

## STANDARISASI DAN PEMISAHAN PIGMEN EKSTRAK ETANOL DAUN SELADA MERAH (*LACTUCA SATIVA* VAR *CRISPA* L.)

Nastiti Utami<sup>1\*</sup>, Prashinta Nita Damayanti<sup>2</sup>, Tiara Karunia Kristy<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Program Studi S1 Farmasi, Sekolah Tinggi Ilmu Kesehatan Nasional, Jl. Raya Solo - Baki, Bangorwo, Kwarasan, Grogol, Sukoharjo, Jawa Tengah 57552, Indonesia

<sup>2</sup>Fakultas Pertanian, Universitas Tidar, Magelang, Jl. Kapten Suparman No.39, Potrobangsari, Magelang Utara, Magelang, Jawa Tengah 56116, Indonesia

\*nastiti.utami@stikesnas.ac.id

### ABSTRAK

Penggunaan selada merah sebagai sumber nutrisi dan bahan baku obat tradisional memerlukan proses standarisasi. Standarisasi dilakukan dengan pengujian pada ekstrak etanol daun selada merah (EESM). Penelitian yang dilakukan yaitu pengujian parameter spesifik dan non spesifik, serta pemisahan pigmen dalam EESM. Penelitian ini bertujuan menganalisis parameter kualitas mutu EESM. Metode ekstraksi yang digunakan maserasi dengan etanol 70% selama 3 hari dan 1 hari remaserasi. EESM diuji parameter spesifik meliputi: identitas, organoleptik ekstrak, senyawa terlarut dalam pelarut air dan etanol, kandungan kimia kualitatif, dan kadar flavonoid, sedangkan parameter non spesifik meliputi: susut pengeringan, penetapan kadar air, berat jenis, kadar abu total, kadar abu tidak larut asam. Pemisahan pigmen dalam EESM menggunakan kromatografi kolom dengan fase diam alumina dan perbedaan rasio fase gerak yaitu petroleum eter:aseton (90:10); (80:20); (75:25). Hasil standarisasi yang didapatkan menyatakan bahwa EESM memiliki kadar flavonoid ( $8,41 \pm 0,368$  mgQE/g) kadar senyawa larut air ( $29,75 \pm 0,777\%$ ), senyawa larut etanol ( $14,641 \pm 0,367\%$ ), susut pengeringan ( $10,401 \pm 0,466\%$ ), kadar air ( $7,508 \pm 0,399\%$ ), kadar abu total ( $3,751 \pm 0,433\%$ ), kadar abu tidak larut asam ( $0,141 \pm 0,035\%$ ), dan berat jenis ( $1,001 \pm 0,012$  g/mL). EESM terdapat flavonoid, alkaloid, tanin, saponin, dan triterpenoid. Pemisahan berdasarkan warna dengan pelarut tertentu menghasilkan pemisahan empat warna pada pelarut eter:aseton (90:10), tujuh warna pada pelarut eter:aseton (80:20), enam warna pada pelarut eter:aseton (75:25).

Kata kunci: kromatografi; *Lactuca sativa*; selada merah; standarisasi

## STANDARDIZATION AND SEPARATION OF PIGMENTS FROM RED LEAF LETTUCE ETHANOL EXTRACT (*LACTUCA SATIVA* VAR *CRISPA* L.)

### ABSTRACT

*The use of natural materials such as red lettuce as a source of nutrition and raw materials for traditional medicine requires a standardization process. Standardization was carried out by testing the ethanol extract of red lettuce leaf (EESM). The parameters used are specific, non-specific, and qualitative phytochemical screening parameters as well as pigment separation in EESM. The extraction method used was maceration with 70% ethanol for 3 days and 1 day of remaceration. Standardization EESM was carried out by testing specific parameters including: identity, organoleptic extracts, dissolved compounds in water and ethanol solvents, qualitative chemical content, and flavonoid content, while non-specific parameters included: drying loss, determination of water content, specific gravity, total ash content, no ash content. acid soluble. Separation of pigments in EESM uses column chromatography with alumina stationary phase and different mobile phase ratios of petroleum ether:acetone (90:10); (80:20); (75:25). The purpose of this research was to obtain quality parameters of EESM. The standardization results obtained stated that the EESM has flavonoid content ( $8,41 \pm 0,368$  mgQE/g), water soluble compound content ( $29,759 \pm 0,777\%$ ), ethanol soluble compound content ( $14,641 \pm 0,367\%$ ), drying loss ( $10,401 \pm 0,466\%$ ), water content ( $7,508 \pm 0,399\%$ ), total ash content ( $3,751 \pm 0,433\%$ ), insoluble acid ash content ( $0,141 \pm 0,035\%$ ), and specific gravity ( $1,001 \pm 0,012$  g/mL). EESM contains phytochemical compounds of flavonoids, tannins alkaloids, saponins, and triterpenoids. Separation based on color with certain solvents results in the separation of four colors in the ether:acetone (90:10) solvent, seven colors in the petroleum ether:acetone (80:20) solvent, six colors in the ether:acetone (75:25) solvent.*

*Keywords: chromatography; Lactuca sativa; red lettuce extract; standardization*

## **PENDAHULUAN**

Selada memiliki fitomedis yang merupakan campuran senyawa metabolit mengandung senyawa aktif farmakologis yang menunjukkan beberapa sifat terapeutik. Selada dapat memperkuat otot dan sistem saraf. Selada membantu pengembangan kekebalan tubuh terhadap semua penyakit dan infeksi. Selada masuk dalam famili Asteraceae yang mempunyai peranan penting bagi kesehatan tubuh manusia, karena adanya senyawa fenolik, vitamin A dan C, serta karotenoid (Assefa et al., 2021). Senyawa ini mempunyai fungsi dalam bidang nutrisi dan kesehatan, yaitu dapat meningkatkan kemampuan antioksidan bagi tubuh manusia, serta menekan penyakit inflamasi dan kanker. Selada dapat diperoleh dalam tiga warna berbeda yaitu merah tua, merah, dan hijau. Selada merah banyak digunakan dalam salad atau biasa dikonsumsi mentah, namun pengembangan ekstrak selada untuk memperoleh manfaat optimum juga dilakukan karena selada merah memiliki aktivitas antioksidan yang kuat karena kandungan antosianinnya lebih tinggi dibandingkan selada hijau (Shi et al., 2022). Selain itu, beberapa peneliti menemukan bahwa hidroponik *Lactuca sativa* dapat menyembuhkan penyakit seperti kanker, penyakit Alzheimer, dan diabetes (Naseem & Ismail, 2022).

Ekstrak etanol 96% selada merah memiliki nilai IC<sub>50</sub> 126,91 ppm (Febrianto & Septiyani, 2019). Utami & Damayanti, 2023 memperoleh nilai IC<sub>50</sub> ekstrak etanol 70% daun selada merah sebesar 41,345 ppm dengan menggunakan metode ABTS. Selain potensinya sebagai antioksidan, ekstrak etanol daun selada merah juga memiliki aktivitas antibakteri (Utami & Damayanti, 2022). Berdasarkan besarnya potensi aktivitas farmakologis yang dimiliki selada merah sebagai nutrisi dan alternatif pengobatan, sehingga perlu dilakukan standarisasi ekstrak etanol daun selada merah. Standarisasi bertujuan menjaga kualitas serta mempertahankan kestabilan senyawa aktif yang terdapat dalam simplisia dan ekstrak (Indrayati, 2021). Standarisasi daun selada merah membutuhkan persyaratan yang tercantum dalam monografi umum. Hasil yang diperoleh dalam penelitian ini diharapkan dapat menjadi referensi kualitas ekstrak etanol selada merah (EESM). Penelitian ini bertujuan untuk standarisasi parameter non spesifik dan spesifik EESM yang memiliki potensi sebagai obat bahan alam, serta pemisahan pigmen dalam EESM.

## **METODE**

Alat yang digunakan meliputi timbangan digital analitik, tabung reaksi, oven, *rotary evaporator*, *waterbath*, *moisture balance*, cawan porselen, tanur, kuvet, oven, glasswool, kolom, spektrofotometer uv-vis. Bahan yang digunakan meliputi daun selada merah, etanol, reagen mayer, FeCl<sub>3</sub>, reagen dragendroff, natrium klorida, asetat anhidrat, akuades, magnesium, amonia, kloroform, besi klorida 1%, kloroform, HCl, AlCl<sub>3</sub>, asam asetat, alumina. Tanaman selada merah didapatkan dari Klaten yang ditanam secara hidroponik. Metode ekstraksi yang digunakan yaitu maserasi menggunakan etanol 70%. Selanjutnya dilakukan standarisasi parameter spesifik dan non spesifik, selain itu juga dilakukan uji pemisahan pigmen warna dengan kromatografi kolom.

### **Parameter Spesifik**

#### **Senyawa larut air atau etanol**

1gram EESM masing-masing dicampurkan dengan 20 mL air-kloroform dan etanol 95%, kemudian didiamkan selama 24 jam, kemudian disaring. Sebanyak 4 mL filtrat diuapkan hingga kering, residu dipanaskan pada suhu 105°C, kemudian ditimbang.

#### **Uji kandungan kimia ekstrak**

Pengujian untuk mengidentifikasi keberadaan senyawa metabolit sekunder alkaloid, flavonoid, saponin, tannin, dan triterpenoid. Pengujian triterpenoid menggunakan asam asetat anhidrat dan  $H_2SO_4$  apabila terbentuk cincin merah atau kecokelatan menunjukkan terkandung triterpenoid. Pengujian alkaloid dikatakan positif apabila terbentuk warna jingga-coklat. Pengujian saponin, EESM dikocok selama 10 detik apabila terbentuk busa yang stabil setinggi 1-10 cm dan tidak hilang apabila ditetesi 1 tetes HCl 2 N menandakan positif terhadap saponin. Pengujian tanin menggunakan  $FeCl_3$ , dikatakan positif apabila terbentuk warna ungu atau biru tua atau biru kehitaman. Pengujian flavonoid dilakukan dengan penambahan serbuk Mg dan HCl pekat, apabila positif jika terjadi perubahan warna kuning, jingga atau merah.

### **Analisis kadar flavonoid**

Pengukuran operating time (OT) dilakukan dengan 1 mL larutan 100 ppm kuersetin, ditambahkan  $AlCl_3$  10% sebanyak 1 mL dan sebanyak 8 mL asam asetat 5%, dibaca absorbansinya pada panjang gelombang 415 nm selama 60 menit. Pengukuran lamda maksimum dilakukan dengan prosedur yang sama dengan OT, namun inkubasi dilakukan selama OT dan diukur pada rentang panjang gelombang 400-450 nm. Pembuatan kurva baku kuersetin dengan konsentrasi 60, 80, 100, 120 dan 140 ppm diambil masing-masing 1ml, ditambahkan  $AlCl_3$  10% sebanyak 1 mL dan sebanyak 8 mL asam asetat 5%. Diinkubasi selama OT yang diperoleh dan dianalisis pada lamda maksimum yang diperoleh. Absorbansi yang didapatkan diplot pada kurva regresi linier sehingga diperoleh persamaan regresi linear. Pengukuran kadar flavonoid dalam EESM ditimbang sebanyak 150 mg dilarutkan dengan etanol hingga 10ml, kemudian perlakuan penambahan reagen dilakukan sama dengan standar kuersetin.

### **Parameter Non Spesifik**

#### **Penetapan Susut Pengerinan**

1 gram EESM dipanaskan dengan *moisture balance* pada suhu  $105^\circ C$  dan telah ditara, setelah mendapat berat tetap, persentase susut pengerinan dicatat.

#### **Penetapan Kadar Air**

1 gram EESM dimasukkan dalam labu destilasi, ditambahkan 100 ml toluen P (yang dijenuhkan dulu 24 jam) dan didestilasi sampai membentuk lapisan memisah sempurna antara air dan toluena, kemudian volume air dibaca.

#### **Berat Jenis**

Piknometer dalam kondisi bersih dan kering. EESM diencerkan 5% menggunakan air. Ekstrak air dimasukkan ke piknometer yang telah dikalibrasi, piknometer ditutup, dilap dengan tisu, dan ditimbang. Berat jenis ekstrak yang diperoleh adalah hasil pembagian kerapatan ekstrak dengan kerapatan air dalam piknometer pada suhu  $25^\circ C$ .

#### **Penetapan Kadar Abu**

Ditimbang 1 gram EESM dalam cawan porselen yang telah ditimbang. Dipijarkan hingga arang abis, kemudian dinginkan dalam desikator dan ditimbang.

#### **Penetapan Kadar Abu Tidak Larut Asam**

Abu yang diperoleh ditambahkan 25 ml HCl encer, kemudian dididihkan dengan selama 5 menit, dikumpulkan residu yang tidak larut dengan disaring dengan kertas saring, selanjutnya kertas saring dipijarkan hingga berat tetap dan ditimbang.

**Preparasi Kromatografi Kolom**

Dimasukkan glass wool ke dalam kolom hingga cairan dapat mengalir dengan baik, namun fase diam dapat tertahan dalam kolom. 20gram Alumina yang telah diaktifkan dicampurkan dengan eluen dimasukkan ke dalam kolom hingga tidak terlihat rongga atau retak pada alumina. Eluen atau fase gerak dialirkan hingga tinggal kira-kira 1 cm di atas alumina.

**Pemisahan Warna dengan Kromatografi Kolom**

Sejumlah 0,3gram EESM dicampur dengan alumina sebanyak 3 gram. Dimasukkan sampel setelah kolom siap, kemudian dielusi menggunakan eluen petroleum eter: aseton dengan tiga variasi perbandingan yaitu eluen A (90:10); eluen B (80:20); eluen C (75:25). Kran pada kolom dibuka sehingga eluen akan mengalir keluar, eluen ditambahkan ke dalam kolom secara berkala. Komponen warna yang keluar ditampung dan diidentifikasi warna yang terpisah secara visual.

**HASIL DAN PEMBAHASAN**

**Parameter spesifik**

**Pemeriksaan Identitas**

Pemeriksaan parameter EESM bertujuan untuk memberikan identitas secara objektif. Hasil pengamatan identitas terlampir pada Tabel 1.

Pemeriksaan Organolepti Analisis organoleptik EESM meliputi pengamatan terhadap bentuk, bau, warna, dan rasa (BPOM RI, 2023). Pengamatan ini bertujuan untuk memberikan informasi pengenalan awal terhadap EESM. Pemeriksaan organoleptik EESM menunjukkan hasil berupa konsistensi ekstrak kental, berwarna hijau kehitaman, rasa pahit dan memiliki bau tidak khas yang dapat dilihat pada Tabel 1.

Tabel 1.

Parameter spesifik ekstrak dengan menggunakan panca indera

Uji	Parameter	Hasil
Identitas	Nama ekstrak	Ekstrak etanol daun selada merah
	Nama latin	<i>Lactuca sativa var Crispa L.</i>
	Bagian tanaman	Daun
Organoleptik	Bentuk	Ekstrak kental
	Warna	Hijau kehitaman
	Rasa	Pahit
	Bau	Tidak khas



Gambar 1. Ekstrak etanol daun selada merah

**Uji kandungan kimia ekstrak**

Uji kualitatif kandungan fitokimia dilakukan pada simplisia daun selada merah dan EESM. Uji kualitatif fitokimia dilakukan dengan menggunakan pereaksi kimia. Hasil yang diperoleh menunjukkan simplisia dan EESM positif terhadap alkaloid, flavonoid, saponin, tanin, dan triterpenoid dapat dilihat pada Tabel 2.

Tabel 2.  
Penapisan Fitokimia

Golongan Senyawa	Simplisia	Ekstrak
Alkaloid	+	+
Flavonoid	+	+
Saponin	+	+
Tanin	+	+
Triterpenoid	+	+

### Senyawa Terlarut dalam Pelarut Tertentu dan Analisis Kadar Flavonoid

Analisis senyawa terlarut dalam pelarut air atau etanol bertujuan untuk memprediksi banyaknya kandungan senyawa aktif menurut kepolarannya. Berdasarkan hasil yang diperoleh menunjukkan bahwa senyawa yang terkandung dalam EESM lebih banyak bersifat polar dibandingkan semipolar, hal ini ditunjukkan dengan banyaknya senyawa yang larut dalam pelarut air dibandingkan pelarut etanol dapat dilihat pada Tabel 3.

Tabel 3.  
Senyawa Terlarut dalam Pelarut Tertentu dan Analisis Kadar Flavonoid

Parameter	Hasil
Kadar senyawa larut air	29,759 ± 0,777 %
Kadar senyawa larut etanol	14,641 ± 0,367%
Kadar flavanoid	8,41 ± 0,368 mgQE/g

Uji spektrofotometri berdasarkan pembentukan kompleks aluminium adalah salah satu prosedur yang paling umum diterapkan untuk penentuan kandungan total flavonoid dalam sampel makanan atau tanaman obat. Penetapan kadar flavonoid dalam EESM Menggunakan metode kurva kalibrasi dengan standar kuersetin. Kuersetin adalah senyawa flavonoid yang banyak terdapat pada tumbuhan dan menunjukkan berbagai aktivitas biologis. Kuersetin memiliki gugus ketokarbonil dalam molekulnya, dan atom oksigen pada karbon pertama bersifat basa dan dapat menghasilkan garam dengan asam kuat. Struktur molekulnya mengandung empat gugus aktif yaitu gugus dihidroksi antara cincin A, gugus o-dihidroksi B, cincin C2, ikatan rangkap C3, dan 4-karbonil. Kehadiran gugus hidroksil fenolik dan ikatan rangkap memberi kuersetin aktivitas antioksidan yang kuat. Sifat antioksidan dan anti-inflamasinya berkaitan erat dengan pencegahan dan pengobatan penyakit kardiovaskular dan kanker (Yang et al., 2020).

Analisis flavonoid dengan penambahan larutan  $AlCl_3$  menghasilkan spektrum kompleks Aluminium-kuersetin dengan adanya garam asetat menunjukkan puncak serapan yang kuat pada 425–430 nm.  $\lambda$  maks untuk kompleks ini pada 426 nm dengan adanya  $CH_3COOK$  sedangkan tanpa penambahan asetat pada 445 nm, penambahan garam asetat (dalam bentuk  $CH_3COONa$  atau  $CH_3COONH_4$ ) tidak diperlukan karena ada dan tidaknya garam asetat, nilai serapan yang sama dicatat pada panjang gelombang yang direkomendasikan untuk pengukuran kerapatan optik (Mammen & Danniell, 2012). Dalam media asam, kompleks Al-kuersetin dengan stoikiometri 1:1 pada  $\lambda$  maks 425 nm. Hal ini mendekati dengan hasil pengukuran lamda maksimum yang dianalisis yaitu pada 423 nm. Berdasarkan hasil penentuan operating time yang diperoleh pada penelitian ini yaitu 25 menit. Pengukuran absorbansi standar dan sampel menggunakan panjang gelombang dan OT yang diperoleh. Kurva kalibrasi dibuat dengan konsentrasi 40, 60, 80, 100, dan 120ppm. Persamaan regresi yang didapatkan yaitu  $y=0,0041x+0,1322$  dengan nilai regresi 0,9992. Flavonol (kuersetin, morin, kaempferol dan rutin) menunjukkan serapan maksimum pada 415–425 nm, rentang panjang gelombang yang digunakan. Flavonol membentuk kompleks dengan gugus hidroksil C-3 dan C-5 serta dengan gugus dihidroksil pada cincin B. Rutin dan kuersetin menunjukkan

absorbansi maksimum pada panjang gelombang yang sama dengan bentuk aglikonnya (Pełak & Pyrzynska, 2014).

#### Parameter Non Spesifik

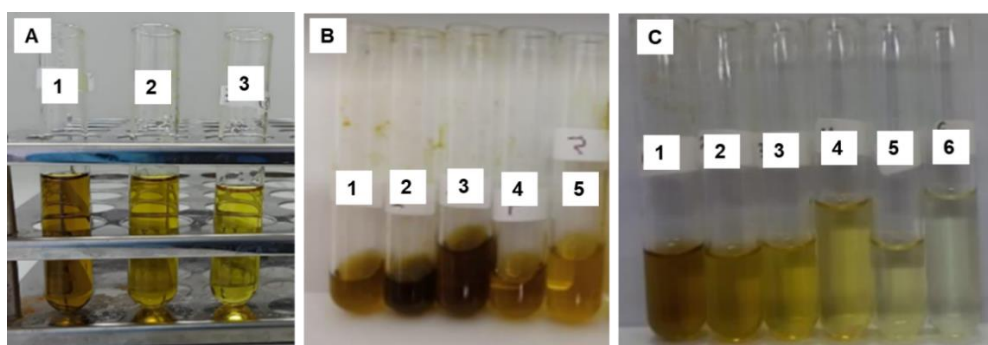
Pengujian parameter non spesifik ditunjukkan pada Tabel 3. Hasil susut pengeringan untuk memberikan batasan maksimum senyawa yang hilang setelah proses pengeringan. Pada penelitian ini diperoleh hasil susut pengeringan EESM sebesar  $9,401 \pm 0,466\%$ . Penentuan kadar air bertujuan untuk menetapkan residu air setelah pengeringan, pada pengujian ini dilakukan dengan metode gravimetri. Hasil yang diperoleh yakni  $7,508 \pm 0,399\%$  hal ini memenuhi syarat mutu dimana kadar air dalam ekstrak tidak boleh lebih dari 10% (Depkes, 2022). Kadar air yang tinggi ( $>10\%$ ) dapat menyebabkan tumbuhnya mikroba pada ekstrak dan berakibat pada penurunan stabilitas ekstrak. Pengujian berat jenis bertujuan untuk menggambarkan kemurnian suatu zat yang ditentukan berat jenisnya. Berat jenis EESM sebesar  $1,001 \pm 0,012$  g/mL. Analisis kadar abu total bertujuan untuk mengetahui banyaknya logam yang terdapat dalam EESM. Kadar abu dari suatu ekstrak menunjukkan kadar kemurnian dan tingkat kebersihan dari suatu proses pengolahan produk. Kontaminasi logam berat dapat terjadi selama budidaya, proses penyimpanan, dan atau pengolahannya. Penyerapan dan bioakumulasi zat-zat tersebut berdampak negatif terhadap kesehatan konsumen (Kowalska, 2021). Kadar abu total yang diperoleh dalam ekstrak etanol daun selada merah sebesar  $3,751 \pm 0,433\%$ . Kadar abu tidak larut asam menggambarkan adanya kandungan senyawa silika (Liu, 2022). Hasil kadar abu tidak larut asam sebesar  $0,141 \pm 0,035\%$ .

Tabel 3.  
Parameter non spesifik ekstrak etanol daun selada merah

Parameter	Hasil
Susut pengeringan	$9,401 \pm 0,466\%$
Kadar air	$7,508 \pm 0,399\%$
Kadar abu total	$3,751 \pm 0,433\%$
Kadar abu tidak larut asam	$0,141 \pm 0,035\%$
Berat jenis	$1,001 \pm 0,012$ g/mL

#### Pemisahan Warna dengan Kromatografi Kolom

Pigmen alami adalah kelompok molekul yang tersebar luas di alam dan memiliki peran penting dalam kehidupan sehari-hari. Selain warnanya, pigmen alami saat ini diketahui memiliki sifat biologis relevan yang terkait dengan manfaat kesehatan, seperti aktivitas antitumor, antipenuaan, dan antiinflamasi (Young & Lowe, 2018). Kromatografi kolom dapat digunakan dalam pemisahan pigmen daun (Ciaccio & Hassan, 2020). Metode ini memiliki kelebihan yaitu dapat dilanjutkan untuk tahap analisis berikutnya karena hasil pemisahan yang memiliki jumlah banyak. Prinsip pemisahan dengan kromatografi kolom yakni adsorpsi dan gravitasi. Adanya perbedaan laju migrasi komponen-komponen campuran zat dalam fase gerak. Pemisahan komponen campuran dapat terjadi berdasarkan perbedaannya dalam fasa diam dan fasa gerak. Fase diam yang digunakan dalam penelitian ini memiliki sifat polar karena kaya akan gugus hidroksida. Hasil pemisahan warna kromatografi kolom dilampirkan pada Gambar 2.



Gambar 2. Pemisahan Kromatografi Kolom: a. Eter:aseton (90:10) b. Eter : aseton (80:20) c. Eter :aseton (75:25)

Pemisahan pigmen lipofilik dan hidrofilik dari EESM pada kolom kromatografi menjelaskan polaritas molekul dengan adanya afinitas pigmen terhadap fase gerak dan fase diam. Warna coklat tua, hijau, dan kuning dipisahkan pada kolom dengan elusi beberapa kombinasi fase gerak. Ikatan hidrogen yang kuat dapat terbentuk antara alumina dan senyawa polar yang kaya akan gugus hidroksil dalam EESM. Klorofil merupakan molekul besar dengan bagian siklik yang terikat pada ion logam (magnesium), yang memberikan warna hijau (Sousa, 2022). Klorofil hijau bergerak lebih lambat daripada karotenoid. Pigmen tumbuhan yang menyebabkan warna kuning, merah cerah, dan oranye adalah karotenoid (Aadil et al., 2019). Karotenoid kuning bergerak lebih cepat daripada klorofil. Kelarutan karotenoid yang lebih tinggi dalam eter disebabkan oleh dominasi rantai hidrokarbon dalam strukturnya (Miękus et al., 2019). Kelas karotenoid memiliki tulang punggung C40 yang sama dengan sistem ikatan rangkap terkonjugasi, yang diklasifikasikan sebagai karoten (hanya mengandung karbon dan hidrogen) atau sebagai xantofil (mengandung oksigen tambahan) (Sousa, 2022). Karotenoid dan klorofil merupakan pigmen lipofilik, namun keduanya memiliki laju pergerakan yang berbeda dengan eluen non polar seperti petroleum eter. Antosianin adalah glikosida fenolik yang larut dalam air atau asil-glikosida dari antosianidin memiliki warna merah jambu, merah, biru dan ungu pada bunga, buah-buahan dan sayuran, warna yang terkait sesuai dengan pola substitusi (posisi dan gugus fungsi) pada cincin aromatic (Sousa, 2022).

Perbedaan polaritas diperoleh dengan membuat campuran eluen dengan kombinasi rasio eluen yang berbeda. Pada eluen dengan campuran petroleum eter dan aseton 90:10, diperoleh tiga warna pemisahan yaitu coklat, kuning kehijauan (klorofil b), dan kuning (xantofil). Pada eluen dengan campuran petroleum eter dan aseton 80:20 diperoleh lima warna pemisahan yaitu kuning coklat muda, coklat tua, merah kecoklatan, kuning kecoklatan, kuning (xantofil). Pada eluen dengan campuran petroleum eter dan aseton 75:25 diperoleh enam warna yaitu coklat, coklat muda, kuning tua, kuning (xantofil), kuning kehijauan (klorofil b), dan hijau-kebiruan (klorofil a) (Brera et al., 2023). Berdasarkan hasil pemisahan dari tiga kombinasi eluen, maka diperoleh hasil pemisahan yang paling banyak yaitu pada kombinasi yang lebih polar dari kedua jenis yang lain yaitu eluen dengan campuran petroleum eter dan aseton 75:25. Pemisahan dengan kromatografi kolom menghasilkan beberapa warna pada masing-masing pelarut. Hasil ini dapat menjadi rujukan pemilihan fase gerak untuk kromatografi lapis tipis atau instrumen kromatografi cair untuk menghasilkan pemisahan yang baik karena setiap warna dari hasil pemisahan dapat mewakili variasi jumlah dan atau jenis senyawa fitokimia di dalamnya.

## SIMPULAN

Hasil standarisasi yang didapatkan menyatakan bahwa EESM memiliki kadar flavonoid ( $8,41 \pm 0,368$  mgQE/g) kadar senyawa larut air ( $29,75 \pm 0,777\%$ ), senyawa larut etanol

(14,641±0,367%), susut pengeringan (10,401±0,466%), kadar air (7,508±0,399%), kadar abu total (3,751 ±0,433%), kadar abu tidak larut asam (0,141 ±0,035%), dan berat jenis (1,001±0,012 g/mL). EESM terdapat flavonoid, alkaloid, tanin, saponin, dan triterpenoid. Pemisahan berdasarkan warna dengan pelarut tertentu menghasilkan pemisahan empat warna pada pelarut eter:aseton (90:10), tujuh warna pada pelarut eter:aseton (80:20), enam warna pada pelarut eter:aseton (75:25).

## DAFTAR PUSTAKA

- Aadil, R. M., Roobab, U., Sahar, A., Rahman, U. U., & Khalil, A. A. (2019). Functionality of bioactive nutrients in beverages. In Elsevier eBooks (pp. 237–276). <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-816842-4.00007-1>
- Assefa, A. D., Hur, O. S., Hahn, B. S., Kim, B., Ro, N. Y., & Rhee, J. H. (2021). Nutritional Metabolites of Red Pigmented Lettuce (*Lactuca sativa*) Germplasm and Correlations with Selected Phenotypic Characters. *Foods (Basel, Switzerland)*, 10(10), 2504. <https://doi.org/10.3390/foods10102504>
- Badan Pengawas Obat dan Makanan Republik Indonesia (BPOM RI). (2023). PerBPOM Nomor 29 Tahun 2023 tentang Persyaratan Keamanan Dan Mutu Obat Bahan Alam. Jakarta: Kepala Pengawas Obat dan Makanan Republik Indonesia
- Brera G., Mukhtar, Ahmed, Manzoor, Modassar, Ranjha. (2023). Natural pigments: Anthocyanins, carotenoids, chlorophylls, and betalains as colorants in food products, *Food Bioscience*, Volume 52, 102403.
- Ciaccio, J. A., & Hassan, K. (2020). Modified method for extraction of photosynthetic plant pigments for microcolumn chromatography. *Journal of Chemical Education*, 97(8), 2362–2365. <https://doi.org/10.1021/acs.jchemed.0c00503>
- Departemen Kesehatan Republik Indonesia. (2022). *Farmakope Herbal Indonesia*. Suplemen I. Edisi II. Jakarta: Departemen Kesehatan Republik Indonesia.
- Febrianto, Y. F., & Septiyani, K. (2019). Uji Aktivitas Antioksidan Ekstrak Etanol Daun Selada Merah (*Lactuca sativa* var. *acephala*) dengan Menggunakan 1, 1-Difenyl-2-Picrylhydrazyl (DPPH). *Jurnal Farmasi & Sains Indonesia*, 2(2), 36-41.
- Harefa, D. (2020). Pemanfaatan Hasil Tanaman Sebagai Tanaman Obat Keluarga (TOGA). *Madani : Indonesian Journal of Civil Society*, 2(2), 28–36. <https://doi.org/10.35970/madani.v2i2.233>
- Indrayati, L. L. (2021). Spesifik Dan Non Spesifik Ekstrak Etanol Labu Kuning (*Cucurbita Maxima*) Specific and Non Specific Standardization of Etanol Extract of Pumpkin (*Cucurbita maxima*). *Indonesian Journal of Pharmacy and Natural Product*, 4(1), 37–44. <http://jurnal.unw.ac.id/index.php/ijpnp>
- Kowalska G. (2021). The Safety Assessment of Toxic Metals in Commonly Used Herbs, Spices, Tea, and Coffee in Poland. *International journal of environmental research and public health*, 18(11), 5779. <https://doi.org/10.3390/ijerph18115779>
- Liu, K. (2022). New and improved methods for measuring acid insoluble ash. *Animal Feed Science and Technology*, 288, 115282. <https://doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2022.115282>
- Mammen, D., & Daniel, M. (2012). A critical evaluation on the reliability of two aluminum chloride chelation methods for quantification of flavonoids. *Food chemistry*, 135(3), 1365-1368.



- Miękus, N., Iqbal, A., Marszałek, K., Puchalski, C., & Świergiel, A. (2019). Green chemistry extractions of carotenoids from *Daucus carota* L.—Supercritical carbon dioxide and enzyme-assisted methods. *Molecules*, 24(23), 4339.
- Naseem, S., & Ismail, H. (2022). In vitro and in vivo evaluations of antioxidative, anti-Alzheimer, antidiabetic and anticancer potentials of hydroponically and soil grown *Lactuca sativa*. *BMC Complementary Medicine and Therapies*, 22(1), 30.
- Pękal, A., Pyrzynska, K. (2014). Evaluation of Aluminium Complexation Reaction for Flavonoid Content Assay. *Food Anal. Methods* 7, 1776–1782. <https://doi.org/10.1007/s12161-014-9814-x>
- Shi, M., Gu, J., Wu, H., Rauf, A., Emran, T. B., Khan, Z., Mitra, S., Aljohani, A. S. M., Alhumaydhi, F. A., Al-Awthan, Y. S., Bahattab, O., Thiruvengadam, M., & Suleria, H. A. R. (2022). Phytochemicals, Nutrition, Metabolism, Bioavailability, and Health Benefits in Lettuce-A Comprehensive Review. *Antioxidants (Basel, Switzerland)*, 11(6), 1158. <https://doi.org/10.3390/antiox11061158>
- Sousa C. (2022). Anthocyanins, Carotenoids and Chlorophylls in Edible Plant Leaves Unveiled by Tandem Mass Spectrometry. *Foods (Basel, Switzerland)*, 11(13), 1924. <https://doi.org/10.3390/foods11131924>
- Utami, N., & Damayanti, P. N. (2022). Aktivitas Antibakteri Ekstrak Etanol Daun Selada Merah Dan Daun Selada Hijau (*Lactuca sativa* L.) Terhadap Bakteri *Staphylococcus aureus* dan *Escherichia coli*. *Medical Sains : Jurnal Ilmiah Kefarmasian*, 7(2), 83–90. <https://doi.org/10.37874/ms.v7i2.335>
- Utami, N., & Damayanti, P. N. (2023). Phytochemical Analysis, Antioxidant Activity and Ftir Spectroscopic Analysis of Red Leaf Lettuce and Green Leaf Lettuce (*Lactuca Sativa* L.). *Indian Drugs*, 60(5), 50–56. <https://doi.org/10.53879/id.60.05.13378>
- Yang, D., Wang, T., Long, M., & Li, P. (2020). Quercetin: Its Main Pharmacological Activity and Potential Application in Clinical Medicine. *Oxidative medicine and cellular longevity*, 2020, 8825387. <https://doi.org/10.1155/2020/8825387>
- Young, A. J., & Lowe, G. L. (2018). Carotenoids—antioxidant properties. *Antioxidants*, 7(2), 28.

