

Die groot verskil in chemiese samestelling en anti-bakteriese aktiwiteit van twee na-verwante *Leonotis* spesies (Lamiaceae) mag taksonomiese waarde hê

The major differences in chemical composition and antibacterial activity of two closely related Leonotis species (Lamiaceae) may have taxonomic value

JN ELOFF

Fitomedisyne Program, Departement Parakliniese Wetenskappe,
Veeartsenykunde Fakulteit, Universiteit van Pretoria
kobus.elloff@up.ac.za



Kobus Eloff

JN (KOBUS) ELOFF was sedert 1974 professor of buitengewone professor in Plantkunde aan die Universiteite van Vrystaat, Kaapstad, Stellenbosch, Johannesburg en Pretoria. Hy was ook Direkteur van die Nasionale Botaniese Tuine en Direkteur Navorsing van die Nasionale Botaniese Instituut. Na sy aftrede in 1999 is hy as leier van 'n fitomedisyne navorsingsgroep aan die Universiteit van Pretoria aangestel (www.up.ac.za/phyto). Hy het reeds 43 MSc en 23 PhD studente gelewer met 12 PhD studente wat tans onder sy leiding werk. Hy het meer as 220 wetenskaplike publikasies gelewer en is uitgenooi as referent vir verskeie nasionale en internasionale organisasies en meer as 50 wetenskaplike tydskrifte. Hy dien op verskeie nasionale en internasionale organisasies se besture, insluitende die Dagbestuur van die Raad van die Suid-Afrikaanse Akademie vir Wetenskap en Kuns. Hy het die Senior Medalje van die Suid-Afrikaanse Genootskap vir Plantkundiges ontvang asook die Havengaprys vir Biologiese Wetenskappe en die Goue medalje van die Akademie vir Wetenskap en Kuns.

JN (KOBUS) ELOFF was professor or extraordinary professor at the universities of the Free State, Cape Town, Stellenbosch, Johannesburg and Pretoria since 1974. He was also the Director of the National Botanical Gardens and Director of Research of the National Botanical Institute. After his retirement in 1999 he became the leader of a phytomedicine research group at the University of Pretoria (www.up.ac.za/phyto). He has delivered 43 MSc and 23 PhD students and is currently guiding 12 PhD students. He has delivered more than 220 scientific publications and has acted as referee for several national and international funding agencies and has been invited to review manuscripts for more than 50 different scientific journals. He serves on the Boards of several national and international organizations including the Executive Committee of the Board of the South African Academy for Science and Arts. He has received the Senior Medal from the South African Association of Botanists as well as the Havenga Prize for Biological Sciences and the Gold Medal from the SA Academy for Science and Arts.

ABSTRACT

The major differences in chemical composition and antibacterial activity of two closely related Leonotis species (Lamiaceae) may have taxonomic value

Several Leonotis species are used widely for medicinal purposes in Africa. There have been drastic changes in the taxonomic treatment of Leonotis species during the past decade. Two species, L. dysophylla and L. microphylla occurring in Pretoria have been considered as varieties

of the same species and as different species by different authors. Because *Leonotis* species are used widely as medicinal plants inter alia against bacterial infections, we decided to compare the chemical composition and antibacterial activity of four plants from each of two populations of the species.

The chemical composition of acetone extracts of finely ground leaves was determined by thin layer chromatography followed by spraying with vanillin-sulphuric acid. There were hardly any differences between plants from the same population. There were major differences between the two species in the composition of pigments separated by thin layer chromatography and for compounds visualized with the vanillin-sulphuric acid spray reagent. This supported the viewpoint that the two species should not be considered as varieties. The major differences found in chemical composition indicate that chemical parameters may play an important role in resolving taxonomic differences. Because such a small quantity of material is needed, it may be feasible to analyze one or two leaves obtained from herbarium sheets as an additional taxonomic parameter.

The antibacterial activity of the acetone extracts was determined using a two-fold serial dilution microplate method with tetrazolium violet as indicator of growth. The specific strains of the four most important nosocomial bacterial pathogens suggested by the United States National Committee for Clinical Laboratory Standards were used: *Staphylococcus aureus* (American Type Culture Collection 29213), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853), *Escherichia coli* (ATCC 25922) and *Enterococcus faecalis* (ATCC 21212). The minimum inhibitory activity of the crude extract of *L. microphylla* was 58, 33, 113 and 15 µg/ml against the four pathogens respectively. The MIC of the *L. dysophylla* extracts were 110, 95, 113 and 63 µg/ml respectively. If the total activity was calculated by dividing the quantity in mg extracted from one gram of each species with the MIC, the following values were obtained against the respective bacteria using the *L. microphylla* extract: 700, 1400, 381 and 2100 ml/g. The values for the *L. dysophylla* extract were 381, 420, 420 and 700 ml/g. This means that if one gram of dried leaves of *L. microphylla* were extracted with acetone it could be diluted to 2100 ml and it would still kill *E. faecalis*.

These results not only prove the possible use of chemical and biological activity as taxonomic markers, but also the potential value of *L. microphylla* acetone extracts in treating infections with *P. aeruginosa* and *E. faecalis*. The activity of the crude extract against *P. aeruginosa* was as good as or better than the activity of ampicillin, gentamicin, nitrofurantoin, trimethoprim or sulfisoxazole. The activity against *E. faecalis* was as good as or better than ampicillin, gentamicin, nitrofurantoin or sulfisoxazole. If the acetone leaf extract of *L. microphylla* is stable and not toxic there is a good possibility of developing a commercially useful antibacterial product from it.

The results indicate the taxonomic value of chemical parameters and biological activity and support the view that the two taxa should be considered as different species.

KEY WORDS: *Leonotis*, *L. microphylla*, *L. dysophylla*, *L. randii*, *L. intermedia*, minimum inhibitory concentration, antibacterial activity, chemical composition, commercial use

TREFWOORDE: *Leonotis*, *L. microphylla*, *L. dysophylla*, *L. randii*, *L. intermedia*, minimum inhiberende konsentrasie, antibakteriese aktiwiteit, chemiese samestelling, handel

OPSOMMING

Daar is verskeie menings oor die taksonomie van *Leonotis* spesies en onlangse outeurs het groot veranderings aanbeveel. Sommige outeurs beskou *L. dysophylla* en *L. microphylla* as variante van dieselfde spesie en ander as twee aparte spesies. *Leonotis* spesies word wyd gebruik vir

medisinale doeleindes. Heelwat van die gebruike is vir toestande wat met bakteriese infeksies verband hou. Die chemiese samestelling en antibakteriese aktiwiteit van verskillende plante van twee populasies van die spesies is ondersoek om te bepaal of hierdie kenmerke van taksonomiese waarde kan wees.

Beide die samestelling van pigmente geskei deur dunlaagchromatografie en van verbindings wat sigbaar geword het na behandeling van chromatogramme met vanillien-swawelsuur het aangedui dat daar groot verskille tussen plante van die twee populasies bestaan.

Die antibakteriese aktiwiteit van asetoonekstrakte is bepaal deur die minimum inhiberende konsentrasie (MIK) te bepaal deur middel van 'n tweevoudige verdunningsreeks mikroplaat metode met tetrasoliumvioleat as aanduiders van bakteriese groei. As toetsorganismes is *Staphylococcus aureus* (American Type Culture Collection 29213), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853), *Escherichia coli* (ATCC 25922) en *Enterococcus faecalis* (ATCC 21212) gebruik. Daar was groot verskille in die antibakteriese aktiwiteit tussen die twee spesies veral nadat die totale aktiwiteit in ml/g droë materiaal tussen die twee spesies vergelyk is. Die *L. microphylla* asetoonekstrak het verbasende goeie aktiwiteit gehad met 'n MIK (33 µg/ml) van net so goed of beter as die MIK van ampicillien, gentamisien, nitrofurantoen, trimetroptien, sulfisoksasool teenoor *P. aeruginosa*. Dieselfde ekstrak het 'n MIK (15 µg/ml) van net so goed of beter as ampicillien, gentamisien, nitrofurantoen en sulfisoksasool gehad. Daar bestaan 'n sterk moontlikheid dat 'n aseton ekstrak van *L. microphylla* kommersiële toepassing kan vind indien daar nie stabiliteit of toksisiteit probleme is nie.

Die resultate ondersteun die beskouing dat die twee taksons as afsonderlike spesies beskou moet word.

INLEIDING

Volgens die webbladsy ZipcodeZoo.com (opgedateer 1 Januarie 2010) met 'n indrukwekkende voorkoms bestaan die genus *Leonotis* in die familie Lamiaceae uit ongeveer 40 spesies. Die webbladsy beweer ook dat al die spesies uit Suider-Afrika afkomstig is met die uitsondering van *L. nepetifolia* wat ook in tropiese Afrika en Indië voorkom. Die jongste deeglike studie van die plantegroei van sub Sahara Afrika¹ stel egter 'n ander beeld. Hiervolgens word slegs 12 spesies erken waarvan 6 in tropiese Afrika 3 in beide tropiese en subtropiese Afrika voorkom en 3 slegs in subtropiese Afrika. In totaal is daar egter nog 57 sinonieme wat nou versink is in die 12 spesies wat die outeurs erken. In hierdie genus is daar grootskaalse verskille tussen die behandeling van die genus in die Flora van Suidelike Afrika en Enumération des plante sa fleurs d'Afrique tropicale wat die publikasie van Klopper en medewerkers in 2006¹ voorafgegaan het.

Daar is twee ander *Leonotis* spesies wat in die omgewing van Pretoria natuurlik voorkom waarvan die verwantskap op verskillende wyses deur verskillende outeurs vertolk word. Van Wyk en Malan² in 1988 beskryf *Leonotis dysophylla* Benth. (klipdagga) as 'n robuuste meerjarige struik wat tot 2 m hoog word terwyl *L. microphylla* Skan (ook bekend as wilde dagga) 'n korter meerjarige struikie is. *L. dysophylla* se blare is gewoonlik langer as 50 mm en met fluweelagtige hare terwyl die blare van *L. microphylla* gewoonlik korter as 20 mm is met 'n vou in die midrib. *L. dysophylla* word in grasveld en bosveld, veral in die Pretoria/Magaliesberg gebied aangetref. *L. microphylla* is meer wydverspreid in klipperige grasveld.² Welman in 2002³ beskou die twee as subspecies naamlik *L. dysophylla* Benth. as *L. ocymifolia* (Burm.f.) Iwarsson var. *raineriana* (Vis.) Iwarsson, en *L. microphylla* Skan as *L. ocymifolia* (Burm.f.) Iwarsson var. *schinzii* (Gürke) Iwarsson. Klopper en medewerkers in 2006,¹ beskou *L. microphylla* as *L. randii* S.Moore. Hulle beskou *L. dysophylla* in subtropiese Afrika as *L. intermedia* Lindl., en *L. dysophylla* in tropiese

Afrika as *L. ocymifolia* (Burm f.) Iwarsson var *raineriana*. Dit is duidelik dat daar verskeie standpunte oor die taksonomiese posisie van die twee taksons is. Die chemiese samestelling van plantekstrakte lewer dikwels waardevolle inligting om taksonomiese verwantskappe van verskillende taksons te ondersoek.

Benewens die chemiese samestelling kan biologiese aktiwiteit ook as 'n taksonomiese maatstaf gebruik word. Verskillende *Leonotis* spesies word wyd vir verskeie medisinale doeleindes gebruik. Dekoksies van *L. leonurus* (wilde dagga) is ekstern gebruik om pitswere en velsiektes te behandel en intern as behandeling van hoes, verkoues, griep, brongitis, hoë bloeddruk en hoofpyn.^{4,5} 'n Dekoksie van *Leonotis dysophylla* is tradisioneel gebruik teen verkoues en as 'n tonikum.⁴ 'n Infusie van *L. microphylla* is gebruik vir pynlike vlekke en vir aambeie.⁴ Uit die tradisionele gebruike van *Leonotis* spp wil dit voorkom asof dit antibakteriese eienskappe mag hê. Met die wyd verspreide ontwikkeling van weerstandbiedendheid deur bakterieë as gevolg van die wangebruik van antibiotika word die arsenaal van chemiese wapens wat die mens beskikbaar het in die stryd teen mikroorganismes al hoe meer beperk. Daar is verskeie patogene waarteen daar prakties geen effektiewe middels bestaan nie. Geen nuwe model molekule vir die ontwikkeling van antibiotika het die afgelope paar dekades in die farmaseutiese mark gekom nie. Sommige outeurs waarsku dat die mens nou die post-antibiotiese tydperk nader.⁶ Omdat meer as 70% van die aktiewe verbindings wat in medisyne gebruik is, afkomstig is van natuurprodukte, is daar 'n grootskaalse ondersoek na die ontdekking van nuwe antibiotiese verbindings uit plante.⁷ Gevolglik is besluit om benewens die chemiese samestelling ook die antibakteriese aktiwiteit van verskillende plante van die twee taksons te ondersoek.

MATERIAAL EN METODES

Versameling en ekstraksie van plantmateriaal

Bogronde plantmateriaal is versamel van vier plante in die Pretoria Nasionale Botaniese Tuin en van die noordelike hang van die natuurlike koppies in Murrayfield naby die Pretoria Nasionale Botaniese Tuin. Herbarium eksemplare is geplaas in die medisinale herbarium van die Departement Parakliniese Wetenskappe van die Universiteit van Pretoria. Plantmateriaal is by kamertemperatuur in die skaduwee gedroog om foto-oksidase en chemiese veranderings te beperk. Hierna is die droë materiaal afkomstig van die verskillende plante afsonderlik fyngemaal in 'n Jankel en Künkel Model A10 laboratoriummeule. Vyf honderd mg van die plantmateriaal is met 5 ml asetoon geëkstraheer deur dit vinnig in 'n poli-etileen sentrifugeerbuis vir 5 minute in 'n Vortex model K-500 proefbuisemmer te skud. Asetoon is die beste ekstraheermiddel vir die ondersoek na antimikrobiologiese aktiwiteit van plante.⁹ Hierna is die plantreste verwyder deur dit teen 5000 x g af te swaai. Die supernaat is by kamertemperatuur gedroog, die opbrengs is bepaal en dit is opgelos in asetoon om 'n 10 mg/ml konsentrasie te lewer.

Bepaling van chemiese samestelling

Van elke ekstrak is 10 µl in 'n dun streep op Merck F 254 dunlaagchromatografieplate geplaas en dit is ontwikkel met benseen/etanol/ammoniumhidroksied (90/9/1) (BEA) en chloroform/etielasetaat/mieresuur (5/4/1, v/v/v) (CEF).⁸ Die chromatogramme is in sigbare en ultravioletlig (245 and 360 nm, Camac Universal UV lamp TL-600) ondersoek en ingeskandeer met 'n Hewlett Packard skandeerder. Die chromatogramme is daarna met 0.59 g vanillien opgelos in 100 ml swawelsuur:etanol (4:1) gesprei en by 100°C geplaas tot optimale kleurontwikkeling.

Bepaling van antibakteriese aktiwiteit

Die minimum inhiberende konsentrasie (MIK) van elke ekstrak is bepaal deur 'n tweevoudige verdunningsreeks mikroplaat metode.¹⁰ Die volgende toetsorganismes is gebruik: Gram positiewe bakterieë *Staphylococcus aureus* (American Type Culture Collection 29213), en *Enterococcus faecalis* (ATCC 21212). Gram negatiewe bakterieë: *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853) en *Escherichia coli* (ATCC 25922). Hierdie vier bakterie spesies is verantwoordelik vir die meeste nosokomiale infeksies in hospitale.¹² Die spesifieke isolate wat gebruik is, is dié wat aanbeveel is deur die National Committee for Clinical Laboratory Standards.¹³

RESULTATE EN BESPREKING

Ekstraksie van droë materiaal met asetoon

Asetoon het verskeie voordele as ekstraheermiddel in die analise van chemiese verbindings en ekstraksie van verbindings met antibakteriese aktiwiteit.⁹ Die ekstraksiedoeltreffendheid van die asetoon vir die verskillende plante was redelik konstant vir *L. dysophylla* (21, 21, 22, 18 mg geëkstraheer uit 500 mg droë materiaal), maar vir *L. microphylla* was daar 'n groter variasie (32, 24, 26, 24 mg geëkstraheer uit 500 mg droë materiaal). Die opbrengs van 4-6% is laer as die waardes (wissel tussen 2.6-20% met 'n gemiddelde waarde van 10.65%) wat met 27 lede van die Combretaceae bevind is.¹¹ Dit mag toegeskryf word aan die teenwoordigheid van meer vesels in die blare van die twee *Leonotis* taksons. 'n Tweede ekstraksie van die residu van *L. microphylla* het die persentasie ekstraksie met ongeveer 0.6% verhoog.

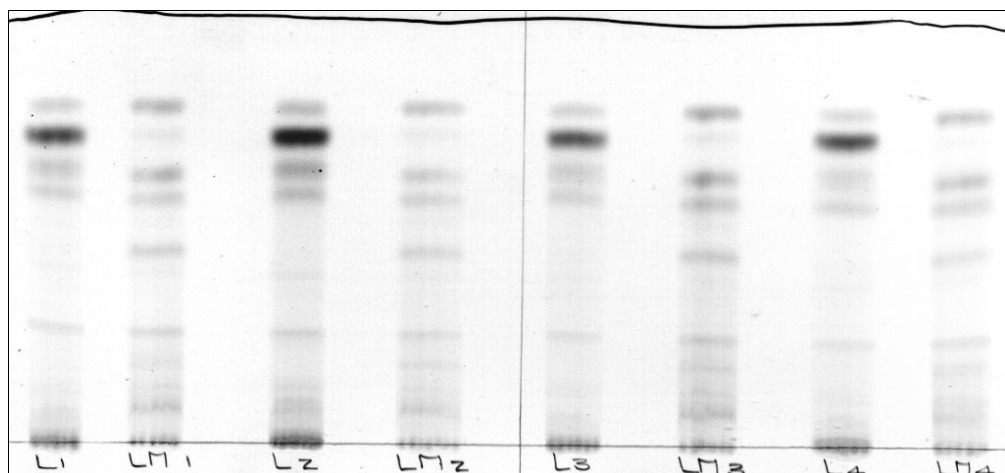
Chemiese analise deur dunlaagchromatografie

Voordat die chromatogramme met vanillien-swawelsuur behandel is, was daar verskeie verbindings sigbaar (Figuur 1). Hierdie verbindings dui pigmente aan wat onder die alkaliese toestande van die loopmiddel BEA gekleur is. Hierdie chromatogramme het drasties verskil van dié wat met vanillien-swawelsuur behandel is. Hierdie spuitmiddel reageer met 'n verskeidenheid alkoholiese en fenoliese verbindings asook met steroïede en essensiële olies.¹⁴ Verskeie van die pigmente het nie met die vanillien-swawelsuur gereageer nie. Met albei behandelings van die chromatogramme was daar egter 'n groot verskil in die chemiese samestelling van die twee taksons, maar nie 'n beduidende verskil in die relatiewe konsentrasies van die verbindings in die verskillende plante van dieselfde takson nie (Figuur 1 en 2).

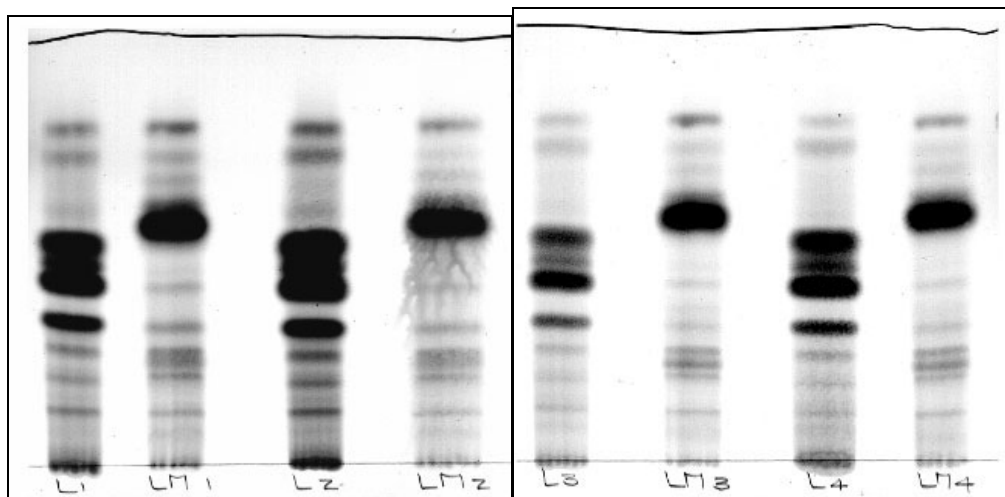
Die uitgangspunt van chemiese taksonomie is dat verskille in die genetiese samestelling tot verskillende vlakke van ensiemkonsentrasies kan lei. Dit kan weer tot verskillende metaboliese weë en/of verskillende poelkonsentrasies van metaboliete lei. Chemiese parameters is nie meer of minder werd as ander parameters soos inwendige of uitwendige morfologie in taksonomiese besluite nie. In sekere plantgroepe speel chemiese parameters 'n baie groter rol as morfologiese parameters, maar in ander groepe het dit min waarde. Uit die groot verskille in die samestelling van die metaboliete wat sigbaar was wat pigmentsamestelling en fenoliese verbindings betref, wil dit voorkom asof die twee taksons as afsonderlike spesies beskou kan word. Om hierdie gevolgtrekking te bevestig, sou 'n ondersoek van die betrokke taksons uit verskillende omgewings sinvol wees.

Antibakteriese aktiwiteit van die ekstrakte

Met enkele uitsonderings was daar min variasie in die aktiwiteite van verskillende plante van dieselfde spesie. Oor die algemeen het die *L. microphylla* ekstrakte 'n hoër aktiwiteit as die *L. dysophylla* ekstrakte gehad in Tabel 1. Eloff¹⁵ kon aandui dat nie alleen die minimum inhibeerder konsentrasie nie, maar ook die hoeveelheid geëkstraheer uit die plant in berekening gebring moet word om spesies met mekaar te vergelyk. Hy het die konsep "totale aktiwiteit"



Figuur 1: Chromatogramme van 100 µg ekstrakte afkomstig van vier plante van *L. dysophylla* (L1-L4) en van vier plante van *M. microphylla* LM1-LM4) direk na ontwikkeling met BEA.



Figuur 2: Chromatogramme van 100 µg ekstrakte van vier plante van *L. dysophylla* (L1-L4) en van vier plante van *M. microphylla* LM1-LM4) gesput met vanillien-swawelsuur en verhit na ontwikkeling met BEA.

ontwikkel waardeur die massa in mg geëkstraheer uit een g plantmateriaal gedeel word deur die MIK in mg/ml om die totale aktiwiteit van die spesie te lower. Toe hierdie waardes bereken is, het dit geblyk dat daar 'n groot verskil in die totale aktiwiteit tussen die twee spesies is. Met die uitsondering van *E. coli* het *L. microphylla* twee tot drie keer hoër totale aktiwiteit as *L. dysophylla* gehad. Die syfers van 1200 en 2100 ml/g beteken dat indien die asetoon ekstrak uit een gram van *L. microphylla* na 1200 en 2400 ml verdun word dit onderskeidelik *P. aeruginosa* en *E. faecalis* se groei nog steeds sou inhibeer. Dit blyk dus dat hierdie spesie uitstekende toepassing sou kon vind in die bekamping van sekere infeksies en veral vir uitwendige infeksies.

Ekstrakte van albei taksons het buitengewoon goeie aktiwiteite teen beide Gram-negatiewe en Gram-positiewe bakterieë gehad. Hoe laer die MIK waarde is, hoe meer aktief is die ekstrak. Met enkele uitsonderings was die waardes bemoedigend. Oor die algemeen was daar minder variasie tussen die *L. microphylla* plante as tussen die *L. dysophylla* plante. In hierdie eksperiment is geen positiewe kontrole gebruik nie. Om die aktiwiteit van die ekstrakte te evalueer, is dit belangrik om dit te vergelyk met die aktiwiteite van bestaande antibiotika. Toe dieselfde metode gebruik is om die aktiwiteit van verskillende antibiotika teen dieselfde bakteriese isolate te bepaal, is die onderstaande waardes in mg/ml vir ampisillien, gentamisien, norfloksasien, nitrofurantoën, trimetroptien, sulfisoksasool onderskeidelik bevind.¹⁰

<i>E. coli</i>	0.04, 0.006, 0.0008, 0.025, 0.005 en 0.049
<i>S. aureus</i> :	0.04, 0.001, 0.006, 0.1, 0.620 en 0.09.
<i>E. faecalis</i> :	0.04, 0.008, 0.005, 0.050, 0.005 en 0.09
<i>P. aeruginosa</i>	0.250, 0.016, 0.006, 0.1, 0.16 en 0.125

Teenoor *E. coli* het die ekstrakte oor die algemeen laer aktiwiteit as die antibiotika gehad. Die ekstrak van *L. microphylla* het dieselfde orde aktiwiteit of beter aktiwiteit teen *P. aeruginosa* gehad as vyf van die ses ander antibiotika. Teenoor *S. aureus* en *E. faecalis* het net twee van die antibiotika beter aktiwiteite gehad as die ekstrakte.

TABEL 1: Minimum inhiberende konsentrasies in mg/ml en totale aktiwiteit in ml/g van asetoon ekstrakte van vier *Leonotis dysophylla* en vier *L. microphylla* plante op *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli* en *Enterococcus faecalis*. Elke waarde vir die individuele plante verteenwoordig die gemiddelde van drie bepalings.

Plant	Mikroörganisme	1	2	3	4	Gemiddeld	Totale aktiwiteit
<i>L. microphylla</i>	<i>S. aureus</i>	0.07	0.05	0.07	0.04	0.058	700
<i>L. dysophylla</i>	<i>S. aureus</i>	0.11	0.14	0.09	0.10	0.110	381
<i>L. microphylla</i>	<i>P. aeruginosa</i>	0.04	0.02	0.03	0.04	0.033	1400
<i>L. dysophylla</i>	<i>P. aeruginosa</i> .	0.05	0.14	0.10	0.09	0.095	420
<i>L. microphylla</i>	<i>E. coli</i>	0.14	0.10	0.13	0.08	0.113	381
<i>L. dysophylla</i>	<i>E. coli</i>	0.11	0.14	0.09	0.05	0.098	420
<i>L. microphylla</i>	<i>E. faecalis</i>	0.02	0.01	0.02	0.01	0.015	2100
<i>L. dysophylla</i>	<i>E. faecalis</i>	0.05	0.07	0.04	0.09	0.063	700

GEVOLGTREKKINGS EN AANBEVELINGS

Die groot verskil in die chemiese samestelling tussen die twee taksons ondersteun die aanbeveling van die mees onlangse outeurs¹ dat die twee as afsonderlike spesies beskou moet word. Dit mag die moeite loon om ander spesies ook te ondersoek en om meer plante van dieselfde spesie te ondersoek om die effek van omgewingsfaktore uit te skakel. Omdat die tegnieke wat gebruik word min materiaal vereis, is herbarium eksemplare al gebruik om die chemiese samestelling en biologiese aktiwiteit van blare *Combretum erythrophyllum* te bepaal.¹⁵ Dit sou iets wees om te oorweeg in verdere studies op verskillende *Leonotus* spesies.

Die antibakteriese aktiwiteit van veral *L. microphylla* = *L. randii* teen *Pseudomonas aeruginosa* mag betekenisvol wees. Uit ondervinding in die Fitomedisyne Program (www.up.ac.za/phyto) wil dit voorkom asof sinergie tussen verskillende komponente van plantekstrakte 'n baie belangrike rol speel en dat die geïsoleerde antibakteriese verbindings baie minder aktief is as wat verwag kan word. Desnieteenstaande sou dit van waarde wees om die verbindings verantwoordelik vir die aktiwiteit te isoleer en die aktiwiteit te bepaal. Voor die gebruik van die ekstrak oorweeg kan word, behoort aspekte soos die aktiwiteit van verskillende populasies, die veiligheid, en stabiliteit van die ekstrak ondersoek te word.

Indien daar nie probleme met die toksisiteit en stabiliteit is nie en daar populasies gevind word met 'n hoë aktiwiteit is daar 'n moontlikheid om 'n kommersieel waardevolle antibakteriese plantekstrak uit verboude *L. microphylla/randii* te ontwikkel.

DANKBETUIGINGS

Die navorsing is befonds deur die Nasionale Navorsingstigting. Mev. Maryna Steinmann het waardevolle tegniese hulp verleen.

BIBLIOGRAFIE

1. Klopper, R.R., Chatelain, C., Bänninger, V., Habashi, C., Steyn, H.M., de Wet, B.C., Arnold, T.H., Gautier, L., Smith, G.F., & Spichiger, R. (2006). Checklist of the flowering plants of Sub-Saharan Africa. An index of accepted name and synonyms. South African Botanical Diversity network Report no 42, SABONET, Pretoria.
2. Van Wyk AE & Malan SJ. (1988). *Field guide to the wild flowers of the Witwatersrand and Pretoria region*. Cape Town :Struik Publishers, p. 278. ISBN 0 86977 814 5.
3. Welman W.G in Arnold T.H & de Wet B.C. (Eds). *Plants of southern Africa: name and distribution. Memoirs of the Botanical Survey of South Africa* No. 26, National Botanical Institute, South Africa ISBN 1-874907-03-X.
4. Watt JM & Breyer-Brandwijk MG (1962) *The medicinal and poisonous plants of southern and eastern Africa*. 2nd ed. Edinburgh: Livingstone Ltd.
5. Hutchings A, Scott AH, Lewis G & Cunningham AB (1996) *Zulu medicinal plants: an inventory*. Pietermaritzburg: University of Natal Press.
6. Berkowitz, F.E. (1995). Antibiotic resistance in bacteria. *The wake-up call has come. Southern Medical Journal* 88: 797-804.
7. Cowan M.M. (1999). Plants products as antimicrobial agents. *Clinical Microbiology Reviews*, 12(4): 564-582.
8. Kotze M & Eloff J N (2002). Extraction of antibacterial compounds from *Combretum microphyllum* (Combretaceae). *South African Journal of Botany* 68: 62-67.
9. Eloff JN (1998a). Which extractant should be used for the screening and isolation of antimicrobial components from plants? *Journal of Ethnopharmacology* 60: 1-8.

10. Eloff JN (1998b). A sensitive and quick microplate method to determine the minimal inhibitory concentration of plant extracts for bacteria. *Planta Medica* 64: 711-713.
11. Eloff J N (1999). The antibacterial activity of 27 southern African members of the Combretaceae. *South African Journal of Science* 95: 148-152.
12. Sacho H & Schoub DB (1993). *Current perspectives on nosocomial infections*. Pietermaritzburg: Natal Witness Printing and Publishing.
13. NCCLS (1990) The National Committee for Clinical Laboratory Standards. Performance standards for antimicrobial disk susceptibility tests, 4th ed. Approved Standard. NCCLS Document M2-A4. Villanova, Pa. USA
14. Stahl, E. (1969). *Thin layer chromatography*. 2nd edition, Berlin:Springer-Verlag.
15. Eloff J N (2004). Quantifying the bioactivity of plant extracts during screening and bioassay-guided fractionation. *Phytomedicine* 11: 370-371.
16. Eloff J N (1999). It is possible to use herbarium specimens to screen for antibacterial components in some plants. *Journal of Ethnopharmacology* 67: 355-360.