

Uji Kromatografi Lapis Tipis dan Deteksi Senyawa Antibakteri Fraksi N-Heksan Ekstrak Etanol Daun Pandan Wangi terhadap *Methicillin-resistant Staphylococcus aureus*

Riyan Setiyanto

D3 Farmasi, Politeknik Indonusa Surakarta, Surakarta, Indonesia; riyansetiyanto@poltekindonusa.ac.id
(koresponden)

Yulita Maulani

D4 Teknologi Laboratorium Medis, Politeknik Indonusa Surakarta, Surakarta, Indonesia;
yulita.maulani@poltekindonusa.ac.id

Camelia Marshanda

D3 Farmasi, Politeknik Indonusa Surakarta, Surakarta, Indonesia; e22103@poltekindonusa.ac.id

Ryan Nur Rifai

D3 Farmasi, Politeknik Indonusa surakarta, Surakarta, Indonesia; 23.ryan.nur@poltekindonusa.ac.id

ABSTRACT

Pandanus amaryllifolius Roxb leaves contain chemical compounds in the form of tannins, saponins, alkaloids, flavonoids, in the pandan wangi plant has antibacterial and antifungal activity. The purpose of this study was to detect the antibacterial compounds of the n-hexane fraction of ethanol extract of pandan wangi leaves against Methicillin-resistant Staphylococcus aureus. Detection of the content of compounds contained in pandan wangi leaves was carried out using thin layer chromatography with dragendrof spray reagent, FeCl₃, sitroborate and vanillin sulfuric acid. From the results of thin layer chromatography it was found that pandan wangi leaves contain tannins, flavonoids, alkaloids and saponins. The content of compounds contained in pandan leaves was tested again by bioautography to determine which compounds have antibacterial properties to overcome the resistance of Methicillin-resistant Staphylococcus aureus bacteria. From the results of the thin layer chromatography bioautography test, there were 4 Rf clear zones found in petri dishes. After matching the clear zones, it was discovered that the substances were suspected to be tannins, alkaloids, terpenoids, and saponins. It was concluded that pandan wangi leaves contain tannins, flavonoids, alkaloids, and saponins, with the n-hexane fraction having antibacterial activity against methicillin-resistant Staphylococcus aureus.

Keywords: pandan wangi leaves; n-hexane fraction; methicillin-resistant Staphylococcus aureus

ABSTRAK

Daun pandan wangi (*Pandanus amaryllifolius Roxb*) mengandung senyawa kimia berupa tannin, saponin, alkaloid, flavonoid, pada tumbuhan pandan wangi memiliki aktivitas antibakteri dan antifungi. Tujuan penelitian ini adalah melakukan deteksi senyawa antibakteri fraksi n-heksan ekstrak etanol daun pandan wangi terhadap *Methicillin-resistant Staphylococcus aureus*. Deteksi kandungan senyawa yang terkandung dalam daun pandan wangi dilakukan dengan menggunakan kromatografi lapis tipis dengan pereaksi semprot dragendrof, FeCl₃, sitroborat dan vanilin asam sulfat. Dari hasil kromatografi lapis tipis didapatkan bahwa daun pandan wangi mempunyai kandungan tanin, flavonoid, alkaloid dan saponin. Kandungan senyawa yang terdapat dalam daun pandan ini diuji lagi dengan bioautografi untuk mengetahui senyawa mana yang mempunyai khasiat sebagai antibakteri untuk mengatasi resistensi bakteri *Methicillin-resistant Staphylococcus aureus*. Dari hasil uji kromatografi lapis tipis bioautografi didapat ada 4 Rf zona bening yang terdapat dalam petri. Zona bening tersebut setelah kita cocokkan ternyata zat tersebut diduga senyawa tanin, alkaloid, terpenoid dan saponin. Disimpulkan bahwa daun pandan wangi mempunyai kandungan tanin, flavonoid, alkaloid, dan saponin, dengan fraksi n-heksan mempunyai aktivitas antibakteri terhadap *Methicillin-resistant Staphylococcus aureus*.

Kata kunci: daun pandan wangi; fraksi n-heksan; *Methicillin-resistant Staphylococcus aureus*

PENDAHULUAN

Tanaman tropis yang dikenal sebagai *Pandanus amaryllifolius (Roxb.)*, atau yang lebih umum disebut sebagai daun pandan wangi, merupakan spesies tumbuhan yang secara luas dimanfaatkan dalam bidang kuliner, terutama di kawasan Asia Tenggara, sebagai bahan penyedap alami yang memberi aroma khas pada berbagai jenis makanan tradisional dan modern.⁽¹⁾ Selain fungsi kuliner, tanaman ini juga memiliki nilai farmakologis yang cukup tinggi karena kandungan bioaktifnya. Daun pandan wangi mengandung berbagai senyawa metabolit sekunder yang terbukti memiliki efek terapeutik. Di antaranya adalah flavonoid, saponin, alkaloid, dan polifenol yang berperan penting dalam mekanisme biologis sebagai agen antiinflamasi, antibakteri, dan antioksidan.⁽²⁾ Keempat kelompok senyawa ini bekerja secara sinergis dalam melindungi sel dari kerusakan oksidatif, mencegah peradangan, serta menghambat pertumbuhan mikroorganisme patogen yang dapat mengganggu kesehatan.

Secara khusus, aktivitas antibakteri dari daun pandan wangi diyakini berasal dari kompleksitas kandungannya. Flavonoid, alkaloid, saponin, tanin, polifenol, dan pigmen alami yang terdapat di dalam jaringan daun memberikan kontribusi terhadap mekanisme penghambatan pertumbuhan dan perkembangan bakteri Gram positif maupun gram negatif.⁽³⁾ Masing-masing senyawa tersebut memiliki mekanisme kerja yang berbeda, seperti merusak membran sel bakteri, menghambat sintesis protein, atau memicu respon imun lokal.

Saponin, sebagai salah satu senyawa dominan dalam daun pandan, merupakan kelompok metabolit sekunder yang terkenal dengan sifat antimikroba dan antibakterinya.⁽⁴⁾ Saponin dapat merusak membran sel mikroba melalui pembentukan kompleks dengan sterol, sehingga menyebabkan kebocoran isi sel dan kematian mikroorganisme. Selain itu, saponin juga memiliki sifat tensioaktif, yang menyebabkan terbentuknya busa jika dikocok dalam air. Fenomena ini tidak hanya menjadi ciri khas saponin tetapi juga menunjukkan kemampuannya dalam membentuk emulsi yang bermanfaat dalam aplikasi farmasi dan pangan.⁽⁵⁾

Dengan berbagai potensi bioaktif yang dimiliki, daun pandan wangi tidak hanya relevan sebagai bahan kuliner tetapi juga sebagai kandidat sumber obat herbal yang menjanjikan untuk dikembangkan lebih lanjut dalam bidang farmakologi, fitoterapi, dan nutrasetikal. Penelitian lanjutan mengenai efektivitas serta keamanan senyawa aktifnya akan memperkuat posisi tanaman ini dalam pengembangan produk kesehatan yang berbasis alam dan berkelanjutan.

Efektivitas pengobatan empiris saat ini menghadapi tantangan serius seiring dengan meningkatnya kasus resistensi antibiotik yang dilaporkan secara global, khususnya terhadap patogen yang menjadi penyebab utama infeksi saluran pernapasan berat. Resistensi ini berdampak langsung pada penurunan keberhasilan terapi konvensional dan peningkatan morbiditas pasien. Salah satu studi penting yang menyoroti fenomena ini adalah *European EPECH Study*, yang menemukan bahwa sebanyak 60% isolat *Staphylococcus aureus* yang diperiksa merupakan jenis *Methicillin-resistant Staphylococcus aureus* (MRSA). Bahkan, prevalensi MRSA pada kasus bakteremia mencapai 72% dari total patogen *S. aureus* yang diamati pada pasien, menandakan eskalasi signifikan dalam insidensi infeksi yang sulit ditangani.⁽⁶⁾

Dalam konteks pencarian alternatif terapi berbasis bahan alam, daun pandan wangi mendapat perhatian karena sifat aromatik dan kandungan bioaktifnya. Berbagai senyawa metabolit sekunder seperti flavonoid, saponin, dan alkaloid yang terkandung di dalamnya terbukti secara *in vitro* memiliki potensi antibakteri, antimikroba, dan mempercepat proses penyembuhan luka yang diakibatkan oleh bakteri patogen.⁽⁷⁾ Penelitian yang dilakukan oleh Setiyanto *et al.*⁽⁶⁾ menunjukkan bahwa ekstrak etanol dari daun pandan wangi efektif dalam menghambat pertumbuhan strain MRSA. Aktivitas antibakteri ini ditengarai berasal dari mekanisme sinergis antara flavonoid, alkaloid, dan saponin yang bekerja mengganggu integritas membran sel bakteri, menghambat sintesis protein, serta menstimulasi respon imun lokal. Studi lain⁽⁸⁾ memperkuat temuan tersebut dengan menunjukkan bahwa ekstrak etanol daun pandan wangi pada konsentrasi 2,5% mampu menurunkan pertumbuhan MRSA secara signifikan. Dalam metodologi penelitian ini, digunakan pelarut etanol 70% untuk mengekstraksi senyawa polar dari jaringan daun. Selanjutnya, dilakukan pemisahan lanjutan menggunakan pelarut n-heksana guna memperoleh fraksi non-polar, yang kemudian diuji aktivitas antibakterinya terhadap MRSA.

Identifikasi senyawa antibakteri dilakukan menggunakan teknik Kromatografi Lapis Tipis (KLT), di mana berbagai pereaksi semprot digunakan untuk mendeteksi keberadaan senyawa aktif. Selain itu, pendekatan bioautografi KLT juga diimplementasikan guna mengidentifikasi secara langsung zona aktivitas antibakteri pada plat kromatografi, memberikan bukti visual mengenai potensi senyawa dalam menghambat pertumbuhan mikroba. Pendekatan berbasis fraksinasi dan pemetaan senyawa bioaktif ini menunjukkan prospek besar pengembangan terapi berbasis bahan alam, terutama untuk menghadapi ancaman patogen resisten seperti MRSA. Penelitian lanjutan yang bersifat multidisipliner sangat diperlukan untuk mengeksplorasi aspek farmakodinamik, farmakokinetik, serta toksisitas dari ekstrak pandan secara lebih komprehensif, termasuk kemungkinan integrasinya dalam formulasi farmasi modern maupun tradisional.

Berdasarkan penjelasan di atas, diperlu penelitian yang bertujuan untuk melakukan deteksi senyawa antibakteri fraksi n-heksan ekstrak etanol daun pandan wangi terhadap MRSA.

METODE

Penelitian ini termasuk dalam penelitian analitik eksperimental. Komponen fenol dan flavonoid terkandung dalam fraksi etil asetat, ekstrak etanol dan heksan. Ekstrak etanol daun pandan dan fraksi etil asetat secara kualitatif mengandung alkaloid, flavonoid, fenol dan saponin. Senyawa terpenoid terdapat pada ekstrak etanol sedangkan steroid terdapat pada fraksi etil asetat. Fraksi n-heksan mengandung senyawa steroid dan fenolik.⁽⁸⁾ Fraksi n-heksan mempunyai potensi antibakteri terhadap MRSA.⁽⁹⁾ Kebaruan dari penelitian ini yaitu dilakukan uji aktifitas antibakteri terhadap resistensi bakteri *Staphylococcus aureus* yaitu bakteri MRSA dan dilakukan deteksi senyawa antibakterinya. Ekstrak etanol 70 % daun pandan wangi di fraksinasi dengan n-heksan kemudian dilakukan skrining fitokimia dan dianalisis komponen kimianya menggunakan uji KLT diamati pada UV vis, UV 256 nm, UV 366 nm dengan beberapa pereaksi semprot (serium sulfat, Dragendrof, FeCl₃, Vanilin-asam sulfat). Hasil dari uji KLT kemudian dideteksi senyawa antibakterinya dengan menggunakan bioautografi.

Sampel daun *Pandanus amaryllifolius* diperoleh dari Desa Kauman, Keden, Pedan, Klaten, Jawa Tengah. Tanaman kemudian diidentifikasi dan dideterminasi di Laboratorium Biologi Universitas Muhammadiyah Surakarta, pada bagian akar, batang dan daun tanaman pandan wangi. Sampel segar dipilih kemudian dilakukan sortasi basah, lalu dsampel dicuci dengan air yang mengalir lalu ditimbang didapatkan bobot basah 861,74 g. Sampel dirajang dan dikeringkan dengan cara ditiriskan, selanjutnya dikeringkan dengan pemanas oven. Simplisia rajangan yang sudah dikeringkan disortasi kering dihaluskan menggunakan blender kemudian diayak sampai didapatkan serbuk simplisia kering yang sesuai kadarnya.

Ekstraksi dilakukan menggunakan metode maserasi dengan konsep perendaman. Serbuk simplisia direndam pada suhu kamar menggunakan pelarut etanol 70%. Filtrat kemudian difiltrasi dengan kertas saring hingga didapat ekstrak cair lalu diuapkan dengan alat *rotary evaporator* sampai didapatkan ekstrak kental. Fraksinasi dengan menggunakan n-Heksan Sebanyak 10,0 gram ekstrak etanol daun pandan kental difraksinasi dengan jalan partisi cair cair menggunakan pelarut n-heksan dan air. Fraksinasi dilakukan dengan melarutkan ekstrak kental ke dalam campuran air dan etanol (9:1). Larutan tersebut dimasukkan dalam corong pisah dan ditambah n-heksan. Jumlah n-heksan yang digunakan sebanding dengan jumlah air-etanol yang ditambahkan ke dalam ekstrak etanol (1:1). Fraksi n-heksan yang terbentuk (lapisan atas) dipisahkan Fraksi air-etanol digojog kembali menggunakan n-heksan hingga fraksi n-heksan jernih (replikasi 3 kali). Fraksi n-heksan yang diperoleh dipakatkan menggunakan rotary evaporator pada suhu 45 °C.⁽¹⁴⁾ Fraksi n-heksan yang didapat kemudian di analisis komponen kimianya menggunakan KLT dengan menggunakan fase diam Silika Gel GF 254 dan fase gerak n-heksan : etil asetat = 6 : 4. Fraksi n-heksan dengan konsentrasi 30% ditotolkan pada enam lempeng yang berbeda dengan jarak 1 cm dari tepi bawah plat dengan menggunakan pipa kapiler. Kemudian dikeringkan dengan

cara diangin-anginkan. Lempeng pertama, diamati dengan lampu UV vis, UV 256 nm, UV 366 nm dan disemprot menggunakan pereaksi semprot serum sulfat, dragendrof, FeCl₃ dan vanilin asam sulfat.⁽¹³⁾ Lempeng keenam untuk uji bioautografi.

Uji aktivitas antibakteri fraksi n-heksan terhadap bakteri MRSA pada penelitian ini adalah metode yang digunakan untuk uji mikrobiologi adalah metode *disc diffusion* padat, yang mana dilakukan uji antibakteri. Bakteri yang digunakan adalah *Methicillin Resistant Staphylococcus aureus*. Bakteri didapatkan dari Laboratorium Mikrobiologi, Fakultas Kedokteran, Universitas Sebelas Maret Surakarta. Uji aktivitas antibakteri menggunakan metode *disc diffusion*. Kontrol positif yang digunakan untuk uji antibakteri menggunakan Vankomisin.⁽¹⁵⁾ Vankomisin merupakan antibiotik yang mempunyai sensitivitas lebih tinggi dibanding Clindamycin.⁽⁵⁾ Kontrol negatif yang digunakan untuk uji antibakteri menggunakan DMSO 10%.⁽¹⁶⁾ Untuk tahapan penelitian uji mikrobiologi adalah yang pertama sterilisasi alat dan bahan menggunakan oven dan autoklaf. Pembuatan media NA atau MHA untuk inokulasi bakteri. Setelah media siap maka diinokulasikan bakteri MRSA dan diinkubasi dalam inkubator pada suhu 37°C selama 24 jam. Pembuatan seri konsentrasi fraksi n-heksan 10%, 20% dan 30% dengan pelarut DMSO 10%. Penyiapan kontrol positif Vankomisin dan kontrol negatif DMSO 10%. Perendaman cakram disk kosong kedalam fraksi n-heksan selama 15 menit. Kemudian diinkubasikan kedalam media yang telah diinokulasikan bakteri MRSA pada suhu 37 °C selama 24 jam dan dilakukan replikasi 3 kali. Pengukuran zona hambat menggunakan jangka sorong.

Data yang didapat dianalisa menggunakan SPSS 22 dengan metode *One Way Anova* atau Kruskal Wallis.⁽¹⁷⁾ Uji KLT bioautografi pada penelitian ini adalah metode yang digunakan adalah bioautografi agar overlay. Medium *nutrien broth* sebanyak 10 mL yang sudah dicampur 1 mL suspensi bakteri bakteri uji *S. aureus* (MRSA) yang telah disiapkan dalam media agar dituang untuk melapisi lempeng KLT yang sebelumnya telah dielusi. Setelah itu lempeng KLT tersebut diinkubasikan pada suhu 37 °C selama 18-24 jam. Kemudian dilakukan pencatatan zona hambat yang terbentuk. Setelah dilakukan uji bioautografi KLT dilakukan pemantauan bercak KLT guna mengidentifikasi senyawa apa yang terdapat dalam kromatogram hasil elusi yang memiliki aktivitas antibakteri dengan melihat perubahan warna bercak noda pada kromatogram. Senyawa tersebut dapat berupa flavonoid, tanin, atau saponin. Pemantauan penampakan bercak KLT akan dilakukan menggunakan sinar UV dengan panjang gelombang 254 nm dan 365 nm.⁽¹⁸⁾

HASIL

Pembuatan simplisia dilakukan dengan menggunakan sampel bagian daun pandan wangi yang masih segar, berwarna hijau, dan telah mencapai tahap pertumbuhan maksimal. Sampel simplisia yang diperoleh terlebih dahulu menjalani proses sortasi kering untuk menghilangkan bagian yang rusak atau tidak sesuai, kemudian dibersihkan menggunakan air bersih yang mengalir (sortasi basah). Selanjutnya, daun dirajang secara melintang dengan ukuran ±2 cm. Setelah proses perajangan, daun pandan dikeringkan dalam oven selama 18 jam pada suhu 60°C hingga diperoleh hasil pengeringan yang sempurna, yang ditandai dengan tekstur sampel yang mudah diremah. Setelah kering, simplisia kembali menjalani sortasi kering untuk memastikan konsistensi kualitas. Suhu dan durasi pengeringan tersebut telah disesuaikan dengan ketentuan umum dalam *Farmakope Herbal Indonesia*.⁽⁹⁾ Simplisia kering yang diperoleh kemudian dianalisis untuk menentukan persentase *Loss on Drying* (LOD), dengan tujuan mengetahui proporsi senyawa kimia yang hilang selama proses pengeringan.

Hasil LOD daun adalah memenuhi standar karena simplisia sudah kering sempurna yang ditandai dengan simplisia dapat diremah (Tabel 1). Setelah uji LOD dilakukan uji kadar air dengan alat *moisture analyser*,⁽¹⁰⁾ dengan kadar air simplisia serbuk kering adalah 7,39%. Hasil tersebut sudah memenuhi standar mutu ekstrak daun pandan wangi dan pas dengan syarat susut pengeringan simplisia menurut yaitu tidak lebih dari 10%.⁽⁹⁾

Hasil perhitungan LOD pada simplisia daun pandan wangi disajikan pada Tabel 1.

Tabel 1. LOD simplisia daun pandan wangi

Berat basah	Berat kering	LOD (%) b/b
861,74 gram	113,16 gram	86%

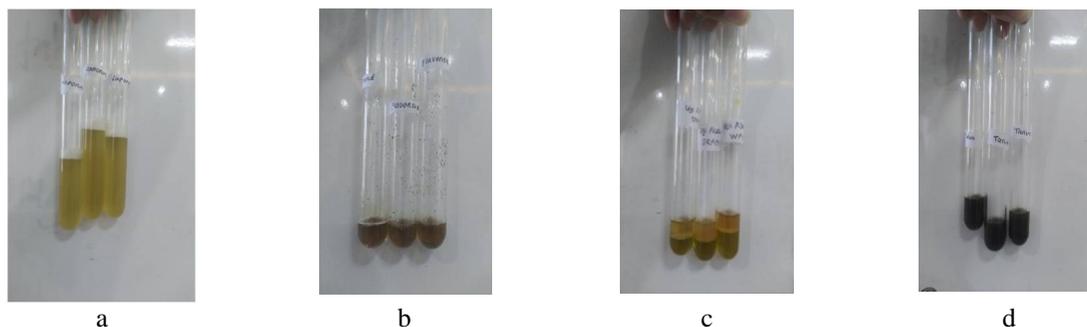
Tabel 2. Rendemen ekstrak daun *Pandanus amaryllifolius*

Simplisia kering	Ekstrak kental	Rendemen
113,16 gram	12,64 gram	11,17 %

Metode maserasi adalah metode yang digunakan untuk ekstraksi dengan cara simplisia serbuk daun pandan wangi direndam dengan pelarut etanol 70% pada suhu kamar. Penggunaan teknik maserasi relatif sederhana pengerjaannya karena tidak memerlukan pemanasan dan tidak memerlukan alat khusus. Menurut prinsip bahwa suatu senyawa larut dalam pelarut dengan polaritas yang sama, efisiensi ekstraksi metabolit tanaman dari pelarut sangat bergantung pada kelarutan senyawa dalam pelarut.⁽¹⁰⁾ Pelarut etanol 70% digunakan untuk menyarikan senyawa-senyawa polar. Etanol 70% digunakan untuk proses ekstraksi maserasi karena merupakan pelarut organik yang bisa menarik kebanyakan metabolit sekunder bersifat polar yang terkandung dalam tanaman.⁽¹¹⁾

Dari hasil maserasi serbuk daun pandan kering 113,16 gram dengan pelarut etanol 70% sebanyak 1,14 liter, dihasilkan ekstrak kental 12,64 gram, sehingga diperoleh rendemen ekstrak 11,17% (Tabel 2). Rendemen dikatakan baik bila nilainya lebih dari 10%. Ekstrak yang didapat kemudian diuji kadar air dengan menggunakan alat *moisture analyser*, kadar air ekstrak daun pandan wangi sebesar 2,74%. Hasil tersebut sudah memenuhi persyaratan untuk kadar air ekstrak kental dimana berkisar antara 2%-30%.⁽¹²⁾

Berdasarkan hasil uji organoleptik didapatkan ekstrak daun pandan wangi berwarna hijau tua, serta memiliki tekstur kental, bau khas pandan menyengat. Tekstur kental diperoleh karena kandungan etanol dan zat-zat yang mudah menguap pada suhu dibawah 70°C telah habis dan hanya menyisakan metabolit sekunder yang tidak menguap pada suhu tersebut. Warna coklat tua yang diperoleh sudah sesuai dengan parameter ekstrak pandan wangi seperti yang tertera pada *Farmakope Herbal Indonesia* Edisi II.⁽⁹⁾ yaitu warna hijau tua, tekstur ekstrak kental, dan bau pandan wangi. Kemudian dilakukan skrining fitokimia yaitu uji saponin, flavonoid, alkaloid, uji tanin (Gambar 1).



Gambar 1. Hasil uji kandungan fitokimia (a: saponin, b: alkaloid, c: flavonoid, d: tanin)

Tabel 3. Hasil uji skrining fitokimia

Senyawa	Warna	Hasil
Saponin	Berbuih	+
Alkaloid	Endapan Putih	+
Flavonoid	Kuning	+
Tanin	Hijau kehitaman	+

Keterangan: + adalah mengandung senyawa metabolit; - adalah tidak mengandung senyawa metabolit

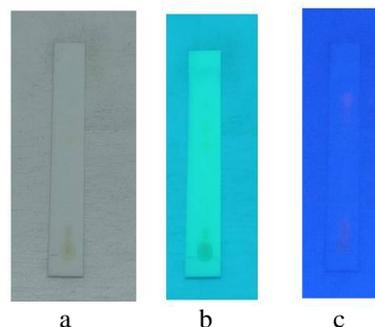
Tabel 4. Diameter zona hambat ekstrak etanol daun pandan wangi.\)

Kelompok	1	2	3	Rerata±SD
Kontrol -	0	0	0	0±0
Kontrol +	21,34	21,47	21,59	21,46±0,125
10 %	7,92	7,44	6,32	7,226±0,82
20%	10,31	10,02	8,73	9,68±0,84
30%	16,69	16,26	14,68	15,887±1,058

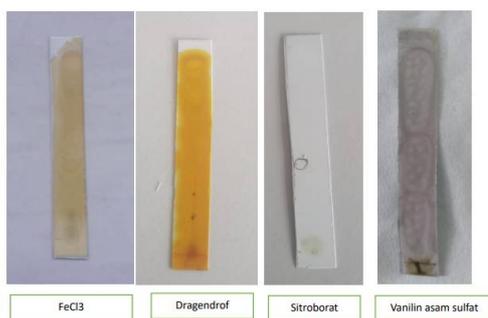
Hasil dari fraksinasi n-heksan dari ekstrak etanol didapatkan fraksi n-heksan yang didapat sebanyak 4,8 g. Fraksi n-heksan kemudian dibuat konsentrasi 10%, 20% dan 30%. Metode difusi cakram digunakan untuk mengevaluasi sifat antibakteri. MRSA adalah bakteri yang digunakan. Aktivitas antibakteri ditunjukkan berdasarkan diameter zona hambat (mm) yang diukur menggunakan jangka sorong digital. Hasil uji aktivitas antibakteri ditunjukkan pada Gambar 2 dan Tabel 5.



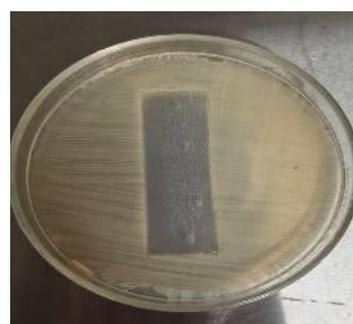
Gambar 2. Diameter zona hambat Fraksi n-Heksan terhadap bakteri MRSA



Gambar 3. Profil KLT dengan a: sinar tampak, b: sinar UV 254 nm dan c: sinar UV 366 nm



Gambar 4. Profil KLT dengan beberapa pereaksi semprot



Gambar 5. Hasil KLT bioautografi terhadap bakteri MRSA

Uji KLT (Gambar 3 dan Gambar 4) dengan menggunakan fase diam; Silika Gel GF 254 nm dan fase gerak n-heksan : etil asetat = 6:4 dengan pengamatan pada sinar tampak, sinar UV 254 nm dan sinar UV 366 nm. Hasil pemisahan senyawa dengan KLT PF 254 ekstrak n-heksan menggunakan eluen heksan : etil asetat (6:4) dengan penampak noda sinar UV vis, UV 254 dan UV 366 serta pereaksi semprot FeCl₃, dragendrof, sitroborat, vanilin asam sulfat. Hasil pengujian KLT bioautografi fraksi n-heksan (Gambar 5) eluen n-heksan : etil asetat (6:4) menunjukkan bahwa terdapat 4 noda yang memberikan aktivitas penghambatan terhadap bakteri MRSA. Data KLT dan hasil pengujian KLT-bioautografi selengkapnya dapat dilihat pada Tabel 5 dan Tabel 6. Lempeng-lempeng hasil elusi diuji aktivitasnya dengan metode KLT bioautografi. Hasil pengujian KLT bioautografi ekstrak

n-heksan dengan eluen n-heksan : etil asetat (6:4), diperoleh 4 spot dengan nilai Rf 0,16 Rf 0,416 Rf 0,716 dan Rf 0,916 aktif terhadap bakteri MRSA.

Tabel 5. Profil kromatogram lempeng KLT-bioautografi fraksi n-heksan daun pandan

Fraksi	Rf	Penampakan noda						
		Uv vis	Uv 254	Uv 366	FeCl ₃	Dragendorff	Sitroborat	Vanilin asam sulfat
n-heksan	0,116	Ada (hitam)	Ada (kuning hitam)	Ada (ungu hitam)	Ada (biru)	-	-	-
	0,416	-	-	-	-	Ada (kecoklatan)	-	-
	0,716	-	Ada (kuning)	Ada (ungu)	-	-	-	Ada (jingga)
	0,916	-	-	-	-	-	Ada (kekuningan)	-

Tabel 6. Profil KLT bioautografi

	Penampakan noda	Dugaan senyawa antibakteri
Rf 1	0,116	Tannin
Rf 2	0,416	Alkaloid
Rf 3	0,716	Terpenoid
Rf4	0,916	Saponin

PEMBAHASAN

Daun pandan wangi diekstraksi dengan pelarut etanol 70% menggunakan metode maserasi. Hasil ekstraksi etanol kemudian difraksinasi, suatu metode yang memungkinkan pemisahan senyawa berdasarkan polaritasnya. Prosedur fraksinasi ini melibatkan penggunaan dua pelarut dengan polaritas berbeda untuk menghasilkan fraksi-fraksi terpisah. Tujuan utama penelitian ini adalah mendeteksi senyawa antibakteri pada fraksi n-heksan dari ekstrak etanol daun pandan wangi terhadap MRSA menggunakan metode KLT bioautografi.⁽¹³⁾

Pembuatan simplisia merupakan tahapan awal dalam proses ekstraksi.⁽¹⁴⁾ Simplisia disiapkan dari daun pandan wangi segar yang berwarna hijau dan telah mencapai pertumbuhan maksimal. Sampel yang diperoleh dibersihkan melalui sortasi basah dengan air mengalir, kemudian dirajang melintang dengan ukuran ± 2 cm. Daun yang telah dirajang dikeringkan dalam oven pada suhu 60°C selama 18 jam hingga kering sempurna, ditandai dengan daun yang mudah diremah. Proses pengeringan ini sesuai dengan standar *Farmakope Herbal Indonesia*.⁽¹⁴⁾ Simplisia kering selanjutnya dihaluskan menggunakan blender untuk memperluas luas permukaan jaringan tumbuhan agar senyawa aktif dapat lebih efektif berikatan dengan pelarut. Purwanti *et al.* (2018) menunjukkan bahwa metode pengeringan dengan oven menghasilkan persentase inhibisi tertinggi dibandingkan metode lain. Persentase inhibisi tersebut merupakan parameter aktivitas antioksidan yang diukur dengan metode DPPH.⁽⁵⁾

Tahapan berikutnya adalah penghitungan LOD untuk mengetahui jumlah kandungan yang hilang selama proses pengeringan. Hasil analisis menunjukkan bahwa simplisia telah kering sempurna, ditandai dengan sampel yang mudah diremah. Uji kadar air dilakukan menggunakan alat *moisture balance*, dan diperoleh kadar air simplisia sebesar 7,39%. Angka ini sesuai dengan parameter mutu, di mana kadar air simplisia tidak melebihi 10%, dan kadar air ekstrak kental berada pada kisaran 2%–30%. Kandungan air yang berlebih dapat memicu pertumbuhan mikroba dan menurunkan stabilitas ekstrak.⁽¹⁵⁾

Metode maserasi digunakan dalam ekstraksi. Simplisia direndam pada suhu ruang dengan pelarut etanol 70% selama 5 hari dan diaduk secara berkala untuk mencegah pengendapan serbuk yang bisa menghambat pelarutan dan ekstraksi zat aktif secara optimal. Filtrat disaring dengan kertas saring dan diuapkan menggunakan rotary evaporator untuk menghasilkan ekstrak kental yang kaya senyawa metabolit sekunder seperti antioksidan. Hasil maserasi dari serbuk daun pandan dikategorikan baik karena nilai rendemennya melebihi 10%.⁽¹⁴⁾

Uji organoleptik terhadap ekstrak dilakukan berdasarkan bentuk, warna, dan bau. Hasil uji menunjukkan ekstrak daun pandan berwarna hijau tua dan bertekstur kental. Konsistensi kental ini terjadi karena pelarut etanol dan senyawa volatil menguap di bawah suhu 70°C, menyisakan hanya metabolit sekunder. Warna cokelat tua yang terbentuk sesuai dengan karakteristik ekstrak pandan sebagaimana tercantum dalam *Farmakope Herbal Indonesia* Edisi II.⁽⁹⁾ Uji kadar air pada ekstrak menggunakan *moisture analyser* menunjukkan kadar 2,45%, yang memenuhi persyaratan kadar air ekstrak kental (2%–30%).⁽¹²⁾

Skrining fitokimia menunjukkan kandungan saponin, alkaloid, dan flavonoid. Ini sejalan dengan studi yang menyebutkan daun pandan mengandung saponin, alkaloid, steroid, dan fenolik.^(5,16-18) Uji KLT lanjutan memperkuat hasil tersebut: fraksi n-heksan menunjukkan positif fenolik dan tanin berdasarkan munculnya bercak biru setelah penyemprotan reagen FeCl₃. Reagen Dragendorff digunakan untuk mendeteksi alkaloid dan menghasilkan bercak kecoklatan, menandakan positif alkaloid. Pengujian dengan sitroborat menunjukkan bercak berfluoresensi kuning kehijauan di bawah sinar UV 366 nm, menandakan kandungan saponin.⁽¹⁹⁾ Pengujian terakhir dengan vanillin-asam sulfat menunjukkan bercak kekuningan yang mengindikasikan kandungan terpenoid.⁽²⁰⁾

Mekanisme kerja metabolit sekunder sebagai antibakteri berbeda-beda yakni flavonoid: mendenaturasi protein dan merusak lipid DNA serta struktur inti sel bakteri;⁽²¹⁾ saponin: mengganggu permeabilitas dinding sel, menyebabkan kebocoran sitoplasma dan kematian sel;⁽²²⁾ tanin: menghambat pembentukan dinding sel melalui inhibisi enzim DNA topoisomerase;⁽²³⁾ alkaloid: mengganggu komponen peptidoglikan pada dinding sel, menyebabkan kematian bakteri.⁽²⁴⁾

Metode bioautografi digunakan untuk mendeteksi senyawa aktif antibakteri secara langsung dari campuran kompleks.⁽¹⁹⁾ Keuntungan metode ini adalah prosedurnya cepat, murah, mudah, dan akurat, serta hanya memerlukan peralatan sederhana. Metode *agar overlay* digunakan karena sampel yang diperlukan relatif sedikit dan cocok untuk bioassay yang mengarah pada isolasi senyawa aktif. Sensitivitas metode *agar overlay* lebih tinggi dibandingkan metode kontak.⁽²⁵⁾

Uji Kruskal-Wallis dan Mann-Whitney dipilih berdasarkan hasil uji normalitas *One-Sample Kolmogorov-Smirnov*, dengan $p = 0,966$ (data berdistribusi normal). Namun, nilai p *Test of Homogeneity of Variances* adalah 0,019 yang menunjukkan bahwa data tidak homogen, sehingga uji ANOVA tidak dapat digunakan. Nilai p dari

uji Kruskal-Wallis adalah 0,009 yang menunjukkan adanya pengaruh signifikan perlakuan terhadap diameter hambat fraksi n-heksan. Uji Mann-Whitney menunjukkan bahwa perlakuan berbeda secara signifikan, dengan nilai $p = 0,037$ untuk kontrol negatif, serta nilai 0,05 untuk perlakuan lainnya, yang menandakan bahwa seluruh perlakuan memberikan hasil yang berbeda bermakna terhadap diameter hambat fraksi n-heksan.

KESIMPULAN

Berdasarkan hasil penelitian ekstrak daun pandan (*Pandanus amaryllifolius*) mempunyai kandungan tanin, flavonoid, alkaloid, dan saponin. Fraksi n-heksan mempunyai aktivitas antibakteri terhadap bakteri MRSA, semakin tinggi konsentrasi semakin tinggi daya hambatnya. Berdasarkan hasil uji KLT bioantografi senyawa yang diduga mempunyai aktivitas antibakteri adalah tanin, alkaloid dan terpenoid dan saponin.

DAFTAR PUSTAKA

1. Faras AF, Wadkar SS, Ghosh JS. Effect of leaf extract of pandanus amaryllifolius (Roxb.) on growth of Escherichia coli and Micrococcus (Staphylococcus) aureus. *Int Food Res J.* 2014;21(1):421–3.
2. Astanti MD, Lestari PE, Triwahyuni IE. Efektivitas gel ekstrak daun pandan wangi (*Pandanus amaryllifolius Roxb.*) terhadap penyembuhan ulser pada tikus wistar. *STOMATOGNATIC - J Kedokt Gigi.* 2022;19(1):7.
3. Mardiyarningsih A, Aini R. Pengembangan potensi ekstrak daun pandan (*Pandanus amaryllifolius Roxb*) sebagai agen antibakteri. *Pharmaciana.* 2014;4(2):102-108.
4. Pamungkas DK, Retnaningtyas Y, Wulandari L. Pengujian aktivitas antioksidan kombinasi ekstrak metanol daun mangga gadung (*Mangifera indica L. var. gadung*) dan ekstrak etanol daun pandan wangi (*Pandanus amaryllifolius roxb.*). *e-Jurnal Pustaka Kesehat.* 2017;5(1):46–9.
5. Purwanti NU, Yuliana S, Sari N. Pengaruh cara pengeringan simplisia daun pandan (*Pandanus amaryllifolius*) terhadap aktivitas penangkal. *J Farm Medica/Pharmacy Med J.* 2018;1(2):63–72.
6. Setiyanto R, Suhesti I, Utami AD. Aktivitas antibakteri dan antijamur dari ekstrak dan fraksi daun pandan wangi (*Pandanus amaryllifolius Roxb*) sebagai bahan makanan, Report. 2024;20(1):156–68.
7. Nofikasari I, Rufaida A, Aqmarina CD, Failasofia F, Fauzia AR, Handajani J. Efek aplikasi topikal gel ekstrak pandan wangi terhadap penyembuhan luka gingiva. *Maj Kedokt Gigi Indones.* 2017;2(2):53.
8. Putra HP. Efektivitas antibakteri ekstrak etanol daun pandan wangi (*Pandanus amryllifolius Roxb*) terhadap *Metchicillin Rensitive Staphylococcus aureus* (MRSA) secara in vitro. Report. 2015;8(2):92-98.
9. Kemenkes RI. Farmakope Herbal Indonesia. Jakarta: Kemenkes RI; 2017.
10. Verdiana M, Widarta IWR, Permana IDGM. Pengaruh jenis pelarut pada ekstraksi menggunakan gelombang ultrasonik terhadap aktivitas antioksidan ekstrak kulit buah lemon (*Citrus limon (Linn.) Burm F.*). *J Ilmu dan Teknol Pangan.* 2018;7(4):213.
11. Kurniawati Evi. Daya antibakteri ekstrak etanol tunas bambu apus terhadap bakteri *Escherichia coli* dan *Staphylococcus aureus* secara in vitro. *J Wiyata.* 2015;2(2):193–9.
12. Salahudin F, Cahyanto HA. Aktivitas antibakteri *Propionibacterium acnes* dan formulasi ekstrak etanol biji pinang (*Areca catechu, L*) dalam krim anti jerawat. *J Ris Ind Has Hutan.* 2020;12(1):21–8.
13. Bergfeld WF, Donald V, Hill RA, Klaassen CD, Liebler DC, Marks JG, et al. Safety assessment of polyvinyl alcohol as used in cosmetics. *Cosmet Ingred Rev.* 2015;8(2):102-108.
14. Rakhmawatie MD, Marfu'ati N. Pembuatan simplisia dan teknik penyiapan obat tradisional jahe merah dan daun pepaya untuk standardisasi dosis. *Berdikari: Jurnal Inovasi dan Penerapan Ipteks.* 2023 Apr 20;11(1).
15. Utami YP, Umar AH, Syahrini R, Kadullah I. Standardisasi simplisia dan ekstrak etanol daun leilem (*Clerodendrum*). *J Pharm Med Sci.* 2017;2(1):32–9.
16. Tias PDA 2019. Aktivitas antifungi seduhan daun pandan wangi (*Pandanus amaryllifolius Rxb.*) terhadap pertumbuhan *Candida albicans* dengan metode sumuran. Report. 2019;18(12):62-68.
17. Hardianti S, Chiuman L, Ginting CN, Adrian A. Analyzing ethanol's antioxidant extract of pandanus leaves through DPPH method. *Interdiscip Soc Stud.* 2022;1(5):610–6.
18. Kiyato P, Kamu VS, Runtuwene MR. Skrining fitokimia dan uji aktivitas antioksidan fraksi pelarut dari ekstrak metanol batang pandan wangi (*Pandanus amaryllifolius Roxb*). *J LPPM Bid Sains dan Teknol.* 2022;7(2):1–7.
19. Muhtadi, Ambarwati R, Yuliani R. Aktivitas antibakteri ekstrak etanol dan fraksi kulit batang belimbing wuluh (*Averrhoa bilimbi Linn.*) terhadap bakteri *Klebsiella pneumoniae* dan *Staphylococcus epidermidis* beserta bioautografinya. *Biomedika.* 2012;4(2):1–9.
20. Raihan M, Taqwa N, Hanifah AR, Lallo S, Ismail I, Amir MN. Skrining fitokimia ekstrak kulit buah nangka (*Artocarpus heterophyllus*) dan aktifitas antioksidannya terhadap [2,2'-azinobis-(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonate)] (ABTS). *Maj Farm dan Farmakol.* 2020;23(3):101–5.
21. Armanda F, N YI, Budiarty LY. Efektivitas daya hambat bakteri ekstrak bawang dayak terstandarisasi flavonoid terhadap *Enterococcus Faecalis* (in vitro). *Dentino.* 2017;2(2):183–7.
22. Dominius A, Khotimah S, Rahmayani S. Uji aktivitas antibakteri kombinasi infusa umbi bawang dayak (*Eleutherine americana (Aubl.) Merr.Ex K. Heyne*) dan daun mangga bacang (*Mangifera foetida L.*) terhadap *Staphylococcus aureus* secara in vitro. Report. 2015;151:10–17.
23. Rizal NM, Nurhaeni N, Ridhay A. Aktivitas antibakteri ekstrak daun mayana (*Coleus atropurpureus [L] Benth*) berdasarkan tingkat kepolaran pelarut. *KOVALEN J Ris Kim.* 2018;4(2):180–9.
24. Novaryatiin S, Pratiwi AM, Ardhany SD. Uji daya hambat ekstrak etanol bawang dayak (*Eleutherine bulbosa (Mill.) Urb.*) terhadap bakteri *Staphylococcus epidermidis*. *Anterior J.* 2018;18(1):92–7.
25. Kusumaningtyas E, Estie A, Darmono. Sensitivitas metode bioautografi kontak dan agar overlay dalam penentuan senyawa antikapang. Report. 2008;18(12):75–79.