

BAB I

TINJAUAN PUSTAKA

1.1 Pisang (*Musa x paradisiaca*)

Pisang yang tergolong tanaman buah berupa herba tidak asing lagi bagi sebagian besar masyarakat. Tumbuhan ini berdasarkan klasifikasi ilmiahnya tergolong dalam keluarga besar Musaceae, sebagaimana penggolongan dari klasifikasi (Cronquist. 1981; 225 - 233)

Kerajaan : Plantae
Divisi : Magnoliophyta
Kelas : Liliopsida
Anak kelas: Zingiberidae
Bangsa : Zingiberales
Suku : Musaceae
Marga : *Musa*
Jenis : *Musa x paradisiaca*. Peels

1.1.1 Deskripsi

Tanaman pisang termasuk dalam golongan terna monokotil tahunan berbentuk pohon yang tersusun atas batang semu (**Gambar I.1**). Batang semu ini merupakan tumpukan pelepah daun yang tersusun secara rapat teratur. Percabangan tanaman bertipe simpodial dengan meristem ujung memanjang dan membentuk bunga lalu buah. Bagian bawah batang pisang menggelembung berupa umbi yang disebut bonggol. Pucuk lateral muncul dari kuncup pada bonggol yang

selanjutnya tumbuh menjadi tanaman pisang. Buah pisang umumnya tidak berbiji atau bersifat partenokarpi. Pisang mempunyai bunga majemuk, yang tiap kuncup bunga dibungkus oleh seludang berwarna merah kecoklatan. Seludang akan lepas dan jatuh ke tanah jika bunga telah membuka. Bunga betina akan berkembang secara normal, sedang bunga jantan yang berada di ujung tandan tidak berkembang dan tetap tertutup oleh seludang dan disebut sebagai jantung pisang. Tiap kelompok bunga disebut sisir, yang tersusun dalam tandan. Jumlah sisir betina antara 5-15 buah. (Rukmana, 1999; 15).



Gambar I.1 Morfologi pisang (musarama.org)

Ciri-ciri dari daun pisang (*Musa x paradisiaca* L.) adalah bangun daun memanjang bentuk jorong (*ovalis*) yaitu daun yang mempunyai perbandingan panjang dan lebar adalah satu setengah sampai dua berbanding satu, bentuk ujung daun tumpul (*obtusus*), bentuk pangkal daun membulat (*rotundatus*) dan berpelepah, tepi daun rata (*integer*), daging daun seperti kertas

(*papyraceus* atau *chartaceus*), pertulangan daun menyirip (*penninervis*) yaitu mempunyai satu ibu tulang yang memanjang dari pangkal sampai ke ujung dan merupakan terusan tangkai daun, pada permukaan daun bagian atas licin (*laevis*) sedangkan permukaan daun bagian bawahnya licin berselaput lilin (*laevis pruinosis*), warna daun pada bagian atas hijau cerah sedangkan pada bagian bawah berwarna hijau suram (Cronquist, 1981; 223 - 233).

1.1.2 Jenis-jenis pisang

Menurut jenisnya, tanaman pisang yang selama ini dikenal oleh masyarakat dapat dikelompokkan menjadi tiga kelompok yaitu *Musa acuminatae*, *Musa balbisiana* dan hasil persilangan alami maupun buatan antara *Musa acuminatae* dan *Musa balbisiana*.

a. *Musa acuminata*

Jenis tanaman pisang dari kelompok ini memiliki ciri umum yang mudah dikenali yaitu tidak ada biji dalam buahnya, batang semunya memiliki banyak bercak melebar kecoklatan atau kehitaman, saluran pelepah daunnya membuka, tangkai daun ditutupi lapisan lilin, tangkai buah pendek, kelopak bunga melengkung ke arah bahu setelah membuka, bentuk daun bunga meruncing seperti tombak, warna bunga jantan putih krem. *Musa acuminata* disandikan AA untuk diploid sedangkan untuk triploid disandikan AAA. Contoh kultivar pisang yang termasuk kelompok ini adalah pisang Ambon (AAA), pisang Mas (AA) dan lain-lain (Suhardiman, 1997 : 15 dan Cronquist, 1981; 223 - 233).

b. *Musa balbisiana*

Pisang dengan ciri berbiji dalam buahnya contoh dari jenis ini yang cukup populer di masyarakat di antaranya adalah pisang Kluthuk Awu dan pisang Kluthuk Wulung. Pisang jenis ini mengandung banyak biji. *Musa balbisiana* disandikan dengan genom B, dan dibedakan menjadi BB yang diploid, BBB yang triploid dan BBBB tetraploid (Suhardiman, 1997; 15 dan Cronquist, 1981; 223 - 233).

c. Persilangan alami maupun buatan dari *Musa acuminata* dengan *Musa balbisiana*

Ciri dari kelompok pisang ini adalah gabungan dari *Musa acuminata* dan *Musa balbisiana* atau bisa disebut *Musa x paradisiaca*. karena merupakan pisang persilangan, jadi ciri yang mudah dikenali terdapat ciri dari *Musa acuminata* dan *Musa balbisiana*. Kelompok pisang jenis ini biasanya dimanfaatkan sebagai pisang yang dikonsumsi segar dan pisang olahan. Seperti pisang Kepok (AAB), pisang Nangka (AAB) dan pisang Manggala (ABB) (Suhardiman, 1997; 15 dan Cronquist, 1981; 223 - 233).

1.1.3 Kegunaan pisang

Getah batang pisang *Musa x paradisiaca* yang dimanfaatkan sebagai obat tradisional untuk menyembuhkan luka, ini telah dipakai di daerah Cicalengka sebagai obat untuk menghentikan pendarahan luka sayatan dan mempercepat penyembuhan. Zat kimia yang terkandung dalam getah pohon pisang adalah saponin, antrakuinon, kuinon dan tanin bersifat antiseptik

Beberapa penelitian mengenai tanaman pisang antara lain menyatakan bahwa ekstrak bonggol pisang kepok memiliki diameter hambat bakteri *Staphylococcus aureus* (20,39 mm) bersifat irradikal dan *E. coli* (18,96 mm) bersifat radikal (Ningsih, 2013; 212). Sementara penelitian lain menyatakan bahwa dari 50 isolat yang berhasil diisolasi dari batang pisang hanya satu isolat yang menghasilkan zona hambat (Nawangsih, 2007; 48).

Pelczar dan Chan (1986 dalam Ningsih 2013; 5) menyatakan bahwa zona irradikal merupakan suatu daerah di sekitar cakram tempat pertumbuhan bakteri dihambat oleh antibakteri tapi tidak dimatikan. Di sini akan terlihat pertumbuhan yang kurang subur dibanding dengan daerah di luar pengaruh antibakteri tersebut. Sedangkan zona radikal yaitu suatu daerah di sekitar antibakteri dimana sama sekali tidak ditemukan pertumbuhan bakteri.

1.1.4 Getah pisang

Getah pelepah pisang mengandung beberapa jenis senyawa fitokimia yaitu saponin dengan kandungan yang paling banyak, kemudian flavonoid dan tanin, alkaloid dan tidak mengandung steroid dan triterpenoid. Polifenol dan flavon merupakan golongan fenol yang telah diketahui memiliki aktivitas antiseptik. Senyawa flavonoid menurut strukturnya merupakan turunan senyawa flavon dengan konfigurasi C₆ - C₃ - C₆ cincin benzen tersubstitusi disambung oleh rantai alifatik 3 karbon, senyawa ini merupakan senyawa flavonoid larut dalam air serta dapat diekstraksikan menggunakan etanol 70% (Harborne, 1987; 69 - 70).

1.2 Senyawa-senyawa metabolit sekunder

1.2.1 Alkaloid

Alkaloid (**Gambar I.2**) merupakan golongan senyawa metabolit sekunder yang terbesar, pada umumnya alkaloid mencakup senyawa bersifat basa yang mengandung satu atau lebih atom nitrogen, biasanya dalam gabungan, sebagai bagian dari siklik. Alkaloid umumnya beracun bagi manusia dan banyak yang mempunyai aktivitas fisiologis yang menonjol sehingga digunakan secara luas dalam bidang pengobatan. Alkaloid biasanya tidak berwarna, sering kali bersifat optis aktif, kebanyakan berbentuk kristal tetapi hanya sedikit yang berupa cairan (misalnya nikotina) pada suhu kamar (Harborne, 1987; 234 - 235).

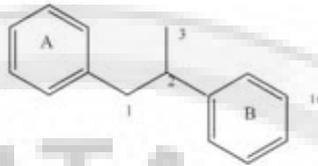


Gambar I.2 Struktur Dasar Alkaloid (Harborne, 1987; 234 - 235)

1.2.2 Flavonoid

Flavonoid (**Gambar I.3**) merupakan senyawa turunan fenol, warnanya bisa berubah bila ditambah basa atau amonia, jadi senyawa flavonoid mudah dideteksi pada kromatografi atau dalam larutan. Flavonoid mengandung sistem aromatik yang terkonjugasi, oleh karena itu senyawa ini menunjukkan pita serapan kuat pada daerah spektrum UV dan spektrum sinar tampak. Flavonoid umumnya merupakan senyawa metabolit sekunder yang bersifat polar, namun masih terdapat juga senyawa flavonoid yang memiliki kepolaran rendah. Isoflavon, flavonon, metil flavon, flavonol merupakan flavonoid dengan tingkat

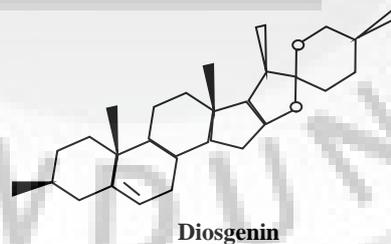
kepolaran yang rendah (Anderson dan Markam, 2006 *dalam* Karlina, dkk 2013; 22). Flavonoid pada umumnya terdapat dalam tumbuhan, terikat pada gula sebagai glikosida (Harborne, 1987; 69 - 70).



Gambar I.3 Struktur Dasar Senyawa Flavonoid (Harborne, 1987; 69 - 70).

1.2.3 Saponin

Saponin (**Gambar I.4**) merupakan golongan senyawa glikosida yang mempunyai struktur steroid dan mempunyai sifat-sifat khas yang dapat membentuk larutan koloidal dalam air dan membentuk buih atau busa bila dikocok. Saponin merupakan senyawa aktif permukaan dan bersifat seperti sabun, serta dapat dideteksi berdasarkan kemampuannya membentuk busa dan menghemolisis sel darah (Harborne 1987; 70 - 75).

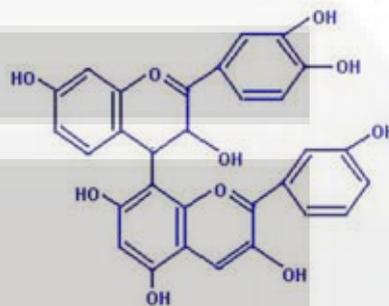


Gambar I.4 Contoh Struktur Senyawa Saponin (Harborne 1987; 70 - 75).

1.2.4 Tanin

Tanin secara luas terdapat dalam tumbuhan berpembuluh, dalam Angiospermae terdapat khusus dalam jaringan kayu. Menurut batasannya, tanin (**Gambar I.5**) dapat bereaksi dengan protein membentuk kopolimer mantap yang tak larut dalam air, sehingga dalam identifikasi senyawa tanin indikasi nilai

positifnya berupa endapan yang berwarna kecoklatan. Bila menggunakan jaringan kering, hasil tanin mungkin agak berkurang karena terjadinya pelekatan tanin pada tempatnya di dalam sel. Perkiraan kuantitatif tanin dalam suatu jaringan tumbuhan tidak akan disadari jika adanya fenol lain yang dapat mengganggu cara kimia yang tidak khas, dalam praktiknya sangat sukar mengekstraksi keseluruhan tanin dalam tumbuhan terutama jenis tanin terkondensi. Tanin terkondensi tersebar luas terutama dalam tumbuhan berkayu dan kadar tanin dalam daun lebih dari 2% bobot keringnya (Harborne, 1987; 102 - 105).



Gambar I.5 Contoh Struktur Senyawa Tanin (Harborne, 1987 ; 102 - 105).

1.2.5 Triterpenoid / Steroid

Triterpenoid adalah senyawa yang kerangka karbonnya berasal dari enam satuan isoprena dan secara biosintesis diturunkan dari hidrokarbon C_{30} asiklik, yaitu skualena. Uji yang banyak digunakan ialah reaksi Liebermann-Burchard yang dengan kebanyakan triterpena dan sterol yang memberikan warna hijau-biru. Sterol adalah triterpena yang kerangka dasarnya sistem cincin siklopentana perhidrofenantreana. (Harborne, 1987; 147 - 148).

1.3 Bakteri

Bakteri merupakan makhluk hidup uniseluler, pada umumnya tidak berklorofil, ada beberapa yang bersifat fotosintetik dan produksi aseksualnya secara pembelahan dan bakteri mempunyai ukuran sel kecil dimana setiap selnya hanya dapat dilihat dengan bantuan mikroskop. Bakteri pada umumnya mempunyai ukuran sel 0,5-1,0 μm kali 2,0-5,0 μm , dan terdiri dari tiga bentuk dasar yaitu bentuk bulat atau *coccus*, bentuk batang atau *bacillus*, bentuk spiral. (Dwidjoseputro, 1985 hal 42 - 44). Klasifikasi bakteri menurut Prasetyo (2009; 4 - 6) adalah sebagai berikut :

a. Bakteri Gram positif

Dengan pewarnaan Gram, golongan bakteri ini akan memberikan warna ungu. Golongan ini memiliki peptidoglikan setebal 20-80 nm dengan komposisi terbesar asam teikhoat, *asam teichuroni*, dan berbagai macam polisakarida. Asam teikhoat berfungsi sebagai antigen permukaan pada gram positif. Selain itu golongan ini memiliki 40 lembar peptidoglikan pada dinding selnya, yang merupakan 50% dari seluruh komponen penyusun dinding sel.

b. Bakteri Gram negatif

Golongan ini memiliki lapisan peptidoglikan yang tipis (5-10 nm) dengan komposisi utama : lipoprotein, membran luar dan lipopolisakarida. Membran luar pada bakteri gram negatif juga memiliki sifat hidrofilik, namun komponen lipid pada dinding selnya justru memberikan sifat hidrofobik.

1.4 *Staphylococcus aureus*

1.4.1 Morfologi

Staphylococcus aureus merupakan bakteri Gram positif berbentuk bulat berdiameter 0,7-1,2 μm , tersusun dalam kelompok-kelompok yang tidak teratur seperti buah anggur, fakultatif anaerob, tidak membentuk spora, dan tidak bergerak. Bakteri ini tumbuh pada suhu optimum 37°C, tetapi membentuk pigmen paling baik pada suhu kamar (20-25 °C). Koloni pada perbenihan padat berwarna abu-abu sampai kuning keemasan, berbentuk bundar, halus, menonjol, dan berkilau (Jawetz dkk.,1995; 7).

1.4.2 Patogenisitas

Sebagian bakteri *Staphylococcus aureus* merupakan flora normal pada kulit, saluran pernafasan, dan saluran pencernaan makanan pada manusia. Bakteri ini juga ditemukan di udara dan lingkungan sekitar. *S. aureus* yang patogen bersifat invasif, menyebabkan hemolisis, membentuk koagulase, dan mampu meragikan manitol (Warsa, 1994; 103-105).

Infeksi oleh *Staphylococcus aureus* ditandai dengan kerusakan jaringan yang disertai abses bernanah. Beberapa penyakit infeksi yang disebabkan oleh *S. aureus* adalah bisul, jerawat, impetigo, dan infeksi luka. Infeksi yang lebih berat di antaranya pneumonia, mastitis, plebitis, meningitis, infeksi saluran kemih, osteomielitis, dan endokarditis. *S. aureus* juga merupakan penyebab utama infeksi nosokomial, keracunan makanan, dan sindroma syok toksik (Warsa, 1994; 103 - 110).

1.4.3 Pengobatan

Pengobatan terhadap infeksi *Staphylococcus aureus* dilakukan melalui pemberian antibiotik, yang disertai dengan tindakan bedah, baik berupa pengeringan abses maupun nekrotomi. Pemberian antiseptik lokal sangat dibutuhkan untuk menangani furunkulosis (bisul) yang berulang. Pada infeksi yang cukup berat, diperlukan pemberian antibiotik secara oral atau intravena, seperti penisilin, metisillin, sefalosporin, eritromisin, linkomisin, vankomisin, dan rifampisin. Sebagian besar galur *Staphylococcus aureus* sudah resisten terhadap berbagai antibiotik tersebut, sehingga perlu diberikan antibiotik berspektrum lebih luas seperti kloramfenikol, amoksilin, dan tetrasiklin (Ryan dkk., 1994; 31).

1.5 Metode pengujian aktivitas antibakteri

Penentuan aktivitas antibakteri secara *in vitro* dapat dikelompokkan dalam dua metode, yaitu metode turbidimetri dan metode difusi :

a. Metode turbidimetri (metode tabung)

Pada cara turbidimetri, digunakan medium agar cair dalam tabung reaksi. Pengamatan dengan melihat kekeruhan yang terjadi akibat pertumbuhan bakteri. Kadar antibakteri ditentukan dengan menggunakan spektrofotometer. Kelebihan cara ini adalah lebih cepat dari cara difusi agar karena hasil dapat dibaca setelah 3 atau 4 jam setelah inkubasi.

b. Metode difusi (metode lempeng)

Metode difusi tidak berbeda jauh dengan turbidimetri yaitu media yang digunakan merupakan agar cair yang memadat dalam cawan petri yang kemudian

dapat dilihat spektrum kerjanya setelah diinokulasikan bakteri dengan melihat daya hambat dari zat antibakteri yang digunakan (Rostinawati, 2009; 8).

1.6 Proses Isolasi Senyawa

1.6.1 Ekstraksi

Ekstraksi merupakan proses penarikan senyawa yang terkandung pada suatu simplisia dengan menggunakan suatu pelarut yang mampu menarik senyawa yang terkandung di dalam tanaman. Metode ekstraksi sendiri dikelompokkan menjadi dua macam yaitu ekstraksi cara dingin dan ekstraksi cara panas. Yang membedakan dari kedua metode ini adalah energi yang digunakan pada ekstraksi cara panas melibatkan energi panas yang dilakukan dengan bantuan dari alat pemanas dan pada ekstraksi ini senyawa dapat tertarik secara maksimal, yang termasuk ke dalam metode cara panas adalah soxhlet, refluks, dekokta, dan lain-lain. Sedangkan pada ekstraksi cara dingin tidak dibantu dengan pemanasan biasanya disebut dengan metode perendaman yang termasuk ke dalam metode ekstraksi cara dingin yaitu maserasi dan perkolasi.

1.6.2 Fraksinasi

Fraksinasi merupakan proses pemisahan antara zat cair dengan zat cair. Fraksinasi dilakukan secara bertingkat berdasarkan tingkat kepolarannya yaitu dari non polar, semi polar, dan polar. Senyawa yang memiliki sifat non polar akan larut dalam pelarut non polar, yang semi polar akan larut dalam pelarut semi polar, dan yang bersifat polar akan larut ke dalam pelarut polar. Fraksinasi ini

dapat dilakukan dengan menggunakan Ekstraksi Cair - cair atau kromatografi kolom (Harborne 1987; 4 - 8).

1.6.3 Kromatografi

Kromatografi adalah teknik pemisahan campuran didasarkan atas perbedaan distribusi dari komponen-komponen campuran tersebut di antara dua fase, yaitu fase diam (padat atau cair) dan fase gerak (cair atau gas). Bila fase diam berupa zat padat yang aktif, maka dikenal istilah kromatografi penjerapan. Bila fase diam berupa zat cair, maka teknik ini disebut kromatografi partisi (Harborne 1987; 9 - 10).

1.6.4 Kromatografi Cair Vakum

Cara ini pertama kali dipublikasikan oleh Coll dkk., pada tahun 1977 dengan menggunakan corong Buchner kaca masir atau kolom pendek untuk mengisolasi diterpena sesterpenoida dari terumbu karang Australia. Kolom kromatografi dikemas kering dalam keadaan vakum agar diperoleh kerapatan kemasan maksimum. Vakum dihentikan, pelarut yang kepolarannya rendah dituangkan ke permukaan penjerap lalu divakumkan lagi. Kolom dihisap sampai kering dan sekarang siap dipakai (Hostettmann dan Marston 1995; 35).

Kromatografi Cair Vakum (KCV) merupakan salah satu kromatografi vakum khusus yang biasanya menggunakan silika gel sebagai adsorben. Kelebihan KCV jika dibandingkan dengan kromatografi kolom klasik terletak pada kecepatan proses (efisiensi waktu) karena proses pengelusan dipercepat dengan memvakumkan kolom selain itu KCV juga dapat memisahkan sampel dalam jumlah banyak. Pemilihan jenis silika gel yang tepat merupakan faktor

yang sangat penting untuk mendapatkan hasil pemisahan yang baik (Peddersen, 2001 *dalam* Septyaningsih, 2010; 12).

1.6.5 Kromatografi Lapis Tipis

Kromatografi lapis tipis ialah metode pemisahan fisikokimia. Lapisan pemisah terdiri atas bahan berbutir-butir (fase diam), ditempatkan pada penyangga berupa plat gelas, logam atau lapisan yang cocok. Campuran yang akan dipisah berupa larutan yang ditotolkan baik berupa bercak ataupun pita, setelah plat atau lapisan dimasukkan ke dalam bejana tertutup rapat yang berisi larutan pengembang yang cocok (fase gerak), pemisahan terjadi selama perambatan kapiler (pengembangan), selanjutnya senyawa yang tidak berwarna harus ditampakkan (Stahl, 1985; 13 - 14).

Pendeteksian bercak hasil pemisahan dapat dilakukan dengan beberapa cara. Untuk senyawa tak berwarna cara yang paling sederhana adalah dilakukan pengamatan dengan sinar ultraviolet. Beberapa senyawa organik bersinar atau berfluorosensi jika disinari dengan sinar ultraviolet gelombang pendek (254 nm) atau gelombang panjang (366 nm), jika dengan cara itu senyawa tidak dapat dideteksi maka harus dicoba disemprot dengan pereaksi yang membuat bercak tersebut tampak yaitu pertama tanpa pemanasan, kemudian bila perlu dengan pemanasan (Stahl, 1985; 14 - 16).

1.7 Bioautografi KLT

Bioautografi KLT adalah suatu metode pendeteksian untuk menemukan suatu senyawa antimikroba yang belum teridentifikasi dengan cara melokalisir

aktivitas antimikroba tersebut pada suatu kromatogram hasil Kromatografi Lapis Tipis (KLT). Pada bioautografi ini didasarkan atas efek biologi berupa antibakteri, antiprotozoa, antitumor dan lain-lain dari substansi yang diteliti. Ciri khas dari prosedur bioautografi KLT adalah didasarkan atas teknik difusi agar, yaitu senyawa antimikrobanya dipindahkan dari lapisan KLT ke medium agar yang telah diinokulasikan dengan merata bakteri uji yang peka. Dari hasil inkubasi pada suhu dan waktu tertentu akan terlihat zona hambatan di sekeliling spot dari KLT yang telah ditempelkan pada media agar. Zona hambatan ditampakkan oleh aktivitas senyawa aktif yang terdapat di dalam bahan yang diperiksa terhadap pertumbuhan mikroorganisme uji (Akhyar, 2010; 24).

Bioautografi KLT dapat dipertimbangkan karena paling efisien untuk mendeteksi komponen antimikroba, sebab dapat melokalisir aktivitas meskipun dalam senyawa aktif tersebut terdapat dalam bentuk senyawa kompleks dan dapat pula diisolasi langsung dari komponen yang aktif. Bioautografi dapat dibagi atas tiga kelompok yaitu (Akhyar, 2010; 24):

a. Bioautografi langsung

Bioautografi langsung, yaitu metode deteksi yang mikroorganismenya tumbuh secara langsung di atas lempeng Kromatografi Lapis Tipis (KLT). Prinsip kerja dari metode ini adalah suspensi mikroorganisme uji yang peka dalam medium cair disemprotkan pada permukaan Kromatografi Lapis Tipis (KLT) yang telah dihilangkan sisa-sisa eluen yang menempel pada lempeng kromatogram. Setelah itu dilakukan inkubasi pada suhu dan waktu tertentu.

Pengeringan kromatogram dilakukan secara hati-hati dengan menggunakan *hair dryer* untuk menghilangkan sisa eluen. Senyawa dalam lempeng kromatogram dideteksi dengan menggunakan sinar UV pada panjang gelombang 254 nm dan 366 nm. Setelah diketahui letak dan jumlah senyawa aktif yang terpisah atau terisolasi, dengan timbulnya noda (*spot*) pada lempeng KLT, selanjutnya disemprotkan suspensi bakteri uji sebanyak 5-6 ml di atas permukaan lempeng KLT tadi secara merata. Besarnya lempeng KLT yang sering digunakan adalah 20x20 cm dan untuk meratakan suspensi bakteri yang telah disemprotkan dapat menggunakan alat putar atau *roller* yang dilapisi dengan kertas kromatogram (Whatman, Clifton). Lempeng KLT diinkubasi semalam (1x24 jam) dalam box plastik dan dilapisi dengan kertas, kemudian disemprot dengan 5 ml larutan TTC (20 mg/ml) atau INT (5 mg/ml), INTB (5 mg/ml) serta MTT (2,5 mg/ml) dan selanjutnya diinkubasi kembali selama 4 jam pada suhu 37°C.

b. Bioautografi kontak

Bioautografi kontak, yaitu metode dengan cara senyawa antimikroba dipindahkan dari lempeng KLT ke medium agar yang telah diinokulasikan bakteri uji yang peka secara merata dan melakukan kontak langsung. Metode ini didasarkan atas difusi dari senyawa yang telah dipisahkan dengan Kromatografi Lapis Tipis (KLT) atau kromatografi kertas. Lempeng kromatografi tersebut ditempatkan di atas permukaan Nutrien Agar yang telah diinokulasikan dengan mikroorganisme yang sensitif terhadap senyawa antimikroba yang dianalisis. Setelah 15-30 menit, lempeng kromatografi tersebut dipindahkan dari permukaan medium. Senyawa antimikroba yang telah berdifusi dari lempeng kromatogram ke

dalam media agar akan menghambat pertumbuhan bakteri setelah diinkubasi pada waktu dan suhu yang tepat sampai noda yang menghambat pertumbuhan mikroorganisme uji tampak pada permukaan membentuk zona yang jernih.

c. Bioautografi pencelupan

Bioautografi pencelupan, yaitu metode dengan medium agar yang telah diinokulasikan dengan suspensi bakteri dituang di atas lempeng Kromatografi Lapis Tipis (KLT). Pada prakteknya lempeng kromatografi yang telah dilusi diletakkan dalam cawan petri, sehingga permukaan tertutup oleh medium agar yang berfungsi sebagai *base layer*. Setelah *base layer*-nya memadat, dituangkan medium yang telah disuspensikan mikroba uji yang berfungsi sebagai *seed layer*, kemudian diinkubasi pada suhu dan waktu yang sesuai.