

**'n Onderzoek na die antibakteriese eienskappe van
Carpobrotus edulis L.**

verhandeling voorgelê ter vervulling van
die vereistes vir die graad

MAGISTER SCIENTAE

IN DIE DEPARTEMENT PLANTKUNDE EN GENETIKA
FAKULTEIT NATUURWETENSKAPPE
IN SAMEWERKING
MET DIE DEPARTEMENT AGRONOMIE
FAKULTEIT LANDBOU
VAN DIE
UNIVERSITEIT VAN DIE ORANJE VRYSTAAT
BLOEMFONTEIN

deur

ELMARIE VAN DER WATT

STUDIELEIER: PROF. J.C. PRETORIUS

MEDESTUDIELEIER: DR. K. KEMP

NOVEMBER 1999



INHOUDSOPGAWE

	<u>BLADSYE</u>
Lys van afkortings	viii-ix
Lys van figure	x-xii
Lys van tabelle	xiii-xvi
HOOFSTUK 1:	1-6
<u>Inleiding en rasionaal vir studie</u>	
HOOFSTUK 2:	7-36
<u>Literatuurstudie</u>	
INLEIDING	7
2.1 Plante as geneesmiddels en die assosiasie met die mens	8
2.2 Die belang van tradisionele genesing in Afrika	10
2.2.1 Problematiek rondom tradisionele genesingsmetodes	11
2.2.2 Die fondasies van tradisionele genesing en die verwantskap met ander mediese stelsels	14
2.2.3 Die nis wat die tradisionele genesers beklee	17
2.3 Kweking en bewaring van medisinale plante	19
2.4 Toekoms van natuurlike produkte uit plante vir die formele en informele sektore	20
2.5 Sukkulente	23
2.5.1 Patrone van verspreiding	25
2.5.2 Die invloed van klimaat op sukkulente	27
2.5.3 Familie Mesembryanthemaceae	28

2.5.3.1	Familie agtergrond	28
2.5.3.2	Subfamilies en die genus <i>Carpobrotus</i>	30
2.5.3.3	Algemene kenmerke van <i>Carpobrotus edulis</i> L.	33

HOOFSTUK 3: 37-50

Algemene materiaal en metodes

3.1	INLEIDING	37
3.2	MATERIAAL	37
3.2.1	Plantmateriaal	37
3.2.2	Ander Materiaal	37
3.3	Voorbereiding van die ru-ekstrak	39
3.4	Bepaling van die konsentrasie van die ru-ekstrak	40
3.5	Skeiding van die polêre en nie-polêre fraksies van die waterige metanol ru-ekstrak met behulp van vloeistof-vloeistof chromatografie	41
3.6	Kolomchromatografie	42
3.7	Kwalitatiewe dunlaag chromatografie (K-TLC)	43
3.8	Preparatiewe dunlaag chromatografie (P-TLC)	44
3.9	Algemene stappe tydens 'n biotoets	45
3.9.1	Gieting van agar	45
3.9.2	Die kwalitatiewe bepaling van bakterie getalle in sokkulture	46
3.9.3	Quebec kolonieteller asook die kweking van nuwe kulture	47
3.9.4	Metodes van gradering ("screening") vir natuurlike komponente met antimikrobiese aktiwiteite	48

3.9.5	Antifungale toetse	49
HOOFSTUK 4:		51-86
<u>Kwalitatiewe vooraf toetsing van die anti-mikrobiese</u>		
<u>potensiaal van 'n <i>Carpobrotus edulis</i> L. ru-ekstrak</u>		
<u>asook semi-gesuiwerde fraksies daarvan</u>		
INLEIDING		51
4.1	MATERIAAL EN METODEDES	54
4.1.1	MATERIAAL	54
4.1.2	METODES	55
4.1.2.1	Vorbereiding van die ru-ekstrak en bepaling van die konsentrasie	55
4.1.2.2	Fraksionering van die komponente uit 'n waterige ru-ekstrak met behulp van vloeistof-vloeistof chromatografie deur gebruik te maak van verskillende tegnieke.	55
	o Tegniek 1	55
	o Tegniek 2	56
	o Tegniek 3	57
4.1.2.3	Kolomchromatografiese fraksionering van die bioaktiewe fraksies verkry met behulp van tegniek 1	57
4.1.2.4	Kwalitatiewe dunlaag chromatografie (K-TLC)	58
4.1.2.5	Preparatiewe dunlaag chromatografie (P-TLC)	60
4.1.2.6	Antimikrobiese biotoetse	60
4.1.2.6.1	Antibakteriese toetse	60
4.1.2.6.2	Antifungale toetse	61

4.1.3	Opsomming van die volgorde waarin tegnieke toegepas is om stapsgewys kwalitatiewe data oor die antimikrobiese potensiaal van 'n waterige <i>C. edulis</i> ru-ekstrak te bekom.	61
4.2	RESULTATE	64
4.2.1	Die antibakteriese aktiwiteit van 'n waterige ru-ekstrak van <i>C. edulis</i> asook 'n wasneerslag wat uitgesipiteer het.	64
4.2.2	TLC-profiel van komponente in die ru-ekstrak wat selektief met vloeistof-vloeistof chromatografie gefraksioneer is.	65
4.2.3	TLC-profiel van komponente in ses gekombineerde semi-gesuiwerde kolomchromatografiese fraksies van 'n <i>C. edulis</i> diëtleter ekstrak wat vooraf met behulp van vloeistof-vloeistof chromatografie gefraksioneer is.	68
4.2.4	Die antibakteriese aktiwiteit van die ses semi-gesuiwerde gekombineerde fraksies wat kolomchromatografies uit 'n diëtleter ekstrak bekom is.	69

4.2.5	TLC-profiel van komponente in ekstraksies wat tydens die grootskaalse suiwing van 'n <i>C. edulis</i> ru-ekstrak met behulp van vloeistof-vloeistof chromatografie bekom is (tegniek 2) en die ooreenkomste met die voorlopige suiweringsprotokol (tegniek 1).	73
4.2.6	Komponente geïsoleer met behulp van preparatiewe dunlaag chromatografie (P-TLC) uit die aktiewe gekombineerde heksaan en diëtleter fraksie.	76
4.2.7	TLC-profiel van komponente wat direk uit droë plantmateriaal van <i>C. edulis</i> geëkstraheer is en verder selektief met behulp van vloeistof-vloeistof chromatografie gefraksioneer is.	79
4.3	BESPREKING	81
HOOFSTUK 5:		87-119
<u>Suiwing en identifisering van komponente met antibakteriese aktiwiteit uit <i>Carpobrotus edulis</i> deur tanniene vooraf te verwyder</u>		
INLEIDING		87
5.1	MATERIAAL EN METODEDES	89
5.1.1	MATERIAAL	89
5.1.2	METODEDES	89
5.1.2.1	Ekstrahering en verwydering van tanniene	89

5.1.2.2	Verdere fraksionering van die oorblywende ekstrak met behulp van vloeistof-vloeistof chromatografie	90
5.1.2.3	Kwalitatiewe dunlaag chromatografie (K-TLC)	92
5.1.2.4	Kleurreagense gebruik vir identifikasie	94
(a)	Alkaloïede	94
(b)	Antraseen derivate	95
(c)	Terpenoïede ("Bitter drugs")	95
(d)	Kardiale glikosiedes	96
(e)	Fenole	96
(f)	Flavonoïede	97
5.1.2.5	Preparatiewe dunlaag chromatografie (P-TLC) van die bioaktiewe etielasetaat fraksie	97
5.1.2.6	Isolasie, suiwering en identifikasie van aktiewe komponente uit die bioaktiewe etielasetaat fraksie	98
5.2	RESULTATE	100
5.2.1	Bioaktiwiteit van semi-gesuiwerde fraksies nadat tanniene verwyder is	100
5.2.2	TLC-profiel van komponente in die metanoliese askorbiensuuroplossing wat selektief met vloeistof-vloeistof chromatografie, deur etielasetaat te gebruik, gefraksioneer en kolomchromatografies geëlueer is.	102
5.2.3	Komponente geïsoleer met behulp van preparatiewe dunlaag chromatografie (P-TLC) uit die aktiewe etielasetaat fraksie	104

5.2.4	TLC-profiel van ses gesuiwerde komponente in die bioaktiewe etielasetaat fraksie wat met behulp van preparatiewe dunlaag chromatografiese skeiding (P-TLC) gesuiwer is en identifikasie deur met bekende flavonoïedstandaarde te vergelyk	108
5.2.5	Struktuurformules van die aktiewe gesuiwerde komponente geïdentifiseer uit ‘n bioaktiewe etielasetaat fraksie van 'n <i>C. edulis</i> ru-ekstrak.	113
5.3	BESPREKING	116
	HOOFSTUK 6:	120-138
	<u>Algemene bespreking</u>	
	BYLAE	139-144
	◦ ASETILERINGSPROSES	
	◦ KLEURREAGENSE	
	◦ DIELEKTRIESE KONSTANTES	
	BEDANKINGS	145
	OPSOMMING	146-147
	SUMMARY	148-149
	VERWYSINGS	150-166

LYS VAN AFKORTINGS

ATP:	adenosientrifosfaat
CHL:	chloroform
CMA:	“corn meal agar”
DC:	diëlektriese konstantes
DIE:	diëtieleter
DMSO:	dimetiel sulfoksied
EtOAc:	etielasetaat
ETOH:	etanol
HCl:	soutsuur
H ₂ O:	water
HOP:	Heropbou en Ontwikkelingsprogram
H ₂ SO ₄ :	swaelsuur
KOH:	kaliumhidroksied
Konstr:	konsentrasie
K-TLC:	kwalitatiewe dunlaag chromatografie
L.:	Linnaeus
M:	molaar
MEA:	“malt extract agar”
MeOH:	metanol
MS:	mieresuur
m/v:	massa per volume
NP/PEG:	natuurlike produk-polietileenglikol reagens
PCA:	“plate count agar”
PDA:	“potato dextrose agar”
P-TLC:	preparatiewe dunlaag chromatografie

RF: retensiefaktor
TLC: dunlaag chromatografie
UV: ultraviolet lig
vC: voor Christus
VSA: Verenigde State van Amerika
VS-reagent: vanallien swaelsuur
v/v: volume per volume
WHO: Wêreld gesondheidsorganisasie
YAS: ysasynsuur

LYS VAN FIGURE

HOOFSTUK 2:

FIGUUR 1: 31

Die verspreiding van die genus *Carpobrotus* in Suid-Afrika (A), asook die verspreiding oor die wêreld (B)

HOOFSTUK 3:

FIGUUR 1: 38

Boggrondse dele van *C. edulis* L. nadat dit vars afgesny is (A), in 'n oond by 60°C gedroog is (B) en nadat die droë materiaal fynemaal is (C)

HOOFSTUK 4:

PLAAT 1: 65

Kwalitatiewe TLC-profiel van komponente in die ru-ekstrak van *C. edulis* wat met behulp van vloeistof-vloeistof chromatografie gefraksioneer is deur gebruik te maak van organiese oplosmiddels in volgorde van stygende polariteit

PLAAT 2: 68

Kwalitatiewe TLC-profiel van komponente in 'n diëtieleter fraksie van *C. edulis* wat vooraf met behulp van vloeistof-vloeistof fraksionering van die ru-ekstrak bekom is en verder kolomchromatografies geskei is

PLAAT 3: 69

Antibakteriese aktiwiteit van fraksies, nadat 'n diëtieleter ekstrak verder kolomchromatografies geskei is, teen die gram (+) bakterie *S. lutea*

PLAAT 4:	70
Antibakteriese aktiwiteit van fraksies, nadat 'n diëtetieleter ekstrak verder kolomchromatografies geskei is, teen die gram (-) bakterie <i>M. catharalis</i>	
PLAAT 5:	73
Kwalitatiewe TLC-profiel van komponente in 'n ru-ekstrak van <i>C. edulis</i> wat op grootskaal (tegniek 2) met behulp van vloeistof-vloeistof chromatografie gefraksioneer is	
PLAAT 6:	76
Kwalitatiewe TLC-profiel van komponente in die ru-ekstrak van <i>C. edulis</i> wat met behulp van vloeistof-vloeistof chromatografie gefraksioneer is deur heksaan en diëtetieleter. Hierdie fraksies is gekombineer en komponente geïsoleer met behulp van preparatiewe dunlaag chromatografie	
PLAAT 7:	79
Kwalitatiewe TLC-profiel van komponente wat direk uit droë plantmateriaal van <i>C. edulis</i> met behulp van vloeistof-vloeistof chromatografie gefraksioneer is	
HOOFSTUK 5:	
PLAAT 1:	102
Kwalitatiewe TLC-profiel van komponente in 'n metanoliese askorbiensuurekstrak van <i>C. edulis</i> wat met behulp van vloeistof-vloeistof chromatografie gefraksioneer en kolomchromatografies geëlueer is deur gebruik te maak van die tannienekstraheringsmetode	

PLAAT 2:	104
Kwalitatiewe TLC-profiel van komponente in die metanoliese askorbiensuurekstrak van <i>C. edulis</i> wat met behulp van vloeistof-vloeistof chromatografie gefraksioneer is deur gebruik te maak van etielasetaat	
PLAAT 3:	108
Kwalitatiewe TLC-profiel van ses komponente wat uit 'n etielasetaat fraksie van <i>C. edulis</i> met behulp van preparatiewe dunlaag chromatografie geïsoleer en gesuiwer is nadat tanniene verwyder is	
PLAAT 4:	109
Kwalitatiewe TLC-profiel van ses komponente wat uit 'n etielasetaat fraksie van <i>C. edulis</i> met behulp van preparatiewe dunlaag chromatografie geïsoleer en gesuiwer is nadat tanniene verwyder is. Vergelyking tussen ses komponente en flavonoïed standarde, na behandeling met die voorgeskrewe kleurreagense onder 365 nm UV-lig	
FIGUUR 1:	113
Die molekulêre struktuur van neohesperidien	
FIGUUR 2:	113
Die molekulêre struktuur van feruliensuur	
FIGUUR 3:	114
Die molekulêre struktuur van hyperosied	
FIGUUR 4:	114
Die molekulêre struktuur van rutien	
FIGUUR 5:	115
Die molekulêre struktuur van cactisien	

LYS VAN TABELLE

HOOFSTUK 4:

TABEL 1: 64

Antibakteriese aktiwiteit van die waterige ru-ekstrak van *C. edulis* asook 'n was residu teen die gram (-) bakterie *M. catharalis* na ekstrahering met 95 % metanol

TABEL 2: 66

Antibakteriese aktiwiteit van verskillende fraksies van 'n *C. edulis* ru-ekstrak wat m.b.v. tegniek 1 bekom is en die effek van temperatuur op die aktiwiteit van afsonderlike fraksies

TABEL 3: 67

Antibakteriese aktiwiteit van verskillende fraksies van 'n *C. edulis* ru-ekstrak wat m.b.v. tegniek 2 bekom is en die effek van temperatuur op die aktiwiteit van afsonderlike fraksies

TABEL 4: 67

Antibakteriese aktiwiteit van verskillende vloeistof-vloeistof chromatografiese fraksies wat direk uit *C. edulis* ru-poeiermateriaal geëkstraheer is (tegniek 3) en die effek van temperatuur op die aktiwiteit van afsonderlike fraksies

TABEL 5: 71

Antibakteriese aktiwiteit van 'n *C. edulis* ru-ekstrak wat m.b.v. vloeistof-vloeistof chromatografie verder met diëtleter gefraksioneer is en kolomchromatografies in afsonderlike komponente geskei is, teen die bakterieë *S. lutea* en *M.catharalis*

TABEL 6: 75

Antibakteriese aktiwiteit van 'n *C. edulis* ru-ekstrak asook 'n hekasaan en diëtieleter fraksie, geëkstraheer m.b.v. vloeistof-vloeistof chromatografie en die anti-biotiese effek op bekende mensbakterieë

TABEL 7: 78

Antibakteriese aktiwiteit van 'n *C. edulis* ru-ekstrak wat m.b.v. vloeistof-vloeistof chromatografie deur hekasaan en diëtieleter gefraksioneer is. Die gekombineerde fraksie is verder gesuiwer m.b.v. preparatiewe dunlaag chromatografie, die komponente geskei en die bioaktiwiteit van elke komponent teen die bakterie *M. catharalis* bepaal

TABEL 8: 80

Antibakteriese aktiwiteit van 'n *C. edulis* ru-poeier ekstrak geëkstraheer m.b.v. vloeistof-vloeistof chromatografie (tegniek 3) teen die gram (-) bakterie *M. catharalis*

HOOFSTUK 5:

TABEL 1: 100

Antibakteriese aktiwiteit van etanoliese en metanoliese askorbiensuurfraksies van *C. edulis*, bekom tydens die ekstrahering en verwydering van tanniene, teen die gram (-) toetsorganisme *M. catharalis*

TABEL 2: 101

Antibakteriese aktiwiteit van verskillende fraksies en/of eluate van 'n *C. edulis* metanoliese askorbiensuurekstrak, geëkstraheer m.b.v. vloeistof-vloeistof en kolomchromatografie, tydens die tannienekstraheringsmetode, teen die gram (-) toetsorganisme *M. catharalis*

TABEL 3: 103

Die samestelling van die fraksies en/of eluate verkry m.b.v. die tannienekstraheringsmetode uit *C. edulis* en identifikasie van spesifieke groepe komponente op grond van kleurreaksies en/of m.b.v. UV-lig (254 en 365 nm) na behandeling met voorgeskrewe kleurreagense

TABEL 4: 105

Antibakteriese aktiwiteit van fraksies in 'n *C. edulis* ekstrak gefraksioneer deur vloeistof-vloeistof chromatografie m.b.v. etielasetaat. Die fraksie is verder gesuiwer m.b.v. preparatiewe dunlaag chromatografie en die geïsoleerde semi-gesuiwerde fraksies getoets teen die gram (-) bakterie *M. catharalis*

TABEL 5: 106

Antibakteriese aktiwiteit van 'n *C. edulis* metanoliese askorbiensuurekstrak wat m.b.v. vloeistof-vloeistof chromatografie deur etielasetaat gefraksioneer is en m.b.v. preparatiewe dunlaag chromatografie geskei is in afsonderlike komponente, waarvan drie aktiewe fraksies geïdentifiseer is en getoets is teen die toetsorganisme *M. catharalis* by verskillende konsentrasies

TABEL 6:

107

Die spesifieke groep komponente waaraan die ses bioaktiewe gesuiwerde komponente op bane 4,5 en 6 van 'n preparatiewe plaat na P-TLC skeiding van die drie semi-gesuiwerde fraksies in die aktiewe etielasetaat fraksie behoort, sowel as die bioaktiwiteit teen die gram (-) bakterie *M. catharalis*

TABEL 7:

110

Identifikasie van ses aktiewe gesuiwerde komponente, geïsoleer uit die bioaktiewe etielasetaat fraksie van *C. edulis* m.b.v. K-TLC skeiding, op grond van ooreenkomste met bekende flavonoïed standarde ten opsigte van RF-waardes en fluoresserende kleure. Bioaktiwiteit teen *M. catharalis* word ook aangedui

TABEL 8:

111

Antibakteriese aktiwiteit van ses gesuiwerde komponente uit 'n etielasetaat fraksie van *C. edulis* m.b.v. preparatiewe dunlaag chromatografie teen bekende menspatogene. Die aktiwiteit van die tannienfraksie word ook aangedui

HOOFSTUK 1

INLEIDING EN RASIONAAL VIR DIE STUDIE

Oor jare heen wil dit voorkom asof die belangstelling in navorsing op natuurlike produkte uit plante met farmaseutiese potensiaal 'n sikliese verskynsel is, met die hoogtepunt wat twintig jaar gelede bereik is. Navorsingsprogramme is deurlopend sedert die vroegste tye, waar daar vir die anti-biotiese potensiaal in plante gesoek is, aan die gang gehou. Die primêre fokuspunt van hierdie navorsingsprogramme was, en is nog steeds, die ontdekking van nuwe anti-mikrobiële metaboliete met biologiese aktiwiteite (Borris, 1996). Soos reeds geïmpliseer het plante gedurende die 1940's tot die 1970's wisselvallige aandag ontvang as potensiële bronne van geneesmiddels, maar oor die afgelope twintig jaar het hernieude belangstelling selfs van die groter farmaseutiese maatskappye aangespoor om natuurlike plantmateriaal vir hulle geneeskundige potensiaal te toets (Borris, 1996).

Ten spyte daarvan dat plante as 'n uitstekende bron vir biologiese aktiewe natuurlike produkte beskou word, moet die planteryk steeds gesien word as 'n grotendeels onbenutte stoorplek van fitochemikalieë. Hostettman en Wolfender (1997) het aangedui dat minder as 10 % van die hoërplant spesies op aarde vir biologiese aktiwiteit getoets is en in die meeste gevalle ook net vir een aktiwiteit.

Suid-Afrika, met sy ryk en diverse flora, het deur die eeue heen 'n groot bydrae as bron van natuurlike geneesmiddels gelewer, maar hoofsaaklik vir inheemse volkere. Dieselfde kan ook vir die res van Afrika gesê word.

Dit moet egter bygevoeg word dat die plante van hierdie kontinent, waarvan daar ongeveer 25 000 spesies reeds beskryf is (Van Wyk, 1997), in 'n groot mate deur navorsers afgeskeep is in die lig van die min terapeutiese middels wat uit plante van hierdie deel van die wêreld ontwikkel is.

Aangesien relatief min plantspesies deeglik vir hulle farmaseutiese potensiaal bestudeer is, algemeen aanvaar as minder as 1 % (Van Wyk, 1997), het weinig produkte wat plaaslik ontwikkel is reeds die wêreldmark bereik. Nietemin is 'n plaaslike mark in die informele sektor, wat ru-plantmateriaal vir medisinale gebruike aan die publiek beskikbaar stel, reeds gevestig (Alkofahi *et al.*, 1990; Van Wyk, 1997).

Van die bekende komponente wat egter al kommersieël benut word is die bekende anti-kanker agente, vinblastien uit *Catharanthus roseus* en steroïede uit *Dioscorea* spesies. Die meeste studies op die potensiaal wat in plante opgesluit lê word egter steeds in Europa uitgevoer.

Tradisionele, plant-gebaseerde, gesondheidstelsels verskaf primêre gesondheidsorg aan meer as 75 % van die wêreld se populasie. Medisinale plante, selfs in hulle ru-vorm, is vir eeue reeds onder inboorlingstamme in gebruik met byna geen veranderings in die vorm of die manier waarop hulle gebruik is nie. Alhoewel hierdie geneesmiddels steeds algemeen in Suid-Afrika is, is baie van die tradisionele genesingsmetodes van Suid-Afrikaanse inheemse stamme besig om te verdwyn as gevolg van verwestering, verstedeliking en die invloed van die moderne genesingstechnologie (Van Zyl, 1996).

Daar bestaan min twyfel dat 'n groot deel van die tradisies, oorgedra van generasie tot generasie, oor 'n paar jaar dalk vir die mensdom verlore kan wees. 'n Besondere poging deur etnobotaniste en ander belangstellendes om hierdie natuurlike erfenis vir die nageslag behoue te laat bly, asook om nuwe kennis te versamel, het 'n saak van dringendheid geword.

Enkele programme is egter huidig aan die gang wat help om die plaaslike kennis van medisinale plante te verhoog en bestaande medisinale sisteme verder te ontwikkel in meer effektiewe gesondheidsorgstelsels binne die konteks van ekonomiese toestande en sosiale voorkeure (Desta, 1993).

Erkenning van die beperkinge van gesintetiseerde komponente in die behandeling van baie kroniese kondisies en siektes, en die potensiaal van plant-gebaseerde geneesmiddels om 'n meer bekostigbare en in sommige gevalle 'n meer effektiewe alternatief te verskaf, het aanleiding gegee tot die vinnige groei in die kruiegeneesmiddel industrie oor die laaste dekade. Alhoewel tradisionele genesing met kruie steeds baie aandag geniet, het ander gesondheidstelsels, en meer spesifiek die moderne Westerse geneeskunde, komplementêre rolle in die gesondheidsorg begin speel en op geen manier kan hierdie stelsels mekaar vervang nie (Rojas *et al.*, 1992).

Aangesien tradisionele genesing soms onder groot geheimhouding gepraktiseer word, is dit vir farmaseutiese maatskappye, wat buite hierdie gebiede voorkom en belang het by bioprospektering van hierdie gebiede, belangrik om goeie verhoudings met plaaslike bevolkings te vestig ten einde kommersiële produkte uit plante te ontwikkel (Van Zyl, 1996).

Kommersiële kruiegeneesmiddels bied 'n kleiner inkomste as farmaseutiese produkte, maar die produkte benodig ook minder tyd en geld om te ontwikkel. Hierdie geneesmiddels het die potensiaal om 'n belangrike bron van inkomste vir plaaslike gemeenskappe te wees maar plaas 'n vraagteken agter die volhoubare benutting van natuurlike bronne.

Oorbenuiting van natuurlik plante vir farmaseutiese-, kruie- en tradisionele geneesmiddels, kan tot die uitputting van waardevolle spesies aanleiding gee en enige bioprospekteringsprogram wat die potensiële gebruik van spesifieke plante kan verhoog, moet ook strategië vir die volhoubare benutting van die natuurlike bronne beplan en implimenteer (Baker *et al.*, 1995). Die verhouding tussen tropiese biodiversiteit, bewaring en gesondheid is egter kompleks en moenie oorvereenvoudig word nie. Ethnobotaniste kan baie onbekende aspekte ten opsigte van die fyn balans tussen benutting en bewaring in die toekoms te wagte wees wat verdere navorsing uit verskillende perspektiewe sal noodsaak.

Wanneer 'n keuse gemaak moet word ten opsigte van 'n plant uit 'n natuurlike populasie wat vir sy medisinale of agrochemiese potensiaal ondersoek moet word, kan dit lonend wees om die volgende kriteria in aanmerking te neem: 1) aanduidings dat die plant tradisioneel onder plaaslike bevolkings benut word, 2) dit waarvoor die plant gebruik word, 3) hoe volop die plant in die natuur voorkom en 4) die moontlikheid om die plant, volhoubaar te benut sonder om tot die verdwyning daarvan uit 'n gebied aanleiding te gee.

Die keuse het in hierdie studie op *Carpobrotus edulis* L. (voortaan verwys na as *C. edulis*) geval aangesien daar sterk aanduidings is dat die plant wyd deur tradisionele genesers gebruik word (kriterium 1) vir die behandeling van sinusites, diarree, verekseem en selfs tuberkulose (Van Wyk, 1997; kriterium 2). Aangesien genoemde siektetoestande met bakteriese infeksies gepaard gaan, is besluit om die anti-mikrobiese en veral die anti-bakteriese eienskappe van die plant te ondersoek. *C. edulis* kom redelik volop in Suid-Afrika voor, is 'n relatief vinnige groeier en kan maklik gevestig word (Watt en Breyer-Brandwijk, 1962, kriterium 3). Aangesien die blare hoofsaaklik benut word deur tradisionele genesers is die versameling daarvan uit die veld non-destruktief (kriterium 4).

Min is egter oor die plant bekend ten opsigte van die aktiewe bestanddele wat vir die genesende eienskappe verantwoordelik is wat saam met die feit dat dit aan al die kriteria wat hoërop genoem is voldoen, 'n rasionaal vir 'n meer intensiewe studie van die plant verskaf. As deel van die ondersoek op *C. edulis* beskryf hierdie studie (1) die voorlopige bepaling van die anti-mikrobiese eienskappe van die plant ru-ekstrak (sien hoofstuk 4), (2) die aktiwiteite van semi-gesuiwerde fraksies van die ru-ekstrak sonder die verwydering van tanniene (sien hoofstuk 4), (3) die aktiwiteite van semi-gesuiwerde fraksies nadat tanniene vooraf verwyder is (sien hoofstuk 5), (4) die suiwering en identifikasie van aktiewe anti-bakteriese komponente anders as tanniene (sien hoofstuk 5) en (5) die anti-bakteriese aktiwiteite van afsonderlike komponente geïsoleer en gesuiwer uit *C. edulis*.

Natuurlike antimikrobiëse komponente uit plante kan moontlik die groei van bakterieë deur middel van verskillende meganismes as die huidige gebruikte antibiotikums inhibeer en kan dus kliniese waarde besit vir die behandeling van weerstandbiedende mikro-organismes (Eloff, 1998). As gevolg van hierdie moontlikheid asook redes hoërop genoem, is dit belangrik dat die soektog na nuwe antibiotikums voortgaan.

HOOFSTUK 2

LITERATUURSTUDIE

INLEIDING

Suid-Afrika is 'n kontinent met na raming 30 000 verskillende plantspesies waarvan ten minste 5 000 spesies in die woudstreke alleen voorkom (Van Wyk, 1997). In die lig van Suid-Afrika se groot biodiversiteit is dit nie verrassend om te vind dat omtrent net 3 000 van hierdie plantspesies vir hulle medisinale waarde benut word nie. Ten minste 350 spesies word algemeen in tradisionele genesing deur plaaslike bevolkingsgroepe gebruik (Van Wyk, 1997). Die medisinale waarde van plante lok in resente tye besondere belangstelling uit en word hoofsaaklik uit twee perspektiewe beskou naamlik as 'n bron vir gesuiwerde biologies aktiewe bestanddele deur farmaseutiese maatskappye en ru-ekstrakte as 'n belangrike bron van medisyne deur tradisionele genesers (Taniguchi en Kubo, 1993).

Uit 'n ekonomiese oogpunt is die gebruik van medisinale plante besonder winsgewend vir die farmaseutiese industrie. In Europa is die omset van natuurlike farmaseutiese produkte ongeveer \$ 7,5 biljoen per jaar teenoor die \$ 3 biljoen in VSA. In 'n land soos Duitsland maak natuurlike produkte 48 % van die geneesmiddels wat gebruik word uit teenoor 24 % in Frankryk, 10,7 % in Italië en 6,7 % in die Verenigde Koningryk. Natuurlike produkte en hulle derivate verteenwoordig meer as 50 % van alle geneesmiddels in kliniese gebruik regoor die wêreld (Farnsworth en Soejarto, 1991).

Deur die eeue het die mens swaar gesteun op plante as 'n bron van medisynes vir die behandeling van 'n verskeidenheid siektes (Cragg *et al.*, 1993). Gesofistikeerde gebruikstelsels van tradisionele geneesmiddels, wat uit plante geïsoleer is, bestaan reeds duisende jare in 'n land soos China (Chang en But, 1986). Die Wêreld Gesondheidsorganisasie (WHO) het reeds in 1992 bereken dat 80 % van die 5 biljoen wêreldbewoners hoofsaaklik op tradisionele medisynes vir hulle primêre gesondheidsorg steun (Nigg en Seigler, 1992; Cragg *et al.*, 1993). Van hierdie plante wat in tradisionele genesing gebruik word het al die wêreldmark bereik. Van die bekende komponente wat uit hierdie plante geïsoleer is, is kodeïen uit *Papaver somniferum* asook vinblastien en viskristien uit *Catharanthus roseus*. Kodeïen word algemeen gebruik vir die behandeling van kopseer en is ook 'n belangrike bestanddeel van hoesmedisynes (Kingham en Balandrin, 1993).

Vinblastien word algemeen gebruik in die behandeling van Hodgkins se siekte en viskristien vir die behandeling van leukemia by kinders (Evans *et al.*, 1982). Daar is egter relatief min bekend oor tradisionele genesingsmetodes en dus is daar ook min literatuur, wat hieroor rapporteer, beskikbaar.

2.1 Plante as geneesmiddels en die assosiasie met die mens

Die meeste van die hedendaagse beskikbare kennis oor tradisionele geneesmiddels is deur mondelingse oordrag bekom maar in sekere gevalle ook op skrif gestel (Bell, 1981). Die gevolg hiervan is dat etlike duisende plantspesies van medisinale belang reeds aan die mens bekend is.

Suid en Sentraal Amerika, Afrika en Suid-Asie bedek omtrent 10 % van die wêreldoppervlakte maar bevat meer as 50 % van die wêreld se flora (Nigg en Seigler, 1992). Die verlies aan flora in genoemde gebiede is egter kommerwekkend en is groter as geskat in die verlede.

In China word daar groot waarde geheg aan tradisionele genesing en maak dit 30 - 50 % van die mees algemene genesingsmetodes uit. In hierdie gebied alleen word \pm 6 000 plantspesies kontemporêr vir hulle medisinale waarde gebruik maar waarvan slegs 500 algemeen bekend is (Bell, 1981). In Suid-Afrika is 'n groot deel van die geneesmiddels wat daaglik gebruik word afkomstig van plante en word dit veral in die informele sektor maar ook op kleiner skaal in die kommersiële sektor te koop aangebied.

Reeds gedurende die negentiende eeu is beide waterige en alkoholiese ekstrakte van plante berei en die chemiese analise hiervan het gelei tot die isolasie van aktiewe bestanddele wat op hulle beurt tot die ontstaan van moderne geneesmiddels gelei het (Nigg en Seigler, 1992). Moderne medisynes het egter nog gebreke aangesien die volle spektrum steeds nie aan die mens bekend is nie of dat die verwagte eindresultate nog nie verkry kon word nie. So byvoorbeeld het bekende antivirale middels steeds 'n nou spektrum van aktiwiteit, beperkende terapeutiese gebruike en 'n variasie in toksisiteit (Elisabetsky en Posey, 1994). Aan die ander kant is die toename in virus verwante siektes aan die groei en is dit steeds noodsaaklik om nuwe en beter antivirale middels te ontwikkel.

2.2 Die belang van tradisionele genesing in Afrika

In derde wêreld lande soos Asië, Latyns Amerika en Afrika word tradisionele genesing hoofsaaklik beoefen vanweë die onbereikbaarheid van Westerse gesondheidsstelsels, gebrek aan kommunikasiekanale en ontoereikende paaie (Conco, 1991). Hierdie lande is steeds, wat hulle gesondheidsdienste betref, onderontwikkel. 'n Gebrek aan tegnologie, swak higiëne, onbereikbare waterbronne asook onvoldoende behuising kan waarskynlik vir hoë mortaliteite verantwoordelik gehou word.

Die hoë mortaliteite kan verder toegeskryf word aan onbekende toksiene, parasitiese infeksies en siektes wat veroorsaak word deur 'n gebrek aan sanitasie en die benutting van staande waterbronne. Ten spyte hiervan het tradisionele genesing steeds 'n belangrike rol om te vervul en het 'n lewenswyse vir tot 80 % van die populاسie geword. Daar word bereken dat ± 200 000 tradisionele genesers in Suid-Afrika werksaam is en dat tot 60 % van Suid-Afrikaners jaarliks besoek by hierdie genesers in die informele sektor aflê ten spyte van moderne biomediese dienste wat beskikbaar is. Suid-Afrika se ryk kulturele diversiteit kan waarskynlik hiervoor verantwoordelik gehou word (Mammen, 1996).

Die kennis oor plante met medisinale waarde, wat vir die informele sektor belangrik is, word mondelings van generasie tot generasie oorgedra, terwyl die kennis van belang vir die formele sektor oor die laaste 300 jaar deur die Europese en ander settelaars bekendgestel is. Die meeste Afrikane verkies egter steeds om eerder van tradisionele genesingsmetodes gebruik te maak.

Tradisionele genesing in Afrika is steeds 'n onbeskryfde wetenskap, waar die informasie oor die genesende eienskappe van sekere kruie oor generasies heen in 'n familie bewaar is maar vinnig besig is om uit te sterf (Mammen, 1996).

Die mediese wêreld is egter tans besig om 'n hoë premie op kennis aangaande tradisionele genesing te plaas en hierdie kennis word tans herontdek. Afrika se rykdom aan natuurlike plante word beskou as 'n groot bron van geneesmiddels en farmaseutiese maatskappye belê tans groot somme geld om soveel as moontlik inligting hieromtrent te bekom (Conco, 1991).

Die kans is egter goed dat nuwe ontdekte aktiewe bestanddele sinteties berei kan word deur van die groter farmaseutiese maatskappye. In 'n sekere opsig is dit vir Westerlinge meer aanvaarbaar in terme van die beheer wat daarvoor uitgeoefen kan word aangesien van die onbekende bestanddele wat addisioneel in natuurlike ru-ekstrakte kan voorkom, gevaarlike newe-effekte kan hê (Mammen, 1996).

2.2.1 Problematiek rondom tradisionele genesingsmetodes

Vanuit beide 'n tradisionele en moderne farmakologiese oogpunt het elke stelsel sy eie unieke benadering ten opsigte van die metodes van genesing en is dit belangrik om elk se *materia medica* te ondersoek. Hierdie term verwys na 'n versameling van geskrifte van geneesmiddels vir spesifieke siektetoestande. Elke geskrif bevat gespesifiseerde inligting oor medikasie, gebruike, voorbereiding, metode van administrasie, dosis en ander relevante data.

Met verwysing na tradisionele medisynes, het die *materia medica* die beskrywing van nuwe metodes en die ontwikkeling van nuwe geneesmiddels ten doel (Van Wyk, 1997). Laasgenoemde dokument behels die beskrywing van kulturele en tradisionele behandelings onder etniese groepe asook die geografiese verspreiding van plante wat as bronne gebruik word.

Die noodsaaklikheid van so 'n dokument kan nie oorbeklemtoon word nie veral in die lig van die feit dat ouer mense, wat oor die kennis en belangstelling beskik, aan die kwyn is.

Plantkundiges wat ekologiese opnames doen in gebiede waar van tradisionele genesingsmetodes gebruik gemaak word, verskaf nie altyd genoeg inligting vir die wetenskaplike in die laboratorium nie terwyl hierdie wisselwerking al hoe meer belangrik word. Om die tradisionele genesingsmetodologie op 'n wetenskaplike grondslag te plaas is veral die volgende inligting van belang: (1) Latynse binomiaal naam van die plant gebruik, (2) algemene naam van die plant, (3) plantdele gebruik, (4) geografiese ligging, (5) algemene medisinale gebruike, (6) metode(s) van voorbereiding, (7) dosering, (8) bron van inligting (byvoorbeeld tradisionele genesers, ens.), (9) roete van administrasie en (10) die spesifieke medisinale gebruike (Farnsworth, 1994). Van uiterse belang is dat 'n herbarium eksemplaar in 'n geakrediteerde herbarium bewaar moet word.

Volgens Mammen (1996) word die volgende problematiek met tradisionele genesingsmetodes geassosieer:

- * Dit hou nie tred met die wetenskaplike en tegnologiese ontwikkeling nie.
- * Die metodes, tegnieke, medisinale gebruike en opleiding word geheim gehou.
- * Dit is moeilik vir tradisionele genesers om chroniese siektes betyds te identifiseer.
- * Die gebruike van natuurlike plantekstrakte is nie goed gedefinieer nie en word soms met bonatuurlike kragte geassosieer.
- * Die gebruik van spesifieke plante is soms op spirituele en morele beginsels gebaseer wat moeilik is om te beskryf.
- * Nuwe-effekte van die kombinasies kruie wat gebruik word is die meeste van die tyd onbekend.
- * 'n Lae kwaliteit van pasiënte sorg is aan die orde van die dag as gevolg van die tekort aan regulering deur lisensiëring.
- * Dit is moeilik om die suksesvolheid van tradisionele genesing te evalueer as gevolg van die tekort aan geskrewe registers van pasiënte wat dan ook waarskynlik aanleiding gee tot kennis wat verlore gaan.

Balick (1994) is van mening dat hedendaagse studies oor tradisionele genesing volledige inligting moet bevat, wat al bogenoemde aspekte insluit.

Dit is uiters belangrik dat die kennis van tradisionele genesers vir die nageslag behoue moet bly en dit lê waarskynlik op die weg van goed opgeleide etnobotaniste.

2.2.2 Die fondasies van tradisionele genesing en die verwantskap met ander mediese stelsels

Moderne geneeskunde het 'n relatiewe kort geskiedenis in vergelyking met tradisionele genesing. Gekonfronteer deur siektes is die eerste mense gedwing om na die medisinale waarde van die planteryk te kyk (Thikhoi, 1980). Die vroegste rekord van 'n plant wat gebruik is deur die mens is gevind in 'n Egiptiese Eber papyrus wat 1550 vC dateer. Die vader van genesing, Hippokrates, het ook die waarde van plante in genesing ingesien. Genesing met behulp van kruie het nie juis vordering gemaak deur die eeue heen nie totdat aktiewe bestanddele soos morfien gedurende die 19 de eeu uit kruie geïsoleer is (Thikhoi, 1980).

Medisinale plante kon daarna ook in ander vorms, byvoorbeeld mengsels, gebruik word en geneesmiddels kon ook in toenemende mate gesintetiseer word as gesuiwerde en hoogs aktiewe middels. Dit is reeds meer as twee dekades gelede bereken dat natuurlike produkte tot 25 % van die voorgeskrewe geneesmiddels regoor die wêreld uitmaak (Wagner en Wolff, 1976). Vandag is dit nader aan 50 % (Balick *et al.*, 1996)

Alle gesondheidsstelsels het sekere doelwitte in gemeen naamlik om te genees, verligting te bring en om te vertroos. Ten spyte van die groot rol wat moderne genesingsmetodes in Afrika speel, dra die tekort aan gekwalifiseerde personeel steeds by tot die neiging om van tradisionele genesingsmetodes gebruik te maak. Tradisionele genesing is gebaseer op die ingesteldheid van elke kultuurgroep teenoor die geneeskundige en word verder beïnvloed deur spesifieke gelowe, strategië, gedrag en kulturele interaksie met die omgewing (Sindiga, 1993).

Ten spyte hiervan word tradisionele genesing wêreldwyd aanvaar. Hierdie praktyk is egter beperk tot sekere streke vanweë streeksgebonde kulturele praktyke maar hierdie kultuurgrense kan wel oorskry word. 'n Voorbeeld hiervan is die toenemende mate waarin die Westerse beskawing oor die laaste vier dekades belangstelling in medisinale plante en die tradisionele gebruike daarvan getoon het. Die stelsel van tradisionele genesing maak geen onderskeid tussen spesifieke plante met potensiaal nie, maar alle beskikbare natuurlike reserwes word benut om gesondheidsprobleme te hanteer.

Verder is die stelsel baie dinamies en is dit moeilik om tred te hou met die veranderings oor tyd asook kulturele veranderings (Sindiga, 1993). Hierteenoor word die Westerse genesingsmetodes as modern beskou en word gekenmerk deur die aanpassing van genesingstegnieke by die veranderinge in wetenskap en tegnologie oor tyd.

Tradisionele genesing in Afrika word beskryf as die somtotaal van alle kennis en praktyke wat gebruik word in die diagnoseer, voorkoming of eliminerings van siektetoestande en wat slegs gerugsteun word deur ondervinding uit die verlede asook kennis wat oorgedra is van een generasie na 'n ander. Hierdie kennis word hoofsaaklik mondelings oorgedra en word selde op skrif gestel. Die tradisionele geneser, in hierdie geval, benodig tog 'n sekere periode van nie-formele opleiding en moet beskik oor spesifieke eienskappe om vir die gemeenskap aanvaarbaar te wees.

Verder word hoofsaaklik van tuisgemaakte instrumente gebruik gemaak en word die pasient in sy eie huis besoek (Sindiga, 1993). Fisiese ondersoek word op tradisionele wyse gedoen deur gebruik te maak van geskiedkundige oorlewering, water, die Bybel en lampe. Addisioneel is die vervaardiging van medisyne afhanklik van die kennis van die omgewing terwyl ander vervaardigingstegnieke van spirituele aard is. In die praktyk word die vervaardiging, verspreiding en bemarking van geneesmiddels beperk tot die tradisionele geneesheer (Wagner en Wolff, 1976).

Hierteenoor word 'n siektetoestand by die mens deur Westerlinge beskou as 'n fisiese, meganiese of organiese wanfunksie wat in slegs 'n klein verhouding tot die persoon se sosiale en geloofsondervinding staan (Sindiga, 1993). Die opleiding van die moderne algemene praktisyn word oor 'n spesifieke voorgeskrewe periode aan 'n universiteit gedoen en die minimum kwalifikasie is nodig vir verdere spesialisering. Verder word geneesmiddels eers ontwikkel na jarelange toetsing en geregistreer by 'n mediese raad voordat dit vir menslike gebruik aangewend kan word. Laasgenoemde benodig spesiale toerusting sowel as gespesialiseerde geboue soos laboratoriums.

Tradisionele en moderne geneeskunde het egter baie van mekaar te leer. Wedersydse respek en konsultasie behoort aangemoedig te word ten einde meer effektiewe gesondheidsstelsels op alle sosio-ekonomiese vlakke te verseker (Thikhoi, 1980).

2.2.3 Die nis wat die tradisionele genesers beklee

Voor die vestiging van blanke pioniers in Afrika het die tradisionele genesers 'n baie belangrike rol in die gemeenskap sowel as die lewens van individue met betrekking tot geneeskundige behoeftes gespeel. Veel later het sendelinge die standpunt gehuldig dat Westerse genesing meerderwaardig in vergelyking met tradisionele genesing was en is laasgenoemde ook verbied omdat dit as heidens en primitief beskou was. Ten spyte hiervan was tradisionele genesing, veral in meer afgeleë gebiede, soms die enigste bron wat geraadpleeg kon word en het die praktyk in groot mate bly voortbestaan (Van Zyl, 1996).

Uit die Witskrif van die Heropbou en Ontwikkelingsprogram (HOP) van Suid-Afrika blyk dit dat daar huidig toenemende klem gelê word op die uitbou van primêre gesondheidsdienste. In die lig van die beperkte fondse wat vir mediese dienste beskikbaar is, word die tradisionele genesingsprogram, soos dit tans steeds bedryf word, meer as ooit tevore aangemoedig en die nis wat dit kan vul beklemtoon (Van Zyl, 1996).

As gevolg van die verbintenis tussen tradisionele genesers en toordokters word eersgenoemde in 'n negatiewe lig deur veral Westersinge beskou maar daar word maklik vergeet dat hulle 'n belangrike rol gespeel het in die jare toe daar geen formele opgeleide geneeshere in hierdie kontinent was nie. Die huidige wêreld ekonomie en hoë mediese kostes sal waarskynlik daartoe bydra dat 'n groot deel van die Suid-Afrikaanse bevolking steeds swaar op tradisionele genesing sal steun.

Na bewering word tradisionele genesers in swart stedelike gebiede in Suid-Afrika nog druk besoek. Volgens 'n opname wat onlangs gedoen is besoek 85 % van Soweto se volwassenes nog gereeld 'n tradisionele geneser, terwyl 95 % steeds kruiemedisynes gebruik (Smith, 1995). Hierdie genesers speel ook 'n breër sosiale rol en is meer gemeenskapsgeoriënteerd as die tipiese moderne Westerse klinikus. Tradisionele genesers verrig egter nie almal dieselfde funksie nie en ressorteer nie onder dieselfde etniese groep nie.

In 'n breër konteks word verskillende kategorieë van tradisionele genesers in Afrika aangetref wat hoofsaaklik in twee hoofgroepe ingedeel kan word naamlik die kruiedokter en die godsdiensgeneser (Hutchings, 1989). Die oordrag van kruiekennis vind gewoonlik in 'n spesifieke sosiale groep plaas en volgens Hutchings (1989) is die volgende praktyke steeds aan die orde van die dag:

- (1) Dorpenaars versamel die plante en gebruik dit vir algemene doeleindes asook kure vir meer algemene siektes.
- (2) Kruiedokters sowel as toordokters versamel en verkoop kruiemedisyne. Die verskil tussen 'n kruiedokter en 'n toordokter is dat eersgenoemde die mense moet beskerm teen die “werking van bose geeste”, terwyl laasgenoemde die mense “wat reeds getoor is” moet genees.
- (3) Godsdiensgenesers lê hulle hoofsaaklik toe op die diagnosering van die onverklaarbare en boodskappe van voorouers word vertolk om sodoende die onbekende te verklaar. Daar bestaan hoofsaaklik drie kategorieë van godsdiensgenesers naamlik die beengooier, siener en mediumistiese geneser.

Dit is gewoonlik vrouens wat hierdie beroep beoefen en 'n lang en gekompliseerde opleidingstydperk van 8 maande tot 5 jaar is nodig. Die klem word hoofsaaklik op rituele gelê.

- (4) Tradisionele dokters verkoop en skryf kruiemedisynes voor maar identifiseer nie self die oorsaak van die siekte nie. Hulle is gewoonlik manlik en moet 'n periode van 'n jaar lank by 'n “inyonga” deurbring, vir hulle opleiding.
- (5) Homeopate word ook in die tradisionele genesingspraktyke aangetref en hulle ondergaan 'n verskeidenheid van korrespondensie kursusse in kruiemedisynes en homeopatie. Hulle maak hoofsaaklik gebruik van gepubliseerde informasie oor menslike anatomie, refleksiologie, bestraling en die mengsels van kruie om siektes te behandel (Conco, 1991).

2.3 Kweking en bewaring van medisinale plante

Tropiese lande beskik oor 'n groot verskeidenheid van plante en die inheemse bevolking het 'n redelike kennis van die gebruike van hierdie plante as tradisionele geneesmiddels. Maar, as gevolg van die groot ekonomiese en sosiale veranderinge wat hedendaags plaasvind, verdwyn baie van die tradisies en die rol wat medisyne uit natuurlike plante gespeel het is ook besig om te verdwyn (Nick *et al.*, 1995). Nogtans moedig tradisionele genesers die kweking van sekere tradisionele plante aan aangesien hulle soms oor lang afstande moet reis om die plante te bekom. Van die togte is baie veeleisend en die gebiede waarin plante versamel moet word is vinnig besig om te krimp.

Laasgenoemde is waarskynlik die gevolg van verhoogde druk wat op die omgewing deur die plaaslike bevolking geplaas is asook verwante ontwikkelingsaktiwiteite wat aanleiding gegee het tot die verlies aan biodiversiteit, maar veral medisinale plante, in hierdie gebiede.

Die voortbestaan van baie plantspesies word tans bedreig as gevolg van vernietigende metodes van oesinsameling asook die afwesigheid van 'n daaropvolgende herwinningsprogram. Huidig bestaan daar 'n groot behoefte vir die bewaring van medisinale plante deur die vestiging van selfonderhoubare omgewings of deur die bewaring van kiemplasma of beide (Smith, 1995). Alle bewaringstegnieke behoort egter te fokus op die bestuur van die algehele ekosisteme deur die groot variasie van plant en dierelewe te onderhou.

2.4 Toekoms van natuurlike produkte uit plante vir die formele en informele sektore

Chemikaliëe afkomstig van plante, diere en bakteriëe staan bekend as natuurlike produkte en is belangrik vir die voortbestaan van die mens (Nigg en Seigler, 1992).

Van hierdie stowwe het onder andere hulle ontstaan gekry deur die biologiese en ekologiese interaksies wat daar tussen organismes en hulle omgewing bestaan en sluit ook sogenaamde sekondêre metaboliete in. Sekere sekondêre metaboliete besit die potensiaal om in 'n gesuiwerde of ru-ekstrak vorm deur die mens as aktiewe bestanddele in 'n verskeidenheid van kommersiële produkte, wat landboukundige sowel as farmaseutiese produkte insluit, gebruik te word.

Deur die eeue heen het natuurlike seleksie waarskynlik plaasgevind en aanleiding gegee tot die ontstaan van verskillende weë van respirasie en fotosintese wat vandag nog deur verskillende plantgroeperinge gevolg word. Uiteraard moes hierdie dinamiese chemiese en biologiese evolusie aanleiding gegee het tot die ontstaan van nuwe eindprodukte wat vanuit 'n allelopatiese perspektief vir sommige organismes voordelig maar vir ander nadelig kon wees (Rizvi en Rizvi, 1992).

Allelopatie moet huidig as 'n verwaarloosde wetenskap beskou word waarvan die voordele vir veral die landboupraktyk nog nie tot sy volle potensiaal ontwikkel is nie.

Allelopatie word gedefinieer as die sintese en vrystelling van allelochemikalieë deur een plant aan die omgewing wat 'n voor- of nadelige uitwerking op ander plante in die omgewing het (Rizvi en Rizvi, 1992). Allelochemikalieë kan voordelig wees deurdat dit kan bydra tot die beskerming van een organisme maar weer nadelig wees vir 'n ander organisme of plantspesie in dieselfde omgewing. Deur die proses van evolusie het nuwe toksiene waarskynlik ook in plante ontwikkel wat nadelige gevolge vir selfs mens en dier kon inhou. Mens en dier het geleer om hierdie plante as potensiële bronne van voedsel te vermy maar huidig is daar hernieude belangstelling in bioaktiewe komponente wat selfs toksiene insluit (Rizvi en Rizvi, 1992). Bestudering van beide die biologie en chemie van die organismes betrokke in biologiese interaksies kan inligting bevat oor die meganismes van biologiese kommunikasie en kan ook leidrade verskaf vir die ontdekking van nuwe bruikbare natuurlike produkte (Nindi, 1980).

Vanuit 'n navorsingsoogpunt het verskillende natuurwetenskaplike dissiplines soos chemie, biochemie, mikrobiologie, entomologie, virologie, verskillende landboudissiplines, plantkunde en veral etnobotanie die gemeenskaplike verantwoordelikheid om die potensiaal van natuurlike produkte uit plante vir toekomstige gebruik deur die mens na te vors.

Die direkte aanwending van natuurlike ru-ekstrakte sowel as ontwikkelde bioafbreekbare natuurlike produkte vir die geneeskundige en landboupraktyk, om maar twee te noem, behoort hoë prioriteit te geniet (Rizvi en Rizvi, 1992). Die beoefening van tradisionele genesing in die informele sektor is steeds algemeen in Suid-Afrika en as gevolg van die verswakte ekonomie asook die kulturele gewoontes van 'n groot deel van die bevolking, is die regering van die dag waarskynlik verplig om nie apaties hierteenoor te staan nie. Gesondheidsprogramme wat meer op 'n Westerse grondslag bedryf was, het in die verlede subsidies van die staat ontvang vir die verskaffing van geneesmiddels aan hospitale en klinieke. Die huidige ekonomiese toestand waarin die land hom bevind het daartoe bygedra dat gesondheidsdienste agteruit gegaan het met die gevolg dat daar steeds in die toekoms op tradisionele genesing staatgemaak sal moet word (Balick, 1994).

Die swak ekonomie van arm Afrika lande het 'n invloed op gesondheidsdienste as gevolg van die hoë kostes om farmakologiese industrieë op te rig asook die kostes om gevorderde tegnologiese instrumentasie wat benodig word in hospitale, te verskaf.

Om hierdie redes en omdat moderne genesing vanuit 'n ekonomiese oogpunt nie binne die bereik van almal is nie, word mense verplig om op tradisionele genesingsmetodes terug te val.

Die dinamiese en aanpasbaarheidseienskappe van tradisionele genesing toon, dat met die huidige ondersteuning en erkenning wat dit geniet, dit waarskynlik minstens in die volgende eeu nog bedryf sal word. Aangesien medisinale plante die ruggraat van tradisionele genesing vorm, beteken dit dat miljoene mense in onderontwikkelde lande druk op natuurlike medisinale plantbevolkings, deur die gereelde gebruik daarvan, sal uitoefen (Wiley en Chichester, 1994). Dit blyk dus uiters noodsaaklik te wees om in belang van hierdie gedeelte van die bevolking, maar ook in belang van die ekologiese bewaring van hierdie natuurlike erfenis, plante te bestudeer en nuwe goedkoper produkte, waarvan die toksikologie behoorlik uitgepluis is, daaruit te ontwikkel. Om redes wat hoërop aangesny is, is die rasionaal gesien om 'n studie te maak van *Carpobrotus edulis* L. (hotnotsvy, suurfig) met die klem op die plant se anti-mikrobiese potensiaal. Relatief min inligting is oor hierdie plant in die literatuur beskikbaar en daarom is dit nodig om 'n breër oorsig te gee oor die groep plante, bekend as sukkulente, waaraan hierdie plant behoort.

2.5 SUKKULENTE

Plantegroei in verskillende streke wat naastenby dieselfde klimaat het sal, wat hulle algemene bou aanbetref, uiteraard baie groot ooreenkomste toon (Ihlenfeldt, 1994). Van al die faktore wat in die omgewing van die plante kan varieer, het water seker die grootste ekologiese uitwerking.

Wat die vogvereistes betref, kan vier hoofekologiese tipes onderskei word naamlik: (a) Mesofiete (plante wat onder middelmatige vogtoestande groei), (b) Hidrofiete (plante wat in baie nat omgewings groei), (c) Xerofiete (plante wat in droë omgewings groei) en (d) Halofiete (plante wat in grond groei wat baie opgeloste soute bevat) (Barkhuizen, 1978).

Xerofiete moet 'n voortdurende stryd om water voer. Hulle groei in droë, oënskynlik onherbergsame streke. Deur middel van hulle besondere bouwysigings is hulle egter bestand teen droogtetoestande. Aangesien daar soms verkeerdelik na alle xerofitiese plante as vetplante verwys word, moet daarop gelet word dat hulle in twee groepe ingedeel kan word, naamlik nie-vlesige xerofiete en vlesige xerofiete of sukkulente (Smith *et al.*, 1998). Onder eersgenoemde ressorteer die dunblarige xerofiete, dorplante en die skyn-xerofiete.

Sukkulente of vetplante is van die mees gespesialiseerde en aangepaste plantvorme bekend. Waar ander plante in die warm trope en die subtropie as gevolg van die hoë temperature en bomatige vogtigheid 'n welige blaargroei het, moet die vetplante wat in woestyn en semi-woestyn gebiede voorkom, water bewaar of opgaar weens die baie lae voggehalte van sowel die lug as die grond. Hierdie plante moet in staat wees om die bietjie beskikbare water vinnig te absorbeer. Die water moet bowenal ook so lank as moontlik behoue bly (Smith *et al.*, 1998).

2.5.1 Patrone van verspreiding

Die grootste natuurlike verspreiding van sukkulente word aangetref tussen 30°N en 30°S van die ewenaar. Suid-Afrika (langs die weskus tot in die Namibwoestyn), Australië (Westlike Australië, Nieu Suid Wallis en Queensland se bergagtige dele) asook Noord (Mexico) en Suid Amerika (Peru en Chile) lê die naaste aan hierdie breedtegrade en is derhalwe ryk aan spesies wat aan hierdie plantgroep behoort en toon ook van die digste bevolkings hiervan in die wêreld (Rowley, 1978; Arnold en de Wet, 1993).

Alhoewel Suid-Afrika oor 'n wye spektrum van sukkulente beskik, is baie min kaktusse inheems aan Suid-Afrika. Alle kaktusse wat aan die genusse *Harrisia*, *Cereus*, *Rhipsalis* en *Pereskia* behoort is uitheems. Die enigste genus wat inheems in Suid-Afrika is, is *Opuntia* (Arnold en de Wet, 1993) Alle sukkulente is morfologies aangepas om water te kan stoor maar die storingsorgaan hang af van die tipe droogte wat in 'n gebied voorkom. Twee tipes droogtes word onderskei naamlik 'n periodieke droogte, wat van korte duur is en 'n langdurige droogte wat vir jare op een plek kan voortduur (Barkhuizen, 1978).

Bolle en knolle is ideaal vir die oorlewing van hierdie plante gedurende 'n langdurige droogte. *Bulbine* is 'n goeie voorbeeld van 'n plant met saamtrekbare wortels. Laasgenoemde is wortels waarvan die veselagtige murg krimp gedurende droogte en dan sodoende die plant dieper in die grond in trek (Arnold en de Wet, 1993).

Die penwortels van plante in gebiede wat gekenmerk word deur langdurige droogtes is nie goed ontwikkel nie en hierdie plante besit 'n goed ontwikkelde bywortelstelsel. *Carnegiea* het byvoorbeeld 'n bywortelstelsel wat tot 5 m om die plant kan strek. Hierdie wortels voorsien 'n groot oppervlak vir die absorpsie van die bietjie reën wat val, sowel as vog wat gedurende die nag kondenseer wanneer die temperature daal (Rowley, 1978).

Nie-sukkulente xerofiete daarenteen is gewoonlik bome of struik met harde hout, diep wortels en leeragtige blare (Barkhuizen, 1978). Hulle word ook gewoonlik geassosieer met gebiede wat jaarliks aan droogtes onderwerp word, het 'n vinnige lewenssiklus en oorleef die droogtes in die vorm van sade. Sade ontkiem vinnig en die plante blom slegs as dit reën (Rowley, 1978). Sukkulente floreer in gebiede met 'n jaarlikse reënval van tussen 50 en 80 mm en sorteer onder die kategorie bekend as semi-woestynplante. Meeste van hierdie sukkulente kom voor in rotsagtige gebiede met hoë berghellings waar water redelik beperk is (Mauseth, 1991). Sommige kusgebiede (suidwestelike dele van Afrika, die gebiede wat strek vanaf Angola tot in die Oos-Kaap en oor die sentrale plato van Suid-Afrika tot in Zimbabwe en Botswana sowel as oor die Andesgebergtes in Chile en Peru) word gekenmerk deur 'n misbelt wat voldoende vog verskaf vir die groei van xerofiete op veral sandduine en woestynsand wat bekend is vir hulle swak waterhouvermoë.

'n Misbelt kom ook langs die Atlantiese kus van suidelike Afrika en die Namibwoestyn voor. 'n Unieke sukkulente flora word in hierdie smal kusstreke, wat net binne bereik van doudraende inwaaiende winde val, aangetref (Mauseth, 1991).

2.5.2 Die invloed van klimaat op sukkulente

Vorige studies het getoon dat die plantdeel wat aktiewe bestanddele met farmakologiese potensiaal bevat, van plant tot plant varieer en word ook beïnvloed deur geoklimaat kondisies asook die tyd van die jaar (Caceres *et al.*, 1993). Baie meerjarige sukkulente is spesiaal aangepas om hulle dormante seisoene ondergronds deur te bring en verskyn dan slegs gedurende reënperiodes. Alhoewel sukkulente se habitate verskil, stem dit tog in 'n mate ooreen ten opsigte van die voorkoms van periodieke droogtes en die feit dat temperature selde onder vriespunt daal. Tog kan hierdie plante aan ryp blootgestel word (Herre, 1971).

Ten spyte van die kontraste in klimaat en groeiseisoene, besit die meeste Suid-Afrikaanse sukkulente die vermoë om aan te pas by glashuistoestande. Sukkulente wat moeilik aanpas kom voor in gebiede met 'n jaarlikse reënval van minder as 250 mm (10 duim) en maklik aanpasbares kom weer voor in dele met 'n hoër reënval, alhoewel die intervalle tussen die reënperiodes lank kan wees (Herre, 1971).

2.5.3 Familie Mesembryanthemaceae

Die familie Mesembryanthemaceae sorteer onder die orde Caryophyllales wat ook ander sukkulente families insluit. Die orde bestaan uit 12 families en omtrent 10 000 spesies (Cronquist, 1981).

Daar is nie een familie wat dominant is nie, maar die drie families Aizoaceae, Cactaceae en Caryophyllaceae sluit omtrent twee-derdes van die spesies in (Cronquist, 1981). Die familie Phytolaccaceae sluit omtrent 120 spesies in. Die Amaranthaceae, Chenopodiaceae, Nyctaginaceae, Phytolaccaceae en Portulacaceae is ook van die bekendste families (Mauseth, 1991). Alhoewel dit op die oog af mag lyk asof hierdie families niks in gemeen het nie, word hulle wel verbind op grond van hulle ooreenstemmende embriologie, anatomie sowel as biochemiese en morfologiese kenmerke (Rowley, 1978).

2.5.3.1 Familie agtergrond

Die familienaam hou verband met die Griekse woorde *mesembria* wat middag, en *antheon* wat blom beteken. Die blomme van hierdie hoofsaaklik Suid-Afrikaanse familie, gaan in die namiddag oop (Wisura en Glen, 1993). Linnaeus het al die spesies in hierdie familie onder die familie Mesembryanthemaceae geplaas, wat later bekend geword het as die familie Aizoaceae (Maddams, 1989). In die 19 de eeu is pogings aangewend, deur onder andere Maddams (1989), om die familie in verskillende genusse te onderverdeel na aanleiding van sekere verskille wat by die blomme opgemerk is, maar sonder enige sukses.

Bittrich en Hartmann (1988) het Mesembryanthema as 'n monofiletiese tak in die familie Aizoaceae beskou, wat dan in twee subfamilies Mesembryanthemoideae en Rhuschioideae verdeel kan word. Smith *et al.* (1998) gebruik dieselfde indeling vir die familie as Bittrich en Hartmann (1998) en die klassifikasie van die spesies is gedoen op grond van hulle vrugte en nie hulle blomme nie. Hierdie tak in die familie Aizoaceae van Mesembryanthema word dan ook deur Smith *et al.* (1998) onder die familie Mesembryanthemaceae geklassifiseer.

Linnaeus het egter wel daarin geslaag om die familie in 100 genusse te verdeel, waarvan 99 persent in die Republiek van Suid-Afrika en Suidwes-Afrika voorkom (Barkhuizen, 1978). Smith *et al.* (1998) het ook onlangs 'n studie van die Mesembryanthemaceae gedoen en het die familie in 123 genusse verdeel. Hierdie familie is relatief uiteenlopend en bestaan uit een- of meerjarige kruide, klein vetplantagtige struikies, halfstruik, struik en kruipende plantsoorte met platliggende stingels.

Die plantjies kom egter almal vlesig, kompak, polvormig en dwergagtig voor (Herre, 1971; Smith *et al.*, 1998). In die algemeen word na spesies in hierdie familie as vygies, of "midday flowers" verwys. Die kenmerkende eienskappe van die verskillende genera is in die blom, maar veral in die vrug geleë (Smith *et al.*, 1998; Bittrich en Hartmann, 1988).

Die vrugte is meesal oopspringende kapsules wat meganies open om die sade vry te stel. Water is gewoonlik verantwoordelik vir die oopmaak van kapsules asook die uitwassing en verspreiding van sade (Rowley, 1978).

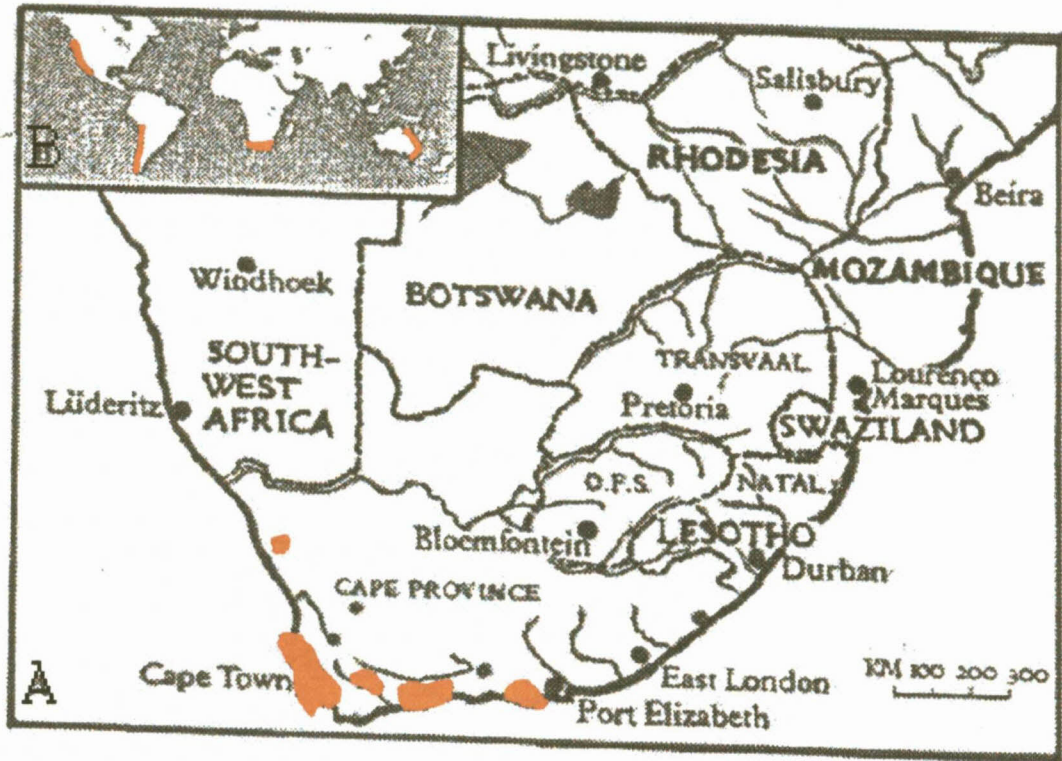
Variasies in die struktuur van die vrugte is die basis vir die verdeling van die familie in genusse (Bittrich en Hartmann, 1988).

Die ontkiemingstyd van die sade varieer van 'n aantal dae tot 'n aantal weke. Meerjariges ontkiem egter oor die algemeen stadiger as eenjariges en dit word toegeskryf daaraan dat eersgenoemde meer vatbaar vir veranderinge in klimaat is (Barkhuizen, 1978). Die familie Mesembryanthemaceae is gesentreerd in Suid-Afrika, maar kom ook voor in St. Helena, Madagaskar, Noord-Afrika en Arabië. Die twee genusse *Carpobrotus* en *Disphyma* is inheems aan Australië en Nieu-Seeland (Figuur 1; Herre, 1971).

Twee tipes verspreidingsmeganismes word aangetref naamlik waar die sade aktief deur die moederplant self versprei word en waar die sade versprei word deur sekere agente soos water, wind, diere en die mens self (Barkhuizen, 1978). Ongeveer 98 % van die Mesembryanthemaceae het 'n hokkige kapsule wat oopspring langs die dorsale struktuur sodra dit benat word en dan ook weer sluit as dit uitdroog. Die sade kan tot so ver as 30 cm van die plant af uitgeskiet word (Wisura en Glen, 1993; Barkhuizen, 1978).

2.5.3.2 Subfamilies en die genus *Carpobrotus*

Die genus *Carpobrotus* behoort aan die subfamilie Rhuschioideae en nie aan die Mesembryanthemoideae soos 'n mens sou verwag nie (Smith *et al.*, 1998). 'n Diverse groep van groeivorms word in hierdie subfamilie Rhuschioideae aangetref.



FIGUUR 1: Die verspreiding van die genus *Carpobrotus* in Suid-Afrika
 (A) asook die verspreiding oor die wêreld (B) (Herre, 1971)

Die blare is gewoonlik teenoorstaande en tot 'n mate vergroei. Die blare kan in sommige gevalle nie baie vlesig wees nie, of hulle is hoogs sukkulent (Smith *et al.*, 1998).

Die plant kan voorkom as matvormende of struikagtige plante. Die genusse van die subfamilie Rhuschioideae word in sekere groepe ingedeel na aanleiding van die blaartipes en die habitate waarin hulle voorkom, asook die tipes vrugte wat voorkom (Smith *et al.*, 1998). Die genus *Carpobrotus* ressorteer onder die groep *Lampranthus* (Bittrich en Hartmann, 1988; Smith *et al.*, 1998), het vlesige nie-oopspringende vrugte wat net soos vye ryp word en staan bekend as die Hottentotsvy. Die genus verteenwoordig vinniggroeiende grondbedekkers wat veral gebruik word met die vestiging van duine vanweë hulle uitgebreide wortelstelsels (Court, 1981, Jones en Luchsinger, 1987). Spesies wat onder hierdie genus ressorteer floreer dus in gematigde klimaatstoestande waarvan kusgebiede 'n voorbeeld is.

Carpobrotus is een van die min genera wat buite die grense van Suid-Afrika voorkom. Dit is egter nie bekend of laasgenoemde slegs die gevolg van kunsmatige aanplantings is nie (Wisura en Glen, 1993). Blake (1969) het vier spesies van die genus *Carpobrotus* in Australië, een op die eiland Norfolk, een in Chile en die oorblywende 23 spesies in Suid-Afrika geïdentifiseer (Wisura en Glen, 1993). Die genusnaam is 'n samestelling van die Griekse woorde *karpos* en *brotos* wat respektiewelik *vrugte* en *eetbaar* beteken (Wisura en Glen, 1993). Die 23 spesies wat in die Republiek van Suid-Afrika aangetref word groei meesal in die kusgebiede en in baie sanderige grond (Jones en Luchsinger, 1987).

Die genus verteenwoordig meerjarige sukkulente met platliggende, kruipende stingels. Die blare is teenoorstaande en effens by die basis vergroei terwyl blomme eindstandig is en die blomkleure wissel van wit en geel tot rooi. Die meeste spesies van die genus *Carpobrotus* blom vanaf April tot November. Hulle kan ewe maklik van steggies en van saad af gekweek word. Hierdie genus verkies sanderige grond wat vinnig dreineer. Daar bestaan ook bewyse dat die genus 'n verhoogde groeitempo toon en meer blomme produseer na vure wat ook veral baie voorkom in die Kaapse Skiereiland (Rowley, 1978).

2.5.3.3 Algemene kenmerke van *Carpobrotus edulis* L.

Die spesie *Carpobrotus edulis* L. is 'n baie dekoratiewe plant wat met groot sukses teen skuinstes geplant kan word. Dit word oral in die Kaapse Skiereiland aangetref waar die eetbare vrugte te koop aangebied word (*edulis* is die Latynse woord vir *eetbaar* ; Barkhuizen, 1978). Dit is 'n meerjarige sukkulent wat meestal in kusgebiede en sanderige grond aangetref word, groei maklik en benodig min water om te kan bestaan.

Die plant toon 'n variasie van medisinale eienskappe wat antivirale, antimikrobiese en antiparasitiese sowel as insekdodende eienskappe insluit (Watt en Breyer-Brandwijk, 1962). Reeds sedert die agtiende eeu is die blare en vrugte algemeen gebruik vir farmakologiese doeleindes. Die blaarsap het 'n vransk smaak, is antisepties en kan gebruik word vir die verligting van brande, skrape en sonbrand (Roberts, 1995).

Die bekendste gebruik is egter die verligting van pyn veroorsaak deur bloublasies se steek asook spinnekop en vlooibyte (Roberts, 1995). Volgens Rood (1994) word die blare ook effektief aangewend in die behandeling van omlope en ekseem by babas.

McClintock (1975) het uitgewys dat die meeste blomme eerder geel as pienk van kleur is. Drie tipes blomme is geïdentifiseer. Die eerste en mees algemene is 'n helder gekleurde geel blom wat slegs 'n klein variasie in die intensiteit van kleuring van die bloeiwyses toon. Die kleur verander ook nie soos die blom ouer word nie (Toelken, 1996).

Die tweede tipe is geel wanneer die blom oopmaak maar na twee of drie dae neem dit 'n vleeskleur aan wat verdiep soos die blom ouer word. Kleurvariasie in hierdie tweede tipe is egter nie so algemeen soos in die derde tipe, waar die kleur kan wissel van geel tot magenta nie (Maddams, 1989).

Carpobrotus edulis word beskou as 'n problematiese indringer spesie in California, V.S.A., wat kompeteer met sekere bedreigde plantspesies in duinhabitate aldaar. Die matvormende sukkulent omring en groei oor die inheemse plantspesies in California se kusbiblioteke. Veral twee struikspesies naamlik *Haplopappus ericoides* en *H. venetus* var. *sedoides*, het vlak wortelstelsels wat dieselfde grondiepte as *C. edulis* beset en van hier die kompetisie (Antonio *et al.*, 1991). Kunsmatige verwydering van *C. edulis* rondom genoemde twee spesies het aanleiding gegee tot 'n hoër drukpotensiaal in die xileem van hierdie spesies wat as bewys voorgehou word dat *Carpobrotus* die water gebruik wat andersins vir die struik beskikbaar sou gewees het (Antonio *et al.*, 1991).

Verwydering van *C. edulis* uit die omgewing het ook gelei tot die vorming van nuwe blare in die twee struik wat daarop dui dat dit ook 'n nadelige effek op hul groei het.

'n Veldstudie is ook uitgevoer in die noordelike dele van Santa Barbara, V.S.A., om die meganismes van beheer oor *C. edulis* in graslande en kusgebiede te bepaal. Hierdie plantgemeenskappe verskil ten opsigte van faktore wat die toename in *C. edulis* beheer naamlik grondverspreiding, herbivore en kompeteerdere (D'Antonio, 1993).

Daar is tot die gevolgtrekking gekom dat die toename van *C. edulis* meestal in graslande voorkom, waar die ontkieming en oorlewing afhanklik is van die teenwoordigheid van knaagdier. In kusgebiede het *C. edulis* egter baie swak gegroei en dit was skynbaar die gevolg van die swak fisiese toestande van hierdie gebiede wat die groei en oorlewing van die spesies beïnvloed het. D'Antonio het egter reeds in 1990 bevind dat *C. edulis* sekere ekologiese kenmerke besit wat dit instaat stel om kusgebiede met gemak in te dring en dat die plant sonder inspanning op enige plek gevestig kan word.

Wat groei- en vestigingspotensiaal aanbetref beskik *C. edulis* oor die eienskappe om maklik as alternatiewe gewas aangewend te word indien 'n besondere gebruik daarvoor ontdek kan word.

Die anti-bakteriese eienskap van die plant is reeds geïdentifiseer (Smith *et al.*, 1998) maar nog nie intensief nagevors nie. Indien hierdie eienskap enigsins ekonomiese potensiaal toon, is die moontlikheid nie uitgesluit dat *C. edulis* as alternatiewe landbougewas ontwikkel kan word nie.

In so 'n geval sal die plant dan as bron gebruik kan word vir die aktiewe bestanddeel of bestanddele verantwoordelik vir hierdie eienskap. Hieroor sal onder andere in hierdie studie gespekuleer word. Na aanleiding van die vroëre verwysing na die anti-bakteriese eienskap van *C. edulis* was die hoofdoel van hierdie studie om die aktiewe bestanddeel of bestanddele met anti-bakteriese eienskappe uit die blare (Watt en Breyer-Brandwijk, 1962) van *C. edulis* te isoleer, te suiwer en te identifiseer asook om die molekulêre struktuur(-ure) daarvan te ontsyfer.

HOOFSTUK 3

ALGEMENE MATERIAAL EN METODEDES

3.1 INLEIDING

In hierdie gedeelte word slegs daardie metodes behandel wat van toepassing is op meer as een hoofstuk. Metodes en eksperimentele uitlegte wat van toepassing is op 'n spesifieke hoofstuk sal in daardie hoofstuk behandel word.

3.2. MATERIAAL

3.2.1 PLANTMATERIAAL

Die blare van *Carpobrotus edulis* L. is versamel in Bloemfontein op die kampus van die Universiteit van die Oranje-Vrystaat (29° 06' 58" Suid ; 26° 11' 08" Oos) gedurende 1998. Die materiaal is oor 7 dae in 'n oond by 60 °C gedroog, gemaal tot 'n poeier met behulp van 'n meule wat toegerus was met 'n fyn sif en in Scott Duran lugdigte bottels by 4°C gestoor (Figuur 1).

3.2.2 ANDER MATERIAAL

Aluminium dunlaag chromatografie plate (silika gel 60 F 254; 20x20 cm) was afkomstig van Merck (Duitsland), preparatiewe dunlaag chromatografie plate (silikagel + indikator, 1mm, G 1510/LS 254; 20 x 20 cm) van Schleicher en Schuell (Duitsland) of Sigma (Duitsland).



FIGUUR 1: Boggrondse dele van *Carpobrotus edulis* L. nadat dit vars afgesny is (A), in 'n oond by 60⁰C gedroog is (B) en nadat die droë materiaal fynemaal is (C).

Die meeste van die chemikalieë was afkomstig van Merck in Duitsland naamlik: metanol, diëtleter, heksaan, etielasetaat, toluen, swaelsuur, soutsuur, etanol, chloroform, butanol, aseton en ysasynsuur en in die suiwerste graad beskikbaar.

Agar gebruik vir die biotoetse, naamlik PDA ("potato dextrose agar"), PCA ("plate count agar") en voedingsmedium ("nutrient broth") tesame met die pakkingsmateriaal vir kolomchromatografie (Kieselgel 60; partikelgrootte 0,063-0,200 mm; 70-230 mesh ASTM) was ook verskaf deur Merck (Duitsland). Ander chemikalieë wat gebruik was word in afsonderlik hoofstukke genoem.

3.3 VOORBEREIDING VAN DIE RU-EKSTRAK

Die droë materiaal is by kamertemperatuur geëkstraheer deur gebruik te maak van verskillende tegnieke en verskillende organiese oplosmiddels wat afsonderlik in elke hoofstuk behandel sal word. Gemeenskaplike prosedures sluit egter die volgende in:

'n Homogene pasta is met behulp van verskillende organiese oplosmiddels in 'n Kenwood versapper teen volle omwenteling vir een minuut verkry en onder vakuum deur 'n enkele Whatman no. 1 filtreerpapier gefiltreer met behulp van 'n Buchner trechter wat op 'n dikwandige Erlenmeyer fles gemonteer en aan 'n vakuumpomp gekoppel was. Die mees algemene organiese oplosmiddel wat gebruik was is 95 % metanol (v/v) waarmee die pasta herhaaldelik gewas is en dan gefiltreer is.

Die proses is minstens vyf keer herhaal totdat die filtraat byna helder gekleurd was en totdat seker was dat alle aktiewe bestanddele verwyder is. Organiese oplosmiddels is verwyder deur van vakuum distillasie by 40°C gebruik te maak met behulp van 'n Buchi Rotavapor (Bibby Sterilin LTD, Engeland) toegerus met 'n verkoelde Liebig kondensor.

Die oorblywende waterige oplossing word na verwys as die ru-ekstrak. Ander organiese oplosmiddels wat gebruik was om aktiewe bestanddele uit die verpoeierde plantmateriaal te ekstraheer was: heksaan, dietieleter, chloroform en etielasetaat. Die tegnieke word verder bespreek in die betrokke hoofstuk (sien hoofstukke 4 en 5).

3.4 BEPALING VAN DIE KONSENTRASIE VAN DIE RU-EKSTRAK

Twee cm^3 van die ru-ekstak is in 'n vooraf geweegde petribakkie oorgeplaas en die massa van die bakkie plus die ru-ekstrak weer bepaal. Na droging by 70°C in 'n oond vir 48 h is die massa weereens bepaal en die massa van die droë materiaal bereken deur die massa van die petribakkie van die gesamentlike massa af te trek. Bekende massas en volumes is deurgaans gebruik en die konsentrasie as mg cm^{-3} of $\mu\text{g cm}^{-3}$ uitgedruk.

3.5 Skeiding van die polêre en nie-polêre fraksies van die waterige metanol ru-ekstrak met behulp van vloeistof-vloeistof chromatografie

Vloeistof-vloeistof chromatografie is met behulp van 'n skeitregter uitgevoer ten einde te bepaal of die anti-fungale en anti-bakteriese eienskappe (sien 3.9) in die polêre of nie-polêre fraksies van die ru-ekstrak geleë was. Organiese oplosmiddels wat hiervoor gebruik was is gekies in volgorde van hulle stygende diëlektriese konstant-waardes (DC), wat ook 'n aanduiding van hulle polariteit is (Ouellette, 1992).

Die waterige ru-ekstrak wat in een geval met behulp van 95 % Metanol bekom is of die droë plantmateriaal in 'n ander geval (sien hoofstuk 5) is in 'n skeitregter geplaas en 'n paar keer gewas met die volgende organiese oplosmiddels in volgorde van stygende polariteit en in 'n 1:1 (v/v) verhouding: heksaan (DC= 1.9); diëtieleter (DC= 4.3;) chloroform (DC= 4.8) en etielasetaat (DC= 6.0).

Aangesien diëtieleter en chloroform se DC-waardes baie na aanmekaar is, is laasgenoemde slegs gebruik om seker te maak dat alle komponente met ooreenstemmende polariteit deur diëtieleter verwyder is.

Elke fraksie is afsonderlik vakuüm gedistilleer by 40°C (sien 3.3) tot droog. Na die bepaling van die massas van die droë fraksies is elk opgelos in 'n bekende volume 10% (v/v) dimetiel sulfoksied (DMSO) en die konsentrasie van elke fraksie uitgedruk as mg cm^{-3} of $\mu\text{g cm}^{-3}$ (sien 3.4).

Met behulp van dunlaag chromatografie (TLC; sien 3.7) is die suksesvolle skeiding van vloeistof-vloeistof chromatografiese fraksionering getoets en by wyse van 'n TLC-profiel gedemonstreer.

Alle fraksies is getoets vir hulle anti-mikrobiëse aktiwiteite (sien 3.9). Net die bioaktiewe fraksies is verder gesuiwer met behulp van kolomchromatografie (sien 3.6) en preparatiewe dunlaag chromatografie (sien 3.8).

3.6 Kolomchromatografie

Net die bioaktiewe fraksies wat deur vloeistof-vloeistof chromatografie bekom is, is verder gesuiwer met behulp van kolomchromatografie. Silikagel 60 of Sephadex LH 20 is as stasionêre fases gebruik en voorberei deur 'n pasta te verkry met die verskillende mobiele fases wat gebruik is (sien hoofstukke 4 en 5). Die mobiele fases is vooraf met die stasionêre fase gemeng en toegelaat om ten minste 4 ure lank te staan voordat dit gebruik is. Die pastas wat op hierdie wyse bekom is, is na 'n glaskolom (die grootte word in elke afsonderlik hoofstuk gespesifiseer) oorgedra en die stasionêre fase toegelaat om goed te kompakteer en te stabiliseer. Daar is van 'n oop kolom sisteem gebruik gemaak en ekstrakte is met behulp van 'n pipet versigtig op die oppervlakte van die stasionêre fases geplaas. Ekstrak volumes wat kolomchromatografies geskei is word in elke hoofstuk gespesifiseer.

Die vloeitempo van die eluaat is deur gravitasie bepaal, maar die volume fraksies wat verlang is, is gereguleer deur 'n Gilson (model FC-203 B; USA) fraksiëkollekteerder. Rekord is gehou van die vloeitempo per minuut sowel as die totale volume mobiele fase wat gebruik is. Verskillende volumes fraksies, wat gewissel het van $0,5$ tot 5 cm^{-3} , is versamel.

3.7 KWALITATIEWE DUNLAAG CHROMATOGRAFIE (K-TLC)

Aluminium plate, bedek met fluoësserende Silika 60 (F 150/LS 254; 0.1mm), is volgens verlangde afmetings gesny en gebruik vir K-TLC skeiding van fraksies wat deur middel van vloeistof-vloeistof fraksionering sowel as kolomchromatografie verkry is. In die geval van kolomchromatografie is slegs elke derde fraksie na 'n TLC-plaat met behulp van 'n kapillêre buis oorgedra en as klein kolle ($\pm 10\mu\text{g}$) op die basislyn aangebring.

Verskillende mobiele fases is gebruik afhangende van die polariteit van die oplosmiddels wat in voorafskedings gebruik is. Die K-TLC plate is daarna in 'n vooraf gekondisioneerde ontwikkelingstenk geplaas en ontwikkel.

Nadat die fraksies toegelaat is om te skei op die TLC-plate, is die frontlyn gemerk en die plate in 'n oond by 70°C gedroog. Vervolgens is die plaat met 5% (v/v) metanoliese H_2SO_4 benat en ontwikkel in 'n oond by 70°C .

Hierdie behandeling is as standaard kleuringsmetode gebruik ten einde vinnig vir die teenwoordigheid van koolstofbevattende komponente in 'n spesifieke fraksie te toets.

Bruin kolle wat ontwikkel het vanweë die reaksie met die swaelsuur het 'n profiel gelaat wat, tesame met berekende RF-waardes, gebruik is om die fraksies van mekaar te onderskei. In die geval van kolomchromatografie fraksies, is daardie fraksies met ooreenstemmende TLC-profiel gekombineer en getoets vir die teenwoordigheid van anti-bakteriese aktiwiteite (sien 3.12). In sekere gevalle is van die voorgeskrewe kleurreagense (Wagner en Bladt, 1996) gebruik gemaak om K-TLC plate te ontwikkel ten einde op grond van die kleurreaksies of met behulp van UV-lig (254 en 365 nm) spesifieke groepe komponente te identifiseer. Breedvoerige uiteensetting van die prosedures wat gevolg is word in afsonderlike hoofstukke beskryf (sien hoofstuk 5).

3.8 PREPARATIEWE DUNLAAG CHROMATOGRAFIE (P-TLC)

Dieselfde prosedures as vir K-TLC is gevolg (sien 3.7) behalwe dat 20 x 20 cm glasplate, wat met 1 mm dik Silika 60 + fluoresserende indikator bedek was, gebruik is en dat semi-gesuiwerde fraksies in 'n band op die basislyn aangebring is. In alle gevalle is 60 mg droë materiaal op die plate gelaai behalwe waar swak skeidings gevind is en die hoeveelheid verminder is na 50 mg.

Nadat plate ontwikkel is, is die posisies van komponente op die plaat met behulp van UV-lig (254 of 365 nm) geïdentifiseer, afsonderlik van die plate afgekrap en na skoon eppendorfbuisies oorgedra. Komponente met RF-waardes groter as 0,5 is met behulp van etanol en die met RF-waardes kleiner as 0,5 met behulp van metanol van die silika afgewas.

Na sentrifugering vir 5 minute teen 12 000 r.p.m. is die supernatant na skoon eppendorfbuisies oorgedra en vir bioaktiwiteit getoets (sien 3.9). Slegs daardie komponente wat positiewe reaksies teen bakterieë of swamme getoon het, is verder gesuiwer (sien hoofstuk 5).

3.9 ALGEMENE STAPPE TYDENS 'N BIOTOETS

3.9.1 GIETING VAN AGAR

Die agarpoëier is gemeng met gedistilleerde water teen konsentrasies soos voorgeskryf deur die leweransiers. Die mengsel is geoutoklaveer vir 15 minute by 120 °C en toegelaat om af te koel tot omtrent 45 °C.

Na opening van die bottel, wat die geoutoklaveerde agar bevat het, is die nek van die bottel steriel gehou deur dit oor 'n oop vlam te beweeg. 'n Steriele omgewing is gehandhaaf deur deurgaans in 'n laminêre vloekabinet, wat vooraf met 80 % (v/v) etanol gesteriliseer is, te werk. Om kontaminasie te verhoed, is die gesteriliseerde agar vinnig in die steriele omgewing na petri-bakkies oorgedra teen die verlangde volumes. In die geval waar agar nie die hele bodem bedek het nie, is die petri-bakkie geroteer in 'n sirkelbeweging terwyl dit op die tafel lê.

Nadat die bodem op hierdie wyse bedek is, is die plaat nie weer beweeg nie en die agar toegelaat om te stol. Volledige stolling is bewerkstellig deur die agarplate oornag by kamertemperatuur in die laminêre vloeikabinet te hou waarna dit onderstebo in plastieksakkies by 4°C gebêre is, om kondensasie op die agar te verhoed, tot latere gebruik.

Een van die plate is telkens geïnkubeer by 35°C vir 24 uur ten einde enige kontaminasie wat tydens die proses mag voorgekom het te identifiseer. In gevalle waar kontaminasie wel voorgekom het, is die proses herhaal (Klement *et al.*, 1990).

3.9.2 DIE KWANTITATIEWE BEPALING VAN BAKTERIE GETALLE IN SOPKULTURE

Verskeie metodes bestaan om die aantal bakterieë in vloeistowwe te bepaal. Sommige metodes bepaal die aantal dooie en lewende selle en ander slegs die lewende selle (sien 3.9.3). Die plaattellingsmetode is die standaard metode wat deur die Amerikaanse Public Health Association gebruik word (Beisher, 1974; Penn, 1991). Aseptiese tegnieke was tydens die opmaak van verdunningsreekse, asook pipetering tussen steriele petribakkies, gebruik.

'n Verdunningsreeks van 1:10, 1:100, 1:1000 en 1:10 000 is van die oorspronklike sokkultuur voorberei deur aanvanklik 1 cm³ van die sokkultuur met 9 cm³ steriele water te verdun. Telkens is 1 cm³ van die verdunning op dieselfde wyse verder verdun totdat die reeks voltooi was.

Een cm^3 van elke verdunning is op agar geplaas en eweredig met 'n gesteriliseerde glasstaaf, waarvan die punt effens gebuig is, versprei. Kulture is vooraf goed geskud om die bakterieë meer eweredig te versprei (Penn, 1991). Elke verdunning was in duplikaat voorberei. Plate is vir 24 uur by 35°C geïnkubeer en tellings met behulp van 'n Quebec kolonieteller gedoen (3.9.3). Die aantal kolonies per 1 cm^3 van die bepaalde verdunning is bepaal.

3.9.3 QUEBEC KOLONIETELLER ASOOK DIE KWEKING VAN NUWE KULTURE

Nuwe kulture is gekweek deur $100 \mu\text{l}$ van die oorspronklike sokkultuur op steriele agar in 'n petri-bakkie oor te dra, oor die plaat te sprei met 'n gesteriliseerde glasstaaf en te inkubeer vir 24 uur by 35°C . Een van die kolonies is na voedingsmedium ("nutrient broth") oorgedra en geïnkubeer vir 24 uur by 35°C . Van die nuwe kultuur is $100 \mu\text{l}$ op agar geplaas en weer geïnkubeer.

'n Kolonietelling is daarna met behulp van 'n Quebec kolonieteller gedoen (Beisher, 1974). Die kolonies het gewissel tussen 30 en 300 kolonies per plaat wat as standaard vir alle verdere biotoetse aanvaar is. Elke plaat is twee maal getel en die gemiddeld asook standaard afwyking van twee plate vir elke verdunning bereken. Die standaard afwyking tussen twee plate was deurgaans minder as tien kolonies wat ook as minimum standaard gestel is.

Om die gemiddelde aantal bakterieë per cm^3 sokkultuur te bereken is die gemiddelde bakterie telling met die verdunning van elke bakkie vermenigvuldig.

Byvoorbeeld

155 x 1: 100 verdunning = 15 500 bakterieë per cm^3 sokkultuur. In geval waar slegs 0,1 cm^3 (100 μl) sokkultuur per plaat gegiet is, is die aantal bakterieë in hierdie volume bereken deur die oorspronklike telling met 10 te deel.

3.9.4 METODES VAN GRADERING ("SCREENING") VIR NATUURLIKE KOMPONENTE MET ANTIMIKROBIESE AKTIWITEITE.

Omdat sekere faktore (kultuurmedium samestelling, mikroorganismes getoets, ekstraksie metodes, pH en oplosbaarheid van ekstrak in kultuurmedium) die verkreeë resultate beïnvloed, was dit moeilik om 'n metode te standaardiseer (Villar *et al.*, 1986a). Daar is egter op die bekende plaat diffusie metode besluit.

Hierdie tegniek vereis nie die homogene dispersie van water nie en 'n papiertjie, gaatjie of silinder is as die reservoir gebruik waarin die ekstrak gelaai is. Die reservoir het die monster wat getoets is bevat en dit is in kontak gebring met die geïnokuleerde medium. Na inkubering by 35°C is die skoon inhibisie sone om die reservoir (deursnee) gemeet (Rios *et al.*, 1988). Die metode was oorspronklik toegepas om die totale aktiwiteit van alle antibiotiese bestanddele in die ru-ekstrak te meet.

Om die opsporingslimiet te verlaag, is die geïnkuleerde sisteem by lae temperature gehou voor inkubering aangesien die diffusie van die ekstrakteur die kultuurmedium hierdeur bevoordeel word en die inhibisie deursnee ook op hierdie wyse geoptimaliseer word (Rios *et al.*, 1988).

“Plate count agar” (PCA) is in die algemene bakterie toetse gebruik met *Moraxella catharalis* (voortaan sal verwys word na as *M. catharalis*) as toetsorganisme. Die agar medium is geïnkuleer met die sokkultuur van die toetsorganisme (100 µl per plaat) en gaatjies is in die agar gemaak met behulp van 'n steriele kurkboor. Die ooreenstemmende monster, waarvan die aktiwiteit bepaal moes word, is in die gaatjies geplaas teen 'n standaard konsentrasie van 50 mg cm⁻³ of 1 mg 20µl⁻¹.

Die plate is by 4⁰C vir 1-2 ure gehou om diffusie te optimaliseer en daarna geïnkubeer by 35⁰C vir 18-24 uur (Villar *et al.*, 1986 a).

3.9.5 ANTIFUNGALE TOETSE

Die fungus is op CMA (“corn meal”) en PDA (“potato dextrose”) agar gegroei vir ± 'n week. Na 'n week is die agar in stukkies gesny en elke stukkie op MEA (“malt extract”) agar geplaas vir verdere groei. Steriele filtreerpapertjies is in verskillende fraksies gedoop, die oortollige ekstrakte toegelaat om af te drup en op die medium geplaas. Swamkulture is by 27⁰C vir een week geïnkubeer.

'n Ander metode wat gevolg is om ekstrakte vir antifungale aktiwiteite te toets was om die ekstrak, waarvan die konsentrasie bekend was, in die agar op te los by 45⁰C voordat stolling plaasgevind het en daarna die agar in die petribakkies te giet. 'n Stukkie van die fungus kolonie is op die agar geplaas en die groeiinhibisie gemeet (Villar *et al.*, 1986 a).

HOOFSTUK 4

Kwalitatiewe vooraf toetsing van die anti-mikrobiëse potensiaal van 'n *Carpobrotus edulis* L. ru-ekstrak asook semi-gesuiwerde fraksies daarvan

INLEIDING

Daar is 'n groeiende belangstelling in natuurlike en tradisionele geneesmiddels as 'n bron vir nuwe kommersiële produkte. Volgens Van Wyk (1997) is die toetsing van die potensiaal wat in plante opgesluit is, iets vir die toekoms en nie iets van die verlede nie. Voeg hierby die feit dat daar huidig, selfs met die beskikbaarheid van moderne geneesmiddels, siektes bestaan wat ongeneeslik is, dan word dit duidelik dat verskerpte pogings aangewend behoort te word om aktiewe bestanddele uit natuurlike bronne te isoleer en hulle aksiemeganismes te ontsyfer (Smith *et al.*, 1998). As egter in aanmerking geneem word dat een groep molekules van letterlik duisende ander in 'n plant ru-ekstrak geskei moet word, dan lyk hierdie na 'n formidabele taak. Met reeds ontwikkelde tegnieke is egter al groot suksesse behaal.

Alle skeidingsprosedures behels aanvanklik die fraksionering van 'n ru-ekstrak in afsonderlike semi-gesuiwerde fraksies deur middel van vloeistof-vloeistof- asook kolomchromatografiese tegnieke (Cannell, 1998). Afhangende van die doel met die fraksioneringsproses is 'n metode nodig om tred te hou met die posisionering van 'n spesifieke aktiewe bestanddeel in die geskeide fraksies tydens die ekstraksieproses en hierna word verwys as 'n biotoets (Cannell, 1998).

Vir die doel van hierdie studie op *C. edulis* is die fraksionering van aktiewe bestanddele met anti-mikrobiëse eienskappe gevolg aan die hand van 'n anti-bakteriese biotoets.

Mense regoor die wêreld gebruik *C. edulis* as 'n medisinale plant weens die verskeie farmakologiese eienskappe wat dit besit (sien hoofstuk 2), en dit verskaf 'n rasionaal vir verdere studies (Fox en Young, 1982). Op grond van die beweerde medisinale waarde is die plant ru-ekstrak tydens hierdie studie onder andere getoets teen gram (+) en gram (-) bakterieë asook die gis *Saccharomyces cerevisiae* en ander swamme.

Plante vorm verdedigingsmeganismes teen siekteveroor sakende organismes deur onder andere fototoksiene te produseer wat, as dit geïsoleer en gesuiwer word, aanleiding kan gee tot spesifieke farmakologiese gebruike. Fototoksiene se toksiese aktiwiteite teen virusse, mikro-organismes, insekte of ander selle is afhanklik van, of word verhoog deur, lig van sekere golflengtes. Die aktiwiteite is meestal selektief en het aanleiding gegee tot die terapeutiese vooruitsig in die beheer van infektiewe siektes, peste en kanker. Die toksiese aktiwiteite van fototoksiene teen beide virusse en mikroorganismes word onder andere geassosieer met asetileen, furaniel of tiofeniel groepe in die struktuur van sekondêre metaboliete terwyl gram positiewe bakterieë meer sensitief is hiervoor as gram negatiewe bakterieë (Marchant en Cooper, 1987a).

Koumariene is redelik aktief teen giste en gram positiewe bakterieë, maar oor die algemeen is hulle minder effektief teen gram negatiewe bakterieë (Hudson en Towers, 1991).

Baie studies toon dat furanokoumariene, koumariene met 'n furaniel groep, toksies is teen 'n verskeidenheid van mikroorganismes in die teenwoordigheid van lang golflengte ultraviolet of sigbare lig.

Fowlkes (1985) rapporteer dat verskillende psoraleen tipes, ook bekend as fikusien of furokoumarien, toksies is teen gram positiewe en gram negatiewe bakterieë.

Abysekera *et al.* (1983) het egter aangetoon dat visnagien meer aktief is as kellien. Laasgenoemde is beter bekend as visammin wat uit die plant *Ammi visnaga* geëkstraheer is, en beide was fototoksies teen die gis *Saccharomyces cerevisiae*.

Sekere alkaloiëde het potente afhanklike toksisiteit in sigbare lig teen sekere bakterieë en giste getoon, insluitende die gis *S. cerevisiae*. Daarteenoor is die korresponderende aktiwiteite van ander nie afhanklik van sigbare lig nie en besit hulle swakker en meer selektiewe aktiwiteit (Hudson *et al.*, 1988b; Smith, 1972).

Die alkaloiëde, furanokinolien, ook bekend as leukolien, het 'n inhiberende invloed op gram (+) bakterieë en giste asook op filamentagtige swamme, byvoorbeeld *Fusarium*, *Mucor* en *Penicillium* spesies, in die teenwoordigheid van sigbare lig (Pfyffer *et al.*, 1982a). Dit is 'n aanduiding dat daar verskillende aksiemeganismes teen bakterieë en giste bestaan. Studies toon verder dat sekere antraseen derivate, naamlik suiwer hiperisien en pseudohiperisien, toksies is teen gram (+) bakterieë in sigbare lig (Nick *et al.*, 1995).

'n Hoë konsentrasie karotenoïede, wat effektiewe suurstof blussers ('*quencher*s') is, of die kenmerkende eienskappe van selwande, wat isolering van potensiële skadelike toksiene toelaat, is hoogs waarskynlik verantwoordelik vir die weerstand van die plant teen verskeie mikro-organismes (Daub, 1987).

Fotosensitiseerders, ook bekend as fototoksene, is redelik algemeen in 'n aantal blomplant families. Baie van die komponente het toksiese effekte op 'n verskeidenheid van organismes, alhoewel dit wil voorkom asof net 'n paar kenmerke relevant is tot hulle normale biologiese funksies. Die toksiese effekte van hierdie komponente teen 'n groot verskeidenheid organismes word toegeskryf aan die chemiese struktuur van die komponente, wat hulle toelaat om fotons in potensiël skadelike enkel suurstowwe en radikale om te skakel (Wilson en Goulding, 1986).

In hierdie hoofstuk is 'n ru-ekstrak en semi-gesuiwerde fraksies daarvan berei, met behulp van verskillende chromatografiese tegnieke, en die anti-bakteriese en anti-fungale eienskappe daarvan bepaal.

4.1 MATERIAAL EN METODES

4.1.1 MATERIAAL

Alle organiese oplosmiddels gebruik (sien 3.2.2), was van die suiwerste graad beskikbaar en verskaf deur Merck (Duitsland).

4.1.2 METODES

4.1.2.1 Voorbereiding van die ru-ekstrak en bepaling van die konsentrasie

Sien 3.3 en 3.4. 'n Konsentrasie van 50 mg cm^{-3} is gebruik vir biotoetse.

4.1.2.2 Fraksionering van die komponente uit 'n waterige ru-ekstrak met behulp van vloeistof-vloeistof chromatografie deur gebruik te maak van verskillende tegnieke

TEGNIK 1

Hierdie tegniek is aanvanklik op klein skaal toegepas ten einde te bepaal in watter fraksie die anti-fungale en anti-bakteriese aktiwiteit (sien 3.9.4) geleë was. Die ru-ekstrak is aanvanklik verkry deur die droë plantmateriaal met 95 % metanol te ekstraheer (sien 3.3) en die metanol deur vakuumdistillasie te verwyder. Die oorblywende waterige ru-ekstrak (sien 3.3) is as volg verder gefraksioneer met behulp van verskeie organiese oplosmiddels (sien 3.5):

Vyf cm^3 van die waterige ru-ekstrak is tien keer in 'n skeitregter gewas met elk van vier organiese oplosmiddels in die orde van toenemende polariteit (sien 3.5) en in 'n 1:1 (v/v) verhouding. Elke fraksie is vakuumgedistilleer tot droog by 40°C (sien 3.3).

Na bepaling van die droë massas (sien 3.4) is elke fraksie afsonderlik opgelos in 10 % (v/v) DMSO. Alle fraksies se bioaktiwiteit (sien 3.9.4 en 3.9.5) is bepaal en slegs die aktiewe fraksies is verder met behulp van kolomchromatografie gesuiwer (sien 3.6) ten einde 'n voorlopige suiweringsprotokol te vestig.

TEGNIK 2

Hierdie tegniek is gebruik om grootskaalse ekstraksies uit te voer sodat genoeg van die gefraksioneerde bioaktiewe fraksies versamel kon word vir latere grootskaalse suiwing.

Vyfhonderd cm³ van die waterige ru-ekstrak (sien 3.3) is vyf maal in 'n skeitregter met suiwer hekasaan in 'n 1:1 (v/v) verhouding gewas deur deeglik te skud en telkens die hekasaan tussen wasse te vervang.

Dieselfde prosedure is vervolgens met diëtleter gevolg behalwe dat die vorige hekasaan-gewasde ru-ekstrak tien maal gewas is aangesien die meeste van die aktiewe bestanddele deur hierdie oplosmiddel verwyder was.

Met die organiese oplosmiddels chloroform en etielasetaat is dieselfde prosedure gevolg. Elke fraksie is afsonderlik vakuumedistilleer tot droog by 40⁰C (sien 3.4). Slegs die hekasaan, diëtleter en chloroform fraksies was aktief en is verder gesuiwer met behulp van preparatiewe dunlaag chromatografie (P-TLC; sien 3.8).

TEGNIËK 3

Aangesien die teenwoordigheid van tanniene tot die presipitering van ander moontlike aktiewe bestandele uit die waterige ru-ekstrak, asook die verlies aan aktiwiteit, aanleiding kan gee (Hagerman, 1998), is 'n poging aangewend om aktiewe bestanddele direk uit die droë plantmateriaal met behulp van die vier organiese oplosmiddels (sien tegniek 2) te ekstraheer.

Tien gram droë plantmateriaal is vyf maal gewas met elk van die genoemde organiese oplosmiddels in volgorde van stygende polariteit en in 'n 1:1 (m/v) verhouding. Elke fraksie is afsonderlik vakuumedistilleer tot droog by 40⁰C (sien 3.3). Die bioaktiwiteit van elke fraksie is afsonderlik bepaal (sien 3.9.4) en slegs die aktiewe fraksies is verder gesuiwer.

4.1.2.3 Kolomchromatografiese fraksionering van die bioaktiewe fraksies verkry met behulp van tegniek 1

Slegs die bioaktiewe diëtleter fraksie wat met behulp van tegniek 1 (sien 4.2.3) bekom is, is verder kolomchromatografies gefraksioneer ten einde 'n voorlopige suiweringsprotokol vir verdere studies te vestig. Silikagel 60 is as stasionêre fase gebruik en is voorberei deur 300 cm³ van die mobiele fase (Diëtleter : MeOH : H₂O : 80:20:10) by 165 g van die silikapoeier te voeg. Die prosedure soos uiteengesit in hoofstuk 3 (sien 3.6) is verder gevolg.

Die kolomdimensies was as volg:

Bedvolume ($\pi r^2 \times$ kolomlengte): 166 cm^3

Eluasie volume (V_e): $3\,000 \text{ cm}^3$

Volume van ekstrak gelaai : 5 cm^3

Vloeiempo: $4.5 \text{ cm}^3 \text{ min}^{-1}$

Fraksie volume: 5 cm^3

Aantal fraksies versamel: 300

Die bioaktiewe heksaan, diëtieleter en chloroform fraksies wat met behulp van grootskaalse fraksionering (sien 4.2.3; tegniek 2) verkry is, is ook verder gefraksioneer met behulp van kolomchromatografie.

Aangesien 'n groot hoeveelheid van die aktiewe komponente egter op die kolom agtergebly het is hierdie fraksies verder met behulp van preparatiewe dunlaag chromatografie gesuiwer (P-TLC; sien 3.8).

4.1.2.4 Kwalitatiewe dunlaag chromatografie (K-TLC)

Fluoreserende silika plate is gebruik vir die K-TLC skeiding (sien 3.7) van komponente in fraksies wat deur middel van vloeistof-vloeistof sowel as kolomchromatografiese fraksionering bekom is. Die uitsluitlike doel hiermee was om, na kleuring met metanoliese H_2SO_4 (5 %; v/v), 'n profiel van komponente te bekom ten einde die suksesvolheid van vooraf fraksioneringstappe te monitor. Nadat die bioaktiewe diëtieleter fraksie (tegniek 1) verder met behulp van kolomchromatografie gefraksioneer is, is elke derde fraksie na 'n TLC-plaat met behulp van 'n kapillêre buis oorgedra en as klein kolle ($\pm 10 \mu\text{g}$) op die basislyn aangebring.

Diëtleter : MeOH : H₂O (80:20:10) is as die mobiele fase gebruik om die plaat te ontwikkel. Nadat die verskillende komponente toegelaat is om op die TLC-plate te skei is die frontlyn gemerk en die plaat gekleur met 5 % (v/v) metanoliese H₂SO₄ (sien 3.7).

Die kolomfraksies met ooreenstemmende komponente of TLC-profiel is gekombineer en getoets vir antibakteriese aktiwiteit (sien 3.9.4). Slegs die eerste 54 kolomfraksies was bioaktief, is derhalwe gekombineer in een fraksie en slegs hiermee is verder gewerk. Die komponente in laasgenoemde gekombineerde aktiewe fraksie is vervolgens vir 'n tweede keer kolomchromatografies geskei deur van dieselfde stasionêre en mobiele fases gebruik te maak as tydens die vorige kolom. Tagtig 1 cm³ fraksies is met behulp van 'n fraksieversamelaar versamel.

Die komponente in elke derde fraksie hiervan is verder met behulp van TLC geskei na aansuring met soutsuur (1:100; v/v). Diëtleter : MeOH : H₂O (5:90:10) is as mobiele fase gebruik. Na kombinerings van die fraksies met ooreenstemmende TLC-profiel, is ses nie-polêre kolomfraksies geïdentifiseer en getoets vir antibakteriese aktiwiteit (sien 3.9.4). Drie bioaktiewe fraksies is geïdentifiseer en die komponente in elk verder met behulp van preparatiewe TLC (P-TLC-skeiding; sien 3.8) gefraksioneer.

4.1.2.5 Preparatiewe dunlaag chromatografie (P-TLC)

Vir beide die bioaktiewe hekasaan en diëtieleter fraksies is die mobiele fase Chloroform : MeOH : H₂O (80:20:10) vir die skeiding van komponente gebruik. Die posisies van alle komponente is met behulp van UV-lig (254 of 365 nm) geïdentifiseer, afsonderlik van die plate afgekrap en na skoon eppendorfbuisies oorgedra (sien 3.8). Komponente is met behulp van metanol en etanol van die silika afgewas (sien 3.8) en gesentrifugeer.

Elke afsonderlike komponent is vir bioaktiwiteit getoets (sien 3.9.4). Slegs daardie komponente wat positiewe reaksies teen bakterieë of swamme getoon het is verder gesuiwer (sien hoofstuk 5). Aangesien beide die hekasaan en diëtieleter fraksies dieselfde TLC-profiel getoon het, is die komponente van die twee fraksies na dunlaagskeiding gekombineer. Altesaam 19 komponente is uit hierdie algehele fraksie geïsoleer en die bioaktiwiteit van elk bepaal (sien 3.9.4).

4.1.2.6 Antimikrobiële biotoetse

4.1.2.6.1 Antibakteriese toetse

Die ses bioaktiewe semi-gesuiwerde nie-polêre kolomfraksies verkry met behulp van tegniek 1, asook die gekombineerde hekasaan/diëtieleter fraksie, is vir antibakteriese aktiwiteit getoets deur gebruik te maak van die toetsorganismes *M. catharalis* (gram -) en *Sarcinea lutea* (gram -; voortaan verwys na as *S. lutea*) (sien 3.9.4).

4.1.2.6.2 Antifungale toetse

Die antifungale aktiwiteit van slegs bogenoemde ses semi-gesuiwerde nie-polêre kolomfraksies is bepaal. Drie swamme naamlik, 'n *Phoma* spp., *Botrytis cinerea* en *Fusarium oxysporum*, sowel as die bakkersgis, *Saccharomyces cerevisiae*, is gebruik.

4.1.3 Opsomming van die volgorde waarin tegnieke toegepas is om stapsgewys kwalitatiewe data oor die antimikrobiële potensiaal van 'n waterige *Carpobrotus edulis* ru-ekstrak te bekom

Ten einde 'n sinvolle geheel van die metodologie wat gevolg is te verskaf, word die volgende opsomming aangebied:

- 'n Ru-ekstrak is voorberei deur ekstrahering van droë plantmateriaal met 95 % metanol volgens tegniek 1.
- Die waterige ru-ekstrak is getoets teen *M. catharalis* om seker te maak dat dit aktief is asook om moontlike aktiwiteit in die wasneerslag aan te dui (tabel 1).
- Vloeistof-vloeistof chromatografie is toegepas om die hoofkomponente op grond van polariteit te skei en vas te stel in watter fraksie die aktiwiteit geleë was.
- Kwalitatiewe TLC-skeiding van bogenoemde aktiewe fraksies is uitgevoer om die komponente in elke fraksie te skei en met behulp van 5 % metanoliese H₂SO₄ (v/v) kleuring 'n TLC-profiel (sien plaat 1) te bekom wat moontlike aktiewe komponente se posisies op die TLC-plaat sigbaar maak.

- Die fraksies is ingedamp by verskillende temperature om die effek van temperatuur op die antibakteriese aktiwiteit van afsonderlike fraksies te bepaal (tabel 2).
- Die aktiewe diëtieleterfraksie (tegniek 1) is kolomchromatografies geskei ten einde 'n voorlopige suiweringsprotokol te vestig.
- Elke derde kolomfraksie is met behulp van kwalitatiewe TLC geskei en die met ooreenstemmende profiele gekombineer.
- Ses gekombineerde kolomchromatografie fraksies is geïdentifiseer en die aktiwiteit bepaal teen onder andere *M. catharalis* (gram-) en *S. lutea* (gram +) en verskillende swamme (plate 2, 3, 4, tabel 5).
- In die lig van die feit dat, buiten die diëtieleter fraksie, die hekseen en chloroform fraksies ook aktief was (sien tabel 2), is die ru-ekstrak voorts deur middel van twee verskillende tegnieke op grootskaal gefraksioneer.
- Ten einde die aktiewe komponente uit die bioaktiewe fraksies op grootskaal te fraksioneer is die ru-ekstrak voorberei deur ekstrahering met metanol volgens tegniek 2.
- Vloeistof-vloeistof chromatografie is uitgevoer om die hoofkomponente op grond van polariteit te skei en vas te stel waar die aktiwiteit geleë is (sien tabel 3).
- Kwalitatiewe TLC-skeiding van bogenoemde is (plaat 5) vergelyk met die TLC-profiel van tegniek 1. In beide gevalle het komponente meer prominent in die aktiewe hekseen- en diëtieleter-, en in 'n mindere mate in die chloroformfraksie, voorgekom.

- Die fraksies is ingedamp by verskillende temperature om die effek van temperatuur op die antibakteriese aktiwiteit van afsonderlike fraksies te bepaal (sien tabel 3).
- Die aktiewe heksaan, diëtieleter en waterige ru-ekstrak fraksies is afsonderlik teen elf bekende mensbakterieë getoets (sien tabel 6).
- Die aktiewe heksaan en diëtieleter fraksies, met ooreenstemmende TLC-profiel (tegniek 2; plaat 5), is gekombineer en die aktiewe chloroform fraksie met baie lae aktiwiteit en ooreenstemmende komponente is geïgnoreer.
- Negentien komponente is uit hierdie gekombineerde fraksie geïsoleer met behulp van preparatiewe dunlaag chromatografie (plaat 6) en die bioaktiwiteit van elk is bepaal (tabel 7).
- 'n Verlies aan aktiwiteit het aanleiding gegee tot tegniek 3 waar komponente direk uit droë plantmateriaal geïsoleer is m.b.v verskillende organiese oplosmiddels.
- Kwalitatiewe TLC-skeiding van bogenoemde fraksies is vervolgens uitgevoer en plate met 5 % (v/v) H₂SO₄ ontwikkel ten einde die TLC-profiel met die van vorige tegnieke te vergelyk (sien plaat 7)
- Die fraksies is ook ingedamp by verskillende temperature om die effek van temperatuur op die antibakteriese aktiwiteit van die afsonderlike fraksies te bepaal (sien tabel 4).

4.2 RESULTATE

4.2.1 Die antibakteriese aktiwiteit van 'n waterige ru-ekstrak van *Carpobrotus edulis* asook 'n wasneerslag wat uitgepresipeer het

Resultate in tabel 1 illustreer dat die waterige ru-ekstrak van *C. edulis* wel antibakteriese aktiwiteit teen die gram (-) bakterie *M. catharalis*, wat as inisiële toetsorganisme gebruik is, getoon het.

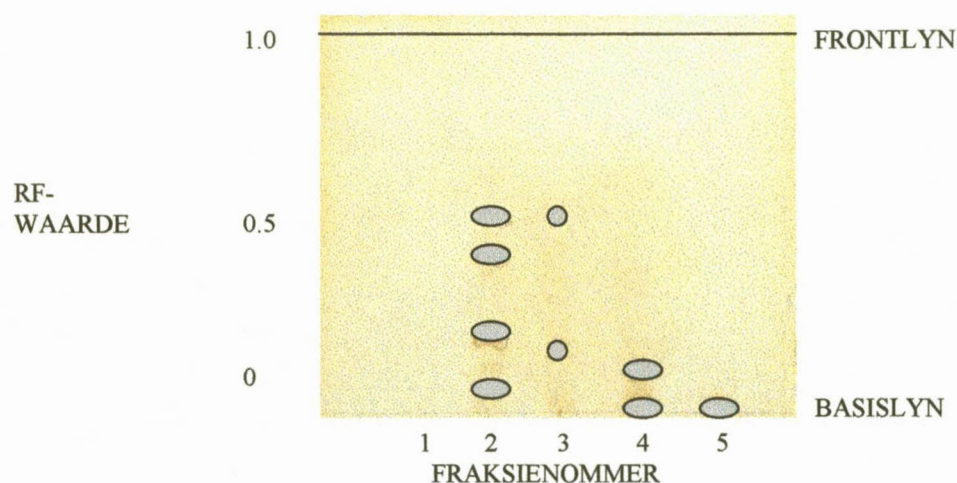
Op grond hiervan is die ru-ekstrak verder gefraksioneer (sien 4.2.2) ten einde die aktiewe bestanddeel of bestanddele verantwoordelik vir hierdie antibakteriese eienskap te isoleer. 'n Was residu wat tydens die voorbereiding van die ru-ekstrak as neerslag uitgesak het is ook vir antibakteriese aktiwiteit getoets maar het geen aktiwiteit getoon nie.

TABEL1: Antibakteriese aktiwiteit van die waterige ru-ekstrak van *C. edulis* asook 'n was residu teen die gram (-) bakterie *M. catharalis* na ekstrahering met 95 % metanol

Fraksie	Konsentrasie mg.cm ⁻³	Inhibisiesone deursnee mm
Waterige ru-ekstrak	562	25
Was residu	561,5	-

Die ru-ekstrak is vervolgens verder deur middel van vloeistof-vloeistof chromatografie gefraksioneer.

4.2.2 TLC-profiel van komponente in die ru-ekstrak wat selektief met vloeistof-vloeistof chromatografie gefraksioneer is.



PLAAT 1: Kwalitatiewe TLC-profiel van komponente in die ru-ekstrak van *C. edulis* wat met behulp van vloeistof-vloeistof chromatografie gefraksioneer is deur gebruik te maak van organiese oplosmiddels in volgorde van hulle stygende polariteit (1 = Heksaan; 2 = Diëtieleter; 3 = Chloroform; 4 = Etielasetaat; 5 = Water). Mobiele fase: Chloroform: Metanol: Water (80:20:10). Stasionêre fase: Silikagel 60. Die plaat is ontwikkel met 5 % metanoliese H_2SO_4

Die TLC-profiel (plaat 1) illustreer dat heksaan ($DC=1.9$) tydens vloeistof-vloeistof fraksionering geen komponente uit die ru-ekstrak verwyder het nie of dat die komponente in 'n onopspoorbare lae konsentrasie teenwoordig was. Aangesien antibakteriese aktiwiteit wel in hierdie fraksie opgespoor is (sien tabel 2) blyk dit of laasgenoemde die geval was (sien tegniek 2).

Die meeste van die komponente het in diëtieleter ($DC = 4.3$) opgelos terwyl chloroform ($DC = 4.8$), met 'n diëlektriese konstantwaarde baie naby aan dié van diëtieleter, baie min van dieselfde komponente verwyder het.

Etielasetaat (DC = 6.0) het min addisionele komponente uit die ru-ekstrak verwyder wat illustreer dat die meeste van die komponente van lae polariteit was en reeds deur diëtleter uit die mengsel verwyder was. Al vier hierdie fraksies is vir antibakteriese aktiwiteit teen die toetsorganisme *M. catharalis* getoets. Terselfdertyd is die optimum temperatuur, waarby die organisme die beste groei getoon het, bepaal asook die effek van temperatuur op die antibakteriese aktiwiteit (tabel 2).

Resultate in tabel 2, 3 en 4 illustreer die antibakteriese aktiwiteit in die verskillende fraksies soos respekiewelik met tegnieke 1, 2 en 3 bekom. In alle gevalle het die diëtleter fraksie die grootste inhibisiesone opgelewer, terwyl chloroform met ooreenstemmende komponente as die van diëtleter biostatiese aktiwiteit getoon het (sien tegniek 1). Dit was egter duidelik dat die komponente in alle fraksies temperatuur sensitief was. Bokant 35°C het die bioaktiwiteit in alle gevalle afgeneem. Aangesien die toetsorganisme by 35°C die beste groei getoon het is besluit om op 35°C te standaardiseer.

TABEL 2: Antibakteriese aktiwiteit van verskillende fraksies van 'n *C. edulis* ru-ekstrak wat met behulp van tegniek 1 bekom is en die effek van temperatuur op die aktiwiteit van afsonderlike fraksies.

Temperatuur °C	Konsentrasie mg cm ⁻³	Inhibisiesone deursnee mm			
		Heksaan	Diëtleter	Chloroform	Etielasetaat
35	36	10	13	8	-
40	36	8	12	8	-
70	36	-	-	-	-
95	36	-	-	-	-

TABEL 3: Antibakteriese aktiwiteit van verskillende vloeistof-vloeistof chromatografiese fraksies van 'n *C. edulis* ru-ekstrak wat met behulp van tegniek 2 bekom is en die effek van temperatuur op die aktiwiteit van afsonderlike fraksies.

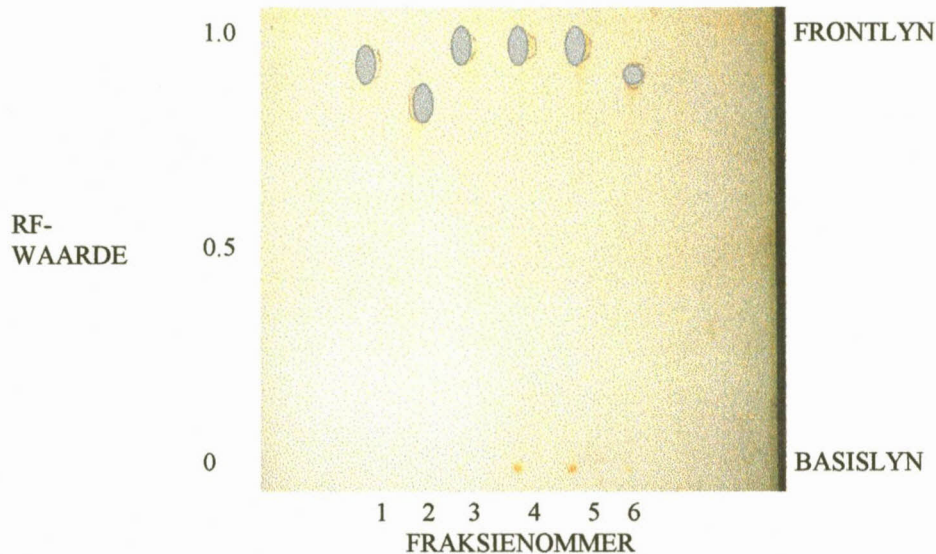
Temperatuur °C	Konsentrasie mg cm ⁻³	Inhibisiesone deursnee mm			
		Heksaan	Diëtieleter	Chloroform	Etielasetaat
35	36	15	16	8	-
40	36	8	10	6	-
70	36	-	-	-	-
95	36	-	-	-	-

TABEL 4: Antibakteriese aktiwiteit van verskillende vloeistof-vloeistof chromatografiese fraksies van 'n *C. edulis* ru-poeiermateriaal ekstrak wat met behulp van tegniek 3 bekom is en die effek van temperatuur op die aktiwiteit van afsonderlike fraksies.

Temperatuur °C	Konsentrasie mg cm ⁻³	Inhibisiesone deursnee mm			
		Heksaan	Diëtieleter	Chloroform	Etielasetaat
35	36	11	13	10	9
40	36	10	11	9	8
70	36	-	-	-	-
95	36	-	-	-	-

Slegs die diëtieleter fraksie (tegniek 1) is verder kolomchromatografies gefraksioneer ten einde 'n voorlopige suiweringsprotokol te vestig.

4.2.3 TLC-profiel van komponente in ses gekombineerde semi-gesuiwerde kolomchromatografiese fraksies van 'n *Carpobrotus edulis* diëtleter ekstrak wat vooraf met behulp van vloeistof-vloeistof chromatografie gefraksioneer is.



Plaat 2: Kwalitatiewe TLC-profiel van komponente in 'n di-ëtleter fraksie van *C. edulis* wat vooraf met behulp van vloeistof-vloeistof fraksionering van die ru-ekstrak bekom is en verder kolomchromatografies geskei is. (1-6 = gekombineerde kolomfraksies). Mobiele fase: Diëtleter : MeOH : H₂O (5:90:10) + soutsuur. Stasionêre fase: Silikagel 60. Die plaat is ontwikkel met 5 % metanoliese H₂SO₄

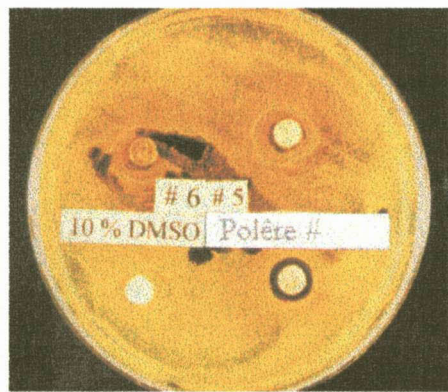
Die resultate in plaat 2 dui op die teenwoordigheid van 6 komponente in 'n diëtleter fraksie wat vooraf met behulp van vloeistof-vloeistof chromatografie bekom is en verder met behulp van kolomchromatografie geskei is. Weens ooreenstemmende RF-waardes blyk dit dat die komponente in fraksies 3,4 en 5 dieselfde is.

Die antibakteriese aktiwiteite van hierdie ses fraksies teen die gram-negatiewe bakterie *M. catharalis* het getoon dat slegs fraksies 3,4,5 en 6 aktief was (sien tabel 5). In die lig van die feit dat dieselfde komponente waarskynlik oor fraksies 3,4 en 5 versprei is dui daarop dat twee moontlike verskillende aktiewe komponente met antibakteriese aktiwiteite in 'n diëtleter fraksie van *C. edulis* voorgekom het.

4.2.4 Die antibakteriese aktiwiteit van die ses semi-gesuiwerde gekombineerde fraksies wat kolomchromatografies uit 'n diëtleter ekstrak bekom is



Plaat 3A

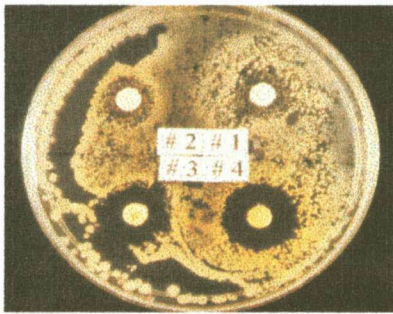


Plaat 3B

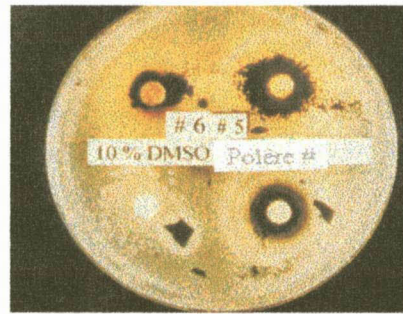
Plaat 3: Die antibakteriese aktiwiteit van fraksies 1 tot 4 (3A) asook fraksies 5 en 6, 10 % DMSO en die oorblywende polêre fraksie (3B), nadat 'n diëtleter ekstrak verder kolomchromatografies geskei is, teen die gram-positiewe bakterie *S. lutea*.

Die inhibisiesones in plate 3 A en B illustreer dat slegs die polêre fraksie, wat agtergebly het nadat die meeste minder polêre komponente vooraf met behulp van vloeistof-vloeistof fraksionering uit 'n ru-ekstrak van *C. edulis* verwyder is, antibakteriese aktiwiteit teen die gram positiewe bakterie *S. lutea* getoon het.

Nie een van die semi-gesuiwerde minder polêre komponente wat kolomchromatografies bekom is of die 10 % DMSO kontrole het antibakteriese aktiwiteit getoon nie. Inhibisiesone deursnee word in tabel 5 aangedui.



Plaat 4A



Plaat 4B

Plaat 4: Die antibakteriese aktiwiteit van fraksies 1 tot 4 (4A) asook fraksies 5 en 6, 10 % DMSO en die oorblywende polêre fraksie (4B), nadat 'n diëtleter ekstrak verder kolomchromatografies geskei is, teen die gram negatiewe bakterie *M. catharalis*.

Die inhibisiesones in plate 4 A en B illustreer dat die semi-gesuiwerde minder polêre komponente in fraksies 3,4 en 5 en in 'n mindere mate fraksie 6, almal antibakteriese aktiwiteit teen die gram negatiewe bakterie *M. catharalis* getoon het.

Geen hergroei was vir hierdie fraksies in hierdie inhibisiesones waargeneem nie wat die anti-biotiese aktiwiteit bevestig. Die oorblywende polêre fraksie (waterige residu) het egter ook 'n relatiewe sterk inhibisiesone opgelewer. Inhibisiesone deursnee word in tabel 5 aangedui.

TABEL 5: Antibakteriese aktiwiteit van 'n *C. edulis* ru-ekstrak wat met behulp van vloeistof-vloeistof chromatografie deur diëtieleter gefraksioneer is en kolomchromatografies in afsonderlike komponente geskei is, teen die bakterieë *S. lutea* (gram +) en *M. catharalis* (gram -).

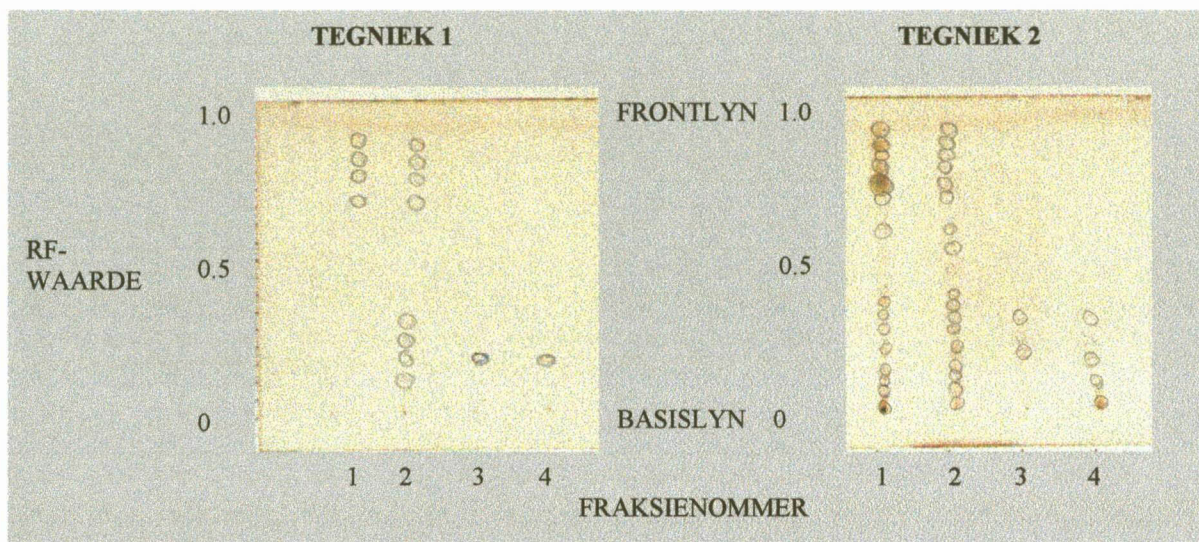
Kolomfraksies	Konsentrasie mg cm ⁻³	Rf-waarde	Sone deursnee mm	
			<i>S. lutea</i> (gram +)	<i>M. catharalis</i> (gram -)
1	2,35	0,806	-	-
2	1,63	0,72	-	-
3	1,21	0,829	-	20
4	1,2	0,870	-	20
5	2,96	0,874	-	21
6	3,2	0,846	-	14
10% DMSO	-	-	-	-
Oorblywende polêre fraksie	4,3	-	10	10
Ru-ekstrak	950	-	9	9

DMSO het geen bioaktiwiteit teen enige van die twee bakterieë wat getoets is getoon nie (tabel 5) en derhalwe kan aanvaar word dat die antibakteriese aktiwiteit van die onderskeie fraksies wat getoets is aan die aktiwiteite van onbekende komponente in die fraksies toegeskryf kan word.

Aangesien nie een van die die ses kolomchromatografiese fraksies van 'n diëtieleter ekstrak van *C. edulis* antibakteriese aktiwiteit teen die bakterie *S. lutea* (gram +) getoon het nie, maar vier wel aktief was teen die bakterie *M. catharalis* (gram -), dui op selektiewe antibakteriese aksie van die aktiewe bestanddele. Fraksies 3, 4 en 5 was, teen laer konsentrasies, meer aktief teen laasgenoemde organisme as fraksie 6.

Nie die ru-ekstrak of enige van die fraksies wat deur vloeistof-vloeistof of kolomchromatografie bekom is het enige antifungale aktiwiteit teen die fungi *Botrytis cinerea*, *Fusarium oxysporum* en *Phoma* spp. asook die gis *Saccharomyces cerevisiae* getoon nie (resultate nie getoon nie). In die lig van die feit dat, buiten die diëtieleter fraksie, bioaktiwiteit ook in die heksaan en chloroform fraksies waargeneem is (sien tabel 2), is die ru-ekstrak voorts deur middel van twee verskillende tegnieke en op groter skaal gefraksioneer.

4.2.5 TLC-profiel van komponente in ekstraksies wat tydens die grootskaalse suiwing van 'n *C. edulis* ru-ekstrak met behulp van vloeistof-vloeistof chromatografie bekom is (tegniek 2) en die ooreenkomste met die voorlopige suiweringsprotokol (tegniek 1)



Plaat 5: Kwalitatiewe TLC-profiel van komponente in 'n ru-ekstrak van *C. edulis* wat op grootskaal (tegniek 2) met behulp van vloeistof-vloeistof chromatografie gefraksioneer is deur gebruik te maak van organiese oplosmiddels in volgorde van stygende polariteit (1= heksaan; 2 = diëtieleter; 3 = chloroform en 4 = etielasetaat). Mobiele fase: Chloroform : Metanol : Water (80:20:10). Stasionêre fase: Silikagel 60. Die plaat is ontwikkel met 5 % metanoliese H_2SO_4

Die TLC-profiel (plaat 5) dui daarop dat tydens die voorlopige suiweringsprotokol (tegniek 1), heksaan ($DC = 1.9$) omtrent 50 % van die komponente uit die ru-ekstrak verwyder het. Die meeste van die komponente (87.5 %) het egter in diëtieleter ($DC = 4.3$) opgelos, terwyl slegs enkele komponente in die chloroform ($DC = 4.8$) en etielasetaat ($DC = 6.0$) fraksies opgespoor kon word. Laasgenoemde dui daarop dat die meeste komponente vooraf verwyder is.

Grootskaalse ekstrahering met behulp van tegniek 2 het 'n duidelike invloed op die hoeveelheid komponente wat in beide hekasaan (DC= 1.9) en diëtleter (DC = 4.3) opgelos het gehad en bykans identiese TLC-profiel is met hierdie twee organiese oplosmiddels bekom. Die TLC-profiel van chloroform en etielasetaat toon dat die meeste komponente vooraf verwyder is, en baie min addisionele komponente hierin voorgekom het. Antibakteriese aktiwiteit is in die hekasaan en diëtleter fraksies, waarvan die TLC-profiel ooreengestem het, sowel as die chloroform fraksie opgespoor (tabel 3). Dit dui daarop dat alle aktiewe bestanddele van relatiewe lae polariteit was en tydens die eerste twee ekstraksies verwyder is.

Slegs die bioaktiewe hekasaan en diëtleter fraksies se aktiwiteit teen bekende mensbakterieë is bepaal. Die waterige ru-ekstrak is ook by hierdie bio-toets ingesluit (sien tabel 6).

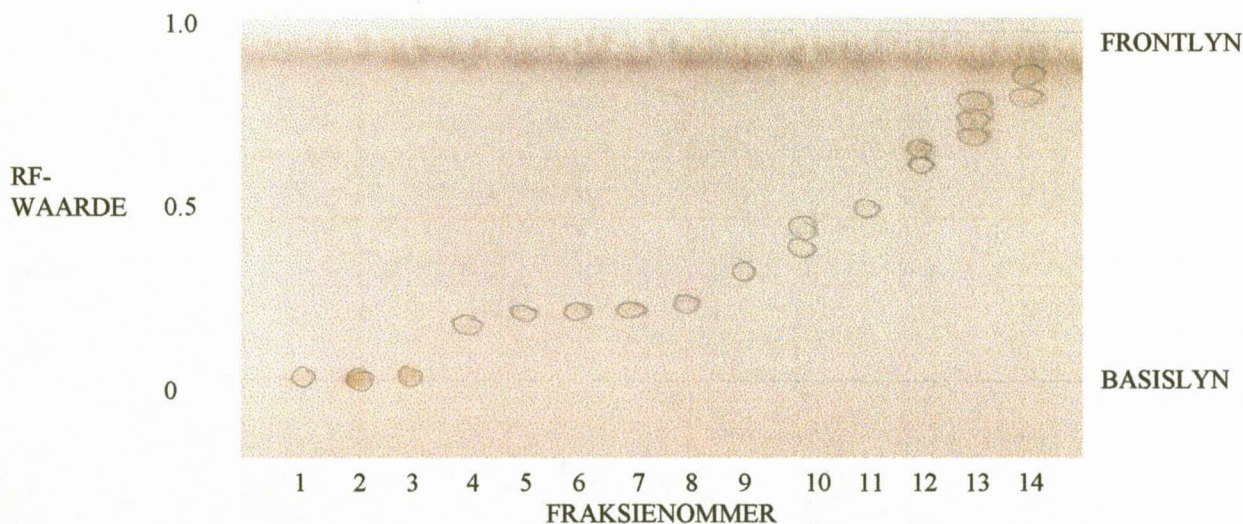
TABEL 6: Antibakteriese aktiwiteit van 'n *C. edulis* ru-ekstrak asook 'n heksaan en diëtleter fraksie, geëkstraheer met behulp van vloeistof-vloeistof chromatografie, en die anti-biotiese effek op bekende mensbakterieë

Organismes	Agar	Konsentrasie mg cm ⁻³	Waterige ru-ekstrak	Heksaan fraksie	Diëtleter fraksie
Sone deursnee (mm)					
<i>Staphylococcus aureus</i>	Mueller Hinton	50	18	16	-
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	Mueller Hinton	50	20	9	-
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	Mueller Hinton + skaapbloed	50	10	15	16
<i>Streptococcus pyogenes</i>	Mueller Hinton + skaapbloed	50	9	16	16
<i>Haemophilus influenzae</i>	Sjokolade agar	50	-	11	10
<i>Moraxella catharalis</i>	Mueller Hinton/ PCA	50	22	25	20
<i>Escherichia coli</i>	Mueller Hinton	50	10	10	-
<i>Klepsiella pneumoniae</i>	Mueller Hinton	50	-	-	-
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Mueller Hinton	50	-	-	-
<i>Acinetobacter baumannii</i>	Mueller Hinton	50	-	13	-
<i>Bacillus subtilis</i>	Mueller Hinton	50	14	15	-

Duidelike ooreenkomste in die antibakteriese aktiwiteite van die waterige ru-
 ekstrak, heksaan en diëtleter fraksies het voorgekom. Beide die heksaan
 en diëtieteter fraksies was selektief in hulle werking en ooreenkomste tussen
 die twee is deur die ooreenstemmende TLC-profiel (sien plaat 5) bevestig.
 Ten spyte van ooreenkomste tussen die TLC-profiel van die heksaan en
 diëtleterfraksies het eersgenoemde antibakteriese aktiwiteit teen 9 van die
 11 bakterieë, teenoor die 4 van laasgenoemde, getoon.

Omdat beide die heksaan en diëtleter fraksies dieselfde TLC-profiel
 getoon het (sien plaat 5; tegniek 2) is die twee fraksies gekombineer.
 Hierdie gekombineerde fraksie is verder gesuiwer met behulp van
 preparatiewe dunlaag chromatografie (sien plaat 6; 4.1.2.5).

**4.2.6 Komponente geïsoleer met behulp van preparatiewe dunlaag
 chromatografie (P-TLC) uit die aktiewe gekombineerde heksaan
 en diëtleter fraksie**



Plaat 6: Kwalitatiewe TLC-profiel van komponente in die ru-ekstrak van *C. edulis* wat met behulp van vloeistof-vloeistof chromatografie gefraksioneer is deur gebruik te maak van die organiese oplosmiddels heksaan en diëtieleter. Hierdie fraksies is gekombineer en komponente geïsoleer met behulp van preparatiewe dunlaag chromatografie (P-TLC). (1-14 = geïsoleerde komponente). Mobiele fase: Chloroform : Metanol : Water (80:20:10). Stasionêre fase: Silika gel 60. Die plaat is ontwikkel met 5 % metanoliese H₂SO₄

Plaat 6 illustreer die komponente geïsoleer uit die gekombineerde heksaan en diëtieleter fraksie. Negentien komponente is geïdentifiseer en afsonderlik van die silikagel verwyder (sien 3.8). Elk van hierdie komponente se antibakteriese aktiwiteit teen die bakterie *M. catharalis* (gram -) (sien tabel 7) is bepaal.

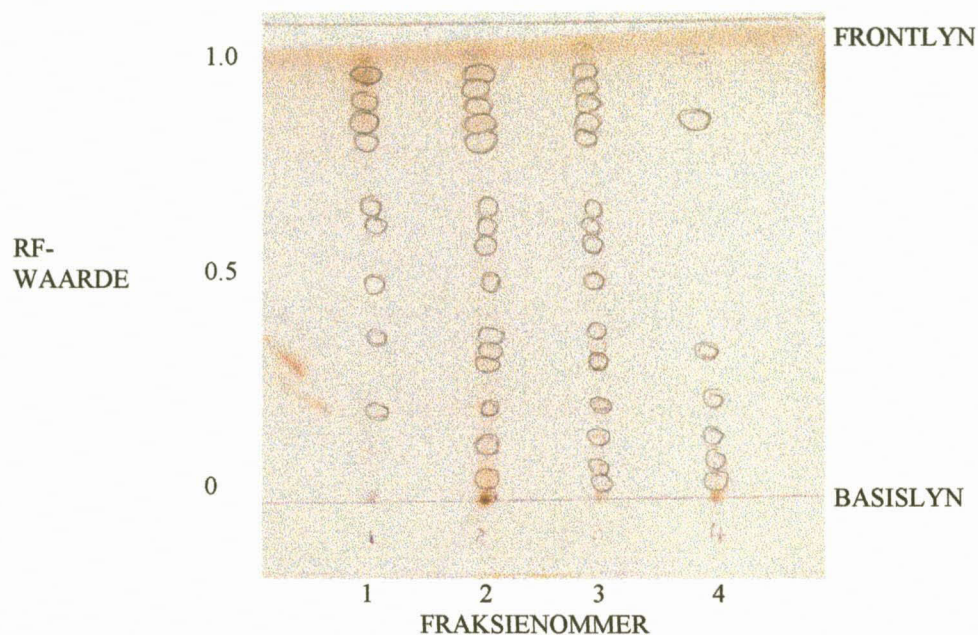
TABEL 7: Antibakteriese aktiwiteit van 'n *C. edulis* ru-ekstrak wat met behulp van vloeistof-vloeistof chromatografie deur hekasaan en diëtleter gefraksioneer is. Die gekombineerde fraksie is verder gesuiwer met behulp van preparatiewe dunlaag chromatografie, die komponente geskei en die bioaktiwiteit van elke komponent teen die bakterie *M. catharalis* (gram -) bepaal.

Komponente	Konsentrasie	Sone deursnee (mm)
1	50 mg cm ⁻³	-
2	50 mg cm ⁻³	-
3	50 mg cm ⁻³	-
4	50 mg cm ⁻³	-
5	50 mg cm ⁻³	-
6	50 mg cm ⁻³	-
7	50 mg cm ⁻³	-
8	50 mg cm ⁻³	-
9	50 mg cm ⁻³	-
10	50 mg cm ⁻³	-
11	50 mg cm ⁻³	-
12	50 mg cm ⁻³	-
13	50 mg cm ⁻³	-
14	50 mg cm ⁻³	-
15	50 mg cm ⁻³	-
16	50 mg cm ⁻³	-
17	50 mg cm ⁻³	-
18	50 mg cm ⁻³	-
19	50 mg cm ⁻³	-

Nie een van die 19 semi-gesuiwerde komponente wat met behulp van preparatiewe dunlaag chromatografie uit die gekombineerde fraksie geïsoleer het antibakteriese aktiwiteit teen die gram negatiewe bakterie *M. catharalis* getoon nie.

Die onverklaarbare verlies in aktiwiteit het aanleiding gegee tot die direkte ekstrahering van aktiewe komponente uit droë plantmateriaal deur van vloeistof-vloeistof chromatografie gebruik te maak (sien tegniek 3).

4.2.7 TLC-profiel van komponente wat direk uit droë plantmateriaal van *C. edulis* geëkstraheer is en verder selektief met behulp van vloeistof-vloeistof chromatografie gefraksioneer is.



Plaat 7: Kwalitatiewe TLC-profiel van komponente wat direk uit droë plantmateriaal van *C. edulis* met behulp van vloeistof-vloeistof chromatografie gefraksioneer is deur gebruik te maak van organiese oplosmiddels in volgorde van stygende polariteit. (1 = heksaan; 2 = diëtieleter; 3 = chlorofom; 4 = etielasetaat). Mobiele fase: Chloroform : Metanol : Water (80:20:10). Stasionêre fase: Silikagel 60. Die plaat is ontwikkel met 5 % metanoliese H₂SO₄

Plaat 7 illustreer die TLC-profiel van komponente wat direk uit die droë plantmateriaal van *C. edulis* geïsoleer is deur middel van vloeistof-vloeistof chromatografie (tegniek 3). Heksaan (DC = 1.9) het omtrent 25 % van die komponente uit die droë plantmateriaal verwyder. Die meeste van die komponente (45 %) het in diëtleter (DC = 4.3) en (20 %) chloroform (DC = 4.8) opgelos. Die enkele komponente (10 %) wat in die etielasetaat (DC = 6.0) opgespoor kon word dui daarop dat die meeste van die komponente vooraf verwyder is. Die antibakteriese aktiwiteite van die afsonderlike fraksies is ook bepaal teen die bakterie *M. catharalis* (gram -) (sien tabel 8).

TABEL 8: Antibakteriese aktiwiteit van 'n *C. edulis* ru-poeier ekstrak geëkstraheer met behulp van vloeistof-vloeistof chromatografie (tegniek 3) teen die gram (-) bakterie *M. catharalis*

Fraksies	Konsentrasies mg cm ⁻³	Inhibisiesone deursnee (mm)
Heksaan	1	11
Diëtleter	1	13
Chloroform	1	10
Etielasetaat	1	9

Antibakteriese aktiwiteite is in alle fraksies opgespoor (tabel 8). Dit was egter te wagte aangesien die TLC-profiel (plaat 7) in 'n groot mate ooreengestem het. Alhoewel *C. edulis* definitiewe antibakteriese aktiwiteite toon was dit moeilik om komponente selektief te isoleer en 'n ander tegniek is vir hierdie doel aangewend (sien hoofstuk 5).

4.3 BESPREKING

Die oorspronklike doel met hierdie vooraf studie was om die antibakteriese en antifungale eienskappe van *Carpobrotus edulis* L. ru-ekstrak te bevestig en om 'n voorlopige protokol vir verdere studies te vestig. 'n Verdere doel was om semi-gesuiwerde fraksies van die waterige ru-ekstrak te bekom sodat die aktiewe bestanddele in hierdie fraksies verder gesuiwer kon word en sodat die potensiaal van die plant as bron vir natuurlike antibiotikums geëvalueer kon word. Aangesien die ru-ekstrak die groei van die gram (-) bakterie *M. catharalis* geïnhibeer het, is met die verdere suiwing daarvan voortgegaan. Maar aangesien geen aktiwiteit in die wasneerslag wat gepresipiteer het gevind kon word nie, is dit geïgnoreer.

Drie aktiewe vloeistof-vloeistof chromatografie fraksies is aanvanklik op klein skaal geïsoleer (tegniek 1) maar slegs die mees aktiewe van die drie, naamlik diëtieleter, is verder kolomchromatografies gesuiwer om 'n voorlopige suiweringsprotokol te verkry waarop verdere studies gevestig kon word. Ses verskillende gekombineerde fraksies is kolomchromatografies geïdentifiseer. Drie hiervan was bioaktief teen die gram (-) bakterie *M. catharalis*. Slegs die oorblywende polêre waterige fraksie na verwydering van die nie-polêre komponente deur chromatografie, het selektiewe aktiwiteit teen die gram positiewe bakterie *S. lutea* getoon.

Die TLC-profiel van die ses gekombineerde kolomfraksies het aangetoon dat fraksies 4 en 5 identies was. Aangesien drie van hierdie fraksies egter aktief was maar ook verskillende TLC-profiel getoon het, is aanvaar dat minstens drie verskillende komponente of groepe komponente met antibakteriese eienskappe in *C. edulis* voorkom.

'n Moontlike vierde antibakteriese komponente het in die polêre fraksie agtergebly wat nie selektief in sy werking was nie aangesien dit antibakteriese aktiwiteit teen beide die gram negatiewe en gram positiewe bakterie getoon het. Weens die feit dat dit relatief moeilik is om polêre fraksies verder te suiwer en farmakologiese maatskappye eerder op minder polêre fraksies konsentreer (Dr. Bob Borris, mondelingse mededeling, Merck Pharmaceuticals) is besluit om slegs die nie-polêre fraksies verder te suiwer.

Nie een van die polêre of die nie-polêre semi-gesuiwerde fraksies van 'n *C. edulis* ru-ekstrak het enige antifungale aktiwiteit teen enige van die swamme wat as toetsorganismes gebruik was, naamlik *Phoma* spp.; *Fusarium oxysporum* en *Botrytis cinerea* getoon nie. Natuurlike plantekstrakte besit selde antifungale aktiwiteit (Caceres *et al.*, 1993). Dit kan beteken dat plante oor die algemeen nie baie bestand is teen swam-infeksies nie of dat die *in vivo* aktiwiteit verskil van die *in vitro* aktiwiteit.

In vitro antibakteriese en antifungale toetse kan kwalitatief of kwantitatief uitgevoer word. Die plaat diffusie metode wat gebruik is, is 'n eenvoudige graderingsprosedure ("screening"), waar die toets-komponente toegelaat word om deur die agar te diffundeer gedurende die inkuberingsperiode en as dit 'n inhiberingseffek op die organisme het, word 'n inhibisiesone (Daniels, 1965; Towers, 1984) waargeneem. Die deursnee van die sone kan aanduidend wees van die relatiewe inhibisiepotensiaal in vergelyking 'n standaard kommersieël beskikbare antimikrobiële verwysingsmiddel. Die sone van inhibisie is nie slegs afhanklik van die potensie van die komponente nie, maar ook van ander kenmerke naamlik die oplosbaarheid in 'n waterige kultuurmedium, die diffusie koëffisient asook stabiliteit van die agarmedium (Patel *et al.*, 1984).

As gevolg hiervan is die sone deursnee nie noodwendig kwantitatief nie. Die gekombineerde kolomfraksies 3, 4 en 5 en in 'n mindere mate fraksie 6, kwalitatief geïdentifiseer as die bio-aktiewe fraksies. Hierdie kolomfraksies is bekom deur die diëtleter fraksie van 'n *C. edulis* ru-ekstrak verder te suiwer maar die samestelling daarvan was moeilik om vas te stel weens die lae konsentrasies waarin die komponente voorgekom het.

Vervolgens is 'n grootskaalse ekstrahering van hierdie aktiewe fraksies uitgevoer ten einde die bioaktiewe fraksies in groter volumes te bekom en verder te suiwer. Probleme is egter ook tydens die grootskaalse ekstraheringsproses ondervind deurdat die aktiwiteit oor die hekasaan en diëtleter fraksies versprei was.

Beide hierdie fraksies se TLC-profiel het ook ooreengestem en was ook aktief teen die gram negatiewe bakterie *M. catharalis* wat daarop gedui het dat die fraksioneringsproses nie behoorlik tussen komponente onderskei het nie. Gevolglik is die twee fraksies gekombineer en verder gesuiwer met behulp van preparatiewe dunlaag chromatografie.

Alhoewel sterk ooreenkomste in die P-TLC profiel steeds waargeneem is wou dit tog voorkom asof sekere komponente meer prominent in die onderskeie fraksies waargeneem kon word. Meer selektiewe werking teen bekende mensbakterieë het hierdie waarneming bevestig.

Met behulp van 'n tweede P-TLC skeiding van komponente in die vorige gekombineerde aktiewe fraksie is 19 komponente geïsoleer. Die bioaktiwiteit van elk is teen die toetsorganisme *M. catharalis* bepaal maar geen aktiwiteit is waargeneem nie. Die verlies aan aktiwiteit kon moontlik toegeskryf word aan strukturele veranderinge wat die komponente ondergaan het van weë die lang periode wat dit in die organiese oplosmiddel bly lê het en die moontlike oksidasie effek. 'n Ander moontlike verklaring vir die verlies aan aktiwiteit kan wees dat die komponente sinergeties in hulle werking was en dus net antibakteriese aktiwiteit in kombinasie kon openbaar. Geen sukses is egter behaal met die skeiding van komponente terwyl aktiwiteit behoue gebly het nie en vervolgens is 'n derde suiweringsprotokol, bekend as tegniek 3, probeer.

Met tegniek 3 is alle moontlike aktiewe komponente direk uit die droë plantmateriaal geëkstraheer deur middel van vloeistof-vloeistof chromatografie waartydens verskillende organiese oplosmiddels met verskillende DC-waardes gebruik is. Geen verskille tussen die vier organiese oplosmiddels ten opsigte van TLC-profiel en bioaktiwiteit kon egter sonder onsekerheid waargeneem word nie. Ten spyte hiervan was daar tog 'n sterk aanduiding (sien plaat 2 en tabel 5) dat daar uit *C. edulis* minstens drie verskillende fraksies met antibakteriese aktiwiteit voorgekom het en daar is voortgegaan om die suiweringsprotokol te verfyn.

Aangesien 'n hoë tannieninhoud in die blare van *C. edulis* voorkom (Watt & Breyer-Brandwijk, 1962; Smith *et al.*, 1998), tanniene baie polêr is, antibakteriese aktiwiteit toon en ook ander aktiewe bestanddele uit 'n ekstrak kan presipiteer (Hagerman, 1998), is 'n poging aangewend om alle tanniene eers vooraf te verwyder voordat ander moontlike aktiewe bestanddele gesuiwer is. Laasgenoemde prosedure het nodig geblyk aangesien tanniene moontlik verantwoordelik kon wees vir die probleme wat met suiwing van aktiewe komponente ondervind is. Verder was dit nodig om vas te stel of die antibakteriese aktiwiteit van 'n *C. edulis* ru-ekstrak nie bloot aan die teenwoordigheid van tanniene toegeskryf kon word nie. Vervolgens is in hoofstuk 5 met hierdie prosedure voortgegaan ten einde vas te stel of die aanduiding van drie moontlike verskillende aktiewe bestanddele met antibakteriese aktiwiteit, wat in hoofstuk 4 na vore gekom het, bloot 'n artefak van die skeidingsprosedure was.

HOOFSTUK 5

Suiwering en identifisering van komponente met antibakteriese aktiwiteit uit *Carpobrotus edulis* deur tanniene vooraf te verwyder

INLEIDING

Carpobrotus edulis besit 'n hoë tannieninhoud wat moontlik die chromatografiese skeiding van ander komponente tydens grootskaalse suiwering kan beïnvloed (Ihlenfeldt, 1994). Dit kan toegeskryf word aan die feit dat tanniene ander komponente uit 'n waterige oplossing kan presipiteer en op hierdie wyse aanleiding kan gee tot 'n verlies aan aktiwiteit alhoewel tanniene self ook bioaktief is (Hagerman, 1998).

Tanniene is bekend vir hulle antibakteriese eienskappe (Van Wyk, 1997; Hagerman, 1998), maar farmaseutiese maatskappye stel nie daarin belang om tanniene te kommersialiseer nie (Merck Pharmaceuticals, V.S.A.; persoonlike mededeling). Die groep fenoliese komponente bekend as tanniene word duidelik onderskei van sekondêre fenole in hulle strukturele chemie asook hulle biologiese aktiwiteite (Hagerman, 1998).

Tanniene is natuurlike wateroplosbare polifenoliese komponente wat met proteiene kan reageer en dit blyk dat hulle 'n rol speel in die verdedigingsmeganismes van plante (Salunke *et al.*, 1990). Bate-Smith en Swain (1962) definieer tanniene as wateroplosbare polifenoliese komponente met 'n molekulêre massa tussen 500 en 3 000 daltons en kan alkaloiëde, sowel as gelatien en ander proteiene, in 'n waterige oplossing presipiteer.

Tanniene het diverse effekte op biologiese sisteme as gevolg van hulle potensiaal om as metaalioonchelators, proteïen presipiteringsagente of as biologiese antioksidante op te tree (Hagerman, 1998). Die voorkoms, inhoud en ligging van tanniene varieer tussen plante van verskillende spesies. Tanniene word meesal in dikotiele plante gevind en veral in die familie Leguminoceae (Jansman, 1993). Die tannieninhoud van plante wissel baie tussen spesies en varieer gedurende die groeiseisoen van 0.5 % in April tot 5 % in September. Hierdie variasie in die tannieninhoud hou skynbaar verband met die weerstand van sade teen veral swamme en insekplae tydens die ontkiemingsproses (Jansman, 1993).

Plante met 'n hoë tannieninhoud is byvoorbeeld minder smaaklik vir insekte as gevolg van die kompleks wat vorm as die tanniene met die speeksel proteïene en die epiteelselle in die mondholte reageer (Bullard en Elias, 1980). Plante met 'n lae tannieninhoud kan dus makliker deur insekte aangeval word of selfs deur swamme geïnfecteer word, maar die teenwoordigheid van flavan-3-ols, en nie tanniene nie, kan ook in sommige gevalle vir hoër weerstandbiedendheid verantwoordelik wees (Bullard en Elias, 1980).

Baie van die fenole in plante is bloot byprodukte van metabolisme. Fenole verskil van lipiede in die opsig dat hulle meer oplosbaar is in water en minder oplosbaar is in nie-polêre organiese oplosmiddels. Fenole word ook geassosieer met die weerstandbiedendheid van plante teen peste en plae (Hemingway en Karchesy, 1989).

In hierdie hoofstuk is 'n poging aangewend om vas te stel of die antibakteriese aktiwiteit van 'n *C. edulis* ru-ekstrak en semi-gesuiwerde fraksies daarvan die gevolg is van tanniene en/of ander sekondêre metaboliete. Om redes wat hoërop genoem is, is besluit om tanniene eers uit die bioaktiewe metanol fraksie te verwyder volgens die metode van Hagerman (1998), en daarna te poog om moontlike komponente met antibakteriese eienskappe in die plant te identifiseer.

5.1 MATERIAAL EN METODEDES

5.1.1 MATERIAAL

Alle organiese oplosmiddels gebruik, was van die suiwerste graad beskikbaar en is verskaf deur Merck (Duitsland). Askorbiensuur, 'n antioksidant wat gedurende die ekstraheringsproses gebruik is, is verskaf deur Sigma (Duitsland).

5.1.2 METODES

5.1.2.1 EKSTRAHERING EN VERWYDERING VAN TANNIENE (Hagerman, 1998)

Seshonderd milliliter van 'n 10 mM etanoliese askorbiensuuroplossing is by 200 g droë plantmateriaal gevoeg en vir 1 uur geroer om alle moontlike lae molekulêre gewig fenole te verwyder. Die etanoliese ekstrak is gesentrifugeer teen 15 000 r.p.m vir 10 minute by kamertemperatuur en die supernatant, wat lae molekulêre massa fenole bevat het, is vir bio-aktiwiteit getoets.

Die residu ("pellet") is vervolgens verder geëkstraheer met 150 ml 10 mM metanoliese askorbiensuur en onder vakuum deur 'n Schleicher en Schull 595 filtreerpapier filtreer deur gebruik te maak van 'n Buchner trechter lugdig gemonteer op 'n syarm Erlenmeyerfles. Die proses is vier maal herhaal. Na elke ekstraksie, wat tussen 45 minute en 1 uur geduur het, is die filtraat gesentrifugeer teen 15 000 r.p.m vir 10 minute en die supernatant, wat die tanniene bevat het, behou.

'n Gelyke volume van 0,05 M natriumasetaat pH 4, is by hierdie supernatant gevoeg. Alle metanol is van bogenoemde melkerige oranje oplossing verwyder deur middel van vakuumdistingulasie met behulp van 'n Buchi Rotavapor by 30°C (sien 3.3). Nadat alle metanol verwyder is, is die waterige ekstrak verder gesuiwer met behulp van vloeistof-vloeistof chromatografie (sien 3.5).

5.1.2.2 Verdere fraksionering van die oorblywende ekstrak met behulp van vloeistof-vloeistof chromatografie

Die oorblywende waterige ekstrak, is drie maal in 'n skeitreter met suiwer etielasetaat in 'n 1:1 (v/v) verhouding gewas deur deeglik te skud en telkens die etielasetaat tussen wasse te hernu. Met elke was is die onderste (waterige, tannienbevattende) fase behou vir verdere fraksionering. Die boonste etielasetaat fase, wat nou vry van tanniene was, is ook behou en die bioaktiwiteit bepaal (sien 3.9.4).

Die onderste waterige, tannienbevattende fase, is weer deur vakuumdistingasie ingedamp (sien 3.3) by 30⁰C tot 'n totale volume van ± 20 ml oorgebly het. Suiwer etanol is hierby gevoeg om 'n 80 % etanoloplossing op te maak, en vervolgens by ± 20 g droë Sephadex LH 20 gevoeg in 'n glastregter en tot 'n pasta vermeng. Die Sephadex LH 20 is vooraf met 80 % etanol geëkwilibreer.

Die inhoud van die glastregter is onder 'n ligte vakuum (1 atmosfeer) geplaas terwyl dit met 'n glasstaaf geroer is. Deur die pasta te roer is die grootste moontlike oppervlakte vir kontak deur tanniene aan die korrels moontlik gemaak (Hagerman, 1998). Die meeste van die bruinkleurige tanniene het aan die Sephadex LH 20 deeltjies geadsorbeer.

Die Sephadex LH 20 is vervolgens versigtig met 95 % etanol gewas deur stadige filtrasie en vermenging totdat alle moontlike komponente, behalwe tanniene, verwyder is. Die filtraat, wat onbekende komponente bevat het, is behou vir bepaling van bioaktiwiteit en latere suiwering. Hierna is die Sephadex LH 20 weer met 50 % asetoon gewas en die filtraat behou. Die asetoon het alle tanniene tydens die tweede was verwyder (Hagerman, 1998).

Alle filtrate (80 % etanol, 95 % etanol en 50 % asetoon) is met behulp van 'n Rotavapor (sien 3.3) by 30⁰C vakuumedistilleer tot droog. Hierdie fraksies se bioaktiwiteit is bepaal (sien 3.9.4) asook die hoofgroep komponente (sien 5.1.2.3) wat in elke afsonderlike fraksie voorgekom het ("fingerprinting") met behulp van verskillende kleurreagense (sien 5.1.2.4).

Die gewasde Sephadex LH 20 is met 80 % etanol bedek en in 'n lugdigte bottel by 40⁰C gestoor vir latere gebruik. Die herwinde onbekende komponente is met behulp van kwalitatiewe dunlaag chromatografie (K-TLC, sien 3.7) geskei, 'n biotoets op elk uitgevoer en alle aktiewe fraksies verder deur middel van preparatiewe dunlaag chromatografie (P-TLC, sien 3.8) geskei.

5.1.2.3 Kwalitatiewe dunlaag chromatografie (K-TLC)

Aluminium plate, bedek met fluoresserende Silika 60 (F 150/LS 254; 0,1 mm), is volgens verlangde afmetings gesny en gebruik vir K-TLC skeiding van komponente wat herwin is nadat tanniene verwyder is.

Vier verskillende fraksies naamlik 'n suiwer etanol fraksie (eerste ekstraksie van komponente uit die plantmateriaal), 'n etielasetaat fraksie (verkry deur vloeistof-vloeistof chromatografie van die oorspronklike metanol ekstrak), 'n 80 % etanol fraksie (verkry deur 80 ml etanol by 20 ml van die waterige ru-ekstrak te voeg) en 'n 95 % etanol fraksie (verkry deur die Sephadex kolom met hierdie organiese oplosmiddel te was om oortollige komponente vanaf die kolom te verwyder en net tanniene te behou) is verkry deur die tannien ekstraheringsmetode. Die komponente in bogenoemde vier fraksies is geskei met behulp van K-TLC deur klein kolle ($\pm 10 \mu\text{g}$) met 'n kapillêrebuis op die basislyn van die plaat aan te bring. Etielasetaat : Metanol : Water (80:20:10) is as die mobiele fase gebruik.

Die asetonfraksie, wat tanniene bevat het, is nie verder gebruik nie. 'n Afsonderlike TLC-plaat is met 5 % metanoliese H_2SO_4 behandel (sien 3.7) en in 'n oond by $70^{\circ}C$ ontwikkel ten einde slegs die teenwoordigheid van die komponente te bevestig. Vervolgens is die komponente op afsonderlike TLC-plate, maar met behulp van dieselfde protokol, geskei en standaardkleuringsmetodes (Wagner en Blatt, 1996) gebruik om die hoofgroepe komponente voorlopig te identifiseer ("fingerprinting"). Etielasetaat : Metanol : Water (80:20:10) is as die mobiele fase gebruik.

Na skeiding van elke fraksie op afsonderlike TLC-plate is die plate by kamertemperatuur met behulp van 'n haardroër gedroog. Fluoreserende komponente is eerstens onder UV-lig (254 en 365 nm) geïdentifiseer en die posisies op die plaat aangedui waarna die plate met standaard kleurreagense (Wagner en Blatt, 1996) gespuit is en by $100^{\circ}C$ in 'n oond ontwikkel is. Op hierdie wyse is minstens die groepe komponente waaraan aktiewe bestanddele moontlik kan behoort geïdentifiseer ("fingerprinting").

Kleuring is vir alkaloïede, fenole, glikosiedes, antraseen derivate en terpenoïede gedoen. Alle semi-gesuiwerde komponente se bioaktiwiteit is bepaal met behulp van die kurkboormetode (sien 3.9.4) en slegs die bioaktiewe fraksies is verder gesuiwer met behulp van preparatiewe dunlaag chromatografie (P-TLC; sien 3.8). Die etielasetaatfraksie is die enigste een wat 'n positiewe reaksie vir fenole getoon het. Hierdie fraksie was ook die enigste bioaktiewe een en is verder gesuiwer met behulp van preparatiewe dunlaag chromatografie (P-TLC; sien 3.8) ten einde die aktiewe komponente in hierdie fraksie te identifiseer.

5.1.2.4 Kleurreagense gebruik vir identifikasie

Die verskillende kleurreagense wat gebruik is om vir spesifieke groepe komponente na TLC-skeiding te toets is in die bylae (sien p.133) uiteengesit. Hierdie toetse is uitgevoer op die oorblywende fraksies en filtrate, nadat tanniene verwyder is (Wagner en Blatt, 1996). Hieronder volg 'n opsomming van die metodiek wat vir die identifikasie van verskillende klasse komponente gebruik is.

(a) Alkaloïede

Die meeste plantalkaloïede is derivate van tersiêre amiene, terwyl ander primêre of sekondêre stikstof in hulle struktuur bevat. Die basiese struktuur van individuele alkaloïede varieer egter aansienlik, afhangende van die tipe teenwoordig, en beïnvloed dus die kleurreaksie en fluoressensie van die onderskeie komponente (Waterman en Mole, 1994). Onder UV-lig en by 254 nm vind daar blussing van sommige alkaloïede, naamlik indool, puriene asook tropiene plaas, terwyl die meeste alkaloïede blou, blou-groen of violet onder UV-lig by 365nm fluoresseer.

Dragendorff se reagens word algemeen gebruik vir die identifisering van alkaloïede in plantekstrakte (Wagner en Blatt, 1996). In sigbare lig kleur alkaloïede bruin of oranje-bruin na behandeling met Dragendorff se reagens gevolg deur behandeling met 10 % etanoliese swaelsuur (sien bylae).

(b) Antraseen derivate

Kenmerkende komponente van hierdie groep is antrakinoon, antranole en antrone, terwyl die meeste antraseen-derivate egter as O-glikosiedes in plante teenwoordig is (Waterman en Mole, 1994). Afhangende van die tipe komponente teenwoordig, sal die meeste onder UV-lig by 254 nm blussing toon, terwyl hulle geel of rooi-bruin onder UV-lig by 365 nm fluoesseer.

Vyf persent etanoliese kaliumhidroksied (sien bylae) is as kleurreagens gebruik. Nadat die plaat hiermee behandel is kleur antrakinoon normaalweg rooi in sigbare lig en fluoesseer in dieselfde kleur onder UV-lig 365 nm. Hierteenoor fluoesseer antrone en antranole geel na behandeling met 5 % etanoliese KOH en kan in sigbare lig ook as geel kolle waargeneem word (Wagner en Blatt, 1996)

(c) Terpenoïede (“Bitter drugs”)

Die meeste van die komponente in hierdie groep word beskou as 'n gemodifiseerde of gepolimeriseerde isopreen residu.

Die isopreen eenheid besit verskillende addisionele groepe, verskil in die vlakke van onversadiging en het oop of geslote ringstrukture. Onder hierdie groep ressorteer ook derivate van monoterpene, diterpene en triterpene. Afhangende van die tipe struktuur en skelet van die molekule kan blussing onder UV-lig by 254 nm waargeneem word. Onder UV-lig by 365 nm is daar geen kenmerkende fluoressensie nie (Wagner en Blatt, 1996).

Vanillien in swaelsuur (sien bylae) is as kleurreagens gebruik. Na behandeling van die plaat met vanillien is dit in 'n oond geplaas by 100°C vir 10 min. Onder UV-lig by 365 nm kan fluoressensie van rooi-violet, bruin-rooi, blou-groen, blou en grys of rooi-grys wissel afhangende van die tipe struktuur in die molekule (Smith, 1976).

(d) Kardiale glikosiedes

Hierdie groep bevat steroïed glikosiedes wat spesifiek die ritme van die hartspier beïnvloed en vandaar die naam kardiale glikosiedes (Waterman en Mole, 1994). Kardiale glikosiedes toon baie swak blussing onder 254 nm UV-lig en geen fluoressensie onder 365 nm nie.

Kedde se reagens (sien bylae) is gebruik vir die deteksie van die γ -laktoonring in kardiale glikosiedes. Tydens kontak met die kleurreagens toon komponente 'n pienk of blou-violet kleur in sigbare lig. Die kleur verdwyn na 'n paar minute maar word herwin deur die plaat weer met Kedde se reagens te spuit (Wagner en Bladt, 1996).

(e) Fenole

Vir die identifisering van alle fenoliese verbindings word 'n ammonium vandaat-anisidien oplossing (sien bylae) gebruik (Wagner en Bladt, 1996). Na behandeling toon fenole 'n variasie van kleurreaksies, naamlik blou of pers, maar meestal 'n duidelike blou-violet kleur teen 'n pienk agtergrond (Haslam, 1989).

(f) Flavonoïede

Dit is die grootste groep natuurlike fenole en het 'n kenmerkende flavonoïed C_{15} nukleus. Die variasie in die struktuur van flavonoïede hang af van die kondensasie van die asetaat eenhede of is 'n produk van fenol biosintese. Die meeste van die komponente is teenwoordig as mono- of diglikosiedes (Smith, 1976). Alle flavonoïede toon ligte blussing onder 254 nm UV-lig. Afhangende van die struktuur sal flavonoïede geel, groen of blou fluoresseer onder 365 nm UV-lig wat verdiep na behandeling met 'n kleurreagens soos NP/PEG (Wagner en Blagdt, 1996).

Die natuurlike produk-polietileenglikol reagens (NP/PEG; sien bylae) word normaalweg gebruik vir die identifisering van flavonoïede. Op grond van hul chemiese struktuur word flavonoïede egter in twee groepe geklassifiseer naamlik flavone en flavanole, wat verskillende kleurreaksies met hierdie reagens toon.

Flavanole fluoresseer gewoonlik in verskillende skakerings van oranje-geel of geel-groen onder 365 nm UV-lig. Flavone daarenteen fluoresseer gewoonlik helder oranje of geel-groen onder 365 nm UV-lig.

5.1.2.5 Preparatiewe dunlaag chromatografie (P-TLC) van die bioaktiewe etielasetaat fraksie.

Slegs die etielasetaatfraksie was bioaktief en is verder gesuiwer met behulp van preparatiewe dunlaag chromatografie (P-TLC; sien 3.8).

Dieselfde prosedure as vir K-TLC (sien 3.7) is gevolg behalwe dat 20 x 20 cm glasplate, wat met 0,5 mm silika 60 + fluoresserende indikator bedek was, gebruik is en dat die aktiewe semi-gesuiwerde etielasetaat fraksie in 'n band op die basislyn aangebring is. 'n Totale konsentrasie van 25 mg is gelaai. Etielasetaat : Metanol : Water (100:13,5:10) (Wagner en Blatt, 1996) is as die mobiele fase gebruik.

Nadat die plate ontwikkel is, is die posisies van die komponente op die plaat met behulp van UV-lig (254 en 365 nm) geïdentifiseer, afsonderlik van die plate afgekrap en na skoon eppendorfbuisies oorgedra.

Die komponente is met behulp van organiese oplosmiddels van die silika afgewas (sien 3.8), gesentrifugeer teen 15 000 r.p.m. vir 5 minute (sien 3.8) en die bioaktiwiteit van elke semi-gesuiwerde komponent bepaal (sien 3.9.4).

'n Kwalitatiewe dunlaag chromatografiese skeiding van elke afsonderlike band wat tydens die P-TLC skeiding herwin is, is uitgevoer ten einde die suiwerheid van afsonderlike komponente (sien 5.1.2.6) te bepaal.

5.1.2.6 Isolasie, suiwering en identifikasie van aktiewe komponente uit die bioaktiewe etielasetaat fraksie

Sewentien fraksies is met behulp van P-TLC skeiding uit die bioaktiewe etielasetaat fraksie geïsoleer. Elk van hierdie fraksies is vir antibakteriese aktiwiteit teen die gram negatiewe toetsorganisme, *M. catharalis* (sien 3.9.4) getoets en slegs die bioaktiewe fraksies is verder gesuiwer.

Drie bioaktiewe semi-gesuiwerde fraksies, naamlik in bane 4, 5 en 6 van die P-TLC plaat, is geïdentifiseer. K-TLC skeidings van elk van hierdie fraksies is uitgevoer ten einde die suiwerheid van elk te bepaal.

Etielasetaat : Mieresuur : Ysasynsuur : Water (100:11:11:26) is as die mobiele fase gebruik (Wagner en Bladt, 1996). Na die afsonderlike skeiding van genoemde aktiewe fraksies op K-TLC-plate is elk volgens die standaardmetode met 5 % metanoliese H_2SO_4 gekleur (sien 3.7) maar ook met behulp van standaard kleurreagense ten einde die groepe verbindings te identifiseer (sien 5.1.2.5).

Verdere suiwing van die drie fraksies met behulp van P-TLC chromatografie het tot verdere skeiding van komponente in elk van die drie bande, wat vooraf herwin is, aanleiding gegee. Hieruit is ses komponente geïsoleer. Elk van hierdie ses gesuiwerde komponente se bioaktiwiteit (sien 3.9.4, tabel 6) is afsonderlik bepaal.

As gevolg van die positiewe reaksie vir fenole wat elk van hierdie ses komponente getoon het, is elk geïdentifiseer op grond van ooreenstemmende kleure en RF-waardes (sien tabel 7) deur van bekende standarde gebruik te maak.

5.2 RESULTATE

5.2.1 Bioaktiwiteit van semi-gesuiwerde fraksies nadat tanniene verwyder is

Droë plantmateriaal van *C. edulis* L. is gefraksioneer deur die verwydering van ongewenste tanniene (Hagerman *et al.*, 1997). 'n Fraksie wat lae molekulêre fenole bevat het is aanvanklik met behulp van 'n suiwer etanoliese askorbiensuuroplossing verkry. Die residu ("pellet") van bogenoemde ekstrak, na sentrifugering (sien 5.1.2.1), is verder met behulp van 'n suiwer metanoliese askorbiensuuroplossing gefraksioneer.

Beide hierdie fraksies se bioaktiwiteit is bepaal ten einde vas te stel watter fraksie(s) verder gesuiwer moes word. Die resultate in tabel 1 illustreer dat slegs die metanoliese askorbiensuurfraksie aktiwiteit teen die toetsorganisme *M. catharalis* getoon het en is derhalwe verder gesuiwer (sien 5.1.2.1) met behulp van vloeistof-vloeistof- en kolomchromatografie.

TABEL 1: Antibakteriese aktiwiteit van etanoliese en metanoliese askorbiensuurfraksies van *C. edulis*, bekom tydens die ekstrahering en verwydering van tanniene, teen die gram (-) toetsorganisme *M. catharalis*

Fraksie	Konsentrasie mg cm ⁻³	Sone deursnee mm
Absolute etanol	50	-
Metanol	50	17

Vloeistof-vloeistof chromatografie met etielasetaat het bygedra tot die verdere fraksionering van die aktiewe metanoliese askorbiensuuroplossing.

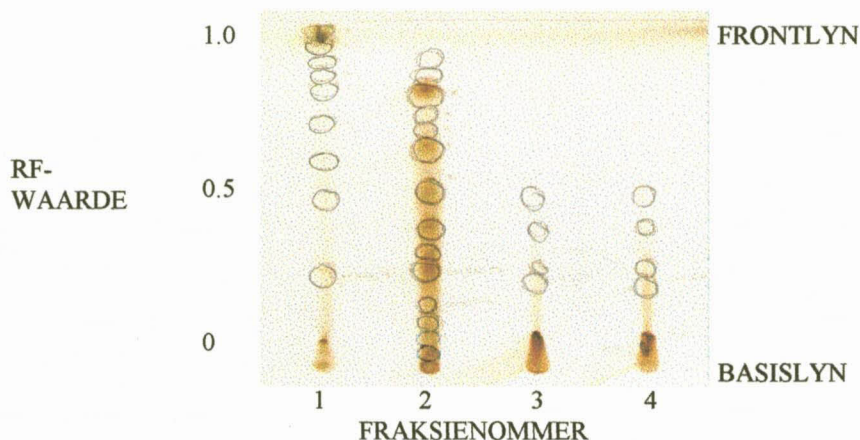
Tydens verwydering van tanniene uit die oorblywende waterige fase met behulp van kolomchromatografie (sien 5.1.2.1 en 5.1.2.2) is 'n 80 % en 95 % etanol eluaat bekom. Asetoon is gebruik om die tanniene van die Sephadex LH 20 kolom af te verwyder (sien 5.1.2.2). Die bioaktiwiteit van al bogenoemde fraksies en/of eluate is bepaal.

Die resultate in tabel 2 illustreer dat slegs die etielasetaat fraksie aktiwiteit teen die toetsorganisme *M. catharalis* getoon het nadat tanniene met behulp van asetoon verwyder is. Die asetoonfraksie (tanniene) was soos verwag ook aktief.

TABEL 2: Antibakteriese aktiwiteit van verskillende fraksies en/of eluate van 'n *C. edulis* metanoliese askorbiensuurekstrak, geëkstraheer met behulp van vloeistof-vloeistof en kolomchromatografie, tydens die tannienekstraheringsmetode, teen die gram negatiewe toetsorganisme *M. catharalis*

Fraksies	Konsentrasie mg cm ⁻³	Sone deursnee mm
Etielasetaat	50	13
80% ETOH	50	-
95 % ETOH	50	-
50 % Asetoon	50	16

5.2.2 TLC-profiel van komponente in die metanoliese askorbiensuuroplossing wat selektief met vloeistof-vloeistof chromatografie, deur etielasetaat te gebruik, gefraksioneer en kolomchromatografies geëluëer is



Plaat 1: Kwalitatiewe TLC-profiel van komponente in 'n metanoliese askorbiensuurekstrak van *C. edulis*, wat met behulp van vloeistof-vloeistof chromatografie gefraksioneer en kolomchromatografies geëluëer is deur gebruik te maak van die tannienekstraheringsmetode (Hagerman, 1998). (1 = metanol; 2 = etielasetaat; 3 = 80 % etanol en 4 = 95 % etanol). Mobiele fase: Etilasetaat: Metanol: Water (100:13,5:10). Stasionêre fase: Silikagel 60. Die plaat is ontwikkel met 5 % metanoliese H₂SO₄.

Die TLC-profiel (plaat 1) illustreer dat die metanoliese askorbiensuurekstrak tydens die tannienekstraheringsmetode (Hagerman, 1998) meeste van die aktiewe komponente verwyder het. Verdere suiwing van hierdie fraksie (sien 5.1.2.1 en 5.1.2.2) het getoon dat die meeste van die aktiewe komponente in etielasetaat opgelos het, terwyl 80 % en 95 % etanol van oortollige nie aktiewe komponente ontslae geraak het (sien tabel 2).

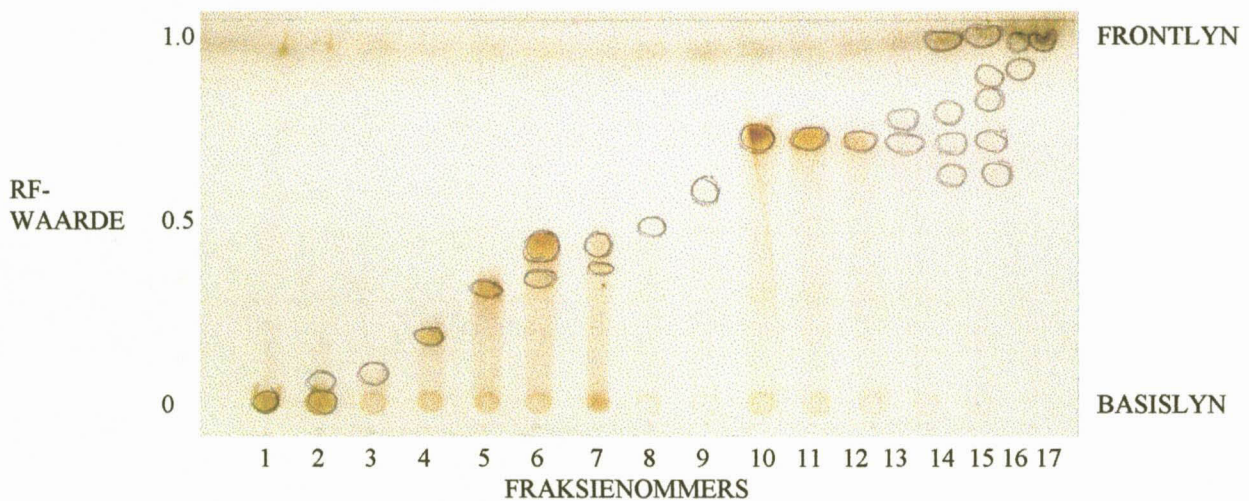
Na skeiding van elke fraksie op TLC-plate, is die plate gedroog en met behulp van voorgeskrewe kleurreagense (Wagner en Blatt, 1996) ontwikkel, ten einde op grond van kleurreaksies en/of met behulp van UV-lig (254 en 365 nm) spesifieke komponente in elke fraksie te identifiseer. Kleuring is vir alkaloïede, fenole, glikosiedes, antraseen derivate en terpenoïede gedoen (sien 5.1.2.4). Die resultate in tabel 3 illustreer dat slegs die etielasetaat fraksie 'n positiewe reaksie vir die teenwoordigheid van fenole en flavonoïede getoon het en was ook die enigste bioaktiewe fraksie.

TABEL 3: Die samestelling van die fraksies en/of eluate verkry met behulp van die tannienekstraheringsmetode uit *C. edulis* en identifikasie van spesifieke groepe komponente op grond van kleurreaksies en/of met behulp van UV-lig (254 en 365 nm) na behandeling met voorgeskrewe kleurreagense (Wagner en Blatt, 1996)

Spesifieke groepe komponente	FRAKSIES				Kleurreagens
	ETOH	80% ETOH	95 % ETOH	Etielasetaat	
Alkaloïede	-	-	-	-	Dragendorff se reagens
Fenole	-	-	-	+	Ammonium vanadaat-anisidien
Flavanoïede	-	-	-	+	NP/PEG
Terpenoïede	-	-	-	-	VS-reagens
Kardiale glikosiedes	-	-	-	-	Kedde se reagens
Antraseen derivate				-	10% etanoliese KOH

Slegs die bioaktiewe etielasetaat fraksie is verder met behulp van preparatiewe dunlaag chromatografie (P-TLC) gesuiwer (sien 5.1.2.6; 3.8). Alhoewel die asetoon fraksie, wat slegs tanniene bevat het bioaktief was, is dit nie verder gesuiwer nie aangesien geen farmaseutiese maatskappy daarin belangstel nie (Merck Pharmaceuticals; persoonlike mededeling).

5.2.3 Komponente geïsoleer met behulp van preparatiewe dunlaag chromatografie (P-TLC) uit die aktiewe etielasetaat fraksie



Plaat 2: Kwalitatiewe TLC-profiel van komponente in die metanoliese askorbiensuurekstrak van *C. edulis* wat met behulp van vloeistof-vloeistof chromatografie gefraksioneer is deur gebruik te maak van etielasetaat. Hierdie fraksie is verder met behulp van preparatiewe dunlaag chromatografie (P-TLC, sien 3.8) gesuiwer. (1-17 = geïsoleerde komponente). Mobiele fase : Etielasetaat : Metanol : Water (100:13,5:10). Stasionêre fase: Silikagel 60. Die plaat is ontwikkel met 5 % metanoliese H₂SO₄.

Plaat 2 illustreer komponente geïsoleer uit die aktiewe etielasetaat fraksie met behulp van preparatiewe dunlaag chromatografie (P-TLC). Sewentien verskillende fraksies is geïdentifiseer, afsonderlik van silikagel verwyder (sien 3.8) en na skoon eppendorfbuisies oorgedra. Elk van hierdie fraksies se antibakteriese aktiwiteit teen die bakterie *M. catharalis* is bepaal (tabel 4).

TABEL 4: Antibakteriese aktiwiteit van fraksies in 'n *C. edulis* ekstrak gefraksioneer deur vloeistof-vloeistof chromatografie met behulp van etielasetaat. Die etielasetaat fraksie is verder gesuiwer met behulp van preparatiewe dunlaag chromatografie (P-TLC) en die geïsoleerde semi-gesuiwerde fraksies getoets teen die gram negatiewe bakterie *M. catharalis*

Fraksies	Konsentrasie mg cm ⁻³	Sone deursnee mm
1	50	-
2	50	-
3	50	-
4	50	16
5	50	20
6	50	21
7	50	-
8	50	-
9	50	-
10	50	-
11	50	-
12	50	-
13	50	-
14	50	-
15	50	-
16	50	-
17	50	-

Drie verskillende bio-aktiewe semi-gesuiwerde fraksies, naamlik in bane 4, 5 en 6 van die 17 bane op die P-TLC plaat, is geïdentifiseer wat antibakteriese aktiwiteit teen die gram (-) bakterie *M. catharalis* getoon het. DMSO het geen bioaktiwiteit teen die bakterie getoon nie en dus kon aanvaar word dat die antibakteriese aktiwiteit van die onderskeie semi-gesuiwerde fraksies wat getoets is aan die aktiwiteite van die onbekende komponente daarin toegeskryf kon word.

Die antibakteriese aktiwiteit van die drie semi-gesuiwerde fraksies teen bekende mensbakterieë is ook bepaal (tabel 5).

TABEL 5: Antibakteriese aktiwiteit van 'n *C. edulis* metanoliese askorbiensuurekstrak wat m.b.v vloeistof-vloeistof chromatografie deur etielasetaat gefraksioneer is en m.b.v. preparatiewe dunlaag chromatografie (P-TLC) geskei is in afsonderlik komponente, waarvan drie aktiewe fraksies geïdentifiseer is en getoets is teen die toetsorganisme *M. catharalis* asook 9 menspatogene teen verskillende konsentrasies

Bakterie	Fraksienommer en Sonedeursnee (mm)																							
	4								5								6							
Komponente	1	2	3	4	5	6	7	8	1	2	3	4	5	6	7	8	1	2	3	4	5	6	7	8
Konsentrasies	15	11	9	-	-	-	-	-	16	12	8	-	-	-	-	-	17	13	11	-	-	-	-	-
<i>M. catharalis</i>	14	11	10	9	8	-	-	-	12	11	10	9	-	-	-	-	15	12	11	10	8	-	-	-
<i>H. influenzae</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>A. baumannii</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>E. coli</i>	10	-	-	-	-	-	-	-	11	-	-	-	-	-	-	-	10	-	-	-	-	-	-	-
<i>S. epidermidis</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>B. subtilis</i>	10	9	-	-	-	-	-	-	9	8	-	-	-	-	-	-	9	8	-	-	-	-	-	-
<i>S. aureus</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>P. aeruginosa</i>	11	10	9	-	-	-	-	-	13	10	8	-	-	-	-	-	12	10	8	-	-	-	-	-
<i>S. pneumoniae</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>S. pyogenes</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Verskillende konsentrasies is gebruik naamlik 1 = 10 mg cm⁻³; 2 = 5 mg cm⁻³; 3 = 2,5 mg cm⁻³; 4 = 1,25 mg cm⁻³; 5 = 0,625 mg cm⁻³; 6 = 0,3125 mg cm⁻³; 7 = 0,15625 mg cm⁻³ en 8 = 0,078125 mg cm⁻³ (tabel 5).

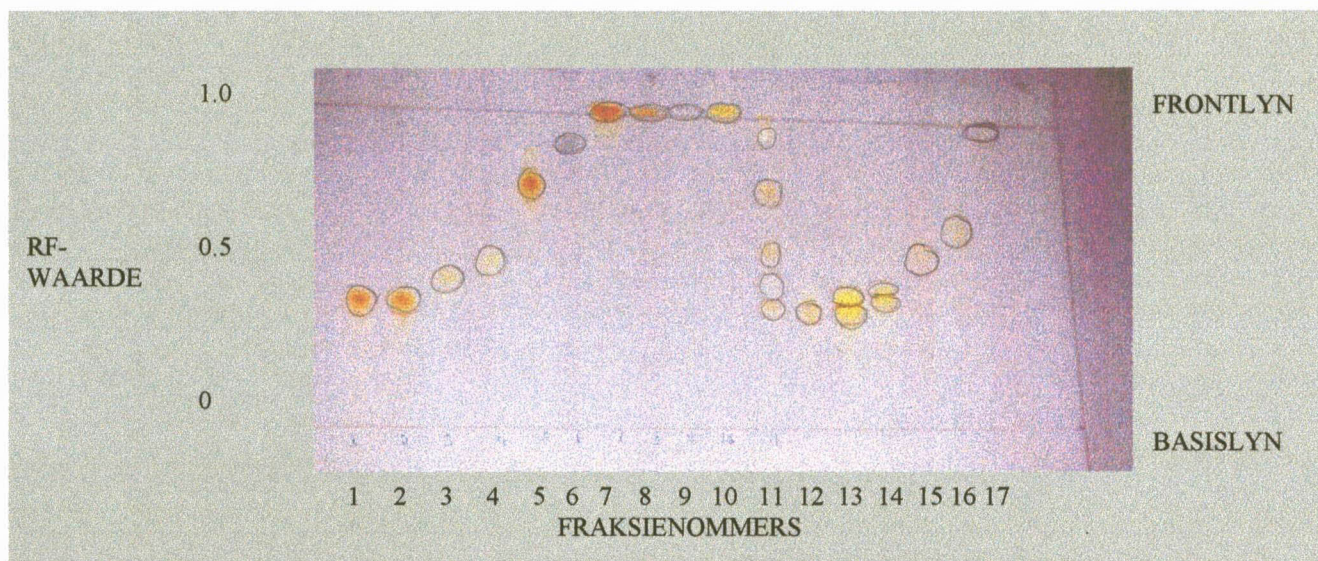
Die drie semi-gesuiwerde fraksies het definitiewe aktiwiteit teen *M. catharalis* getoon. Hierdie fraksies het biostatiese aktiwiteit teen die organismes *H. influenzae*, *S. epidermidis*, *S. aureus* en *S. pneumoniae* getoon terwyl die aktiwiteit duidelik afgeneem het namate konsentrasies verlaag is. Geen aktiwiteit teen die ander organismes is waargeneem nie. Die drie semi-gesuiwerde aktiewe fraksies is verder gesuiwer met behulp van preparatiewe dunlaag chromatografie (sien 5.1.2.7). Ses verskillende komponente is hieruit gesuiwer waarna die aktiwiteit (tabel 6) teen die gram negatiewe bakterie *M. catharalis* bepaal is. Resultate in tabel 6 illustreer die spesifieke groepe komponente waaraan die ses gesuiwerde komponente behoort asook die ooreenstemmende bioaktiwiteit van die ses gesuiwerde komponente teen die toetsorganisme *M. catharalis*.

TABEL 6: Die spesifieke groep komponente waaraan die ses bioaktiewe gesuiwerde komponente op bane 4,5 en 6 van 'n preparatiewe plaat na P-TLC skeiding van die drie semi-gesuiwerde fraksies in die aktiewe etielasetaat fraksie behoort, sowel as die bio-aktiwiteit teen die gram negatiewe bakterie *M. catharalis*

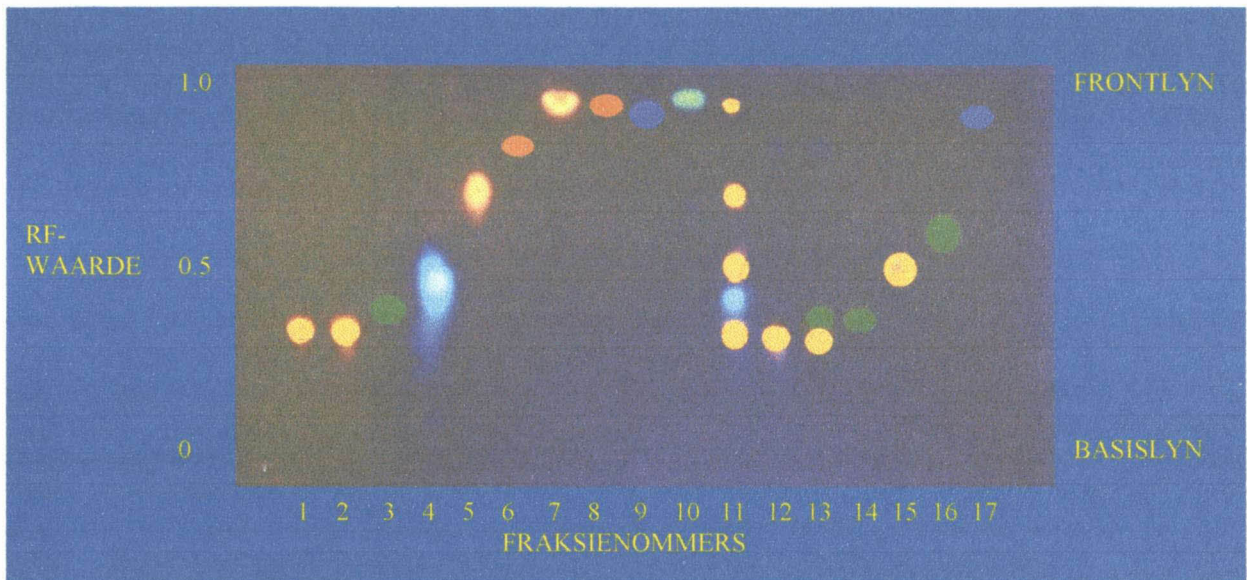
Komponent nommer	Inhibisiesone (mm)	RF-waarde	Kleur fluoressensie (365 nm)	Klas van sekondêre produk
1	10	0,2875	Pers	Fenole
2	13	0,356	Pers	Fenole
3	12	0,4125	Pers	Fenole
4	14	0,4625	Pers	Fenole
5	13	0,525	Pers	Fenole
6	10	0,6	Pers	Fenole

Al ses die gesuiwerde aktiewe komponente is as fenole geïdentifiseer (tabel 6). Op grond hiervan is die ses komponente met behulp van voorgeskrewe kleurreagense (Wagner en Blatt, 1996) en UV-lig (254 en 365 nm) asook bekende flavonoïedstandaarde verder geïdentifiseer.

5.2.4 TLC-profiel van ses gesuiwerde komponente in die bioaktiewe etielasetaatfraksie wat met behulp van preparatiewe dunlaag chromatografiese skeiding (P-TLC) gesuiwer is en identifikasie van afsonderlike komponente deur met bekende flavonoïedstandaarde te vergelyk



PLAAT 3: Kwalitatiewe TLC-profiel van ses komponente wat uit 'n etielasetaat fraksie van *C. edulis* met behulp van preparatiewe dunlaag chromatografie geïsoleer en gesuiwer is nadat tanniene verwyder is. Die ses komponente is met bekende flavonoïedstandaarde, na behandeling met die voorgeskrewe kleurreagens (Wagner en Blatt, 1996) vergelyk. (1= rutien, 2= rutosiel, 3= neohesperidien, 4= chlorogeensuur, 5= kwersitrien, 6= kwersetien, 7= dihidrokwersetien, 8= kaempferol, 9= hyperisien, 10= feruliensuur, 11= mengsel (rutien, chlorogeensuur, hyperosied, kwersitrien), 12= komponent 1, 13= 2, 14= 3, 15= 4, 16= 5, 17= 6). Mobiele fase: Etielasetaat : Mieresuur : Ysasynsuur : Water (100:11:11:26). Stasionêre fase: Silikagel 60. Die plaat is ontwikkel met NP/PEG kleurreagens



Plaat 4: Kwalitatiewe TLC-profiel van ses komponente wat uit 'n etielasetaat fraksie van *C. edulis* met behulp van preparatiewe dunlaag chromatografie geïsoleer en gesuiwer is nadat tanniene verwyder is. Die ses komponente is met bekende flavonoïedstandaarde, na behandeling met die voorgeskrewe kleurreagens (Wagner en Blatt, 1996), vergelyk onder 365 nm UV-lig. (1= rutien, 2= rutosiel, 3= neohesperidien, 4= chlorogeensuur, 5= kwersitrien, 6= kwersetien, 7= dihidrokwersetien, 8= kaempferol, 9= hyperisien, 10= feruliensuur, 11= mengsel (rutien, chlorogeensuur, hyperosied, kwersitrien), 12= komponent 1, 13= 2, 14= 3, 15= 4, 16= 5, 17= 6). Mobiele fase: Etielasetaat : Mieresuur : Ysasynsuur : Water (100:11:11:26). Stasionêre fase: Silikagel 60. Die plaat is ontwikkel met NP/PEG kleurreagens en fluoresserende kleure onder UV-365 nm waargeneem.

Plate 3 en 4 illustreer die ses gesuiwerde komponente wat met behulp van kwalitatiewe dunlaag chromatografiese skeiding geïdentifiseer is deur met bekende flavonoïed standaard, ten opsigte van kleurreaksies (plaat 3), en RF-waardes en UV-lig fluoressensie (plaat 4) na behandeling met die voorgeskrewe kleurreagens vir flavonoïede (Wagner en Blatt, 1996), te vergelyk. Die resultate word in tabel 7 opgesom.

Resultate in tabel 7 illustreer die antibakteriese aktiwiteite (inhibisiesone) van die ses komponente wat uit 'n etielasetaatfraksie van *C. edulis* gesuiwer is asook die identifikasie van spesifieke komponente deur met bekende flavonoïedstandaarde, ten opsigte van Rf-waardes en fluoesserende kleure na behandeling met die voorgeskrewe kleurreagens vir flavonoïede (Wagner en Blatt, 1996) te vergelyk.

TABEL 7: Identifikasie van ses aktiewe gesuiwerde komponente, geïsoleer uit die bioaktiewe etielasetaat fraksie met behulp van K-TLC skeiding, op grond van ooreenkomste met bekende flavonoïed standaard op grond van Rf-waardes en fluoesserende kleure. Bioaktiwiteit teen *M. catharalis* word ook aangedui.

Komponente	RF-waarde	Kleur	Komponentnaam wat 100 % met 'n bekende standaard ooreengestem het	Inhibisiesone
1	0,35	Oranje	Rutien	10
2	0,42	Groen	Onbekend	13
3	0,448	Groen	Neohesperidien	12
4	0,564	Oranje	Hyperosied	14
5	0,647	Groen-geel	Cactisien	13
6	0,987	blou	Feruliensuur	10

Al ses gesuiwerde komponente was aktief teen die gram negatiewe bakterie *M. catharalis*. Slegs vyf van die ses komponente nl. rutien, neohesperidien, hyperosied, cactisien en feruliensuur, kon geïdentifiseer word deur met bekende flavonoïed standaard te vergelyk terwyl een steeds onbekend bly. Cactisien is geïdentifiseer deur presies dieselfde grootte TLC- plate gebruik deur Wagner en Blatt (1996) te ontwikkel met dieselfde mobiele fase. Kleure en Rf-waardes wat ooreenstem met die verwysingsplate is gebruik vir identifikasie.

Die ses gesuiwerde komponente, insluitend die totale etielasetaat fraksie sowel as die asetoon fraksie wat slegs tanniene bevat het, se bioaktiwiteit is teen elf bekende menspatogene bepaal (tabel 8). Die komponente het selektiewe werking teen verskeie organismes getoon.

TABEL 8: Antibakteriese aktiwiteit van ses gesuiwerde komponente uit 'n etielasetaat fraksie van *C. edulis* met behulp van preparatiewe dunlaag chromatografie (P-TLC) teen bekende menspatogene. Die aktiwiteit van die tannienfraksie word ook aangedui.

Bakterie	Inhibisiesones (mm)							
	Suiwer komponente						Semi-gesuiwerde fraksies	
	1	2	3	4	5	6	Etielasetaat	Tanniene
	15 mg cm ⁻³						50 mg cm ⁻³	
<i>M. catharalis</i>	13	9	12	14	13	9	16	16
<i>B. subtilis</i>	-	-	-	-	-	8	10	13
<i>S. epidermidis</i>	10	10	9	12	12	9	16	16
<i>S. aureus</i>	11	10	9	11	11	8	16	12
<i>S. pneumoniae</i>	-	-	-	-	-	12	14	-
<i>S. pyogenes</i>	-	-	-	-	-	-	-	10
<i>H. influenzae</i>	-	-	-	-	-	-	-	10
<i>E. coli</i>	-	-	-	-	-	-	-	9
<i>K. pneumoniae</i>	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>P. aeruginosa</i>	-	-	10 (biostaties)	11	-	-	-	-
<i>A. baumannii</i>	-	-	-	-	-	-	-	-

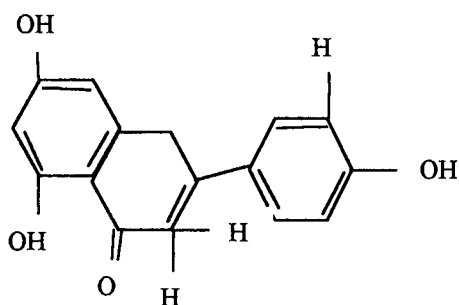
Al ses geïdentifiseerde komponente naamlik komponent 1 (rutien), komponent 2 (onbekend), komponent 3 (neohespiridien), komponent 4 (hyperosied) en komponent 5 (cactisien) was almal aktief teen die organismes *M. catharalis*, *S. epidermidis* en *S. aureus*. Neohespiridien en hyperosied was ook aktief teen *P. aeruginosa* maar hergroeï het plaasgevind by eersgenoemde.

Ferulien suur was die enigste komponent wat addisioneel aktiwiteit teen *B. subtilis* en *S. pneumoniae* getoon het. Nie een van die gesuiwerde komponente het egter enige aktiwiteit teen *S. pyogenes*, *H. influenzae*, *E. coli*, *K. pneumoniae* of *A. baumannii* getoon nie. Selfs nie eers die etielasetaat fraksie kon die groei van laasgenoemde lys weerstandbiedende bakterieë inhibeer nie.

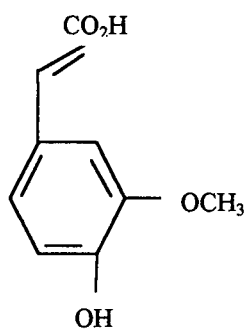
Die suiwer tannienfraksie het aktiwiteit teen *M. catharalis*, *B. subtilis*, *H. influenzae*, *S. epidermidis*, *E. coli*, *S. pyogenes* en *S. aureus* getoon. Die semi-gesuiwerde etielasetaat en tannien fraksies was beide teen 'n konsentrasie van 50 mg cm^{-3} getoets en die gesuiwerde komponente teen 'n konsentrasie van 15 mg cm^{-3} .

5.2.5 Struktuurformules van die aktiewe gesuiwerde komponente geïdentifiseer uit die bioaktiewe etielasetaatfraksie van 'n *Carpobrotus edulis* ru-ekstrak

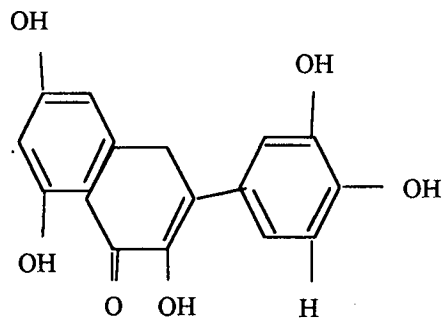
Figuur 1: Die molekulêre struktuur van neohesperidien



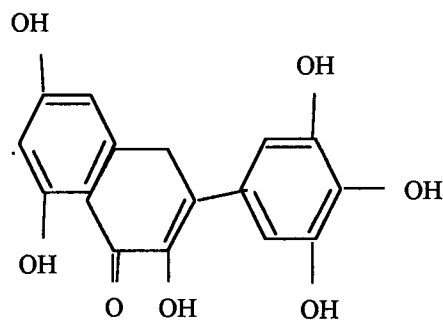
Figuur 2: Die molekulêre struktuur van feruliensuur



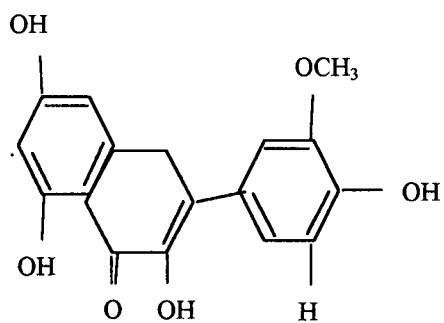
Figuur 3: Die molekulêre struktuur van hyperosied



Figuur 4: Die molekulêre struktuur van rutien



Figuur 5: Die molekulêre struktuur van cactisien



5.3 BESPREKING

Kwalitatiewe vooraf toetsing van 'n *C. edulis* ru-ekstrak het die teenwoordigheid van aktiewe komponente met antibakteriese eienskappe in die plant bevestig, maar suiwing van die aktiewe komponente was moeilik en aanvanklik is slegs beperkte sukses hiermee behaal (sien hoofstuk 4). Dit het aanleiding gegee tot die toepassing van 'n tweede ekstraheringstegniek, naamlik die vooraf verwydering van tanniene, voordat met die semi-suiwingstappe voortgegaan is (Hagerman, 1998). *Carpobrotus edulis* L. het 'n groot hoeveelheid tanniene in die blare wat grootskaalse suiwing van die aktiewe bestanddele uit die plant bemoeilik het, deurdat dit die bestanddele uit die waterige ekstrak gepresipiteer het en aanleiding gegee het tot 'n verlies aan aktiwiteit (Watt en Breyer-Brandwijk, 1962; Smith *et al.*, 1998; Hagerman, 1998). Met behulp van die tannienekstraheringsmetode van Hagerman (1998) is tanniene vooraf verwyder en dit het die suiwing van die aktiewe antibakteriese komponente uit *C. edulis* moontlik gemaak.

Tanniene besit egter self antibakteriese aktiwiteit en kan bydra tot die antibakteriese eienskappe van die plant, maar die suiwing van tanniene is baie moeilik en wetenskaplikes verkies om nie met tanniene te werk nie (Hagermann, 1998; Salisbury en Ross, 1992; Merck Pharmaceuticals, persoonlike mededeling).

Na verwydering van tanniene is aktiewe komponente in die etielasetaat fraksie geïdentifiseer, terwyl die diëtieleter fraksie geen aktiwiteit getoon het nie. Dus is die diëtieleter- sowel as die aseton tannienfraksies geïgnoreer en slegs verder met die bioaktiewe etielasetaatfraksie gewerk.

Hoofgroepe van aktiewe komponente in die etielasetaat fraksie is eerstens met behulp van kleurreagense geïdentifiseer (“fingerprinting”). Laasgenoemde behels die skeiding van komponente met behulp van dunlaag chromatografie en die vergelyking van die fluoresserende kleure onder UV- lig asook RF-waardes met die van bekende standaarde afhangende van die spesifieke groepe sekondêre produkte wat aanvanklik geïdentifiseer is (Wagner en Bladt, 1996).

TLC-skeiding van die etielasetaat fraksie en kleuring van die plate met behulp van verskillende kleurreagense het aanleiding gegee tot die identifikasie van komponente met basiese fenoliese strukture en daaropvolgend die teenwoordigheid van flavonoïede. Fenoliese metabolisme in plante is kompleks en behels ‘n wye verskeidenheid van komponente wat wissel van blompigmente tot die komplekse fenole in die plantselwand (lignien) (Salunke *et al.*, 1990). Flavonoïede besit antibakteriese aktiwiteit en dit is ook vir die flavonoïede in *C. edulis* bevestig.

Sewentien semi-gesuiwerde fraksies is geïdentifiseer met behulp van P-TLC-skeiding en elk se bioaktiwiteit bepaal. Slegs drie aktiewe semi-gesuiwerde fraksies is in die etielasetaat fraksie geïdentifiseer wat aktief teen die gram negatiewe bakterie *M. catharalis* was. Dit het met vorige studies, waar daar ook drie aktiewe semi-gesuiwerde fraksies in die plant geïdentifiseer is, gekorreleer (ongepubliseerde resultate). Deur P-TLC-skeiding van die drie aktiewe semi-gesuiwerde fraksies is ses komponente geïsoleer. Elk van hierdie ses bestanddele was bioaktief teen die gram negatiewe bakterie *M. catharalis*.

Die kurkboormetode is gebruik vir die eenvoudige antibakteriese gradering ("screening") van die ses komponente, deurdat die komponente direk in kontak met die agar gebring is, wat diffusie deur die agar moontlik gemaak het. Waar die komponente wel 'n effek op die menspatogene gehad het, het inhibisiesones gevorm (Kwasniewska en Kaiser, 1983; Towers, 1984).

Hierdie ses komponente is met behulp van dunlaag chromatografie geïdentifiseer deur van bekende flavonoïedstandaarde gebruik te maak. Die komponente wat positief geïdentifiseer is sluit rutien, neohesperidien, cactisien, hyperosied en feruliensuur in. Een komponent ($R_f = 0.42$; fluoresser groen onder UV-365 lig) kon nie deur die metode geïdentifiseer word nie en bly dus onbekend. Die hoeveelheid van hierdie onbekende komponent wat uit 'n massa van 2 kg droë plantmateriaal herwin was, was te min vir identifikasie met behulp van KMR-spektroskopiese analise.

Al ses die gesuiwerde komponente was aktief teen die gram negatiewe bakterie *M. catharalis*, wat as toetsorganisme gebruik is, asook teen die gram positiewe cocci *S. epidermidis* en *S. aureus*.

Feruliensuur het selektiewe werking teen die gram positiewe endosporvormer *B. subtilis*, asook die gram positiewe cocci *S. pneumoniae* gehad. Neohesperidien en hyperosied was ook selektief aktief teen die gram negatiewe bakterie *P. aeruginosa*, maar hergroei het plaasgevind by eersgenoemde.

Uit hierdie studie het dit geblyk dat ses komponente met antibakteriese eienskappe, geïdentifiseer as flavonoïede, in die plant *C. edulis* teenwoordig is. 'n Volledige bespreking van die aktiwiteite van die geïdentifiseerde komponente asook die bakterieë wat in hierdie studie gebruik is om die antibakteriese potensiaal van die plant te bepaal, word in die hoofstuk 6 meer volledig bespreek.

HOOFSTUK 6

ALGEMENE BESPREKING

Die hoofdoel van hierdie studie was om die anti-mikrobiese aktiwiteit van *Carpobrotus edulis* L. te bepaal asook om die moontlike aktiewe komponente te identifiseer. 'n Waterige ru-ekstrak van die blare van *C. edulis* L. is aanvanklik vir hierdie doel gebruik. Die keuse het op hierdie spesifieke plant geval aangesien die blare en vrugte van *C. edulis* reeds sedert die agtiende eeu deur die mens vir farmakologiese doeleindes gebruik is. In die familie Mesembryanthemaceae is *C. edulis* die belangrikste spesie en word veral in die Wes-Kaap Provinsie van Suid-Afrika op duine aangeplant om laasgenoemde te stabiliseer, terwyl *C. acinaciformis* en *C. deliciosus* ook tot 'n mindere mate benut word deur die plaaslike bevolking (Smith *et al.*, 1998).

Die sap van die blare van *C. edulis* besit sametrekkende eienskappe en word algemeen gebruik vir die behandeling van seer keel asook fungale infeksies by die mens (Smith *et al.*, 1998). Met hierdie studie is gepoog om die bekende tradisionele gebruike van *C. edulis* L. (sien hoofstuk 2) met moontlike antifungale aktiewe komponente (hoofstuk 4) asook anti-bakteriese komponente (hoofstuk 5) in die plant te korreleer en te identifiseer.

Kwalitatiewe voorlopige studies, om die aanspraak dat *C. edulis* oor anti-mikrobiese potensiaal beskik (hoofstuk 4), het bevestig dat die waterige ru-ekstrak aktief was teen die gram negatiewe bakterie *M. catharalis*.

Hierdie ru-ekstrak is verder gesuiwer met behulp van vloeistof-vloeistof en kolomchromatografie. Slegs die diëtieleterfraksie, bekom na direkte vloeistof-vloeistof chromatografie van die ru-ekstrak, was aktief. Uit hierdie nie-polêre diëtieleter fraksie is ses gekombineerde kolomfraksies versamel waarvan drie aktief teen die toetsorganisme *M. cataharalis* was. Hierdie drie aktiewe kolomfraksies is ook teen die gram positiewe bakterie *S. lutea* getoets, maar nie een het enige aktiwiteit daarteen getoon nie.

Die oorblywende polêre fraksie was egter ook aktief teen laasgenoemde gram negatiewe sowel as gram positiewe bakterieë wat daarop gedui het, dat meer as een komponent met anti-bakteriese eienskappe waarskynlik in die ru-ekstrak voorgekom het. Hierdie antibakteriese maar ook sametrekende eienskappe van die blaar ru-ekstrak is voorheen toegeskryf aan die teenwoordigheid van tanniene, malaat- en/of sitroensuur (Watt en Breyer-Brandwijk, 1962; Fuller en Gallon, 1985).

Dit is egter ook bekend dat die plant anti-fungale aktiwiteit teen swamme wat mens infekteer besit (Smith *et al.*, 1998), maar die aktiwiteit teen plantswamme is nog onbekend. Drie algemene plantswam spesies naamlik *Phoma* spp., *Fusarium oxysporum* en *Botrytis cinerea* is gebruik om die bio-aktiwiteit te bepaal. *Phoma* spp wat verrotting by sade veroorsaak, *Botrytis cinerea* wat verrotting van vrugte veroorsaak en *Fusarium oxysporum* wat verrotting van stingels en saailing sterftes veroorsaak is van die bekende probleme geassosieer met hierdie swamme (Nene en Thopliyal, 1993). Nie een van die nie-polêre kolomfraksies of die oorblywende polêre fraksie, verkry deur die voorlopige suiweringsprotokol (sien hoofstuk 4), was aktief teen een van die swamme nie.

Verdere navorsing oor die anti-fungale aktiwiteit van *C. edulis* teen plant- en mensswamme word voorgestel in die nabye toekoms. Natuurlike sekondêre metaboliete geëkstraheer uit plante besit selde anti-fungale aktiwiteite (Caceres *et al.*, 1993) wat daarop dui dat plante oor die algemeen nie goed beskerm is teen swaminfeksies nie.

Die gis *Saccharomyces cerevisiae* is afhanklik van 'n etanoliese fermentasie proses vir die generering van relatief min energie vir groei in vergelyking met normaal respirerende selle. Slegs twee ATP molekules word deur die glikolise proses uit 'n glukose molekule gegenereer en dit word beweer dat hierdie energievrystelling nie genoeg is om die anaërobiese groei van laktaatsuur bakterie en giste te bevorder nie (Marsh, 1977). *Saccharomyces cerevisiae* was weerstandbiedend teen al die fraksies wat uit *C. edulis* deur middel van die voorlopige suiweringsprotokol geëkstraheer is. Dit kan moontlik daaraan toegeskryf word dat die aktiewe bestanddele in *C. edulis* ATP benodig om as groeiinhibeerders vir swamme te funksioneer. Hierdie aspek sal verdere ondersoek vereis.

Klem het dus op die verdere grootskaalse suiwering van komponente met antibakteriese eienskappe uit die waterige ru-ekstrak van *C. edulis*, geval (sien hoofstuk 4). Op hierdie wyse is twee aktiewe nie-polêre fraksies naamlik heksaan en diëtieleter, geïsoleer. Die aktiwiteit was min of meer gelykop tussen hierdie twee fraksies verdeel en duidelike ooreenkomste ten opsigte van TLC-profiel is waargeneem. Gevolglik is die twee fraksies gekombineer en verder saam gesuiwer met behulp van preparatiewe dunlaag chromatografie (P-TLC).

Die bio-aktiwiteit van die semi-gesuiwerde fraksies (afsonderlike bane op die P-TLC plaat) is bepaal nadat die bane afgekrap is. Die heksaan, diëtieleter, waterige ru-ekstrak asook die afsonderlike fraksies wat uit die gekombineerde heksaan/diëtieleter fraksie met behulp van P-TLC bekom is, se bio-aktiwiteit is teen bekende mensbakterieë bepaal (sien hoofstuk 4). Die doel hiermee was om 'n korrelasie tussen die aktiwiteite van die ru-ekstrak en semi-gesuiwerde fraksies te trek (sien hoofstuk 5).

Die waterige ru-ekstrak was aktief teen die gram negatiewe bakterieë *Moraxella catharalis*, *Escherichia coli* en *Pseudomonas aeruginosa*, maar by laasgenoemde het hergroei plaasgevind en was dit dus biostaties. Hierdie ekstrak het geen aktiwiteit teen die gram negatiewe bacillus *Klebsiella pneumoniae* getoon nie, maar wel teen die gram positiewe bakterieë *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Streptococcus pneumoniae* en *Streptococcus pyogenes*, asook die gram positiewe spoorvormende aërobiese bakterie *Bacillus subtilis*.

Die heksaan fraksie was aktief teen tien van die elf bakterie. In die geval van *Pseudomonas aeruginosa* het hergroei egter plaasgevind (biostaties) en geen aktiwiteit is teen die gram negatiewe bacillus *Klebsiella pneumoniae*, waargeneem nie.

Die diëtieleterfraksie het duidelike ooreenkomste met die aktiwiteit van die heksaanfraksie getoon maar was meer selektief in werking. Dit kan moontlik toegskryf word aan sekere komponente wat meer prominent in die diëtieleterfraksie na vore gekom het.

Meer selektiewe werking is veral teen die gram negatiewe bakterie *M. catharalis* asook die gram positiewe bakterieë *S. pneumoniae* en *S. pyogenes* waargeneem. Hierdie fraksie het ook biostatiese aktiwiteit teen die gram negatiewe bakterie *P. aeruginosa* getoon. Beide fraksies, hekasaan en diëtieleter, was aktief teen die gram negatiewe bakterie *Haemophilus influenzae* maar suiwering van die gekombineerde hekasaan en diëtieleter fraksies het 'n duidelike verlies aan aktiwiteit getoon en het gelei tot die direkte ekstrahering van aktiewe komponente uit die droë plantmateriaal (sien hoofstuk 4). Hierdie tegniek was ook nie suksesvol om die verlies aan aktiwiteit te verhoed nie en 'n nuwe tegniek waar tanniene vooraf verwyder is (Hagerman, 1998), is gebruik om aktiewe komponente uit die plantmateriaal te ekstraheer (sien hoofstuk 5). Die vermoede het bestaan dat die verlies aan aktiwiteit aan die teenwoordigheid van tanniene toegeskryf kon word vanweë die presipiteringsaksie wat voorheen beskryf is (Hagerman, 1998). Die vooraf verwydering van tanniene het die suiwering van aktiewe komponente in die plant moontlik gemaak (sien hoofstuk 5).

Die tannieninhoud fluktueer gedurende die jaar (Jansman, 1993; Ewing en Fife, 1972). Plantmateriaal wat deur middel van die voorlopige kwalitatiewe suiweringsprotokol gesuiwer is, is in Aprilmaand versamel wanneer die tannieninhoud maar 0,5 % of laer is as aan die einde van die groeiseisoen (Harborne, 1991). Weinig verlies aan anti-bakteriese aktiwiteit is met hierdie ekstrakte ondervind. Maar, vir die grootskaalse suiwering en direkte ekstrahering van aktiewe komponente uit die droë plantmateriaal, is die materiaal in die groeiseisoen versamel wanneer die tannieninhoud tot so hoog as 5 % kan wees (Harborne, 1991).

Deur die fluktuasie van die tannieninhoud word meer of minder sekondêre produkte soos fenole, alkaloiëde ens. uit die ru-ekstrak gepresipiteer wat tot 'n fluktuierende verlies aan anti-bakteriese aktiwiteit tydens die suiweringsproses aanleiding kon gee (Hagermann, 1998).

Na die verwydering van tanniene is verskeie fraksies geïsoleer. Die etanoliese askorbiensuurfraksie het meesal lae molekulêre fenole bevat en het geen antibakteriese aktiwiteit getoon nie. Die metanoliese askorbiensuurfraksie, wat tanniene en fenole bevat het, was wel aktief en is verder gesuiwer met behulp van vloeistof-vloeistof chromatografie waar organiese oplosmiddels in 'n 1:1 (v/v) verhouding gebruik is (hoofstuk 5).

Die aktiewe etielasetaat fraksie wat op hierdie wyse bekom is was die enigste aktiewe fraksie en het dus alle aktiewe komponente verwyder. Slegs tanniene en ander nie-aktiewe komponente het in die waterige fraksie oorgebly. Beide 80 % en 95 % etanol is gebruik om (Hagerman, 1998) seker te maak dat geen aktiewe komponente in die waterige fraksie oorgebly het nie. Die tanniene in hierdie waterige fraksie is in asetoon opgelos en die bio-aktiwiteit bepaal.

Tanniene is wateroplosbare polifenoliese komponente wat baie polêr is en wat diverse effekte op biologiese sisteme het omdat hulle potensiële metaalioonchelators, proteïenpresipiteringsagente sowel as biologiese anti-oksidente is (Freudenberg en Weinges, 1962; Hagerman *et al.*, 1997). Beide die tannienfraksie sowel as die etielasetaatfraksie was besonder aktief teen die gram negatiewe bakterie *M. catharalis*. Die tannienfraksie is egter geïgnoreer om redes wat voorheen genoem is.

Slegs die komponente in die bioaktiewe etielasetaatfraksie is verder gesuiwer met behulp van preparatiewe dunlaag chromatografiese (P-TLC) skeiding. Uit hierdie fraksie is sewentien semi-gesuiwerde fraksies (verskillende bane op die P-TLC plaat) geïdentifiseer, waarvan drie aktief teen die gram negatiewe toetsorganisme *M. catharalis* was. Dit het gekorreleer met die aktiwiteit van drie semi-gesuiwerde kolomfraksies wat tydens die voorlopige suiweringsprotokol geïdentifiseer is (sien hoofstuk 4). Hierdie drie semi-gesuiwerde fraksies het almal positief getoets vir basiese fenole en is vervolgens ook getoets teen bekende mensbakterieë in 'n konsentrasiereeks tussen 0,078 en 10 mg cm⁻³. Die laagste konsentrasie waar aktiwiteit waargeneem is, was 2,5 mg cm⁻³.

Op grond van die basiese fenoliese struktuur van hierdie drie semi-gesuiwerde komponente is getoets vir die teenwoordigheid van flavonoïede (hoofstuk 5). Al drie fraksies het positief getoets vir die teenwoordigheid van flavonoïede. Flavonoïede kom algemeen in die blaarkutikula en epidermisselle van plante voor en beskerm plante teen die skadelike effekte van UV-bestraling en anti-mikrobiële infeksie (Bruneton, 1995). Farmaseutiese toepassings van flavonoïede sluit in die verlaging van aar permeabiliteit en die behandeling van geringe sirkulatoriese wanordes. Flavonoïede besit ook anti-inflammatoriese eienskapper (Smith *et al.*, 1998). Verskeie flavonoïede en ander fenoliese verbindings reageer met vry radikale om die degradasie van membrane te verhoed deur die aksie van vry radikale op membraan fosfolipiede te verhoed (Bruneton, 1995). Hulle kan dus as anti-oksidente optree en in die algemeen tree flavonoïede ook *in vitro* op as ensiemhhibeerders.

Dit verduidelik die anti-inflammatoriese en anti-allergiese eienskappe wat wyd voorkom in 'n verskeidenheid van natuurlike produkte (Hostettmann *et al.*, 1995).

Deur preparatiewe dunlaag chromatografiese (P-TLC) skeiding van die drie semi-gesuiwerde fraksies, is ses aktiewe komponente geïsoleer, gesuiwer en as flavonoïede geïdentifiseer. Almal was bioaktief teen die gram negatiewe bakterie *M. catharalis*. Hierdie komponente is geïdentifiseer met behulp van kwalitatiewe dunlaag chromatografie (K-TLC) op grond van fluoresserende kleure en Rf-waardes deur met bekende flavonoïed standarde te vergelyk. Vyf van die ses komponente kon op hierdie wyse geïdentifiseer word.

Komponent een ($R_f = 0.35$) is geïdentifiseer as rutien en was aktief teen die gram negatiewe bakterie *M. catharalis* asook die gram positiewe bakterieë *S. epidermidis* en *S. aureus*. Alhoewel rutien redelik algemeen in plante voorkom, besit slegs 'n klein hoeveelheid medisinale plante, wat tans gebruik word, genoegsame hoeveelhede vir industriële ekstrahering (Bruneton, 1995). Van die drie algemeenste bronne wat genoeg rutien bevat is *Sophora japonica* L., *Fagopyrum esculentum* Moerich., *F. tataricum* L en *Eucalyptus macrorrhyncha* L. (Bruneton, 1995). Die rutieninhoud in eersgenoemde wissel tussen 15 – 20 % en word algemeen gebruik vir die kleuring van sy. *Fagopyrum esculentum* word kommersieël verbou omdat dit eetbare stysel bevat en die rutieninhoud wissel tussen 5- 8 %. Die rutieninhoud in *Eucalyptus macrorrhyncha* is in die omgewing van 10 % (Bruneton, 1995).

Rutien en sy derivate word soms gekombineer met alkaloiëde en in geneesmiddels gebruik vir die behandeling van simptome van seniele serebrale gebreke (Vlahov, 1992). Rutien word ook gebruik om die effektiwiteit van vitamien C te verbeter. 'n Paar bioflavonoïede, onder andere rutien, help om kapillêre bloedvate en vesels te versterk, om die broosheid van die are te verminder asook om daaropvolgende bloeding en kneusing as gevolg van verswakte are te verminder. Rutien verlig ook enige moontlike mikrotrauma op die weefsel (Smith *et al.*, 1998).

Komponent twee ($R_f = 0.42$) kon nie geïdentifiseer word nie alhoewel dit positief getoets het vir 'n flavonoïed. Die konsentrasie droë materiaal wat uit 'n totale massa van 2 kg plantmateriaal herwin is was ook te min vir identifikaie deur KMR-spektroskopiese analise. Hierdie komponent was wel aktief teen die gram negatiewe bakterie *M. catharalis*, asook die gram positiewe bakterieë *S. epidermidis* en *S. aureus*.

Komponent drie ($R_f = 0.45$) is as die bekende flavonoïed neohesperidien geïdentifiseer. Hierdie molekule word gekenmerk deur die afwesigheid van 2,3-dubbelbindings en deur die teenwoordigheid van ten minste een asimmetriese middelpunt (Markham, 1982). Hierdie flavonoïed is minder algemeen as sy onversadigde homoloë en die meeste plantfamilies akkumuleer gewoonlik C-alkiel derivate daarvan (Markham, 1982). Neohesperidien was aktief teen die gram negatiewe bakterie *M. catharalis* asook die gram positiewe bakterieë *S. epidermidis* en *S. aureus*, maar, alhoewel dit ook aktief teen die gram negatiewe bakterie *P. aeruginosa* was, het hergroei plaasgevind en was die aktiwiteit dus biostaties.

Komponent vier ($R_f = 0.56$) is positief as hyperosied geïdentifiseer en was aktief teen die gram negatiewe bakterieë *M. catharalis* en *P. aeruginosa*, sowel as teen die gram positiewe bakterieë *S. epidermidis* en *S. aureus*. Hyperosied is teenwoordig in 'n verskeidenheid van plante, onder andere *Ribes nigrum* (Bruneton, 1995). Die vrugte van hierdie plant is ryk aan suikers (10 –15 %) en organiese sure en bevat ook flavanolglikosiedes en antraseen derivate. Die blare bevat ook 'n klein hoeveelheid essensiële olies en baie flavonoïede onder andere hyperosied, wat bydra tot die anti-inflammatoriese eienskap van die plant (Bruneton, 1995).

Komponent vyf ($R_f = 0.65$) bekend as cactisien was aktief teen die gram negatiewe bakterie *M. catharalis* en die gram positiewe bakterie *S. epidermidis* en *S. aureus*. Hierdie polimere is 'n vorm van gekondenseerde tanniene (Bruneton, 1995) en die basiese strukturele elemente van hierdie polimere is flavan-3-ol.

Die biologiese eienskappe van tanniene word verbind met hulle vermoë om komplekse met makromolekules, veral proteïene, te vorm (Jansman, 1993). Dit verduidelik probleme ondervind in die voedseltegnologie naamlik melkerigheid in bier, asook in landbou waar dit die voedingswaarde van veevoer verlaag. Die gebruike van tannien-bevattende geneesmiddels is beperk en kan toegeskryf word aan hulle affiniteit vir proteïene. Inwendig kan tanniene as lakseermiddels aangewend word en selfs, vanweë hulle antimikrobiese aktiwiteit, help om diarree en dermatitis teen te werk. Uitwendig kan hulle aangewend word om die lae van die vel en mucus te beskerm en het ook 'n vasokonstriksie effek op klein are.

Deur beperking van die verlies aan vloeistowwe en beskerming teen uitwendige aanvalle, help tanniene om die regenerasie van weefsel te versnel en sodoende oppervlakkige brande en wonde te genees (Bruneton, 1995). Die potensiaal van tanniene in die inhibering van lipied peroksidase is bekend, hulle tree op as anti-oksidante deurdat hulle vry radikale verwyder en tree ook op as inhibeerder van peroksiedioonvorming (Bruneton, 1995). Die inhiberingseffek op virusreplikasie *in vitro* is ook bekend, te same met hulle effek as ensiem inhibeerders. Ten spyte van al hierdie moontlike positiewe gebruike van tanniene, stel farmaseutiese maatskappye nie belang om hierdie groep verbindings in kommersiële produkte te ontwikkel nie. Dieselfde mag moontlik vir die tannien-derivaat cactisien geld.

Komponent ses ($R_f = 0.987$) staan bekend as feruliensuur en was aktief teen die gram negatiewe bakterie *M. catharalis*, asook die gram positiewe bakterie *B. subtilis*, *S. epidermidis*, *S. pneumoniae* en *S. aureus*. Die meeste C6-C3 fenoliese sure, waaronder feruliensuur, is wyd verspreid. Fenoliese sure besit ten minste een karboksielgroep en 'n fenoliese hidroksielgroep. Huidig is hierdie term van toepassing op derivate van bensoësuur en kaneelsuur (Bruneton, 1995). Baie min is egter bekend oor die anti-septiese eienskappe van hierdie komponent, maar dit word algemeen gebruik as 'n billiëre geneesmiddel vir die simptomatiesse behandeling van dispepsie. Dispepsie is slegte spysvertering wat ook galaanvalle insluit (Bruneton, 1995). Die tannienfraksie se aktiwiteit het 100 % gekorreleer met die van feruliensuur maar was ook aktief teen die gram negatiewe bakterieë *M. catharalis*, *E. coli* en *H. influenzae* asook teen die gram positiewe bakterie *S. epidermidis*, *S. aureus*, *S. pyogenes* en *B. subtilis*.

Die anti-bakteriese aktiwiteit van tanniene is bekend en kan gebruik word in die behandeling van infektiewe diarree (Bruneton, 1995). Die tannien fraksie was die enigste een wat aktief was teen die gram negatiewe intestinale bakterie *E. coli* wat algemeen in die dermkanaal van mens en dier voorkom. Dit het ook gekorreleer met die aktiwiteit van die heksaanfraksie (sien hoofstuk 4) en die teenwoordigheid van tanniene in hierdie fraksie bevestig.

Escherichia coli kan voordelig wees vir die gasheer deurdat dit 'n bron van vitamienes kan wees wat ook die groei van moontlike patogeniese organismes in die dermkanaal verhoed (Morello *et al.*, 1984). 'n Verhoging in die getalle van *E. coli* kan egter ook nadelig wees vir die mens. Die algemene oorsaak van verhoogde getalle *E. coli* is blaaspyp- asook nierpypinfeksies. Epidemiese diarree van pasgebore babas kan ook die gevolg van *E. coli* wees (Meyer, 1974).

Nie een van die gesuiwerde komponente was aktief teen die gram negatiewe bakterie *Haemophilus influenzae* nie, maar die tannienfraksie, asook die heksaan en di-etieleter fraksies verkry tydens die voorlopige suiweringsprotokol, was wel aktief (sien hoofstuk 4). Die inhiberingseffek van tanniene op virusreplikasie *in vitro* is algemeen bekend. Gedurende die goue era van bakteriologie is hierdie organisme verkeerdelik as 'n bakterie gesien, maar dit is later waargeneem om eerder soos 'n virus op te tree (Meyer, 1974). *Haemophilus influenzae* is die mees algemene oorsaak van meningitis (harsing-en rugmurgvliesontstekking) wat kenmerkend is by kinders onder twee jaar (Meyer, 1974).

Dit is ook die oorsaak van obstruktiwe strottehooftrageale infeksie wat gewone seerkeel kan veroorsaak maar wat fataal by kinders kan wees deurdat die pasiënt nie asem kan kry nie (Meyer, 1974). Die bakterie is deel van die normale respiratoriese flora by mense en kan 'n variasie van infeksies veroorsaak, veral in die boonste respiratoriese lugweg by alle ouderdomsgroepe (Meyer, 1974). Infeksies veroorsaak deur die organisme kan behandel word deur 'n hele aantal antibiotikums, maar ampicillin word die algemeenste gebruik. Tanniene is ook aktief teen die gram positiewe *S. epidermidis*, *S. aureus*, *S. pyogenes* en *S. pneumoniae*.

Staphylococcus epidermidis is sferiese, gram positiewe bakterieë wat nie-patogenies is nie. Hulle kom algemeen op die vel voor, maar as dit in die bloedstroom beland kan dit die oorsaak wees van bloedvergiftiging, ook bekend as septikemie. Dit kan ook endokarditis veroorsaak. Dit is 'n toestand gekenmerk deur inflammatoriese veranderinge van die endokardium, veral beperk tot die kleppe, en is gewoonlik die gevolg van rumatiekkoors of bakteriese infeksies (Meyer, 1974).

Staphylococcus aureus dek 'n wye spektrum van infeksies. Van lokale infeksies in die vel tot fokale infeksies van dieperliggende weefsels wat toksiese effekte kan hê en dan ook moontlik kan lei tot die dood. Die oorsaak van hierdie infeksies is wanneer endogene staphylococci dieperliggende weefsel binnedring deur gebreke vel. Die velinfeksies veroorsaak deur *S. aureus* lei tot absesse wat kan wissel van 'n eenvoudige puisie tot pynlike bloedvinte of karbonkels (negeooog) (Meyer, 1974).

Bloedvinte ontstaan as gevolg van absesse wat gelokaliseerd in die haarsakkies vorm. Hulle kom nie op die kop voor nie, maar op enige ander liggaamsoppervlakte wat met hare bedek is. Karbonkels is dieperliggende absesse in die weefsel. *Staphylococcus aureus* veroorsaak ook moontlik skarlakenkoors. Klassieke simptome van die siekte sluit in koors, hipotensie, kopseer, braak, diarree, neurologiese abnormaliteite en veluitslag (Morello *et al.*, 1984). *Staphylococcus aureus* produseer ook 'n enterotoksien wat lei tot voedselvergiftiging. Bekende simptome sluit in mislikheid, braking en diarree. Penisillien was in die verlede algemeen gebruik vir die behandeling van infeksies veroorsaak deur *S. aureus*. Die bakterie word beskou as een van die mees algemene en wydverspreide menspatogene. Omdat hierdie bakterie nie baie probleme met groeikondisies het nie, groei hulle omtrent enige plek en kan selfs vir lang periodes oorleef onder swak toestande totdat hulle 'n geskikte gasheer vind. Hulle versprei deur direkte of indirekte kontak. Direkte kontak sluit in oordrag deur respiratoriese druppels afkomstig van 'n draer van *Staphylococci*. Indirekte kontak is oordrag van die organisme na 'n geskikte gasheer na 'n periode wat die organisme buite die gasheer spandeer het (Meyer, 1974).

Streptococcus pneumoniae veroorsaak hoofsaaklik longinfeksies en kom meestal voor as primêre infeksies, maar kan ook die oorsaak van sekondêre infeksies wees na griep. *Staphylococci* kom normaalweg in die ingewande voor waar hulle getalle laag gehou word deur kompeterende mikroorganismes. Hulle getalle kan verhoog as mense byvoorbeeld chemoterapie ontvang en dit lei tot irritasie en inflammasie van die ingewande as die bakterie se getalle toeneem (Meyer, 1974).

Streptococcus pneumoniae het in die veertiger jare die sterftesyfer aansienlik verhoog as gevolg van longontsteking by die mens. Hierdie organisme veroorsaak longontsteking bloot deur die feit dat hulle so gou vermeerder en weerstandbiedend is teen fagositose. Longontsteking begin as die organisme toegang kry tot die alveoli van die longe, as die virulensie van die organisme hoog genoeg is en die weerstand van die gasheer laag genoeg is sodat die organisme vinnig vermeerder. Dit veroorsaak die vorming van 'n vloeistof wat wit en rooibloedselle bevat en wat die respirasie en asemhalingsproses van die gasheer negatief beïnvloed. Penisillien is die mees algemene geneesmiddel vir die behandeling teen infeksies veroorsaak deur *S. pneumoniae* (Morello *et al.*, 1984).

Streptococcus pyogenes veroorsaak 'n wye reeks van siektes wat gevaarlikes soos skarlakenkoors en rumatiekkoors insluit. Wanneer die bakterie in redelike getalle in kliniese materiaal in hospitale voorkom loop pasiënte die gevaar om siektes op te doen. Penisillien G word hoofsaaklik gebruik vir die behandeling van infeksies veroorsaak deur *S. pyogenes* by persone wat nie 'n hipersensitiewe reaksie teen die geneesmiddel toon nie (Morello *et al.*, 1984). As daar wel 'n hipersensitiewe reaksie voorkom kan erietromysien of linkomysien as geneesmiddels gebruik word.

Tanniene en feruliensuur was die enigste twee komponente wat aktief teen die gram positiewe, spoorvormende, aërobiese bakterie *B. subtilis* was. Hierdie bakterie kom voor in grond, plante of water maar kan selde in mensweefsel oorleef. Antraks, 'n akute aansteeklike siekte, kom meestal by herbivore voor en kan deur mense opgedoen word deurdat hulle geïnfekteerde vleis en dierprodukte eet (Meyer, 1974).

Nie een van die komponente was aktief teen die gram negatiewe bacillus *K. pneumoniae*, wat die algemene oorsaak van blaasweginfeksies is, asook nie teen *A. baumannii* wat opportunistiese of saprofietise patogene by die mens is nie (Meyer, 1974).

Hyperosied besit anti-inflammatoriese eienskappe en was die enigste komponent wat aktief was teen die gram negatiewe, aërobiese bacillus *P. aeruginosa*. Hierdie opportunistiese bakterie word die mees algemeen met menssiektes geassosieer en kan infeksies van wonde, brandwonde, oë en buite- sowel as middeloor infeksies veroorsaak. *Pseudomonas aeruginosa* is meesal ongevoelig vir antibiotikums, maar karbenisillien word meesal gebruik teen infeksies (Meyer, 1974). In hierdie opsig blyk dit of hyperosied 'n redelike potensiaal toon om in die toekoms as 'n alternatiewe anti-septikum teen *P. aeruginosa* ontwikkel te word.

Al ses die gesuiwerde komponente was aktief teen die gram negatiewe bacillus *M. catharalis*. Hierdie organisme kom gewoonlik op die oogbindvliese voor, maar die wasaksie van trane en die inhoud van lisosome help om die organismes te beheer. Dit is 'n algemene oorsaak van ooginfeksies by mens en dier. Die bakterie is 'n coccus wat verwant is aan *Neisseria*. Dit veroorsaak ook laer respiratoriese infeksies by volwassenes met kroniese longinfeksies (seerkeel) en is 'n algemene oorsaak van sinusitis by kinders (Baron, 1991).

Nie een van die gesuiwerde komponente was aktief teen die gram positiewe bakterie *S. lutea* nie. Die bakterie vorm 20 – 50 % van die mikroocci geïsoleer op die vel van die mens.

Bekende tradisionele gebruike van *C. edulis* naamlik as 'n anti-septiese middel teen inflammasie by brand- en snywonde korreleer met die teenwoordigheid van hyperosied, cactesien en tanniene (Roberts, 1995) in die plant. Aansluitend hierby help die teenwoordigheid van tanniene en cactesien om die regenerasie van weefsel in oppervlakkige wonde te versnel. Roberts (1995) het ook die plant gebruik om die gejeuk veroorsaak deur muskiet-, spinnekop- en vlooibyte te verlig, wat hy met die teenwoordigheid van tanniene in verband gebring het. Hierdie komponente verbind met die proteïene in gifstowwe en veroorsaak op hierdie wyse verligting van die byt irritasies.

'n Ru-ekstrak van *C. edulis* blare, berei as 'n konkoksie met warm water, help met die verligting van seer keel en dit korreleer met die anti-bakteriese aktiwiteit teen *H. influenzae* en *M. catharalis* (Watt en Breyer-Brandwijk, 1962). Volgens Watt en Breyer-Brandwijk (1962) kan die sap van die blare ook as 'n lakseermiddel gebruik word wat korreleer met die teenwoordigheid van feruliensuur, tanniene en cactesien.

Die komponente tannien, rutien en cactesien is verantwoordelik vir die anti-septiese en sametrekkende, bloedstollende eienskappe van die plant (Watt en Breyer-Brandwijk, 1962). Hierdie drie komponente is bekend vir hulle effek op are, deurdat hulle die are versterk en beskerm teen moontlike kneusing en beskadiging wat tot bloeding kan lei.

Die gevolgtrekking wat uit hierdie studie gemaak kan word, is dat *C. edulis* oor anti-bakteriese aktiwiteite beskik wat wel selektief in werking is maar wat tog van die belangrikste menspatogene inhibeer. Die negatiewe resultate wat met die gesuiwerde komponente teen gram negatiewe bakterieë gevind is was te wagte aangesien hierdie klas bakterieë meer weerstandbiedend is as gram positiewe bakterieë (Batista *et al.*, 1994; artin, 1995). Die waterige ru-ekstrak het egter wel redelike tot goeie beheer van *P. aeruginosa* asook *E. coli* en *M. catharalis* respektiewelik getoon en al drie hierdie bakterieë behoort aan die gram negatiewe klas. Hieruit blyk dit dat geïsoleerde komponente in kombinasie 'n breër spektrum van beher kan uitoefen, waarskynlik vanweë moontlike sinergetiese werking en dit sal die moeite werd wees om hierdie aspek in die toekoms te ondersoek.

Van die belowendste waarnemings is die antibiotiese (nie bioastatiese nie) beheer wat die flavonoïed hyperosied in sy gesuiwerde vorm op die groei van die gram negtiewe patogeen *P. aeruginosa* uitgeoefen het. Hierdie bakterie is 'n groot probleem in hospitale en waarskynlik verantwoordelik vir die meeste van die infeksies wat pasiënte hier sekondêr kan opdoen. Die kommersiële gebruik van hyperosied in hierdie verband kan oorweeg word.

Onder die plaaslike bevolking van Suid-Afrika is *C. edulis* reeds as 'n tradisionele medisinale plant gevsetig. Oor die moontlike kommersiële waarde daarvan kan op hierdie stadium slegs gespekuleer word maar dit blyk of die plant ook breër ten opsigte van ander moontlike toepassings geanaliseer moet word. Die antibakteriese potensiaal alleen sal waarskynlik nie aan die plant komersiële status verleen, of dan die potensiaal om as 'n alternatiewe gewas ontwikkel te word nie. Verdere studies op veral gram negatiewe bakterieë en virusse kan egter dalk lonend wees.

BYLAE

(a) Asetileringsproses (Harwood en Moody, 1989)

Droging van puridien:

By 'n volume van puridien word natriumhidroksied korrels gevoeg en oornag in dampkas gelaat.

Volume puridien gebruik:

Volume puridien > mg puridien

$$\begin{aligned} \text{mg van komponent} &= \frac{\text{mg/komponent}}{\text{mg/puridien}} \quad \times \quad \text{volume van komponent} \\ &= \text{volume puridien gebruik} \end{aligned}$$

Byvoorbeeld:

$$\begin{aligned} 30 \text{ mg} &> 500 \mu\text{l} \\ 5,4 \text{ mg} &= \frac{5,4 \text{ mg}}{30 \text{ mg}} \quad \times \quad 500 \\ &= 90 \mu\text{l} \end{aligned}$$

PROSES

Los komponent op in bekende volume puridien en voeg daarby twee maal die volume Ac_2O (“acetic anhydride”). Byvoorbeeld $90 \mu\text{l}$ puridien + $(90 \times 2) \mu\text{l}$ Ac_2O . Hierdie mengsel word oornag gelaat om te asetileer op ‘n warm plek byvoorbeeld buite ‘n warm oond. Na 8 – 12 ure word die mengsel in fyn ys gelaat om te presipiteer en word dan gefiltreer met behulp van ‘n gesinteriseerde glastregter, om die oortollige puridien te verwyder, met koue gedistilleerde water. Die gepresipiteerde materiaal word weer opgelos in asetoon of chloroform. Hierna word weer ‘n K-TLC skeiding gedoen om die TLC-profiel te vergelyk met die gewone kwalitatiewe TLC. ‘n Skoon komponent wat “streak” dui ‘n suur aan en ‘n bietjie ysasynsuur moet by die mobiele fase gevoeg word om ‘n beter skeiding te gee.

(b) Kleurreagense (Wagner en Bladt, 1996)

(1) Dragendorff se reagens

Oplossing A: Los 0,85 g bismut nitraat op in 10 ml ysasynsuur en 40 ml water. Verhit en filtreer indien nodig.

Oplossing B: Los 8 g kaliumjodied op in 30 ml water.

Meng twee oplossings in 'n 1:1 (v/v) verhouding.

Kleurreagens: 1 ml van die oplossing word gemeng met 2 ml ysasynsuur en 10 ml water.

Deteksie: alkaloïede

(2) Kedde se reagens

Vyf ml van 3 % etanoliese 3,5-dinitrobensoësuur word gemeng met 5 ml 2 M NaOH. Moet vars voorberei word. Nadat plaat gekleur is met reagens moet dit vir 5 – 10 min by 100°C verhit word en onder sigbare lig waargeneem word.

Deteksie: Kardiale glikosiedes

(3) Natuurlike produk-polietileen glikolreagens (NP/PEG)

Plaat word gespuit met 1 % metanoliese difenielboorsuur- β -etielaminoester gevolg deur 5 % etanoliese polietileen glikol-4000. Doen waarnemings onder 365 nm UV-lig nadat plaat gespuit is.

Deteksie : flavanoïede

(4) Kaliumhidroksied (KOH)

Vyf % etanoliese kaliumhidroksied word opgemaak en die plaat daarmee gespuit. Doen waarnemings onder 365 nm UV-lig of in sigbare lig.

Deteksie : Antrakinone (rooi in sigbare lig), antrone (geel – UV-365nm) en koumariene (blou – UV-365 nm).

(5) Swaelsuur (H₂SO₄)

Vyf % etanoliese H₂SO₄ of gekonsentreerde H₂SO₄ word gebruik om plaat te spuit. Plaat word dan verhit vir 3 – 5 min by 100°C en onder sigbare lig vir kleurreaksies waargeneem.

Deteksie: kardiaale glikosiedes; ligniene

(6) Vanillien-swaelsuur (VS)

Oplossing A: 1 % etanoliese vanillien

Oplossing B: 10 % etanoliese swaelsuur

Die plaat word gespuit met 10 ml van oplossing A, gevolg deur oplossing B.

Na verhitting by 110°C vir 5 – 10 min word plaat geëvalueer onder sigbare lig.

Deteksie: essensiële olies (terpenoïede ens.).

(7) Ammonium vanadaat –anisidien

Oplossing A: Versadigde waterige ammonium vanadaat

Oplossing B: Los 0,5 g p-anisidien op in 2 ml fosforsuur en verdun met etanol tot 100 ml en filtreer.

Spuit plaat eers met oplossing A en terwyl plaat nog nat is spuit met oplossing B. Verhit by 80°C vir 5 min.

Deteksie: Enige komponente met basiese fenoliese struktuur

(c) Diëlektriese konstantes (Harwood *et al.*, 1999)

Chemiese formule	Oplossing	Diëlektriese konstante DC
C_6H_{14}	n-Heksaan	1,9
$C_4H_{10}O$	Diëtieleter	4,3
$CHCl_3$	Chloroform	4,8
$C_4H_8O_2$	Etielasetaat	6,02
$C_2H_4O_2$	Ysasynsuur	6,15
$C_4H_{10}O$	1-Butanol	17,8
C_3H_6O	Asetoon	20,7
C_2H_6O	Etanol	24,30
C_7H_8	Tolueen	24,38
CH_4O	Metanol	32,63
CH_2O_2	Miersuur	58

BEDANKINGS

Ek wil net die volgende individue bedank vir hulle hulp:

Prof J.C. Pretorius wat opgetree het as studieleier,

Dr. K. Kemp as medestudieleier,

Prof. Wijnand Swart vir die verskaffing van bakterie- en swamkulture asook agar.

Dr. J. du Plessis vir verskaffing van 'n UV-lig en *Dr. Charlene Maree* vir hulp met praktiese probleme,

Carlize Oosthuizen vir hulp met anti-bakteriese toetse en verskaffing van sopkulture en agar,

Diana Eksteen, Danie Nieuwoudt en *Sibusisiwe Magama* vir hulle tegniese advies en hulp met praktiese probleme.

Dan net laastens my familie, maar spesiaal my ouers vir hulle hulp, liefde en bystand deur die jaar. Sonder julle sou dit nie moontlik gewees het nie.

Bo alles en almal my Almagtige Heer vir die leiding, wysheid en gesondheid wat hy vir my en my familie gegee het deur hierdie tyd.

Elmarie van der Watt

OPSOMMING

In die volksgeneeskunde van Suid-Afrika word talle plante aangetref wat deur die plattelandse bevolking sowel as 'n klein persentasie van stedelinge gebruik word, een van hierdie plante is *Carpobrotus edulis* L. 'n Ondersoek na sy chemiese samestelling en antimikrobiële eienskappe was die hoofdoel van hierdie studie.

'n Oorsig word gegee oor tradisionele genesing in Suid-Afrika sowel as 'n algemene oorsig oor die familie Mesembryanthemaceae. Volgens beskikbare gegewens is betreklik min oor die chemiese samestelling van, aktiewe komponente in, sowel as die farmakologiese eienskappe van *C. edulis* bekend maar gepubliseerde inligting handel hoofsaaklik oor die ekologiese belang van die plant. In hierdie studie is bevestig dat die plant antibakteriese eienskappe besit en drie semi-gesuiwerde fraksies is aanvanklik met behulp van verskillende chromatografie tegnieke geïsoleer.

Tydens die suiwering van aktiewe komponente, met vooraf verwydering van tanniene, is ses antibakteriese komponente geïsoleer waarvan vyf geïdentifiseer is naamlik neohesperidien, rutien, hyperosied, cactisien, feruliensuur terwyl een onbekend gebly het.

Die gevolgtrekking wat uit hierdie studie gemaak is, is dat die antibakteriese eienskappe van *C. edulis* met die teenwoordigheid van die flavonoïede rutien, neohesperidien, hyperosied, cactisien, feruliensuur en 'n onbekende flavonoïed in verband gebring kan word.

Veral die selektiewe inhibering van gram negatiewe bakterieë, bekend as die mees weerstandbiedende klas bakterieë teen antibiotikums, was die belangrikste waarneming uit hierdie studie.

SLEUTELWOORDE: Tradisionele genesing, *Carpobrotus edulis*, sukkulente, anti-bakteriese eienskappe, flavonoïede.

SUMMARY

In the folk medicine of South Africa, many traditional medicinal plants are used by both the rural and a small percentage of the city population. One of these plants is *Carpobrotus edulis* L. An investigation of the chemical composition as well as the anti-microbial properties of this plant was the main objective of this study.

Overviews on traditional medicine in South Africa and the family Mesembryanthemaceae are given. According to the available literature little is known about the chemical composition, active substances in as well as pharmacological properties of *C. edulis*, but most of the published information deals with the ecological importance of the plant. In this study the anti-bacterial properties of the plant were confirmed and three semi-purified fractions were initially isolated by applying different chromatography techniques.

During purification of active substances, with prior removal of tannins, six anti-bacterial compounds were isolated of which five were identified namely rutin, neohesperidin, hyperoside, cacticin, ferulic acid while one flavonoid remained unidentified.

The conclusion from this study is that the anti-bacterial properties of the plant are related to the presence of the flavonoids rutin, neohesperidin, hyperoside, cactecin and ferulic acid as well as one unknown flavonoid.

The most promising observation during this study was the selective inhibition of gram negative bacteria, known to be more resistant than gram positive bacteria to antibiotics.

KEYWORDS: Traditional medicine, *Carpobrotus edulis*, succulents, antibacterial properties, flavonoids.

VERWYSINGS

- Abysekera, B.F., Abramowski, Z. en Towers, G.H.N. 1983. Genotoxicity of the natural furanochromones, khellin and visnagin and the identification of the khellin-thymine photoadduct. *Photochemistry and Photobiology* 38: 311-315.
- Alkofahi, A.S., Abdelaziz, A., Mahmoud, I., Abuirjie, M., Hunaiti, A. en El-Oqla, A. 1990. Cytotoxicity, mutagenicity and antimicrobial activity of forty Jordanian Medicinal plants. *International Journal of Crude Drug Research* 28(2): 139-144.
- Antonio, C.M. en Mahall, B.E. 1991. Root profiles and competition between the invasive, exotic perennial, *Carpobrotus edulis* and two native shrub species in California coastal scrub. *American Journal of Botany Columbus, Ohio: Botanical Society of America* 78(7): 885-894.
- Arnold, T.H. en De Wet, B.C. 1993. Plants of southern Africa : Names and distribution. National Botanical Institute. Pretoria.
- Balick, M.J. 1994. Ethnobotany and the search for new drugs. Ciba-Geigy Limited. London.

- Balick, M.J., Elisabetsky, E. en Laird, S.A. 1996. Medicinal Resources of the tropical forest. Biodiversity and its importance to human health. Columbia University Press. New York.
- Baker, J.T., Borris, R.P., Carte, B., Cardell, G.A., Soejarto, D.D., Gragg, G.M., Gupta, M.P., Iwu, M.M., Madulid, D.R. en Tyler, V.E. 1995. Natural product drug discovery and development: New perspectives on international collaboration. *Journal of Natural Products* **58(9)**: 1325-1357.
- Barkhuizen, B.P. 1978. Vetplante van Suidelike Afrika. Perskor-Uitgewery. Johannesburg.
- Baron, M.D. 1991. Medical microbiology. Churchill Livingstone Inc. New York.
- Bate-Smith, en Swain, T. 1962. Flavonoid compounds. In : Comparative Biochemistry, vol III. Academic press. New York.
- Batista, O., Simoes, M.F., Nascimento, J., Riberio, S., Duarte, A., Rodriques, B. en De la Torre, M.C. 1996. A re-arranged abietane diterpenoid from *Plectranus hereroensis*. *Phytochemistry* **41**: 571-573.

- Beisher, L. 1974. *Microbiology in Practice. Individualized Instruction for the Allied Health Sciences.* Harper and Row Publishers Inc. New York.
- Bell, A.A. 1981. Biochemical mechanisms of disease resistance. *Annual Review of Plant Physiology* **32**: 21-81.
- Bittrich, V. en Hartmann, H. 1988. The Aizoaceae a new approach. *Botanical Journal of the Linnaean Society* **97**: 239-254.
- Blake, S.T. 1969. A revision of *Carpobrotus* and *Sarcozona* in Australia; genera allied to *Mesembryanthemum* (Aizoaceae). Contributions from the Queensland Herbarium.
- Borris, R.P. 1996. Natural products research: Perspectives from a major pharmaceutical company. *Journal of Ethnopharmacology* **51**: 29-38.
- Bruneton, J. 1995. *Pharmacognosy, Phytochemistry, Medicinal plants.* Lavoisier Publishing Inc. New York. USA.
- Bullard, R.W. en Elias, D.L. 1980. Sorghum polyphenols and bird resistance. In : *Polyphenols in Cereals and Legumes.* International Development Research Centre. Ottawa. Canada.

- Caceres, A., Lopez, B., Juarez, X., Del Aguila, J. en Garcia, S. 1993. Plants used in Guatemala for the treatment of dermatophytic infections. 2. Evaluation of antifungal activity of seven American plants. *Journal of Ethnopharmacology* 40: 207-213.
- Cannell, R.J.P. 1998. How to approach the isolation of a natural product. From: *Methods in Biotechnology* Vol. 4: Natural Products Isolation (Ed) R.J.P. Canell. Human Press Inc. Totowa. New Jersey.
- Chang, H.M en But, P.P.H. (ed) 1986. Pharmacology and applications of Chinese materia medica. Vols 1 and 2. World Scientific Publishing Co. Singapore.
- Conco, W.Z. 1991. Zulu Traditional medicine: its role in modern society. *Community Health* 5: 8-13.
- Court, D. 1981. Succulent flora of Southern Africa. A comprehensive and authoritative guide to the indigenous succulents of South Africa; Botswana; South-West Africa / Namibia; Angola; Zambia; Zimbabwe / Rhodesia and Mozambique. Balkema printers. Cape Town.

Cragg, G.M., Boyd, M.R., Cardellina, J.H., Grever, M.R., Schepartz, S.A. en Snader, K.M. 1993. The role of plants in the drug discovery program of the US manipulation. In: International crop science 1. Crop Science Society of America. Madison. USA.

Cronquist, A. 1981. An integrated system of classification of flowering plants. The New York Botanical Garden. Columbia University Press.

Daniels, F. 1965. A simple microbiological method for demonstration, phototoxic compounds. *Journal of Investigative Dermatology* 44: 259.

D'Antonio, C.M. 1990. Seed production and dispersal in the non-native, invasive succulent *Carpobrotus edulis* in coastal sand communities of central California. *Journal of Applied Ecology* 27: 693-702.

D'Antonio, C.M. 1993. Mechanisms controlling invasion of coastal plant communities by the alien succulent *Carpobrotus edulis*. *Ecology* 74(1): 83-95.

Daub, M.E. 1987. The fungal photosensitizer cercosporin and its role in plant disease. In: Light Activated Pesticides. Heitz J.R. and Downum K. (eds) American Chemical Society Washington D.C.

Desta, B. 1993. Ethiopian traditional herbal drugs Part II: Antimicrobial activity of 63 medicinal plants. *Journal of Ethnopharmacology* 39: 129-139.

Elisabetsky, E. en Posey, D.A. 1994. Ethnopharmacological search for antiviral compounds: treatment of gastriontestinal disorders by Kayapo medical specialists. Ciba Foundation Symposium 185.

Eloff, J.N. 1998. Which extractant should be used for the screening and isolation of antimicrobial components from plants. *Journal of Ethnopharmacology* 60: 1-8.

Evans, I.A., Prorok, J.H., Cole, C.R., Al-Salmani, M.H., Al-Samarrai, A.M.H., Patel, M.C. en Smith, R.M.M 1982. The carcinogenic mutagenic and teratogenic toxicity of bracken. *Proceedings. Royal Society Edinburgh* 81 b: 65-77.

Ewing, W.H. en Fife, M.A. 1972. Flavanoid compounds. *International Journal of Systematic Bacteriology* 22: 4-11.

- Farnsworth, N.R. en Soejarto, D.D. 1991. Global importance of medicinal plants. In: Akerele, Haywood O., Syngé H. (Eds). Conservation of Medicinal Plants. Cambridge University Press. Cambridge..
- Farnsworth, N.R. 1994. Ethnopharmacology and drug development. In: Prance, G.T. (Ed). Ethnobotany and the search for New Drugs. Wiley. Chischester. Ciba Foundation Symposium 185
- Fowlkes, E. 1985. Plant polyphenols: vegetable tannins revisited. Cambridge University Press. Cambridge.
- Fox, F.W. en Young, M.E.N. 1982. Food from the veld; edible wild plants of Southern Africa. Delta Books. Cape Town.
- Freudenberg, K. en Weinges, K. 1962. The chemistry of flavonoid compounds. Pergamon Press. Oxford. United Kingdom.
- Fuller, K.W. en Gallon, J.R. 1985. Plant products and the New Technology. Annual Proceedings of the Phytochemical Society of Europe Volume 26 . Oxford University Press.
- Hagerman, A.E., Zhao, Y. en Johnson, S. 1997. Antinutrients and Phytochemicals in Foods. American Chemical Society. Washington D.C.

Hagerman, A.E. 1998. Tannin Handbook. Miami University. Oxford. USA.

Harborne, J.B. 1991. Plant defenses against Mammalian Herbivory. CRC Press: Boca Raton. Oxford. USA.

Harwood, L.M. en Moody, C.J. 1989. Experimental organic chemistry. Principles and practice. Blackwell Scientific Publications.

Harwood, L.M., Moody, C.J. en Percy, J.M. 1999. Experimental Organic Chemistry. Standaard and Microscale. Second Edition. Blackwell Science Ltd. Oxford.

Haslam, E. 1989. Metabolites and metabolism: a commentary on secondary metabolism. Claredon Press. Cape Town.

Hemingway, R.W. en Karchesy, J.J. 1989. Chemistry and significance of condensed Tannins. Plenum. New York.

Herre, H. 1971. The Genera of the Mesembryanthemaceae. Tafelberg Uitgewers Beperk. Cape Town and Johannesburg.

- Hostettman, K., Marston, A.J., Wolfender, L. en Maillard, M. 1995. Screening for flavanoids and related compounds in medicinal plants by LC-UV-MS and subsequent isolation of bioactive compounds. *Akademiai. Kiahó. Budapest.*
- Hostettman, K. en Wolfender, J.L. 1997. The search for biologically active secondary metabolites. *Pesticide Science* 51(4): 471-482.
- Hudson, J.B., Saboune, H., Abramowski, Z. en Towers, G.H.N. 1988 b. The photoactive antimicrobial properties of eudistomins from the Caribbean tunicate *Eudistoma olivaceum*. *Photochemistry and Photobiology* 47: 377-381.
- Hudson, J.B. en Towers, G.H.N. 1991. Therapeutic potential of plant photosensitizers. *Pharmacology and Therapeutics* 49: 181-222.
- Hutchings, A. 1989. Observations on plant usage in Xhosa and Zulu medicine. *Bothalia* 19(2): 225-235.
- Ihlenfeldt, H.D. 1994. Diversification in an arid world: the Mesembryanthemaceae. *Annual review of ecology and systematics* 25: 521-546.

- Jansman, A.J.M. 1993. Tannins in Faba Beans (*Vicia Faba L.*) - antinutritional properties in monogastric animals. PhD Thesis. Department of Animal Nutrition. Wageningen Agricultural University. Wageningen. Netherlands.
- Jones, S.B. jnr. en Luchsinger, A.E. 1987. Plant systematics. Second edition. McGraw-Hill international editions.
- Kinghorn, K. en Balandrin, G. 1993. Human medicinal agents from plants. ACS Symposium series 534. American Chemical Society. Washington.
- Klement, Z., Rudolph, K. en Sands, D.C. 1990. Methods in Phytobacteriology. Akademiai Kiado. Budapest.
- Kwasniewska, K. en Kaiser, K.L.E. 1983. Toxicities of selected phenols to fermentative and oxidative yeasts. *Environmental Contamination Toxicology* 31: 181-194.
- Maddams, W.F. 1989. Flower colour variation of *Carpobrotus edulis*. *British cactus & succulent journal* 7(1): 16-17.
- Mammen, M. 1996. Bridging the gap between traditional and 'modern' medicine. *Veld & Flora* 2: 2.

- Marchant, Y.Y. en Cooper, G.K. 1987 a. Structure and function relationships in polyacetylene photoactivity. In: Light-Activated Pesticides. Heitz J.R. and Downum K.R. (eds) American Chemical Society Washington D.C.
- Markham, K.R. 1982. Techniques of flavonoid identification. Academic press. New York.
- Marsh, R.W. 1977. Systematic Fungicides. Longman Group Limited. London.
- Martin, G.J. 1995. Ethnobotany: A Methods Manual. Chapman and Hall, London.
- Mauseth, J.D. 1991. Botany: An Introduction to plant biology. Saunders College Publishing. Chile.
- McClintock, D. 1975. The wild flowers of Guernsey. Collins. London.
- Meyer, E.A. 1974. Microorganisms and human disease. Appleton-century-Crofts. New York.
- Morello, J.A., Mizer, H.E. en Wilson, M.E. 1984. Microbiology in Patient care. Collier Macmillan Publishing Co., Inc. New York.

- Nene, Y.L. en Thopliyal, P.N. 1993. Fungicides in plant disease control. International Science Publisher. New York.
- Nick, A., Rali, T. en Sticher, O. 1995. Biological screening of tradisional medicinal plants from Papua New Guinea. *Journal of Ethnopharmacology* 49: 147-156.
- Nigg, H.N. en Seigler, D. 1992. Phytochemical Resources for Medicine and Agriculture. Plenum Press. New York.
- Nindi, B.C. 1980. Issues on Ethnomedicine and health in SADC. *Ethnomedicine in Southern Africa in the Journal of research* 4: 1-16.
- Ouellette, R.J. 1992. Introduction to general, Organic, and Biological Chemistry Third edition Macmillan publishing Company. New York.
- Patel, M., Hegbe, V., Horan, A., Gullo, V.P., Loebenberg, D., Marquez, J.A., Miller, G.H., Puar, M.S. en Waitz, J.A. 1984. A novel phenazine antifungal antibiotic, 1,6-dihydroxy-2-chlorophenazine. Fermentation, isolation, structure and biological properties. *Journal of Antibiotics* 37: 943-948.
- Penn, C. 1991. Handling laboratory microorganismes. Open University Press.

- Pfyffer, G.F., Panfil, I. en Towers, G.H.N. 1982 a. Monofunctional covalent photobinding of dictamnine, a furoquinoline alkaloid, to DNA as target in vitro. *Photochemistry and Photobiology* 35: 63-68.
- Rios, J.L., Recio, M.C. en Villar, A. 1988. Screening methods for natural products with antimicrobial activity: a Review of the literature. *Journal of Ethnopharmacology* 32: 127-149.
- Rizvi, S.J.H. en Rizvi, V. 1992. Allelopathy: Basic and applied aspects. Chapman Hall.
- Roberts, M. 1995. Indigenous Healing Plants. Tafelberg Uitgewers Beperk. Kaapstad.
- Rood, B. 1994. Uit die veldapteek. Tafelberg Uitgewers Beperk. Kaapstad.
- Rojas, A., Hernandez, L., Rogelio, P.M. en Mata, R. 1992. Screening for antimicrobial activity of crude drug extracts and pure natural products from Mexican medicinal plants. *Journal of Ethnopharmacology* 35: 275-283.
- Rowley, G. 1978. The illustrated Encyclopedia of Succulents. A guide to the natural history and cultivation of cactus and cactus-like plants. Crown Publishers Inc. New York

Salisbury, F.B. en Ross, C.W. 1992. *Plant Physiology*. Wadsworth Publishing Company. Belmont. California.

Salunke, D.K., Chavan, J.K. en Kadam, S.S. 1990. *Dietary Tannins: Consequences and remedies*. CRC Press. Boca Raton. Florida. USA.

Sindiga, I. 1993. *Traditional Medicine: Its Practice and the law in Kenya*. Tafelberg Uitgewers Beperk. Cape Town.

Smith, H. 1972. In "Phytochrome". Academic Press. New York and Londen.

Smith, P.M. 1976. *The chemotaxonomy of plants*. Edward Arnold (Publishers) Limited. London.

Smith, A. 1995. *A contribution to South African Materia medica*. Juta. Cape Town.

Smith, G.F., Chesselet, P., Van Jaarsveld, E.J., Hartmann, H., Hammer, S., Van Wyk, B., Burgoyne, P., Klak, C. en Kurzweil, H. 1998. *Mesembs of the world*. Briza Publications.

- Taniguchi, M. en Kubo, I. 1993. Ethnobotanical drug discovery based on medicine men's trials in the African savanna: screening of East African plants for antimicrobial activity II. *Journal of Natural Products* **56**(9): 1539-1546.
- Thikhoi, L.J. 1980. Traditional versus modern medicine: The case for collaborative approach to primary health care (PHC). *Ethnomedicine in Southern Africa in the Journal of Research* **4**: 9-16.
- Toelken, H.R. 1996. Surprises in Australian *Carpobrotus*. *Aloe* **33**: 28-29.
- Towers, G.H.N. 1984. Interaction of light with phytochemicals in some natural systems. *Canadian Journal of Botany* **62**: 2900-2911.
- Van Wyk, B. 1997. Medicinal plants of South Africa. Briza Publications. Pretoria.
- Van Zyl, M. 1996. Tradisionele helers. *Woord & Daad* **5**: 5-7.
- Villar, A., Rios, J.L., Recio, M.C., Cortes, D. en Cave, A. 1986a. Antimicrobial activity of benzyloquinoline alkaloids. II Relation between chemical composition and antimicrobial activity. *Planta Medica* **52**: 556-557.

- Vlahov, G. 1992. Flavanoids in three olive (*Olea europea*) fruit varieties during maturation. *Journal of the Science of Food and Agriculture* **58**: 157-159.
- Wagner, H. en Blatt, S. 1996. Plant drug analysis. A thin layer chromatography atlas. Springer. New York.
- Wagner, H. en Wolff, P. 1976. New natural products and plant drugs with pharmacological, biological and therapeutical Activity. Proceedings of the first International Congress on Medicinal plant Research. Section A held at the University of Munich. Germany. Springer-Verlag Press. Berlin.
- Waterman, P.G. en Mole, S. 1994. Analysis of Phenolic Plant Metabolites. Blackwell Scientific Publications. London.
- Watt, J.M. en Breyer-Brandwijk, M.G. 1962. The Medicinal and Poisonous Plants of Southern and and Eastern Africa. Livingstone. London.
- Wiley, G. en Chichester, H. 1994. Ethnobotany and the search for new drugs. Ciba-Greigy Limited. London.
- Wilson, K. en Goulding, K.H. 1986. Principles and Techniques of Practical Biochemistry. Edward Arnold (Publishers). Great Britain.

Wisura, W. en Glen, H.F. 1993. The South African species of *Carpobrotus* (Mesembryanthema, Aizoaceae). *Contribution. Boletim Herbage* 15: 76-107.