



Die toets van ekstrakte uit *Sutherlandia frutescens* (Fabaceae) op *Mycobacterium smegmatis* in die behandeling van tuberkulose

**Authors:**

Itumeleng H. Mabusa¹
Rachmond Howard² 
Peter Masoko¹ 

Affiliations:

¹Department of Biochemistry, Microbiology and Biotechnology, University of Limpopo, South Africa

²Planning & Institutional Support, University of Mpumalanga, South Africa

Corresponding author:

Peter Masoko,
peter.masoko@ul.ac.za

Dates:

Received: 17 Oct. 2017

Accepted: 30 Oct. 2017

Published: 14 Dec. 2017

How to cite this article:

Mabusa, I.H., Howard, R. & Masoko, P., 2017, 'Die toets van ekstrakte uit *Sutherlandia frutescens* (Fabaceae) op *Mycobacterium smegmatis* in die behandeling van tuberkulose', *Suid-Afrikaanse Tydskrif vir Natuurwetenskap en Tegnologie* 36(1), a1494. <https://doi.org/10.4102/satnt.v36i1.1494>

Copyright:

© 2017. The Authors.
Licensee: AOSIS. This work is licensed under the Creative Commons Attribution License.

Read online:

Scan this QR code with your smart phone or mobile device to read online.

Sutherlandia frutescens (L) R. Br. bevat verskeie essensiële bioaktiewe verbindings met farmakologiese aktiwiteit waarvoor daar kliniese bewyse bestaan. *Sutherlandia* word vir mense met tuberkulose voorgeskryf, maar niemand weet nog watter verbindings in hierdie plant *Mycobacterium tuberculosis* en die werking daarvan teenwerk nie. Hierdie studie het ten doel om te bepaal of *S. frutescens* antimikobakteriese verbindings bevat. Bogrondse dele van *S. frutescens* is gedroog, gemaal en met etanol:metanol [1:1] (vol./vol.) en water onttrek. Die chemiese profiel is bepaal deur hoëverrigting vloeistofchromatografie-massaspektrometrie en dunlaagchromatografie te gebruik. Die dunlaagchromatografie is in butanol:asynsuur:water (BAW) [21:6:3], chloroform:metanol:water:miersuur (CMWM1) [60:15:2:1] en CMWM2 [21:9:1:0.3] ontwikkel. Die kwalitatiewe anti-oksidadant-aktiwiteit is bepaal deur 2,2 difeniel-2-pikrieldihidrasiel (DFPH) te gebruik. Die antimikobakteriese aktiwiteit van die plantekstrakte is bepaal deur mikro-verdunning en bio-outografiese metodes teen *Mycobacterium smegmatis* te gebruik. Ons het lae antimikobakteriese aktiwiteit teen *M. smegmatis* in die bio-outogramme waargeneem. Die profiele van die hoëverrigting vloeistofchromatografie-massaspektrometrie het meer verbindings in die etanolekstrakte as in die waterekstrakte aangedui. Die gemiddelde waardes vir minimum inhibeerderkonsentrasie vir al die ekstrakte was 0.61 mg/mL. Die DCM:MeOH (1:1) ekstrak het die laagste minimum inhibeerderkonsentrasie-waarde, naamlik 0.28 mg/mL gehad. Die resultate het getoon dat die plant verder vir moontlike antimikobakteriese agente ondersoek kan word. Lae aktiwiteit is waargeneem, waarskynlik as gevolg van stadig vermeerderende bacilli en nie-vermeerderende organismes. Die studie bied voorlopige wetenskaplike ondersteuning vir die tradisionele medisinale gebruik van hierdie plant.

Navorsing korrelasie: Hierdie artikel is die vertaalde weergawe en is beskikbaar gestel om 'n breër lesersgroep te bereik. Die oorspronklike Engelse artikel is beskikbaar hier: <https://doi.org/10.4102/satnt.v36i1.1486>

***Sutherlandia frutescens* (Fabaceae) extracts used for treating tuberculosis do not have high activity against *Mycobacterium smegmatis*.** *Sutherlandia frutescens* (L) R. Br. contains several essential, bioactive compounds with clinically-proven pharmacological activities. *Sutherlandia* is prescribed for people with tuberculosis but it is still not known what compounds in this plant acts against *Mycobacterium tuberculosis* and its mode of action. This study is aimed at determining if *S. frutescens* extracts contain antimycobacterial compounds. Aerial parts of *S. frutescens* were dried, ground and extracted with ethanol, dichloromethane:methanol 1:1 (v/v) and water. The chemical profiling was done using HPLC-MS and thin layer chromatography (TLC). TLC plates were developed in butanol:acetic acid:water (BAW) to the ratio of 21:6:3; chloroform:methanol:water:formic acid (CMWF1) [60:15:2:1] and (CMWF2) [21:9:1:0.3]. Qualitative antioxidant activity was done, using 2,2 diphenylacryl -2-hydrazyl (DPPH). Antimycobacterial activity of the plant extracts was evaluated, using micro-dilution and bioautographic methods against *Mycobacterium smegmatis*. Low antimycobacterial activity against *M. smegmatis* was observed on the bioautograms. The ethanol extracts contained more compounds compared to water extracts on HPLC-MS chromatographic profiles. The average Minimum Inhibitory Concentration (MIC) values for all the extracts were 0.61 mg/mL units and the DCM: MeOH (1:1) extract had the lowest MIC value of 0.28 mg/mL. The results showed that the plant could be further explored for possible antimycobacterial agents. Low activity was observed, possibly due to lowly replicating bacilli and non-replicating organisms. The study provides preliminary scientific validation of the traditional medicinal use of this plant. Further studies are required to identify the bioactive compounds in the DCM: MeOH 1:1 extract which showed significant antimycobacterial activities.

Research correlation: This article is the translated version, made available to provide access to a larger readership, of which the original English article is available here: <https://doi.org/10.4102/satnt.v36i1.1486>

Inleiding

Sutherlandia frutescens is 'n inheemse medisinale plant wat kommersieel in Suider-Afrika verbou word, wyd bekend is en baie gebruik word. *S. frutescens* bevat verskeie essensiële bioaktiewe verbindings met farmakologiese aktiwiteite waarvoor daar kliniese bewyse bestaan (Haraguchi 2001:1; Ojewole 2008:126; Prevo, Swart & Swart 2008:118). Dit maak die plant aanloklik as geneesmiddel vir verskeie kwale en siektes. Die Suid-Afrikaanse Departement van Gesondheid beveel *Sutherlandia* aan as ondersteunende behandeling vir mense met verworwe immuuniteitsgebreksindroom (VIGS) (Mills et al. 2005:1; SA Healthinfo 2009:1; Seier et al. 2002:1). Dit word ook in die behandeling van kanker, tuberkulose (tering), diabetes, angs en kliniese depressie voorgeskryf (Mills et al. 2005:1; SA Healthinfo 2009:1; Van Wyk 1997).

Tuberkulose is 'n hoogs aansteeklike siekte wat deur *Mycobacterium tuberculosis* veroorsaak word en jaarliks miljoene mense se dood veroorsaak. Dit is ook een van die algemeenste ko-infeksies onder mense met VIGS en vererger dus die MIV/VIGS-pandemie. Die geneesmiddels wat tans gebruik word om tuberkulose mee te behandel, moet oor 'n lang tydperk geneem word en gevolglik staak baie mense die behandeling voortydig wat tot die ontwikkeling van weerstandigheid lei. Daar is ook 'n toename in middelweerstandige stamme wat as 'n betekenisvolle gesondheidsbedreiging beskou word (WHO 2007a; 2007b). Daar word wêreldwyd pogings aangewend om geneesmiddels te ontdek wat vinniger werk en wat ook effektief teen die middelweerstandige stamme is. Hoewel *Sutherlandia* vir mense met tuberkulose voorgeskryf word, weet niemand nog of die ekstrakte wel oor antimikobakteriese aktiwiteite beskik nie en watter verbindings in hierdie plant *M. tuberculosis* en die werking daarvan kan teenwerk nie. Hierdie studie het beoog om die aktiwiteit van ekstrakte uit *Sutherlandia frutescens* teen *Mycobacterium smegmatis* te ondersoek. *M. tuberculosis* groei uiters stadig en hou biologiese gevaar in 'n laboratorium in. *M. smegmatis* bevat 'n soortgelyke selwandstruktuur as *M. tuberculosis* en word algemeen in laboratoriumeksperimente vir navorsing gebruik omdat dit vinniger groei en nie patogenies is nie (Reyrat & Kahn 2001). Boonop beperk die hoogs aansteeklike aard van *Mycobacterium tuberculosis* die gebruik daarvan vir die grootskaalse sifting van moontlike kandidate vir geneesmiddels. Daar is bevind dat *M. smegmatis* 'n middel-sensitiewe profiel vertoon wat soortgelyk is aan die van *M. tuberculosis* (Chaturvedi et al. 2007). Die plantekstrakte is hoofsaaklik teen hierdie vinnig-groeiende en nie-patogeniese mikobakteriële stam gesif met die doel om aktiewe verbindings te identifiseer wat later teen *Mycobacterium tuberculosis* se sijkimiaatkinase getoets sou kon word. Die studie het beoog om voorlopige data oor antimikobakteriese aktiwiteit *in vitro* as 'n eerste stap tot verdere ondersoek te bied.

Materiaal en metode

Plantversameling

Ons het 150 g vars bogrondse dele (blare en takke) van *Sutherlandia* op 'n gemeenskapsgebaseerde plaas in Petrusburg in die Vrystaat versamel (29° 6.774' S; 25° 24.305' E; 1249 m bo

seevlak). 'n Twygie met 'n blom aan is vir identifisering na die Suid-Afrikaanse Nasionale Biodiversiteitsinstituut (SANBI) gestuur (monsternommer 428679 op SANBI bewysstuk). Die plantmateriaal is fyngemaal en teen kamertemperatuur geberg totdat die toetse afgehandel is.

Ekstraksieprosedure

Die ekstraksie van plantmateriaal op die tradisionele manier

Gedroogde bogrondse dele (blare en takke) van *S. frutescens* (50 g) is in twee liter gedistilleerde water gekook op 'n warmplaat met 'n staalekstraksiefles wat met aluminiumfoelie bedek is, en dit is af en toe geroer. Die suspensie is van die warmplaat verwyder en teen kamertemperatuur afgekoel en toe deur filtreerpapier (Whatman nr. 1) gefiltreer en in 'n gemerkte glasbeker versamel. Die waterige ekstraksie is gevriesdroog en 'n poeier is daaruit verkry. Die ekstrak is teen 4 °C in 'n lugdigte houer geberg totdat verdere toetse gedoen is

Die ekstraksie van plantmateriaal met organiese oplosmiddels

Een liter 96% etanol is by 50 g plantmateriaal geroer en oornag gelaat. Die suspensie is die volgende dag deur filtreerpapier (Whatman nr. 1) filtreer en laat verdamp om 'n etanolekstrak te bied (oormatige etanol in die ekstrak is verwyder deur oornag in 'n dampkas met sterk lugvloei te laat). Nog 50 g plantmateriaal is gebruik om 'n 1:1 dichlorometaan:metanol-ekstrak (DCM:MeOH; 1,4 L) te berei. Dieselfde prosedure is gebruik as om die etanolekstrak te berei.

Fitochemiese analise

Die bepaling van die chemiese profiel met dunlaag chromatografie

Die verbindings in die plantekstrak is met behulp van dunlaagchromatografie (DLC) ontleed deur aluminiumgesteunde DLC-chromatogramme te gebruik (Merck, silika jel 60 F₂₅₄). Die DLC-chromatogramme is onder versadigde toestande ontwikkel met elk van die drie mobiele fases wat verskil wat polariteit betref, te wete: (1) chloroform:metanol:water:miersuur (CMWM1) [60:15:2:1], (2) chloroform:metanol:water:miersuur (CMWM2) [21:9:1:0,3] en (3) butanol:asynsuur:water (BAW) [21:6:3]. Die chromatogramme is onder ultravioletlig (254 nm en 365 nm) besigtig vir verbindings wat fluoresserend is. Dit is ook later met vanillien (Sigma)- swaelsuurreagens gespuit en verhit om die kleure van die verskillende verbindings in elke ekstrak sigbaar te maak.

Kwalitatiewe toets met 2,2-difeniel-pikriëhidrasiel op dunlaagchromatografie

Die chromatogramme is voorberei soos in die vorige afdeling beskryf is dit in 'n dampkap uitgedroog. Die chromatogramme is met 1.2 % 2,2-difeniel-1-pikriëhidrasiel (DFPH) in metanol gespuit ten einde enige moontlike antioksidantverbindings in die geskeide plantekstrakte sigbaar te maak. Die bande/verbindings wat antioksidanteienskappe getoon het, is vergelyk

met die bande wat antimikobakteriese aktiwiteit getoon het om te bepaal of die waargenome antimikrobiële eienskappe aan die antioksidanteienskappe van die ekstrakte toegeskryf kan word. Die teenwoordigheid van antioksidantverbindings is waargeneem deur geel kolle op 'n pers agtergrond op DLC-chromatogramme wat met 0.2 % DFP in metanol gespuit is (Deby & Margotteaux 1970)

Chemiese profielbepaling met hoëverrigting vloeistofchromatografie¹-massaspektroskopie

Die water- en etanol-ekstrakte is vir hierdie eksperiment gebruik en 25 mg van elke ekstrak is in 'n buisflesjie afgeweg en 2 mL HPLC-graad metanol is bygevoeg. Die mengsel is 10 min lank in 'n ultrasoniese bad geplaas en deur Acrodisc[®] GHP spuitfilters filtreer voordat dit in 2 mL HPLC-buisflesjies geplaas is. Die onderskeie monsters is ontleed deur 'n WATERS HPLC heksiel-feniel skeidingsmodel te gebruik. Atlantis T3-kolonne (150 mm x 2.1 mm, 5 µm partikelgrootte) wat in serie gekoppel is, is vir die skeiding gebruik. UV-sigbare opsporing is gedoen op 'n WATERS PDA wat tussen 200 m en 500 nm kan skandeer. Die mobiele fase wat gebruik is, was 0.1 % (vol./vol.) mieresuur in water (A) en metanol (B). Die verhouding van die mobiele fase wat voorberei is, word in Tabel 1 aangetoon. Massaspektrometrie-opsporing is gedoen deur 'n WATERS Synapt G1-massaspektrometer te gebruik en tussen 100 Dalton en 1000 Dalton te skandeer met 'n skanderingtyd van 0.2 sekondes. 'n Elektrosproei ioniseringsmodus (ESI) met sowel positiewe as negatiewe polariteit is gebruik. Die werkstoestand in die ESI-put was soos volg:

- brontemperatuur: 120 °C
- optika: V-modus optika
- desolvasietemperatuur: 450 °C
- kapillêre spanning: 2500 V
- keëlspanning: 20 V
- ekstraksiekeëlspanning: 4 V
- desolvasie: 800 L/h
- keëlgas: 50 L/h
- gas gebruik: stikstof
- eindmassakalibrant: leusien-ensefalin 50 pg/mL oplossing in 50 % waterige asetonnietriël (vloeï gestel om 100 tot 200 ioontellings per sekonde te gee).

Die inspuitingvolume was 3 mL en die tyd wat die eksperiment geloop het, was 30 min.

TABEL 1: WATERS oplosmiddelbestuurtoestande.

Tyd (min)	Vloeikoers (mL/min)	%A: Mieresuur & H ₂ O	%B: MeOH
0.00	0.4	70	30
1.00	0.4	70	30
8.00	0.4	70	30
9.00	0.4	70	30
25.00	0.4	70	30
25.10	0.4	0	100
28.00	0.4	70	30
29.00	0.4	70	30

¹ Hoewel die apparaat se naam vertaalbaar is, word die Engelse afkorting wat algemeen in laboratoria gebruik word, HPLC, in die teks behou.

Voorlopige antimikobakteriese toetsing met *Mycobacterium smegmatis*

Organisme gebruik

Mycobacterium smegmatis is van die Departement Biowetenskappe by die Wetenskaplike en Nywerheidsnavorsingsraad (WNNR) verkry. Die *M. smegmatis* is in 'n sop van Middlebrook 7H9 wat 0.05% Tween 80 en 10% (vol./vol.) bevat het, aan die lewe gehou. Die kultuur is met 'n Ziehl-Neelsen-vlek getoets voordat dit in die antimikrobiële toets gebruik is. Die kultuur is van die sop na 'n agarplaat oorgeplaas en binne twee weke gebruik. Daar is toe subkulture van die kultuur op hellings gekweek en vir twee tot drie maande geberg.

Kwalitatiewe antibakteriële aktiwiteitstoets deur bio-outografie

Bio-outografiese studies word, volgens Begue en Kline (1972), op DLC-chromatogramme uitgevoer om die belangrikste bioaktiewe verbindings in die ongesuiwerde ekstrakte op te spoor. DLC-chromatogramme is met 10 µL van elke plantekstrak gelaai en in BAW, CMWM1 en CMWM2 ontwikkel. Die chromatogramme is vier dae lank onder 'n lugstroom geplaas sodat die oplosmiddels kan verdamp. Die chromatogramme is toe met INT gespuit en 30 min lank geïnkubeer. Inhibisiesones is as wit strepe teen 'n pienk agtergrond waargeneem.

Kwantitatiewe antibakteriële aktiwiteitstoets deur minimum inhibisiekonsentrasie

'n Kwantitatiewe antibakteriële aktiwiteitstoets is in 96-put mikrotiterplate uitgevoer, soos deur Eloff (1998) beskryf, om die minimum inhiberende konsentrasie (MIK) van die plantekstrakte, wat met H₂O, EtOH en DCM:MeOH 1:1 geëkstraheer is, te bepaal. Daar is 100 mL gesteriliseerde gedistilleerde water in 11 van die 12 bane van die 96-put mikrotiterplate opgelos en 100 mL dimetiel-sulfoksied (DMSO) is as 'n negatiewe kontrole in die twaalfde baan opgelos. Verder is 100 mL rifampisien wat as die positiewe kontrole gebruik is by die eerste put op die elfde baan bygevoeg en 'n reeksverdunding is aan die einde van die baan gemaak. Die oorblywende inhoud van die pipet is uitgegooi om die volume in elke put dieselfde te maak. Alle plantekstrakte is weer in DMSO opgelos teen 'n konsentrasie van 10 mg/mL. Daarna is 100 mL van elke ekstrak by die eerste putjies op bane een tot nege bygevoeg en in 'n reeks verdun, terwyl die tiende baan met net steriele gedistilleerde water gelaat is en dus ook as negatiewe kontrole beskou is. Daarna is 100 mL gestandaardiseerde *Mycobacterium smegmatis* in 'n sokkultuur in al 96 putjies bygevoeg en die chromatogramme is 24 h lank teen 37 °C geïnkubeer. Na die inkubasietydperk is 10 mL 0.2mg/mL p-iodonitrotetrasolium-violet (INT) in water by al 96 putjies gevoeg om die teenwoordigheid van bakteriële groei in die chromatogramme te bepaal en die chromatogramme is vir nog 45 min teen 37 °C geïnkubeer om kleur te laat ontwikkel. Die teenwoordigheid van aktief-groeiende bakterieë is aangedui deur INT wat van kleurloos tot 'n pienk-rooi kleur gereduseer is. Die MIK is aangeteken as die laagste konsentrasie van die plantekstrakte wat die groei van

Mycobacterium smegmatis na 24 uur geïnhibeer het en elke ekstrak is in triplikaat getoets. Die totale aktiwiteit van die ekstrakte is in mL/g bereken deur die MIK deur die hoeveelheid wat van 1 g plantmateriaal onttrek is, te deel. Die gevolglike waarde dui die volume aan waartoe die ekstrak verdun kan word terwyl dit steeds die groei van mikro-organismes inhibeer (Eloff 2004).

Resultate

Die massa van plantekstrak

Die hoeveelheid monster wat ge-ekstraheer is word in Tabel 2 aangedui. Plantmateriaal wat met 96% etanol onttrek is, het meer ekstrak opgelewer as die plantmateriaal wat met ander oplosmiddels onttrek is.

TABEL 2: Verskillende hoeveelhede ongesuiwerde ekstrakte van *Sutherlandia frutescens* wat deur ekstraksie met verskillende oplosmiddels verkry is.

Massa van gemaalde blare (g)	Extraktant	Volume (L)	Hoeveelheid ekstrak (g)
50	dH ₂ O	2	4.89
50	96% EtOH	1	6.06
50	DCM: MeOH 1:1	1.4	4.25

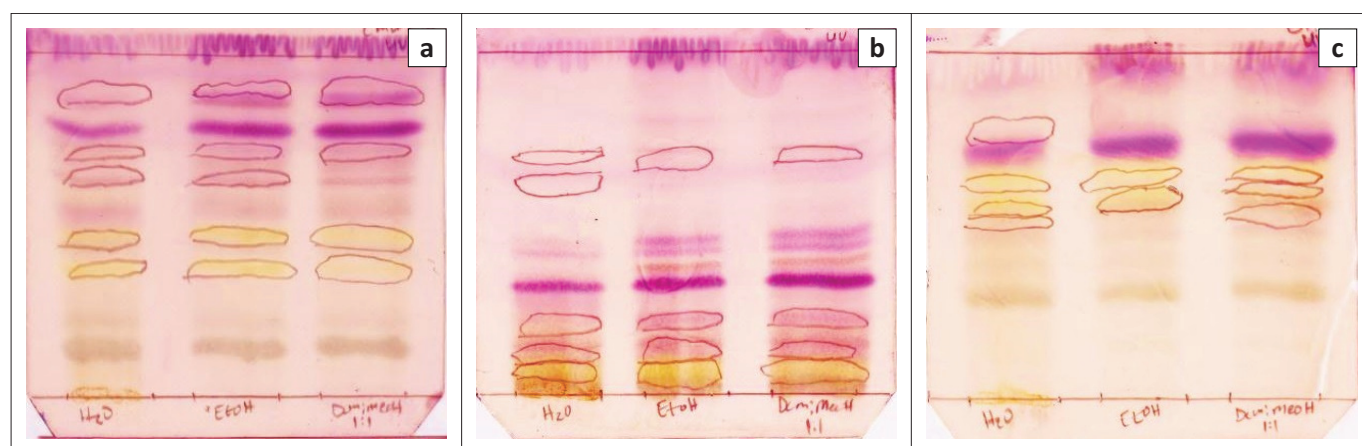
Nota: Totale hoeveelheid ekstrak (g) = 15.20.

Dunlaagchromatografie-profielbepaling vir fitochemiese analise van plantekstrak

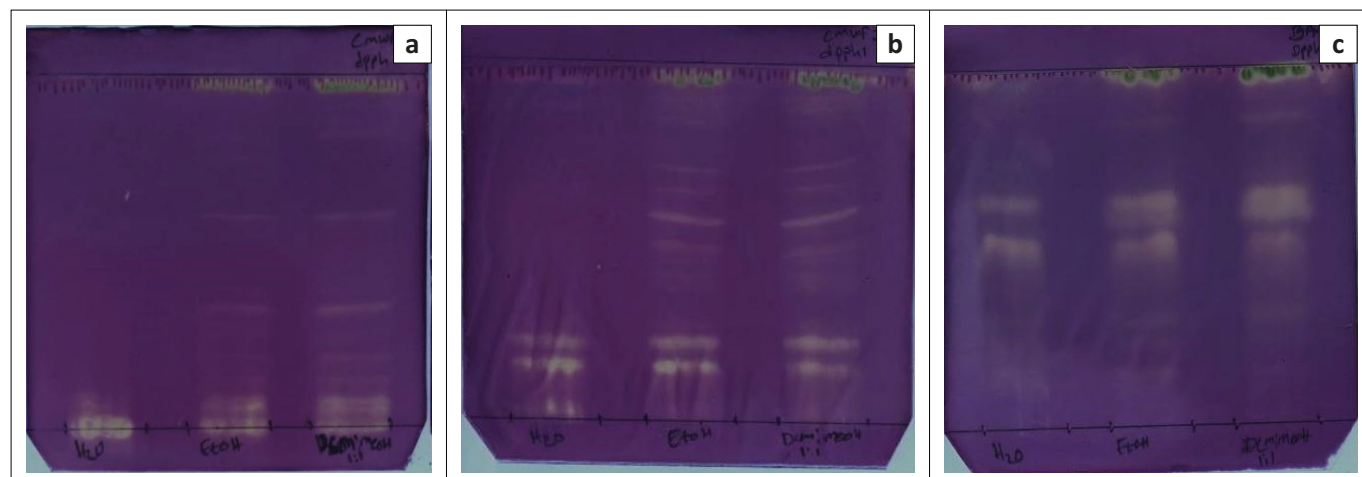
Die bepaling van DLC-vingerafdrukke is gebruik om die fitochemikalieë in die plantekstrak wat ge-ekstraheer is, te ontleed. Daar is drie oplosmiddels gebruik, te wete water, etanol en DCM:MeOH 1:1 (vol./vol.). Die ekstrak is weer met chloroform:metanol 1:1 (vol./vol.) opgelos tot 'n konsentrasie van 10 mg/mL. DLC-chromatogramme is met 10 mL van die voorbereide ekstrakoplossings gelaai en skeiding van die verskillende verbindings is waargeneem nadat die chromatogramme in CMWM1, CMWM2 en BAW ontwikkel is en met 0.1 mL vanillien-swaelsuur gespuit is soos in Figuur 1 aangetoon.

Kwalitatiewe antioksidanttoets in difeniel-pikriëhidrasiel van ekstrakte op dunlaagchromatografie

'n Kwalitatiewe antioksidanttoets is gedoen om die *S. frutescens*-ekstrakte vir die teenwoordigheid van antioksidantverbindings te sif. Om die verbindings met antioksidant aktiwiteit sigbaar te maak, is 0.2 % DFPH gespuit op chromatogramme wat met mobiele fases van CMWM1,



FIGUUR 1: Die DLC-chromatogramme (a, b en c) is van links na regs in CMWM1, CMWM2 en BAW ontwikkel. Die DLC-chromatogramme is met 0.1% vanillien-swaelsuur gespuit om die skeiding van die verbindings sigbaar te maak en onder UV-lig besigtig. Aktiewe UV-bande is omring. Die heel linkerkantse baan is die waterekstrak, die tweede baan die etanolekstrak en die derde baan is DCM:MeOH (1:1)-ekstrak.



FIGUUR 2: Die DLC-chromatogramme (a, b en c) is van links na regs in CMWM1, CMWM2 en BAW ontwikkel. Die DLC-chromatogramme is met DFPH gespuit om die verbindings met antioksidantaktiwiteit (deur die gelerige sones aangedui) te toon. Die eerste baan is die waterekstrak, die tweede baan is die etanolekstrak en die derde is DCM:MeOH 1:1-ekstrak.

CMWM2 en BAW ontwikkel is. Die teenwoordigheid van antioksidantverbindings is met geel strepe teen 'n pers agtergrond aangedui, soos in Figuur 2 te sien is.

Profielbepaling met HPLC-MS

HPLC-MS-chromatogramme (Figuur 3 en Figuur 4) toon die profiele van H₂O- en EtOH-ekstrakte. Hierdie chromatografiese profiele toon ook ionisering van al die verbindings wat in die water- en etanolekstrakte gevind is volgens hulle m/z-verhouding.

Getabuleerde verbindings in *Sutherlandia frutescens* wat met HPLC-MS verkry is

Tabelle 3 en 4 hieronder toon die molekulêre massa, retensietye asook die staat van ionisering van al die verbindings volgens hulle m/z-verhouding in die water- en etanolekstrakte.

Die toets van kwalitatiewe antibakteriële aktiwiteit deur bio-outografie

Nie een van die bio-outografiese toetse wat op die ongesuiwerde ekstrakte (H₂O, EtOH en DCM:MeOH 1:1) uitgevoer is, het enige antimikobakteriese aktiwiteit teen *M. smegmatis* getoon nie.

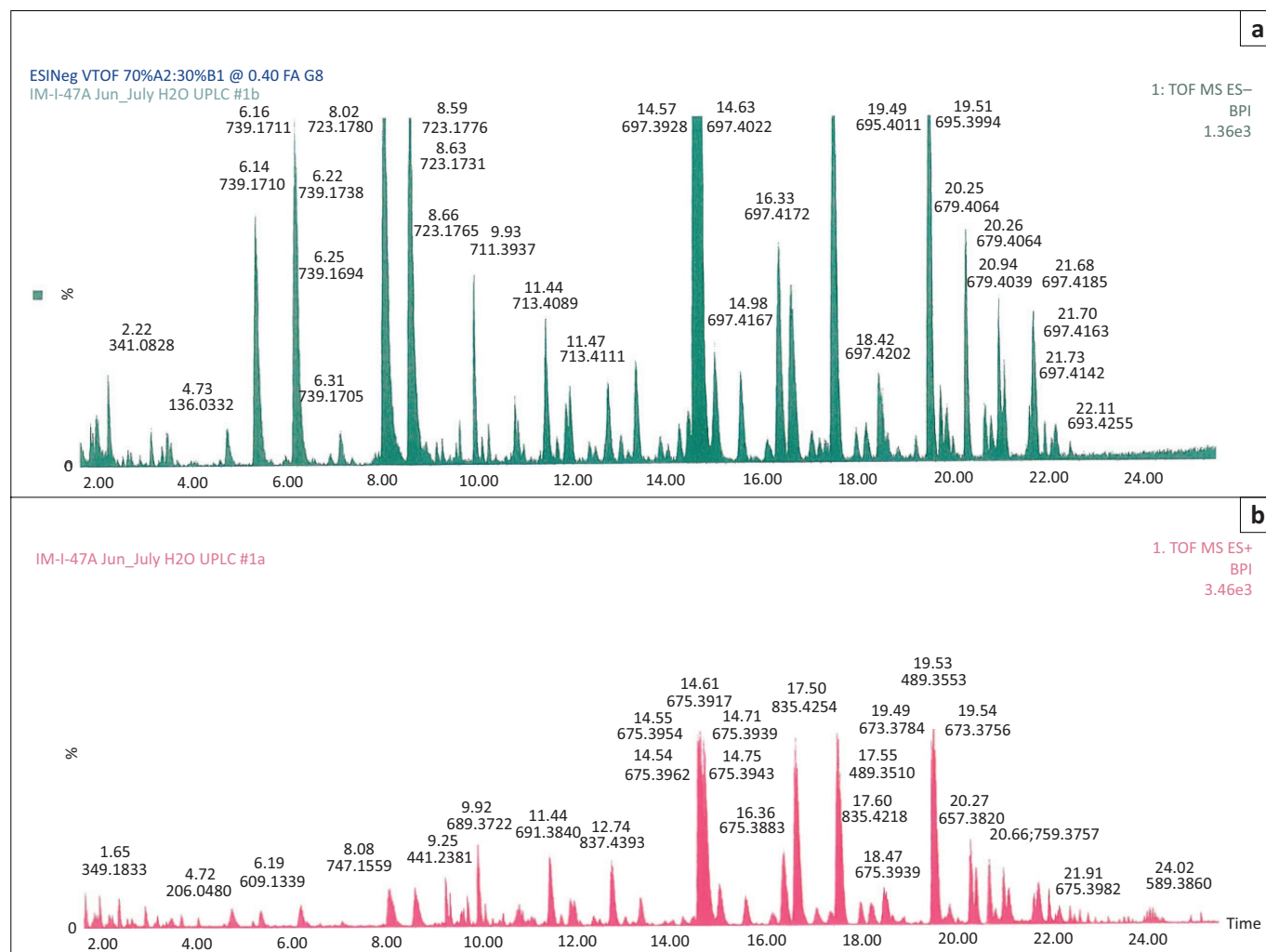
Die toets van kwantitatiewe antibakteriële aktiwiteit: Minimum inhibisiekonsentrasie

Die DCM:MeOH 1:1-ekstrakte het die laagste minimum inhibisiekonsentrasie teen *M. smegmatis* gehad (Tabel 5). Die waterekstrakte het na 24 uur se inkubasie die hoogste minimum inhibisiekonsentrasie getoon.

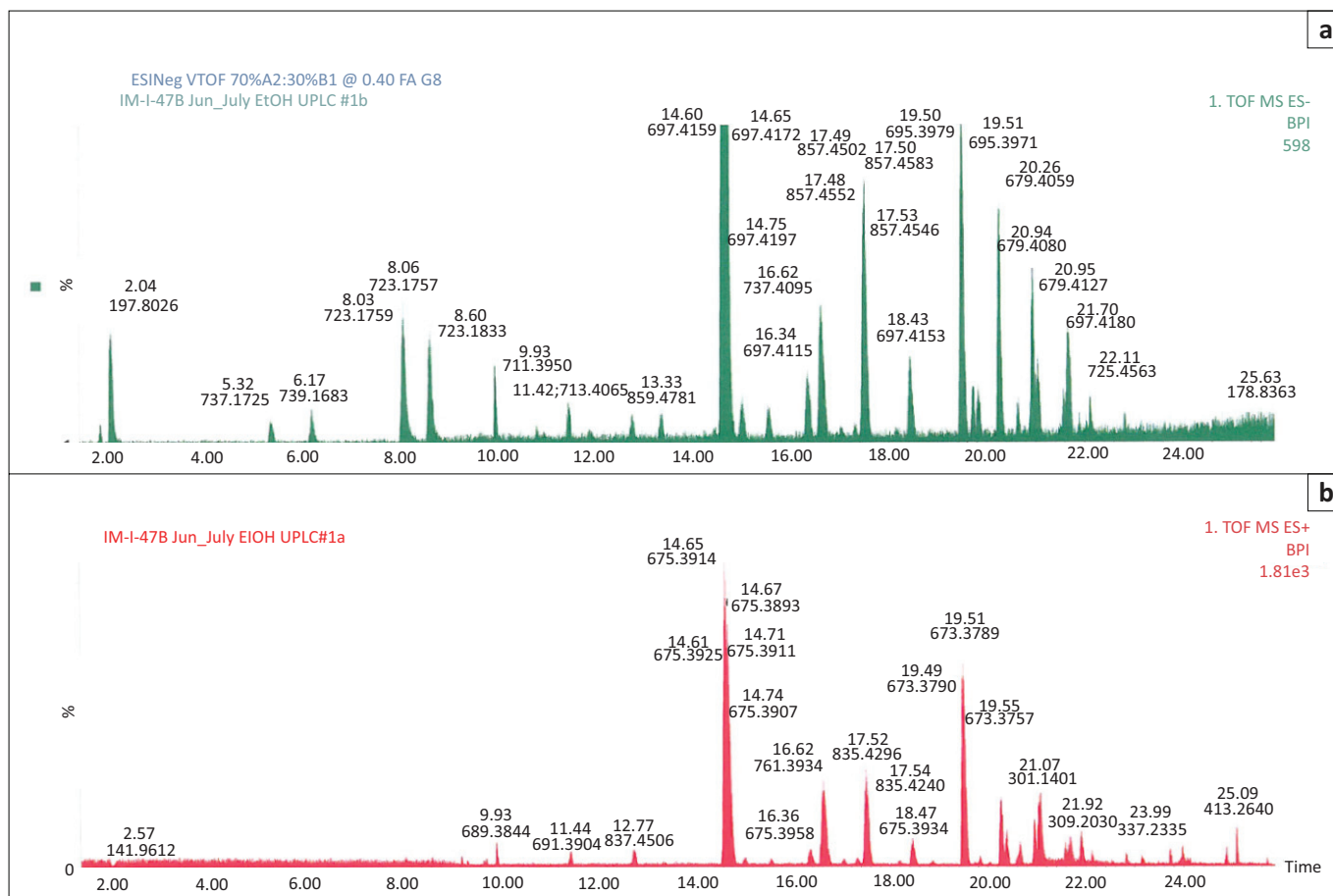
Bespreking

Van die drie ekstraktante wat in hierdie studie gebruik is, was etanol die beste. Dit was in al drie ekstraktietye in staat om die grootste massa van die bogrondse plantmateriaal te onttrek. Gedistilleerde water het die minste plantmateriaal onttrek. 'n DLC is gebruik om die profiel van die ongesuiwerde ekstrakte en al die breuke van die verbindings wat in *S. frutescens* gevind is, te bepaal. Die chromatogramme wat in CMWM1 ontwikkel is, het meer verbindings geskei as die wat in CMWM2 en BAW ontwikkel is (Figuur 1). Die etanol- en DCM:MeOH 1:1-ekstrakte het ook meer verbindings gehad as die waterekstrakte en dieselfde waarneming is vir die UV-aktiewe bande gemaak.

Elke ongesuiwerde ekstrakte is teen *M. smegmatis* getoets om die MIK daarvan te bepaal. Tabel 5 toon aan dat ekstrakte met DCM:MeOH 1:1 die grootste aktiwiteit met minimum



FIGUUR 3: Chromatogramme wat ES- (a) en ES+ (b) profiele van die H₂O-ekstrakte toon.



FIGUUR 4: Chromatogramme wat die ES- (a) en ES+ (b) profiele van EtOH-ekstrakte toon.

inhibisiekonsentrasiewaardes gehad het. Dit het gewissel van so min soos 0.28 mg/mL tot 1.04 mg/mL en waterekstrak het die minste bevat. Katerere en Eloff (2005) het dieselfde waarneming gemaak waar die heksaan-, DCM- en etielasetaat-ekstrak beter antimikrobiële aktiwiteit gehad het (MIKs van 2.5 mg/mL, 1.25 mg/mL en 0.31 mg/mL onderskeidelik) teen *Staphylococcus aureus*, wat 'n Gram-positiewe mikro-organisme is wat nie met *Mycobacterium* spesies vergelyk kan word nie. Hulle water-, etanol- en aseton-ekstrak het minimum inhibisiekonsentrasiewaardes van so hoog soos 10 mg/mL gehad. Benewens die feit dat tradisionele genesers dikwels water gebruik om afkooksels en adaptogeniese tonika te maak, is bevind dat die waterekstrak die minste aktief is. Hierdie bevindinge kan toegeskryf word aan water se onvermoë om nie-polêre verbindings te onttrek (Masoko & Nxumalo 2013). Geen aktiwiteit is in bio-outografie gevind nie (resultaat nie aangedui). 'n Mens kan gevalle waar minimum inhibisiekonsentrasiewaardes antimikrobiële aktiwiteit getoon het terwyl bio-outografie niks kon opspoor nie, verduidelik deur die moontlikheid dat die aktiewe verbindings tydens die verwydering van die DLC-elemente verdamp het soos vroeër vermeld, of deur die ontwinging van die sinergisme tussen aktiewe bestanddele deur DLC (Masoko & Eloff 2005). Die feit dat nie een van die verbindings wat op bio-outogramme geïdentifiseer is enige antimikrobiële aktiwiteit gehad het nie, toon dat dit nie prakties haalbaar is om antimikrobiële verbindings uit hierdie plant te probeer isoleer nie.

Die antioksidantverbindings in difeniel-pikriëlhidrasiel was as geel kolle teen 'n pers agtergrond sigbaar. Toe omkeerdefase DLC-chromatogramme met DFPD as opsporingsagent gebruik is, was die ontwikkelende kleur stabiel wat die identifisering van radikaal-suiwerende aktiwiteit na 'n paar minute moontlik gemaak het (Figuur 2). Hierdie metode kan ook vir die biotoetsgeleide isolering van ongeïdentifiseerde natuurlike antioksidante benut word en sou gebruik kon word om potensiële antioksidante uit 'n groep met struktureel diverse verbindings te kies. Die huidige toepassing bewys ook dat 'n standaard HPTLC-stelsel veelsydig en aanpasbaar genoeg is om 'n bykomende doel op die gebied van geneesmiddelontdekking te dien. Desnieteenstaande is geen antimikrobiële aktiwiteit in ekstrakte uit *S. frutescens* bepaal nie. Die studie doen aan die hand dat daar geen verband tussen die antioksidant- en antibakteriële aktiwiteit van die ekstrakte uit *S. frutescens* is nie. In 'n studie deur Katerere en Eloff (2005) is 'n betekenisvolle hoeveelheid antioksidantaktiwiteit ook gevind vir die meer polêre oplosmiddels (bv. water) wat in die ekstraksieproses gebruik is. Dit mag dus wees dat bakteriële oksidatiewe status en/of die metabolisme van reaktiewe suurstofspesies by superoksied dismutasiefunksies betrokke kan wees (Langford, Williams & Kroll 1991).

HPLC-analise is 'n analitiese prosedure wat meer sensitief en selektief vir natuurlike produkte is - nie net om die profiel van chemiese bestanddele van plante te bepaal nie, maar

TABLE 3: MS-ES-negatiewe verteenwoordigers van molekulêre massa en retensietyd van verbindings in *Sutherlandia frutescens*.

Retensietyd (minute) [†]	Molekulêre massa (Mw) (u)		Retensietyd (minute) [‡]
	Waterekstrak [†]	Etanolekstrak [‡]	
2.22	341.0828	197.8026	2.04
4.73	136.0332	737.1725	5.32
6.14	739.1710	739.1683	6.17
6.16	739.1711	723.1759	8.03
6.22	739.1738	723.1757	8.06
6.25	739.1694	723.1833	8.60
6.31	739.1705	711.3950	9.93
8.02	723.1780	713.4065	11.42
8.59	723.1776	859.4781	13.33
8.63	723.1731	697.4159	14.60
8.66	723.1765	697.4172	14.65
9.93	711.3937	697.4197	14.75
11.44	713.4089	697.4115	16.34
11.47	713.4111	737.4095	16.62
14.57	697.3928	857.4552	17.48
14.63	697.4022	857.4502	17.49
14.98	697.4167	857.4583	17.50
16.33	697.4172	857.4546	17.53
18.42	697.4202	697.4153	18.43
19.49	695.4011	695.3979	19.50
19.51	695.3994	695.3971	19.51
20.25	679.4064	679.4059	20.26
20.94	679.4039	679.4080	20.94
21.68	697.4185	679.4127	20.95
21.70	697.4163	697.4180	21.70
21.73	697.4142	725.4563	22.11
22.11	693.4255	178.8363	25.63

[†], Retensietyd en molekulêre massa in verbindings wat in die waterekstrak gevind is;

[‡], Retensietyd en molekulêre massa van verbindings wat in die etanolekstrak gevind is.

TABLE 4: MS-ES positiewe verteenwoordigers van molekulêre massa en retensietyd van verbindings wat in *Sutherlandia frutescens* gevind is.

Retensietyd (minute) [†]	Molekulêre massa (Mw) (u)		Retensietyd (minute) [‡]
	Waterekstrak [†]	Etanolekstrak [‡]	
1.65	349.1833	141.9612	2.57
4.72	206.0480	689.3844	9.93
6.19	609.1339	691.3904	11.44
8.08	747.1559	837.4506	12.77
9.25	441.2381	675.3925	14.67
9.92	689.3722	675.3914	14.65
11.44	691.3840	675.3893	14.67
12.74	837.4393	675.9311	14.71
14.54	675.3962	675.3907	14.74
14.55	675.3954	675.3958	16.36
14.61	675.3917	761.3934	16.62
14.71	675.3939	835.4296	17.52
14.75	675.3943	835.4240	17.54
16.36	675.3883	675.3934	18.47
17.50	835.4254	673.3790	19.49
17.55	489.3510	673.3789	19.51
17.60	835.4218	673.3757	19.55
18.47	675.3939	301.1401	21.07
19.49	673.3784	308.2030	21.92
19.53	489.3553	337.233	23.99
19.54	673.3756	413.2640	25.09
20.27	657.3820	214.9169	27.81
20.66	759.3757	141.9634	28.51
21.91	675.3982	-	-
24.02	589.3860	-	-

[†], Retensietyd en molekulêre massa in verbindings wat in die waterekstrak gevind is;

[‡], Retensietyd en molekulêre massa van verbindings wat in die etanolekstrak gevind is.

TABLE 5: Gemiddelde minimum inhibisie-konsentrasie (mg/mL) en totale aktiwiteit (mL/g) van ongesuiwerde ekstrakte van *Sutherlandia frutescens* na 24 uur teen 37 °C.

Extraktante	Gemiddelde minimum inhibisie-konsentrasiewaardes (mg/mL)	Totale aktiwiteit (mL/g)
H ₂ O	1.04	4.70
Etanol	0.52	4.69
DCM: MeOH (1:1)	0.28	10.12
Gemiddeld	0.61	6.50

DCM: MeOH, dichlorometaan:metanol.

ook om geïsoleerde stowwe te kwantifiseer (Marques et al. 2013). Die ongesuiwerde ekstrakte in water en etanol is ontleed deur HPLC-MS te gebruik om hulle chromatografiese profiele te bepaal. Die profiele van hierdie ekstrakte in sowel ESI- as ESI+-modus (negatiewe en positiewe modusse vir elektrospoei-ionisering) word in Figure 3 en 4 aangetoon. Die chromatografiese profiel van die etanolekstrak in Figuur 4 toon 'n groter hoeveelheid verbindings met 'n negatiewe ioniseringsmodus as die met 'n positiewe ES. Dit is presies die teenoorgestelde van die waterekstrak (Figuur 3) wat meer verbindings in die ES+-modus as in die ES-modus bevat. Fut et al. (2008; 2010) het van die belangrikste verbindings wat in *S. frutescens* voorkom geïsoleer, naamlik sikloataan glikosied en flavonol glikosied. In 'n studie deur Fu et al. (2008) is vier nuwe sikloataan glikosiede geïsoleer en hulle word sutherlandiosied A, B, C en D genoem. Sutherlandiosied B is die belangrikste glikosied van hierdie plant en ook vir die meeste van die plant se bioaktiwiteite verantwoordelik. Sutherlandiosiede A en B het beide die chemiese formule C₃₆H₆₀O₁₀ en 'n pseudo-ioonpiek is by *m/z* 675.4042 [M + Na]⁺ waargeneem. Die enigste verskil is dat 'n β-glukopiranosiel-moëteit in sutherlandiosied B waargeneem is. Sutherlandiosied C het 'n chemiese formule (C₃₆H₅₈O₁₀) en 'n molekulêre massa van 650 u, en D is dieselfde as C behalwe dat dit 'n molekulêre massa van (C₃₆H₅₈O₉) en een minder suurstofmolekule het. Die chromatogramme in hierdie studie toon dat die glikosiedryke area tussen net meer as 14 min en net minder as 16 min voorkom en hierdie streek is ook in die negatiewe modus van elektrospoei-ionisering sigbaar. Hierdie sutherlandiosiede is triterpenoiede en daar is dus meer daarvan in die etanolekstrak as in die waterekstrak. Dit kan waarskynlik daaraan toegeskryf word dat triterpenoiede beter in alkohol as in water oplos. Fu et al. (2010) het flavonol glikosiede geïsoleer en hulle is sutherlandiene A, B, C en D genoem. Hulle pseudomolekulêre pieke het tussen *m/z* 767 en 747 gewissel en hulle is (soos in Figuur 3 te sien) sigbaarder en in hoër konsentrasies teenwoordig in die waterekstrak. Dit kan waarskynlik daaraan toegeskryf word dat flavonoïde meer polêr is en dus in staat is om die beste in water op te los. Benewens die verbindings wat alreeds vermeld is, het die chromatografiese profiele ook aangedui dat daar baie verbindings in *S. frutescens* is wat nog nie beskryf of geïsoleer is nie.

Gevolgtrekking

Ten slotte het hierdie studie en verskeie studies wat hierbo vermeld is, getoon dat *S. frutescens* wel aktiwiteit teen 'n verskeidenheid mikro-organismes het en hierdie navorsing

ondersteun die gebruik van hierdie plant deur tradisionele genesers vir verskeie kwale, insluitende die behandeling en ondersteunende behandeling vir tuberkulose. Verdere studie om die ekstrakte teen *M. tuberculosis* se sijkimiasie te toets en die antimikobakteriese verbindings te isoleer, sal nog gedoen word.

Erkenning

Ons wil graag die Wetenskaplike en Nywerheidsnavorsingsraad sowel as die Universiteit van Limpopo vir finansiële ondersteuning bedank.

Kompeterende belange

Die outeurs verklaar dat hulle geen kompeterende belange het nie.

Outeursbydraes

I.H.M. het die eksperimente gedoen en die eerste konsepartikel geskryf. R.H. het die eksperimente ontwerp. P.M. het die protokol ontwerp en die analise van die eksperimente bestuur. Al die outeurs het die finale manuskrip gelees, teksversorg en goedgekeur.

References

- Begue, W.J. & Kline, R.M., 1972, 'The use of tetrazolium salts in bioautographic procedure', *Journal of Chromatography* 88, 182–184. [https://doi.org/10.1016/S0021-9673\(00\)92965-0](https://doi.org/10.1016/S0021-9673(00)92965-0)
- Chaturvedi, V., Dwivedi, N., Tripathi, R.P. & Sinha, S., 2007, 'Evaluation of *Mycobacterium smegmatis* as a possible surrogate screen for selecting molecules active against multi-drug resistant *Mycobacterium tuberculosis*', *Journal of General and Applied Microbiology* 53, 333–337. <https://doi.org/10.2323/jgam.53.333>; PMID:18187888
- Deby, C. & Margotteaux, G., 1970, 'Relationship between essential fatty acids and tissue antioxidant levels in mice', *Comptes Rendus des Seances de la Societe de Biologie et de ses Filiales* 165, 2675–2681.
- Eloff, J.N., 1998, 'A sensitive and quick microplate method to determine the minimal inhibitory concentration of plant extracts for bacteria', *Planta Medica* 64(8), 711–713. <https://doi.org/10.1055/s-2006-957563>; PMID:9933989
- Eloff, J.N., 2004, 'Quantifying the bioactivity of plant extracts during screening and bioassay guided fractionation', *Phytomedicine* 11, 370–371. <https://doi.org/10.1078/0944711041495218>; PMID:15185853.

- Fu, X., Li, X., Smillie, T., Carvalho, P., Mabusele, W., Syce, J. et al., 2008, 'Cycloartane glycosides from *Sutherlandia frutescens*', *Journal of Natural Product* 71(10), 1749–1753. <https://doi.org/10.1021/np800328r>; PMID:18808182; PMCID:PMC3457064.
- Fu, X., Li, X., Wang, Y., Avula, B., Smillie, T.J., Mabusele, W. et al., 2010, 'Flavonoid glycosides from the South African medicinal plant *Sutherlandia frutescens*', *Planta Medica* 76, 178–181. <https://doi.org/10.1055/s-0029-1186030>; PMID:19670162.
- Haraguchi, H., 2001, *Antioxidant plant constituents in bioactive compounds from natural sources – isolation, characterisation and biological properties*, Taylor and Francis, London.
- Katerere, D.R. & Eloff, J.N., 2005, 'Antibacterial and antioxidant activity of *Sutherlandia frutescens* (Fabaceae), a reputed anti-HIV/AIDS phytomedicine', *Phytotherapy Research* 19, 779–781. <https://doi.org/10.1002/ptr.1719>; PMID:16220570.
- Langford, P., Williams, A.E. & Kroll, J.S., 1991, 'Superoxide dismutases of pathogenic and non-pathogenic *Streptococcus suis* type 2 isolates', *FEMS Microbiology Letters* 77(2–3), 347–350. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.1991.tb04374.x>
- Marques, G.S., Leao, W.F., Lyra, M.A.M., Peixoto, M.S., Monteiro, R.P.M., Rolim, L.A. et al., 2013, 'Comparative evaluation of UV/VIS and HPLC analytical methodologies applied for quantification of flavonoids from leaves of *Bauhinia forficata*', *Brazilian Journal of Pharmacology* 23(1), 51–57. <https://doi.org/10.1590/S0102-695X2012005000143>
- Masoko, P. & Eloff, J.N., 2005, 'The diversity of antifungal compounds of six South African *Terminalia* species (Combretaceae) determined by bioautography', *African Journal of Biotechnology* 4(12), 1425–1431.
- Masoko, P. & Nxumalo, K.M., 2013, 'Validation of antimycobacterial plants used by traditional healers in three districts of the Limpopo province (South Africa)', *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine* 2013, Article ID 586247, 7 pages. <http://dx.doi.org/10.1155/2013/586247>
- Mills, E., Coope, C., Seely, D. & Kanfer, I., 2005, 'African herbal medicines in the treatment of HIV: *Hypoxis* and *Sutherlandia*. An overview of evidence and pharmacology', *Nutrition Journal* 4, 19. <https://doi.org/10.1186/1475-2891-4-19>; PMID:15927053; PMCID:PMC1156943.
- Ojewole, J.A.O., 2008, 'Anticonvulsant property of *Sutherlandia frutescens* (Fabaceae) shoots aqueous extract', *Brain Research Bulletin* 75, 126–132. <https://doi.org/10.1016/j.brainresbull.2007.08.002>; PMID:18158106.
- Prevo, D., Swart, P. & Swart, A.C., 2008, 'The influence of *Sutherlandia frutescens* on adrenal steroidogenic cytochrome P450 enzymes', *Journal of Ethnopharmacology* 118, 118–126. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2008.03.019>; PMID:18485640.
- Reyrat, J.M. & Kahn, D., 2001, '*Mycobacterium smegmatis*: An absurd model for tuberculosis', *Trends Microbiology* 9(10), 472–474. [https://doi.org/10.1016/S0966-842X\(01\)02168-0](https://doi.org/10.1016/S0966-842X(01)02168-0).
- SA Healthinfo, 2009, *Traditional medicines, Sutherlandia frutescens herba*, viewed 10 May 2012, from <http://www.sahealthinfo.org/traditionalmeds/monographs/sutherlandia.htm>
- Seier, J.V., Mdhlu, M., Dhansay, M.A., Loza, J. & Laubscher, R.A., 2002, *Toxicity study of Sutherlandia leaf powder (Sutherlandia frutescens sub-species microphylla) consumption*, Medical Research Council, Tygerberg, South Africa.
- Van Wyk, B.E., 1997, *Medicinal plants of South Africa*, Briza Publishers, Pretoria, SA, pp. 246–247.
- World Health Organization (WHO), 2007a, *Report 2007: Global tuberculosis control. Surveillance, planning, financing*, WHO, Geneva.
- World Health Organization (WHO), 2007b, *The global MDR-TB and XDR-TB response plan, 2007–2008*, WHO, Geneva.