

SKRIPSI

**VALIDASI METODE *GAS CHROMATOGRAPHY - FLAME
IONIZATION DETECTOR* UNTUK ANALISIS KANDUNGAN
MITRAGININ DARI DAUN KRATOM (*Mitragyna Speciosa*)
VARIETAS MERAH, PUTIH, DAN HIJAU**



ELOK SITI NURJANNAH

NIM. 20221666036

**PROGRAM STUDI S1 FARMASI
FAKULTAS ILMU KESEHATAN
UNIVERSITAS MUHAMMADIYAH SURABAYA**

2025

SKRIPSI
VALIDASI METODE *GAS CHROMATOGRAPHY - FLAME*
***IONIZATION DETECTOR* UNTUK ANALISIS KANDUNGAN**
MITRAGININ DARI DAUN KRATOM (*Mitragyna Speciosa*)
VARIETAS MERAH, PUTIH, DAN HIJAU

Diajukan untuk memperoleh gelar Sarjana Farmasi (S.Farm)
Program Studi S1 Farmasi Fakultas Ilmu Kesehatan
Universitas Muhammadiyah Surabaya



ELOK SITI NURJANNAH
NIM. 20221666036

PROGRAM STUDI S1 FARMASI
FAKULTAS ILMU KESEHATAN
UNIVERSITAS MUHAMMADIYAH SURABAYA

2025

SURAT PERNYATAAN BEBAS PLAGIARISME

Yang bertandatangan di bawah ini:

Nama : Elok Siti Nurjannah

NIM : 20221666036

adalah mahasiswa Fakultas Ilmu Kesehatan, Universitas Muhammadiyah Surabaya, menyatakan dengan sesungguhnya bahwa Naskah Tugas Akhir/Skripsi yang saya tulis dengan judul:

Validasi Metode *Gas Chromatography - Flame Ionization Detector* untuk Analisis Kandungan Mitraginin dari Daun Kratom (*Mitragyna Speciosa*) Varietas Merah, Putih, Dan Hijau

adalah benar-benar merupakan hasil karya sendiri. Apabila di kemudian hari diketahui bahwa Naskah Skripsi ini merupakan hasil plagiasi, maka saya bersedia menerima sanksi berupa pembatalan kelulusan dan atau pencabutan gelar yang saya peroleh.

Demikian surat pernyataan ini saya buat untuk dapat dipergunakan sebagaimana mestinya.

Surabaya, 24 Desember 2025

Yang membuat pernyataan,



Elok Siti Nurjannah

NIM. 20221666036

SURAT PERSETUJUAN PUBLIKASI

Yang bertandatangan di bawah ini:

Nama : Elok Siti Nurjannah

NIM : 20221666036

menyatakan bahwa demi kepentingan perkembangan ilmu pengetahuan, saya menyetujui abstrak Skripsi yang saya tulis dengan judul :

Validasi Metode *Gas Chromatography - Flame Ionization Detector* untuk Analisis Kandungan Mitraginin dari Daun Kratom (*Mitragyna Speciosa*) Varietas Merah, Putih, Dan Hijau

Untuk dipublikasi atau ditampilkan di internet atau media lain yaitu Digital Library Perpustakaan Universitas Muhammadiyah Surabaya untuk Kepentingan Akademik, sebatas sesuai dengan Undang-Undang Hak Cipta.

Demikian surat pernyataan ini saya buat untuk dapat dipergunakan sebagaimana mestinya.

Surabaya, 24 Desember 2025
Yang membuat pernyataan,



Elok Siti Nurjannah
NIM. 20221666036

LEMBAR PERSETUJUAN

Skripsi ini telah diperiksa dan disetujui isi serta susunannya, sehingga dapat diajukan dalam ujian Skripsi pada Program Studi S1 Farmasi Fakultas Ilmu Kesehatan Universitas Muhammadiyah Surabaya

Surabaya, 24 Desember 2025

Menyetujui

Pembimbing I

Pembimbing II



apt. Etik Wahyuningsih, S.Farm.,M.Farm.
NIDN. 071118007



Dr. apt. Isnaeni, M.S.
NIDN. 8983050022

Mengetahui

Ketua Program Studi S1 Farmasi



Dr. apt. Isnaeni, M.S.
NIDN. 8983050022

LEMBAR PENGESAHAN

Skripsi ini telah dipertahankan di depan tim penguji ujian sidang Skripsi pada

Program Studi S1 Farmasi Fakultas Ilmu Kesehatan


Universitas Muhammadiyah Surabaya


Pada tanggal 24 Desember 2025

Tim Penguji

Tanda Tangan

Ketua Penguji : apt. Etik Wahyuningsih, S.Farm.,M.Farm (..........)


Penguji 1 : Prof. Dr. apt. Djoko Agus Purwanto, M.Si. (..........)

Penguji 2 : Dr. apt. Isnaeni, MS (..........)

Mengesahkan

Dekan Fakultas Ilmu Kesehatan

Universitas Muhammadiyah Surabaya


Dr. Dede Nasrullah, S.Kep., Ns., M.Kep

NIP. 012.05.1.1987.14.113

KATA PENGANTAR

Alhamdulillah segala puji bagi Allah SWT yang telah melimpahkan rahmat serta hidayah-Nya, sehingga penyusunan skripsi ini dapat terselesaikan. Skripsi ini disusun untuk memenuhi salah satu syarat dalam menempuh ujian akhir Program Studi S1 Farmasi Fakultas Ilmu Kesehatan di Universitas Muhammadiyah Surabaya, tahun 2025 dengan judul penelitian “Validasi Metode *Gas Chromatography-Flame Ionization Detector* untuk Analisis Kandungan Mitraginin dari Daun Kratom (*Mitragyna speciosa*) Varietas Merah, Putih, dan Hijau”

Dalam proses penyusunan skripsi ini penulis banyak mendapatkan bimbingan dan motivasi dari berbagai pihak, untuk itu perkenankan penulis mengucapkan terima kasih kepada :

1. apt. Etik Wahyuningsih, S.Farm., M.Farm selaku dosen pembimbing utama yang dengan tulus ikhlas dan penuh kesabaran membimbing, memberikan pengarahan, dorongan, inspirasi, dan motivasi kepada penulis sehingga skripsi ini dapat terselesaikan.
2. Dr. apt. Isnaeni, M.S selaku dosen pembimbing serta yang dengan tulus ikhlas dan penuh kesabaran membimbing, memberikan pengarahan, dorongan, inspirasi, dan motivasi kepada penulis sehingga skripsi ini dapat terselesaikan
3. Dr. Mundakir, S.Kep., Ns., M.Kep., selaku Rektor Universitas Muhammadiyah Surabaya beserta seluruh jajarannya.
4. Dr. Dede Nasrullah, S.Kep., Ns., M.Kep., selaku Dekan Fakultas Ilmu Kesehatan Universitas Muhammadiyah Surabaya beserta seluruh jajarannya.
5. Dr. apt. Isnaeni, M.S selaku Ketua Program Studi S1 Farmasi Fakultas Ilmu Kesehatan Universitas Muhammadiyah Surabaya beserta seluruh jajarannya.
6. Prof. Dr. Apt. Djoko Agus Purwanto, M.Si., selaku dosen penguji yang telah bersedia menguji dan memberikan arahan serta masukan yang bermanfaat untuk menyempurnakan penulisan skripsi ini.
7. apt. Karima Samlan, S.Farm., M.Farm.Klin., selaku dosen wali yang dengan penuh perhatian telah mendampingi, membimbing, dan memberikan motivasi kepada penulis selama masa perkuliahan.

8. Seluruh dosen Program Studi S1 Farmasi Fakultas Ilmu Kesehatan Universitas Muhammadiyah Surabaya yang telah memberikan bekal ilmu pengetahuan dan membimbing penulis dengan penuh kesabaran selama menjalani pendidikan.
9. Panutan hidup sekaligus surga dunia penulis, Ibunda Sitti Maryam. Terimakasih atas cinta yang tak bertepi dan pengorbanan yang tak terhingga. Meskipun beliau tak sempat merasakan bangku perkuliahan, namun beliau adalah guru terbaik yang mengajarkan makna kehidupan yang sesungguhnya. Beliau adalah teman cerita terbaik yang selalu mendengarkan keluh kesah dengan penuh kasih sayang, memberikan pelukan hangat di saat lelah, dan menjadi tempat pulang paling nyaman. Beliau telah memberikan segalanya hingga penulis mampu menyelesaikan studi dan meraih gelar sarjana ini. Penulis percaya doa-doa beliaulah yang selalu menyelamatkan dan menuntun penulis melewati masa-masa sulit. Tak lupa kepada kedua kakak tercinta Muhammad Arif Rahmatullah dan Moch. Shofarul Khoir yang selalu menjadi pelita semangat dalam setiap langkah, serta seluruh keluarga besar yang senantiasa memberikan doa dan dukungan.
10. Teruntuk cinta pertamaku, Almarhum Moh. Chotibul Umam, S.Sos., M.Si. Beliau memang tidak sempat menemani penulis dalam perjalanan menyusun skripsi, namun selama hidupnya telah menjadi sosok panutan, sumber semangat, kasih sayang yang tidak terputus, inspirasi yang tak tergantikan. Doa-doa beliau, didikan dan nilai-nilai kehidupan yang beliau tanamkan akan selalu hidup dalam diri penulis. Semoga Allah SWT menempatkan almarhum di tempat terbaik di sisi-Nya. Aamiin ya Rabbal'Alamiin.
11. Bapak Abdul Maat, S.E, ayah angkat yang telah Allah hadirkan dalam hidup penulis, atas segala kasih sayang yang tiada henti, doa yang selalu mengiringi setiap langkah penulis, motivasi yang tak pernah padam, nasehat yang selalu membimbing, perhatian yang tulus, dukungan materi yang tidak pernah disesalkan, dan pengorbanan luar biasa yang telah diberikan dengan sepenuh hati.
12. Teman-teman seperjuangan Program Studi S1 Farmasi angkatan 2022, terkhusus sahabat-sahabat terbaik yang telah menjadi keluarga kedua selama masa perkuliahan. Terimakasih untuk setiap tawa, tangis, keluh kesah,

begadang bersama, saling menguatkan di saat lelah, dan menjadi rumah yang nyaman di perantauan. Kalian adalah hadiah terindah yang penulis dapatkan selama menempuh pendidikan ini. Semoga persahabatan kita tetap abadi dan kita semua selalu dalam lindungan Allah SWT.

13. *Last but not least*, Terimakasih untuk diri sendiri, Elok Siti Nurjannah. Terimakasih karena selalu mau belajar dan berusaha memberikan yang terbaik di setiap langkah, serta tetap terbuka untuk hal-hal baru yang sebelumnya mungkin terasa asing dan tidak mudah. Kini, semua proses itu terbayar ketika tugas akhir ini berhasil diselesaikan dengan baik. Ini bukan hanya tentang pencapaian akademik, tapi juga tentang bagaimana bertumbuh menjadi pribadi yang lebih kuat dan lebih dewasa. Pencapaian ini mungkin ditulis hari ini oleh diri penulis yang sekarang, namun kelak akan dibaca dengan rasa bangga oleh diri penulis di masa depan sebagai pengingat bahwa segala perjuangan ini layak diperjuangkan, dan telah melakukannya dengan baik.

"Success is not final, failure is not fatal: It is the courage to continue that counts." (Winston Churchill)

Semoga semua amal kebaikan yang telah diberikan diterima di sisi Allah dan mendapat imbalan pahala dari Allah SWT. Penulis menyadari bahwa masih terdapat kekurangan dalam penulisan skripsi ini, Oleh karena itu, kritik dan saran dari pembaca tetap diharapkan demi perbaikan penulisan di masa yang akan datang. Akhir kata, penulis berharap semoga Allah SWT berkenan membalas segala kebaikan semua pihak yang telah membantu. Semoga skripsi ini membawa manfaat bagi pengembangan ilmu pengetahuan khususnya di bidang farmasi.

Surabaya, 11 Desember 2025
Penulis

Elok Siti Nurjannah
NIM. 20221666036

RINGKASAN

Validasi Metode *Gas Chromatography-Flame Ionization Detector* untuk Analisis Kandungan Mitraginin dari Daun Kratom (*Mitragyna speciosa*) Varietas Merah, Putih, dan Hijau

Elok Siti Nurjannah

Kratom (*Mitragyna speciosa* Korth.) merupakan tanaman tropis dari familia Rubiaceae yang banyak dijumpai di Asia Tenggara, termasuk Indonesia. Di Indonesia, kratom banyak ditemukan di Kalimantan Barat dan secara tradisional digunakan masyarakat setempat sebagai obat herbal untuk mengatasi berbagai keluhan kesehatan seperti pereda nyeri, obat demam, dan pengobatan diare. Namun, saat ini kratom sering disalahgunakan dan dijual bebas dalam bentuk serbuk atau ekstrak, bahkan dipasarkan melalui platform online, sehingga menunjukkan pentingnya pengawasan dan regulasi terhadap peredaran kratom. Daun kratom mengandung lebih dari 54 jenis alkaloid, dengan mitraginin sebagai alkaloid mayor yang mencapai 66% dari total alkaloid. Mitraginin memiliki berat molekul sekitar 398,5 g/mol dan termasuk dalam kelompok indole alkaloid dengan aktivitas farmakologis kompleks, termasuk sebagai agonis parsial reseptor μ -opioid, serta menunjukkan efek analgesik, antidepresan, stimulan pada dosis rendah, sedatif dan euforik pada dosis tinggi.

Berdasarkan warna tulang daun, kratom diklasifikasikan menjadi tiga varietas utama yaitu merah, hijau, dan putih. Perbedaan warna tulang daun ini diduga berkaitan dengan kandungan alkaloid, terutama mitraginin. Badan Pengawas Obat dan Makanan (BPOM) Indonesia telah menetapkan kebijakan bahwa kratom tidak diperbolehkan sebagai bahan dalam obat tradisional dan suplemen kesehatan. Sejalan dengan itu, Badan Narkotika Nasional (BNN) sejak tahun 2019 telah mengkampanyekan agar kratom dimasukkan ke dalam kategori narkotika golongan I karena mengandung senyawa berbahaya bagi kesehatan. Oleh karena itu, pengembangan metode analisis yang akurat sangat diperlukan untuk mendukung fungsi pengawasan dan forensik. Meskipun berbagai metode telah dikembangkan menggunakan HPLC, UPLC-MS, GC-MS, dan LC-MS/MS, metode *Gas Chromatography* (GC) dengan detektor *Flame Ionization Detector* (FID) tetap

dipilih karena beberapa keunggulan strategis, antara lain instrumen lebih umum tersedia di laboratorium Indonesia, memiliki sensitivitas dan selektivitas tinggi, biaya operasional lebih rendah, serta *dynamic range* yang sangat luas.

Rumusan masalah penelitian ini adalah apakah metode analisis GC-FID memenuhi parameter validasi untuk penetapan kadar mitraginin dari fraksinasi cair-cair asam-basa daun kratom, berapa kadar mitraginin dari fraksinasi cair-cair asam-basa daun kratom varietas merah, hijau, dan putih, serta varietas manakah yang menghasilkan kadar mitraginin tertinggi. Penelitian ini bertujuan mengembangkan dan memvalidasi metode GC-FID untuk penetapan kadar mitraginin pada tiga varietas daun kratom, dalam rangka pengembangan metode analisis yang tervalidasi dan terstandardisasi berbasis tanaman obat Indonesia yang valid dan aplikatif untuk kepentingan pengawasan, forensik, serta mendukung kemandirian bahan baku lokal.

Penelitian ini merupakan penelitian kuantitatif eksperimental laboratorium melalui uji validasi metode analisis GC-FID dan penetapan kadar mitraginin. Sampel penelitian adalah daun kering *Mitragyna speciosa* varietas merah, hijau, dan putih yang berasal dari Kalimantan Barat dan telah dideterminasi di Herbarium Bogoriense, LIPI. Simplisia daun kratom distandardisasi sesuai Farmakope Herbal Indonesia Edisi II tahun 2017, kemudian diekstraksi dengan metode maserasi menggunakan pelarut etil asetat dengan perbandingan 1:10. Sebanyak 100 gram serbuk daun kratom dimaserasi dengan etil asetat 1000 mL secara bertahap, diaduk menggunakan magnetic stirrer, kemudian didiamkan selama 24 jam dengan pengulangan 3 kali untuk memastikan ekstraksi optimal.

Purifikasi senyawa aktif dilakukan menggunakan metode fraksinasi cair-cair asam-basa. Ekstrak kental dilarutkan dalam asam asetat 10%, kemudian ditambahkan NH_4OH bertahap hingga pH 9-10 untuk membebaskan alkaloid dari bentuk garamnya. Endapan alkaloid yang terbentuk kemudian diekstraksi dengan kloroform dalam corong pisah, dan fase kloroform yang mengandung alkaloid mitraginin diuapkan hingga diperoleh residu alkaloid kering. Analisis GC-FID dilakukan dengan kondisi optimum menggunakan kolom HP-5 ($30\text{ m} \times 320\text{ }\mu\text{m} \times 0,25\text{ }\mu\text{m}$), suhu injektor 280°C , program temperatur kolom $200\text{-}285^\circ\text{C}$, suhu detektor 280°C , volume injeksi $1\text{ }\mu\text{L}$, laju alir gas pembawa helium $1,0\text{ mL/menit}$,

dan rasio split 1:10. Validasi metode analisis dilakukan sesuai pedoman ICH Q2(R2) dan AOAC, meliputi spesifisitas menggunakan TLC-densitometri sekaligus menghitung nilai resolusi, selektivitas dievaluasi dengan melihat keterpisahan antara mitraginin dengan matriks dan internal standard, linieritas pada rentang konsentrasi 5-100 mg/L, presisi dengan 6 kali replikasi, dan akurasi menggunakan metode *spike-recovery* pada tiga tingkat konsentrasi (80%, 100%, dan 120%). Penetapan kadar mitraginin dilakukan dengan menginjeksikan sampel fraksi alkaloid dari ketiga varietas kratom ke sistem GC-FID, kemudian kadar dihitung menggunakan persamaan kurva kalibrasi yang telah divalidasi. Analisis data statistik menggunakan One-Way ANOVA untuk mengevaluasi perbedaan kadar mitraginin antar varietas, dilanjutkan dengan uji Post Hoc LSD.

Hasil standardisasi simplisia menunjukkan ketiga varietas memenuhi persyaratan Farmakope Herbal Indonesia Edisi II tahun 2017. Varietas hijau menunjukkan kadar sari larut air tertinggi (21,61%) dan kadar sari larut etanol tertinggi (15,15%), mengindikasikan kandungan metabolit sekunder termasuk alkaloid mitraginin yang potensial lebih tinggi. Ekstraksi dengan maserasi menghasilkan rendemen ekstrak pada varietas hijau 5,98%, varietas putih 5,86%, dan varietas merah 4,45%. Hasil fraksinasi cair-cair asam-basa menghasilkan rendemen pada varietas merah $1,00 \pm 0,56\%$, varietas hijau $0,86 \pm 0,188\%$, dan varietas putih $0,73 \pm 0,09\%$. Skrining fitokimia menggunakan pereaksi Mayer, Wagner, dan Dragendorff menunjukkan hasil positif alkaloid pada ketiga varietas, mengonfirmasi keberadaan alkaloid indol terutama mitraginin.

Analisis TLC menunjukkan nilai Rf fraksi alkaloid kratom hijau 0,66-0,71, kratom merah 0,62-0,66, dan kratom putih 0,65-0,66, yang sebanding dengan standar mitraginin 0,67. Selanjutnya, analisis TLC-densitometri pada panjang gelombang 254 nm menunjukkan kesamaan nilai Rf dan profil spektrum antara fraksi alkaloid dengan standar mitraginin murni, mengindikasikan spesifisitas metode. Nilai resolusi (Rs) yang diperoleh sebesar 1,38 untuk sampel fraksinasi dan 1,08 untuk standar mitraginin, keduanya memenuhi kriteria $R_s \geq 1,0$. Validasi metode GC-FID menunjukkan Uji selektivitas pada kromatogram GC-FID menunjukkan keterpisahan puncak mitraginin terhadap matriks dan internal standard (IS). linieritas metode sangat baik dengan persamaan regresi $y = 0,0152x$

+ 0,1058, koefisien korelasi $r = 0,9993$, dan koefisien determinasi $R^2 = 0,9987$ pada rentang konsentrasi 5-100 mg/L. Presisi metode ditunjukkan dengan nilai %RSD 0,7996%, memenuhi kriteria $\leq 2,0\%$. Akurasi metode diuji menggunakan *spike-recovery* dengan persen recovery 96,29% pada konsentrasi 80%, 100,44% pada konsentrasi 100%, dan 101,84% pada konsentrasi 120%, seluruhnya berada dalam rentang akseptabel 95-105%. *System Suitability Test* menunjukkan %RSD 1,6421%, memenuhi persyaratan $\leq 2,0\%$.

Penetapan kadar mitraginin menunjukkan variasi signifikan antar varietas. Metode fraksinasi cair-cair asam-basa menghasilkan kadar mitraginin pada kratom hijau sebesar $1,1321 \pm 0,0194$ mg/g, kratom merah $0,6409 \pm 0,0377$ mg/g, dan kratom putih $0,1510 \pm 0,0031$ mg/g. Metode fraksinasi cair-cair asam-basa terbukti 31-71 kali lebih efektif dibandingkan metode ekstraksi langsung dengan pelarut etil asetat. Analisis statistik One-Way ANOVA menunjukkan perbedaan kadar mitraginin yang sangat signifikan antar ketiga varietas kratom dengan nilai $F = 796,136$ dan signifikansi $p < 0,001$. Uji Post Hoc LSD mengonfirmasi bahwa semua pasangan varietas berbeda secara signifikan ($p < 0,001$), dengan urutan kadar mitraginin dari tertinggi ke terendah adalah hijau, merah, kemudian putih.

Metode GC-FID yang dikembangkan telah memenuhi seluruh parameter validasi metode analisis sesuai pedoman ICH Q2(R2), AOAC, dan USP, meliputi spesifisitas, selektivitas, linieritas, range, akurasi, dan presisi. Kadar mitraginin dalam simplisia daun kratom hasil fraksinasi cair-cair asam-basa bervariasi signifikan antar varietas, dengan varietas hijau menghasilkan kadar tertinggi, diikuti varietas merah dan putih. Temuan variasi kadar mitraginin ini memiliki implikasi penting mengingat BPOM melarang kratom sebagai bahan obat tradisional dan suplemen Kesehatan (SE.HK.04.4.421.09.16.1740/2016), serta BNN menyatakan kratom berbahaya dengan efek sedatif hingga narkotika pada dosis tinggi (SEB/3985/X/KA/PL.02/2019/BNN). Oleh karena itu, varietas kratom hijau diidentifikasi sebagai sumber mitraginin paling potensial untuk keperluan penelitian, standardisasi, dan implementasi metode deteksi tervalidasi dalam upaya pengendalian peredaran kratom berbasis bukti ilmiah. Saran penelitian selanjutnya meliputi analisis alkaloid lain dengan metode kromatografi canggih (HPLC-DAD/LC-MS), studi pengaruh agroklimat dan musim panen terhadap kadar

mitraginin, penelitian stabilitas mitraginin dalam berbagai kondisi penyimpanan, pengembangan metode ekstraksi yang efisien dan ramah lingkungan, serta validasi kolaboratif metode GC-FID untuk menetapkannya sebagai metode standar analisis mitraginin di Indonesia.

ABSTRAK

Validasi Metode *Gas Chromatography-Flame Ionization Detector* untuk Analisis Kandungan Mitraginin dari Daun Kratom (*Mitragyna speciosa*) Varietas Merah, Putih, dan Hijau

Elok Siti Nurjannah

Kratom (*Mitragyna speciosa* Korth.) mengandung alkaloid mitraginin yang memiliki aktivitas farmakologis sebagai analgesik dan stimulan, namun berpotensi disalahgunakan sehingga diperlukan metode analisis yang tervalidasi untuk pengendalian mutu dan pengawasan. Penelitian ini bertujuan mengembangkan dan memvalidasi metode *Gas Chromatography-Flame Ionization Detector* (GC-FID) untuk penetapan kadar mitraginin pada tiga varietas daun kratom (merah, hijau, putih) dari Kalimantan Barat. Simplisia daun kratom yang telah distandardisasi diekstraksi dengan maserasi menggunakan etil asetat, dilanjutkan fraksinasi cair-cair asam-basa untuk pemurnian mitraginin. Analisis dilakukan menggunakan GC-FID dengan kolom HP-5 (30 m × 320 µm × 0,25 µm) pada suhu injektor 280°C, program suhu kolom 200-285°C, laju alir gas pembawa helium 1,0 mL/menit, dan rasio split 1:10. Validasi metode meliputi spesifisitas dengan TLC-densitometri ($R_s \geq 1,0$), selektivitas ditunjukkan keterpisahan puncak (peak) mitraginin dari komponen matriks dan standar internal pada kromatogram, linieritas ($r = 0,9993$; range 5,0-100,0 mg/L), presisi (%RSD 0,7996%), dan akurasi (recovery 96,29-101,84%). Hasil penelitian menunjukkan metode GC-FID memenuhi seluruh parameter validasi sesuai ICH Q2(R2) dan AOAC. Kadar mitraginin tertinggi ditemukan pada varietas hijau ($1,1321 \pm 0,0194$ mg/g), diikuti merah ($0,6409 \pm 0,0377$ mg/g) dan putih ($0,1510 \pm 0,0031$ mg/g). Analisis statistik One-Way ANOVA mengkonfirmasi perbedaan sangat signifikan antar varietas daun kratom ($F = 796,136$; $p < 0,001$). Metode fraksinasi cair-cair asam-basa terbukti 31-71 kali lebih efektif dibanding ekstraksi langsung. Kesimpulannya, metode GC-FID yang telah tervalidasi ini bersifat reliabel dan aplikatif untuk analisis kuantitatif mitraginin dalam standardisasi dan pengawasan produk kratom.

Kata Kunci: *Mitragyna speciosa*, mitraginin, GC-FID, validasi metode, fraksinasi cair-cair asam-basa

ABSTRACT

Validation of Gas Chromatography-Flame Ionization Detector Method for Analysis of Mitragynine Content from Kratom Leaves (*Mitragyna speciosa*) Red, White, and Green Varieties

Elok Siti Nurjannah

Kratom (*Mitragyna speciosa* Korth.) contains the alkaloid mitragynine, which possesses pharmacological activities as an analgesic and stimulant; however, it has potential for abuse, necessitating a validated analytical method for quality control and surveillance. This study aimed to develop and validate a Gas Chromatography-Flame Ionization Detector (GC-FID) method for the determination of mitragynine content in three kratom leaf varieties (red, green, and white) from West Kalimantan. Standardized kratom leaf simplicia were extracted by maceration using ethyl acetate, followed by acid-base liquid-liquid fractionation for mitragynine purification. Analysis was performed using GC-FID with an HP-5 column (30 m × 320 μm × 0.25 μm) at an injector temperature of 280°C, column temperature program of 200-285°C, helium carrier gas flow rate of 1.0 mL/min, and split ratio of 1:10. Method validation included specificity by TLC-densitometry ($R_s \geq 1.0$), selectivity demonstrated by separation of mitragynine peak from matrix components and internal standard in the chromatogram, linearity ($r = 0.9993$; range 5.0-100.0 mg/L), precision (%RSD 0.7996%), and accuracy (recovery 96.29-101.84%). The results showed that the GC-FID method met all validation parameters according to ICH Q2(R2) and AOAC guidelines. The highest mitragynine content was found in the green variety (1.1321 ± 0.0194 mg/g), followed by red (0.6409 ± 0.0377 mg/g) and white (0.1510 ± 0.0031 mg/g). One-way ANOVA statistical analysis confirmed highly significant differences among kratom leaf varieties ($F = 796.136$; $p < 0.001$). The acid-base liquid-liquid fractionation method proved to be 31-71 times more effective than direct extraction. In conclusion, this validated GC-FID method is reliable and applicable for quantitative analysis of mitragynine in kratom product standardization and surveillance.

Keywords: *Mitragyna speciosa*, mitragynine, GC-FID, method validation, acid-base alkaloid fractionation

DAFTAR ISI

HALAMAN JUDUL	ii
SURAT PERNYATAAN BEBAS PLAGIARISME.....	iii
SURAT PERSETUJUAN PUBLIKASI	iv
LEMBAR PERSETUJUAN	v
LEMBAR PENGESAHAN	vi
KATA PENGANTAR.....	vii
RINGKASAN	x
ABSTRAK	xv
ABSTRACT	xvi
DAFTAR ISI.....	xvii
DAFTAR TABEL	xxi
DAFTAR GAMBAR	xxiv
DAFTAR LAMPIRAN	xxvii
DAFTAR SINGKATAN.....	xxx
BAB 1 PENDAHULUAN	1
1.1 Latar Belakang.....	1
1.2 Rumusan Masalah	7
1.3 Tujuan Penelitian	7
1.3.1 Tujuan Umum.....	7
1.3.2 Tujuan Khusus	7
1.4 Manfaat Penelitian.....	7
1.4.1 Manfaat Teoritis	7
1.4.2 Manfaat Praktisi.....	8
BAB 2 TINJAUAN PUSTAKA	10
2.1 Kratom (<i>Mitragyna speciosa</i>).....	10
2.1.1 Tanaman Kratom.....	10
2.1.2 Morfologi Kratom.....	12
2.1.3 Manfaat Kratom.....	15
2.1.4 Kandungan Kimia Kratom.....	16
2.1.5 Varietas Daun Kratom.....	18
2.2 Mitraginin	20

2.2.1 Deskripsi dan Struktur Mitraginin	20
2.2.2 Jenis-Jenis Mitraginin	21
2.2.3 Aktivitas Farmakologi Mitraginin	22
2.2.4 Metabolisme Mitraginin	23
2.2.5 Faktor yang Mempengaruhi Kadar Mitraginin	24
2.3 Ekstraksi	25
2.3.1 Pengertian Ekstraksi	25
2.3.2 Ekstraksi Maserasi	26
2.3.3 Pelarut Ekstraksi	27
2.3.4 Studi Terdahulu Terkait Analisis Mitraginin.....	28
2.4 Fraksinasi Cair-Cair Asam-Basa	29
2.5 TLC Densitometer	32
2.6 Gas Chromatography.....	33
2.6.1 Instrumen Gas Chromatography.....	33
2.6.2 Prinsip Kerja Gas Chromatography.....	37
2.6.3 Prinsip Kerja <i>Flame Ionization Detector</i> (FID).....	38
2.6.4 Alasan Pemilihan GC-FID	40
2.6.5 Internal Standar.....	41
2.7 <i>System Suitability Test</i> (SST).....	44
2.8 Validasi Metode	45
2.8.1 Selektivitas.....	47
2.8.2 Linieritas	49
2.8.3 Akurasi.....	50
2.8.4 Presisi.....	52
BAB 3 KERANGKA KONSEPTUAL.....	54
3.1 Bagan Kerangka Konseptual	54
3.2 Uraian Kerangka Konseptual	55
3.3 Hipotesis	57
BAB 4 METODE PENELITIAN.....	58
4.1 Jenis Penelitian	58
4.2 Populasi dan Sampel Penelitian	58
4.3 Variabel Penelitian.....	58

4.4 Lokasi dan Waktu Penelitian	59
4.4.1 Lokasi Penelitian.....	59
4.4.2 Waktu Penelitian	59
4.5 Bahan dan Alat Penelitian	59
4.5.1 Bahan	59
4.5.2 Alat.....	60
4.6 Prosedur Penelitian.....	61
4.6.1 Kerangka Operasional.....	61
4.6.2 Determinasi Tanaman	62
4.6.3 Preparasi Simplisia dan Ekstraksi <i>Mitragyna speciosa</i>	62
4.6.3.1 Preparasi Simplisia.....	62
4.6.3.2 Ekstraksi <i>Mitragyna speciosa</i> Korth	62
4.6.4 Standardisasi Simplisia dan Ekstrak	63
4.6.4.1 Standardisasi Simplisia	63
4.6.4.2 Standardisasi Ekstrak	64
4.6.5 Skrining Fitokimia	66
4.6.6 Fraksinasi Asam-Basa.....	67
4.6.7 Preparasi Sampel	68
4.6.7.1 Pembuatan Larutan Standart Mitraginin	68
4.6.7.2 Penentuan Kosentrasi Mitraginin.....	69
4.6.8 TLC Densitometer	69
4.6.9 <i>System Suitability Test</i> (SST).....	70
4.6.10 Optimasi <i>Gas Chromatography</i>	72
4.6.11 Validasi Metode Analisis.....	73
4.6.11.1 Selektivitas	73
4.6.11.2 Linieritas dan Range.....	74
4.6.11.3 Akurasi (Recovery)	75
4.6.11.4 Presisi (Precision).....	75
4.6.12 Penetapan Kadar Mitraginin	76
4.7 Analisis Data.....	77
4.8 Analisis data Statistik	78
4.9 Rancangan Analisis Data.....	79

BAB 5 HASIL PENELITIAN	81
5.1 Standardisasi Simplisia.....	81
5.2 Ekstraksi Maserasi.....	83
5.3 Standardisasi Ekstrak.....	84
5.4 Skrining Fitokimia.....	85
5.5 Purifikasi Ekstrak	88
5.5.1 Fraksinasi Asam-Basa.....	88
5.5.2 TLC (<i>Thin Layer Chromatography</i>)	89
5.5.1 TLC Densitometer	91
5.6 Optimasi Metode Analisis	93
5.7 <i>System Suitability Test</i>	94
5.8 Validasi Metode	95
5.8.1 Selektivitas.....	95
5.8.2 Linieritas dan Range	97
5.8.3 Presisi.....	99
5.8.4 Akurasi	100
5.8.5 Penetapan Kadar Sampel	101
5.9 Data Hasil Pengamatan Statistik	103
BAB 6 PEMBAHASAN	105
BAB 7 KESIMPULAN DAN SARAN.....	129
7.1 Kesimpulan.....	129
7.2 Saran.....	131
DAFTAR PUSTAKA.....	133
DAFTAR LAMPIRAN	141

DAFTAR TABEL

Tabel 2.1 Unsur Data yang Dibutuhkan untuk Validasi Prosedur Analisis (<i>USP 43-NF 38</i> , 2020)	47
Tabel 2.2 Kriteria Keberterimaan Akurasi dan Presisi (AOAC, 2023)	51
Tabel 2.3 Tabel Kriteria Keberterimaan Akurasi menurut ICH Q2(R2)	52
Tabel 4.1 Optimasi Gas Chromatography (HP Agilent 8860 Series)	72
Tabel 4.2 Analisis Data Validasi Metode	78
Tabel 4.3 Rancangan Analisis Data	79
Tabel 5.1. Analisis Data Standardisasi Simplisia Daun Kratom	81
Tabel 5.2. Data Hasil Ekstraksi Simplisia Daun Kratom	83
Tabel 5.3. Analisis Data Standardisasi Ekstrak Daun Kratom	84
Tabel 5.4. Hasil Uji Skrining Fitokimia Ekstrak Daun Kratom	85
Tabel 5.5. Data Hasil Pengamatan Fraksi Mitraginin dalam Pelarut Kloroform .	88
Tabel 5.6. Nilai R _f TLC Perbandingan Ekstrak Daun Kratom dan Fraksi Fase Gerak (n-Heksana : Ethyl Asetat (6:4, v/v)).....	89
Tabel 5.7. Nilai R _f TLC Hasil Alkaloid Fraksi Asam-Basa	90
Tabel 5.8 Perbandingan Nilai R _f Fraksinasi cair-cair Asam Basa dan Standar Mitraginin.....	90
Tabel 5.9 Data Hasil Pengamatan Densitogram untuk Menentukan Nilai R _s	92
Tabel 5.10 Data Hasil Optimasi Flow rate dan Rasio Split Instrument GC-FID .	93
Tabel 5.11. Data hasil analisis System Suitability Test/SST <i>menggunakan Standar Mitraginin 40 mg/L</i>	95
Tabel 5.12. Data Linieritas Mitraginin Standar	97
Tabel 5.13 Data Presisi Fraksi Mitraginin dalam Pelarut Kloroform.....	99
Tabel 5.14 Data Akurasi Mitraginin	100
Tabel 5.15 Data Penetapan Kadar Mitraginin Metode Fraksi Alkaloid Asam Basa dalam Pelarut Kloroform dan Ekstraksi Pelarut Etil Asetat.....	101
Tabel 5.16 Data Hasil Penetapan Kadar Metode Fraksinasi cair-cair Asam Basa	103
Tabel 0.1. Hasil Penimbangan Bobot dan Perhitungan Rendemen Ekstrak Kental serta Fraksi dari Berbagai Jenis Kratom	153

Tabel 0.2 Hasil Perhitungan Rendemen Fraksi Alkaloid Asam Basa Berdasarkan Berat Simplisia	154
Tabel 0.3. Hasil Pengujian Kadar Air pada Simplisia Daun Kratom dengan Metode Gravimetri	155
Tabel 0.4. Hasil Perhitungan Kadar Air pada Simplisia Daun Kratom dengan Metode Gravimetri	155
Tabel 0.5. Hasil Pengujian Kadar Abu Total pada Simplisia Daun Kratom.....	156
Tabel 0.6 Hasil Perhitungan Kadar Abu Total pada Simplisia Daun Kratom	156
Tabel 0.7. Hasil Pengujian Kadar Abu Tidak Larut Asam pada Simplisia Daun Kratom	157
Tabel 0.8. Hasil Perhitungan Kadar Abu Tidak Larut Asam pada Simplisia Daun Kratom	157
Tabel 0.9. Hasil Pengujian Kadar Sari Larut Air pada Simplisia Daun Kratom	158
Tabel 0.10. Hasil Perhitungan Kadar Sari Larut Air pada Simplisia Daun Kratom	158
Tabel 0.11. Hasil Pengujian Kadar Sari Larut Etanol pada Simplisia Daun Kratom	159
Tabel 0.12. Hasil Perhitungan Kadar Sari Larut Air pada Simplisia Daun Kratom	159
Tabel 0.13. Hasil Pengujian Kadar Air pada Ekstrak Daun Kratom dengan Metode Gravimetri	160
Tabel 0.14. Hasil Perhitungan Kadar Air pada Ekstrak Daun Kratom dengan Metode Gravimetri	161
Tabel 0.15. Hasil Penentuan Berat Jenis Ekstrak dengan Piknometer	161
Tabel 0.16. Hasil Perhitungan Berat Jenis Ekstrak dengan Piknometer.....	162
Tabel 0.17. Hasil Pengujian Kadar Abu Total pada Ekstrak Daun Kratom.....	162
Tabel 0.18. Hasil Perhitungan Kadar Abu Total pada Ekstrak Daun Kratom	163
Tabel 0.19. Hasil Pengujian Kadar Abu Tidak Larut Asam pada Ekstrak Daun Kratom	163
Tabel 0.20. Hasil Perhitungan Kadar Abu Tidak Larut Asam pada Ekstrak Daun Kratom	164

Tabel 0.21. Perbandingan Nilai Rf Sampel Fraksinasi Cair-Cair Asam Basa dan Standar Mitraginin	165
Tabel 0.22. Hasil Perhitungan Linearitas Standar Mitraginin	165
Tabel 0.23. Hasil Perhitungan Kadar Mitraginin pada Sampel Kratom Hijau Fraksinasi	167
Tabel 0.24. Data Hasil Pengamatan Sampel Kratom Fraksinasi Cair-Cair Asam Basa.....	170
Tabel 0.25. Data Hasil Pengamatan Sampel Kratom Ekstraksi Pelarut Etil Asetat	172

DAFTAR GAMBAR

Gambar 2.1 Tanaman Kratom (<i>Mitragyna speciosa</i>).....	10
Gambar 2.2. Persebaran <i>Mitragyna speciosa</i> di Indonesia	12
Gambar 2.3 Tanaman <i>Mitragyna speciosa</i> Tanaman muda, B. Tanaman berusia 40 tahun (Tim Kratom Balitbangkes, 2019).....	13
Gambar 2.4 Morfologi Daun Kratom (A) Bentuk dan Pertulangan Daun Kratom (B) Daun Penumpu pada Daun Kratom (Tim Kratom Balitbangkes, 2019).....	14
Gambar 2.5 Morfologi bunga dan buah <i>Mitragyna speciosa</i> . (A) Bunga majemuk (inflorescence), (B) Bakal buah (immature fruit), (C) Buah (fruit). (Low <i>et al.</i> , 2016 dan Tim Kratom Balitbangkes, 2019).	15
Gambar 2.6. Indole Alkaloids: Mitragynine (1) and Its	17
Gambar 2.7 Perbedaan Morfologi Daun Kratom (<i>Mitragyna speciosa</i>) Berdasarkan Warna Tulang Daun (NINGSIAWATI, 2024)	19
Gambar 2.8 Struktur Kimia Mitragynine (Todd <i>et al.</i> , 2020).....	20
Gambar 2.9 Struktur Kimia jenis utama mitraginin (Sengnon <i>et al.</i> , 2023).....	21
Gambar 2.10 Reaksi Amina dengan Asam Kuat	30
Gambar 2.11 Reaksi Pembebasan Amina dengan Cara Pembasaan.....	31
Gambar 2.12 Desain alat GC pabrikan (A) dan rakitan (B). Keterangan; 1 (gas pembawa), 2 (injektor), 3 (inlet), 4 (colom oven) dan 5 detektor (Susilo <i>et al.</i> , 2023)	34
Gambar 2.13 Bagan letak injeksi (Injektor) GC (Andriana, Y., 2019).....	35
Gambar 2.14 Tiga jenis kolom kromatografi gas (GC) berdasarkan jenis fasa diam yang digunakan (Andriana, Y., 2019)	35
Gambar 2.15 Mekanisme Pemisahan Didalam Kolom (Andriana, Y., 2019).....	36
Gambar 2.16 Hasil Kromatogram GC (Brown <i>et al.</i> , 2012)	36
Gambar 2.17 Detektor Flame Ionization Detector (FID) (Andriana, Y., 2019) ..	40
Gambar 5.1 Kromatogram hasil TLC ekstrak daun kratom: (A) diamati secara visual dan (B) diamati pada sinar UV 366 nm, menggunakan fase gerak n-heksana : etil asetat (6:4, v/v).....	89
Gambar 5.2 Kromatogram hasil TLC fraksinasi asam-basa: (A) diamati secara visual dan (B) diamati pada sinar UV 254 nm, menggunakan fase gerak n-heksana : etil asetat (6:4, v/v).....	89

Gambar 5.3 Kromatogram hasil TLC fraksinasi asam-basa: (A) diamati secara visual dan (B) diamati pada sinar UV 366 nm, menggunakan fase gerak n-heksana : etil asetat (5:5, v/v).....	90
Gambar 5.4. Densitogram Hasil Analisis Mitraginin Menggunakan TLC-Densitometer ((A) Standar mitraginin; (B) Sampel Kratom Varietas Hijau; (C) Sampel Kratom Varietas Merah; (D) Sampel Kratom Varietas Putih).....	91
Gambar 5.5. Seluruh Track Densitogram Sampel dan Standar Mitraginin	92
Gambar 5.6. Kromatogram Selektivitas Standar Mitraginin, Internal Diazepam, dan Sampel Ekstrak Daun Kratom ((A) Standar mitraginin 50 µg/mL; (B) Sampel ekstrak daun kratom 500 µg/mL; (C) Internal diazepam 100 µg/mL; (D) Campuran ID 100 µg/mL + SM 50 µg/mL + sampel ekstrak kratom 500 µg/mL).....	96
Gambar 5.7 Kurva Kalibrasi Mitraginin Standar	98
Gambar 0.1. Daun Kratom Hijau untuk Determinasi Tanaman di Herbarium Bogoriense	142
Gambar 0.2. Daun Kratom Merah dan Putih untuk Determinasi Tanaman di Herbarium Bogoriense	143
Gambar 0.3. Hasil Uji Normalitas Kadar Mitraginin	174
Gambar 0.4. Hasil Uji Homogenitas Varians Kadar Mitraginin.....	174
Gambar 0.5. Hasil Analisis One-Way ANOVA Kadar Mitraginin	174
Gambar 0.6. Statistik Deskriptif Kadar Mitraginin per Varietas	174
Gambar 0.7. Hasil Uji Post Hoc <i>Multiple Comparisons</i> (LSD).....	175
Gambar 0.8 Penimbangan Sampel Simplisia + Botol Timbang untuk Uji Kadar Air Simplisia.....	181
Gambar 0.9 Penimbangan Sampel Simplisia + Botol Timbang untuk Uji Kadar Air Simplisia.....	181
Gambar 0.10 Penimbangan Sampel Ekstrak + Botol Timbang untuk Uji Kadar Air Ekstrak	181
Gambar 0.11 Sampel + Botol Timbang untuk Uji Kadar Air Ekstrak Daun Kratom	181
Gambar 0.12 Penimbangan Krus Kosong untuk Pengujian Kadar Abu Total dan Kadar Abu Tidak Larut Asam	181

Gambar 0.13 Penimbangan Sampel + Krus untuk Pengujian Kadar Abu Total dan Kadar Abu Tidak Larut Asam	181
Gambar 0.14 Peletakan Sampel dalam Furnice dengan Suhu Operasional 800°C	182
Gambar 0.15 Penimbangan Sampel Setelah Pengujian Kadar Sari Larut Air dan Kadar Sari Larut Etanol	182
Gambar 0.16 Keseluruhan Sampel Pengujian Kadar Sari Larut Air dan Kadar Sari Larut Etanol pada Simplisia Daun Kratom	182
Gambar 0.17 Penimbangan Piknometer Kosong untuk Pengujian Bobot jenis Ekstrak Mitraginin	182
Gambar 0.18 Penimbangan Piknometer + Ekstrak dengan Pelarut Etil Asetat untuk Pengujian Bobot jenis Ekstrak Mitraginin	182
Gambar 0.19 Penimbangan Piknometer + Pelarut Etil Asetat untuk Pengujian Bobot jenis Ekstrak Mitraginin	182
Gambar 0.20 Pengujian Susut Pengerinan Ekstrak Daun Kratom Varietas Hijau	183
Gambar 0.21 Pengujian Susut Pengerinan Ekstrak Daun Kratom Varietas Putih	183
Gambar 0.22 Pengujian Susut Pengerinan Ekstrak Daun Kratom Varietas Merah	183
Gambar 0.23 Pengukuran Volume Filtrat Hasil Maserasi Daun Kratom	183
Gambar 0.24 Penimbangan Simplisia untuk Fraksinasi Cair-Cair Asam-Basa.	183
Gambar 0.25 Proses Penguapan Pelarut Fraksinasi (Kloroform pa) di dalam Lemari Asam	183
Gambar 0.26 Sampel Fraksinasi Cair-Cair Asam Basa Setelah di Uapkan Pelarutnya.....	183

DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran 1. Sertifikat Determinasi Tanaman	141
Lampiran 2. Dokumentasi Daun Kratom Hijau untuk Determinasi.....	142
Lampiran 3. Dokumentasi Daun Kratom Merah dan Putih untuk Determinasi	143
Lampiran 4. <i>Certificate of Analysis</i> (COA) Standar Mitraginin	144
Lampiran 5. <i>Certificate of Analysis</i> (Halaman 2) - Detail Kemurnian dan Ketidakpastian Pengukuran Bahan Baku Standar.....	145
Lampiran 6. <i>Certificate of Analysis</i> (Halaman 3) - Detail Ketertelusuran Metrologis dan Proses Sertifikasi Bahan Baku Standar.....	146
Lampiran 7. <i>Certificate of Analysis</i> (Halaman 4) - Verifikasi Larutan Standar dengan Parameter Assay dan Uji Homogenitas	147
Lampiran 8. <i>Certificate of Analysis</i> (Halaman 5) - Mass Balance Purity Factor untuk standar mitraginin	148
Lampiran 9. <i>Certificate of Analysis</i> (Halaman 6) - Data HPLC/UV standar mitraginin menampilkan kromatogram dan tabel retention time serta persentase area 16 puncak terdeteksi	149
Lampiran 10. <i>Certificate of Analysis</i> (Halaman 7) - Data Spektral dan Fisik (lanjutan) - Spektrum ¹ H NMR standar mitraginin yang diukur menggunakan instrumen JEOL ECA400S	150
Lampiran 11. <i>Certificate of Analysis</i> (Halaman 8) - Data Spektral dan Fisik (lanjutan) Spektrum LC/MS standar mitraginin	151
Lampiran 12. <i>Certificate of Analysis</i> (Halaman 9) - Bahan Baku/Standar, Informasi Stabilitas dan Revisi	152
Lampiran 13. Perhitungan Rendemen Ekstrak, Standardisasi Simplisia, dan Ekstrak	153
Lampiran 14. Perhitungan Rendemen Ekstrak, Standardisasi Simplisia, dan Ekstrak (Lembar 2)	154
Lampiran 15. Perhitungan Rendemen Ekstrak, Standardisasi Simplisia, dan Ekstrak (Lembar 3)	155
Lampiran 16. Perhitungan Rendemen Ekstrak, Standardisasi Simplisia, dan Ekstrak (Lembar 4)	156

Lampiran 17. Perhitungan Rendemen Ekstrak, Standardisasi Simplisia, dan Ekstrak (Lembar 5)	157
Lampiran 18. Perhitungan Rendemen Ekstrak, Standardisasi Simplisia, dan Ekstrak (Lembar 6)	158
Lampiran 19. Perhitungan Rendemen Ekstrak, Standardisasi Simplisia, dan Ekstrak (Lembar 7)	159
Lampiran 20. Perhitungan Rendemen Ekstrak, Standardisasi Simplisia, dan Ekstrak (Lembar 8)	160
Lampiran 21. Perhitungan Rendemen Ekstrak, Standardisasi Simplisia, dan Ekstrak (Lembar 9)	161
Lampiran 22. Perhitungan Rendemen Ekstrak, Standardisasi Simplisia, dan Ekstrak (Lembar 10)	162
Lampiran 23. Perhitungan Rendemen Ekstrak, Standardisasi Simplisia, dan Ekstrak (Lembar 11).....	163
Lampiran 24. Perhitungan Rendemen Ekstrak, Standardisasi Simplisia, dan Ekstrak (Lembar 12)	164
Lampiran 25. Perhitungan Validasi Metode dan Penetapan Kadar Mitraginin .	165
Lampiran 26. Perhitungan Validasi Metode dan Penetapan Kadar Mitraginin (Lembar 2).....	166
Lampiran 27. Perhitungan Validasi Metode dan Penetapan Kadar Mitraginin (Lembar 3).....	167
Lampiran 28. Perhitungan Validasi Metode dan Penetapan Kadar Mitraginin (Lembar 4).....	168
Lampiran 29. Perhitungan Validasi Metode dan Penetapan Kadar Mitraginin (Lembar 5).....	169
Lampiran 30. Perhitungan Validasi Metode dan Penetapan Kadar Mitraginin (Lembar 6).....	170
Lampiran 31. Perhitungan Validasi Metode dan Penetapan Kadar Mitraginin (Lembar 7).....	171
Lampiran 32. Perhitungan Validasi Metode dan Penetapan Kadar Mitraginin (Lembar 8).....	172

Lampiran 33. Perhitungan Validasi Metode dan Penetapan Kadar Mitraginin (Lembar 9).....	173
Lampiran 34. Data Hasil Pengamatan Statistik One-Way ANOVA.....	174
Lampiran 35. Data Hasil Pengamatan Statistik One-Way ANOVA (Lembar 2).....	175
Lampiran 36. Proses Ekstraksi pada <i>Mitragyna speciosa</i> Korth.....	176
Lampiran 37. Proses Fraksinasi pada <i>Mitragyna speciosa</i> Korth.....	177
Lampiran 38. Proses <i>On Instrument</i> GC-FID dan Validasi Metode.....	178
Lampiran 39. Proses Pengujian Statistika	179
Lampiran 40. Proses Pengujian Statistika (Lembar 2).....	180
Lampiran 41. Dokumentasi Pelaksanaan Penelitian	181
Lampiran 42. Dokumentasi Pelaksanaan Penelitian (Lembar 2)	182
Lampiran 43. Dokumentasi Pelaksanaan Penelitian (Lembar 3)	183
Lampiran 44. Surat Keterangan Bebas Pinjam	184
Lampiran 45. Lembar <i>Endorsement Letter</i>	185
Lampiran 46. Surat Keterangan Bukti Bebas Plagiarisme	186
Lampiran 47. Lembar Konsultasi Proposal Skripsi Dosen Pembimbing Utama	187
Lampiran 48. Lembar Konsultasi Proposal Skripsi Dosen Pembimbing Serta.....	188
Lampiran 49. Lembar Konsultasi Skripsi Dosen Pembimbing Utama	189
Lampiran 50. Lembar Konsultasi Skripsi Dosen Pembimbing Serta.....	190
Lampiran 51. Lembar Revisi Proposal Skripsi Dosen Penguji	191
Lampiran 52. Lembar Revisi Proposal Skripsi Dosen Pembimbing Utama	192
Lampiran 53. Lembar Revisi Proposal Skripsi Dosen Pembimbing Serta	193
Lampiran 54. Lembar Revisi Skripsi Dosen Penguji	194
Lampiran 55. Lembar Revisi Skripsi Dosen Pembimbing Utama	195
Lampiran 56. Lembar Revisi Skripsi Dosen Pembimbing Serta.....	196

DAFTAR SINGKATAN

RI	: Republik Indonesia
BPOM RI	: Badan Pengawasan Obat dan Makanan
BNN	: Badan Narkotika Nasional
FI	: Farmakope Indonesia
FDA	: <i>Food and Drug Administration</i>
RSD	: <i>Relative Standart Deviation</i>
LOD	: <i>Limit of Detection</i> (Batas Deteksi)
LOQ	: <i>Limit of Quantitation</i> (Batas Kuantisasi)
S/N	: <i>Signal/Noise</i>
ANOVA	: <i>Analysis of Variance</i>
COA	: <i>Certificate of Analysis</i>
GC	: <i>Gas Chromatography</i>
GC-FID	: <i>Gas Chromatography Flame Ionization Detector</i>
GC-MS	: <i>Chromatography-Mass Spectrometry</i>
LC-HRMS	: <i>Liquid Chromatography-High Resolution Mass Spectrometry</i>
HPLC	: <i>High Performance Liquid Chromatography</i>
LC-MS	: <i>Liquid Chromatography-Mass Spectrometry</i>
UV-Vis	: <i>Ultraviolet-Visible</i>
CE	: <i>Capillary Electrophoresis</i>
CE-MS	: <i>Capillary Electrophoresis Mass Spectrometry</i>
FID	: <i>Flame Ionization Detector</i>
DAD	: <i>Diode Array Detector</i>
MS	: <i>Mass Spectrometry</i>
TCD	: <i>Thermal Conductivity Detector</i>
TDC	: <i>Tryptophan Decarboxylase</i>
GPP	: <i>Geranil Pirofosfat</i>
STR	: <i>Strictosidin Sintase</i>
SGD	: <i>Strictosidin β-D-glucosidase</i>
OMT	: <i>O-methyltransferase</i>
QToF	: <i>Quadrupole Time-of-Flight</i>
USP	: <i>United State Pharmacopeia</i>
ICH	: <i>International Council for Harmonisation</i>
AOAC	: <i>Association of Official Analytical Chemist</i>
GBIF	: <i>Global Biodiversity Information Facility</i>

IPNI	: <i>International Plant Names Index</i>
CMPs	: <i>Critical Method Parameters</i>
SST	: <i>System Suitability Test</i>
KLT	: <i>Kromatografi Lapis Tipis</i>
IUPAC	: <i>International Union of Pure and Applied Chemistry</i>
NMR	: <i>Nuclear Magnetic Resonance</i>
HR-MS	: <i>High-Resolution Mass Spectrometry</i>
UPLC	: <i>Ultra-Performance Liquid Chromatography</i>
HRESIMS	: <i>High Resolution Electrospray Ionization</i>
UAE	: <i>Ultrasonic-Assisted Extraction</i>
SFE	: <i>Supercritical Fluid Extraction</i>
HPAE	: <i>High Pressure Assisted Extraction</i>
ASE	: <i>Accelerated Solvent Extraction</i>
MAE	: <i>Microwave-Assisted Extraction</i>
HETP	: <i>High Equivalent Theoretical Plate</i>
CRM	: <i>Certified Reference Material</i>
OFAT	: <i>One-factor-at-a-time</i>
FFD	: <i>Fractional Factorial Design</i>
PLE	: <i>Pressurized Liquid Extraction</i>
PTLC	: <i>Preparative Thin Layer Chromatography</i>
EI	: <i>Electron Impact</i>
DB-5MS	: <i>Database-5 Mass Spectrometry (kolom)</i>
HP-5MS	: <i>Hewlett-Packard-5 Mass Spectrometry (kolom)</i>
LIPI	: <i>Lembaga Ilmu Pengetahuan Indonesia</i>
BO	: <i>Herbarium Bogoriense</i>
KHDTK	: <i>Kawasan Hutan Dengan Tujuan Khusus</i>
DAS	: <i>Daerah Aliran Sungai</i>
ALT	: <i>Angka Lempeng Total</i>
LLOQ	: <i>Lower Limit of Quantification</i>
MOR	: <i>μ-Opioid Receptor (reseptor μ-opioid)</i>
SSL	: <i>Split/Splitless (inlet)</i>
SD	: <i>Standart Deviasi</i>
RSD	: <i>Relative Standard Deviation</i>
CV	: <i>Coefficient of Variation</i>
AUC	: <i>Area Under the Curve</i>

psi	: <i>Pounds per Square Inch</i>
cm/sec	: <i>Centimeter per Second</i>
g/mol	: Gram per Mole
pKa	: Logaritma negatif dari konstanta disosiasi asam
p.a.	: Pro Analysis
Log P	: Logaritma koefisien partisi oktanol-air
°C	: Derajat Celsius
v/v	: Volume per Volume
v/v/v	: Volume per Volume per Volume
m/z	: <i>Mass-to-Charge Ratio</i>
[M+H] ⁺	: <i>Protonated Molecular Ion</i>
Rf	: <i>Retention Factor</i>
Rs	: Resolusi
Rt	: <i>Retention Time</i>
KV	: Koefisien Variasi
r	: koefisien korelasi
s	: Slope
µg	: Mikrogram
mg	: Miligram
mL	: Mililiter
µL	: Mikroliter
µm	: Mikrometer
M	: Molar
t_R	: Waktu Retensi
w	: Lebar Dasar Puncak
V_{x_0}	: Koefisien variasi regresi
S_{x_0}	: Simpangan baku regresi
b	: Slope
a	: Intersep
\bar{x}	: Rata-rata konsentrasi
\bar{y}	: Rata-rata respons
N	: Jumlah titik data
\bar{x}	: Rata-rata