

Sensitivitas Metode Bioautografi Kontak dan *Agar Overlay* dalam Penentuan Senyawa Antikapang

ENI KUSUMANINGTYAS^{1*}, ESTIE ASTUTI², DARMONO^{1,2}

¹Balai Besar Penelitian Veteriner, Jl RE Martadinata 30 Bogor 16114

²Fakultas Farmasi Universitas Pancasila, Srengseng Sawah Jagakarsa, Jakarta

Diterima 30 Maret 2008, Disetujui 8 September 2008

Abstract: Bioautography method is a laboratory technique to detect substances inhibiting the growth of tested microorganisms. The sensitivity of contact and agar overlay bioautography was compared to define a recommended method for detecting antifungal compound. In contact bioautography, *n*-hexane extract of *Alpinia galanga* was eluted with dichloromethane and toluene on a thin layer chromatography plate (silica gel GF₂₅₄). The separated compounds were diffused from chromatogram spots to a *Trichophyton mentagrophytes* inoculated Sabouraud Dextrose Agar plate. The plate was incubated at 37°C for 3 days. Inhibition zone was observed and the hRf value was defined. Agar overlay bioautography was performed by covering chromatogram spots with a molten Sabouraud Dextrose Agar medium seeded by *Trichophyton mentagrophytes*. After solidification, the chromatogram plate was incubated at 37°C overnight and then was stained with Methyl Thiazole Tetrazolium. The inhibition growth bands were visualized and hRfs value were recorded. A contact bioautography produces one band while agar overlay bioautography produces four bands. Agar overlay bioautography was therefore more sensitive than contact bioautography.

Keywords: bioautography, contact, agar overlay, sensitivity.

PENDAHULUAN

METODE bioautografi merupakan metode sederhana yang digunakan untuk menunjukkan adanya aktivitas antibakteri atau antikapang. Metode ini menggabungkan penggunaan teknik kromatografi lapis tipis dengan respons dari mikroorganisme yang diuji berdasarkan aktivitas biologi dari suatu analit yang dapat berupa antibakteri, antikapang, dan antiprotozoa. Bioautografi dapat digunakan untuk mencari antibakteri atau antikapang baru, kontrol kualitas anti mikroba, dan mendeteksi golongan senyawa^(1,2,3).

Metode bioautografi dibedakan menjadi bioautografi kontak, bioautografi imersi atau bioautografi *agar overlay*, dan bioautografi langsung. Bioautografi kontak dilakukan dengan meletakkan lempeng kromatogram hasil eluasi senyawa yang akan diuji di atas media padat yang sudah diinokulasi dengan mikroba uji. Adanya senyawa antimikroba ditandai dengan adanya daerah jernih yang tidak ditumbuhi mikroba. Pada bioautografi *agar overlay*, lempeng kromatogram dilapisi dengan agar yang

masih cair yang sudah diinokulasi dengan mikroba uji. Setelah agar mengeras, lempeng kromatogram diinkubasi dan diwarnai dengan *tetrazolium dye*. Penghambatan dapat dideteksi dengan terbentuknya pita (*band*). Bioautografi langsung dilakukan dengan menyemprot lempeng kromatogram dengan mikroba uji dan diinkubasi. Zona hambatan yang terbentuk divisualisasikan dengan menyemprot lempeng kromatogram dengan *tetrazolium dye*⁽²⁾.

Salah satu keuntungan metode bioautografi dibandingkan dengan metode lain seperti difusi agar dan pengenceran adalah dapat digunakan untuk mengetahui aktivitas biologi secara langsung dari senyawa yang kompleks, terutama yang terkait dengan kemampuan suatu senyawa untuk menghambat pertumbuhan mikroba⁽⁴⁾, selain untuk pemisahan dan identifikasi. Kelebihan lainnya, metode bioautografi tersebut cepat, mudah untuk dilakukan, murah, hanya membutuhkan peralatan sederhana dan interpretasi hasilnya relatif mudah dan akurat.

Meski demikian, mengingat ada tiga macam metode bioautografi yang biasa digunakan maka pemilihan dalam penggunaannya perlu mendapat perhatian karena akan menentukan hasil yang diperoleh. Seperti diketahui, penemuan dan evaluasi bahan alam yang berfungsi sebagai fungisida sangat

* Penulis korespondensi, Tlp. (0251) 8331048, 8334456
e-mail: enikusuma@yahoo.com

tergantung pada pengujian antikapang.

Faktor yang sangat penting dalam pengujian bahan alam meliputi sensitivitas terhadap volume sampel, selektivitas untuk menentukan mikroba target, dan adaptibilitas terhadap campuran kompleks. Pada penelitian ini dilakukan evaluasi tentang sensitivitas dalam penemuan dan penentuan senyawa antikapang dari ekstrak *n*-heksana dari rimpang lengkuas merah (*Alpinia galanga*) antara bioautografi kontak dan *agar overlay*.

BAHAN DAN METODE

BAHAN. *Sabouraud Dextrose Agar* (Oxoid), air suling steril, simplisia rimpang lengkuas merah (*Alpinia galanga*), larutan *n*-heksana (Merck), Tween 80 10%, lempeng KLT (silica gel GF₂₅₄, Merck), diklorometana (Merck), toluena, anisaldehyda-asam sulfat (Merck), MTT (*methyl thiazole tetrazolium*, Sigma-Aldrich), kapang *Trichophyton mentagrophytes* (BCC/Balivet Culture Collection F0217).

METODE. Penyiapan suspensi kapang. Kapang *Trichophyton mentagrophytes* ditumbuhkan dalam media SDA (*Sabouraud Dextrose Agar*) miring dalam tabung. Tabung diinkubasi pada suhu 37°C selama 5 hari. Pemanenan dilakukan dengan mensuspensikan kapang dengan air suling steril. Jumlah spora dihitung dengan menggunakan *haemocytometer*. Karena konsentrasi spora masih terlalu padat, suspensi ditambah dengan air suling steril hingga mencapai konsentrasi 10⁸ cfu/ml untuk bioautografi kontak dan 10⁷ cfu/ml untuk bioautografi *agar overlay*.

Pembuatan ekstrak *n*-heksana rimpang lengkuas merah. Ekstrak *n*-heksana rimpang lengkuas merah diperoleh dari laboratorium pengujian Balai Tanaman Rempah dan Obat (BALLITRO), Bogor. Ekstrak dibuat dengan cara maserasi, yaitu dengan merendam 500 g serbuk kering simplisia di dalam 2,5 l cairan penyari non-polar *n*-heksana, kemudian dikocok dengan pengocok otomatis selama 2 jam dan dibiarkan selama 24 jam. Filtrat yang telah terkumpul dipisahkan dengan menggunakan rotavapor sampai diperoleh ekstrak kental. Ekstrak diencerkan hingga konsentrasinya menjadi 10% dengan air suling dan Tween 80 10% sebagai pengemulsi.

Kromatografi lapis tipis (KLT). KLT dilakukan dua kali, yaitu untuk mendeteksi banyaknya bercak senyawa yang terkandung dalam ekstrak *n*-heksana lengkuas merah dan untuk bioautografi. Untuk mendeteksi bercak, larutan ekstrak dengan konsentrasi 10% sebanyak 10 µl ditotolkan dengan pipa kapiler pada lempeng KLT (silica gel GF₂₅₄) dengan panjang

13 cm dan lebar 4 cm, lalu diekspansi dengan cairan ekspansi diklorometana dan toluena. Setelah cairan ekspansi mencapai batas rambat, lempeng dikeluarkan lalu dikeringkan dengan alat pengering dan disemprot dengan pereaksi semprot anisaldehyda-asam sulfat (komposisi: 0,5 ml anisaldehyda, 10 ml asam asetat glacial, 85 ml metanol, 5 ml asam sulfat pekat)⁽⁵⁾. Pereaksi semprot berfungsi untuk menampakkan bercak senyawa yang tidak berwarna menjadi berwarna sesuai dengan golongan senyawanya⁽⁶⁾. Setelah disemprot, lempeng dipanaskan pada suhu 110°C selama 10 menit. Bercak yang timbul diamati dan dihitung hRf dari masing-masing bercak. KLT untuk bioautografi dilakukan dengan cara yang sama namun lempeng tidak disemprot dengan larutan penyemprot melainkan langsung digunakan untuk tahap bioautografi.

Bioautografi kontak. Disiapkan cawan Petri besar dengan diameter 15 cm dan diisi dengan 120 ml SDA yang sudah diinokulasi dengan 1,2 ml suspensi kapang (10⁸ cfu/ml) sehingga konsentrasi akhir 10⁶ cfu/ml. Setelah mengering, lempeng KLT mengering ditempelkan selama 20 menit pada media SDA dalam cawan petri yang sudah diinokulasi dengan kapang *Trichophyton mentagrophytes*. Lempeng kromatogram diangkat kembali dan cawan Petri diinkubasi pada suhu 37°C selama 3 hari. Pengamatan dilakukan dengan melihat zona hambat yang terbentuk sebagai daerah terang yang tidak ditumbuhi kapang.

Bioautografi *agar overlay* dengan *methyl thiazole tetrazolium* (MTT). Setelah lempeng kromatogram pada tahap sebelumnya (KLT dengan menggunakan lempeng silika gel GF₂₅₄ dengan panjang 13 cm dan lebar 4 cm) mengering, 3 ml suspensi kapang dalam SDA (suspensi kapang 1 ml 10⁷ cfu/ml dicampurkan dalam 9 ml SDA cair suhu 50°C sehingga konsentrasi akhir kapang 10⁶ cfu/ml) dituangkan pada lempeng untuk membentuk lapisan tipis. Lempeng KLT disimpan dalam cawan Petri steril dengan diameter 15 cm, lalu diinkubasi pada suhu 37°C selama 16-18 jam. Lempeng disemprot dengan MTT (2,5 mg/ml) dan diinkubasi pada suhu 37°C selama 4-6 jam. Pengamatan dilakukan pada daerah yang berwarna putih kekuningan (warna MTT) yang menandakan ada aktivitas antikapang dengan latar belakang warna ungu pada daerah yang ditumbuhi kapang. Nilai hRf pada daerah yang menunjukkan zona hambat diukur.

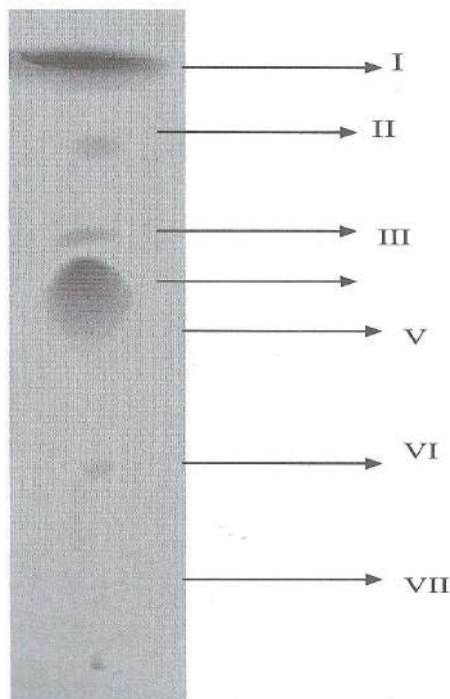
HASIL DAN PEMBAHASAN

Kromatografi lapis tipis (KLT) adalah metode pemisahan senyawa kimia secara kimia-fisika

berdasarkan perbedaan kecepatan migrasi atau rasio distribusi dari komponen campuran fase diam dan fase gerak. Campuran yang dipisahkan berupa larutan dan ditotolkan pada fase diam, diletakkan dalam bejana tertutup berisi larutan pengembang (fase gerak). Selanjutnya, senyawa yang tidak berwarna ditampakan atau dideteksi^(7,8) dengan menggunakan pereaksi semprot seperti anisaldehida-asam sulfat yang dipakai dalam penelitian ini.

KLT merupakan metode yang efisien karena senyawa bisa langsung dipisahkan bahkan dapat diketahui golongannya. Kelebihan KLT dibandingkan metode lain adalah pemakaian pelarut dan cuplikan yang relatif sedikit. Bila dibandingkan dengan kromatografi gas dan KCKT, KLT menggunakan alat yang lebih sederhana dan murah.

Bahan alam biasanya mengandung senyawa yang tidak berwarna. Untuk mengubah senyawa tersebut menjadi berwarna, lempeng yang telah dieluasi disemprot dengan larutan pereaksi warna⁽⁹⁾. Hasil kromatografi lapis tipis dari ekstrak *n*-heksana lengkuas merah (*Alpinia galanga*) yang dieluasi dan disemprot dengan pereaksi warna anisaldehida-asam sulfat disajikan pada Gambar 1.



Gambar 1. Hasil kromatogram KLT Ekstrak *n*-heksana rimpang lengkuas merah (*Alpinia galanga*).

Penyemprotan dengan anisaldehida-asam sulfat memberikan warna bercak yang berbeda-beda sehingga memudahkan dalam pengamatan. Seperti terlihat pada Gambar 1, KLT menghasilkan 7 bercak senyawa. Meski demikian, belum dapat diketahui golongan senyawa yang telah terpisah pada kromatogram. Anisaldehida-asam sulfat memberikan reaksi positif untuk senyawa karbohidrat dengan memberikan warna biru tetapi warna tersebut tidak terdapat pada kromatogram.

Walau memberikan hasil negatif, percobaan tidak diulang menggunakan penyemprot lain karena hanya untuk melihat banyaknya bercak yang nantinya akan dibandingkan dengan bioautogram untuk menentukan bercak yang aktif. Pada kromatogram, terutama pada bercak IV dan V, yaitu warna hijau keabu-abuan dan kuning, kurang terpisah sempurna. Hal tersebut dapat terjadi akibat kondisi bejana yang kurang jenuh, karena tingkat kejenuhan bejana dengan uap cairan eluasi mempunyai pengaruh yang nyata pada pemisahan dan letak bercak pada kromatogram⁽¹⁰⁾.

Penilaian terhadap kromatogram dilakukan dengan melihat harga *hRf*. Tahap pertama adalah dengan melihat jarak bercak. Jarak bercak adalah jarak antar titik penotolan suatu bercak dibandingkan dengan jarak rambat (*Rf*). Ada dua variasi dalam menentukan harga *Rf*. Yang pertama adalah dengan mengukur jarak antara titik pusat bercak dengan titik penotolan. Variasi kedua adalah mengukur jarak antara batas atas dan batas bawah bercak dengan titik penotolan. Pada variasi pertama akan diperoleh satu harga *Rf* dan variasi kedua diperoleh dua harga *Rf*. Jika tujuannya untuk memberikan harga orientasi saja, cukup diukur atau ditetapkan satu harga *Rf*. Bila tujuannya untuk memperlihatkan besarnya bercak, digunakan variasi kedua^(11,12).

Angka *Rf* berkisar antara 0,001–1,0, sedangkan *hRf* adalah angka *Rf* dikalikan faktor 100. Nilai *hRf* bercak pada kromatogram Gambar 1 disajikan pada Tabel 1.

Hasil KLT tersebut dijadikan acuan nilai *hRf* yang memberikan hasil yang positif pada bioautogram karena pada uji bioautografi bercak senyawa yang sudah terpisah tidak disemprot dengan pereaksi warna tetapi langsung diuji dengan mikroba uji. Acuan bercak juga dapat dilakukan dengan melihat bentuk pita hasil bioautografi yang memberikan hasil positif dan melihat posisi disesuaikan dengan hasil KLT yang telah menampilkan warna.

Metode bioautografi yang dibandingkan dalam penelitian ini adalah bioautografi kontak dan bioautografi *agar overlay*. Perbandingan dengan bioautografi langsung tidak dilakukan karena

Tabel 1. Harga hRf kromatografi lapis tipis ekstrak *n*-heksan rimpang lengkuas merah dengan konsentrasi 10%.

No.bercak	Jarak bercak (cm)	Harga hRf	Warna bercak
I	14,4	96	Merah
II	12,3	82	Jingga
III	10	67	Merah keunguan
IV	8,9	59	Hijau abu-abu
V	7,6	51	Kuning
VI	4,8	32	Jingga
VII	1,8	12	Kuning muda

pada penelitian pendahuluan kapang *Trichophyton mentagrophytes* yang digunakan sebagai mikroba uji tidak dapat tumbuh dengan baik sehingga hasil menjadi kurang akurat.

Bioautografi merupakan kombinasi kromatografi dengan *bioassay in situ* yang memungkinkan lokalisasi senyawa aktif. Larutan indikator dehidrogenase (2,5 mg/ml *thiazolyl blue (methyl thiazoyl tetrazolium chloride)*) digunakan untuk menyemprot kromatogram yang menampilkan zona putih dikelilingi latar belakang warna ungu. Garam tetrazolium dipecah oleh dehidrogenase pada kapang uji untuk menghasilkan formazan ungu yang mengindikasikan adanya pertumbuhan pada kapang yang diuji. Apabila ada senyawa yang menghambat pertumbuhan kapang maka garam tetrazolium tidak akan berubah warna atau tetap berwarna putih kekuningan membentuk zona hambat. Diameter zona hambat dengan warna terang di antara warna ungu meningkat seiring dengan besarnya daya hambat^(13,14,15).

Seperti terlihat pada Gambar 2a dan 2b, daerah putih kekuningan menunjukkan adanya aktivitas antikapang. Pada daerah tersebut kapang tidak dapat tumbuh karena adanya aktivitas antikapang dari senyawa yang telah terpisah pada kromatogram. Pada kromatografi *agar-overlay* kapang *Trichophyton mentagrophytes* yang tumbuh akan mengubah warna MTT dari kuning menjadi warna ungu. Pertumbuhan *Trichophyton mentagrophytes* terhambat karena adanya aktivitas antikapang menyebabkan tidak adanya mikroorganisme yang mengubah MTT menjadi formazan sehingga warna kromatogram tetap kuning oleh warna MTT.

Berdasarkan uji bioautografi *agar overlay*, terdapat empat bercak yang mempunyai aktivitas antikapang, yaitu bercak I dengan hRf 96 (merah), IV dengan hRf 59 (hijau keabu-abuan), V dengan hRf 51 (kuning) dan VII dengan hRf (12) kuning muda. Tetapi pada bioautografi kontak, zona

hambat yang terbentuk hanya satu, yaitu pada hRf IV. Tidak terbentuknya zona pada hRf I, V, dan VII dapat disebabkan oleh transfer senyawa aktif pada bioautografi kontak yang kurang maksimal. Salah satu kemungkinannya adalah lempeng kromatogram tidak menempel dengan baik pada permukaan agar, sehingga transfer senyawa aktif menjadi tidak maksimal. Transfer senyawa aktif tidak sempurna dapat pula terjadi karena komponen tersebut terlalu sedikit sehingga banyak yang masih tertinggal dalam kromatogram dan menghasilkan zona yang sangat tipis yang sulit untuk dikenali. Beberapa senyawa dapat berikatan dengan matriks lempeng kromatogram terutama matriks berbasis silika sehingga beberapa senyawa tidak pernah berdifusi ke dalam agar. Lebih lanjut, kadang-kadang sulit untuk mendapatkan kontak yang baik antara lempeng dan agar sehingga matriks lempeng melekat dan tertinggal pada agar ketika lempeng kromatogram diangkat kembali⁽¹⁶⁾.

Meskipun demikian, bioautografi kontak mudah untuk dilakukan dan hasil dapat terlihat jelas tanpa harus menggunakan MTT. Bila zona hambat kurang jelas dalam satu atau dua hari dapat diteruskan sampai kapang uji tumbuh dengan baik. Kekurangan dari bioautografi kontak adalah kesulitan untuk mendapatkan kontak yang optimal antara agar dan kromatogram serta penyerapan oleh permukaan agar.

Metode bioautografi *agar overlay* sebenarnya merupakan pengembangan metode difusi agar. Tak seperti dalam metode difusi agar yang meletakkan bahan yang dievaluasi diserap oleh kertas cakram dan diletakkan pada agar yang telah diinokulasi mikroba, pada bioautografi *agar overlay*, bahan yang akan dievaluasi diserap dalam lempeng KLT dan lapisan agar setebal lebih kurang 1 mm berisi inokulum diletakkan di atas lempeng KLT. Bila dibandingkan dengan metode difusi agar, bioautografi *agar overlay* mempunyai beberapa

keuntungan. Metode ini menggunakan sedikit sampel dan dapat digunakan untuk *bioassay* yang mengarah pada isolasi senyawa aktif. Proses isolasi dan identifikasi senyawa aktif menjadi lebih mudah dan sederhana karena ekstrak kasar telah terpisah berdasarkan golongan senyawa⁽¹⁴⁾, sehingga dapat menyederhanakan proses isolasi dan identifikasi senyawa aktif⁽¹⁷⁾.

Bioautografi *agar overlay* juga merupakan pengembangan dari bioautografi kontak dan bioautografi langsung. Pengembangan tersebut dilatarbelakangi oleh laporan bahwa bioautografi langsung tidak dapat diterapkan untuk *Candida albicans*⁽¹⁴⁾. Berdasarkan laporan tersebut, kemudian dikembangkan *hybrid* dari bioautografi langsung dan bioautografi kontak. Metode bioautografi *agar overlay* dilakukan berdasarkan transfer komponen aktif dengan proses difusi dari fase stasioner ke dalam lapisan agar berisi mikroorganisme. Ketika lempeng disemprot dengan MTT, zona hambat terbentuk di antara latar belakang warna ungu setelah masa inkubasi sehingga zona hambat akan terlihat lebih kontras dan jelas⁽¹⁸⁾.

Ada beberapa teknik bioautografi *agar overlay*. Homma *et al.* (1989) menuangkan agar yang telah diinokulasi dengan kapang atau khamir pada permukaan lempeng KLT seperti yang dikerjakan pada penelitian ini⁽¹⁹⁾. Sementara Motsei *et al.* (2003) melakukannya dengan memasukkan lempeng KLT yang telah berisi senyawa terpisah ke dalam tangki berisi biakan kapang atau khamir⁽²⁰⁾.

Meski memberikan hasil yang lebih sensitif daripada bioautografi kontak, bila dibandingkan dengan bioautografi langsung pada mikroba tertentu, kekurangan utama dari metode bioautografi *agar overlay* adalah sensitivitas yang lebih rendah yang disebabkan oleh pengenceran dari antimikroba pada lapisan agar. Metode ini disarankan terutama ketika bioautografi langsung tidak mungkin dilakukan. Bioautografi langsung tak dapat dilakukan bila kapang uji tidak dapat tumbuh baik pada lempeng kromatogram setelah penyemprotan dengan mikroba. Pada penelitian pendahuluan dengan bioautografi langsung menggunakan *Candida albicans*, lempeng menjadi agak menggelembung karena aktivitas fermentasi sehingga ketika lempeng disemprot dengan MTT menghasilkan lubang-lubang pita yang tidak dikehendaki. Metode bioautografi langsung juga mempunyai keterbatasan. Sebagai contoh, suspensi mikroba hanya dapat diaplikasikan pada lempeng KLT dan diikuti inkubasi. Visualisasi dengan MTT dibutuhkan untuk mendeteksi hasil⁽¹⁶⁾.

Pengamatan terhadap zona hambat pada bioautografi *agar overlay* sebaiknya dilakukan pada

awal setelah masa inkubasi karena pertumbuhan miselia pada permukaan agar akan semakin tebal dan menutupi pita yang aktif sehingga kadang membuat zona hambat tidak terlihat jelas. Pada beberapa kasus, kapang tidak dapat tumbuh dengan baik pada bagian bioautogram dan menyulitkan untuk evaluasi antikapang. Kasus tersebut kemungkinan terjadi bila ada pemakaian asam format yang tertinggal dalam kromatogram dan menghambat pertumbuhan kapang⁽²¹⁾.

SIMPULAN

Hasil penelitian yang dilakukan menunjukkan bahwa bioautografi *agar overlay* dengan pewarnaan *Methyl Tetrazolium Salt* lebih sensitif dibandingkan bioautografi kontak. Sensitivitas bioautografi *agar overlay* ditunjukkan dengan dihasilkannya empat pita hambatan, sedangkan bioautografi kontak hanya menghasilkan satu pita hambatan. Berdasarkan hasil tersebut, maka untuk penentuan antikapang sebaiknya digunakan bioautografi *agar overlay*.

DAFTAR PUSTAKA

1. Macek K. Pharmaceutical application of thin layer and paper chromatograph. 3rd ed. New York: Elsevier Publishing Company; 2005.p.505-7.
2. Choma I. The use of thin-layer chromatography with direct bioautography for antimicrobial analysis. LCGC Europe. 2005.
3. Colorado RJ, Galeano JE, and Martinez MA. Development of direct bioautography as reference method for testing antimicrobial activity of gentamicin against *Escherichia coli*. Vitae. 2007. 14(1):67-71.
4. Kavanagh F. Analytical microbiology. Vol II. New York and London: Academic Press; 1972.p.190-1.
5. Sutrisno RB. Pereaksi KLT (kromatografi lapis tipis). Edisi I. Jakarta: Fakultas Farmasi Universitas Pancasila; 1993.
6. Sutrisno RB. Reverse approach. Edisi I. Jakarta: Fakultas Farmasi Universitas Pancasila; 1986.p.13, 24-6,31.
7. Ketaren S. Minyak atsiri bersumber dari bunga dan buah. Bogor: Jurusan Teknologi Industri Pertanian. Fakultas Teknologi Pertanian. Institut Pertanian Bogor; 1980. hal.32-6.
8. Tyler VE, Brandy LR, and Robbers JE. Pharmacognosy. 8th ed. Philadelphia: Lea and Febiger; 1997.p.77-81
9. Bobit JM.. Thin layer chromatography. New York: Reinhold publishing Co; 1996.p.900.
10. Stahl E. Analisis obat secara kromatografi dan mikroskopi. Diterjemahkan oleh Padmawinata K dan Sudiro I. Bandung: Penerbit ITB; 1985. hal.3-18.
11. Sastroamidjojo H. Kromatografi. Yogyakarta: FMIPA Liberty Press; 1991. hal.26-38.

12. Badaruddin AM. Kromatografi lapis tipis untuk identifikasi alkaloida opium memakai silica gel G. Skripsi. Jakarta: Fakultas Farmasi, Universitas Pancasila; 1976. hal.5-14.
13. Bengue WJ and Kline RM. The use of tetrazolium salt in bioautographic procedures. *J Chromatogr.* 1972.(664):182-184.
14. Rohalison L, Hamburger M, Hosttetman K, Monod M and Frank E. A bioautography agar overlay method for the detection of antifungal compound from higher plants. *Phytochemical Analysis.* 1991.(2):199-203.
15. Fish SA and Codd GA. Bioactive compound production by thermophilic and thermotolerant Cyanobacteria (blue-green algae). *World J. Microbiol. Biotechnol.* 1994.(10):338-341.
16. Verbitsky SM, McChesney JD, Gourdin GT, Ikenouve LM. Methods and compositions for detecting active components using bioluminescent bacteria and thin layer chromatography. USPTO Patent Application 20070184514. 2006.
17. Runyoro DKB., Mecky IN, Matee MIN, Ngassapa OD, Cosam C Joseph CC and Mbwambo ZH. Screening of Tanzanian medicinal plants for antiCandida activity. *BMC Complementary and Alternative Medicine.* 2006.(6):11.
18. Hostettmann K and Marston A. Search for new antifungal compounds from higher plants. *Pure &App/. Chem.* 1994.(66):2231-4.
19. Homma Y, Sato Z, Hirayama F, Konno K, Shirahama H and Suzui T. Production of antibiotics by *Pseudomonas cepacia* as an agent for biological control of soilborne plant pathogens. *Soil Biol. Biochem.* 1989.(21):723-8.
20. Motsei ML, Lindsey KL, Van Staden J, Jäger AK. Screening of traditionally used South African plants for antifungal activity against *Candida albicans*. *J.Ethnopharmacol.* 2003 Gökalp I's, cana. 86:235-41.
21. Hostettmann K, Marston A, Ndjoko K, Wolfender JL. The potential of African plants as a source of drugs. *Curr. Org. Chem.* 2000.(4):973-1010.