyalden 15 gr tartılarak 150 ml çözücüde 2 gün boyunca bekletilmiştir. Kimyasal çözücü olarak aseton (MERCK), etanol (MERCK), metanol (MERCK) ve etil asetat (MERCK) kullanılmıştır. Elde edilen ekstraktlar, vakum altında 40-45°C'de rotary evaporatörde (HEIDOLPH LABOROTA 4000 EFFICIENT) buharlaştırılmıştır.

### 2.4. Antimikrobiyal Aktivitenin Belirlenmesi (Determination of Antimicrobial Activity)

Bakteri suşları Triptik Soy Broth (MERCK) besiyerine aşılanmış, 37°C'de 24 saat inkübe edilerek aktifleştirilmiştir. İnkübasyon sonunda bakteri yoğunluğu densitometre (BIOSAN) kullanılarak 0.5 MacFarland'a ayarlanmıştır.

Hazırlanan ekstraktların antibakteriyel aktivitesi disk difüzyon metodu kullanılarak belirlenmiştir. Elde edilen kabuk ekstraktlarına belirlenen oranlarda DMSO (Dimetil Sülfoksit) eklenerek istenilen konsantrasyonlar (6400 µg/10µl, 3200 µg/10µl, 1600 µg/10µl, 800 µg/10µl ve 400 µg/10µl) disklerle emdirilmek üzere hazırlanmıştır. 6 mm çapındaki steril disklerle (ROTILABO) hazırlanan ekstraktlardan 10 µl/disk emdirilerek diskler kurumaya bırakılmıştır. Negatif kontrol olarak DMSO emdirilmiş diskler, pozitif kontrol olarak Klindamisin (10 µg), Tetrasiklin (10 µg) ve Amoksisilin-Klavulanat (30 µg) antibiyotik diskleri kullanılmıştır. Mueller Hinton Agar ve % 5 koyun kanlı Mueller Hinton Agar besiyerlerine yoğunluğu ayarlanmış bakteri süspansiyonundan steril eküvyon çubuk ile ekim yapılmıştır. Agar üzerine diskler hafifçe bastırılarak aseptik koşullarda yerleştirilmiştir.

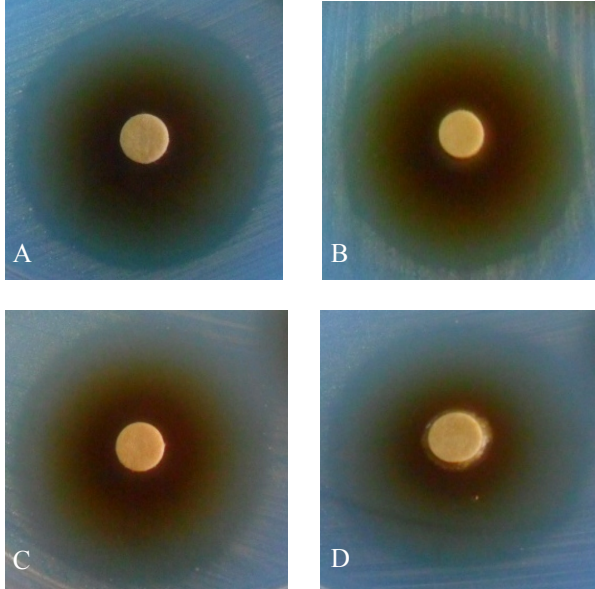
Bu şekilde hazırlanan petriyeler, viridans streptokoklar için anaerobik inkübasyon koşullarında (% 5-10 CO<sub>2</sub>) ; diğer test mikroorganizmaları için ise aerobik inkübasyon koşullarında 37 °C'de 24 saat boyunca bekletilmiştir. İnkübasyon sonunda meydana gelen inhibisyon zon çapları ölçülerek antibakteriyel aktivite tayini yapılmıştır.

### 3. BULGULAR (FINDINGS)

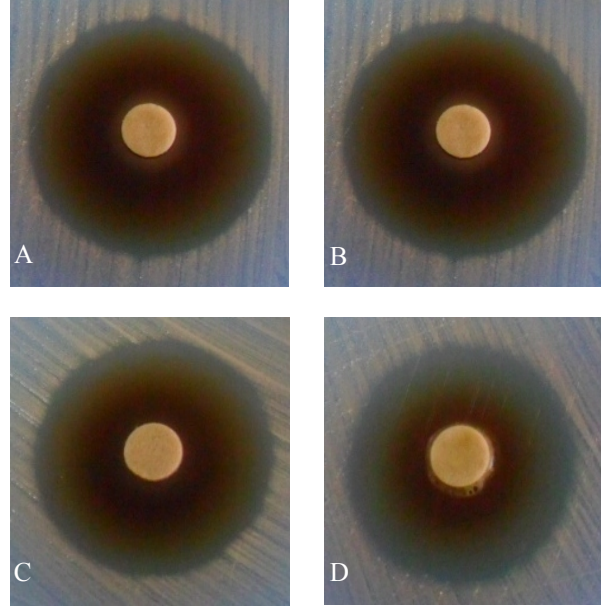
*Punica granatum* L. meyve kabuklarından hazırlanan ekstraktların antibakteriyel aktivitesinin araştırıldığı bu çalışmada, test mikroorganizmalarına karşı meydana gelen inhibisyon zon çapı ölçümleri Tablo 1'de verilmiştir.

Deney sonuçlarına göre ekstraktların gösterdiği en yüksek inhibitör etkinin *Staphylococcus aureus* ve *Staphylococcus epidermidis* bakterilerine karşı olduğu gözlenmiştir.

Ekstraktlar; *Salmonella abony*, *Escherichia coli*, *Streptococcus mitis* ve *Streptococcus salivarius* bakterilerine karşı sınırlı antibakteriyel etki göstermiştir. *Streptococcus mutans*, *Bacillus subtilis*, *Enterococcus faecalis* ve *Salmonella typhimurium* bakterilerine karşı ise inhibitör etki göstermediği belirlenmiştir.



Şekil 1. *Punica granatum* L. ekstraktlarının (6400 µg/10 µl) *Staphylococcus epidermidis*'e karşı oluşturdukları inhibisyon zon çapları [ A- Etanol ekstraktı (30 mm), B- Aseton ekstraktı (29 mm), C- Metanol ekstraktı (28 mm), D- Etil asetat ekstraktı (24 mm) ] ( Inhibition zone diameters of *Punica granatum* L. fruit skin extracts (6400µg/10 µl) to *Staphylococcus epidermidis* [A-Ethanol extract (30 mm), the B-acetone extract (29 mm), C-methanol extract (28 mm), D-ethyl acetate extract (24 mm)])



Şekil 2. *Punica granatum* L. ekstraktlarının (6400µg/10 µl) *Staphylococcus aureus*'a karşı oluşturdukları inhibisyon zon çapları [ A- Etanol ekstraktı (22 mm), B- Aseton ekstraktı (24 mm), C- Metanol ekstraktı (20 mm), D- Etil asetat ekstraktı (18 mm) ] ( Inhibition zone diameters of *Punica granatum* L. fruit skin extracts (6400µg/10 µl) to *Staphylococcus aureus* [A-Ethanol extract (22 mm), the B-acetone extract (24 mm), C-methanol extract (20 mm), D-ethyl acetate extract (18 mm)])

Tablo 1. *Punica granatum* L. meyve kabuk ekstraktlarının oluşturduğu inhibisyon zon çapları [Sm1, *Streptococcus mitis*; Ss, *Streptococcus salivarius*; Sm2, *Streptococcus mutans*; Se, *Staphylococcus epidermidis*; Ec, *Escherichia coli*; Sa1, *Staphylococcus aureus*; Bs, *Bacillus subtilis*; Sa2, *Salmonella abony*; St, *Salmonella typhimurium*; Ef, *Enterococcus faecalis*. (Inhibition zone diameters of *Punica granatum* L. fruit skin extracts

[Sm1, *Streptococcus mitis*, Ss, *Streptococcus salivarius*, SM2, *Streptococcus mutans*, Se, *Staphylococcus epidermidis*, Ec, *Escherichia coli*; Sa1, *Staphylococcus aureus*, Bs, *Bacillus subtilis*, Sa2, *Salmonella abony*, St, *Salmonella typhimurium*, Ef, *Enterococcus faecalis*)

Ekstrakt	Test Mikroorganizmaları									
	Sm1	Ss	Sm2	Se	Ec	Sa1	Bs	Sa2	St	Ef
İnhibisyon zonları (mm)										
Etanol										
6400 µg	12	8	0	30	10	22	0	10	0	0
3200 µg	9	0	0	24	8	20	0	8	0	0
1600 µg	7	0	0	20	0	17	0	0	0	0
800 µg	0	0	0	16	0	16	0	0	0	0
400 µg	0	0	0	14	0	14	0	0	0	0
Kontrol	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Aseton										
6400 µg	12	9	0	29	0	24	8	8	0	0
3200 µg	10	7	0	25	0	22	0	7	0	0
1600 µg	7	0	0	20	0	20	0	0	0	0
800 µg	0	0	0	19	0	15	0	0	0	0
400 µg	0	0	0	15	0	9	0	0	0	0
Kontrol	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Metanol										
6400 µg	10	0	0	28	0	20	0	0	0	0
3200 µg	8	0	0	24	0	18	0	0	0	0
1600 µg	0	0	0	20	0	17	0	0	0	0
800 µg	0	0	0	15	0	15	0	0	0	0
400 µg	0	0	0	12	0	12	0	0	0	0
Kontrol	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Etil asetat										
6400 µg	0	0	0	24	0	18	9	0	0	0
3200 µg	0	0	0	19	0	15	0	0	0	0
1600 µg	0	0	0	15	0	9	0	0	0	0
800 µg	0	0	0	10	0	0	0	0	0	0
400 µg	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Kontrol	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Klindamisin (10 µg)	34	40	48	35	7	31	10	7	0	14
Tetrasiklin (10 µg)	31	28	26	8	17	19	8	15	0	8
Amoksisilin- Klavulanat (30 µg)	42	45	5	32	24	30	38	30	29	24

#### 4. SONUÇ VE TARTIŞMA (CONCLUSION AND DISCUSSION)

*Punica granatum* L. ‘Nar’, *Citrus paradisi* Mc. Fad. ‘Greyfurt’, *Cydonia oblonga* Miller ‘Ayva’, *Musa sapientum* L. ‘Muz’ meyve suları ile kabuk ekstraktlarının antibakteriyel ve antifungal aktivitelerinin Dağcı ve arkadaşları tarafından araştırıldığı çalışmada; *P. granatum* aseton, etil alkol ve sulu ekstraktlarının test edilen mikroorganizmalar üzerinde 12-34 mm inhibisyon zonu ile en etkili bitki olduğu tespit edilmiştir. *P. granatum* etil alkol, aseton ve sulu ekstraktlarının *E. coli*’ye karşı sırasıyla 12, 14, 0 mm, *E. faecalis*’e karşı 20, 19, 15 mm ve *S. aureus*’a karşı 17, 16, 24 mm inhibisyon zonu meydana getirdiği belirlenmiştir [8].

*Punica granatum* L. bitkisinin kurutulmuş yapraklarının ve meyve kabuklarının antimikrobiyal aktivitesinin belirlendiği bir çalışmada; hazırlanan hekzan, etil asetat, metanol ve su ekstraktlarının *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium*, *Bacillus subtilis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae* bakterilerine karşı inhibitör etkileri incelenmiştir. Meyve kabuğu metanol ve etil asetat ekstraktlarının *S. aureus*’a karşı 27-30 mm, *B. subtilis*’e karşı 28-32 mm, *S. typhimurium*’a karşı 27-30 mm inhibisyon zonu oluşturduğu belirtilmiştir. *E. coli*’ye karşı metanol ekstraktında inhibisyon zonu gözlenmemişken etil asetat ekstraktında 30 mm’lik zonu çapı gözlenmiştir. Ayrıca *S. aureus*’a karşı yaprak etil asetat ekstraktının (27 mm) ve su, metanol ekstraktının (32 mm) en yüksek inhibisyon zonu çapını oluşturduğu belirtilmiştir [9]. Bu çalışmanın sonuçları ile bizim çalışmamızın sonuçları bazı bakteriler için paralellik gösterirken bazıları için paralellik göstermemiştir. Çalışmamızda etil asetat ve metanol ekstraktları *S. aureus*’a karşı sırasıyla 18, 20 mm inhibisyon zonu oluşturmuş; fakat *S. typhimurium*, *B. subtilis* ve *E. coli* bakterilerine karşı inhibitör etki gözlenmemiştir.

Taze nar meyve kabuklarının antibakteriyel etkisinin incelendiği bir başka çalışmada, ellagitanen punicalagin’i elde etmek için kromatografik teknikler kullanılarak etil asetat ekstraktı fraksiyonlarına ayrılmıştır. Metisiline dirençli *Staphylococcus aureus* bakterisine karşı punicalagin maddesinin aktif olduğu gözlemlenmiştir. Punicalagin maddesinin, narın antimikrobiyal aktivitesinden sorumlu madde olduğu ileri sürülmüştür [10].

Nar meyve kabuğunun yapısındaki fenolik bileşiklerin antibakteriyel etkilerinin araştırılması amacı ile yapılan bir çalışmada [11], elde edilen % 13 ellagic asit içeren standardize kuru nar kabuğu ekstraktının gram pozitif bakterilerden *S. aureus*’a karşı 15.2 -19.4 mm ve *S.*

*epidermidis*’e karşı 19.1 mm inhibisyon zonu çapı oluşturduğu, gram negatif bakterilerden *E. coli* ve *S. typhimurium*’a karşı inhibitör etki göstermediği saptanmıştır. Bu çalışmanın sonuçları ile bizim çalışmamızın sonuçları paralellik göstermiştir. Çalışmamızda *S. aureus*’a karşı 18-24 mm ve *S. epidermidis*’e karşı 24-30 mm inhibisyon zonu çapı gözlenirken, *S. typhimurium*’a karşı inhibitör etki gözlenmemiştir.

Dahham ve arkadaşları tarafından nar meyve kabuğu metanol ekstraktının antibakteriyel etkisinin araştırıldığı çalışmada [12], *Staphylococcus aureus* bakterisine karşı (25 mm) belirlenen inhibisyon zonu değeri bizim çalışmamızdaki metanol ekstraktı değeri (20 mm) ile paralellik göstermiştir. Buna karşılık çalışmada elde edilen ekstraktın *Bacillus subtilis* ve *Escherichia coli* bakterilerine karşı antibakteriyel etki gösterdiği ileri sürülürken, bizim çalışmamızda ise bu bakterilere karşı antibakteriyel aktivite gözlenmemiştir.

Gıda kaynaklı bakterilere karşı, aralarında *Punica granatum* L. bitkisinin de bulunduğu 46 baharat ve tıbbi bitkiden hazırlanan metanol ekstraktlarının antibakteriyel etkileri incelenmiştir. Shan ve arkadaşları tarafından yapılan çalışmada *Punica granatum* L. bitkisinin *S. aureus* (32.3 mm) ve *E. coli* (14.5 mm) bakterilerine karşı güçlü inhibitör etki gösterdiği belirtilmiştir. Çalışmada, kullanılan diğer bitkiler arasında *Punica granatum* bitkisinin en yüksek toplam fenolik bileşik içeriğine (22.6 gr gallik asit/100 gr kuru ağırlık) sahip olduğu belirlenmiş ve antibakteriyel aktivite ile fenolik bileşik içeriği arasında bir ilişkinin var olduğu ileri sürülmüştür [13].

Çalışmamızda *Punica granatum* L. bitkisinin meyve kabuklarından hazırlanan ekstraktların, özellikle cilt florası ve burun mukozasında bulunan *Staphylococcus aureus* ve *Staphylococcus epidermidis* bakterilerine karşı güçlü antibakteriyel etki gösterdiği gözlenmiştir. Ayrıca ağız ve boğaz florasında bulunan viridans streptokoklardan *Streptococcus mitis* bakterisine karşı bitkinin antibakteriyel etkisinin olduğu ilk kez bu çalışmada belirlenmiştir.

İlerideki çalışmalarda, *Punica granatum* L. ham bitki ekstraktının etken maddesi elde edilerek farklı bakteriler üzerindeki antibakteriyel etkisi araştırılabilir. Nar meyve suyu ve konsantresi üretiminde ortaya çıkan meyve kabuğu posalarının antimikrobiyal madde üreticileri için ekonomik ham madde kaynağı olabileceği düşünülmektedir.

**KAYNAKLAR (REFERENCES)**

- [1] Dulger, B., Gonuz, A., Antimicrobial Activity of Certain Plants used in Turkish Traditional Medicine, *Asian Journal of Plant Sciences*, 3 (1): 104-107, 2004.
- [2] Parseh, H., Hassanpour, S., Emam-Djome, Z., Lavasani, A.S., Antimicrobial Properties of Pomegranate (*Punica granatum L.*) as a Tannin Rich Fruit: a Review, The 1th International and The 4th National Congress on Recycling of Organic Waste in Agriculture, Iran, 2012.
- [3] Naz, S., Ahmad, S., Rasool, S.A., Siddiqi, R., Sayeed, S.A., *In vitro* Antibacterial Activity of the Extracts Derived from *Terminalia catappa*, *Research Journal of Microbiology*, 2 (2): 180-184, 2007.
- [4] Newman, R. A., Lansky, E. P., Pomegranate: The Most Medicinal Fruit, Basic Health Publications, sf. 1-10, America, 2007.
- [5] Poyrazoğlu, E., Gökmen, V., Artık, N., Organic Acids and Phenolic Compounds in Pomegranates (*Punica granatum L.*) Grown in Turkey, *Journal of Food Composition and Analysis*, 15: 567-575, 2002.
- [6] Bele, A. A. Jadhav, V. M., Nikam, S. R., Kadam, V. J., Antibacterial Potential of Herbal Formulation, *Research Journal of Microbiology*, 4 (4): 164-167, 2009.
- [7] Davis, P.H., *Flora of Turkey and the East Aegeans Islands*, vol. 4, Edinburgh University Press, pp. 173-174, Edinburgh, 2008.
- [8] Dağcı, E. K., Dığrak, M., Bazı Meyve Ekstraktlarının Antibakteriyel ve Antifungal Aktiviteleri, *KSÜ Fen ve Mühendislik Dergisi*, 8(2), 2005.
- [9] Omoregie, E. H., Folashade, K. O., Ibrahim, I., Nkiruka, O. P., Sabo, A. M., Koma, O. S., Ibumeh, O. J., Phytochemical Analysis and Antimicrobial Activity of *Punica granatum L.* (fruit bark and leaves), *New York Science Journal*, 3(12), 2010.
- [10] Parashar, A., Gupta, C., Gupta, S. K., Kumar, A., Antimicrobial Ellagitannin from Pomegranate (*Punica granatum*) Fruits, *International Journal of Fruit Science*, 9: 226-231, 2009.
- [11] Panichayupakaranant, P., Tewtrakul, S., Yuenyongsawad, S., Antibacterial, Anti-inflammatory and Anti-allergic Activities of Standardised Pomegranate Rind Extract, *Food Chemistry*, 123: 400-403, 2010.
- [12] Dahham, S. S. Ali, M. N., Tabassum, H., Khan, M., Studies on Antibacterial and Antifungal Activity of Pomegranate (*Punica granatum L.*), *American-Eurasian J. Agric. & Environ. Sci.* 9 (3): 273-281, 2010.
- [13] Shan, B., Cai, Y-Z., Brooks, J. D. Corke, H., The *in vitro* Antibacterial Activity of Dietary Spice and Medicinal Herb Extracts, *International Journal of Food Microbiology*, 117: 112-119, 2007.