

T.C.
SAKARYA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

Punica granatum L. BİTKİSİNİN ANTİBAKTERİYEL
ETKİSİNİN ARAŞTIRILMASI

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Tuğba KONCA

Enstitü Anabilim Dalı : BİYOLOJİ

Tez Danışmanı : Yrd. Doç. Dr. Kenan TUNÇ

Temmuz 2012

T.C.
SAKARYA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

***Punica granatum* L. BİTKİSİNİN ANTİBAKTERİYEL
ETKİSİNİN ARAŞTIRILMASI**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Tuğba Konca

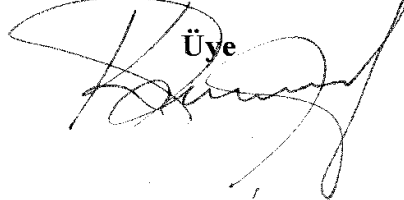
Enstitü Anabilim Dalı : BİYOLOJİ

Bu tez 19 / 07 /2012 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Oybirliği ile kabul edilmiştir.

**Prof. Dr. H. Benan DİNÇTÜRK
BOTOFTE
Jüri Başkanı**



Yrd. Doç. Dr. Kenan TUNÇ

Üye


Doç. Dr. Uğursoy OLGUN

Üye


TEŞEKKÜR

Yüksek lisans eğitimin ve tez çalışmam boyunca bilgi ve deneyimleri ile yardımcı olan, önerilerini ve desteğini esirgemeyen, bana yön veren saygıdeğer danışman hocam Sayın Yrd. Doç. Dr. Kenan TUNÇ'a;

Tez çalışmam boyunca gösterdikleri ilgiden ve yardımlarından dolayı değerli hocalarım Sayın Prof. Dr. H. Benan DİNÇTÜRK BOTOFTE ve Sayın Doç. Dr. Uğursoy OLGUN'a;

Çalışmalarım sırasında yardımlarını esirgemeyen arkadaşım Ayşegül HOŞ'a;

Tezimin yazım aşamasında katkıda bulunan canım kardeşim Kübra KONCA'ya;

Hayatım boyunca beni destekleyen sevgili aileme teşekkürlerimi sunarım.

İÇİNDEKİLER

TEŞEKKÜR	ii
İÇİNDEKİLER	iii
SİMGELER VE KISALTMALAR LİSTESİ.....	vi
ŞEKİLLER LİSTESİ	viii
TABLOLAR LİSTESİ.....	x
ÖZET.....	xi
SUMMARY.....	xii
BÖLÜM 1.	
GİRİŞ	1
BÖLÜM 2.	
KAYNAK ARAŞTIRMASI.....	3
2.1. Nar Bitkisinin Genel Özellikleri.....	3
2.2. <i>Punica granatum</i> Linn	4
2.2.1. <i>Punica granatum</i> L. bitki ağacı	4
2.2.2. <i>Punica granatum</i> L. bitki çiçeği	5
2.2.3. <i>Punica granatum</i> L. bitki yaprağı.....	6
2.2.4. <i>Punica granatum</i> L. bitki meyvesi.....	7
2.3. Nar Bitkisinin Farmasötik ve Kimyasal Özelliklerine Yönelik Yapılan Çalışmalar	10

BÖLÜM 3.

TEST MİKROORGANİZMALARI	17
3.1. Giriş	17
3.2. Viridans Streptokoklar	20
3.3. <i>Staphylococcus aureus</i>	23
3.4. <i>Staphylococcus epidermidis</i>	26
3.5. <i>Escherichia coli</i>	27
3.6. <i>Enterococcus faecalis</i>	29
3.7. <i>Bacillus subtilis</i>	30
3.8. <i>Salmonella</i> Bakterileri	31

BÖLÜM 4.

MATERYAL VE YÖNTEM.....	33
4.1. Materyal	33
4.1.1. Materyal Eldesi	33
4.1.2. Deneylerde Kullanılan Mikroorganizmalar	33
4.1.3. Kullanılan Maddeler	34
4.1.4. Kullanılan Araç ve Gereçler	35
4.2. Yöntem.....	36
4.2.1. Bitkinin Özütleme	36
4.2.1.1. Nar meyve kabuklarının özütleme için hazırlanması	36
4.2.1.2. Direk özütleme	36
4.2.2. Çözücünün Uzaklaştırılması	36
4.2.3. Besiyerlerinin Hazırlanması	37
4.2.4. Test Mikroorganizmalarının Hazırlanması	37
4.2.5. Antibakteriyel Aktivite Tayini.....	38
4.2.5.1. Disk difüzyon metodu	38
4.2.5.2. Deneyin yapılışı.....	39
4.2.5.3. Zon çaplarının ölçülmesi	39

BÖLÜM 5.

DENEYSEL BULGULAR.....	40
5.1. Deneysel Sonuçlar	40
5.2. <i>Punica granatum</i> L. bitkisinin <i>Staphylococcus epidermidis</i> üzerine etkisi..	41
5.3. <i>Punica granatum</i> L. bitkisinin <i>Staphylococcus aureus</i> üzerine etkisi.....	44
5.4. <i>Punica granatum</i> L. bitkisinin <i>Streptococcus mitis</i> üzerine etkisi.....	47
5.5. <i>Punica granatum</i> L. bitkisinin <i>Streptococcus salivarius</i> üzerine etkisi	49
5.6. <i>Punica granatum</i> L. bitkisinin <i>Streptococcus mutans</i> üzerine etkisi	51
5.7. <i>Punica granatum</i> L. bitkisinin <i>Escherichia coli</i> üzerine etkisi.....	54
5.8. <i>Punica granatum</i> L. bitkisinin <i>Salmonella abony</i> üzerine etkisi	56
5.9. <i>Punica granatum</i> L. bitkisinin <i>Salmonella typhimurium</i> üzerine etkisi.....	58
5.10. <i>Punica granatum</i> L. bitkisinin <i>Bacillus subtilis</i> üzerine etkisi	60
5.11. <i>Punica granatum</i> L. bitkisinin <i>Enterococcus faecalis</i> üzerine etkisi	62

BÖLÜM 6.

TARTIŞMA VE ÖNERİLER.....	64
KAYNAKLAR	67
EKLER	74
ÖZGEÇMİŞ.....	84

SİMGELER VE KISALTMALAR LİSTESİ

AMC	: Amoksisilin-Klavulanik asit
ATCC	: Amerikan Tipi Kültür Koleksiyonu
atm.	: Atmosfer Basıncı
<i>B. subtilis</i>	: <i>Bacillus subtilis</i>
cm	: Santimetre
CNCTC	: Çekoslovak Ulusal Tip Kültür Koleksiyonu
CFU	: Colony Forming Unit (Koloni Oluşturan Birim)
CO ₂	: Karbondioksit
DA	: Klindamisin
dk	: Dakika
DMSO	: Dimetil sülfoksit
<i>E.coli</i>	: <i>Escherichia coli</i>
<i>E. faecalis</i>	: <i>Enterococcus faecalis</i>
gr	: Gram
M.Ö	: Milattan önce
MIC	: Minimum İnhibisyon Konsantrasyonu
MBC	: Minimum Bakterisidal Konsantrasyon
m	: Metre
mg	: Miligram
ml	: Mililitre
mm	: Milimetre
µg	: Mikrogram
µl	: Mikrolitre
µm	: Mikrometre

NCTC	: Ulusal Tip Kùltür Koleksiyonu
<i>P. granatum</i>	: <i>Punica granatum</i>
pH	: Bir çözeltilinin asitlik ve bazlık derecesi
ppm	: parts per million (milyonda bir kısım)
<i>S. abony</i>	: <i>Salmonella abony</i>
<i>S. aureus</i>	: <i>Staphylococcus aureus</i>
<i>S. epidermidis</i>	: <i>Staphylococcus epidermidis</i>
<i>S. mitis</i>	: <i>Streptococcus mitis</i>
<i>S. mutans</i>	: <i>Streptococcus mutans</i>
<i>S. salivarius</i>	: <i>Streptococcus salivarius</i>
<i>S. typhimurium</i>	: <i>Salmonella typhimurium</i>
sp.	: Species (tür)
SPRE	: Standardize Nar Kabuğu Ekstraktı
TE	: Tetrasiklin
vb.	: ve benzeri
°C	: Derece santigrat
%	: Yüzde

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 2.1.	<i>Punica granatum</i> L. bitkisinin meyve ağacı.....	4
Şekil 2.2.	<i>Punica granatum</i> L. bitkisinin çiçeği.....	5
Şekil 2.3.	<i>Punica granatum</i> L. bitkisinin yaprağı.....	6
Şekil 2.4.	<i>Punica granatum</i> L. bitkisinin meyvesi.....	7
Şekil 2.5.	Punicalagin ve Ellagic Asit kimyasal yapısı.....	8
Şekil 3.1.	Bakteri hücresinin genel görünümü.....	17
Şekil 3.2.	Gram pozitif ve Gram negatif bakterilerin hücre duvar yapıları.....	18
Şekil 3.3.	Viridans streptokokların hemoliz görünümleri.....	21
Şekil 3.4.	<i>Streptococcus mutans</i> bakterisinin genel görünümü.....	22
Şekil 3.5.	<i>Streptococcus salivarius</i> bakterisinin genel görünümü.....	23
Şekil 3.6.	<i>Streptococcus aureus</i> bakterisinin genel görünümü.....	24
Şekil 3.7.	<i>Staphylococcus epidermidis</i> bakterisinin genel görünümü.....	26
Şekil 3.8.	<i>Escherichia coli</i> bakterisinin genel görünümü.....	27
Şekil 3.9.	<i>Enterococcus faecalis</i> bakterisinin genel görünümü.....	29
Şekil 3.10.	<i>Bacillus subtilis</i> bakterisinin genel görünümü.....	30
Şekil 3.11.	<i>Salmonella typhimurium</i> bakterisinin genel görünümü.....	31
Şekil 5.1.	<i>Punica granatum</i> L. bitki ekstraktlarının <i>Staphylococcus epidermidis</i> üzerine etkisi: a-b) Etanol ekstraktı, c-d) Aseton ekstraktı, e) Metanol ekstraktı, f) Etil asetat ekstraktı, g-h-ı) Antibiyotikler.....	42

- Şekil 5.2. *Punica granatum* L. bitki ekstraktlarının *Staphylococcus aureus* üzerine etkisi: a-b) Etanol ekstraktı, c-d) Aseton ekstraktı, e) Metanol ekstraktı f) Etil asetat ekstraktı, g-h-ı) Antibiyotikler45
- Şekil 5.3. *Punica granatum* L. bitki ekstraktlarının *Streptococcus mitis* üzerine etkisi: a-b) Etanol ekstraktı, c) Aseton ekstraktı, d) Metanol ekstraktı e) Etil asetat ekstraktı, f) Antibiyotikler48
- Şekil 5.4. *Punica granatum* L. bitki ekstraktlarının *Streptococcus salivarius* üzerine etkisi: a-b) Etanol ekstraktı, c) Aseton ekstraktı, d) Metanol ekstraktı, e) Etil asetat ekstraktı, f) Antibiyotikler50
- Şekil 5.5. *Punica granatum* L. bitki ekstraktlarının *Streptococcus mutans* üzerine etkisi: a-b) Etanol ekstraktı, c) Aseton ekstraktı, d) Metanol ekstraktı, e) Etil asetat ekstraktı, g-h-ı) Antibiyotikler.....52
- Şekil 5.6. *Punica granatum* L. bitki ekstraktlarının *Escherichia coli* üzerine etkisi: a-b) Etanol ekstraktı, c) Aseton ekstraktı, d) Metanol ekstraktı, e) Etil asetat ekstraktı, f) Antibiyotikler55
- Şekil 5.7. *Punica granatum* L. bitki ekstraktlarının *Salmonella abony* üzerine etkisi: a-b) Etanol ekstraktı, c) Aseton ekstraktı, d) Metanol ekstraktı, e) Etil asetat ekstraktı, f) Antibiyotikler57
- Şekil 5.8. *Punica granatum* L. bitki ekstraktlarının *Salmonella typhimurium* üzerine etkisi: a-b) Etanol ekstraktı, c) Aseton ekstraktı, d) Metanol ekstraktı, e) Etil asetat ekstraktı, f) Antibiyotikler59
- Şekil 5.9. *Punica granatum* L. bitki ekstraktlarının *Bacillus subtilis* üzerine etkisi: a-b) Etanol ekstraktı, c) Aseton ekstraktı, d) Metanol ekstraktı, e) Etil asetat ekstraktı, f) Antibiyotikler61
- Şekil 5.10. *Punica granatum* L. bitki ekstraktlarının *Enterococcus faecalis* üzerine etkisi: a-b) Etanol ekstraktı, c) Aseton ekstraktı, d) Metanol ekstraktı, e) Etil asetat ekstraktı, f) Antibiyotikler.....63

TABLULAR LİSTESİ

Tablo 2.1.	Nar Bitki Sistematığı	3
Tablo 3.1.	Viridans Grubu Streptokokların Sınıflandırılması	20
Tablo 4.1.	Kirby - Bauer yönteminin standartları.....	38
Tablo 5.1.	<i>Punica granatum</i> L. bitkisinin <i>S. epidermidis</i> üzerine etkisi.....	41
Tablo 5.2.	<i>Punica granatum</i> L. bitkisinin <i>S. aureus</i> üzerine etkisi	44
Tablo 5.3.	<i>Punica granatum</i> L. bitkisinin <i>S. mitis</i> üzerine etkisi	47
Tablo 5.4.	<i>Punica granatum</i> L. bitkisinin <i>S. salivarius</i> üzerine etkisi.....	49
Tablo 5.5.	<i>Punica granatum</i> L. bitkisinin <i>S. mutans</i> üzerine etkisi.....	51
Tablo 5.6.	<i>Punica granatum</i> L. bitkisinin <i>E. coli</i> üzerine etkisi.....	54
Tablo 5.7.	<i>Punica granatum</i> L. bitkisinin <i>S. abony</i> üzerine etkisi	56
Tablo 5.8.	<i>Punica granatum</i> L. bitkisinin <i>S. typhimurium</i> üzerine etkisi	58
Tablo 5.9.	<i>Punica granatum</i> L. bitkisinin <i>B. subtilis</i> üzerine etkisi	60
Tablo 5.10.	<i>Punica granatum</i> L. bitkisinin <i>E. faecalis</i> üzerine etkisi	62

ÖZET

Anahtar kelimeler: *Punica granatum* L., Nar kabuğu, Antibakteriyel aktivite, Disk difüzyon metodu, Viridans streptokoklar

Bu çalışmada, *Punica granatum* L. (Nar) bitkisinin meyve kabuklarından elde edilen ekstraktların (etanol, aseton, metanol, etil asetat) *Streptococcus mitis* CNCTC 4/77, *Streptococcus mutans* CNCTC 8/77, *Streptococcus salivarius* CNCTC 64/59, *Staphylococcus epidermidis* ATCC 12228, *Staphylococcus aureus* ATCC 29213, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Salmonella typhimurium* ATCC 14028, *Salmonella abony* NCTC 6017, *Enterococcus faecalis* ATCC 29212, *Bacillus subtilis* ATCC 6633 bakteri suşlarına karşı *in vitro* ortamda antibakteriyel aktivitesi araştırılmıştır.

Kurutulup toz haline getirilen meyve kabukları farklı çözücüler kullanılarak ekstrakte edilmiştir. Hazırlanan ekstraktların antibakteriyel aktivitesi disk difüzyon metodu kullanılarak belirlenmiştir.

Ekstraktların, en yüksek antibakteriyel aktiviteyi 24 mm'lik etki çapı ile *Staphylococcus aureus* ve 30 mm'lik etki çapı ile *Staphylococcus epidermidis* bakterilerine karşı gösterdiği tespit edilmiştir. Ekstraktlar; *Salmonella abony*, *Escherichia coli*, *Streptococcus mitis* ve *Streptococcus salivarius* bakterilerine karşı sınırlı inhibitör etki (yaklaşık 7-12 mm'lik etki çapı) göstermiştir. *Streptococcus mutans*, *Bacillus subtilis*, *Enterococcus faecalis* ve *Salmonella typhimurium* bakterilerine karşı ise antibakteriyel etki göstermediği belirlenmiştir.

INVESTIGATION OF ANTIBACTERIAL ACTIVITY OF *Punica granatum* L.

SUMMARY

Keywords: *Punica granatum* L., Pomegranate peel, Antibacterial activity, Disc diffusion method, Viridans streptococci

In this study, antibacterial activity of *Punica granatum* L. (pomegranate) extracts (ethanol, acetone, methanol, ethyl acetate) obtained from fruit peel of the plants against bacterial strains of *Streptococcus mitis* CNCTC 4/77, *Streptococcus mutans* CNCTC 8/77, *Streptococcus salivarius* CNCTC 64/59, *Staphylococcus epidermidis* ATCC 12228, *Staphylococcus aureus* ATCC 29213, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Salmonella typhimurium* ATCC 14028, *Salmonella abony* NCTC 6017, *Enterococcus faecalis* ATCC 29212, *Bacillus subtilis* ATCC 6633 was investigated *in vitro*.

The fruit peels of the plant were dried and then were extracted by using different solvents. The antibacterial activity of these extracts was evaluated by disc diffusion method.

The highest antibacterial activity was observed against *Staphylococcus aureus* with an inhibition zone of 24 mm and *Staphylococcus epidermidis* with an inhibition zone of 30 mm. The extracts showed limited inhibition effect (about 7-12 mm inhibition zones) against *Salmonella abony*, *Escherichia coli*, *Streptococcus mitis* and *Streptococcus salivarius*, whereas there was no activity against *Streptococcus mutans*, *Bacillus subtilis*, *Enterococcus faecalis* and *Salmonella typhimurium*.

BÖLÜM 1. GİRİŞ

Yirminci yüzyılın başlarına kadar insan organizmasına zarar verilmeden mikroorganizmaları etkilemenin mümkün olmayacağı düşünülmüştür. Yine de antimikrobik tedavi yöntemleri bilinçsiz olarak M.Ö. 2500 yıllarında başlatılmış ve o devirlerde enfeksiyon hastalıklarının tedavisinde bitki kökleri, şarap, küf gibi maddeler kullanılmıştır. Örneğin; Çin’de stafilokoksik deri enfeksiyonlarında lezyonların üzerine küf konularak tedavi uygulanmıştır. 1600’lü yıllarda Güney Amerika’da, insanlar Cinchona (Kınakına) bitkisinin kabuklarını yiyerek sıtmadan korunmuşlar; Ipeka (Altın kökü) bitkisinin kök ekstresini kullanarak amipli dizanteri hastalığını tedavi etmişlerdir. Yıllar sonra Cinchona bitkisinin kabuğunda kinin maddesinin, Ipeka bitkisinin köklerinde ise emetin maddesinin bulunduğu belirlenmiş ve bu maddeler saflaştırılarak sıtmanın ve amipli dizanterinin tedavisinde kullanılmıştır [1].

Günümüzde hem kırsal kesimde hem de şehirlerde, hastalıkların tedavisinde ve hastalıklardan korunmak için diğer tedavi seçeneklerinin yanı sıra bitkiler ve bitkisel ilaçlardan yararlanılmaktadır. Tıbbi bitkiler ile tedavi bir kültür ve gelenek varlığına dayandığından halk ilacı olarak kullanılan bitkiler üzerindeki araştırmalar gittikçe önem kazanmaktadır [2].

Türkiye; Avrupa-Sibirya, Akdeniz ve İran-Turan bölgesi olmak üzere üç temel bitki coğrafyasının kesişim bölgesinde yer alması nedeniyle, tıbbi ve aromatik bitkiler bakımından zengin bir çeşitlilik sergilemektedir. Türkiye’de yayılış gösteren 9000 üzerinde bitki türünden 500 kadarı ilaç ve koku ham maddesi olarak kullanılmaktadır [3].

Bir tıbbi bitkinin etken organı, kurutma gibi bir işlem ile devamlı olarak saklanabilir bir hale getirilirse, istenilen bir yerde, istenilen bir zamanda kullanılmaya hazır bir drog haline gelmiş demektir. Droglardan da hareket edilerek ilaçlar hazırlanır. Örneğin; bir bitkinin çiçekleri toplanıp kurutuluyor ve bu çiçeklerden hazırlanan enfüzyon ilaç olarak kullanılıyorsa, kurutulmuş bu çiçek bir drogtur.

Bitkisel droglar, kökenlerine göre iki grup altında toplanır:

1. Bir bitkinin tamamından veya herhangi bir parçasından ibaret olan droglar.
2. Bitkide doğal veya ikincil olarak gelişen veya bitkiden özel bir işlem sonucunda elde edilen droglar [4].

Tıbbi bitkilerin yaygın olarak kullanılmaya başlanmasının bazı önemli sebepleri şöyle sıralanabilir;

1. Yeterli düzeyde kimya endüstrisine sahip olmayan ülkelerde bitkilerden yararlanarak kolay ve ucuz bir tedavi olanağı sağlanmaktadır.
2. Tedavi alanında kullanılmaya başlayan yeni sentetik maddelerin bazılarında görülen yan etkiler: Bitkisel droglar çok uzun zamanlardan beri tedavide kullanıldıkları için yan etkileri iyi bilinmektedir. Buna karşılık sentetik ilaçların bazı tehlikeli yan etkilerinin bulunduğu ancak kullanıma başlandıktan sonra anlaşılmaktadır.
3. Bazı bitkisel ilaç hammaddelerinin, sentetik olanlardan daha ucuza elde edilebilme olanakları.
4. Bitkisel drogların diğer bir üstün yanı da birkaç etkiye birden sahip olmalarıdır. Sentetik bileşikler genellikle bir tek etkiye sahiptirler ve bunların bazılarının yan etkilerini önlemek için diğer bazı ilaçlara ihtiyaç duyulmaktadır [5].

Çalışmamızda; farklı çözücüler ile hazırlanan *Punica granatum* L. (Nar) meyve kabuk ekstraktlarının, çeşitli bakterilere karşı, disk difüzyon metodu ile antibakteriyel etkisinin incelenmesi amaçlanmıştır.

BÖLÜM 2. KAYNAK ARAŞTIRMASI

2.1. Nar Bitkisinin Genel Özellikleri

Diğer bitkilerden farklı olarak, nar kendi botanik ailesi olan Punicaceae familyasından gelmektedir. Familyada sadece bir cins (*Punica*) ve baskın bir tür (*Punica granatum* L.) mevcuttur. *Punica* cinsinin ikinci türü olan *Punica protopunica* Balf. daha küçük ve daha ilkel bir ağaç (2.5-4.5 m yüksekliğinde, çalimsı) olarak yaşar [6]. Bu seyrek tür sadece Socotra adasında (Hint okyanusu) bulunmaktadır [7].

Tablo 2.1. Nar Bitki Sistematigi [7]

Alem	Plantae
Bölüm	Magnoliophyta
Sınıf	Magnoliopsida
Takım	Myrtales
Sınıf	Punicaceae
Cins	<i>Punica</i>
Tür	<i>Punica granatum</i> Linn. <i>Punica protopunica</i> Balf.f.

Nar, tropik ve subtropik bölgelerde yetişmektedir. Genel olarak sıcak, kurak Akdeniz ve doğu yönünde Hindistan ve Çin'e doğru yayılış göstermektedir [8]. Yaygın olarak Akdeniz ülkeleri (Türkiye, Tunus, Mısır, İspanya ve Fas), İran, Afganistan, Hindistan, az oranda da Çin, Japonya ve Rusya'da yetiştirilmektedir [9].

2.2. *Punica granatum* Linn.

2.2.1. *Punica granatum* L. bitki ağacı

Mayıs-Haziran aylarında çiçek açan, parlak ve açık yeşil renkli yapraklara sahip, 2-5 m. yüksekliğinde, çalimsı, uzun ömürlü bir ağaçtır [10, 11]. İnce, eğri ve toprak yüzeyinden başlayıp birçok sürgün vererek dallanan, birden fazla ve sık dallı gövdesi bulunmaktadır. İnce dalların uçları bazen dikenlidir. Organik maddece zengin, derin, geçirgen, hafif alkali yada nötr pH'daki topraklarda yetişmektedir [12]. Ağacın kabuğu, bitki genç iken kırmızımsı kahverengi; bitki olgunlaştığında grimsi bir tondadır [7]. Kök ve gövde kabuğu nişasta, mannit, reçineli maddeler, triterpenik asitler (ursolik asit, betulinik asit ve oleanolik asit), tanen ve tanen ile birleşmiş halde pelletierin (=punicin), isopelletierin ve metilpelletierin ismi verilen alkaloidler taşır [10]. Alkaloid miktarı gövde kabuklarında % 0.7 ve kök kabuklarında ise % 0.5'dir [13]. Nar ağacı kabuğu, yüzyıllar boyunca insanların gastrointestinal bölgesinde yaşayan tenyalara karşı geleneksel ilaç olarak kullanılmıştır [7].



Şekil 2.1. *Punica granatum* L. bitkisinin meyve ağacı

2.2.2. *Punica granatum* L. bitki çiçeği

Portakal kırmızısı renkte olan çiçekler hemen hemen sapsızdır. Teker teker veya 2-3 tanesi bir arada bulunmaktadır. Kaliks ve petaller kırmızı, filament pembe, anter sarı renklidir [10]. Erdişi olan çiçekler, epigin ve aktinomorf simetridir. Ovaryum alt durumlu; iki katlı ve katlar üst üstedir. Alt kat, üç bölmeli ve eksensel; üst kat, altı bölmeli ve çeperseldir [14]. Çiçeklerde sepal sayısı 5-7, petal sayısı 5-7 adettir. Stamenler ise çok sayıdadır [8, 11].



Şekil 2.2. *Punica granatum* L. bitkisinin çiçeği

Tıbbi amaçlı kullanımları olan ve çay olarak tüketilen 32 bitkinin (nar çiçeği, adaçayı, alıç, altın otu, anason, biberiye, civanperçemi, çördük, fesleğen, funda, hatmi, ıhlamur, ısırgan, kantaron, karabaş, kekik, kuşburnu, lavanta, melisa, mercanköşk, meyan kökü, nane, ökse, papatya, rezene, sinameki, siyah ve yeşil çay, şahtere, yaban mersini, zencefil, zerdeçal) fenolik bileşik içerikleri ve antioksidan aktivitelerinin karşılaştırıldığı bir çalışmada; nar çiçeğinin en yüksek antioksidan özelliğe sahip olduğu ve bunu yeşil çayın takip ettiği belirtilmiştir. Çalışmada, nar çiçeğinin ve yeşil

çayın antioksidan aktiviteleri karşılaştırıldığında; nar çiçeğinin gösterdiği aktivitenin yeşil çayın gösterdiği aktiviteden neredeyse iki kat fazla olduğu gözlenmiştir. Toplam fenolik madde tayininde incelenen bitkiler arasında, nar bitkisinin çiçek kısımlarının en yüksek düzeyde (165.9 ± 6.0 mg gallik asit / g kuru ağırlık), buna karşın ısırgan otu bitkisinin saplarının ise en düşük düzeyde (2.7 ± 0.7 mg gallik asit / g kuru ağırlık) fenolik bileşik içerdiği belirtilmiştir [15].

2.2.3. *Punica granatum* L. bitki yaprağı

Koyu yeşil renkli, derimsi ve tüsüz olan yaprağın kenarları düz, şekli lanseolattır. Yaprak, 4-8 cm uzunluğunda ve 1-3 cm genişliğindedir [11]. Bileşiminde, tanenler (punikalın, punikalagin, granitin A ve B, korilagin, punikafolin), flavonoidler (apigenin, luteolin ve glikozitleri) ve piperidin alkaloidi (dihidroksifenilpiridyum klorid) bulunmaktadır [16, 17].



Şekil 2.3. *Punica granatum* L. bitkisinin yaprağı

2.2.4. *Punica granatum* L. bitki meyvesi

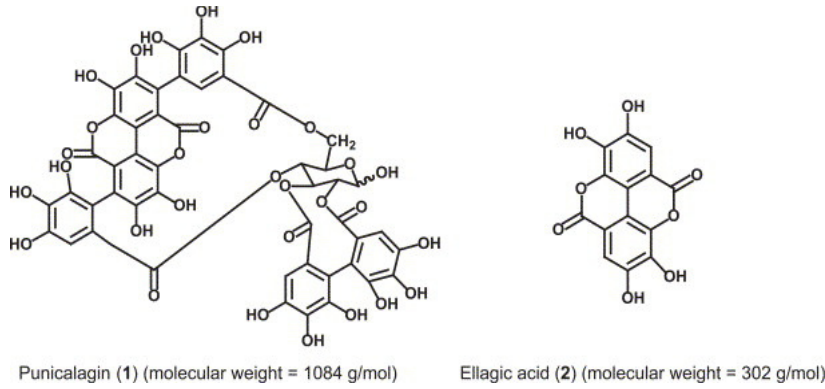
Üzümsü meyve olarak kategorilendirilen nar; portakal büyüklüğünde, 5-8 cm çapında, küre şeklinde, perikarpı derimsi olan çok tohumlu bir bakkadır. Derimsi kabuk sarı, koyu pembe veya kırmızı renkte olabilir [14]. Meyvenin sulu ve etli olan kısmı tohumlarının testa tabakasıdır ve bu durum bitkiler aleminde nar bitkisine özel bir yapıdır [13]. Meyvenin tepesinde bulunan ve yeşil renkte olan çıkıntılı kaliks, meyve olgunlaşınca kırmızımtrak-esmer bir renk alır [10].



Şekil 2.4. *Punica granatum* L. bitkisinin meyvesi

Nar meyvesinin % 15'i karbonhidrat, % 0.8'i protein, % 12 kadarı tanen olup; meyve B₁, B₂ ve C vitaminleri, kalsiyum, fosfor, potasyum ve demir bakımından zengindir. Meyvenin pH'ı 2.4-4.4 arasında belirtilmektedir [12]. Meyvenin kabuğu sert ve iştah kaçıracı olsa da sertliği terapötik kullanımında zengin bileşik içeriği anlamına gelmektedir. Farmakolojik aktivitesinin çoğu polifenol bileşiklerin varlığından kaynaklanmaktadır. Bu bileşikler doğal koruyucu ve güçlü antioksidan olan tanen ve flavonoidlerdir [7].

Hem nar kabuğunda hem de nar meyve suyunda bulunan spesifik ellagitanenler; punicalin ve punicalagindir. Punicalagin; hidrolize olabilen tanen grubu (gallik asit türevleri) bileşiklerinden, yüksek molekül ağırlıklı, suda çözünebilen fenolik bir bileşiktir [18, 19]. Antioksidan kapasitesi, yapısında bulunan ve disosiyasyon yapabilen 16 adet hidroksil (OH) grubu sayesinde ortaya çıkmaktadır [20].



Şekil 2.5. Punicalagin ve Ellagic Asit kimyasal yapısı [21]

Punicalagin; *Combretum molle* [22], *Terminalia myriocarpa* [23] ve *Terminalia oblongata* [24] bitkilerinde de bulunmaktadır.

Meyvede bulunan flavonoidler; antosiyanin, flavan-3-ols, flavon ve flavonollerdir. Flavan-3-ols, proantosiyaninlerin yapı taşları ve güçlü antioksidan olan kateşinleri içerir. Narda major organik asitlerden sitrik asit, L-malik asit ve okzalik asitin olduğu; suksinik, tartarik ve kinik asitin ise daha az miktarda bulunduğu bildirilmektedir [12, 19].

Meyve kabuğunun ekstraktları antibakteriyel, antifungal, antiviral ve antihelmintik aktivite göstermektedir. Bu özelliklerinden dolayı alternatif antibiyotik ilaç olarak kullanımı tavsiye edilmektedir [18].

Nar meyve kabuğunda ve meyve sularında antimikrobiyal aktivitenin temel nedeninin, meyvenin içerdiği fenolik maddelerden kaynaklandığı düşünülmektedir. Fenolik bileşiklerin antimikrobiyal etkisi; bakterilerin hücre duvarında bulunan polipeptidlerle reaksiyona girerek onları aktivite kaybına uğratması ve mikroorganizmanın sahip olduğu protein yapısındaki enzimleri inhibe etmesi mekanizmalarına dayandırılmaktadır [25].

Meyvenin olgunluk derecesine bağlı olarak; ham meyveler 'Ekşi nar', olgun meyveler ise 'Tatlı nar' olarak adlandırılmaktadır. Ekşi meyvenin kabuğu veya meyve suyu kabızlığı önleyici, tatlı meyvenin meyve suyu ise idrar artırıcı olarak kullanılmaktadır [5].

Nar meyvesinin taze veya kurutulmuş kabukları ile yün iplikler (özellikle angora yünü) -kullanılan mordana bağlı olarak- sarı, esmer sarı veya siyah renge boyanmaktadır [5, 26].

Meyvenin içindeki taneler, kabuğun içe doğru uzantısıyla oluşan odacıklarda yer alır. İçlerinde meyvenin tohumu olan çekirdekleri vardır. Nar tanelerinin içindeki beyaz tohumların kuru ağırlığının % 18'i yağdır [27]. Punisik asitçe yüksek olan yağlar cilt esnekliğini arttırıcı özelliğinden dolayı cilt bakımı için kullanılabilir [28].

Meyvenin suyunda; fenolik bileşikler (gallik asit, protokateşik asit, klorojenik asit, kafeik asit ve ferulik asit), flavonoidler (kateşin, kuersetin, floridzin), organik asitler (sitrik asit, tartarik asit ve süksinik asit), ve antosiyaninler (siyanidin, pelargonidin, delfinidin) bulunmaktadır [19]. İçeriğindeki antosiyaninler, meyve suyunun parlak kırmızı renginden sorumlulardır [7].

2.3. Nar Bitkisinin Farmasötik ve Kimyasal Özelliklerine Yönelik Yapılan Çalışmalar

Hicaznar ve genotipleri ile yapılan bir çalışmada, kurutulmuş kabukların su ekstraktlarının antibakteriyel etkisi agar kuyu difüzyon metodu kullanılarak incelenmiştir. Ekstraktların gösterdiği en yüksek inhibitör etkinin, çalışılan bakteriler arasında *Escherichia coli* bakterisine karşı olduğu, bunu *Staphylococcus aureus* ve *Salmonella enteritidis* bakterilerinin izlediği belirtilmiştir. Çalışma sonucunda gram (+) ve gram (-) bakteriler arasındaki duyarlılık farklılığının, hücre duvarı içerikleri ve sitoplazmik membrandan ileri geldiği belirtilmiştir. İncelenen genotipler arasında; en düşük antibakteriyel aktivite gösteren genotipin en yüksek total fenolik bileşik içeriğine ve en düşük asiditeye sahip olduğu belirlenmiştir [29]. Benzer sonuçlu bir çalışmada, Oliveira ve arkadaşları, ortamda sadece fenolik bileşikler (timol, carvacrol vs.) bulunduğu *Staphylococcus aureus* bakterisine karşı inhibitör etkinin düşük olduğunu; fenolik bileşikler ile birlikte laktik-asetik asit varlığında inhibitör etkinin arttığını belirtmişlerdir [30].

2010 yılında yapılan bir çalışmada, taze nar kabuklarından elde edilen metanol ekstraktının antibakteriyel etkisi *Bacillus subtilis*, *Bacillus cereus*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* ve *Klebsiella pneumoniae* bakterilerine karşı disk difüzyon metodu kullanılarak belirlenmiştir. Bu bakteriler arasında en yüksek inhibitör etkinin *Pseudomonas aeruginosa* (32 mm), en düşük inhibitör etkinin ise *Bacillus cereus* (12 mm) bakterilerine karşı olduğu belirtilmiştir [31].

Nar meyve kabuklarının antibakteriyel etkisinin incelendiği bir başka çalışmada, hidrolize tanen grubundan olan ellagitanen punicalagin maddesini elde etmek için kromatografik teknikler ile etil asetat ekstraktı fraksiyonlarına ayrılmıştır. Metisiline dirençli *Staphylococcus aureus* bakterisine karşı punicalagin maddesinin inhibitör etkisini belirten zon çapının 20 mm, MIC değerinin 61.5 µg/ml olduğu ve bu değerlere bağlı olarak punicalagin maddesinin, narın antimikrobiyal aktivitesinden sorumlu madde olduğu ileri sürülmüştür [32].

Negi ve Jayaprakasha, kurutulmuş nar kabuklarının etil asetat, aseton, metanol ve su ekstraktlarının antibakteriyel etkisini *Bacillus cereus*, *Bacillus coagulans*, *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* ve *Pseudomonas aeruginosa* bakterilerine karşı incelemiştir. Antibakteriyel ölçümün dökme plak metodu ile yapıldığı çalışmada en yüksek antibakteriyel aktiviteyi aseton ekstraktının (150 ppm) gösterdiği, bunu metanol ve su ekstraktlarının izlediği belirtilmiştir. Ayrıca ekstraktların fenolik bileşik içerikleri; etil asetat 170 mg/g, aseton 400 mg/g, metanol 460 mg/g ve su 140 mg/g olarak hesaplanmıştır [33].

Duman ve arkadaşları çalışmalarında, Türkiye’de Akdeniz bölgesinde yetişen 6 çeşit nar bitkisinin (Katırbaşı, Tatlı, Şerife, Ekşi, Kan, Dikenli İncekabuk) kullanmışlardır. Antibakteriyel aktivite tayininde agar kuyu difüzyon metodunun kullanıldığı çalışmada *Bacillus megaterium*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Corynebacterium xerosis*, *Escherichia coli*, *Enterococcus faecalis* ve *Micrococcus luteus* bakterilerine karşı meyve örneklerinin zırları bulamaç haline getirilerek kullanılmıştır. En yüksek antibakteriyel etkinin *E. coli*, en düşük antibakteriyel etkinin ise *E. faecalis* bakterilerine karşı olduğu bulunmuştur. Yüksek antibakteriyel etki gösteren türlerin koyu kırmızı renkte olduğu da belirtilmiştir. Çalışmada en yüksek inhibitör etkiyi (17-25 mm) ‘Şerife’ türü göstermiş; bu türün en asidik kültür ve en yüksek ikinci fenolik bileşik içeriğine sahip olduğu belirtilmiştir. Yüksek asidite ve yüksek fenolik bileşik (gallic acid) - antosiyanin (cyanidin 3-glucoside) içeriği, yüksek inhibitör etki göstermiş ve bu etki, narın antioksidan kapasitesi ile ilişkilendirilmiştir. En düşük asiditeye ve fenolik bileşiğe sahip türler arasında; ‘Katırbaşı’ türünün yalnızca *Escherichia coli* bakterisine (21.3 mm), ‘Tatlı’ türünün ise sadece *Rhodotorula rubra* fungusine (16.7 mm) karşı inhibitör etki gösterdiği gözlenmiştir [34].

Gıda kaynaklı bakterilere karşı, aralarında *Punica granatum* bitkisinin de bulunduğu 46 adet baharat ve tıbbi bitkiden hazırlanan metanol ekstraktlarının antibakteriyel etkileri incelenmiştir. Shan ve arkadaşları tarafından yapılan çalışmada *Punica granatum* 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 [35].

Diare ve dizanteri etkeni olan enterik patojenlere (*Salmonella thypi*, *Shigella dysenteriae* ve *Escherichia coli*) karşı, *Punica granatum* bitkisinin kurutulmuş meyve kabuklarından hazırlanan metanol ekstraktlarının antimikrobiyal etkisinin ve toksisitesinin incelendiği bir çalışmada, antibakteriyel etki disk difüzyon ve agar dilüsyon metodu ile belirlenmiş ve kullanılan bütün bakteriler için ekstraktların oluşturduğu inhibisyon zonu 25-26 mm, MIC değeri ise 12.5 mg/ml olarak gözlenmiştir. Mehru ve arkadaşları, belirledikleri sonuçlar dolayısı ile enterik patojenlerin tedavisinde *Punica granatum* kabuk ekstraktlarının kullanılabileceğini ileri sürmüşlerdir. Ayrıca çalışmada kullanılan kabuk ekstraktlarının toksik olmadığını gözlenmiştir [36].

Nar meyvesinin antibakteriyel ve antifungal etkileri üzerine yapılan bir çalışmada; meyvenin kabukları, kırmızı ve beyaz tohumları ile meyve suyu materyallerinin metanol ve su ekstraktları hazırlanmış, *Bacillus coagulans*, *Bacillus cereus*, *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* bakterilerine karşı ve *Aspergillus niger*, *Mucor indicus*, *Penicillium citrinum*, *Rhizopus oryzae*, *Trichoderma reesei* mantarlarına karşı inhibitör etkileri agar kuyu difüzyon metodu kullanılarak incelenmiştir. Bütün materyallerin metanol ekstraktlarının, su ekstraktlarından daha etkili olduğu gözlenmiştir. Nar kabuğunun metanol ekstraktının antibakteriyel etkisinin; en yüksek *S. aureus*'a (25 mm) karşı, en düşük *B. subtilis*'e (18 mm) karşı, antifungal etkisi; en yüksek *Aspergillus niger*'e (23 mm) karşı, en düşük *Mucor indicus*'a (15 mm) karşı olduğu belirtilmiştir. Çalışmanın sonucunda, major aktif bileşikler olarak fenoller, tanenler ve flavonoidleri içeren ekstraktlardaki fitobileşenlerin varlığının, bu aktivitelerden sorumlu olabileceği ileri sürülmüştür.

Aynı çalışmada kullanılan diğer materyaller incelendiğinde; *Bacillus coagulans* bakterisine karşı kırmızı tohumun metanol ve su ekstraktları ile beyaz tohumun metanol ekstraktının inhibitör etki göstermediği; meyve suyu metanol ekstraktının en yüksek inhibitör etkisinin *Klebsiella pneumomiae* bakterisine karşı (25 mm) iken su ekstraktının en yüksek inhibitör etkisinin *B. cereus* ve *S. aureus* (26 mm) bakterilerine karşı olduğu belirtilmiştir [37].

Punica granatum L. ve yabani bir çeşidi olan ‘darı’ türü kullanılarak yapılan bir çalışmada meyvelerin beyaz zar kısımlarının etanol, petrol eteri ve distile su ekstraktları hazırlanmış ve agar kuyu difüzyon metodu kullanılarak antibakteriyel aktiviteleri belirlenmiştir. Çalışmada kullanılmak üzere hastaneden toplanan 150 dış plak örnekleri *Lactobacillus*, *Proteus*, *Staphylococcus* ve *Streptococcus* türleri olmak üzere dört bakteri türü olarak tanımlanmıştır. Ekstraktlardan en yüksek inhibitör etkiyi etanol ekstraktının gösterdiği, bunu petrol eteri ve su ekstraktlarının takip ettiği belirtilmiştir. Bütün ekstraktların *Streptococcus* sp.’ye karşı en etkili olduğu (24-27 mm), *Proteus* sp.’ye karşı ise en az etkili (19-24 mm) olduğu gözlenmiştir. *Streptococcus* sp.’ye karşı; ‘darı’ türü ekstraktlarından etanol 27 mm, petrol eteri 26 mm, distile su 24 mm inhibisyon zon çapı oluştururken, *Punica granatum* L. ekstraktlarından etanol 26 mm, petrol eteri 25 mm, distile su 23 mm inhibisyon zon çapı oluşturmuştur. Devi ve arkadaşları, etanol ‘darı’ ekstraktlarının dental bakterilerin neden olduğu hastalıkların tedavisinde kullanılabileceğini ileri sürmüşlerdir [38].

Kümes hayvanlarından izole edilen *Pseudomonas stutzeri* bakterisine karşı, nar kabuğu su ekstraktlarının antibakteriyel aktivitesinin belirlendiği bir çalışmada, ekstraktın oluşturduğu inhibisyon zon çapı 21-26 mm olarak belirlenmiştir. Çalışmada nar kabuklarının ekstraktları otoklavlandığında, otoklavlanan ekstraktların oluşturduğu inhibisyon zonları otoklavlanmamış olanlarla eşitlik (21-26 mm) göstermiştir. Çalışmada, antimikrobiyal aktiviteden sorumlu olan aktif bileşenlerin sıcaklığa dayanıklı olduğu Devatkal ve arkadaşları tarafından ileri sürülmüştür [39].

McCarrell ve arkadaşları tarafından yapılan benzer bir çalışmada da otoklavlanmış nar kabuğu su ekstraktlarının *Staphylococcus aureus* (14 mm) ve *Bacillus subtilis* (10 mm) bakterilerine karşı antibakteriyel etki gösterdiği belirtilmiştir [40].

Nar meyve kabuğunun yapısındaki fenolik bileşiklerin antibakteriyel etkilerinin araştırılması amacı ile yapılan bir çalışmada, % 13 ellagic asit içeren standardize nar kabuğu ekstraktı (SPRE) elde edilmiştir. SPRE'nin antibakteriyel etkisi, minimum inhibitör konsantrasyonu (MIC) ve minimum bakterisid konsantrasyonu (MBC) *Propionibacterium acnes*, *Salmonella typhimurium*, *Shigella sonnei*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis* ve *Escherichia coli* bakterilerine karşı belirlenmiştir. SPRE'nin bu bakteriler için MBC değerlerinin (250-1000 µg/ml), MIC değerlerinden (7.81-15.6 µg/ml) daha yüksek olduğu gözlenmiştir. Ekstraktın gram pozitif bakterilerden *S. aureus*'a karşı 15.2-19.4 mm ve *S. epidermidis*'e karşı 19.1 mm inhibisyon zon çapı oluşturduğu; gram negatif bakterilerden *E. coli* ve *S. typhimurium*'a karşı inhibitör etki göstermediği belirtilmiştir. Çalışmada SPRE'nin sınırlı spektrumdaki antibakteriyel etkisinden dolayı doğal koruyucu olarak kullanımının mümkün olmayacağı ileri sürülmüştür. Ayrıca SPRE'nin anti-alerjik ve anti-inflamator etkilerinin de olduğu belirtilmiştir [41].

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 etkilerinin Dağcı ve Dığrak tarafından araştırıldığı çalışmada; *P. granatum* L. aseton, etil alkol ve sulu ekstraktlarının test edilen mikroorganizmalara (*Bacillus megaterium*, *Aeromonas hydrophyla*, *Corynebacterium xerosis*, *Escherichia coli*, *Micrococcus luteus*, *Enterococcus faecalis* bakterileri ve *Kluyveromyces fragilis*, *Rodotorula rubra*, *Saccharomyces cerevisiae* mantarları) karşı oluşturdukları 12-34 mm inhibisyon zonu ile en etkili bitki olduğu tespit edilmiştir. *P. granatum* L. etil alkol, aseton, sulu ekstraktlarının *E. coli*'ye karşı sırasıyla 12, 14, 0 mm, *E. faecalis*'e karşı 20, 19, 15 mm, *S. aureus*'a karşı 17, 16, 24 mm inhibisyon zonu meydana getirdiği belirtilmiştir [42].

Punica granatum L. bitkisinin kurutulmuş yapraklarının ve meyve kabuklarının antimikrobiyal aktivitesinin belirlendiği bir çalışmada; hekzan, etil asetat, metanol ve su ekstraktlarının *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium*, *Bacillus subtilis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae* bakterilerine karşı antibakteriyel 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 zon çapı gözlenmiştir. Ayrıca *S. aureus*'a karşı yaprak etil asetat ekstraktının (27 mm) ve su, metanol ekstraktının (32 mm) en yüksek inhibisyon zon çapı oluşturduğu belirtilmiştir. Çalışmada meyve kabuğunun bütün ekstraktlarına kıyasla yaprağın su ve metanol ekstraktlarının mikroorganizmalara karşı daha etkili olduğu belirlenmiş; gözlemlenen bu aktivitenin ise terpen, saponin, flavonoid ve alkaloid gibi bazı metabolitlerin varlığına bağlı olduğu ileri sürülmüştür. Ayrıca yaprak ve meyve kabuğu ekstraktlarının antifungal aktiviteye kıyasla antibakteriyel açıdan etkilerinin yüksek olduğu belirtilmiştir [43].

Aralarında *Punica granatum* bitkisinin de bulunduğu 10 bitkinin (*Achillea millifolium*, *Caryophyllus aromaticus*, *Melissa officinalis*, *Ocimum basilicum*, *Psidium guajava*, *Rosmarinus officinalis*, *Salvia officinalis*, *Syzygium joabolanum*, *Thymus vulgaris*) antimikrobiyal aktivitesinin belirlendiği bir çalışmada; nar kabuğu ekstraktı test edilen mikroorganizmalar arasında *Pseudomonas aeruginosa* ve *Bacillus subtilis*'e karşı inhibisyon zonu oluşturmuş (zon çapı ≥ 7 mm), diğer bakterilere (*Staphylococcus aureus*, *Salmonella choleraesuis*, *Candida albicans*, *Klebsiella pneumoniae*, *Enterobacter aerogenes*, *Escherichia coli*, *Proteus* sp., *Shigella* sp.) karşı inhibe edici etki gösterememiştir. Ayrıca çalışmada *Pseudomonas aeruginosa* bakterisine karşı; ekstraktın MIC değeri 70 mg/ml iken ekstrakt-antibiyotik kombinasyonu (tetrasiklin, ampisilin, kloramfenikol) için bu değer 50 mg/ml olarak belirlenmiştir. Çalışmada kullanılan bitkiler arasında *Caryophyllus aromaticus* ve *Syzygium joabolanum* bitkilerinin test mikroorganizmalarına karşı yüksek aktivite gösterdikleri belirtilmiştir [44].

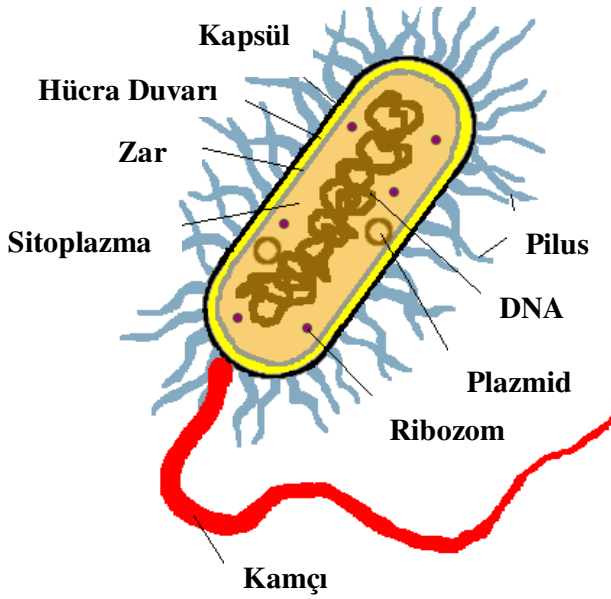
Punica granatum meyve kabuk etanol ekstraktının *Salmonella typhi*, *Salmonella paratyphi*, *Salmonella enteritidis*, *Salmonella typhimurium*, *Salmonella dublin*, *Salmonella derby*, *Salmonella choleraesuis* ve *Salmonella gallinarum* bakterilerine karşı antimikrobiyal aktivitesinin incelendiği bir çalışmada; ekstraktın oluşturduğu en yüksek inhibisyon zonunun *Salmonella paratyphi* (18.6 mm) bakterisine karşı iken en düşük inhibisyon zonunun *Salmonella typhi* (13.3 mm) bakterisine karşı olduğu gözlenmiştir [45].

Punica granatum L. bitkisinin antisalmonella aktivitesinin araştırıldığı bir başka çalışmada ise nar meyvesinin tohumlarından hazırlanan su ve metanol ekstraktlarının, *Salmonella typhimurium*'a karşı 10-12 mm, *Salmonella typhi*'e karşı 24-26 mm, *Salmonella paratyphi*'e karşı 16-19 mm inhibisyon zon çapı oluşturduğu gözlenmiştir [46].

BÖLÜM 3. TEST MİKROORGANİZMALARI

3.1. Giriş

Prokaryot hücre yapısına sahip olan bakteriler tek hücreli mikroorganizma grubudur. Tipik olarak birkaç μm uzunluğunda olan bakterilerin; küresel (kok), çubuk (basil) ve spiral gibi çeşitli şekilleri vardır. Çekirdek zarları olmadığı için genetik materyal nükleoid yapısında ve sitoplazma içerisinde yer almaktadır. Bir bakteri hücresinde; çekirdek, ribozom, sitoplazma, hücre zarı, hücre duvarı, bazen kapsül, pilus ve fimbrialar yer almaktadır. Hücre zarı olarak da adlandırılan plazma zarı, hücreyi içinde bulunduğu çevreden ayırır. Zarın kimyasal yapısı çift tabaka fosfolipittir. Fosfolipitler polar moleküller olup bir uçları hidrofob yağ asitlerinden diğer uçları ise hidrofil gliserin ve fosfattan oluşmuştur [47, 48].

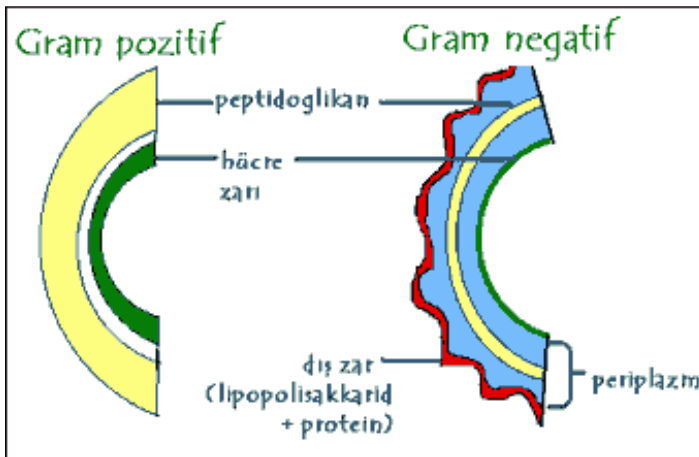


Şekil 3.1. Bakteri hücresinin genel görünümü [49]

Plazma zarının hemen dışında bulunan ve onu kuşatan, katı ve sert özelliğinden dolayı hücrelerin karakteristik ve belli şekillerde kalmasını sağlayan hücre çeperi; bütün mikroorganizmalarda aynı yapıda değildir. Kimyasal yapı ve kalınlık bakımından türden türe fark eder. Bu farklılıklar mikroorganizmanın tanınmasında ve sınıflandırılmasında kullanılmaktadır [47].

Mikroorganizmaların çeperleri çok sayıda kimyasal maddeden oluşan kompleks bir yapıdır. Çeperlerin temeli peptidoglikan adı verilen ve aynı zamanda mürein veya mukopeptit olarak da bilinen büyük molekülü bir kimyasaldan oluşmaktadır. Peptidoglikan, peptit zincirlerle birbirine çapraz bağlanmış polisakkarit zincirlerinden (N-asetilglukozamin ve N-asetilmuramik asit) oluşmaktadır. Bu peptitler, hücredeki diğer protein ve peptitlerden farklı olarak D-aminoasitleri içermektedir [47, 48].

Gram pozitif bakteriler, çok tabakalı peptidoglikan ve teikoik asitlerden oluşan bir hücre duvar yapısına sahiptir. Her tabaka arasında bulunan ve aminoasitlerden oluşan yoğun çapraz bağlar, çeperin direncini artırır. Teikoik asitler, yapılarında tekrarlanan birimler halinde şeker ve fosfatların bulunduğu büyük moleküller olup gram pozitif bakterilerin başlıca yüzey antijenleridir. Gram pozitif bakterilerde çeper, kuru ağırlığın % 20'si kadardır [47].



Şekil 3.2. Gram pozitif ve Gram negatif bakterilerin hücre duvar yapıları [50]

Gram negatif bakterilerin peptidoglikan tabakası gram pozitif bakterilerinkinden çok incedir. Çeper, hücrenin kuru ağırlığının sadece % 1-2'sini oluşturur. Peptidoglikan tabakasının dış yüzeyi bir seri tabakadan oluşur ve bu tabakalara dış zar adı verilir. Dış zarın peptidoglikana bakan kısmı lipit-protein karışımı bir tabaka olup lipoprotein tabakası adını alır [47].

Bakteri hücre çeperinden dışarıya doğru birçok yapı bulunmaktadır. Bunlara hücre uzantıları adı verilir. Başlıcaları; flagellumlar (bakterinin hareketini sağlar), periplazmik flagellumlar, piluslar (bakteriler arasında konjugasyonu ve bakterilerin, enfekte ettikleri dokuların yüzeylerine yapışmalarını sağlar) ve fimbrialar (bakterilerin, birbirlerine ve cisimlerin yüzeylerine tutunmalarını sağlar) dır [47].

Bakterinin yaşadığı şartların kötüleşmesiyle endospor oluşumu gözlenmektedir. Ortamda bulunan azot ve karbon kaynaklarının azalması spor oluşumu için en önemli faktördür. Bakteriler içerisinde sadece birkaç cins endospor oluşturmaktadır. Bunların başında gram pozitif basillerden *Bacillus* ve *Clostridium* cinsleri gelir [47].

Oksijen gereksinimlerine göre bakteriler üç grupta sınıflandırılmaktadırlar. Bunlar; üreme ve gelişmeleri için oksijene ihtiyaç duyan aerop bakteriler, oksijen bulunmayan ortamda üreyebilen anaerop bakteriler ve hem oksijenli hem oksijensiz ortamda üreyebilen fakültatif bakterilerdir [51].

Çevremizde, hava, su ve toprakta, bitkiler üzerinde, insan ve hayvan vücudunda binlerce bakteri türü bulunur. Bunlardan bir kısmı infeksiyon oluşturmazken bir kısmı ise yaşamı tehdit etmektedir [1].

İnsan vücudunda yaşamakta olan farklı türden çok sayıda mikroorganizma- bunların arasında az sayıda mantarlar ve diğer mikroorganizmalar bulunsa da çoğunluğunu bakteriler oluşturur- sağlıklı bir bireyde normal koşullarda zararsızdır ve hatta yarar sağlayabilir. Bu mikroorganizma topluluğu normal flora olarak adlandırılır [52]. Erişkin bir kişideki normal bakteri florası yaklaşık 10^{14} bakteri hücrelerinden meydana gelmektedir. Bu bakterilerin çoğu anaerop veya fakültatif anaerobtur [53].

Normal flora mikroorganizmalarının yerleştiği vücut bölgeleri; dış ortamla etkileşim ve temas halinde olan deri, gözler, üst solunum yolları, sindirim sistemi, ürogenital sistem gibi vücut bölgeleridir [52]. Normal floranın bulunduğu herhangi bir anatomik bölgede organizmalardan biri daima egemen durumdadır. Mikroorganizmalar arasındaki bu denge stabil olma eğilimindedir; ancak yaşa bağlı olarak, antimikrobiyal maddeler verildiğinde ya da normal anatomik veya fizyolojik işlevin bozulması durumunda değişebilir [53].

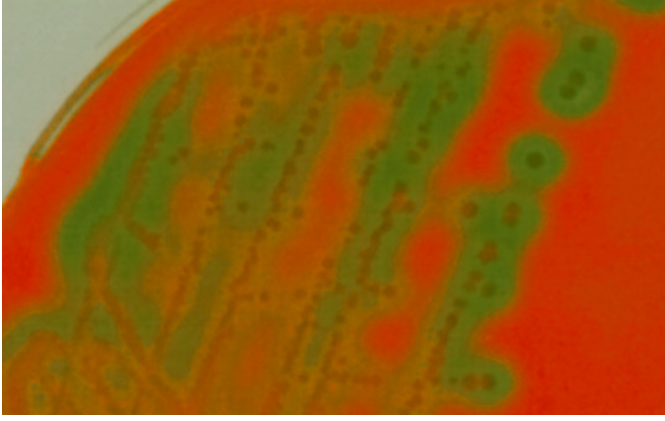
3.2. Viridans Streptokoklar

Viridans grubu (oral) streptokoklar gram pozitif, kok şeklinde mikroorganizmalardır. Viridans streptokokların önemli türleri;

Tablo 3.1. Viridans Grubu Streptokokların Sınıflandırılması [54]

Sanguinis grubu	Mitis grubu	Anginosus grubu	Mutans grubu	Salivarius grubu
<i>S. sanguinis</i>	<i>S. mitis</i>	<i>S. anginosus</i>	<i>S. mutans</i>	<i>S. salivarius</i>
<i>S. parasanguinis</i>	<i>S. oralis</i>	<i>S. constellatus</i>	<i>S. sobrinus</i>	<i>S. vestibularis</i>
<i>S. gordonii</i>	<i>S. pneumoniae</i>	<i>S. intermedius</i>	<i>S. cricetus</i>	<i>S. infantarius</i>
<i>S. sinensis</i>	<i>S. pseudopneumoniae</i>		<i>S. downei</i>	<i>S. thermophilus</i>
	<i>S. cristatus</i>		<i>S. rattii</i>	<i>S. hyointestinalis</i>
	<i>S. peroris</i>		<i>S. macacae</i>	
	<i>S. infantis</i>		<i>S. ferus</i>	

Koyun kanlı agarda tipik olarak alfa hemolitik (kolonilerin etrafında yeşilimsi bir zon oluşumuna yol açan kısmi bir hemoliz) bazen de nonhemolitiklerdir. Bu nedenle pnömokoklar ve enterokoklar ile karıştırılabilirler. Pnömokoklardan optokine dirençli olmaları ve safrada (deoksikolat) erimemeleri; enterokoklardan da % 6.5 sodyum klorür içeren ortamlarda üreyememeleri ile ayrılabilirler [55, 56, 57].



Şekil 3.3. Viridans streptokokların hemoliz görünümleri [58]

Katalaz veya koagülaz üretmeyen, hareketsiz, spor oluşturmeyen, fakültatif anaerobik mikroorganizmalardır. Amonyak oluşturmaz ve jelatini eritmezler. Maltoz, sükroz ve laktoz genellikle pozitif, mannitol negatiflerdir [59]. Gaz oluşturmaksızın karbonhidratları fermente ederek asit meydana getirirler. Ortamın içeriğine ve inkübasyon atmosferine bağlı olarak kolonilerinin büyüklüğü ve görünümü değişkenlik göstermektedir. Sıvı besiyerinde ikili ya da zincir yapan, yuvarlak veya ovoid hücreler şeklinde görülürler [60, 61]. Üremek için proteinden zengin besiyerlerine ve % 5-10 CO₂'li ortama ihtiyaç duymaktadırlar [62].

Viridans streptokoklar virülansı düşük bakteriler olup; üst solunum yolu, ağız boşluğu florası, kadın genital yolu ve gastrointestinal kanalda bulunmaktadırlar [60]. Sağlıklı kişilerde ağız florasının % 30-60'ını oluşturmakta ve burada daha patojen mikroorganizmaların kolonizasyonuna engel olmaktadır [63]. Yerlerini değiştirmeleri ve organizmanın direncinin kırılması durumuna bağlı olarak; dental hastalıklar, menenjit, sinüzit, selülit, safra yolları ve karın içi enfeksiyonları gibi çeşitli hastalıklara neden olmaktadır [59, 63].

Viridans grubu streptokok suşlarının çoğu penisiline yüksek derecede duyarlılardır. Meydana gelen enfeksiyonlar penisilin-aminoglikozid kombinasyonları ile tedavi edilmektedir [61, 64].

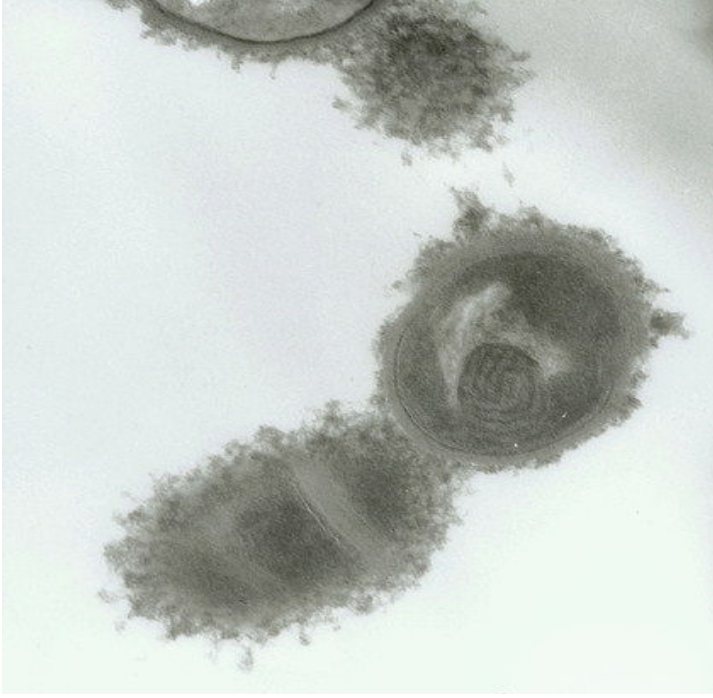
Streptococcus mitis; oral kavitede, orofarinkste, bukkal mukozada (yanakların iç kısmı) ve yeni oluşmakta olan dental plakta yer almaktadır. Plakta polisakkarit depo edebilen mikroorganizmalar arasında egemendir; bu özellik, diyetle karbonhidrat alınmadığı zaman plakta asit oluşumuna sebebiyet vermektedir [60].

Streptococcus mutans, diş plağında en sık yer alan mikroorganizmaların başında gelmektedir [52]. Glikozdan oluşturdukları dekstran sayesinde diş yüzeyine tutunur ve dişlerde bakteri plaklarını ortaya çıkarır. Ayrıca gıdalardaki şekerlerden yüksek konsantrasyonlarda asit üreterek minerde demineralizasyona ve ardında da çürük oluşumuna neden olmaktadır [53, 56, 57].



Şekil 3.4. *Streptococcus mutans* bakterisinin genel görünümü [65]

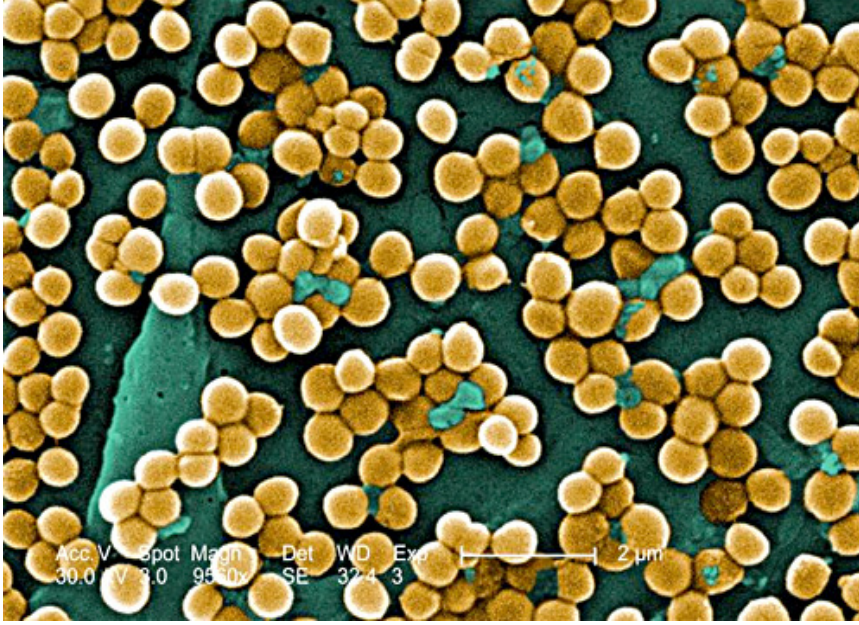
Streptococcus salivarius, dilde ve ağzın diğer yumuşak dokularında en fazla bulunan viridans streptokok türüdür. Dildeki fakültatif streptokokların % 47'sini, yanaktaki fakültatif streptokokların % 10'unu ve tükürükteki fakültatif streptokokların % 47'sini oluşturmaktadır. Plak ve dişeti oluşunda bulunan fakültatif streptokoklar arasındaki oranı ise % 1'den daha az (% 0.47-0.66) dır. *In vitro* olarak, çürüğe benzer lezyonlar oluşturmakta ve böylece bulunuş sıklığı ile diş çürüğü arasında paralellik olduğu düşünülmektedir [66].



Şekil 3.5. *Streptococcus salivarius* bakterisinin genel görünümü [67]

3.3. *Staphylococcus aureus*

Staphylococcus aureus; küçük, yuvarlak-oval şekilli, fakültatif anaerob, gram pozitif, kapsülsüz, hareketsiz ve sporsuz bir bakteridir. Spor oluşturmadığı halde vücut dışında canlılığını uzun süre koruyabilen tek insan patojeni olan *S. aureus* bakterisi, 6-46 °C gibi geniş bir ısı aralığında ve optimum 7.0-7.5 pH'da üreyebilir. Kanlı agarda beta hemoliz yapmaktadır. Katalaz pozitif, oksidaz negatiftir. Agar, buyyon gibi basit besiyerlerinde üreyebilirler [56]. *Staphylococcus aureus*, kolonilerine altın sarısı renk veren karotenoid bir pigment üretir. Bu pigment, nötrofiller içindeki süperoksitler ve diğer tepkici oksijen türlerinin mikrobisit aktivitesini etkisiz hale getirerek organizmanın patojenitesini artırır [68]. Mannitolün fermentasyonu ve koagülaz testi *S. aureus* için ayırt edici bir özelliktir. *Staphylococcus aureus*'un bütün suşları mannitol ve koagülaz (plazmayı pıhtılaştırır) pozitifdir [51, 56]. Şekerlerin çoğunu gaz oluşturmaksızın, asit meydana getirerek fermente ederler [59].



Şekil 3.6. *Staphylococcus aureus* bakterisinin genel görünümü [69]

S.aureus'un hücre duvarı ribitol teikoik asitten oluşmaktadır. Peptidoglikan yapısında, müramik asit kalıntılara tutunmuş halde bulunan tetrapeptidler pentaglisin köprüleri ile birbirlerine bağlanmaktadır. Tüm *S.aureus* kökenlerinin yaklaşık %33'ü, sindirim enzimlerinin etkisine ve ısıya dirençli proteinler olan enterotoksinleri oluştururlar. Bazı enterotoksinlerin yapımı lizojenik fajlar tarafından belirlenir.

Protein A; *S.aureus* izolatlarının % 90'undan çoğunda bulunan ve peptidoglikan tabakaya kovalent bağlarla bağlanmış olan bir yüzey proteindir. Bu madde; kemotatik, antikomplemanter ve antifagositik etki gösteren spesifik bir antijendir [53, 59].

S.aureus, normal insanların yaklaşık % 30'unda deri ve mukozaları kolonize eden, nispeten dirençli bir mikroorganizmadır. En sık yerleştiği bölge ön burun delikleridir. Ön burun deliklerinde yerleşme eğilimi göstermesinin nedeni, 30-37 °C arasındaki ısı derecelerinde iyi üremesidir [70].

En sık bulaşma şekli insandan insana bulaşmadır ve hastane enfeksiyonlarının başlıca nedenlerinden biridir. En sık taşıyıcılık deride olmakla birlikte, burun boşluğu ön bölümünün mukozasında ve vajina gibi başka bölgelerin muköz membranlarında da bulunmaktadır. Direkt temasla veya besin zehirlenmesine neden olabilecek besinlerin kontaminasyonu ile taşıyıcılar, kendileri ve başkaları için enfeksiyon kaynağı olabilmektedir. *S.aureus* izolatları, çeşitli bakteriyofajlara gösterdikleri dirençlilik ve duyarlılıklarına göre epidemiyolojik tiplendirilmede kullanılmaktadır [52, 53].

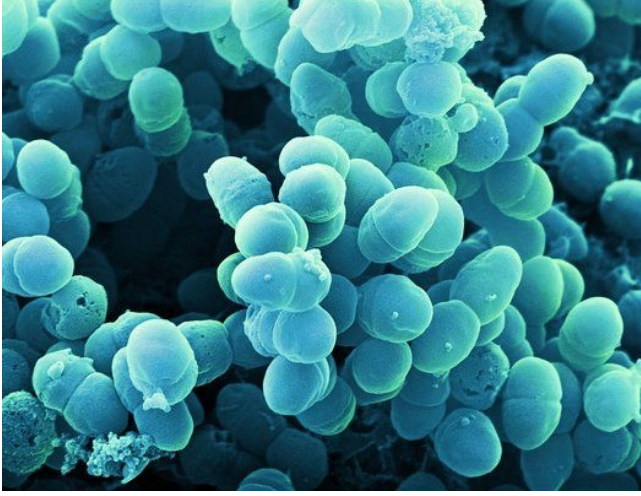
S. aureus bakterisinin yaptığı başlıca hastalıklar; deri ve mukoza enfeksiyonları (ter bezleri ve yağ bezlerinde iltihaplanma, sivilce, sakal kıl kökleri yangısı, göz kapağı yangısı, arpacık, bademcik iltihaplanması), yaygın deri döküntülü stafilokok enfeksiyonları (toksik şok sendromu, haşlanmış deri sendromu), sistem ve organ enfeksiyonları (stafilokok pnömonisi), sepsis, endokardit, besin zehirlenmeleri ve enteritlerdir. *S.aureus* enfeksiyonları sonrasında güçlü veya uzun süreli bir bağışıklık oluşmaz; bunun en belirgin göstergesi bireylerin yaşamları boyunca *S.aureus* enfeksiyonlarına duyarlı olmalarıdır [52, 63].

S.aureus'un identifikasyonunda koloni morfolojisi ve boyanma, pigment üretimi, hemoliz, mannitol fermentasyonu, yüksek tuz konsantrasyonlu ortamda üreme, koagülaz varlığı ve faj özelliği gibi kriterler araştırılır [59].

Koagülaz negatif koklardan daha virülan olmakla birlikte *S. aureus* suşlarının virülansı çok yüksek değildir ve genelde enfeksiyon oluşması için derinin hasar görmüş olması veya vücuda yabancı bir cismin girmiş olması (yara ve cerrahi enfeksiyon esnasında) gerekmektedir. En önemli virülans faktörleri; hücre duvarındaki virülans faktörleri (Protein A ve fibronektin bağlayıcı protein), sitolitik ekzotoksinler ve süperantijen ekzotoksinleridir [52].

3.4. *Staphylococcus epidermidis*

Çoğu kez deri ve üst solunum yolları mukozasında bulunabilen koklar olup; kültür ve irin içerisinde dörtlü veya ikili ya da düzensiz gruplar halinde, nadiren de tek tek görülürler. Gram pozitif olup jelozda kirli beyaz renkte ve *aureus* stafilokoklara göre daha küçük, konveks, düz düz ya da granül yüzeyle koloniler yaparlar. Sadece birkaç suşu kanlı agarda hemoliz oluşturur. Fakültatif anaerob olmalarına rağmen oksijenli ortamda daha iyi ürerler. Üreme dereceleri 15-45 arası olup en iyi 30-37 °C de ürerler [63].

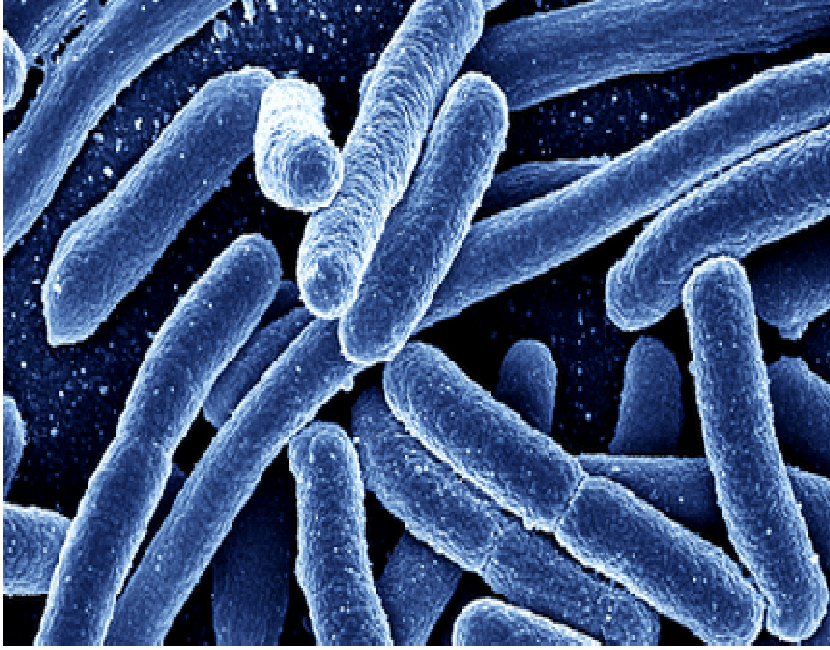


Şekil 3.7. *Staphylococcus epidermidis* bakterisinin genel görünümü [71]

S.epidermidis normal insanların % 85-100'ünde bulunur. Fırsatçı patojen olarak enfeksiyonlara neden olur [53]. İnsanlarda normal mukozada bulunmalarına karşılık en fazla buldukları yer insan derisidir. Yumuşak dokuların abseleri, yara ve konjonktiva enfeksiyonları, pnömoni, artrit, menenjit, ampiyem, sepsis, endokardit ve bazen idrar yolu hastalıkları gibi enfeksiyonlarına rastlanmaktadır. Hücre duvarının teikoik asitleri, *S. epidermidis* bakterisinde poligliserol fosfattır [59, 63]. Virulansı düşük olmasına rağmen kalp kapakçıkları ve kateterler gibi implantlardan kaynaklanan enfeksiyonların sık rastlanan etkenidir. Plastik yüzeylere tutunmada rol oynayan hücre yüzeyi faktörleri, virulans faktörlerindedir [52].

3.5. *Escherichia coli*

Escherichia coli, yaklaşık 0.3-1.0 µm eninde ve 1.0-6.0 µm boyunda, düz, uçları yuvarlak çomakçıklar şeklinde bir bakteridir. Fakültatif anaerob, katalaz pozitif, endospor oluşturmeyen, bakteriyolojik boyalarla kolay boyanabilen, gram negatif bir bakteridir. Genellikle etraflarında bulunan kirpikleri aracılığı ile hareketli olmakla beraber hareketleri yavaştır. Hatta hareketsiz görünebilirler. Laktozu fermente etmeleri ile *Shigella* ve *Salmonella* gibi diğer iki ana bağırsak patojenlerinden ayırt edilebilmektedirler. Epidemiyolojik incelemelerde organizmayı tiplendirme için kullanılan üç antijeni (hücre duvar antijeni, kamçı antijeni ve kapsül antijeni) vardır [63, 68].



Şekil 3.8. *Escherichia coli* bakterisinin genel görünümü [72]

E. coli buyyon ve jeloz gibi genel besiyerlerinde kolayca ürerler. Buyyonda homojen bulanıklık yaparlar. Jelozda hafif kabarık, yuvarlak, düzgün 1-2 mm çapında parlak S tipi koloniler yaparlar. Optimal üreme ısısı 37 °C olup 15-45 arası ısı derecelerinde de üreyebilirler. Ortalama pH 7.2’de iyi ürerler.

Oldukça dirençli bir bakteri olan *E. coli* 60 °C ısıda 30 dakika, oda ısısında uygun ortamda olmak koşulu ile uzun süre canlı kalabilir. Soğuğa dirençli, dezenfektanlara karşı ise dirençsizdir. Malaşit yeşili, brillant yeşili ve fuksin gibi boyalar, safra, safra tuzları, sodyum tetrasyonat, bizmut sitrat, sodyum sülfat, sodyum dezoksikolat ve selenit tuzlarına karşı dirençleri, *Salmonella* ve *Shigella* cinsi bakterilerin gösterdikleri dirençten daha azdır [63].

Escherichia coli, sindirim sistemindeki toplam bakteri popülasyonunun % 0.1'inden azını oluşturur. Endojen bir bakteri olan *E.coli*, idrar yolu infeksiyonlarının en önemli etkenlerindedir [63].

İnsan ve hayvanların bağırsağında yaşayan normal flora üyesidir. Diğer flora bakterileri ve organizma ile bir denge altında kaldığı sürece hastalık yapmaz. Belirli koşullar altında insan ve hayvanlar için patojen olup gerek yangı gerekse sürgün şeklinde ortaya çıkan bağırsak hastalıklarına neden olmaktadır. İnsan ve sıcakkanlı hayvanlarda doğumu takiben 1-2 saat veya gün içinde bağırsak mukozasına tutunurlar. Bir *E. coli* suşu yerleştikten aylar veya yıllar sonra normal florada kalır. Ancak antibiyotik kullanımı ile ortamdan kaybolur. İdrar yolları, safra kesesi ve safra yolları, akciğer, periton ve menenjlere ulaşan *E. coli* bakterileri önemli hastalıklara yol açarlar [63, 73].

Bağırsakların mekanik ya da biyolojik etkilerle yaralanmaları ve organizmanın savunma mekanizmasındaki bozukluklar nedeniyle bakteriler değişik dokulara geçebilirler. Koli basillerinin safra ve safra yollarına yerleşmeleri ile kolesistit ve kolanjit enfeksiyonları oluşur. Bunların dışında *E. coli*'nin yaptığı enfeksiyonlar arasında çeşitli perianal abselere, prostatitlere, daha az olmak üzere tonsillit, sinüzit, yara enfeksiyonları gibi lokalize iltihaplanmalara rastlanmaktadır [63].

E. coli kökenlerinin çoğu streptomisin, tetrasiklin ve kloramfenikol gibi birçok kemoterapötiklere karşı dirençlidir [63].

3.6. *Enterococcus faecalis*

Yaklaşık 1 µm büyüklüğünde, görünüşleri daha çok ikişerli diplokoklar ya da kısa zincirler şeklinde olan gram pozitif koklardır. % 6.5 sodyum klorürlü besiyerlerinde, % 40 safıralı ortamlarda ve 45 °C ısı derecesinde üreyebilirler. Karbonhidratların çoğunu fermente ederek, gaz oluşturmaksızın laktik asit oluştururlar. Katalaz negatif, laktoz pozitiflerdir. Kanlı agarda alfa ve gamma hemoliz gösterirler.

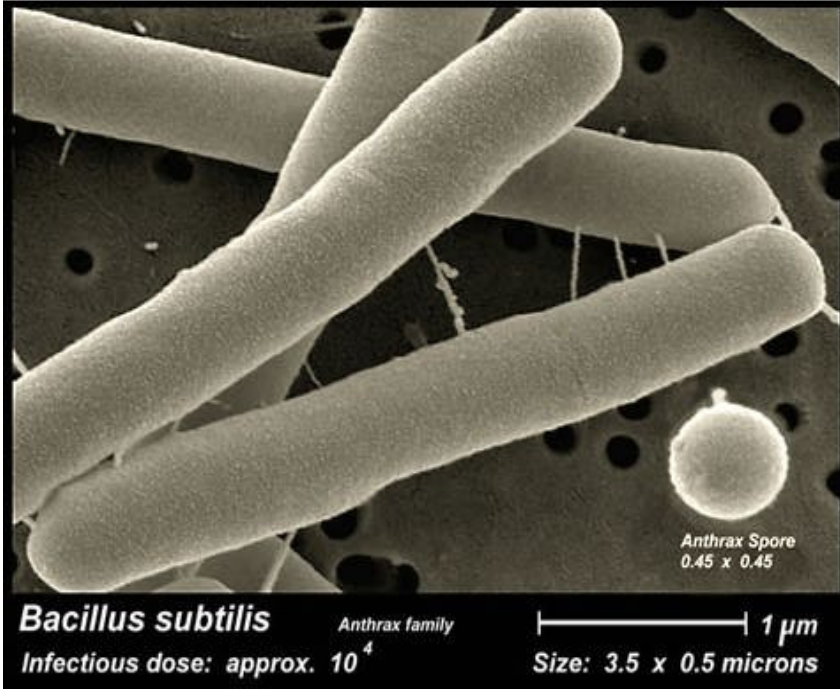


Şekil 3.9. *Enterococcus faecalis* bakterisinin genel görünümü [74]

Enterokoklar içerisinde enfeksiyonlarına en çok rastlanan türdür. Ağız boşluğu ve bağırsaklarda fırsatçı patojen olarak bulunurlar. İdrar yolu ve yara enfeksiyonlarına, intra-abdominal abselere, subakut bakteriyel endokardite, hastane kaynaklı pnömoni, kolesistit, nadiren menenjit ve septisemiye neden olurlar. Safra yolları enfeksiyonlarında *E. coli*'den sonra ikinci sırayı alırlar.

3.7. *Bacillus subtilis*

Sporları doğada çok yaygın olup toz, toprak, gübre, bitki ve hayvanlar ile süt ve sularda bulunan, yaklaşık 1.5-3 μm boyunda, 0.5-0.8 μm eninde, tek tek, bazen zincirler yapan, çomakçık şeklinde, aerob, gram pozitif bir bakteridir. Peritrih kirpikleri bulunduğundan hareketli olup; sporları oval şekilde ve subterminaldır. Kirpikler bakterinin kalınlığını aşmaz ve hücre şeklini bozmazlar. Genellikle kapsülü yoktur. Uygun şartlarda (bikarbonatlı ve CO_2 'li ortamda) polipeptid yapısında kapsül geliştirir. Jelozdaki kolonileri kirli-beyaz, gri renkte, mat olup kenarları pürütlü, yüzeyi bol granüllü R tipindedir.



Şekil 3.10. *Bacillus subtilis* bakterisinin genel görünümü [75]

Genellikle zararsız, fakat bağışık yetmezliği olanları enfekte edebilen bir bakteridir. Sinonimleri ve varyantları: *Bacillus atterimus*, *Bacillus butyricus*, *Bacillus mesentlericus*, *Bacillus ganis*, *Bacillus vugatus* [53, 59, 63].

3.8. *Salmonella* Bakterileri

Salmonella bakterileri yaklaşık olarak 2.0-3.0 µm boyunda ve 0.7-1.5 µm eninde çomakçık şeklinde, peritrih kirpikleri aracılığı ile hareketli, sporsuz, kapsülsüz bakterilerdir. Bakteriyolojik boyalarla iyi boyanırlar ve gram negatiftirler. Aerop ve fakültatif anaeropturlar. 37 °C'de en iyi üreseler de üreme ısılarının sınırı oldukça geniştir (20 °C-42 °C). Ortalama pH 7.2 ortamında üremeyi severler. Buyyon ve benzeri sıvı besiyerlerinde homojen bulanıklık yaparlar. Jelozda 2-3 mm çapında, yuvarlak çoğu kez kabarık, düzgün yüzeyle ve düz kenarlı koloniler yaparlar. *Salmonella* bakterileri ısıya dirençsizdirler. 55 °C'de 20 dakikada ölürlür. Kuruluğa dirençleri yoktur. Ancak gün ışığından uzak, nemli ortamlarda, lağım sularında ve toprakta uzun süre canlı kalabilirler. Soğuğa çok dirençlidirler [63].



Şekil 3.11. *Salmonella typhimurium* bakterisinin genel görünümü [76]

Salmonella sınıflandırmasında çeşitli yenilemeler, düzeltmeler yapılmış ve son olarak, tüm suşlar *Salmonella enterica* olarak tek bir tür içinde sınıflandırılmıştır. Bu tür; hücre duvarı, kirpik ve kapsül antijenlerine göre 1500 serotipi kapsamaktadır. *Salmonella typhimurium* ve *Salmonella typhi* bakterileri bunların içinde önemli olanlarıdır.

Lipopolisakkarit (Lipit A ve O antijeni) ve kapsül antijeni virulans faktörleridir. *Salmonella* cinsine ait suşların çoğu laktozu fermente etmez, glikozu ise asit ve gaz oluşturarak fermente ederler. Sülfür içeren aminoasitlerden hidrojen sülfür gazı oluştururlar [52].

Salmonella bakterileri ince bağırsak epitel hücrelerine nüfuz ederler. Hastalık lokalize kalabildiği gibi, bazen yaygın odaklarla sistemikleşebilir. Bu bakteriler fakültatif hücre içi parazitleri olup fagositik hücrelerde canlılıklarını koruyabilirler. Klinik belirtilerin ortaya çıkışı; enfeksiyonun dozuna (suşa bağlı olarak değişebilir), bağırsak epitel hücrelerinin endositoz yapmasını indükleyerek bakterinin hücre içinde canlı kalmasını sağlayan bakteri faktörlerine ve konak faktörlerine (mide sıvısında hidroklorik asit yokluğu, orak hücreli anemi, hücresel bağışıklığın zayıflığı) bağlıdır [52].

Salmonella bakterileri; bakterinin sevorma, suşun virülans derecesine ve organizmanın savunma reaksiyonuna bağlı olarak çeşitli tip enfeksiyonlara neden olurlar. Temel olarak genel enfeksiyonlar, entero-kolitler (besin zehirlenmeleri), gastro intestinal entoksikasyonlar, sepsis ve organ lokalizasyonları şeklinde belirtilen tüm *Salmonella* enfeksiyonlarında bakterilerin giriş kapısı ağız-mide-bağırsak yoludur. *Salmonella* bakterilerinden bir kısmı yalnız insanlarda (*Salmonella typhi*), bir kısmı hem insan hem hayvanlarda, bir kısmı da yalnız hayvanlarda hastalık yaparlar. *S. typhimurium*'un farelerde barınan bir bakteri olması nedeniyle epidemiyolojisinde bu hayvanların çıkartılarının besin maddelerine karışması da önemli rol oynamaktadır. Ayrıca *Salmonella* bakterilerinin kemoterapötiklere karşı gittikçe artan oranda direnç kazanan kökenleri hastane ortamında yuvalanmakta ve başta prematüre ve yeni doğan klinikleri olmak üzere tüm hastane kliniklerinde hastane enfeksiyonu tipindeki salgınlara yol açmaktadırlar [63].

Salmonella bakterilerinin enfeksiyon kaynakları; insan ya da hayvan dışkı ile kirlenmiş sular, bunların içilmesi ile oluşan ufak veya büyük çapta salgınlara, süt ve süt ürünleri (dondurma vb.), çeşitli kümes hayvanlarının et ve yumurtaları, et ve etle yapılan ürünler, deniz ve tatlı su kabukluları (midye, istiridye vb.) dir [63].

BÖLÜM 4. MATERYAL ve YÖNTEM

4.1. Materyal

4.1.1. Materyal eldesi

Çalışmamızda, *Punica granatum* L. (nar) bitkisinin meyve kabukları ana materyal olarak seçilmiştir. Bitki materyali Düzce ilinin Çiçekpınar köyünden, 2011 yılının Ekim ayında toplanmıştır. Toplanan meyveler Sakarya Üniversitesi Biyoloji Bölümü Mikrobiyoloji Araştırma Laboratuvarına getirilmiş ve deney hazırlıklarına başlanmıştır.

4.1.2. Deneylede kullanılan mikroorganizmalar

Çalışmamızda kullanılan mikroorganizmalar İstanbul Üniversitesi Mikroorganizma Kültür Koleksiyonları Araştırma ve Uygulama Merkezi (KÜKENS)'nden ve Sakarya Üniversitesi Biyoloji Bölümü Mikrobiyoloji Araştırma Laboratuvarı'ndan temin edilmiştir.

İstanbul Üniversitesi Mikroorganizma Kültür Koleksiyonları Araştırma ve Uygulama Merkezi (KÜKENS)'nden temin edilen bakteri suşları;

Streptococcus mitis CNCTC 4/77

Streptococcus salivarius CNCTC 64/59

Streptococcus mutans CNCTC 8/77

Staphylococcus epidermidis ATCC 12228

Sakarya Üniversitesi Biyoloji Bölümü Mikrobiyoloji Araştırma Laboratuvarı'ndan temin edilen bakteri suşları;

Staphylococcus aureus ATCC 29213

Escherichia coli ATCC 25922

Salmonella abony NCTC 6017

Salmonella typhimurium ATCC 14028

Enterococcus faecalis ATCC 29212

Bacillus subtilis ATCC 6633

4.1.3. Kullanılan maddeler

Deneyle süresince kullanılan maddeler Sakarya Üniversitesi Biyoloji Bölümü Mikrobiyoloji Araştırma Laboratuvarı'ndan temin edilmiştir. Bu maddeler;

Nutrient Agar (MERCK)

Mueller Hinton Agar (MERCK)

Triptik Soy Broth (MERCK)

% 5 Koyun Kanlı Mueller Hinton Agar

Dimetil Sülfoksit (DMSO)

Etanol

Aseton

Metanol

Etil Asetat

Steril distile su

Antibiyotik Diskler;

Klindamisin

Tetrasiklin

Amoksisilin - Klavulanik asit

4.1.4. Kullanılan araç ve gereçler

Deneyle süresince kullanılan araç ve gereçler Sakarya Üniversitesi Biyoloji ve Kimya Bölümünden temin edilmiştir. Bu araç ve gereçler;

İnkübatör (Friocell MMM)

Otoklav (Alp CL-32L)

Elektronik hassas tartı (Radwag AS 220/C/2)

Vorteks (Biosan V-32)

Densitometre (Biosan Den-1)

Manyetik karıştırıcı (IKA RCT Classic)

Rotary Evaporatör (Heidolph laborota 4000-efficient)

Öğütücü (Premier PRG 259)

Mikropipet 100-1000 µl (CAPP Aero Single)

Mikropipet 5-50 µl (ISOLAB)

Boş diskler (ROTILABO Ø 6 mm)

Anaerocult C (MERCK)

Dijital fotoğraf makinesi (SAMSUNG PL20)

Anaerobik kavanoz

Petri kabı ve taşıyıcısı

Mikropipet ucu

Pipet

Cam balon

Cam tüp

Beher

Erlenmayer

Öze

Baget

4.2. YÖNTEM

4.2.1. Bitkinin Özütleme

Punica granatum L. bitkisi meyve kabuklarının antibakteriyel etkisinin araştırılması amacı ile yapılan özütleme işlemi için direk özütleme metodu kullanılmıştır.

4.2.1.1. Nar meyve kabuklarının özütleme için hazırlanması

Ekim ayında toplanan meyveler laboratuvar ortamına getirildikten sonra, meyvenin kabukları soyularak oda sıcaklığında, açık havada, gölgede, 7 gün boyunca kurumaya bırakılmıştır.

4.2.1.2. Direk özütleme

Meyve kabukları kurutulduktan sonra öğütücü yardımı ile toz haline getirilmiştir. Toz numunelerin tartımları yapılmış (15 gr); farklı çözücüler (aseton, metanol, etil asetat, kloroform) kullanılarak belirlenen oranlarda (150 ml) kapaklı cam kavanozlar içerisinde 2 gün boyunca bekletilmişlerdir.

4.2.2. Çözücünün Uzaklaştırılması

Kurutma kağıdı yardımı ile cam balonlara süzülen numunelerin çözücülerini uzaklaştırma işlemi için döner buharlaştırıcı kullanılmıştır. Çözücüler vakum altında 40-45 °C'de buharlaştırılmıştır. İşlemlerden önce ve sonra kullanılan balonların tartımları yapılarak ekstrakt miktarları belirlenmiş ve böylece numuneler antibakteriyel aktivite tayini için hazır hale getirilmiştir.

4.2.3. Besiyerlerinin Hazırlanması

Besiyeri olarak Triptik Soy Broth, Mueller Hinton Agar, Koyun Kanlı Agar ve % 5 Koyun Kanlı Mueller Hinton Agar kullanılmıştır. Koyun Kanlı Agar ve % 5 Koyun Kanlı Mueller Hinton Agar besiyerleri, Pendik Veteriner Kontrol Enstitüsü'nden kullanıma hazır halde temin edilmiştir. Mueller Hinton Agar ve Triptik Soy Broth besiyerleri laboratuarda aseptik şartlar altında hazırlanmıştır.

Mueller Hinton Agar besiyerini hazırlamak için 34 gr toz besiyeri üzerine distile su ilave edilerek 1000 ml'ye tamamlandı. Besiyeri çözeltisi iyice karıştırıldıktan sonra erlenmayer'in ağzı alüminyum folyo ile kapatılarak 121 °C'de, 1 atm. basınç altında 15 dk steril edildi. Otoklavdan çıkarılan besiyeri 50 °C'ye kadar soğutuldu ve aseptik şartlarda steril petri kaplarına 4 mm (~20 ml) kalınlığında dökülerek katılaşması beklendi. Hazırlanan besiyerleri kullanılacakları zamana kadar +4 °C'de buzdolabında bekletildi.

Triptik Soy Broth besiyerini hazırlamak için 30 gr toz besiyeri üzerine distile su ilave edilerek 1000 ml'ye tamamlandı. Erlenmayerde iyice karıştırılan besiyeri çözeltisi vida kapaklı kısa deney tüplerinin her birine 5 ml aktarıldıktan sonra 121 °C'de, 1 atm. basınç altında 15 dk steril edildi. Otoklavdan çıkarılan besiyerlerinin kapakları sıkıca kapatılarak kullanılacakları zamana kadar +4 °C'de buzdolabında bekletildi.

4.2.4. Test Mikroorganizmalarının Hazırlanması

Antibakteriyel aktivite tayininde kullanılacak olan bakteri suşları Triptik Soy Broth besiyerine aşılınmış ve 37 °C'de 24 saat inkübe edilerek aktifleştirilmiştir. Aktifleştirilen bakteriler Koyun Kanlı Agar'a çizgi yöntemi ile ekilerek taze kültürler hazırlanmıştır. Bakteri ekimi yapılan petripler 37 °C'de, 24 saat boyunca inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonrasında bakteri yoğunluğu 0.5 Mc Farland'a (10^8 CFU/ml) ayarlanarak çalışma için hazır hale getirilmiştir.

4.2.5. Antibakteriyel Aktivite Tayini

4.2.5.1. Disk difüzyon metodu

Disk difüzyon yöntemi (Kirby-Bauer yöntemi) antibiyotiklere duyarlılığın saptanması amacıyla uygulanan kalitatif bir yöntemdir. Bakteriyostatik etki gösterir [77]. Bu yöntemde farklı antimikrobik maddelerin bilinen belirli miktarlarını içeren diskler, incelenecek mikroorganizmanın bulunduğu besiyeri yüzeyine yerleştirilir.

Mikroorganizmanın üremesi (maddeye direnç) veya ürememesi (maddeye duyarlılık) gözlenir. İnhibisyon zonunun boyutunu (çapı) diskteki antimikrobiyal maddenin konsantrasyonu ve difüzyon oranı etkiler [52].

Tablo 4.1. Kirby – Bauer yönteminin standartları [1]

Kullanılan besiyeri	Mueller Hinton Agar
Besiyerinin petrideki kalınlığı	4 - 6 mm
Besiyerinin pH'ı	7.2 - 7.4
Bakteri süspansiyonunun bulanıklığı	0.5 Mc Farland
Bakteri süspansiyonunun miktarı	0.2 ml
Disklerin birbirine uzaklığı	2 - 2.5 cm
Disklerin petrinin kenarına uzaklığı	1.5 cm

4.2.5.2. Deneyin yapılışı

Elde edilen kabuk ekstraktlarına belirlenen oranlarda DMSO eklenerek istenilen konsantrasyonlar (6400 µg/10µl, 3200 µg/10µl, 1600 µg/10µl, 800 µg/10µl, 400 µg/10µl) disklerle emdirilmek üzere hazırlanmıştır. Ticari olarak temin edilen 6 mm çapındaki, antibiyotik içermeyen boş steril disklerle hazırlanan ekstraktlardan 10 µl/disk emdirilerek diskler bir gece kurumaya bırakılmıştır. Hazırlanmış olan bakteri süspansiyonlarından steril eküvyon çubuk ile Mueller Hinton Agar ve % 5 koyun kanlı Mueller Hinton Agar besiyerlerine ekim yapılmıştır. Ekstraktların emdirildiği diskler steril pens yardımıyla, besiyerleri üzerine hafifçe bastırılarak eşit mesafede yerleştirilmiştir. Negatif kontrol olarak DMSO emdirilmiş diskler kullanılmıştır. Pozitif kontrol olarak ise Klindamisin (10 µg), Tetrasiklin (10 µg) ve Amoksisilin-Klavulanik asit (30 µg) antibiyotik diskleri kullanılmıştır. Hazırlanan petripler, viridans streptokoklar için anaerobik inkübasyon koşullarında (% 5-10 CO₂) ; diğer test mikroorganizmaları için ise aerobik inkübasyon koşullarında 37 °C'de 24 saat boyunca inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonrasında meydana gelen inhibisyon zon çaplarının ölçümü yapılmıştır. Bu çalışma her bakteri ve ekstrakt için üç paralelli olarak ayrı ayrı denenmiştir.

4.2.5.3. Zon çaplarının ölçülmesi

37 °C'de 24 saat inkübatörde bekleyen mikroorganizmalara karşı, bitki materyalinin antibakteriyel aktivitesinin olup olmadığının belirlenmesi için disklerin etrafında oluşan inhibisyon zon çapları (mm) ölçülmüştür. Üç paralelli yapılan deneylerde zon çaplarının ortalaması alınarak sonuçlar kaydedilmiştir. Disklerin etrafında oluşan zon çaplarına bakılarak bitki materyalinin, çalışmada kullanılan bakteriler üzerinde antibakteriyel aktivitesinin olup olmadığı belirlenmiştir.

BÖLÜM 5. BULGULAR

5.1. Deneysel Sonuçlar

Punica granatum Linn. bitkisinin 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 ve *Bacillus subtilis* ATCC 6633 bakteri suşlarına karşı *in vitro* ortamda antibakteriyel etkisinin araştırıldığı bu çalışmada; antibakteriyel aktivite tayininde disk difüzyon metodu kullanılmıştır. Meyve kabuk ekstraktlarının meydana getirdiği en yüksek inhibisyon zon çaplarının (18-30 mm) *Staphylococcus epidermidis* ve *Staphylococcus aureus* bakterilerine karşı olduğu gözlenmiştir. Ekstraktlar, *Salmonella abony*, *Escherichia coli*, *Streptococcus mitis*, *Streptococcus salivarius* bakterilerine karşı sınırlı inhibitör etki (7-12 mm) gösterirken; *Streptococcus mutans*, *Bacillus subtilis*, *Enterococcus faecalis* ve *Salmonella typhimurium* bakterilerine karşı inhibitör etki göstermemiştir. Gözlemlenen etkilerin çözücülerden kaynaklanıp kaynaklanmadığını anlamak için negatif kontrol olarak Dimetil sülfoksit çözücüsü boş disklere emdirilip kurutulmuş ve hiçbirinde zon çapı gözlenmemiştir. Bu da ekstraktların antibakteriyel etkilerinin çözücülerden değil, bitki özütünden kaynaklandığını göstermiştir. Ayrıca kullanılan bitki ekstraktlarının miktarları arttıkça oluşturdukları inhibisyon zon çaplarının büyüdüğü yani antibakteriyel etkilerinin arttığı gözlenmiştir. Pozitif kontrol olarak kullanılan antibiyotik diskler farklı bakterilerde farklı zon çapları oluşturmuştur. Sonuçlar her bakteri için tablolar halinde verilmiştir.

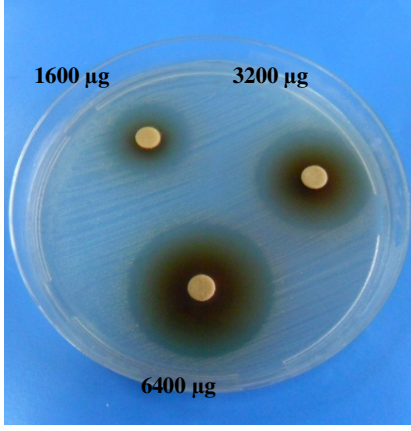
5.2. *Punica granatum* L. bitkisinin *Staphylococcus epidermidis* üzerine etkisi

Punica granatum L. bitkisinin meyve kabuklarından hazırlanan etanol, aseton, metanol ve etil asetat ekstraktlarının *S. epidermidis* bakterisine karşı antibakteriyel etkisi incelenmiştir.

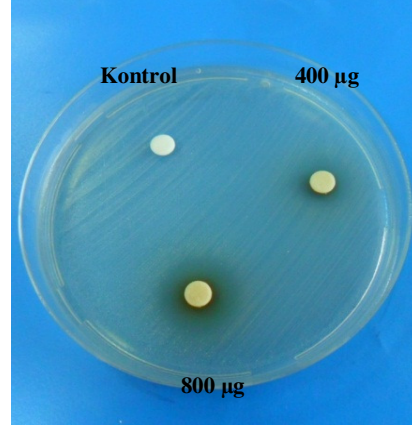
Tablo 5.1. *Punica granatum* L. bitkisinin *S. epidermidis* üzerine etkisi

Ekstrakt çeşitleri	Ekstrakt miktarları (µg)					Kontrol	DA (10µg)	TE (10µg)	AMC (30µg)
	ZON ÇAPLARI (mm)	400	800	1600	3200				
Etanol	14	16	20	24	30	0	35	8	32
Aseton	15	19	22	25	29	0			
Metanol	12	15	20	24	28	0			
Etil asetat	0	10	15	19	24	0			

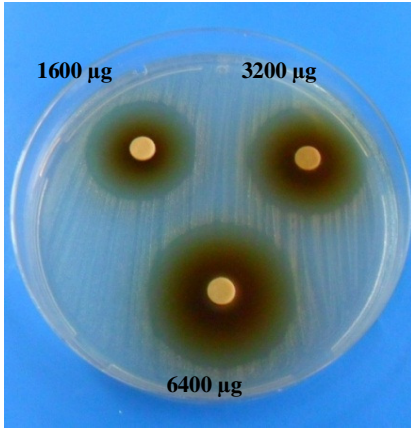
Etanol ekstraktının 400 µg'lık diski 14 mm, 800 µg'lık diski 16 mm, 1600 µg'lık diski 20 mm, 3200 µg'lık diski 24 mm, 6400 µg'lık diski 30 mm inhibisyon zon çapı oluşturmuştur. Aseton ekstraktının 400 µg'lık diski 15 mm, 800 µg'lık diski 19 mm, 1600 µg'lık diski 22 mm, 3200 µg'lık diski 25 mm, 6400 µg'lık diski 29 mm inhibisyon zon çapı oluşturmuştur. Metanol ekstraktının 400 µg'lık diski 12 mm, 800 µg'lık diski 15 mm, 1600 µg'lık diski 20 mm, 3200 µg'lık diski 24 mm, 6400 µg'lık diski 28 mm inhibisyon zon çapı oluşturmuştur. Etil asetat ekstraktının 400 µg'lık diskinde etki gözlenmezken 800 µg'lık diski 10 mm, 1600 µg'lık diski 15 mm, 3200 µg'lık diski 19 mm, 6400 µg'lık diski 24 mm inhibisyon zon çapı oluşturmuştur. Negatif kontrol olarak kullanılan DMSO emdirilmiş disklerde etki gözlenmemiştir.



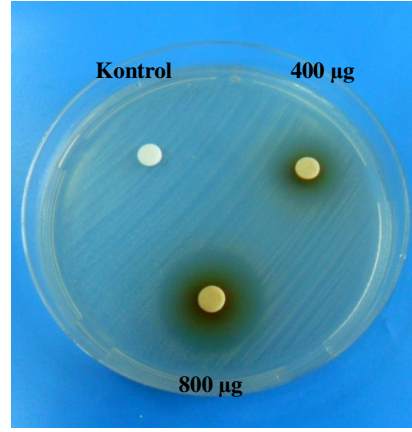
(a)



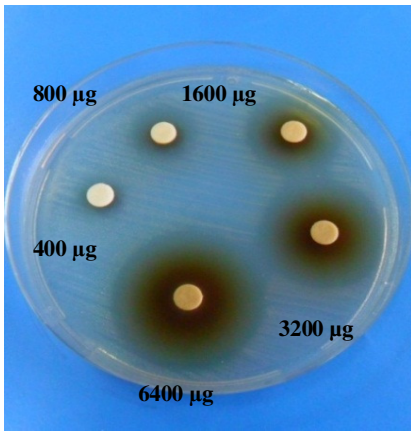
(b)



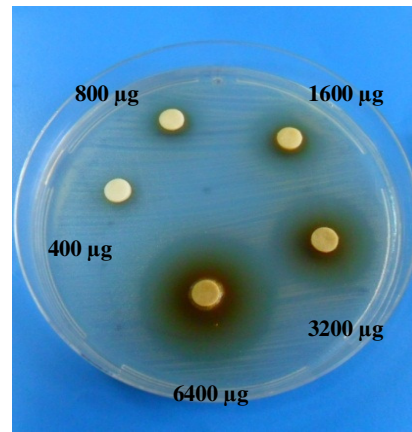
(c)



(d)

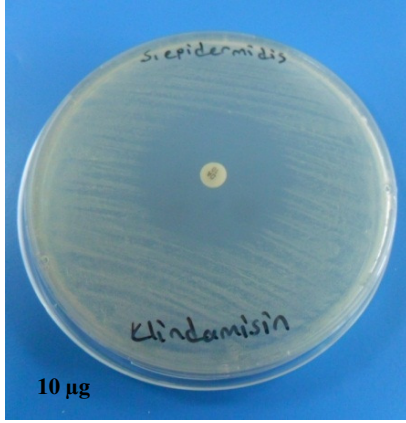


(e)

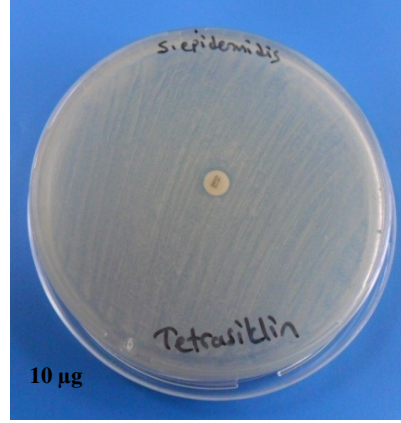


(f)

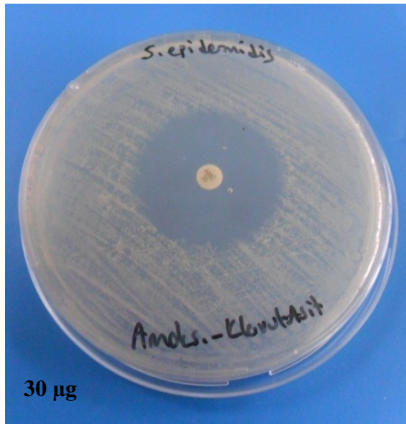
Şekil 5.1. *Punica granatum* L. bitki ekstraktlarının *Staphylococcus epidermidis* üzerine etkisi: a-b) Etanol ekstraktı, c-d) Aseton ekstraktı, e) Metanol ekstraktı, f) Etil asetat ekstraktı, g-h-ı) Antibiyotikler



(g)



(h)



(i)

Şekil 5.1. (Devam)

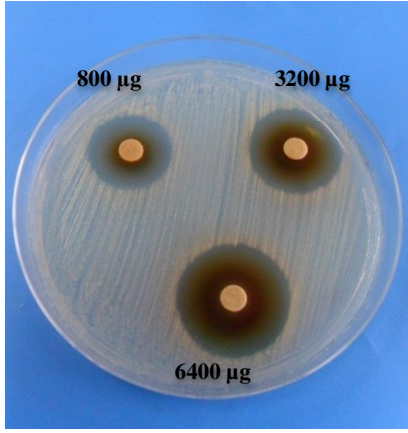
5.3. *Punica granatum* L. bitkisinin *Staphylococcus aureus* üzerine etkisi

Punica granatum L. bitkisinin meyve kabuklarından hazırlanan etanol, aseton, metanol ve etil asetat ekstraktlarının *S. aureus* bakterisi üzerine antibakteriyel etkisi incelenmiştir.

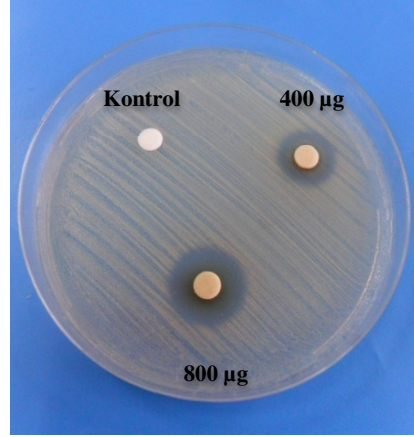
Tablo 5.2. *Punica granatum* L. bitkisinin *S. aureus* üzerine etkisi

Ekstrakt çeşitleri	Ekstrakt miktarları (μg)						Kontrol	DA (10 μg)	TE (10 μg)	AMC (30 μg)
	ZON ÇAPLARI (mm)	400	800	1600	3200	6400				
Etanol	14	16	17	20	22	0	31	19	30	
Aseton	9	15	20	22	24	0				
Metanol	12	15	17	18	20	0				
Etil asetat	0	0	9	15	18	0				

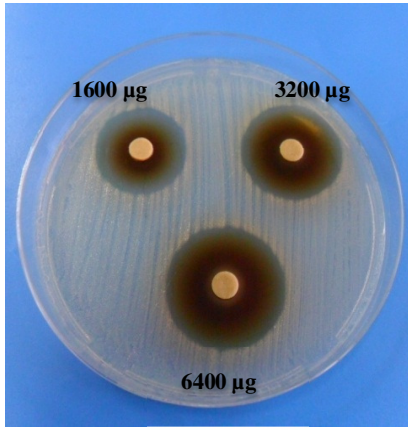
Etanol ekstraktının 400 μg 'lık diski 14 mm, 800 μg 'lık diski 16 mm, 1600 μg 'lık diski 17 mm, 3200 μg 'lık diski 20 mm, 6400 μg 'lık diski 22 mm inhibisyon zon çapı oluşturmuştur. Aseton ekstraktının 400 μg 'lık diski 9 mm, 800 μg 'lık diski 15 mm, 1600 μg 'lık diski 20 mm, 3200 μg 'lık diski 22 mm, 6400 μg 'lık diski 24 mm inhibisyon zon çapı oluşturmuştur. Metanol ekstraktının 400 μg 'lık diski 12 mm, 800 μg 'lık diski 15 mm, 1600 μg 'lık diski 17 mm, 3200 μg 'lık diski 18 mm, 6400 μg 'lık diski 20 mm inhibisyon zon çapı oluşturmuştur. Etil asetat ekstraktının 400 μg 'lık ve 800 μg 'lık diskinde inhibitör etki gözlenmezken 1600 μg 'lık diskinde 9 mm, 3200 μg 'lık diskinde 15 mm, 6400 μg 'lık diskinde 18 mm inhibisyon zon çapı gözlenmiştir. Negatif kontrol olarak kullanılan DMSO emdirilmiş disklerde etki gözlenmemiştir.



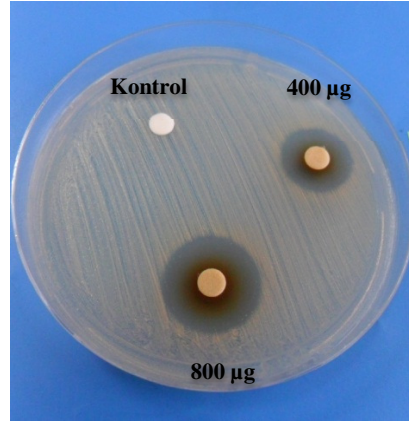
(a)



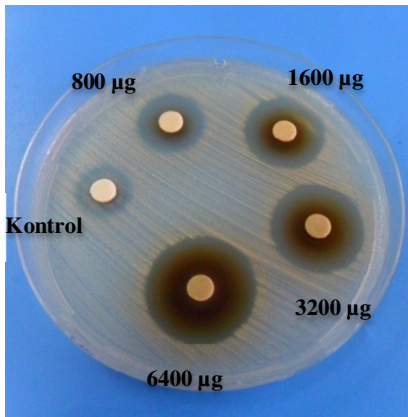
(b)



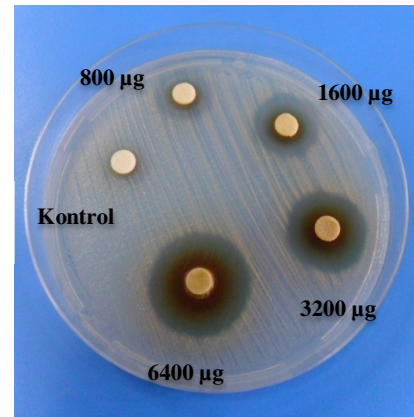
(c)



(d)

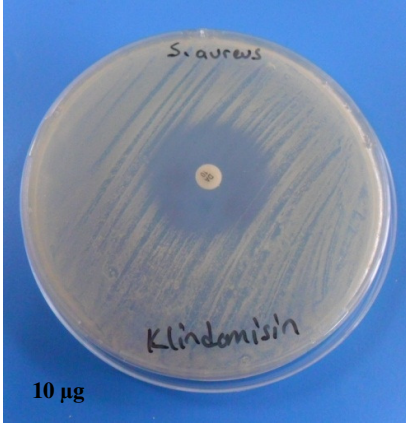


(e)



(f)

Şekil 5.2. *Punica granatum* L. bitki ekstraktlarının *Staphylococcus aureus* üzerine etkisi: a-b) Etanol ekstraktı, c-d) Aseton ekstraktı, e) Metanol ekstraktı, f) Etil asetat ekstraktı, g-h-i) Antibiyotikler



(g)



(h)



(i)

Şekil 5.2. (Devam)

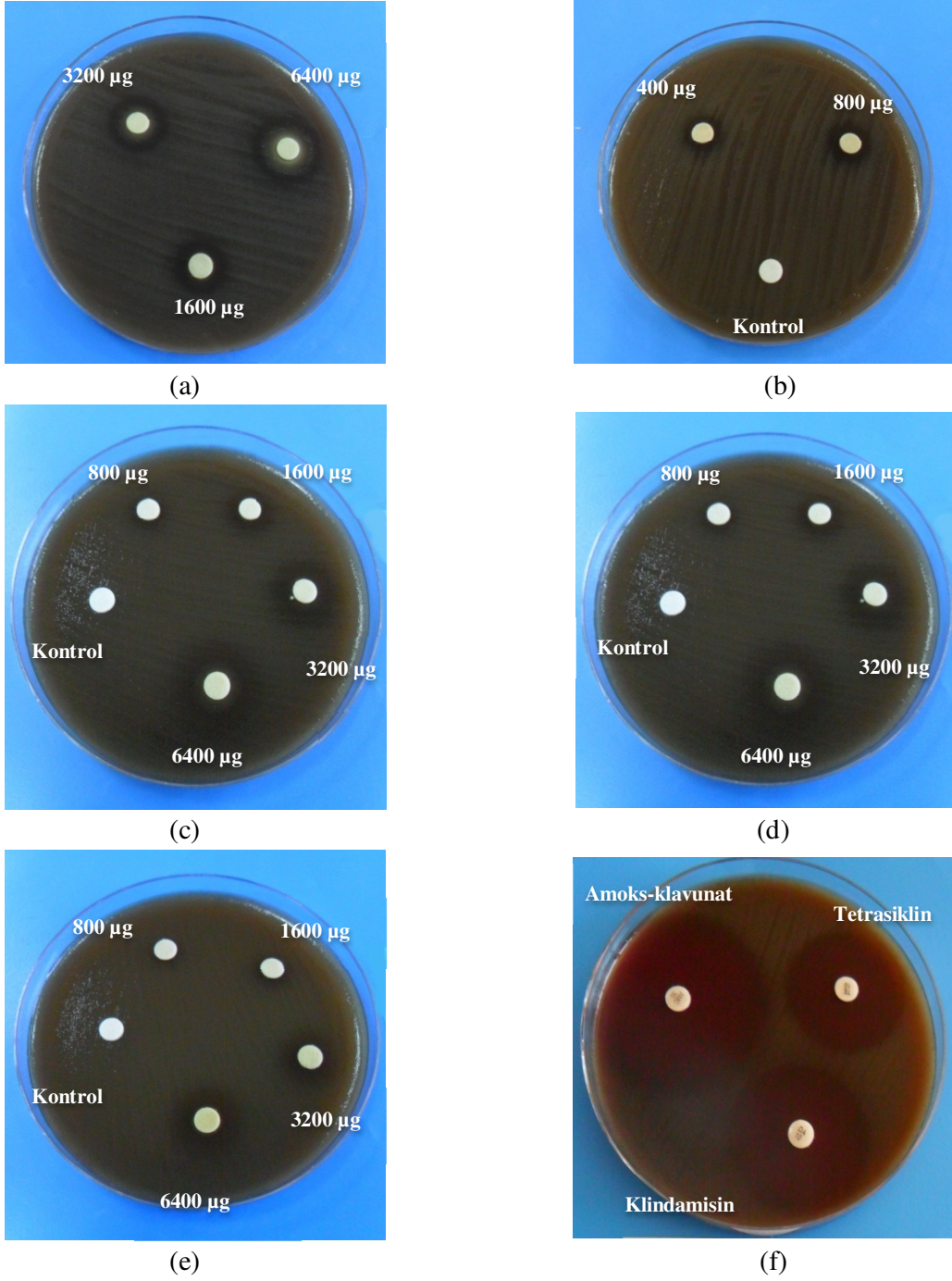
5.4. *Punica granatum* L. bitkisinin *Streptococcus mitis* üzerine etkisi

Punica granatum L. bitkisinin meyve kabuklarından hazırlanan etanol, aseton, metanol ve etil asetat ekstraktlarının *S. mitis* bakterisi üzerine antibakteriyel etkisi incelenmiştir.

Tablo 5.3. *Punica granatum* L. bitkisinin *S. mitis* üzerine etkisi

Ekstrakt çeşitleri	Ekstrakt miktarları (µg)					Kontrol	DA (10µg)	TE (10µg)	AMC (30µg)	
	ZON ÇAPLARI (mm)	400	800	1600	3200					6400
Etanol	ZON ÇAPLARI (mm)	0	0	7	9	12	0	34	31	42
Aseton		0	0	0	0	10	0			
Metanol		0	0	0	8	10	0			
Etil asetat		0	0	0	0	0	0			

Etanol ekstraktının 400 µg'lık ve 800 µg'lık disklerinin inhibisyon zonu oluşturmadığı; 1600 µg'lık diskinde 7 mm, 3200 µg'lık diskinde 9 mm, 6400 µg'lık diskinde 12 mm inhibisyon zon çapı gözlenmiştir. Aseton ekstraktının 6400 µg'lık diskinde 10 mm inhibisyon zon çapı gözlenmiştir. Metanol ekstraktının 3200 µg'lık diskinde 8 mm, 6400 µg'lık diskinde 10 mm inhibisyon zon çapı gözlenmiştir. Etil asetat ekstraktında antibakteriyel etki gözlenmemiştir. Negatif kontrol olarak kullanılan DMSO emdirilmiş disklerde inhibitör etki gözlenmemiştir.



Şekil 5.3. *Punica granatum* L. bitki ekstraktlarının *Streptococcus mitis* üzerine etkisi: a-b) Etanol ekstraktı c) Aseton ekstraktı, d) Metanol ekstraktı, e) Etil asetat ekstraktı, f) Antibiyotikler

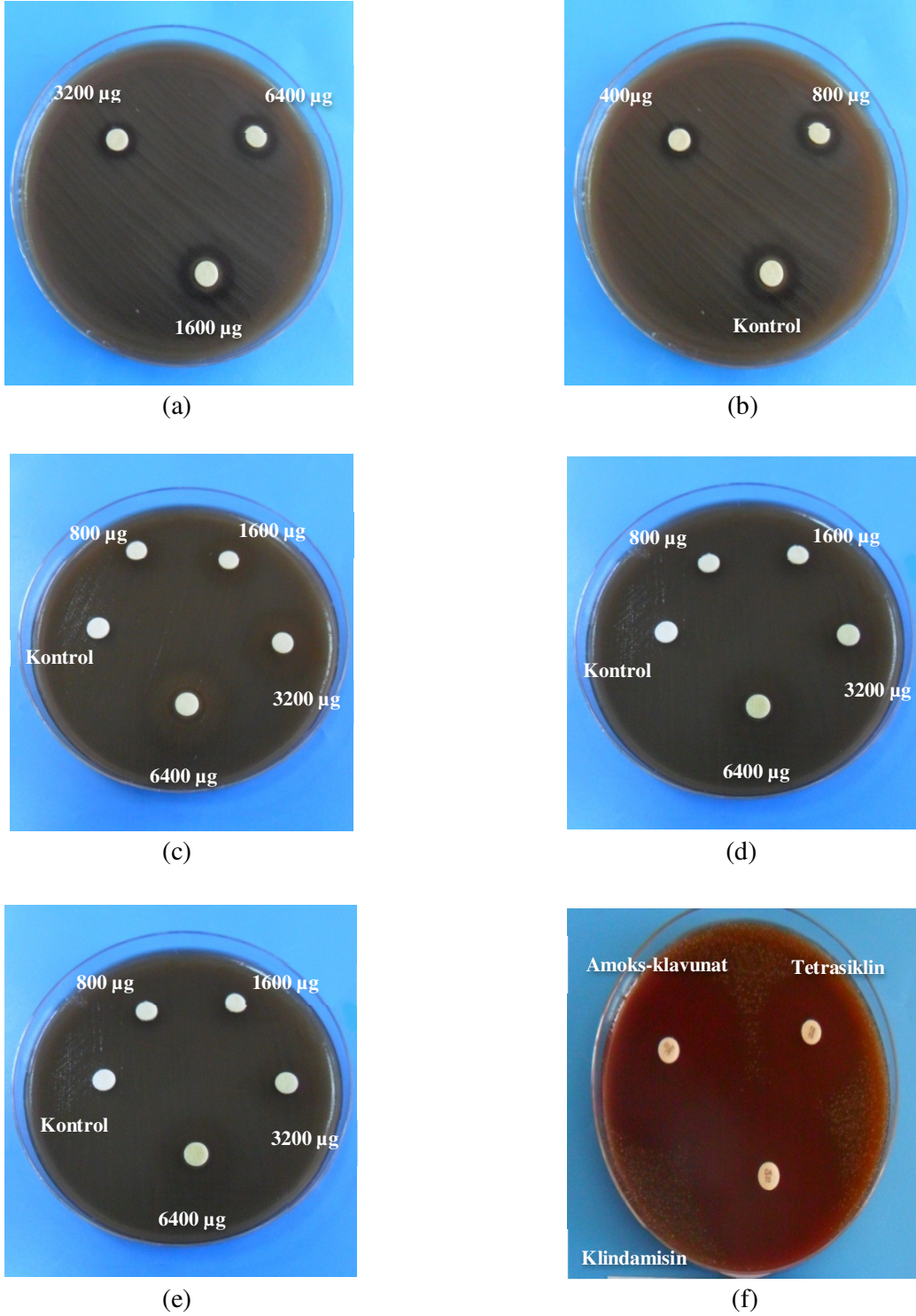
5.5. *Punica granatum* L. bitkisinin *Streptococcus salivarius* üzerine etkisi

Punica granatum L. bitkisinin meyve kabuklarından hazırlanan etanol, aseton, metanol ve etil asetat ekstraktlarının *S. salivarius* üzerine antibakteriyel etkisi incelenmiştir.

Tablo 5.4. *Punica granatum* L. bitkisinin *S. salivarius* üzerine etkisi

Ekstrakt çeşitleri	Ekstrakt miktarları (μg)					Kontrol	DA ($10\mu\text{g}$)	TE ($10\mu\text{g}$)	AMC ($30\mu\text{g}$)	
	ZON ÇAPLARI (mm)	400	800	1600	3200					6400
Etanol	ZON ÇAPLARI (mm)	0	0	0	0	8	0	40	28	45
Aseton		0	0	0	7	9	0			
Metanol		0	0	0	0	0	0			
Etil asetat		0	0	0	0	0	0			

Etanol ekstraktının $6400 \mu\text{g}$ 'lık diski 8 mm inhibisyon zon çapı oluşturmuştur. Aseton ekstraktının $3200 \mu\text{g}$ 'lık diskinin 7 mm , $6400 \mu\text{g}$ 'lık diskinin 9 mm inhibisyon zon çapı oluşturduğu gözlenmiştir. Metanol ve etil asetat ekstraktlarında antibakteriyel etki gözlenmemiştir. Negatif kontrol olarak kullanılan DMSO emdirilmiş disklerde inhibitör etki gözlenmemiştir.



Şekil 5.4. *Punica granatum* L. bitki ekstraktlarının *Streptococcus salivarius* üzerine etkisi: a-b) Etanol ekstraktı, c) Aseton ekstraktı, d) Metanol ekstraktı, e) Etil asetat ekstraktı, f) Antibiyotikler

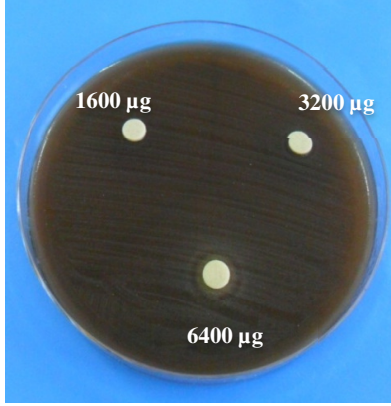
5.6. *Punica granatum* L. bitkisinin *Streptococcus mutans* üzerine etkisi

Punica granatum L. bitkisinin meyve kabuklarından hazırlanan etanol, aseton, metanol ve etil asetat ekstraktlarının *S. mutans* üzerine antibakteriyel etkisi incelenmiştir.

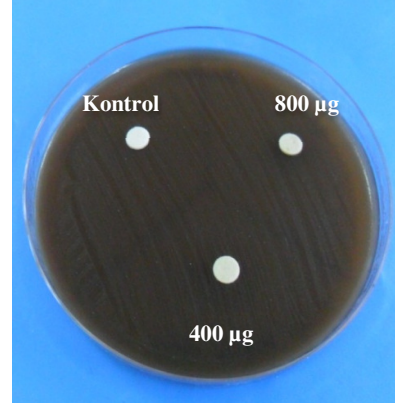
Tablo 5.5. *Punica granatum* L. bitkisinin *S. mutans* üzerine etkisi

Ekstrakt çeşitleri	Ekstrakt miktarları (µg)					Kontrol	DA (10µg)	TE (10µg)	AMC (30µg)
	ZON ÇAPLARI (mm)	400	800	1600	3200				
Etanol	ZON ÇAPLARI (mm)	0	0	0	0	0	48	26	5
Aseton		0	0	0	0	0			
Metanol		0	0	0	0	0			
Etil asetat		0	0	0	0	0			
		0	0	0	0	0			

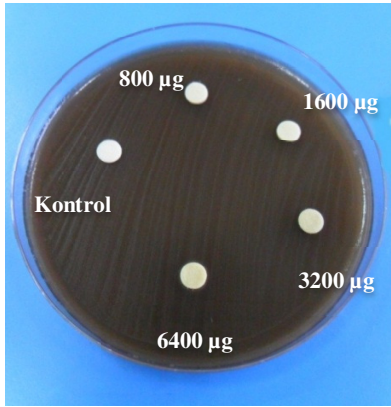
S. mutans bakterisine karşı ekstraktlar antibakteriyel etki gösterememiştir. Negatif kontrollerde etki gözlenmemiştir.



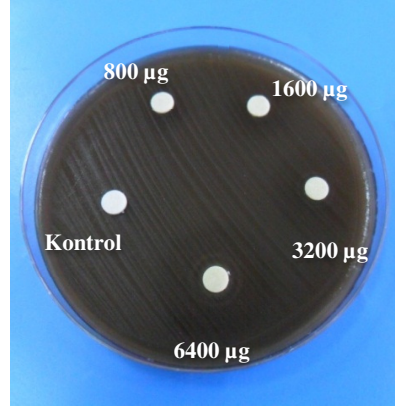
(a)



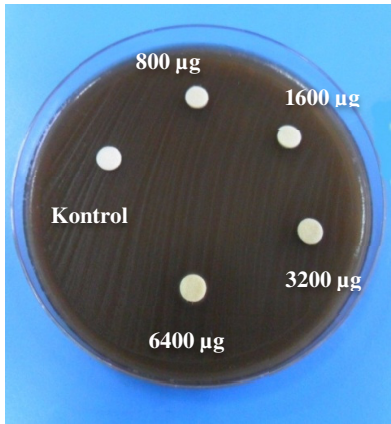
(b)



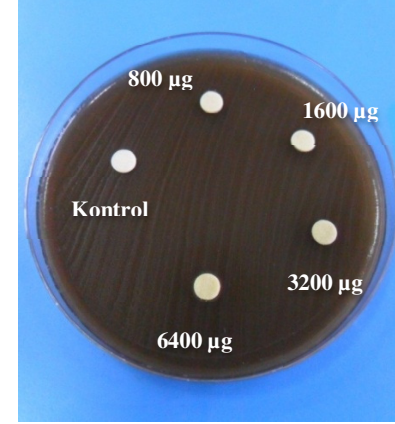
(c)



(d)

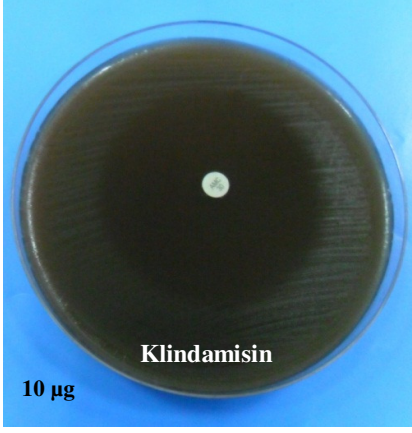


(e)

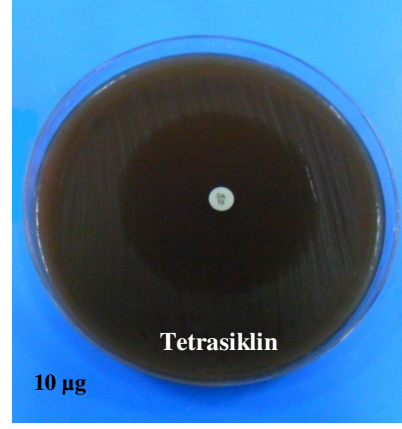


(f)

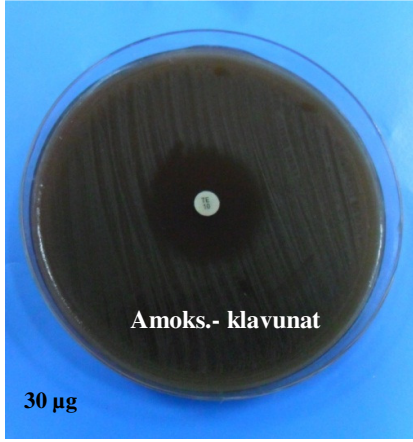
Şekil 5.5. *Punica granatum* L. bitki ekstraktlarının *Streptococcus mutans* üzerine etkisi: a-b) Etanol ekstraktı, c) Aseton ekstraktı, d) Metanol ekstraktı, e) Etil asetat ekstraktı, g-h-ı) Antibiyotikler



(g)



(h)



(i)

Şekil 5.5. (Devam)

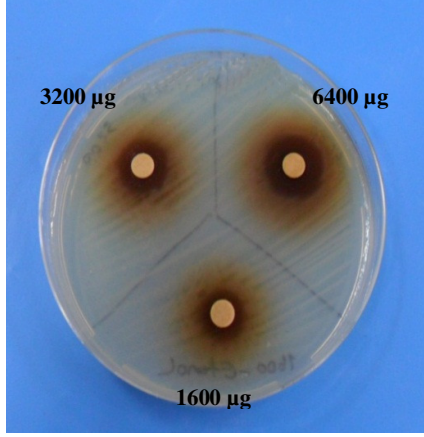
5.7. *Punica granatum* L. bitkisinin *Escherichia coli* üzerine etkisi

Punica granatum L. bitkisinin meyve kabuklarından hazırlanan etanol, aseton, metanol ve etil asetat ekstraktlarının *E. coli* üzerine antibakteriyel etkisi incelenmiştir.

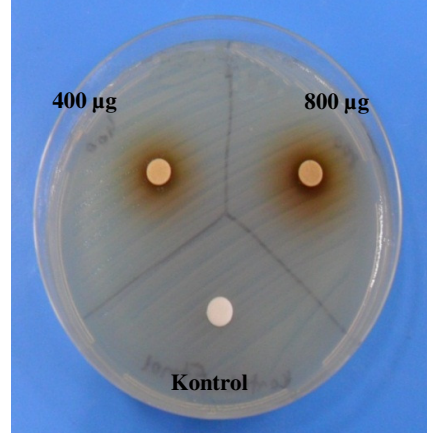
Tablo 5.6. *Punica granatum* L. bitkisinin *E. coli* üzerine etkisi

Ekstrakt çeşitleri	Ekstrakt miktarları (µg)					Kontrol	DA (10µg)	TE (10µg)	AMC (30µg)	
	ZON ÇAPLARI (mm)	400	800	1600	3200					6400
Etanol		0	0	0	8	10	0	7	17	24
Aseton		0	0	0	0	0	0			
Metanol		0	0	0	0	0	0			
Etil asetat		0	0	0	0	0	0			

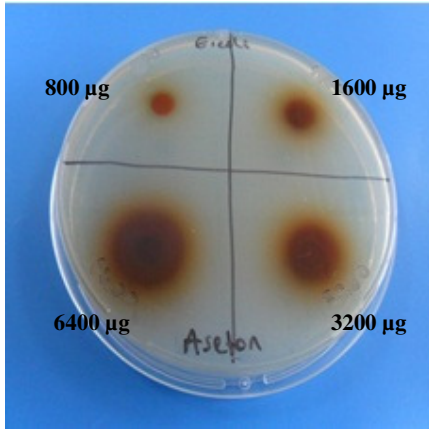
Etanol ekstraktının 3200 µg'lık diski 8 mm, 6400 µg'lık diski 10 mm inhibisyon zon çapı oluşturmuştur. Aseton, metanol ve etil asetat ekstraktlarında antibakteriyel etki gözlenmemiştir. Negatif kontrollerde etki gözlenmemiştir.



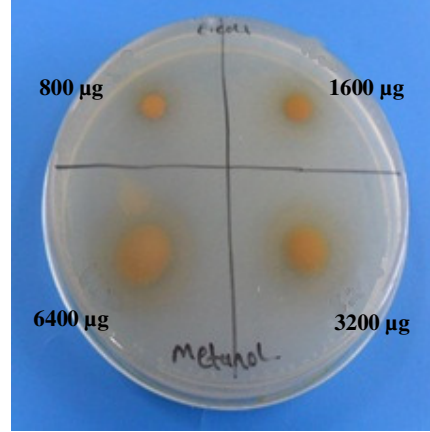
(a)



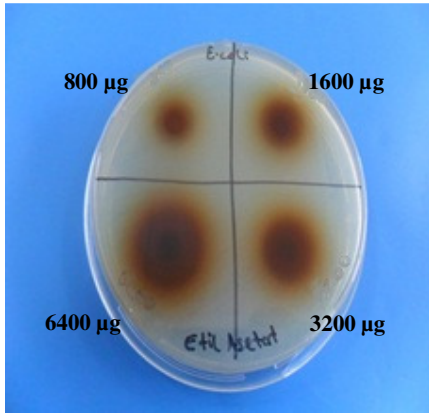
(b)



(c)



(d)



(e)



(f)

Şekil 5.6. *Punica granatum* L. bitki ekstraktlarının *Escherichia coli* üzerine etkisi: a-b) Etanol ekstraktı, c) Aseton ekstraktı, d) Metanol ekstraktı e) Etil asetat ekstraktı, f) Antibiyotikler

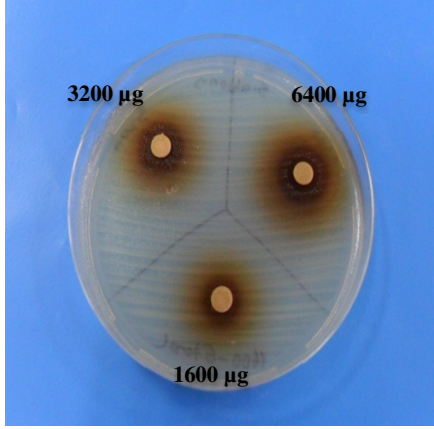
5.8. *Punica granatum* L. bitkisinin *Salmonella abony* üzerine etkisi

Punica granatum L. bitkisinin meyve kabuklarından hazırlanan etanol, aseton, metanol ve etil asetat ekstraktlarının *S. abony* üzerine etkisi incelenmiştir.

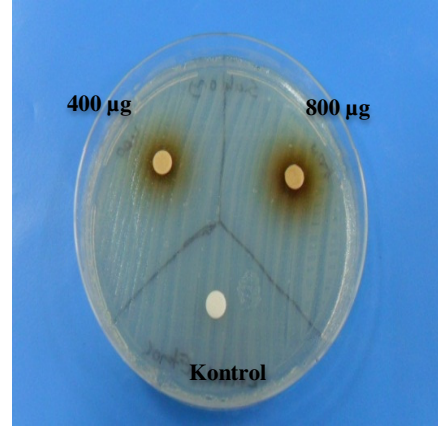
Tablo 5.7. *Punica granatum* L. bitkisinin *S. abony* üzerine etkisi

Ekstrakt çeşitleri	Ekstrakt miktarları (µg)					Kontrol	DA (10µg)	TE (10µg)	AMC (30µg)	
	ZON ÇAPLARI (mm)	400	800	1600	3200					6400
Etanol	ZON ÇAPLARI (mm)	0	0	0	8	10	0	7	17	30
Aseton		0	0	0	7	8	0			
Metanol		0	0	0	0	0	0			
Etil asetat		0	0	0	0	0	0			

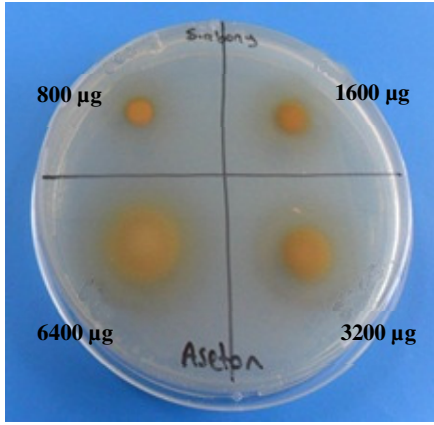
Etanol ekstraktının 3200 µg'lık diski 8 mm, 6400 µg'lık diski 10 mm inhibisyon zon çapı oluşturmuştur. Aseton ekstraktının 3200 µg'lık diski 7 mm, 6400 µg'lık diski 8 mm inhibisyon zon çapı oluşturmuştur. Metanol ve etil asetat ekstraktlarında antibakteriyel etki gözlenmemiştir. Negatif kontrollerde etki gözlenmemiştir.



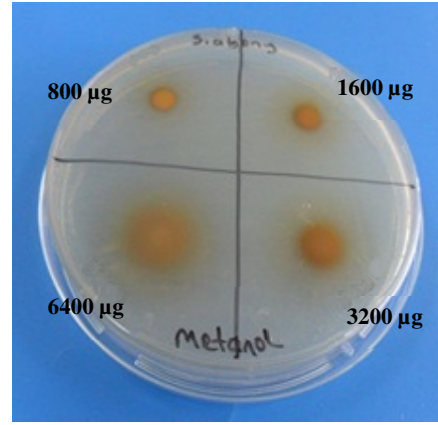
(a)



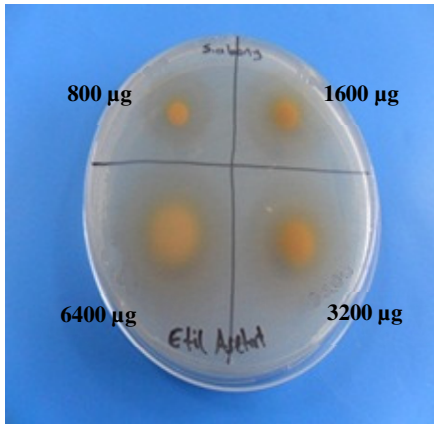
(b)



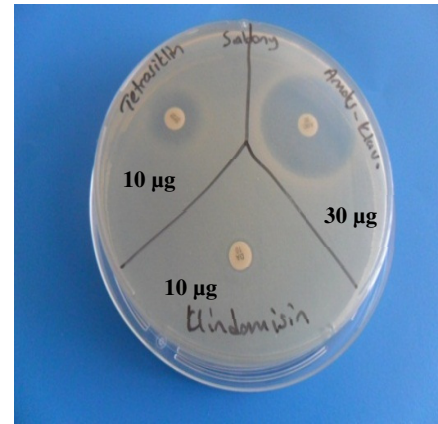
(c)



(d)



(e)



(f)

Şekil 5.7. *Punica granatum* L. bitki ekstraktlarının *Salmonella abony* üzerine etkisi: a-b) Etanol ekstraktı, c) Aseton ekstraktı, d) Metanol ekstraktı, e) Etil asetat ekstraktı, f) Antibiyotikler

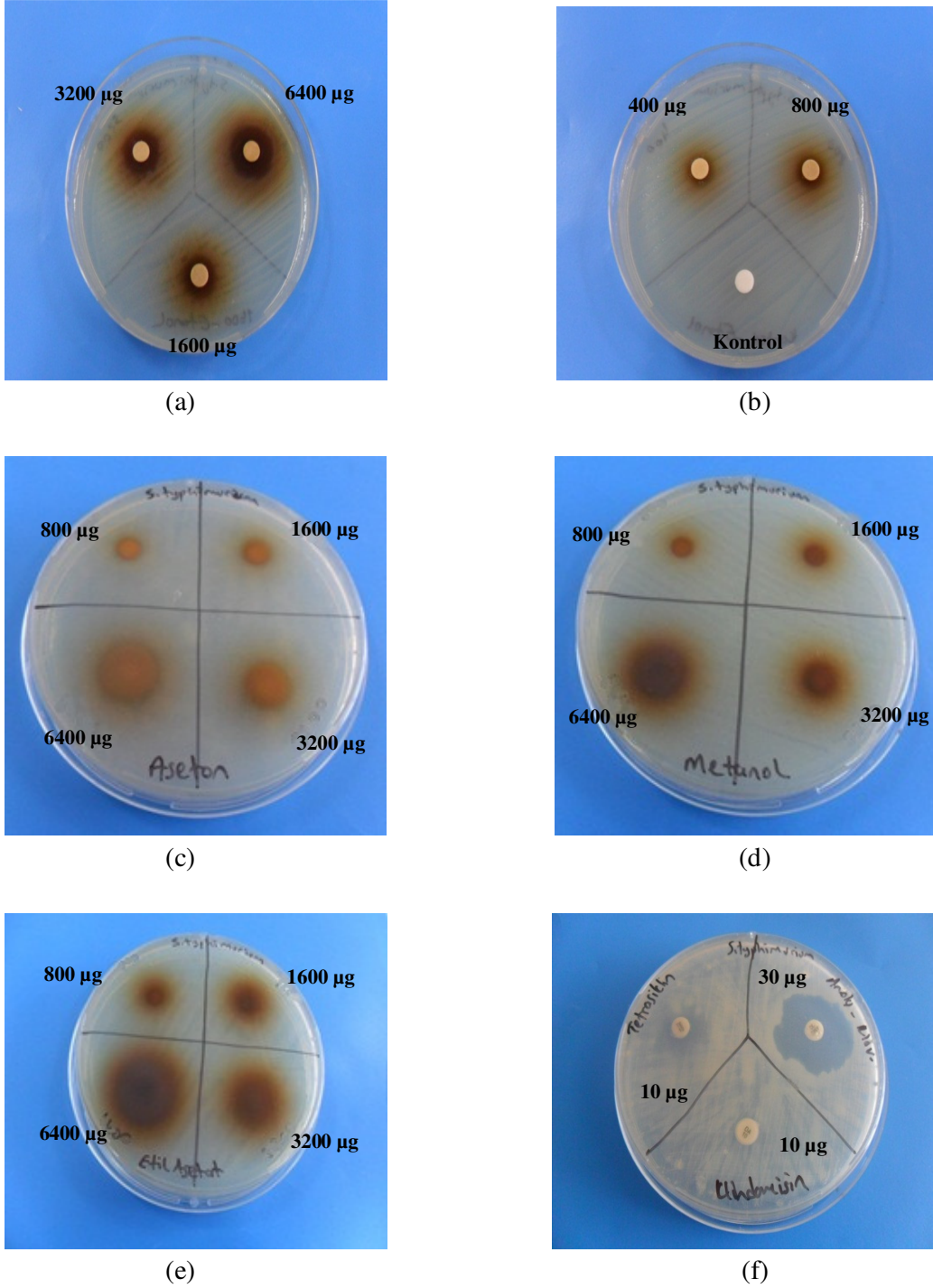
5.9. *Punica granatum* L. bitkisinin *Salmonella typhimurium* üzerine etkisi

Punica granatum L. bitkisinin meyve kabuklarından hazırlanan etanol, aseton, metanol ve etil asetat ekstraktlarının *S. typhimurium* üzerine antibakteriyel etkisi incelenmiştir.

Tablo 5.8. *Punica granatum* L. bitkisinin *S. typhimurium* üzerine etkisi

Ekstrakt çeşitleri	Ekstrakt miktarları (µg)					Kontrol	DA (10µg)	TE (10µg)	AMC (30µg)
	ZON ÇAPLARI (mm)	400	800	1600	3200				
Etanol	0	0	0	0	0	0	0	0	29
Aseton	0	0	0	0	0	0			
Metanol	0	0	0	0	0	0			
Etil asetat	0	0	0	0	0	0			

Ekstraktlar *S. typhimurium* bakterisine karşı antibakteriyel etki gösterememiştir. Negatif kontrollerde etki gözlenmemiştir.



Şekil 5.8. *Punica granatum* L. bitki ekstraktlarının *Salmonella typhimurium* üzerine etkisi: a-b) Etanol ekstraktı, c) Aseton ekstraktı, d) Metanol ekstraktı, e) Etil asetat ekstraktı, f) Antibiyotikler

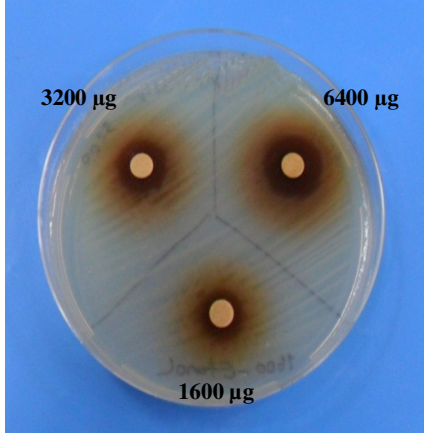
5.10. *Punica granatum* L. bitkisinin *Bacillus subtilis* üzerine etkisi

Punica granatum L. bitkisinin meyve kabuklarından elde edilen etanol, aseton, metanol ve etil asetat ekstraktlarının *B. subtilis* üzerine antibakteriyel etkisi incelenmiştir.

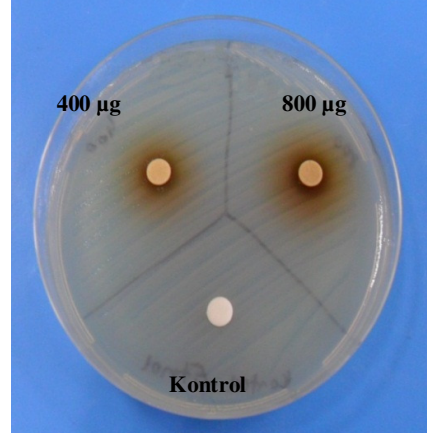
Tablo 5.9. *Punica granatum* L. bitkisinin *B. subtilis* üzerine etkisi

Ekstrakt çeşitleri	Ekstrakt miktarları (μg)					Kontrol	DA (10 μg)	TE (10 μg)	AMC (30 μg)
	ZON ÇAPLARI (mm)	400	800	1600	3200				
Etanol	0	0	0	0	0	0	10	8	38
Aseton	0	0	0	0	0	0			
Metanol	0	0	0	0	0	0			
Etil asetat	0	0	0	0	9	0			

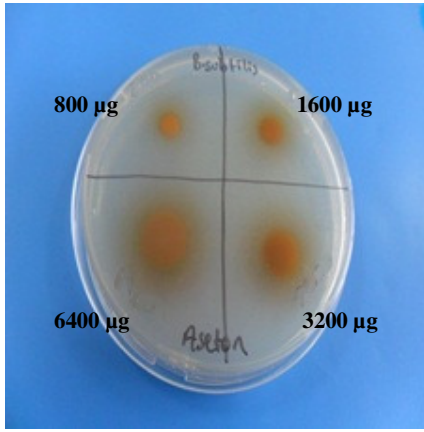
Etanol, aseton ve metanol ekstraktlarında antibakteriyel etki gözlenmemiştir. Etil asetat ekstraktının 6400 μg 'lık diski 9 mm inhibisyon zon çapı oluşturmuştur. Negatif kontrollerde etki gözlenmemiştir.



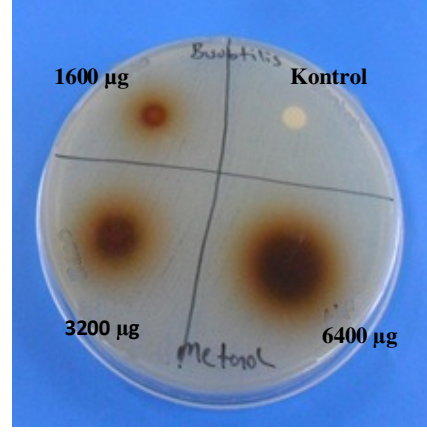
(a)



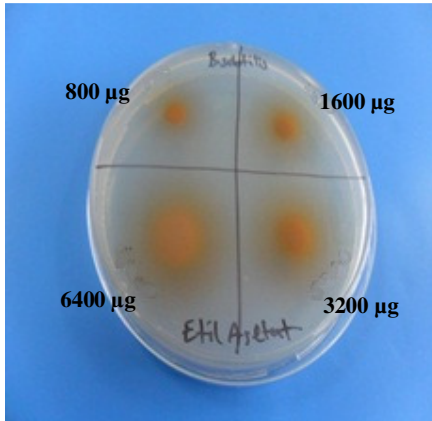
(b)



(c)



(d)



(e)



(f)

Şekil 5.9. *Punica granatum* L. bitki ekstraktlarının *Bacillus subtilis* üzerine etkisi: a-b) Etanol ekstraktı, c) Aseton ekstraktı, d) Metanol ekstraktı, e) Etil asetat ekstraktı, f) Antibiyotikler

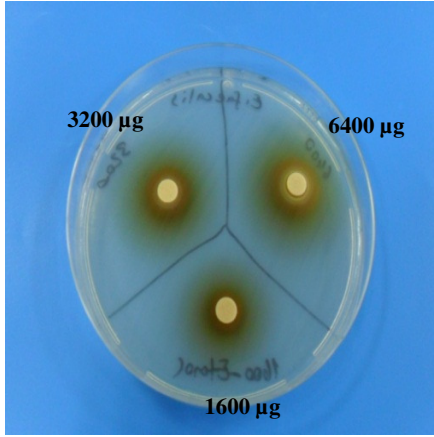
5.11. *Punica granatum* L. bitkisinin *Enterococcus faecalis* üzerine etkisi

Punica granatum L. bitkisinin meyve kabuklarından hazırlanan etanol, aseton, metanol ve etil asetat ekstraktlarının *E. faecalis* üzerine antibakteriyel etkisi incelenmiştir.

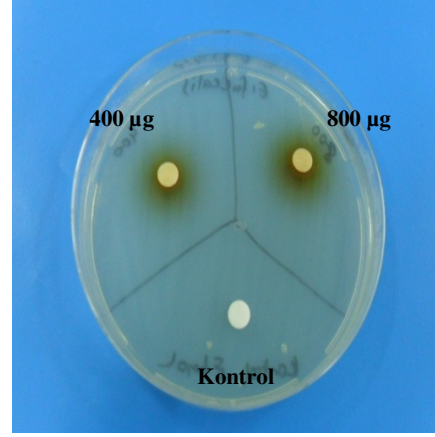
Tablo 5.10. *Punica granatum* L. bitkisinin *E. faecalis* üzerine etkisi

Ekstrakt çeşitleri	Ekstrakt miktarları (μg)					Kontrol	DA (10 μg)	TE (10 μg)	AMC (30 μg)
	ZON ÇAPLARI (mm)	400	800	1600	3200				
Etanol	ZON ÇAPLARI (mm)	0	0	0	0	0	14	8	24
Aseton		0	0	0	0	0			
Metanol		0	0	0	0	0			
Etil asetat		0	0	0	0	0			

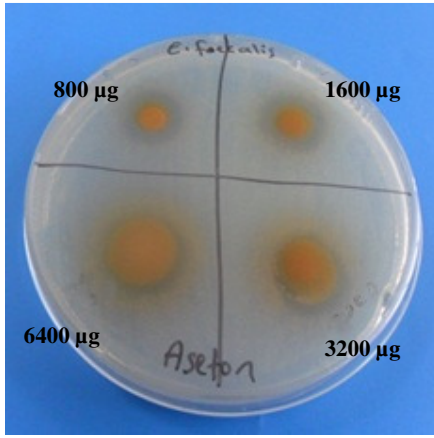
E. faecalis bakterisine karşı ekstraktlarda antibakteriyel etki gözlenmemiştir. Negatif kontrollerde etki gözlenmemiştir.



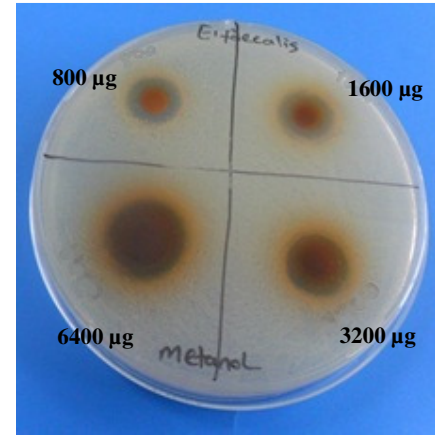
(a)



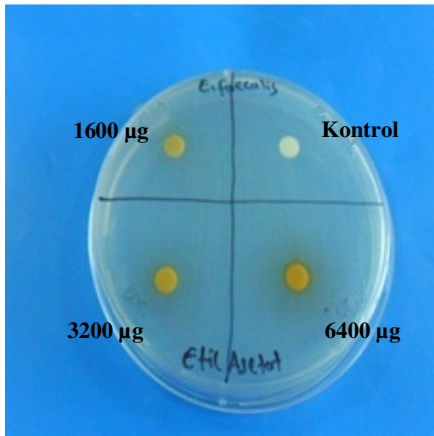
(b)



(c)



(d)



(e)



(f)

Şekil 5.10. *Punica granatum* L. bitki ekstraktlarının *Enterococcus faecalis* üzerine etkisi: a-b) Etanol ekstraktı, c) Aseton ekstraktı, d) Metanol ekstraktı, e) Etil asetat ekstraktı, f) Antibiyotikler

BÖLÜM 6. TARTIŞMA VE ÖNERİLER

Bu çalışmada, ülkemizde doğal olarak yetişen, Punicaceae familyasına ait *Punica granatum* L. bitkisinin, meyve kabuklarından çeşitli çözümlerle hazırlanan ekstraktların, yedi tanesi gram (+), üç tanesi gram (-) olmak üzere toplam on adet bakteri suşuna karşı antibakteriyel etkileri belirlenmiştir.

Ekstraktların gösterdiği en yüksek antibakteriyel etkinin *S. aureus* ve *S. epidermidis* bakterilerine karşı olduğu gözlenmiştir. Ekstraktlar; *S. abony*, *E. coli*, *S. mitis* ve *S. salivarius* bakterilerine karşı sınırlı inhibitör etki gösterir iken *S. mutans*, *B. subtilis*, *E. faecalis* ve *S. typhimurium* bakterilerine karşı antibakteriyel etki göstermemiştir. Elde edilen bulgular göz önüne alındığında; meyve kabuk ekstraktlarının gram pozitif bakteriler üzerinde gram negatif bakterilere kıyasla daha etkili olduğu gözlenmiştir.

Literatür çalışmalarında; *Punica granatum* L. bitkisinin çeşitli kısımlarının (yaprak, meyve kabuğu, zar,) farklı bakteriler üzerinde antimikrobiyal etkileri denenmiş, viridans streptokoklara karşı antibakteriyel etkileri incelenmemiştir.

Dağcı ve Dığrak, bazı meyve ekstraktlarının antibakteriyel ve antifungal aktivitelerini araştırdıkları çalışmalarında; *Punica granatum* L. ‘Nar’, *Citrus paradisi* Mc. Fad. ‘greyfurt’, *Cydonia oblonga* Miller ‘ayva’, *Musa sapientum* L. ‘muz’ meyve suları ile kabuk ekstraktlarının antimikrobiyal etkisini çeşitli bakteri ve mantarlara karşı incelemiştirlerdir. *Punica granatum* L. aseton, etil alkol ve sulu ekstraktlarının test edilen mikroorganizmalarına karşı 12-34 mm inhibisyon zonu ile en etkili bitki olduğu tespit edilmiştir. *P. granatum* L. 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 [42].

Taze nar meyve kabuklarının antibakteriyel etkisinin incelendiği bir başka çalışmada, hidrolize tanen grubundan olan ellagitanen punicalagin'i elde etmek için kromatografik teknikler ile etil asetat ekstraktı fraksiyonlarına ayrılmıştır. Metisiline dirençli *Staphylococcus aureus* bakterisine karşı punicalagin maddesinin inhibitör etkisini belirten zon çapı 20 mm olarak bulunmuştur. Çalışma sonucunda punicalagin maddesinin, narın antimikrobiyal aktivitesinden sorumlu madde olduğu ileri sürülmüştür [32].

Nar meyve kabuğunun yapısındaki fenolik bileşiklerin antibakteriyel etkilerinin araştırılması amacı ile yapılan bir başka çalışmada, %13 ellagic asit içeren standardize nar kabuğu ekstraktı (SPRE) elde edilmiştir. Standardize nar kabuğu ekstraktının, gram pozitif bakterilerden *S. aureus*'a karşı 15.2 mm ve *S. epidermidis*'e karşı 19.1 mm inhibisyon zon çapı oluştururken, gram negatif bakterilerden *E. coli* ve *S. typhimurium* bakterilerine karşı inhibitör etki göstermediği saptanmıştır [41]. Bu çalışmanın sonuçları ile bizim çalışmamızın sonuçları paralellik göstermiştir. Çalışmamızda *S. aureus*'a karşı 15-24 mm ve *S. epidermidis*'e karşı 19-30 mm inhibisyon zon çapı gözlenirken, *S. typhimurium* bakterisine karşı inhibitör etki 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* 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 olduğu ileri sürülmüştür [35].

Punica granatum L. bitkisinin kurutulmuş yapraklarının ve meyve kabuklarının antibakteriyel etkisinin belirlendiği bir çalışmada; hekzan, etil asetat, metanol ve su ekstraktlarının *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium*, *Bacillus subtilis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae* bakterilerine karşı

antibakteriyel 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 gözlenmemiş; etil asetat ekstraktında 30 mm'lik inhibisyon zonu gözlenmiştir. 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*, *E. coli* ve *B. subtilis* bakterilerine karşı inhibitör etki gözlenmemiştir [43].

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 madde grupları elde edilerek farklı bakteriler üzerindeki antibakteriyel etkisi araştırılabilir.

Sentetik yapıllı maddelerin sağlık üzerine olan yan etkilerinden dolayı insanların doğal antimikrobiyal maddelere ilgisinin her geçen gün arttığı ve bu nedenle son yıllarda bitkilerin tıbbi amaçlı kullanımlarına yönelik çalışmaların yoğunlaştığı düşünüldüğünde; *Punica granatum* L. bitkisinin, yeni sentezlenecek kemoterapötikler için kaynak olabileceği kanaatindeyiz.

KAYNAKLAR

- [1] AĞAÇFİDAN, A., ANĞ, Ö., BADUR, S., BOZKAYA, E., DERBENTLİ, Ş., KÜÇÜKER, A.M., GÜRLER, B., ÖNER, Y.A., ÖNGEN B., TÖRECİ, K., YEĞENOĞLU, Y., Tıbbi Mikrobiyoloji-1, Emel Bozkaya (editör), Nobel Tıp Kitabevleri, sf. 7-10, 107, 132, İstanbul, 2002.
- [2] GÜRHAN, G., EZER, N., Halk Arasında Hemoroit Tedavisinde Kullanılan Bitkiler-I, Hacettepe Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Dergisi, 24: 1, 37-55, 2004.
- [3] BAYDAR, H., Tıbbi, Aromatik ve Keyf Bitkileri Bilimi ve Teknolojisi, Süleyman Demirel Üniversitesi Yayınları, sf. 9, Isparta, 2005.
- [4] BAYTOP, A., Farmasötik Botanik, İstanbul Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Yayınları, sf. 9, İstanbul, 1996.
- [5] BAYTOP, T., Türkiye’de Bitkiler ile Tedavi Geçmişte ve Bugün, Nobel Tıp Kitabevleri, İkinci baskı, sf. 3-4, 306, İstanbul, 1999.
- [6] BALFOUR, I.B., Botany of Socotra, Grant&Son and Williams&Norgate, sf. 96, Edinburgh, 1888.
- [7] NEWMAN, R., LANSKY, E., Pomegranate: The Most Medicinal Fruit, Basic Health Publications, sf. 1-10, America, 2007.
- [8] VAUGHAN, J.G., GEISSLER, C.A., The New Oxford Book of Food Plants, Oxford University Press, sf. 104, England, 2009.
- [9] TOUS, J., FERGUSON, L., Mediterranean Fruits: Progress in New Crops, ASHS Press, sf. 416-430, Arlington, 1996.
- [10] BAYTOP, T., Türkiyenin Tıbbi ve Zehirli Bitkileri, İstanbul Üniversitesi Yayınları, sf. 280-281, İstanbul, 1963.
- [11] DAVIS, P.H., Flora of Turkey and the East Aegeans Islands, vol. 4, Edinburgh University Press, sf. 173-174, Edinburgh, 2008.

- [12] SAXENA, A.K., MANA, J.K., BERRY, S.K., Pomegranates, Post Harvest Tecnology Chemistry and Processing Indian Food Packer, 41 (4), 43-60, 1987.
- [13] ÖZYURT, M.S., Ekonomik Botanik, Erciyes Üniversitesi Yayınları, sf. 89, Kayseri, 1992.
- [14] TANKER, N., KOYUNCU, M., COŞKUN, M., Farmasötik Botanik, Ankara Üniversitesi Yayınları, sf. 273, Ankara, 2007.
- [15] AKIŞ, T., Piyasada Çay Olarak Tüketilen Bazı Bitkilerin Antioksidan Aktivitelerinin Belirlenmesi ve Fenolik Yapılarının İncelenmesi, Yüksek Lisans Tezi, Ege Üniversitesi Fen Bilimler Enstitüsü, 2010.
- [16] NAWWAR, M.A.M., HUSSEIN, S.A.M., MERFORT, I., Leaf Phenolics of *Punica granatum* L., Phytochemistry, 37, 1175–1177, 1994.
- [17] HUSSEIN, S.A.M., BARAKAT, H.H., MERFORT, I., NAWWAR, M.A.M., Tannins from the Leaves of *Punica granatum*, Phytochemistry, 45(4), 819–823, 1997.
- [18] 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.
- [19] POYRAZOĞLU, E., GÖKMEN, V., ARTIK, N., Organic Acids and Phenolic Compounds in Pomegranates (*Punica granatum* L.) Grown in Turkey, Journal of Food Composition and Analysis, 15, 567-575, 2002.
- [20] KULKARNI, A.P., MAHAL, H.S., KAPOOR, S., ARADHYA, S.M., *In Vitro* Studies on the Binding, Antioxidant and Cytotoxic Actions of Punicalagin, Journal of Agricultural and Food Chemistry, 55 (4), 1491-1500, 2007.
- [21] SEERAM, N.P., LEE, R., HEBER, D., Bioavailabilty of Ellagic Acid in Human Plasma After Consumption of Ellagitannins from Pomegranate (*Punica granatum* L.) juice, Clinica Chimica Acta, 348, 63-68, 2004.
- [22] ASRES, K., BUCAR, F., KNAUDER, E., YARDLEY, V., KENDRICK, H., CROFT, S.L., *In Vitro* Antiprotozoal Activity of Extract and Compounds from the Stem Bark of *Combretum molle*, Phytotherapy Research, 15, 613-617, 2001.
- [23] MARZOUK, M.S.A., EL-TOUMY, S.A.A., MOHARRAM, F.A., SHALABY, N.M.M., AHMED, A.A.E., Pharmacologically Active Ellagitannins from *Terminalia myriocarpa*, Planta Med, 68: 523-527, 2002.

- [24] DOIG, A.J., WILLIAMS, D.H., OELRICHS, P.B., BACZYNSKYJ, L., Isolation and Structure Elucidation of Punicalagin, a Toxic Hydrolysable Tannin from *Terminalia oblongata*, J. Chem. Soc. Perkin Trans 1, 2317-2321, 1990.
- [25] TAĞI, Ş., TÜRKYILMAZ, M., ÖZKAN, M., Nar Suyu Üretim Aşamalarında Antimikrobiyal Aktivite ve Fenolik Madde Miktarındaki Değişimler, Ankara Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri, Proje No:08B4343002, sf. 31, Ankara, 2010.
- [26] ÖĞÜTGEN, Z., Nar Kabuğu ile Farklı Mordanlar Kullanılarak Yünlü Kumaş Boyama, Yüksek Lisans Tezi, Yıldız Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, 2008.
- [27] KIRALAN, M., GÖLÜKÇÜ, M., TOKGÖZ, H., Oil and Conjugated Linolenic Acid Contents of Seeds from Important Pomegranate Cultivars (*Punica granatum* L.) Grown in Turkey, J Am Oil Chem Soc, 86: 985-990, 2009.
- [28] LEVINI, G.M., Pomegranate Roads: A Soviet Botanist's Exile from Eden, Floreant Press, sf. 27-35, USA, 2006.
- [29] ORAK, H.H., DEMİRCİ, A.Ş., GÜMÜŞ, T., Antibacterial and Antifungal Activity of Pomegranate (*Punica granatum* L.CV.) Peel, Electronic Journal of Environmental, Agricultural and Food Chemistry, 10 (3), 1958-1969, 2011.
- [30] OLIVEIRA, C., STAMFORD, T., NETO, N., SOUZA, E.L., Inhibition of *Staphylococcus aureus* in Broth and Meat Broth Using Synergies of Phenolics and Organic Acids, International Journal of Food Microbiology, 137: 312-316, 2010.
- [31] PEREIRA, M.V., SANDHU, D.K., SAMLETI, A.S., Evaluation of Antibacterial Activity of *Punica granatum* Peels Extract, Inter J Curr Trends Sci Tech, 1 (4): 232-236, 2010.
- [32] 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.
- [33] NEGI, P.S., JAYAPRAKASHA, G.K., Antioxidant and Antibacterial Activities of *Punica granatum* Peel Extracts, Journal of Food Science, 68 (4), 1473-1477, 2003.

- [34] DUMAN, A.D., OZGEN, M., DAYISOYLU, K.S., ERBIL, N., DURGAC, C., Antimicrobial Activity of Six Pomegranate (*Punica granatum* L.) Varieties and Their Relation to Some of Their Pomological and Phytonutrient Characteristics, *Molecules*, 14, 1808-1817, 2009.
- [35] SHAN, B., CAI, Y.Z., BROOKS, J.D., CORKE, C., The *in vitro* Antibacterial Activity of Dietary Spice and Medicinal Herb Extracts, *International Journal of Food Microbiology*, 117: 112-119, 2007.
- [36] MEHRU, N., RATHINAM, X., SUBRAMANIAM, S., AIYALU, R., SREENIVASAN, S., LACHIMANAN, Y.L., Antimicrobial Activity and Toxicity of *Punica granatum* L. Peel, *Journal of Applied Biological Sciences*, 2 (3): 57-59, 2008.
- [37] 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.
- [38] DEVI, A., SINGH, V., BHATT, A.B., Comparative Antibacterial Study of Different Extract of Pomegranate and Its Wild Variety, *International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research*, 2 (10): 2647-2650, 2011.
- [39] DEVATKAL, S.K., JAISWAL, P., JHA, S.N., BHARADWAJ, R., VISWAS, K.N., Antibacterial Activity of Aqueous Extract of Pomegranate Peel Against *Pseudomonas stutzeri* Isolated From Poultry Meat, *Journal Food Science Technology*, 2011.
- [40] MCCARRELL, E.M., GOULD, S.W., FIELDER, M.D., KELLY, A.F., SANKARY, W.E., NAUGHTON, D.P., Antimicrobial Activities of Pomegranate Rind Extracts: Enhancement by Addition of Metal Salts and Vitamin C, *BMC Complementary and Alternative Medicine*, 8: 64, 1-7, 2008.
- [41] PANICHAYUPAKARANANT,P.,TEWTRAKUL,S., YUENYONGSAWAD, S., Antibacterial, Anti-inflammatory and Anti-allergic Activities of Standardised Pomegranate Rind Extract, *Food Chemistry*, 123: 400-403, 2010.
- [42] DAĞCI, E.K., DIĞRAK, M., Bazı Meyve Ekstraktlarının Antibakteriyel ve Antifungal Aktiviteleri, *KSÜ. Fen ve Mühendislik Dergisi*, 8 (2), 2005.
- [43] 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.

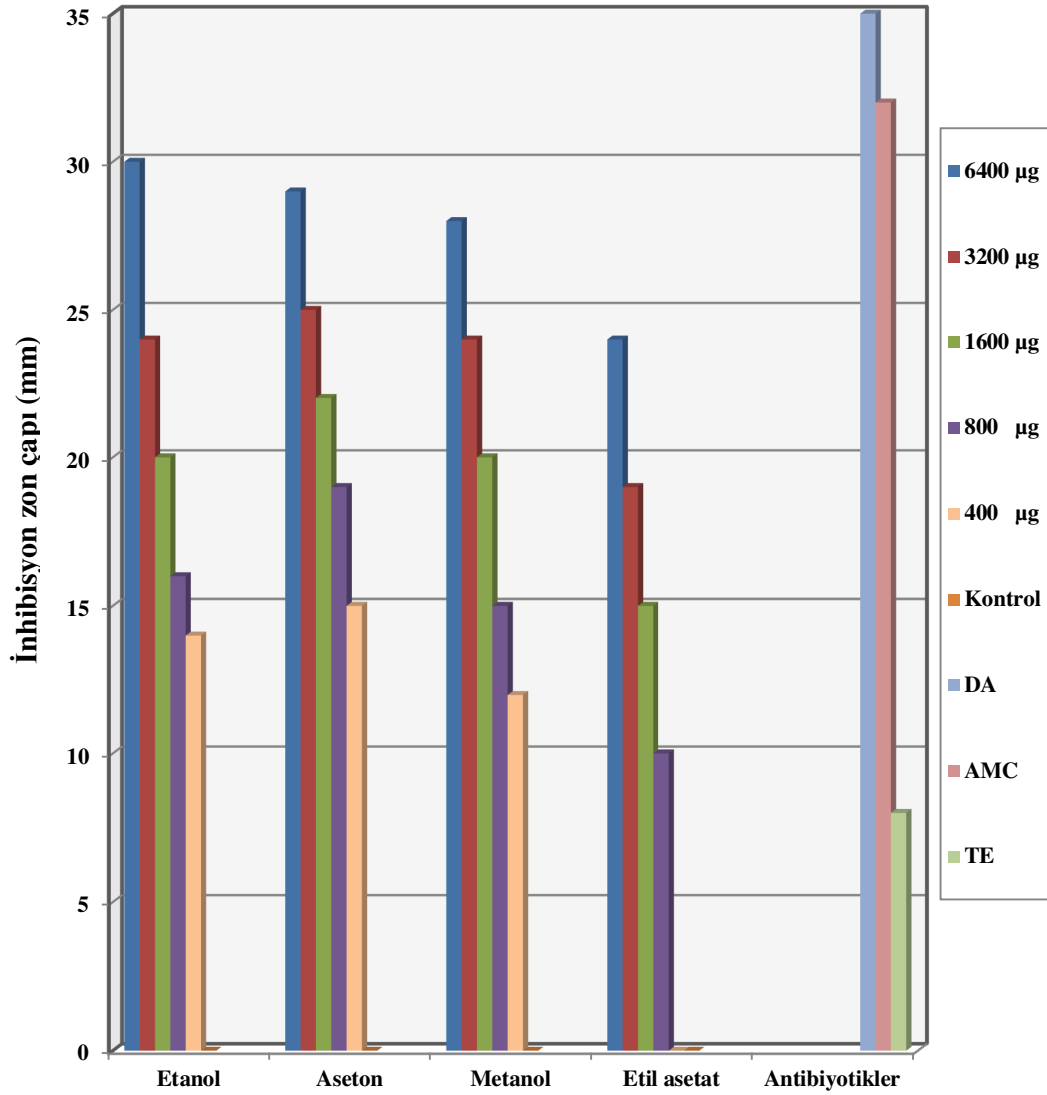
- [44] NASCIMENTO, G.G.F., LOCATELLI, J., FREITAS, P.C., SILVA, G.L., Antibacterial Activity of Plant Extracts and Phytochemicals on Antibiotic-Resistant Bacteria, *Brazilian Journal of Microbiology*, 31: 247-256, 2000.
- [45] CHOI, J.G., KANG, O.H., LEE, Y.S., CHAE, H.S., OH, Y.C., BRICE, O.O., KIM, M.S., SOHN, D.H., KIM, H.S., PARK, H., SHIN, D.W., RHO, J.R., KWON, D.Y., *In vitro* and *in vivo* Antibacterial Activity of *Punica granatum* Peel Ethanol Extract against Salmonella, *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2011.
- [46] PASHA, C., SAYEED, S., ALI, S., KHAN, Z., Antisalmonella Activity of Selected Medicinal Plants, *Turk J Biol*, 33: 59-64, 2009.
- [47] HASENEKOĞLU, İ., YEŞİLYURT, S., *Mikrobiyoloji*, Atatürk Üniversitesi Yayınları, sf. 57-98, 478, Erzurum, 2001.
- [48] TÜNGER, A., ÇAVUŞOĞLU, C., KORKMAZ, M., *Asya Mikrobiyoloji: Bakteriyoloji, Viroloji, Mikoloji, Parazitoloji, İmmünoloji, Asya Tıp Yayıncılık*, sf. 42-49, İzmir, 2003.
- [49] http://water.me.vccs.edu/courses/env108/lesson2_2.htm
(Erişim tarihi: Temmuz, 2012)
- [50] <http://www.biltek.tubitak.gov.tr/bilgipaket/canlilar/monera/poznegfark.htm>
(Erişim tarihi: Haziran, 2012)
- [51] KINSBURG, D.T., WAGNER, G.E., *Mikrobiyoloji*, İkinci baskı, Demir Serter (editör), Saray Tıp Kitabevleri, sf. 81-90, 110-115, İzmir, 1992.
- [52] STROHL, W.A., ROUSE, H., FISHER, B.D., *Mikrobiyoloji*, Özdem Anğ (editör), Nobel Tıp Kitabevleri, sf. 7-9, 31-33, 137-143, 145-155, 179-181, İstanbul, 2006.
- [53] VIRELLA, G., *Mikrobiyoloji ve Enfeksiyon Hastalıkları*, Üçüncü baskı, Demir Serter, Deniz Dereli, Ekin Ertem (editörler), Nobel Tıp Kitabevleri, sf. 97-110, 122-124, İstanbul, 1997.
- [54] ERGİN, A., *Viridans Streptokokların Laboratuvar Tanısında Klasik ve Yeni Yaklaşımlar*, *Mikrobiyol Bul*, 44: 495-503, 2010.
- [55] HART, T., SHEARS, P., *Tıp Mikrobiyolojisi Renkli Atlas*, Özdem Anğ, Mine Anğ Küçükler, O. Şadi Yenen (editörler), Nobel Tıp Kitabevleri, sf. 93-98, İstanbul, 2001.

- [56] BROOKS, G.F., CARROLL, K.C., BUTEL, J.S., MORSE, S., Tıbbi Mikrobiyoloji, Osman Şadi Yemen (editör), Nobel Tıp Kitabevleri, sf. 240-241, İstanbul, 2010.
- [57] TÜNGER, A., ÇAVUŞOĞLU, C., KORKMAZ, M., Mikrobiyoloji Tıpta Uzmanlık Sınavı (TUS) 2000 Serisi, Asya Tıp Yayıncılık, sf. 57, İzmir, 2000.
- [58] http://www.oerafrica.org/FTPFolder/health/cases_in_microbiology/content/viridans.html, (Erişim tarihi: Haziran, 2012)
- [59] USTAÇELEBİ, Ş., MUTLU, G., İMİR, T., CENGİZ, T., TÜMBAY, E., METE, Ö., Temel ve Klinik Mikrobiyoloji, Şemsettin Ustaçelebi (editör), Güneş Kitabevi, sf. 340-346, 350-357, 411-413, Ankara, 1999.
- [60] WILSON, W.R., SANDE, M.A., Enfeksiyon Hastalıkları Tanı ve Tedavi, İsmail Hakkı Dündar (editör), Nobel Tıp Kitabevleri, sf. 518-519, İstanbul, 2004.
- [61] KILIÇTURGAY, K., Klinik Mikrobiyoloji, Güneş ve Nobel Tıp Kitabevleri, sf. 25, Bursa, 1994.
- [62] Clinical Laboratory and Standards Institute, 2007. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing, Seventeenth Informational Supplement, M100- S17, Clinical and Standards Laboratory Institute, Wayne, PA.
- [63] BİLGEHAN, H., Klinik Mikrobiyoloji Özel Bakteriyoloji ve Bakteri Enfeksiyonları, Onuncu baskı, Barış Yayınları, sf. 3-17, 29-57, 240-362, İzmir, 2000.
- [64] ROBINSON, J.W., Microbiology for the Health Science, Fourth edition, Printice Hall, p. 222, 1997.
- [65] <http://www.laanlane.ee/article/teadus-bakter-t%C3%A4idab-hambaharja-rolli> (Erişim tarihi: Haziran, 2012)
- [66] NOLTE, W.A., Ağız Mikrobiyolojisi, Üçüncü baskı, Özdem Anğ (editör), Nobel Tıp Kitabevleri, sf. 41-47, 311, 341-343, İstanbul, 1990.
- [67] <http://www.sciencephoto.com/media/12968/enlarge> (Erişim tarihi: Haziran, 2012)
- [68] LEVINSON, W., Tıbbi Mikrobiyoloji ve İmmünoloji, Dokuzuncu baskı, Tuncay Özgünen (editör), Güneş Tıp Kitabevleri, sf. 106-142, Ankara, 2008.

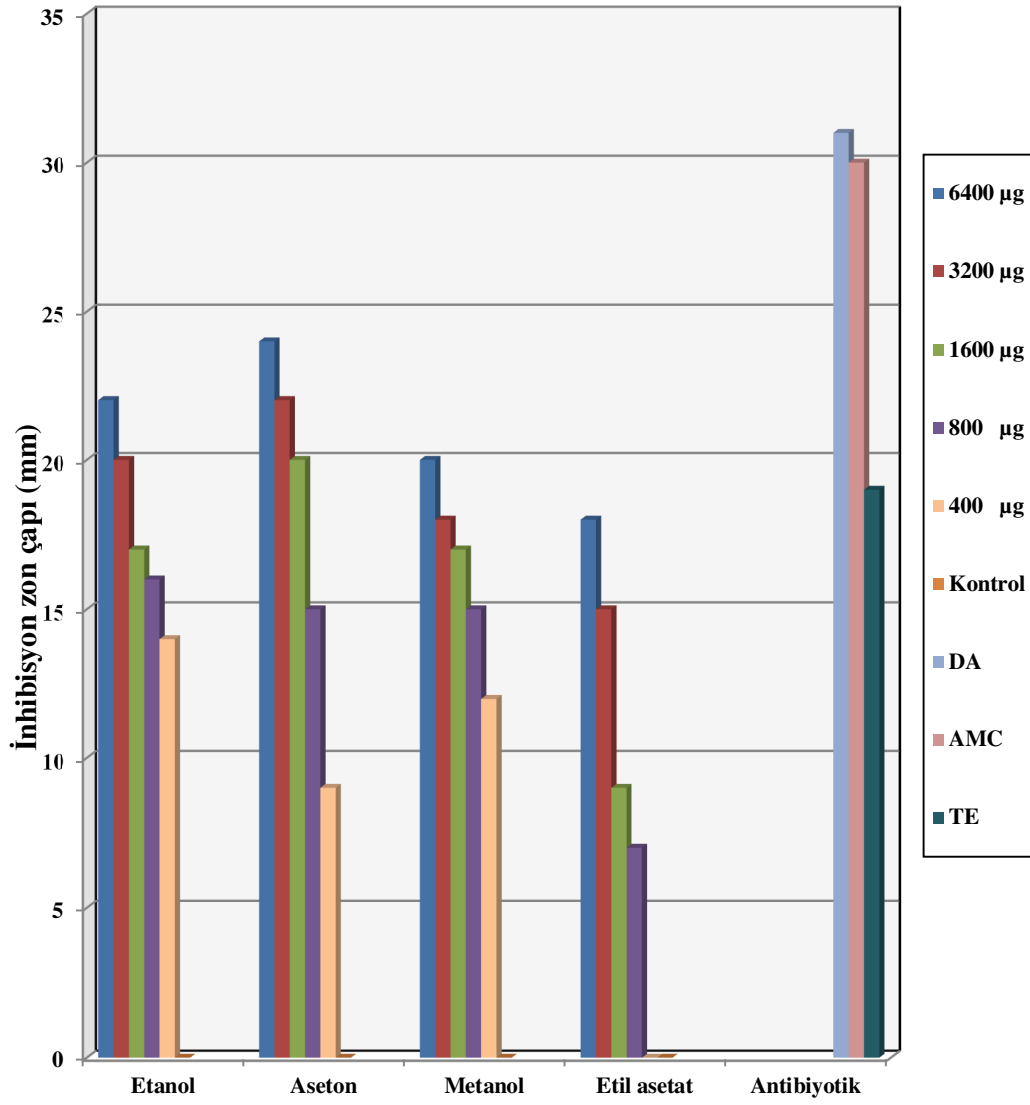
- [69] http://pubs.ext.vt.edu/2910/2910-7032/L_IMG_figure_1.jpg
(Erişim tarihi: Haziran, 2012)
- [70] TUNALI, Y., Farmasötik Mikrobiyoloji Uygulamaları, Anadolu Üniversitesi Yayınları, Eskişehir, 2009.
- [71] <http://www.sciencephoto.com/media/129706/enlarge>
(Erişim tarihi: Haziran, 2012)
- [72] http://news.bbcimg.co.uk/media/images/53234000/gif/_53234379_escherichia-coli.gif (Erişim tarihi: Haziran, 2012)
- [73] UNAT, E.K., Diş Hekimliği Mikrobiyolojisi, İstanbul Üniversitesi Yayınları, sf. 186-208, İstanbul, 1955.
- [74] <http://embryology.med.unsw.edu.au/note/images/git/Enterococcus-faecalis.jpg>
(Erişim tarihi: Haziran, 2012)
- [75] <http://www.crystalwater.sk/mikrobiologicke-znecistenie/>
(Erişim tarihi: Haziran, 2012)
- [76] http://bioweb.uwlax.edu/bio203/s2009/meinhard_jaso/Phylogenetic%20Tree.htm (Erişim tarihi: Haziran, 2012)
- [77] DÖKMECİ, İ., Farmakolojide Temel Kavramlar, Nobel Tıp Kitabevleri, sf. 837, Edirne, 2000.

EKLER

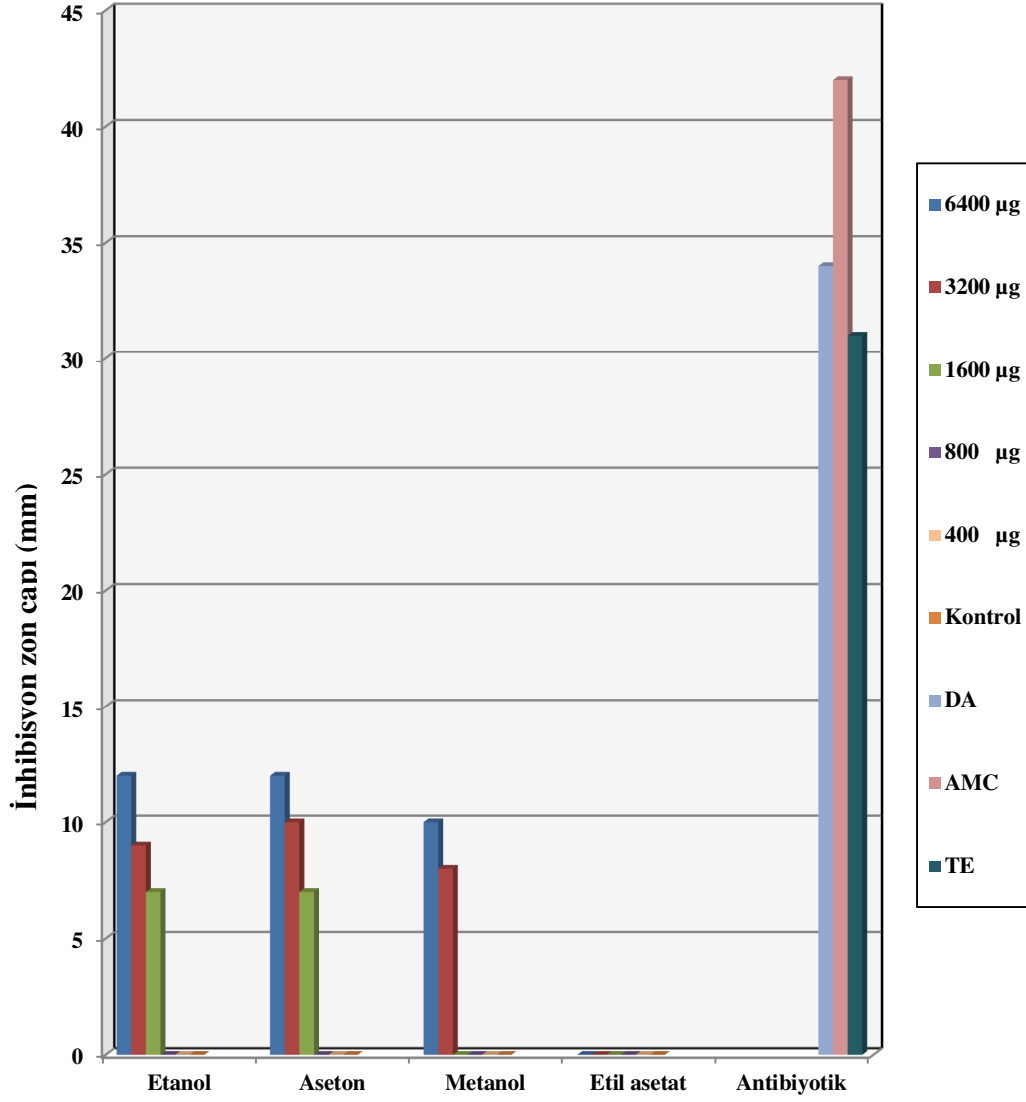
Ek. A.1. *Punica granatum* L. bitki ekstraktlarının *Staphylococcus epidermidis* bakterisine karşı oluşturdukları zon çapı verilerinin grafiksel gösterimi



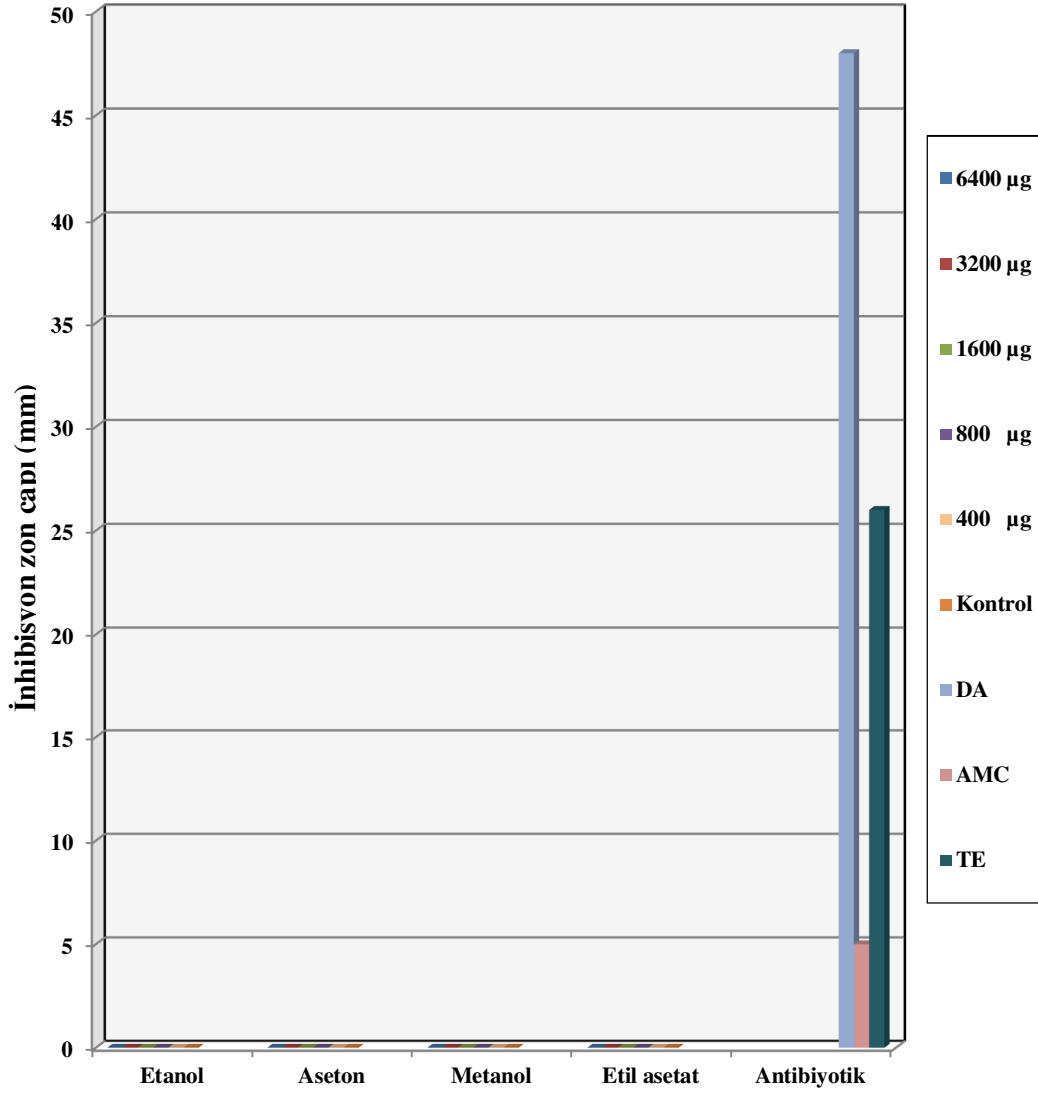
Ek A.2. *Punica granatum* L. bitki ekstraktlarının *Staphylococcus aureus* bakterisine karşı oluşturdukları zon çapı verilerinin grafiksel gösterimi



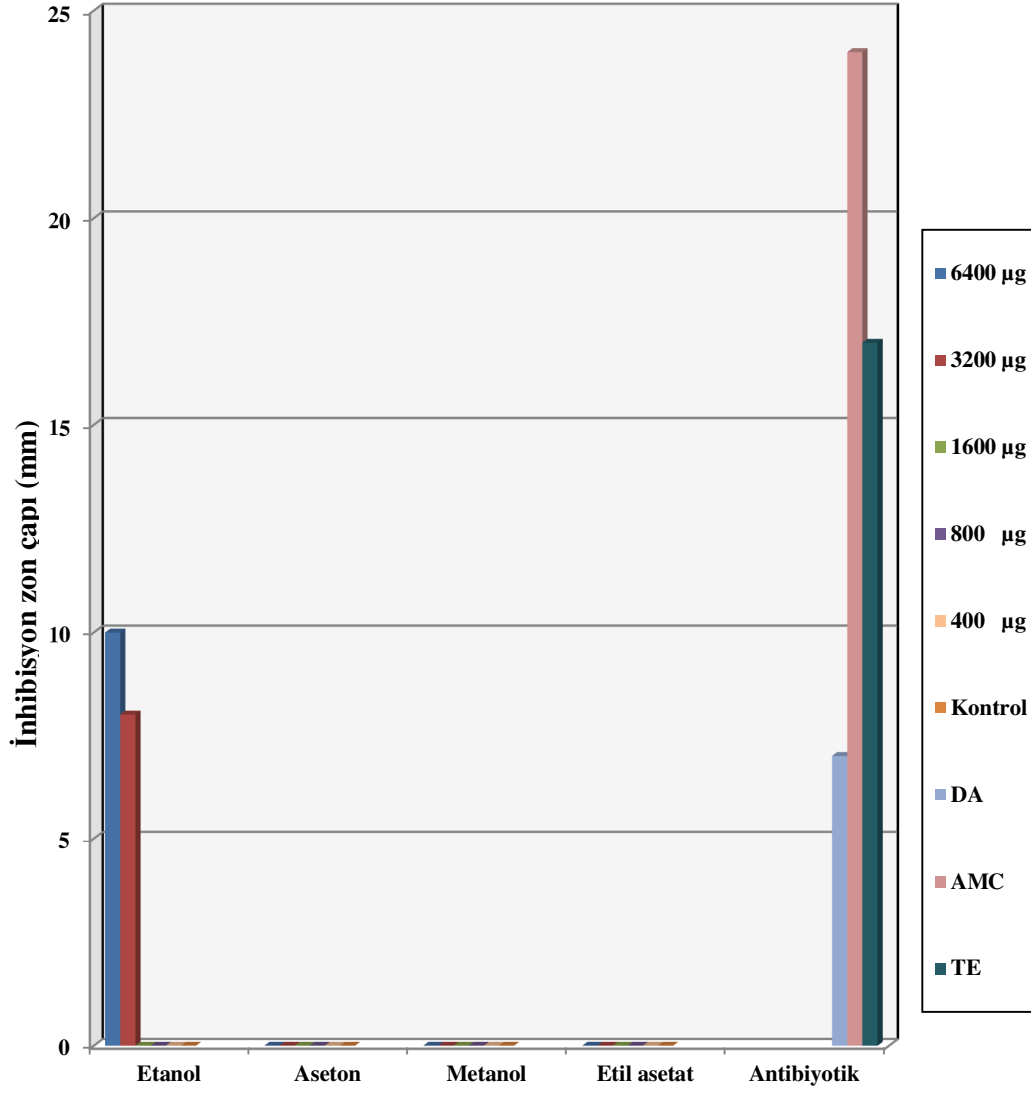
Ek A.3. *Punica granatum* L. bitki ekstraktlarının *Streptococcus mitis* bakterisine karşı oluşturdukları zon çapı verilerinin grafiksel gösterimi



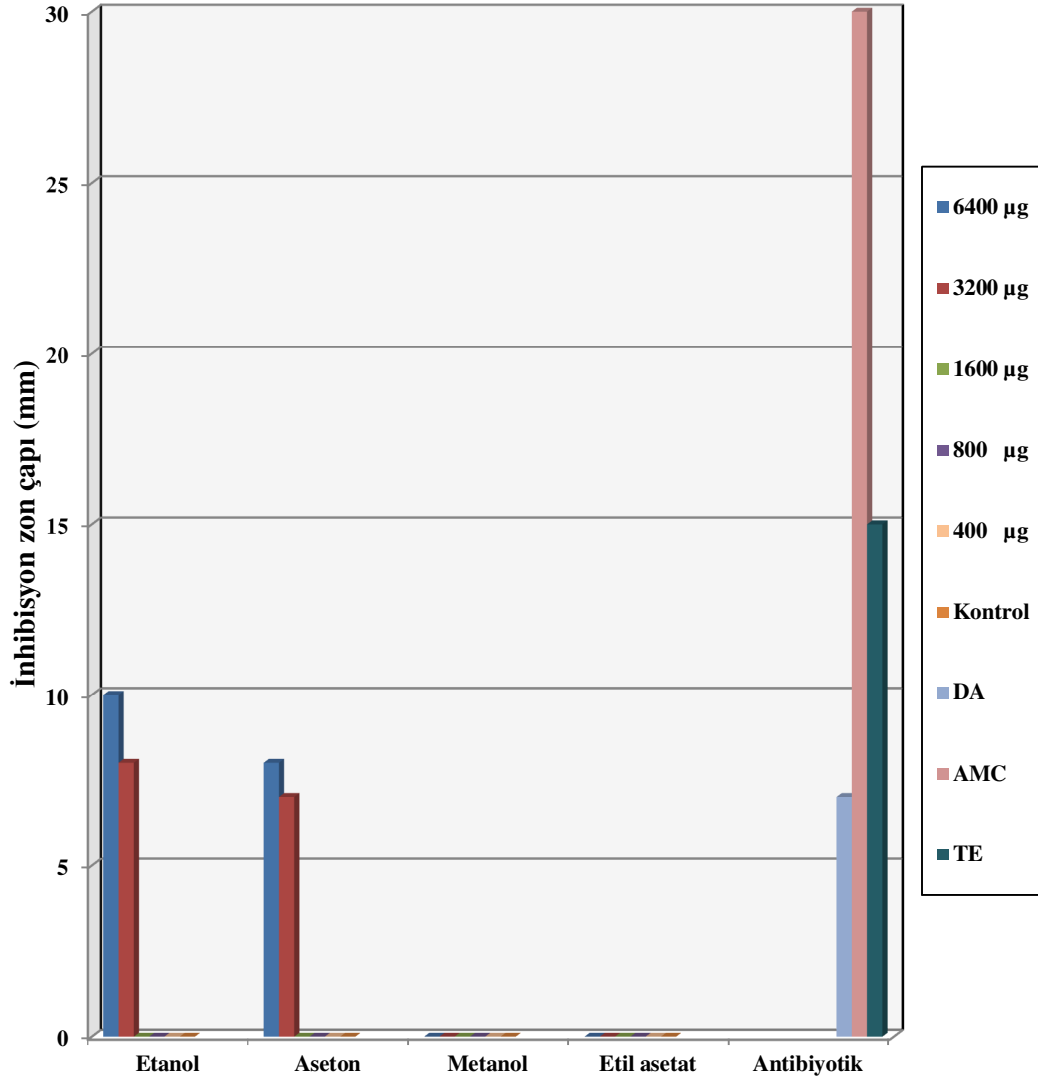
Ek A.5. *Punica granatum* L. bitki ekstraktlarının *Streptococcus mutans* bakterisine karşı oluşturdıkları zon çapı verilerinin grafiksel gösterimi



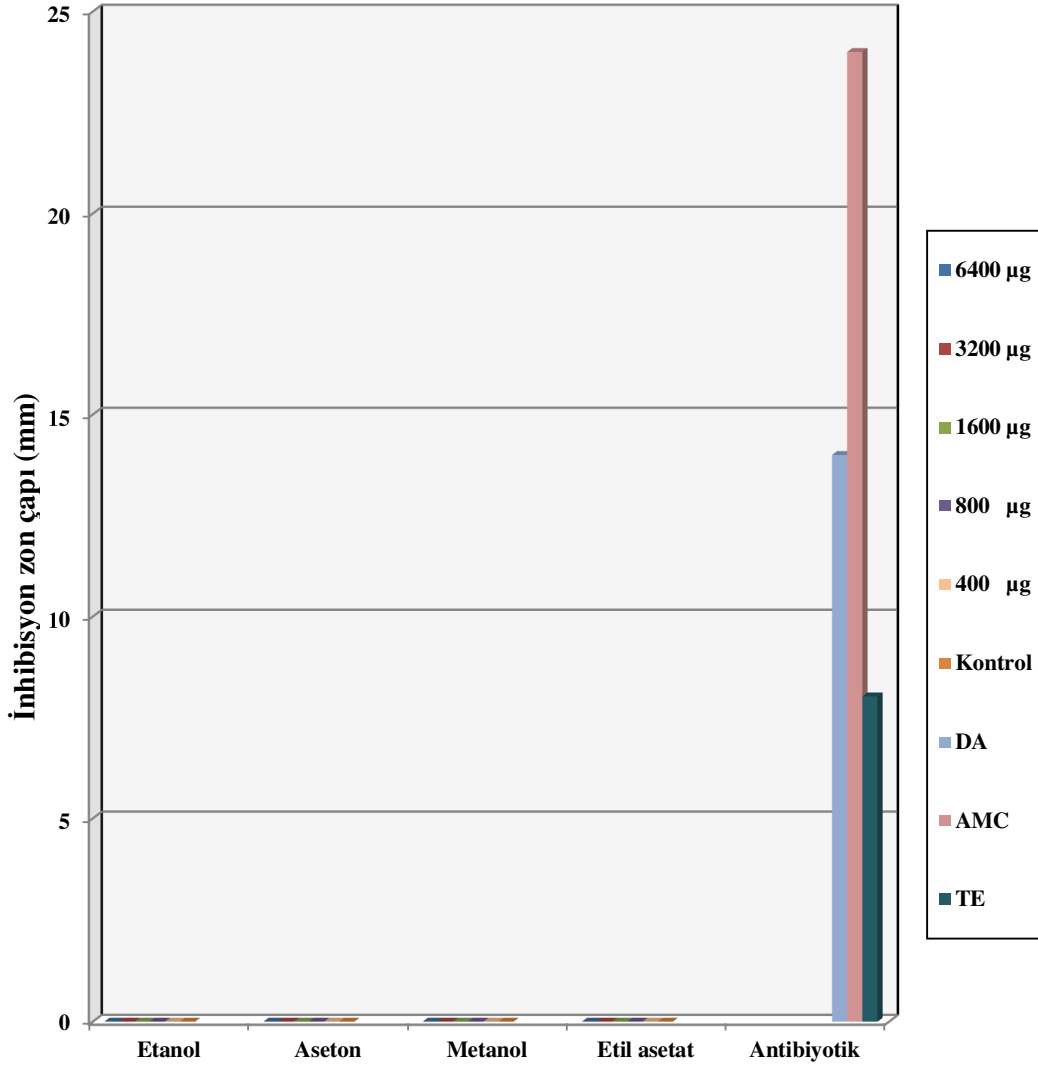
Ek A.6. *Punica granatum* L. bitki ekstraktlarının *Escherichia coli* bakterisine karşı oluşturdukları zon çapı verilerinin grafiksel gösterimi



Ek A.7. *Punica granatum* L. bitki ekstraktlarının *Salmonella abony* bakterisine karşı oluşturdıkları zon çapı verilerinin grafiksel gösterimi



Ek A.10. *Punica granatum* L. bitki ekstraktlarının *Enterococcus faecalis* bakterisine karşı oluşturdukları zon çapı verilerinin grafiksel gösterimi



ÖZGEÇMİŞ

Tuğba Konca, 1986 yılında Düzce’de doğdu. İlk, orta ve lise eğitimini İstanbul’da tamamladı. 2004 yılında lisans eğitimine başladığı Gaziosmanpaşa Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümünü 2008 yılında bitirdi. 2010 yılında Sakarya Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalı’nda yüksek lisans eğitimine başladı.