



Determination of Pomegranate Peel and Seed Extracted in Different Solvents for Antimicrobial Effect[#]

Gökhan Akarca^{1,a,*}, Elif Başpınar^{1,b}

¹Department of Food Engineering, Faculty of Engineering, Afyon Kocatepe University, 03200 Afyon, Turkey

*Corresponding author

ARTICLE INFO	ABSTRACT
<p>[#]This study was presented as an oral presentation at the 4th International Anatolian Agriculture, Food, Environment and Biology Congress (Afyonkarahisar, TARGID 2019)</p> <p><i>Research Article</i></p> <p>Received : 22/05/2019 Accepted : 06/09/2019</p> <p>Keywords: Pomegranate Antimicrobial Disk diffusion MIC MBC</p>	<p>Pomegranate (<i>Punica granatum</i> L.), based on the origin of Southeast Asia and Turkey, with a large growth area such as the Mediterranean and the Arab countries, is the most important plant belonging to family <i>Lythraceae</i>. Pomegranate peel and seed contain numerous and various bioflavonoid, which is indicated to be both antimicrobial and inhibitors of enzymes such as cyclooxygenase and lipooxygenase. The antioxidant, antimicrobial, and antifungal properties of the pomegranate are related to phytochemicals such as delphinidin, cyanidin, pelargonidin, ellagic acid, punicalin, punicalagin, pedunculagin, and different glucosides, which involve anthocyanins. In this study, it was investigated that ethanol, methanol and distilled water extracts, obtained from <i>Punica granatum</i> L. antimicrobial effect against <i>Bacillus cereus</i>, <i>Listeria monocytogenes</i>, <i>Escherichia coli</i>, <i>Enterobacter aerogenes</i>, <i>Salmonella Typhimurium</i>, <i>Staphylococcus aureus</i>, <i>Pseudomonas aeruginosa</i> bacteria known as food pathogen by using disk diffusion method. Also, minimal inhibitory concentration (MIC) and minimum bactericidal concentration (MBC) values on seven different food borne pathogens were also determined. As a result of the research; pomegranate seed extracts obtained from methanol observed the highest antimicrobial effect against <i>Pseudomonas aeruginosa</i> with a 29.02 mm zone diameter, while pomegranate peel extracts obtained from ethanol observed the highest antimicrobial effect against <i>Bacillus cereus</i> with a 26.84 mm zone diameter. The MIC and MBC value against <i>Pseudomonas aeruginosa</i> are determined 7.81 µg/L, while The MIC and MBC value against <i>Bacillus cereus</i> are determined 31.25 and 15.63 µg/L, respectively.</p>

Türk Tarım – Gıda Bilim ve Teknoloji Dergisi 7(sp1): 46-53, 2019

Nar Kabuğu ve Çekirdeğinin Değişik Çözücülerdeki Ekstraktlarının Antimikrobiyal Etkisinin Belirlenmesi

MAKALE BİLGİSİ	ÖZ
<p><i>Araştırma Makalesi</i></p> <p>Geliş : 22/05/2019 Kabul : 06/09/2019</p> <p>Anahtar Kelimeler: Nar Antimikrobiyal Disk difüzyon MIC MBC</p>	<p><i>Nar</i> (<i>Punica granatum</i> L.), orijini Güneydoğu Asya'ya dayanan ve Türkiye, Akdeniz ve Arap ülkeleri gibi geniş yetişme alanına sahip olan <i>Lythraceae</i> familyasına ait en önemli bitkidir. Nar kabuğu ve çekirdeği hem antimikrobiyal hem de siklooksijenaz ve lipoksijenaz gibi enzimlerin inhibitörü olan çok sayıda ve çeşitli biyo flavonoid içerir. Narın sergilediği antioksidan, antimikrobiyal ve antifungal özellikler, antosiyaninler dahil olmak üzere delphinidin, siyanidin, pelargonidin, elajik asit, punicalin, punikalajin, pedunculajin ve farklı glukozitler gibi fitokimyasallar ile ilgilidir. Bu çalışmada, <i>Punica granatum</i> L. (Nar) bitkisi meyve kabukları ve çekirdeklerinden elde edilen etanol, metanol ve distile su ekstraktların gıda patojeni olarak bilinen <i>Bacillus cereus</i>, <i>Listeria monocytogenes</i>, <i>Escherichia coli</i>, <i>Enterobacter aerogenes</i>, <i>Salmonella Typhimurium</i>, <i>Staphylococcus aureus</i>, <i>Pseudomonas aeruginosa</i> bakteri türlerine karşı antimikrobiyal etkisi disk difüzyon yöntemi ile belirlenmiştir. Ayrıca yedi farklı gıda kaynaklı patojen üzerindeki minimal inhibitör konsantrasyon (MIC) ve minimum bakterisidal konsantrasyon (MBC) değerleri de tespit edilmiştir. Araştırma sonucunda; en yüksek antimikrobiyal etki 29,02 mm zon çapı ile <i>Pseudomonas aeruginosa</i>'a karşı nar çekirdeğinden elde edilen metanol ekstraktında gözlenirken, nar kabuğundan elde edilen ekstraktlarda en yüksek antimikrobiyal etki 26,84 mm zon çapı ile <i>Bacillus cereus</i>'a karşı etanol ekstraktında gözlenmiştir. <i>Pseudomonas aeruginosa</i>'ya karşı MIC ve MBC değerleri 7,81 µg/L olarak tespit edilirken <i>Bacillus cereus</i>'a karşı MIC ve MBC değerleri sırasıyla 31,25 ve 15,63 µg/L olarak belirlenmiştir.</p>

^a gakarca@aku.edu.tr | ^b <https://orcid.org/0000-0002-5055-2722> | ^e e.baspinar03@hotmail.com | ^d <https://orcid.org/0000-0001-5201-0663>



Giriş

Nar (*Punica granatum* L.), tipik olarak 12-16 metreye kadar büyüyen ve parlak mızrak şeklinde yaprakları ve birkaç dikenli dalı olan, *Punicaceae* ailesinin baskın bir üyesi olup Kuzey Hindistan'dan İran'a kadar uzanan bölgelere özgüdür (Ramawat ve Merillon, 2019). Olgunlaşmış meyve, sivri uçlu havuzcuk ile çevrelenmiş koyu kırmızı taneli yaklaşık 12 cm genişliğindedir. Meyve, beyaz zarımsı bir yapıyla çevrelenmiş birçok tohum içerir (Heber, 2011).

Türkiye'de nar üretimi başta Antalya olmak üzere, Muğla, Adana ve Mersin illerinde yapılırken narın yetiştirilme sahası ülkenin güney kıyıları da kapsamaktadır. Ayrıca narın; gelişme şartları, toprak isteği vb. gibi yetiştirilme koşullarına karşı fazla seçici olmamasından dolayı son yıllarda daha geniş alanlarda yetiştirilmeye başlanmıştır (Kurt ve Şahin, 2013).

Nar meyvesi ve çiçek, kabuk, sulu kese, çekirdek gibi farklı anatomik fraksiyonları; çok çeşitli antosiyaninler, hidroksibenzoik asitler, hidroksisünamik asitler, mineraller, esansiyel lipitler ve kompleks polisakaritlerin yanı sıra yüksek moleküler ağırlıklı hidrolizlenebilir tanenlerin (ellagitannin) rezervuarları olarak adlandırılır (Orgil ve ark., 2014; Heber, 2011).

Nar çekirdeği, yenilebilir sulu tanelerin %15-25'ini oluşturur ve oldukça iyi fitosterol, punisik asitler, tokoferoller ve konjuge alfa-linolenik asit izomerleri de dahil olmak üzere omega-5 yağ asitleri kaynağıdır (Melo, 2012; Kiralan ve ark., 2009). Konjuge linolenik asit (CLnA), üç konjuge çift bağ ile oktadekatrienoik asit (18:3) izomerleri için kullanılan terimdir. CLnA, süt yağında ve esas olarak cis-9, trans-11, cis-13 C18:3 (punisik asit) içeren nar gibi tohum yağlarında bulunmaktadır (Hennessy ve ark., 2011).

İnsan sağlığı açısından önem taşıyan fitokimyasallar ve biyolojik özellikleri dahil olmak üzere narın sahip olduğu aktif bileşiklerin konsantrasyonundaki değişkenlik; meyvenin çeşidi, anatomik kısmı, olgunluk süresi, ekstraksiyon tipi ve fenolik ekstraksiyon şekli ile değişkenlik gösterir.

Meyvelerin bazı kısımlarında çeşitli hastalıkların görülme sıklığını azaltabilecek mevcut kimyasal maddeler bulunur. Özellikle meyvelerin kabuk kısımlarında bulunan bazı bileşenlerin sergilediği antimikrobiyal aktivite, gıda kaynaklı hastalıkları ve gıda bozulmalarını önleyebilecek etkiye sahiptir. Nar kabuğunun su ve metanol ekstraktlarının içerdiği antosiyanin, punikalajin, elajik asit, gallik asit ve diğer polifenollerin antimikrobiyal etkinliği ve geniş bir yelpazedeki hastalıkların tedavisinde yaygın olarak kullanılabilirliği araştırılmalar ile ortaya konulmuştur (Tanveer ve ark., 2015).

Narın farmakolojik özelliklerinin tanınması çok uzun bir geçmişe sahiptir. Ancak son yıllarda, narın terapötik etkilerini farkındalığı ciddi şekilde artış göstermiştir. Çalışmalar nar suyunun, ellagitanninler (hidroliz edilebilir tanenler) ve antosiyaninler (yoğunlaştırılmış tanenler) dahil olmak üzere yüksek polifenol içeriğinden dolayı güçlü antioksidan aktivitesine (serbest radikalleri temizleme özelliği) sahip olduğunu göstermektedir. Delfinidin narda baskın olan antosiyanindir. Narda bulunan antosiyaninlerin hem antioksidan, hem de antimikrobiyal etkilerinin yanı sıra, bitkiyi ışığa karşı

koruma, bitkinin savunma mekanizmasını oluşturma, tozlaşma ve tohum dağılması gibi diğer üreme fonksiyonlarını da desteklediği bilinmektedir.

Nar kabuğunun metanol ekstraktının (%80), hemorajik *Escherichia coli*, *Yersinia enterocolitica*, *Staphylococcus aureus* ve *Listeria monocytogenes*'e karşı 6 ile 12 mg/ml arasında değişen minimum inhibitör konsantrasyonlu (MIC) etki gösterdiği ortaya konulmuştur (Al-Zoreky, 2009; Prashanth ve ark., 2001). Nar gibi antimikrobiyal etkisi bulunan bitkisel gıdaların bakteri hücrelerine karşı inhibitör etkisi, enzimlerin kofaktörleri ve zarın geçirgenliğini değiştiren aynı zamanda solunum zincirini bozan proteinlerin sülfhidril grubu ile kompleks oluşumundan kaynaklanmaktadır (Cristani ve ark., 2007; Goel ve ark.; 2005).

Günümüzde küresel gıda kaybının birçok nedeni bulunmaktadır. Mikrobiyal bozulma, bu kaybın başlıca nedenlerinden biridir. Bu kaybın dünya genelinde gıda güvenliği sorunlarını artırmasının yanı sıra organoleptik ürün kalitesi üzerinde de istenmeyen etkilere neden olduğu bilinmektedir. Gıdalarda bozulmaya sebep olan mikroorganizmaları kontrol etmek için yaygın olarak sentetik ve doğal koruyucular kullanılmaktadır. Fakat sentetik koruyucuların astım, alerjik reaksiyonlar gibi çeşitli sorunlara yol açması, tüketicilerin son yıllarda doğal katkılar ile üretilen gıdaları tüketme yönündeki eğilimlerinin artması gibi faktörlerden dolayı doğal koruyucuların kullanımı giderek artmaktadır. Bitkisel koruyucular ürünün sadece raf ömrünü uzatmakla kalmayıp, bununla birlikte ürünlerin organoleptik olarak kabul edilebilirliğini de arttırmaktadır. Aynı zamanda gıda kaynaklı patojenlerinde inhibe edilmesinde de hayati bir rol oynamaktadır (Saeed ve ark., 2019)

Bu çalışmada; antimikrobiyal etkisi yüksek ve Türkiye'de geniş yetiştirilme alanına sahip, çok miktarda fitokimyasal madde içerip eşsiz bir biyokimyasal profile sahip insan sağlığı için oldukça faydalı olan narın çekirdek ve kabuklarının değişik çözücülerdeki ekstraktlarının gıda patojenleri üzerindeki antibakteriyel etkilerinin disk difüzyon metodu ile belirlenmesi amaçlanmıştır. Çalışmada farklı çözücü ekstraktlarının MIC ve MBC değerleri de belirlenmiştir.

Materyal ve Metot

Materyal

Çalışmada kullanılan narlar (*Punica granatum* L.), Türkiye'de Antalya ilinde nar yetiştiriciliği yapan özel bir firmadan temin edilmiştir. Nar kabuğu ve çekirdeği ekstraktı, Afyon Kocatepe üniversitesi mühendislik fakültesi mikrobiyoloji Laboratuvarı'nda kabuk ve çekirdek kısmından ayrı ayrı olacak şekilde elde edilmiştir.

Nar Çekirdek ve Kabuk Ekstraktlarının Hazırlanması

Çekirdek kısmı iki gün boyunca oda sıcaklığında ve gölgede kurutulmuştur. Kuruyan çekirdekler öğütücü değirmen yardımı ile toz haline getirilmiştir. Kabuk kısmı ise; küçük parçalara ayrılıp taze olarak kullanılmıştır. Taze nar kabuğu ve toz nar çekirdeklerinden 150 g tartılarak, üzerlerine 400'er ml, %80'lik etanol, metanol ve distile su ilave edilmiştir. Ardından 24 saat boyunca shaker

(WiseShake® SHO-2D) kullanılarak 120 rpm de karanlık bir odada karıştırılmıştır. Süre sonunda karışımlar sterilize 22 mm filtre kağıdından süzülerek, rotary evaporatöre (Heidolph Hei-VAP value) alınarak 100 rpm devirde; etanol ve metanol ekstraktları için 60°C, distile su ekstraktları için 90°C sıcaklıkta çözücü ve ekstrakt kısımları birbirinden ayrılmıştır.

Araştırmada Kullanılan Bakteriler

Araştırmada; *Escherichia coli* (ATCC 25922), *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538), *Listeria monocytogenes* (ATCC 51774), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 10145), *Enterococcus aerogenes* (ATCC 13048), *Salmonella Typhimurium* (ATCC 14028) ve *Bacillus cereus* (ATCC 14579) bakterileri kullanılmıştır. Bakteri suşları kanlı agarda 4-7°C'de muhafaza edilmiş ve her denemede standart inokulum hazırlanması amacıyla 35±0,1°C'de 24 saat Mueller-Hinton Broth (Merck, Almanya, 110293) kültüre alınıp aktifleştirilmiştir.

Nar Çekirdek ve Kabuklarının Ekstraktlarının Antimikrobiyal Etkilerinin Belirlenmesi

Nar kabukları ve çekirdeklerinin farklı çözücülerdeki ekstraktlarının antimikrobiyal aktivitelerinin belirlenmesi disk difüzyon metodu kullanılmıştır (Bauer ve ark., 1959; Bauer ve ark., 1966). Ayrıca minimum inhibitör konsantrasyon (MIC) ve minimum bakterisidal konsantrasyon (MBC) değerleri de tespit edilmiştir.

Ekstrakt İçeren Disklerin Hazırlanması

Ekstraktlardan 10µl steril petri kutuları içerisine alınmış ve üzerine boş antibiyotik diskleri (Bio-Disk 316010001) yerleştirilmiştir. Disklerin ekstraktları emmesi için petri kutuları kapakları kapalı şekilde 1 saat boyunca buzdolabında (4°C'de) bekletilmiştir.

İnokulumların Hazırlanması

Araştırmada kullanılacak bakteriler, seçici olmayan besiyerinde üremiş bir gecelik kültürlerden, tek düşmüş kolonilerden steril bir öze yardımıyla alınmıştır. Alınan koloniler fizyolojik tuzlu su içerisinde homojen bir bulanıklık oluşuncaya kadar süspanse edilmiştir. Elde edilen inokulum süspanسیونunun yoğunluğu 0,5 McFarland standardına eşit olacak şekilde ayarlanmıştır. Yoğunluk kontrolü McFarland bulanıklık standardı ile kontrol edilmiştir (Bauer ve ark., 1959; Bauer ve ark., 1966).

Disk Difüzyon Metodunun Uygulanması

0,5 McFarland bulanıklık standardına göre hazırlanan mikroorganizmalar steril bir pipet yardımıyla 0,1 ml alınarak (10⁶-10⁷ kob/ml) Muller Hinton Agar (Merck, Almanya, 1,05437) (MHA) yüzeyine aktarılmıştır. Aktarılan inokulum cam drigalski spatülü ile inokulum homojen olarak emilene kadar yayılmıştır. 10 dk besiyerinin inokulumü yeterince emmesi için beklendikten sonra ekstrakt emdirilmiş diskler besiyerinin yüzeyine, oluşacak zonların birbirine değmeyeceği uzaklıklarda olacak şekilde yerleştirilmiştir.

Escherichia coli, *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes*, *Enterococcus aerogenes*, *Salmonella Typhimurium* 37°C'de 16-20 saat; *Pseudomonas aeruginosa* ve *Bacillus cereus* ise 30°C'de 16-24 saat

inkübasyona bırakılmıştır (EUCAST, 2018). İnkübasyon sonrası disk çevrelerinde oluşan zonlar yeterince ışık alan bir ortamda dijital bir kumpas yardımıyla mm cinsinden ölçülmüştür.

Minimum İnhibitör Edici Konsantrasyon (MIC) Değerinin Belirlenmesi

Araştırmada kullanılan bakteri suşları, Mueller-Hinton broth (Merck, Almanya, 110293) üzerinde inoküle edilerek, uygun gelişim sıcaklıkları ve sürelerinde inkübe edilmiştir. Bakteriyel suşların inokülasyonu 24 saatlik genç kültürlerden hazırlanmış ve süspanسیونlar 0,5 McFarland standart türbiditeye ayarlanmıştır.

Kabuk ve çekirdek ekstraktlarının minimum inhibitor konsantrasyonları (MIC), "Clinical and Laboratory Standards Institute" tarafından tanımlanan makrodilüsyon yöntemine göre yapılmıştır (CLSI, 2009). Steril tüpler B, 2, 3, 4, 5, 6, 7 olarak işaretlenmiştir. Ayrıca (+) kontrol tüpü de oluşturulmuştur. 2 numaralı tüpten başlayarak (B hariç) her tüpe birer ml nutrient broth (Merck, Almanya, 1.05443) ilave edilmiştir. B tüplerine nar kabuk ve çekirdek ekstraktlarından ayrı ayrı olacak şekilde 2 ml ilave edildikten sonra, 1 ml'si alınarak 2 numaralı tüpe aktarılmış ve homojen bir karışım oluşana kadar karıştırılmıştır. 2 numaralı tüpteki ekstrakt ve besiyeri karışımından 1 ml alınarak 3 numaralı tüpe aktarılıp ve bu işleme 5 numaralı tüpe kadar aynı şekilde devam edilmiştir. Son olarak 5 numaralı tüpten de 1 ml ekstrakt ve besiyeri karışımından alınarak atılmıştır. Böylece her tüpte eşit miktarda ancak bir öncekine göre yarı yarıya azalmış konsantrasyonlar elde edilmiştir. Buna göre ilk tüpteki ekstraktın konsantrasyonu 1000 µg/ml, devam eden tüplerde ise konsantrasyon sırasıyla; 500, 250, 125, 62,5, 31,25 ve 15,63 µg / ml olması sağlanmıştır. Kontrol tüpü dahil tüm tüplere, Nutrient Broth içerisine inoküle edilen 0,5 türbiditeki bakteri kültürlerinden 1 µl (10⁶-10⁷ kob/ml) ilave edilmiştir. Tüpler bakteri suşlarının gelişme özelliklerine göre 30°C ve 37°C'de 16-24 saat inkübasyona bırakılmış olup inkübasyon sonunda bulanıklık, yüzeyde zar ve dipte tortu oluşumu gözlenen tüpler gelişme (+) olarak değerlendirilmiştir.

Ayrıca; inkübasyon sonunda "+ kontrol" tüpünde ise gelişme olduğu gözlenmiştir. MIC değeri; mikrobiyal gelişmenin gözlendiği ilk tüpün konsantrasyonu ile bir önceki gelişme gözlenmeyen tüpün konsantrasyonlarının toplamının yarısı hesaplanarak belirlenmiştir (El Mahmood, 2009; By Aamer ve ark., 2015; Chikezie, 2017).

Minimum Bakterisidal Konsantrasyon (MBC) Değerinin Belirlenmesi

Belirli şartlar altında sabit bir süre boyunca (24 saat) inkübasyondan sonra canlı organizmaların çoğunu (%99,9) öldürmek için gerekli minimum bakterisidal konsantrasyonu (mg/l veya µg/ml) olarak tanımlanan MBC testi, MIC testinin devamı olarak yapılmaktadır.

İlk bulanıklık, yüzeyde ve/veya dipte tortu gözlenen ve altındaki tüm konsantrasyonlardan steril öze yardımıyla örnekler alınarak Mueller-Hinton Agar'a (Merck, Almanya, 110293) inoküle edilmiştir. İnoküle edilen besiyerleri bakteri türüne uygun gelişme koşullarına göre (30°C ve 37°C'de) 16-24 saat süre boyunca inkübasyona bırakılmıştır. Üremenin gözlenmediği ilk konsantrasyon

MBC değeri olarak belirlenmiştir (By Aamer ve ark., 2015).

İstatistiksel Değerlendirme

Sonuçların istatistiksel değerlendirmesi SPSS istatistik paket programı (SPSS Inc., ABD) kullanılarak yapılmıştır. Çalışmadan elde edilen veriler, örnekler arasındaki anlamlı farkları test etmek için tek yönlü varyans analizi ve çift yönlü anova ile test edilmiş, farkların önemi, $P < 0,05$ olarak tanımlanmıştır. Ayrıca gruplar arasında bir fark gözlemlendiğinde, anlamlılık seviyelerini belirlemek için Duncan testi uygulanmıştır.

Bulgular ve Tartışma

Etanol, metanol ve distile su çözücülerinde hazırlanan nar kabuğu ve çekirdeği ekstraktlarının yedi gıda patojenleri üzerindeki antimikrobiyal etkilerinin disk difüzyon metoduna göre belirlenmesi ile elde edilen sonuçlar (Tablo 1), Bakteri ve ekstraktlarının örneklerin antimikrobiyal aktivitesi üzerine etkisi (Tablo 2), varyans analiz sonuçları (Tablo 3), Eurocast ve CLSI (Tablo 5)'in standartlarına göre ekstraktların patojen bakteriler üzerindeki etkilerinin duyarlılık düzeyleri Tablo 4, MIC ve

MBC değerleri ise Tablo 6'da gösterilmiştir.

Yapılan çalışma sonucunda en yüksek antimikrobiyal etki $29,02 \pm 0,11$ mm zon çapı ile *Pseudomonas aeruginosa*'ya karşı nar çekirdeğinin etanol ekstraktında gözlenmiştir ($P < 0,05$). Bunu, $21,11 \pm 0,21$ ve $21,03 \pm 1,09$ mm zon çapları ile sırasıyla *Staphylococcus aureus* ve *Listeria monocytogenes*'a karşı nar çekirdeğinin metanol ekstraktı takip etmiştir ($P < 0,05$). Nar kabuğunun farklı ekstraktlardaki sonuçlarına bakıldığında ise; en yüksek antimikrobiyal etki $26,84 \pm 0,63$ mm zon çapı ile *Bacillus cereus*'a karşı etanol ekstraktında gözlenmiş olup bu sonucu $25,68 \pm 0,45$ mm zon çapı ile *Bacillus cereus*'a karşı metanol ve distile su ekstraktları ile $25,14 \pm 0,75$ mm zon çapı ile *Escherichia coli* 'ye karşı metanol ekstraktı izlediği belirlenmiştir ($P < 0,05$). Ayrıca nar kabuğu ve çekirdeğinin distile su ekstraktının antimikrobiyal etkilerinin diğer çözücülere göre daha az olduğu sonucuna varılmıştır.

Bakteri türü ve ekstrakt çeşidinin antimikrobiyal aktivite üzerine etkisi Tablo 2'de gösterilmiştir. Buna göre üzerinde en fazla antimikrobiyal etki ortalama $21,00 \pm$ mm zon çapı ile *Bacillus cereus* üzerinde tespit edilmiştir ($P < 0,05$). En fazla antimikrobiyal etkiyi gösteren ekstrakt ise $23,52 \pm$ mm zon çapı ile nar kabuğunun metanol ekstraktı olmuştur.

Tablo 1 Farklı Çözücülerde Nar Kabuğu ve Tohum Ekstraktlarının Bazı Gıda Kaynaklı Bakterilere Karşı Antimikrobiyal Etkileri (mm zon çapı)

Table 1 Antimicrobial Effects of Pomegranate Peel and Seed Extracts Against Some Foodborne Bacteria in Different Solvents (mm zone diameter)

Bakteri	Etanol		Metanol		Distile Su	
	Nar Kabuğu	Nar Çekirdeği	Nar Kabuğu	Nar Çekirdeği	Nar Kabuğu	Nar Çekirdeği
<i>Staphylococcus aureus</i>	21,28±0,56 ^{Cc}	20,02±0,03 ^{Db}	24,42±0,84 ^{Aa}	21,11±0,21 ^{Cb}	23,02±1,10 ^{Bb}	12,04±0,06 ^{Eb}
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	16,08±0,12 ^{De}	17,11±0,21 ^{Ce}	22,01±0,25 ^{Bc}	29,02±0,11 ^{Aa}	16,12±0,24 ^{Dd}	14,08±0,16 ^{Ea}
<i>Salmonella Typhimurium</i>	19,02±0,32 ^{Bd}	10,00±0,01 ^{Dg}	24,48±0,93 ^{Aa}	12,30±0,59 ^{Ce}	12,03±0,39 ^{Cef}	12,13±0,25 ^{Cb}
<i>Listeria monocytogenes</i>	16,06±0,26 ^{Be}	20,62±0,43 ^{Aa}	20,05±0,10 ^{Ad}	21,03±1,09 ^{Ab}	11,15±0,29 ^{Cf}	11,06±0,12 ^{Cc}
<i>Enterobacter aerogenes</i>	16,13±0,17 ^{Ce}	16,57±0,38 ^{Cf}	23,28±0,56 ^{Ab}	16,44±0,88 ^{Ccd}	19,72±0,48 ^{Bc}	11,14±0,27 ^{Dc}
<i>Escherichia coli</i>	22,03±0,05 ^{Bb}	18,33±0,22 ^{Cd}	25,38±0,75 ^{Aa}	15,54±0,76 ^{Dd}	12,14±0,09 ^{Ee}	12,28±0,51 ^{Eb}
<i>Bacillus cereus</i>	26,84±0,63 ^{Aa}	19,13±0,26 ^{Cc}	25,14±0,27 ^{Ba}	17,07±0,14 ^{Dc}	25,68±0,45 ^{Ba}	12,17±0,33 ^{Eb}

A-E (→) Aynı satırda farklı harflere sahip değerler istatistiksel olarak önemli ölçüde farklılık gösterir ($P < 0,05$).

a-g (↓) Aynı sütunda farklı harflere sahip değerler istatistiksel olarak önemli ölçüde farklılık gösterir ($P < 0,05$).

Tablo 2 Bakteri ve Ekstraktların Örneklerin Antimikrobiyal Aktivitesi Üzerine Etkisi

Table 2 Effect of Bacteria and Extract on Antimicrobial Activity of Samples

Bakteri	Antimikrobiyal Aktivite
<i>Staphylococcus aureus</i>	20,22±4,12 ^b
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	19,03±5,26 ^c
<i>Salmonella Typhimurium</i>	14,93±5,32 ^{fg}
<i>Listeria monocytogenes</i>	16,59±4,36 ^f
<i>Enterobacter aerogenes</i>	17,21±3,88 ^e
<i>Escherichia coli</i>	17,61±5,10 ^d
<i>Bacillus cereus</i>	21,00±5,56 ^a
Örnekler	Antimikrobiyal Aktivite
Nar Kabuğu Etanol	19,61±3,90 ^b
Nar Çekirdeği Etanol	17,40±3,43 ^d
Nar Kabuğu Metanol	23,52±1,89 ^a
Nar Çekirdeği Metanol	18,85±5,16 ^c
Nar Kabuğu Distile Su	17,03±5,54 ^e
Nar Çekirdeği Distile Su	12,12±0,97 ^f

a-g (↓) Aynı sütunda farklı harflere sahip değerler istatistiksel olarak önemli ölçüde farklılık gösterir ($P < 0,05$).

Tablo 3 Nar Ekstraktlarının Farklı Bakteri türleri üzerindeki antimikrobiyal Etkisinin varyans sonuçları
 Table 3 Variance Results of Antimicrobial Effect of Pomegranate Extracts on Different Bacterial species

Faktör	sd	KO	F Değeri
Ekstrakt	5	194,98	2053,03***
Bakteri	6	54,41	572,94***
Örnek × Bakteri	30	27,51	289,62***

Sd: Serbestlik Derecesi, KO: Kareler Ortalaması, *P<0,05; **P<0,01; ***P<0,0001, ns: İstatistiksel olarak önemli değil

Tablo 4 Nar Kabuğu ve Tohum Ekstraktlarının Antimikrobiyal Aktivitelerinin EUCAST ve CLSI Laboratuvarları Standartları ile Karşılaştırılması*

Table 4 Comparison of Antimicrobial Activity of Pomegranate Peel and Seed Extracts with the Standards of EUCAST and CLSI Laboratories

Bakteri	Etanol		Metanol		Distile Su	
	Nar Kabuğu	Nar Çekirdeği	Nar Kabuğu	Nar Çekirdeği	Nar Kabuğu	Nar Çekirdeği
<i>Staphylococcus aureus</i>	S	I	S	I	I	R
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	R	R	I	S	R	R
<i>Salmonella Typhimurium</i>	S	R	S	R	R	R
<i>Listeria monocytogenes</i>	S	S	S	S	R	R
<i>Enterobacter aerogenes</i>	I	I	S	I	S	R
<i>Escherichia coli</i>	I	S	S	I	R	R
<i>Bacillus cereus</i>	S	S	S	S	S	I

S: Duyarlı, I: Orta Duyarlı, R: Dirençli, *(CLSI, 2015; EUCAST, 2018; Yılmaz ve ark., 2005)

Yapılan varyans analiz sonuçlarına göre; ekstrakt, bakteri ve ekstrakt x bakteri interaksyonlarının etkileri P<0,0001 düzeyinde önemli bulunmuştur (Tablo 3).

Benzer şekilde, Reddy ve ark. (2007) narın su, etanol ve bütanol ekstraktlarının *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* ve metisiline dirençli *Staphylococcus aureus*'a karşı antimikrobiyal aktiviteleri olduğu bildirilmiştir.

Başka bir araştırmada; Khan ve Hane (2011), nar kabuklarının metanol, etanol ve su ekstraktlarını çıkarıp *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* ve *Staphylococcus aureus*'a karşı antibakteriyel etkisini disk difüzyon yöntemini kullanarak belirlemişlerdir. En yüksek antibakteriyel aktiviteyi etanol ekstraktında *Staphylococcus aureus*'a karşı 24,5 mm, *Escherichia coli*'ye karşı 23,3 mm ve *Pseudomonas aeruginosa*'ya karşı 22,3 mm olarak bulmuşlardır. Araştırmalarda elde edilen sonuçlar, çalışmamız bulgularına benzerdir.

Dahham ve ark. (2010)'nın yapmış olduğu benzer bir çalışmada nar kabuğunun metanol ekstraktının *Staphylococcus aureus*'a karşı antibakteriyel etkisinin bizim çalışmamızla benzer olduğu ve ilgili çalışmada belirlenen inhibisyon zon çapı 25 mm iken bizim çalışmamızda 24 mm bulunmuştur.

Nar kabuğu ve çekirdeği ekstraktlarının yedi farklı gıda kaynaklı patojen bakteri üzerindeki antibakteriyel etkisi Eucast ve CLSI standartları ile karşılaştırıldığında (Tablo 5) *Listeria monocytogenes*, *Salmonella Typhimurium* ve *Staphylococcus aureus*'un nar kabuğunun etanol ve metanol ekstraktlarına, *Enterobacter aerogenes*'in metanol ve distile su ekstraktına karşı duyarlı olduğu; *Escherichia coli*'nin ise sadece metanol ekstraktına duyarlı olduğu sonucuna varılmıştır. Buna karşın, *Listeria monocytogenes*, *Escherichia coli* ve *Salmonella Typhimurium*'un nar kabuğunun distile su ekstraktına karşı ise, dirençli olduğu görülmüştür (Tablo 4).

Nar çekirdeğinden elde edilen ekstraktların ise patojen bakteriler üzerindeki duyarlılık sonuçlarına bakıldığında

Listeria monocytogenes'in etanol ve metanol ekstraktına, *Escherichia coli*'nin etanol ekstraktına, *Pseudomonas aeruginosa*'nın ise sadece metanol ekstraktına karşı duyarlı olduğu görülmüştür. Nar çekirdeğinden elde edilen ekstraktların hiçbirinin *Salmonella Typhimurium* üzerinde herhangi bir antimikrobiyal etkisi olmamıştır. Ayrıca *Bacillus cereus* hariç diğer patojen bakterilerin nar çekirdeğinden elde edilen distile su ekstraktına karşı dirençli olduğu tespit edilmiştir. *Bacillus cereus*'un ise, nar çekirdeğinin distile su ekstraktı hariç diğer ekstraktlarının tümüne duyarlı olduğu sonucuna varılmıştır (Tablo 4).

Djomeh ve ark. (2015)'ı çalışmamızla benzer şekilde nar kabuğu ekstraktının *Staphylococcus aureus* ve *Escherichia coli* üzerindeki etkilerini incelemiş, *Staphylococcus aureus*'un nar kabuğu ekstraktına karşı daha duyarlı olduğu sonucunu elde etmişlerdir. Bu durumun gram pozitif bakterilerin tek membranlı glikoprotein / taykoik asite kıyasla gram negatif bakterilerin çift membranla örtülmesinin daha yüksek kompozitli bitki ekstraktlarına karşı daha yüksek direnç göstermesinin nedeni olabileceğini belirtmişlerdir.

Kanatt ve ark. (2010), tavuk etinin raf ömrünün geliştirilmesi için nar ekstraktı kullanarak elde ettiği sonuçlara göre bitkilerin farklı kısımlarından elde edilen ekstraktların bakteriler üzerinde farklı etkilerinin olduğunu tespit etmiştir ve bunun ekstraktların değişken bileşimlerinden kaynaklandığı sonucuna varmıştır.

Nar kabuğu ve çekirdeği ekstraktlarının araştırmamda kullanılan patojen bakteriler üzerindeki minimum inhibisyon konsantrasyon (MIC) ve minimum bakterisit konsantrasyon (MBC) değerleri tablo 6'da verilmiştir. Ekstraktların MIC değerlerinin 7,81-1000 µg/ml aralığında değiştiği belirlenmiştir. Elde edilen sonuçlara göre nar kabuğundan elde edilen farklı çözücü ekstraktlarının, nar çekirdeği ekstraktlarına kıyasla daha düşük konsantrasyonda patojen bakterilerin üremesini durdurduğu görülmüştür.

Tablo 5 CLSI ve Eucast Klinik Mikrobiyoloji Standart Zon Çapları (mm)*

Table 5 CLSI and Eucast Clinical Microbiological Zone Diameter Standards (mm)

A	<i>E.coli</i>			<i>S. aureus</i>			<i>S. typhimurium</i>			<i>L. monocytogenes</i>			<i>P. aeruginosa</i>			<i>B. cereus</i>			<i>E. aerogenes</i>		
	S	I	R	S	I	R	S	I	R	S	I	R	S	I	R	S	I	R	S	I	R
1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	≥11	10	≤9	-	-	-
2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	≥9	8	≤7	-	-	-
3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	≥6	5	≤4	-	-	-
4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	≥8	7	≤6	-	-	-
5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	≥32	31	≤30	-	-	-
6	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	≥17	16	≤15	-	-	-
7	≥17	14-16	≤13	N	N	N	N	N	≤13	≥16	-	≤16	N	N	N	-	-	-	≥10	9	≤8
8	≥14	-	≤14	≥26	-	N	N	N	≤14	≥13	-	≤13	N	N	N	-	-	-	N	N	N
9	≥18	14-17	≤13	N	N	N	N	N	≤13	N	N	N	N	N	N	-	-	-	N	N	N
10	≥15	13-14	≤12	≥15	13-14	N	N	N	≤12	N	N	N	N	N	N	-	-	-	N	N	N
11	N	N	N	≥29	-	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	-	-	-	N	N	N
12	≥15	13-14	≤12	≥18	-	N	N	N	≤12	N	N	N	N	N	N	-	-	-	N	N	N
13	N	N	N	≥23	14-22	≤13	N	N	N	≥25	-	≤25	N	N	N	-	-	-	N	N	N
14	≥15	12-14	≤11	N	N	N	≥15	12-14	≤11	N	N	N	N	N	N	-	-	-	N	N	N
15	≥18	13-17	≤12	≥18	13-17	≤12	≥18	13-17	≤12	N	N	N	N	N	N	-	-	-	N	N	N
16	≥17	13-16	≤12	≥17	13-16	≤12	≥17	13-16	≤12	N	N	N	N	N	N	-	-	-	N	N	N
17	≥18	14-17	≤13	≥18	14-17	≤12	≥18	14-17	≤13	N	N	N	N	N	N	-	-	-	N	N	N
18	N	N	N	≥19	15-18	≤14	N	N	N	N	N	N	N	N	N	-	-	-	N	N	N
19	N	N	N	≥21	15-20	≤14	N	N	N	N	N	N	N	N	N	-	-	-	N	N	N
20	N	N	N	≥24	-	≤44	N	N	N	N	N	N	N	N	N	-	-	-	N	N	N
21	≥20	16-19	≤17	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	≥18	-	≤18	-	-	-
22	≥23	21-22	≤20	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	≥18	-	≤18	-	-	-

A: Antibiyotikler, 1: Vancomycin, 2: Cefazolin, 3: Cefoxitin, 4: Cefamandole, 5: Azithromycin, 6: Cephadroxil, 7: Ampicilin, 8: Benzylpenicillin, 9: Amoxicillin-clavulanate, 10: Gentamicin GN10, 11: Penicilin, 12: Netilmicin, 13: Erythromycin, 14: Streptomycin, 15: Chloramphenicol, 16: Sulfonamides, 17: Kanamycin, 18: Tetracycline, 19: Clindamycin, 20: Fusidic Acid, 21: Piperacilin, 22: Ticarcillin, N: Test Edilmemiş, S: Duyarlı, I: Orta Duyarlı, R: Dirençli, *(CLSI, 2015; EUCAST, 2018; Yılmaz ve ark., 2005).

Tablo 6 Nar Kabuğu ve Tohumunun Farklı Çözücülerdeki MIC ve MBC Değerleri (µg / ml)

Table 6 MIC and MBC Values of Pomegranate Peel and Seed in Different Solvents (µg/ml)

Örnek	Bakteri	Etanol		Metanol		Distile Su	
		MIC (µg/ml)	MBC (µg/ml)	MIC (µg/ml)	MBC (µg/ml)	MIC (µg/ml)	MBC (µg/ml)
Nar Kabuğu	<i>Staphylococcus aureus</i>	125	15,63	62,5	31,25	62,5	15,63
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	125	125	62,5	62,5	125	125
	<i>Salmonella Typhimurium</i>	62,5	15,63	31,25	62,5	15,63	7,81
	<i>Listeria monocytogenes</i>	31,25	15,63	62,5	62,5	31,25	15,63
	<i>Enterobacter aerogenes</i>	62,5	62,5	31,25	15,63	62,5	62,5
	<i>Escherichia coli</i>	31,25	15,63	31,25	15,63	62,5	62,5
	<i>Bacillus cereus</i>	31,25	15,63	62,5	15,63	62,5	15,63
Nar Çekirdeği	<i>Staphylococcus aureus</i>	15,63	7,81	250	15,63	15,63	7,81
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	7,81	7,81	15,63	7,81	125	125
	<i>Salmonella Typhimurium</i>	15,63	7,81	1000	125	15,63	15,63
	<i>Listeria monocytogenes</i>	15,63	15,63	500	500	15,63	15,63
	<i>Enterobacter aerogenes</i>	15,63	15,63	1000	1000	15,63	15,63
	<i>Escherichia coli</i>	15,63	15,63	1000	125	15,63	15,63
	<i>Bacillus cereus</i>	7,81	7,81	15,63	15,63	31,25	15,63

Nar kabuğu etanol ekstraktının *Staphylococcus aureus* ve *Pseudomonas aeruginosa* için MIC değeri 125 µg/ml olarak belirlenmiş olup her iki bakterinin inhibisyonu için yüksek konsantrasyonların gerektiği sonucuna varılmıştır. Aynı şekilde nar kabuğu distile su ekstraktının da *Pseudomonas aeruginosa* üzerinde güçlü inhibisyon etki sağlaması için yüksek konsantrasyonlar gerektirdiği görülmüştür. *Pseudomonas aeruginosa* üzerinde bakterisid etkiyi sağlamak için gerekli olan MBC değeri nar kabuğunun etanol ve distile su ekstraktları için 125 µg/ml olarak belirlenmiştir. Buna karşın nar kabuğu distile su ekstraktının düşük konsantrasyonda *Salmonella Typhimurium* üzerinde etkili olduğu tespit edilmiş olup, MBC değeri 7,81 µg/ml olarak tespit edilmiştir.

Nar çekirdeğinin etanol ekstraktının *Bacillus cereus* üzerinde etkili olabilmesi için düşük konsantrasyonların

gerektiği sonucuna varılmış olup MIC ve MBC değerleri 7,81 µg/ml olarak belirlenmiştir. Ayrıca nar çekirdeği metanol ekstraktlarının; *Salmonella Typhimurium*, *Enterobacter aerogenes* ve *Escherichia coli* üzerinde inhibisyon sağlaması için yüksek konsantrasyonların (1000 µg/ml) gerekli olduğu sonucuna varılmıştır. Nar çekirdeği etanol ekstraktının *Pseudomonas aeruginosa* ve *Bacillus cereus*'a karşı en düşük konsantrasyonda (7,81 µg/ml) inhibisyon etkisini gösterdiği tespit edilmiştir (Tablo 6).

Vişnjevec ve ark. (2017)'nin yapmış oldukları bir çalışmada, farklı nar türlerinin antifungal ve antimikrobiyal etkileri incelenmiş olup çalışmamızla benzer şekilde etanol ekstraktlarının su ekstraktlarına göre daha etkili olduğu belirtmişlerdir. Çalışmada nar ekzokarp etanol ekstraktının *Pseudomonas aeruginosa*'nın gelişimini ise etkilemediğini ifade etmişlerdir.

Nozohour ve ark. (2018) yapmış olduğu bir çalışmada, araştırmamız bulgularına benzer şekilde, nar çekirdeği ve kabuğunun etanol ekstraktları, *Pseudomonas aeruginosa* ve *Staphylococcus aureus*'un gelişimi üzerinde tetrasiklin ve kloramfenikolden daha güçlü olan inhibe edici etkiler gösterdiği bildirilmiştir. Ayrıca bu çalışmada hem *Pseudomonas aeruginosa* hem de *Staphylococcus aureus*'un gelişim inhibisyon zone çapının en büyük olduğu ekstrakt nar çekirdeği ekstraktı olarak tespit edilmiştir. Aynı çalışmada nar kabuğu ve çekirdeği ekstraktlarının MBC'lerinin sırasıyla 25,0 ve 50 mg/ml olduğu araştırmacılar tarafından belirtilmiş olup tüm bakterilerde nar çekirdeği ekstraktı için gerekli olan MIC değerleri, nar kabuğu ekstraktı için gerekli olan MIC değerlerinden önemli ölçüde daha yüksek olduğu görülmüştür.

Cai ve ark. (2019), meyve sularında bozulmalara sebep olan *Alicyclobacillus acidoterrestris*'e karşı nar içerisinde bulunan timol bileşenini kullanarak bakteri gelişme sürecini inhibe ettiği sonucuna varmışlardır. Araştırma sonucunda *Alicyclobacillus acidoterrestris*'in vejetatif hücreleri için en düşük MIC konsantrasyonun 0,25 mg/ml, sporları için ise, 0,5 mg/ml olduğunu bildirmişlerdir.

Joshi ve ark. (2019)'nın yapmış olduğu çalışmada nar kabuğu ekstraktının insan bağırsak biyotasının bir parçası olan iki bakterinin (*Lactobacillus Plantarum* ve *Bifidobacterium bifidum*) büyümesini teşvik ettiği sonucuna varmıştır. Bunun yanında antibiyotik tedavilerinde sıklıkla gözlenen sorunlardan biri olan antibiyotiğin hedef patojeni öldürmenin yanı sıra bağırsak mikrobiyotasına zarar vermesinden dolayı narın antibiyotiklere alternatif olabileceğini ve farmasötik amaçlı kullanılabilceğini belirtmişlerdir.

Farklı araştırmacılar tarafından nar kabuğu ve çekirdeklerinin antimikrobiyal etkileri ile ilgili olarak elde edilen sonuçlar, araştırmamızda ulaştığımız bulgular ile paraleldir. Araştırmamız sonucunda antimikrobiyal etki en fazla nar kabuğunun metanol ekstaktında gözlenmiştir. Ekstraktların antimikrobiyal etkilerinin patojenler üzerinde değişiklik göstermesinin nedenlerinin, ekstraktların narın farklı kısımlarından ve değişik çözücüler kullanılarak elde edilmesine bağlı olduğu düşünülmektedir.

Nar kabuğu ve çekirdeği güçlü antioksidan ve antimikrobiyal aktivitelerle karakterize edilen fenolik bileşiklerce zengin bir yan ürün olup Dünya genelinde çok uzun zamandır tıbbi amaçlı olarak etkin bir şekilde kullanılmaktadır. Sentetik koruyuculardan farklı olarak narın kabuk ve çekirdek kısmının yüksek antimikrobiyal etkiye sahip olması heterojen biyokimyasal bileşiminden dolayıdır.

Günümüzde gıda tüketicileri katkısız ve/veya doğal katkı maddeleri ilave edilerek üretilmiş gıda maddelerini tercih etmektedirler. Bunun doğal sonucu olarak üretici firmalar ürünlerini bu taleplere paralel doğrultuda üretmeye yönelik çalışmalara ağırlık vermektedirler. Yapılan bu çalışma, narın gıda üretiminde doğal koruyucu olarak kullanılabilceğini göstermektedir. Narın gıda sanayisinde ve diğer birçok alanda kullanım olanaklarına yönelik yapılacak yeni çalışmalar ile kullanımının artacağı düşünülmektedir.

Kaynaklar

- Al-Zoreky NS. 2009. Antimicrobial activity of pomegranate (*Punica granatum* L.) fruit peels. J. Food Microbiol., 134: 244–248. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2009.07.002>.
- Bauer A, Perry DM, Kirby MM. 1959. Single disc antibiotic sensitivity testing of Staphylococci. A.M.A. Arch. Intern. Med., 104: 208–216.
- Bauer AW, Kirby MM, Sherris JC, Turck M. 1966. Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method. Am. J. Clin. Pathol., 36: 493-496.
- By Aamer AA, Abdul-Hafeez MM, Sayed SM. 2014. Minimum inhibitory and bactericidal concentrations (MIC and MBC) of honey and bee propolis against multi-drug resistant (MDR) *Staphylococcus* spp. isolated from bovine clinical mastitis. Alternative & Integrative Medicine, 15(2): 1-9. <https://doi.org/10.4172/2327-5162.1000171>
- Cai R, Zhang M, Cui L, Yuan Y, Yang Y, Wang Z, Yue T. 2019. Antibacterial activity and mechanism of thymol against *Alicyclobacillus acidoterrestris* vegetative cells and spores. LWT-Food Sci Technol., 105:377-384. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2019.01.066>
- Chikezie IO. 2017. Determination of minimum inhibitory concentration (MIC) and minimum bactericidal concentration (MBC) using a novel dilution tube method. Afr. J. Microbiol. Res., 11(23): 977-980. <https://doi.org/10.5897/AJMR2017.8545>.
- CLSI. 2009. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing, nineteenth informational supplement. Approved Standard M100-S19. Clinical Laboratory Standards Institute, Wayne, PA.
- CLSI. 2015. Clinical and Laboratory Standards Institute, Zone diameter and minimal inhibitory concentration (MIC) Standards.
- Cristani M, D'Arrigo M, Mandalari G, Castelli F, Sarpietro MG, Micieli D, Venuti V, Bisignano G, Saija A, Trombetta D. 2007. Interaction of four monoterpenes contained in essential oils with model membranes: implications for their antibacterial activity. J. Agric. Food Chem., 55: 6300–6308. <https://doi.org/10.1021/jf070094x>.
- Dahham SS, Ali MN, Tabassum H, Khan M. 2010. Studies on antibacterial and antifungal activity of pomegranate (*Punica granatum* L.). Am. Eurasian J. Agric. Environ. Sci., 9(3): 273-281. DOI: <https://doi.org/10.29252/jabr.01.01.06>
- Djomeh EZ, Moghaddam A, Ardakani YAS. 2015. Antimicrobial activity of pomegranate (*Punica granatum* L.) peel extract, physical, mechanical, barrier and antimicrobial properties of pomegranate peel extract-incorporated sodium caseinate film and application in packaging for ground beef. Packag. Technol. Sci., 28: 869–881. <https://doi.org/10.1002/pts.2145>.
- El-Mahmood MA. 2009. Antibacterial efficacy of stem bark extracts of *Mangifera indica* against some bacteria associated with respiratory tract infections. Sci. Res. Essays., 4(10): 1031-1037.
- EUCAST. 2018. European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing. http://www.eucast.org/fileadmin/src/media/PDFs/EUCAST_files/Breakpoint_tables/v_8.0_Breakpoint_Tables.pdf
- Goel G, Puniya AK, Aguilar CN, Singh K. 2005. Interaction of gut microflora with tannins in feeds. Naturwissenschaften, 92: 497–503.
- Heber D. 2011. Pomegranate Ellagitannins. (Benzie IFF, Wachtel-Galor S.) Herbal medicine: biomolecular and clinical aspects. 2nd edition. CRC Press. Boca Raton.
- Hennessy AA, Ross RP, Devery R, Stanton C. 2011. The health promoting properties of the conjugated isomers of α -Linolenic acid. Lipids, 46(2): 105–119. <https://doi.org/10.1007/s11745-010-3501-5745-010-3501-5>

- Joshi C, Patel P, Kothari V. 2019. Anti-infective potential of hydroalcoholic extract of *Punica granatum* peel against gram-negative bacterial pathogens. F1000 research, <https://doi.org/10.12688/f1000research.17430.1> .
- Kanatt SR, Chander R, Sharma A. 2010. Antioxidant and antimicrobial activity of pomegranate peel extract improves the shelf life of chicken products. *Int. J. Food Sci. Technol.*, 45(2): 216-222. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.2009.02124.x> .
- Khan J.A, and Hanees S. 2011. Antibacterial properties of *Punica granatum* peels. *Int. J. Appl. Biol. Pharm.*, 2(3):23-27.
- Kıralan M, Gölükçü M, Tokgöz H. 2009. Oil and conjugated linolenic acid contents of seeds from important pomegranate cultivars (*Punica granatum* L.) grown in Turkey. *J. Am. Oil. Chem. Soc.*, 86(10): 985–990. <https://doi.org/10.1007/s11746-009-1436-x> .
- Kiril O, Schwartz E, Baruch L, Matityahu I, Mahajna J, Amir R. 2014. The antioxidative and anti-proliferative potential of non-edible organs of the pomegranate fruit and tree. *LWT-Food Sci. Technol.*, 58: 571–577. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2014.03.030>
- Kurt H., Şahin G. 2011. Bir Ziraat Coğrafyası Çalışması: Türkiye’de nar (*Punica granatum* L.) tarımı. *Marmara Coğrafya Dergisi*, 27: 551-574.
- Layden BT, Angueira AR, Brodsky M, Durai V, Lowe WL. 2013. Short chain fatty acids and their receptors: New metabolic targets. *Transl. Res.*, 161(3): 131–140. <https://doi.org/10.1016/j.trsl.2012.10.007>.
- Melo IL. 2012. Evaluation of the effects of pomegranate seed oil (*Punica granatum* L.) on tissue lipid profile and its influence on biochemical parameters in oxidative processes of rats. PhD Thesis. Sao Paulo University, Faculty of Pharmaceutical Science, Sao Paulo, Brasil.
- Nozohour Y, Golmohammadi R, Mirnejad R. 2018. Antibacterial activity of pomegranate (*Punica granatum* L.) seed and peel alcoholic extracts on *Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas aeruginosa* isolated from health centers. *J. Appl. Biotechnol. Rep.*, 5(1): 32-36. <https://doi.org/10.29252/JABR.01.01.06> .
- Orgil O, Schwartz E, Baruch L, Matityahu I, Mahajna J, Amir R. 2014. The antioxidative and anti-proliferative potential of non-edible organs of the pomegranate fruit and tree. *LWT-Food Sci. Technol.*, 58: 571–577. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2014.03.030>
- Prashanth D, Asha MK, Amit A. 2001. Antibacterial activity of *Punica granatum* L. *Fitoterapia*, 72: 171–173. [https://doi.org/10.1016/S0367-326X\(00\)00270-7](https://doi.org/10.1016/S0367-326X(00)00270-7) .
- Ramawat KG, Merillon JM, 2019. Pomegranate Bioactive Molecules and Health Benefits. *Bioactive Molecules in Food*. Switzerland. Springer. 1253-1270. ISBN 978-3-319-78029-0
- Reddy MK, Gupta SK, Jacob MR, Khan SI, Ferreira D. 2007. Antioxidant, antimalarial and antimicrobial activities of tannin-rich fractions, ellagitannins and phenolic acids from *Punica granatum* L. *Planta Med.*, 73(5): 461-467. DOI: <https://doi.org/10.1055/s-2007-967167>.
- Saeed F, Afzaal M, Tufail T, Ahmad A. 2019. Use of Natural Antimicrobial Agents: A Safe Preservation Approach. *Intechopen*, 17(5): 1-18. <http://dx.doi.org/10.5772/intechopen.80869>
- Tanveer A, Farooq U, Akram K, Hayat Z, Shafi A, Nazar H, Ahmad Z. 2015. Pomegranate extracts: a natural preventive measure against spoilage and pathogenic microorganisms. *Food Rev. Int.*, 31: 29–51. <https://doi.org/10.1080/87559129.2014.961074>
- Višnjevec MA, Ota A, Skrt M, Butinar B, Možina SS, Cimerman NG, Nečemer M, Arbeiter AB, Matjaž Hladnik M, Krapac M, Ban D, Miklavčič MB, Ulrih NP, Bandelj D. 2017. Genetic, biochemical, nutritional and antimicrobial characteristics of pomegranate (*Punica granatum* L.) grown in Istria. *Food Technol. Biotechnol.*, 55(2): 151–163. <https://doi.org/10.17113/ftb.55.02.17.4786>, ISSN 1330-9862.
- Yilmaz M, Soran H, Beyatli Y. 2006. Antimicrobial activities of some *Bacillus spp.* strains isolated from the soil. *Microbiological Research*, 161: 127-131.