

BAB 2

TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Kratom (*Mitragyna speciosa*)

2.1.1 Tanaman Kratom

Kratom secara ilmiah dikenal sebagai *Mitragyna speciosa*, merupakan salah satu jenis tumbuhan yang menarik perhatian dalam dunia botani dan farmakologi. Tumbuhan ini pertama kali ditemukan oleh seorang botanis asal Belanda, Pieter Willem Korthals, yang memberikan nama *Mitragyna speciosa* pada tahun 1841. Seiring berjalannya waktu, beberapa ahli botanis melakukan penamaan ulang tumbuhan ini menjadi *Nauclea korthalsii*, *N. luzoniensis*, dan *N. speciosa*, mencerminkan keragaman klasifikasi yang ada dalam dunia tumbuhan. Namun, Haviland kemudian mengembalikan penamaan tumbuhan tersebut ke dalam marga *Mitragyna*, sehingga nama aslinya, *Mitragyna speciosa* (Korth.) Havil, diakui kembali dalam literatur ilmiah (Gahr, 2022).

Klasifikasi taksonomi untuk *Mitragyna speciosa* menurut *Global Biodiversity Information Facility* (GBIF) dan *International Plant Names Index* (IPNI) adalah sebagai berikut:



Gambar 2.1 Tanaman Kratom (*Mitragyna speciosa*)
(Socfindo Conservation, 2020)

Kingdom : Plantae

Subkingdom : Tracheobionta

Superdivisi	: Spermatophyta
Divisi	: Magnoliophyta
Kelas	: Magnoliopsida
Subkelas	: Asteridae
Ordo	: Rubiales
Famili	: Rubiaceae
Suku	: Gentianales
Genus	: <i>Mitragyna</i> Korth.
Spesies	: <i>Mitragyna speciosa</i> (Korth.) Havil
Sinonim	: <i>Nauclea korthalsii</i> Steud.

Nauclea korthalsii infrasubsp. Publ

Nauclea luzoniensis Blanco

Nauclea speciosa (Korth.) Miq

Stephegyne speciosa Korth.

Kratom memiliki hubungan kekerabatan botani yang erat dengan genus-genus lain seperti *Corynanthe*, *Cinchona*, dan *Uncaria*, yang semuanya termasuk dalam keluarga Rubiaceae (suku kopi-kopian). Genus *Corynanthe*, misalnya, dikenal karena mengandung senyawa alkaloid yang memiliki efek psikoaktif, mirip dengan yang ditemukan dalam kratom. *Cinchona*, di sisi lain, terkenal sebagai sumber quinine, yang digunakan dalam pengobatan malaria, sedangkan *Uncaria* dikenal dengan khasiatnya dalam pengobatan tradisional.

Kratom dikenal dengan nama lokal "purik," yang mencerminkan penggunaannya yang luas dalam tradisi masyarakat setempat sebagai obat herbal. Sebutan "purik" umumnya digunakan di Sumatra dan Kalimantan, di mana masyarakat mengenal tanaman ini sebagai sumber khasiat obat untuk mengatasi berbagai masalah kesehatan. Di kalangan masyarakat Karo, suku di Sumatra Utara, kratom juga disebut "puri karo." Nama-nama lokal ini menunjukkan pentingnya kratom dalam budaya dan tradisi masyarakat, serta perannya dalam praktik pengobatan herbal yang diwariskan dari generasi ke generasi.

Tanaman ini umumnya ditemukan di wilayah tropis, khususnya di Asia Tenggara, dengan rentang sebaran yang mencakup Semenanjung Thailand hingga Papua, termasuk negara-negara seperti Thailand, Malaysia, Filipina, Kamboja, Vietnam, Papua Nugini, dan Indonesia, serta berasal dari bioma beriklim tropis basah. Di Indonesia Kratom ditemukan di beberapa daerah di Kalimantan Barat, terutama di Kabupaten Kapuas Hulu dan sepanjang Sungai Kapuas. Tanaman ini tumbuh subur di hutan-hutan Kalimantan dan menjadi bagian penting dari kehidupan masyarakat setempat. Di Kabupaten Kapuas Hulu, kratom banyak dibudidayakan oleh petani yang sebelumnya beralih dari tanaman karet dan minyak kelapa sawit. Selain itu, daerah lain yang juga dikenal sebagai penghasil kratom di Kalimantan Barat meliputi Kabupaten Sintang dan Kabupaten Melawi. Kratom juga tumbuh di daerah rawa dan tepi sungai, di mana kondisi tanah dan iklim mendukung pertumbuhannya.



Gambar 2.2. Persebaran *Mitragyna speciosa* di Indonesia

2.1.2 Morfologi Kratom

Kratom memiliki bentuk morfologi sebagai pohon berkayu yang dapat mencapai ketinggian antara 10 hingga 30 meter (lihat Gambar 2.3). Tumbuhan ini biasanya tumbuh secara soliter atau berdekatan dengan spesies sejenis. Batangnya tumbuh lurus, dengan kulit batang yang berwarna abu-abu kehijauan pada fase muda (sekitar 6 hingga 12 bulan sebelum berbunga) dan berubah menjadi abu-abu kecoklatan saat memasuki usia tua (di atas 1 tahun). Permukaan batang yang masih muda cenderung lebih halus (lihat Gambar 2.3 A), sementara batang yang lebih tua memiliki tekstur yang lebih kasar dan ditandai dengan banyak pustular lentisel (lihat Gambar 2.3 B). Pada satu batang muda umumnya terdapat 10–12 daun yang tumbuh berpasangan, berhadapan

dan bersilangan. Setiap sepasang daun diikuti dengan dua daun penumpu (*interpetiolar stipule*) yang terletak berdekatan atau sedikit di atas tangkai daun (*petiole*). Ujung batang pohon diakhiri dengan bunga dan buah yang tumbuh di bagian ketiak daun (*axil*), di antara beberapa daun (Rodrigues de Araujo *et al.*, 2019).

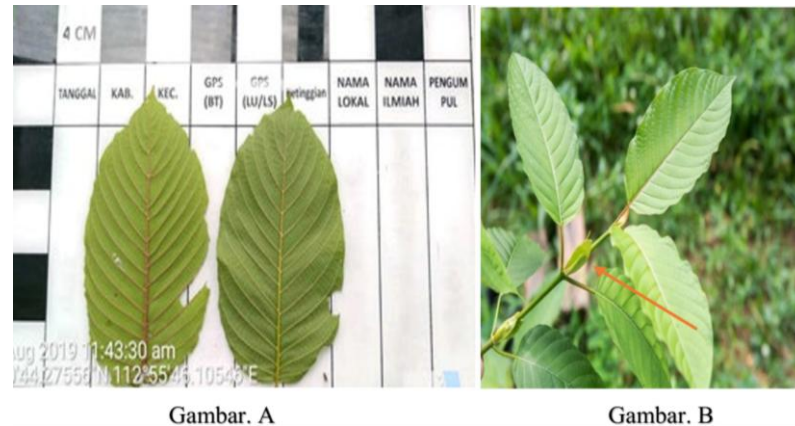


Gambar 2.3 Tanaman *Mitragyna speciosa* Tanaman muda, B. Tanaman berusia 40 tahun (Tim Kratom Balitbangkes, 2019).

Batang muda kratom memiliki 10-12 helai daun yang tumbuh berpasangan, saling berhadapan dan bersilangan. Setiap sepasang daun biasanya diikuti oleh dua daun penumpu yang terletak di antara tangkai daun (*interpetiolar stipule*). Di bagian ujung batang, terdapat bunga, sementara buahnya tumbuh di ketiak daun (*axil*) di antara beberapa daun (Kartikawati & Setyawati, 2023).

Daun kratom berbentuk elips hingga oval (*ovate*), dengan ukuran rata-rata antara 10-20 cm panjang dan 7-12 cm lebar, serta memiliki 12-17 pasang tulang daun menyirip. Umumnya, warna daun adalah hijau muda dengan bagian tulang daun yang berwarna merah, dan warna daun ini cenderung lebih cerah dibandingkan dengan daun tanaman di sekitarnya. Tekstur daun mirip kertas, dengan ujung yang runcing dan pangkal yang bulat atau menyerupai bentuk hati (*sub cordate*). Permukaan atas daun halus tanpa rambut, sedangkan permukaan bawah, terutama pada tulang daun utama dan vena lateral, sedikit berbulu. Warna tulang dan urat daun bervariasi antara coklat pucat hingga coklat kemerahan, sementara beberapa jenis kratom memiliki tulang daun

berwarna hijau (Gambar 2.4 A). Daun penumpu (Gambar 2.4 B) berbentuk seperti tombak (*lanceolatus*) dengan panjang 2-4 cm, memiliki sedikit rambut dan terdiri dari 9 cabang tulang daun (Kartikawati & Setyawati, 2023).



Gambar 2.4 Morfologi Daun Kratom (A) Bentuk dan Pertulangan Daun Kratom (B) Daun Penumpu pada Daun Kratom (Tim Kratom Balitbangkes, 2019)

Bunga kratom adalah bunga majemuk yang terdiri dari tiga bunga dalam satu tangkai, beberapa di antaranya memiliki tangkai yang lebih pendek dibandingkan dengan dua lainnya. Diameter bunga berkisar antara 1,5-2,5 cm, dengan braktea yang memiliki bulu halus dan panjang sekitar 46 mm. Sepal, yang berfungsi melindungi bunga saat masih dalam keadaan kuncup, memiliki panjang sekitar 2 mm dan terdiri dari lima helai daun. Kelopak bunga berbentuk corong berwarna kuning, dengan permukaan luar yang halus, berdiameter 3,55 mm dan panjang 2,53 mm, serta memiliki ujung yang bergelombang (*revolute*) dan dikelilingi oleh rambut di bagian dalam. Lima benang sari terhubung dengan masing-masing kelopak dan menjulang di depan kepala sari yang berbentuk tombak, lebih tinggi dari kelopak. Tangkai putik memiliki panjang sekitar 13 mm, sedangkan kepala putik yang bulat memiliki diameter 2 mm. Mahkota bunga berwarna putih hingga kekuningan (Gambar 2.5 A) (Coonan & Tatum, 2021).

Bakal buah memiliki diameter sekitar 2-3 mm dan terdiri dari 10 sudut (*lobus*) dengan panjang 7-9 mm dan lebar 4-5 mm, serta mengandung banyak biji (Gambar 2.5 B). Buah umumnya berbentuk bulat (Gambar 2.5 C) dan tersusun dalam formasi kapsul kecil. Buah yang masih muda berwarna hijau,

sedangkan buah yang sudah matang akan berwarna kecoklatan dan sangat rapuh saat diremas. Biji memiliki bentuk bulat dengan ukuran sekitar 1 mm dan dilengkapi dengan struktur mirip sayap di bagian ujungnya yang memiliki panjangnya 1-2 mm (Gambar 2.5 C) (Bukharov, 2023).



Gambar 2.5 Morfologi bunga dan buah *Mitragyna speciosa*. (A) Bunga majemuk (inflorescence), (B) Bakal buah (immature fruit), (C) Buah (fruit). (Low *et al.*, 2016 dan Tim Kratom Balitbangkes, 2019).

2.1.3 Manfaat Kratom

Manfaat Kratom (*Mitragyna speciosa*) telah banyak diteliti, terutama berkaitan dengan kandungan senyawa aktif utamanya yaitu *mitragynine* dan *7-hydroxymitragynine*, yang termasuk golongan alkaloid. Kedua senyawa alkaloid ini memiliki aktivitas biologis yang mirip dengan opioid, namun dengan karakteristik kerja yang lebih kompleks. Salah satu manfaat paling dikenal dari kratom adalah sebagai pereda nyeri alami (analgesik), karena senyawa aktifnya mampu berinteraksi dengan reseptor opioid di sistem saraf pusat. Dalam praktik tradisional di kawasan Asia Tenggara, khususnya Thailand, Malaysia, dan Indonesia, ekstrak daun kratom telah lama dimanfaatkan untuk mengurangi rasa sakit, meredakan ketegangan otot, serta mengatasi nyeri kronis akibat aktivitas berat (Grundmann *et al.*, 2022). Selain itu, kratom secara tradisional juga dipercaya memiliki berbagai manfaat lainnya, seperti mengatasi diare, kelelahan, nyeri otot, batuk, meningkatkan daya tahan tubuh, menurunkan tekanan darah tinggi, menambah energi, mengatasi depresi, sebagai antidiabetes, serta berfungsi sebagai stimulan seksual.

Efek kratom pada manusia tergantung dari dosis. Pada dosis rendah mempunyai efek stimulasi dan dosis lebih tinggi berefek narkotika tetapi bukan zat adiktif kuat. Berdasarkan pengalaman pengguna, dosis rendah hingga

sedang (1-5 gram) serbuk daun kratom memiliki efek stimulan ringan yang menyenangkan, pada dosis lebih tinggi (5-15gram) memberikan gejala seperti senyawa opiat yaitu berefek analgesik dan sedasi. Pada dosis ini, kratom mulai digunakan sebagai narkotika (Tanna *et al.*, 2023).

Selain itu, kratom juga mulai dipertimbangkan sebagai alternatif dalam membantu mengatasi gejala putus zat opioid. Senyawa *mitragynine*, sebagai komponen utama dalam kratom, berperan dalam mengurangi gejala withdrawal dan keinginan untuk kembali menggunakan zat seperti morfin atau heroin. Beberapa laporan pengguna menyebutkan bahwa konsumsi kratom secara bertahap dapat membantu mengurangi ketergantungan terhadap opioid, meskipun efektivitas dan keamanannya masih memerlukan dukungan dari studi klinis lebih lanjut. Namun, temuan ini masih memerlukan validasi ilmiah melalui studi klinis lanjutan untuk memastikan efektivitas dan keamanannya. Efek menenangkan dan anti-kecemasan dari kratom juga telah diamati, di mana senyawa alkaloidnya diketahui memberikan rasa relaksasi dan membantu memperbaiki kualitas tidur pada sebagian pengguna (Tanna *et al.*, 2023).

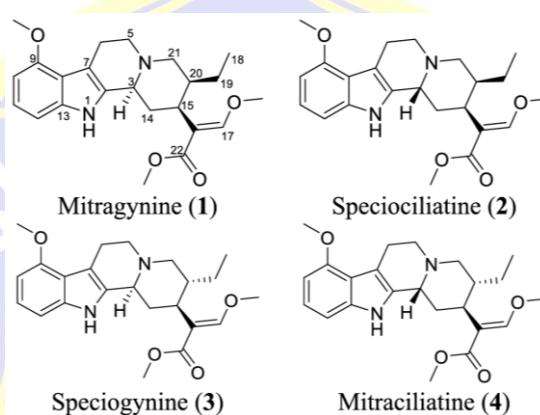
Selain itu, hasil uji laboratorium menunjukkan bahwa kratom memiliki aktivitas sebagai antioksidan, antiinflamasi, antimikroba, dan antikanker, menjadikannya pilihan yang potensial dalam pengembangan obat herbal. Komponen bioaktif lain seperti flavonoid, saponin, dan tanin turut memperkuat manfaat tersebut (Tanna *et al.*, 2023). Walaupun demikian, penggunaan kratom tetap harus dibatasi dan diawasi karena kemiripannya dengan opioid juga membawa risiko ketergantungan serta efek samping, terutama jika dikonsumsi dalam jumlah besar atau dalam jangka panjang.

2.1.4 Kandungan Kimia Kratom

Kratom (*Mitragyna speciosa* Korth.), tanaman tropis dari famili Rubiaceae, diketahui memiliki beragam manfaat farmakologis yang berkaitan erat dengan kandungan senyawa bioaktif di dalamnya. Kandungan utama tanaman ini adalah golongan alkaloid indol dan oksindol, yang secara struktural kompleks dan memberikan efek biologis signifikan. Hingga kini, telah berhasil diidentifikasi lebih dari 54 jenis alkaloid dari daun kratom,

dengan komposisi yang sangat bervariasi tergantung usia daun, asal geografis, varietas, dan kondisi lingkungan (Todd *et al.* 2020; Karunakaran *et al.* 2022).

Senyawa alkaloid yang paling dominan adalah *mitragynine*, yaitu alkaloid indol dengan kerangka *tetrasiklik corynanthe-type* yang ditemukan dalam konsentrasi tinggi (sekitar 66% dari total alkaloid dalam varietas Thailand, dan 6–12% pada varietas Malaysia) (Karunakaran *et al.*, 2022). Senyawa ini juga menunjukkan preferensi terhadap sinyal G-protein tanpa merekrut β -arrestin, sehingga mengurangi risiko efek samping seperti depresi pernapasan (Todd *et al.*, 2020).



Gambar 2.6. Indole Alkaloids: Mitragynine (1) and Its Diastereoisomers (Flores-Bocanegra *et al.*, 2020)

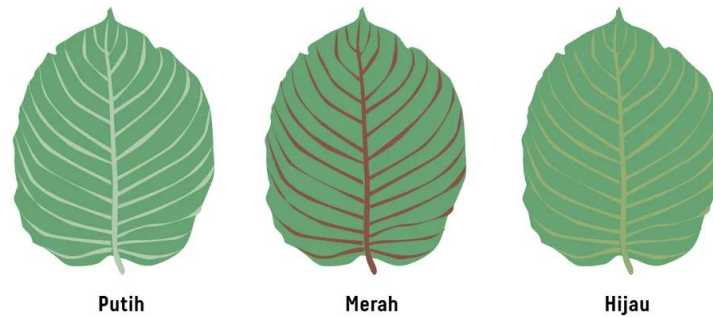
Senyawa metabolit aktifnya, 7-hydroxymitragynine, memiliki afinitas lima kali lebih besar terhadap MOR dan potensi analgesik hingga 40 kali lebih kuat dari morfin, meskipun juga dikaitkan dengan risiko ketergantungan lebih tinggi (Todd *et al.*, 2020). Selain kedua senyawa tersebut, terdapat sejumlah diastereomer mitragynine yang juga telah berhasil diisolasi, seperti speciogynine, speciociliatine, dan mitraciliatine. Perbedaan konfigurasi stereokimia pada posisi C-3, C-15, dan C-20 menghasilkan variasi struktur yang berdampak pada aktivitas biologis masing-masing senyawa (Flores-Bocanegra *et al.*, 2020). Speciogynine dan paynantheine diketahui memiliki efek relaksan otot polos, sedangkan speciociliatine menunjukkan aktivitas lemah pada reseptor opioid. Kratom juga mengandung alkaloid minor lain seperti isopaynantheine, mitragynine-N(4)-oxide, speciofoline, isorotundifoleine, dan corynoxine A/B, termasuk beberapa senyawa oksindol

yang tidak aktif pada reseptor opioid namun mungkin memiliki potensi biologis lainnya (Flores-Bocanegra *et al.* 2020; Todd *et al.* 2020).

Di samping itu, senyawa non-alkaloid dalam kratom meliputi flavonoid, fenolik, triterpenoid, dan saponin, yang berkontribusi terhadap aktivitas antioksidan, antimikroba, dan antiinflamasi. Keberadaan senyawa-senyawa ini memperkaya profil fitokimia kratom, menjadikannya sebagai kandidat bahan baku dalam pengembangan obat herbal dan fitofarmaka (Karunakaran *et al.*, 2022). Variabilitas komposisi kimia kratom sangat dipengaruhi oleh faktor genetik, jenis varietas (merah, hijau, putih), umur panen, lokasi geografis, serta teknik pengolahan dan ekstraksi, termasuk metode UPLC-HRESIMS dan NMR untuk identifikasi senyawa aktif (Flores-Bocanegra *et al.* 2020; Todd *et al.* 2020). Dengan kompleksitas kandungan kimianya, kratom perlu dikaji lebih lanjut dari segi standardisasi komponen aktif, profil farmakokinetik, serta potensi interaksi obat, mengingat beberapa alkaloidnya dapat menghambat enzim CYP450 yang penting dalam metabolisme obat (Todd *et al.*, 2020).

2.1.5 Varietas Daun Kratom

Daun Kratom (*Mitragyna speciosa* Korth.) secara umum diklasifikasikan menjadi tiga varietas utama berdasarkan warna tulang daun bagian tengah, yaitu varietas merah (*red vein*), hijau (*green vein*), dan putih (*white vein*). Perbedaan warna ini bukan hanya ciri morfologis semata, namun juga mencerminkan keragaman komposisi kimia, aktivitas farmakologis, dan efek fisiologis dari masing-masing varietas (Collins *et al.* 2021; Flores-Bocanegra *et al.* 2020). Varietas merah ditandai dengan warna tulang daun yang cenderung merah bata atau kemerahan, sering kali kontras dengan warna hijau daunnya. Varietas hijau memiliki tulang daun berwarna hijau cerah atau hijau kekuningan yang menyatu dengan warna helai daun, dan umumnya tampak segar. Sementara itu, varietas putih memiliki tulang daun berwarna pucat atau kehijauan sangat terang, kadang tampak keputihan atau sedikit perak jika terkena cahaya, dan perbedaannya sering kali hanya bisa dikenali jelas pada daun muda atau segar (Herawatiningsih *et al.*, 2024; Collins *et al.*, 2021). Pengamatan warna tulang daun ini biasanya dilakukan dalam kondisi pencahayaan alami agar perbedaan dapat terlihat jelas.



Gambar 2.7 Perbedaan Morfologi Daun Kratom (*Mitragyna speciosa*) Berdasarkan Warna Tulang Daun (NINGSLAWATI, 2024)

Varietas merah dilaporkan memiliki kandungan *mitragynine* tertinggi, serta lebih banyak mengandung 7-hydroxymitragynine, yang berkontribusi pada efek sedatif, analgesik, dan relaksan otot, sehingga secara tradisional digunakan untuk mengurangi nyeri dan gangguan tidur (Todd *et al.* 2020; Collins *et al.* 2021). Sementara itu, varietas hijau memiliki efek farmakologis yang lebih seimbang antara stimulan dan sedatif. Varian ini biasanya digunakan untuk meningkatkan fokus, ketahanan tubuh, dan energi ringan, tanpa efek mengantuk yang nyata. Adapun varietas putih cenderung memiliki kadar mitragynine yang lebih rendah, namun kaya akan senyawa seperti speciofoline, sehingga lebih sering dimanfaatkan sebagai stimulan, peningkat mood, serta untuk mengatasi kelelahan dan depresi ringan (Flores-Bocanegra *et al.* 2020; Herawatiningsih *et al.* 2024). Menurut laporan studi etnobotani di Desa Labian Ira'ang, kratom merah umumnya dibudidayakan secara sistematis melalui bantuan NGO, sedangkan kratom hijau lebih banyak ditemukan tumbuh liar di hutan sekitar Sungai Kapuas (Herawatiningsih *et al.*, 2024).

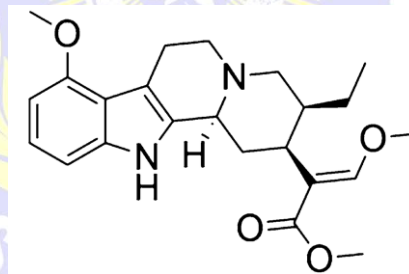
Variasi kimia di antara varietas ini berakar pada profil alkaloid yang khas, terutama perbedaan kadar mitragynine, 7-hydroxymitragynine, speciofoline, paynantheine, dan speciociliatine. Faktor lingkungan seperti iklim, jenis tanah, tinggi tempat, umur panen, serta teknik pascapanen turut memengaruhi profil kimia dan kekuatan efek dari masing-masing varietas (Collins *et al.*, 2021; Fadholi *et al.*, 2023). Dari sudut pandang sosial ekonomi, masyarakat Kapuas Hulu dan sekitarnya memanfaatkan berbagai varietas kratom tidak hanya untuk keperluan kesehatan, tetapi juga sebagai komoditas bernilai ekonomi tinggi, baik untuk pasar lokal maupun ekspor. Varietas merah lebih

disukai dalam pasar internasional karena kandungan senyawa aktifnya lebih tinggi (Collins *et al.*, 2021; Fadholi *et al.*, 2023). Namun demikian, klasifikasi varietas seringkali sulit dibedakan hanya dari warna tulang daun, karena adanya tumpang tindih fenotip antar tanaman. Oleh karena itu, kini telah dikembangkan pendekatan DNA barcoding dan metabolomik untuk membedakan chemotype masing-masing varietas secara lebih akurat (Flores-Bocanegra *et al.*, 2020).

2.2 Mitraginin

2.2.1 Deskripsi dan Struktur Mitraginin

Mitraginin merupakan alkaloid utama dan paling melimpah dalam daun *Mitragyna speciosa* (kratom), yang memiliki peran sentral dalam memberikan efek farmakologis tanaman ini. Alkaloid ini termasuk dalam kelompok indol-monoterpenoid alkaloid, secara struktur diklasifikasikan sebagai turunan corynanthe-type, yang merupakan kerangka tetrasiklik khas pada famili Rubiaceae (Flores-Bocanegra *et al.*, 2020). Penemuan awal senyawa ini dilakukan oleh Ellen Field pada tahun 1921, namun struktur kimianya baru berhasil diuraikan sepenuhnya pada tahun 1960-an melalui pendekatan spektroskopi lanjutan (Shellard, 1974 dalam Flores-Bocanegra *et al.* 2020).



Gambar 2.8 Struktur Kimia Mitragynine (Todd *et al.*, 2020)

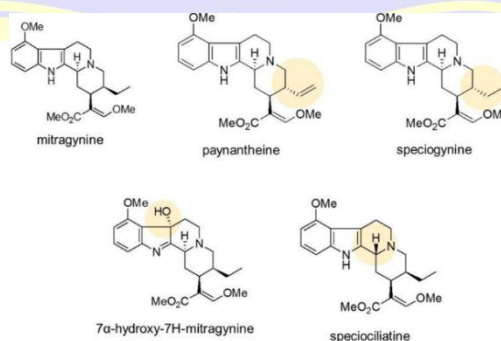
Secara kimiawi, mitraginin memiliki rumus molekul $C_{23}H_{30}N_2O_4$, berat molekul sebesar 398,50 g/mol, dan nama IUPAC-nya adalah: *methyl (E)-2-[(2S,3S,12bS)-3-ethyl-1,2,3,4,6,7,12,12b-octahydroindolo[3,2-h]quinolizin-2-yl]-3-methoxyprop-2-enoate* (Karunakaran *et al.*, 2022). Struktur mitraginin terdiri dari sistem cincin indol yang tergabung dalam sistem kuinolizidin tetrasiklik, dengan substituen utama berupa gugus etil pada C-3, gugus metoksi pada sisi prop-2-enoat, dan gugus ester metil. Keunikan stereokimia mitraginin terletak pada konfigurasi absolut karbon C-2, C-3, dan C-12b, yang

menentukan afinitas interaksi terhadap target biologis. Konfigurasi alami mitraginin adalah 2S,3S,12bS, yang membedakannya dari diastereomer seperti speciogynine atau speciociliatine, yaitu efek farmakologisnya yang berbeda (Flores-Bocanegra *et al.*, 2020).

Teknik identifikasi struktur mitraginin umumnya dilakukan menggunakan metode canggih seperti *Nuclear Magnetic Resonance* (NMR), *High-Resolution Mass Spectrometry* (HR-MS), dan *Ultra-Performance Liquid Chromatography* (UPLC). Metode ini memungkinkan peneliti untuk mendapatkan informasi yang akurat mengenai struktur dan kemurnian senyawa. Mitraginin bersifat lipofilik, yang berarti tidak larut dalam air tetapi larut dalam pelarut organik seperti etanol dan metanol. Sifat ini sangat penting dalam proses ekstraksi dan isolasi senyawa dari matriks daun kratom, yang sering digunakan dalam penelitian untuk memahami potensi terapeutik dan efek samping dari senyawa ini (Flores-Bocanegra *et al.*, 2020; Karunakaran *et al.*, 2022).

2.2.2 Jenis-Jenis Mitraginin

Berdasarkan struktur stereokimia dan hasil isolasi, mitraginin dan senyawa-senyawa sejenisnya dapat diklasifikasikan ke dalam beberapa kelompok utama yang dikenal sebagai diastereomer dan turunan mitraginin. Perbedaan utama antara jenis-jenis ini terletak pada konfigurasi atom karbon tertentu (terutama di posisi C-3, C-15, dan C-20) serta gugus fungsional yang terikat, yang berdampak pada aktivitas biologis dan farmakologis masing-masing senyawa (Flores-Bocanegra *et al.*, 2020; Todd *et al.*, 2020). Berikut ini adalah beberapa jenis utama mitraginin:



Gambar 2.9 Struktur Kimia jenis utama mitraginin (Sengnon *et al.*, 2023)

- a) Mitragynine: Memiliki struktur indol dengan cincin benzena menyatu dengan cincin pirol melalui ikatan C-C, gugus metoksi (-OCH₃) pada C-9, dan gugus ester metil pada rantai samping dengan konfigurasi 2S,3S,12bS. (Todd *et al.*, 2020).
- b) Paynantheine: Diastereomer mitraginin dengan perbedaan konfigurasi stereokimia pada C-3, mengakibatkan orientasi berbeda gugus hidroksil dan ikatan C-H namun mempertahankan kerangka indol yang sama (Kruegel & Grundmann, 2018).
- c) Speciogynine: Diastereomer dengan konfigurasi 2S,3R,12bS, berbeda dari mitraginin pada pusat kiral C-3 dengan inversi ikatan C-H dan C-OH yang mengubah orientasi spasial molekul (Flores-Bocanegra *et al.*, 2020).
- d) 7 α -Hydroxy-7H-mitragynine (7-HMG): Terbentuk melalui hidroksilasi C-7 mitraginin, menambahkan gugus hidroksil (-OH) yang menciptakan ikatan C-O baru dan meningkatkan polaritas molekul (Kruegel & Grundmann, 2018).
- e) Speciociliatine: Memiliki konfigurasi 2S,3R,12bR dengan perubahan pada dua pusat kiral (C-3 dan C-12b), mengakibatkan reorientasi ikatan di sekitar pusat kiral tersebut (Todd *et al.*, 2020).

2.2.3 Aktivitas Farmakologi Mitraginin

Mitraginin berperan sebagai agonis parsial reseptor μ -opioid (MOR) dengan aktivitas pada reseptor δ -opioid, α 2-adrenergik, dan 5-HT_{2A} serotonin, memberikan efek ansiolitik dan euforia ringan. Keunggulan utamanya adalah tidak menginduksi rekrutmen β -arrestin 2 yang terkait dengan efek samping opioid klasik seperti depresi pernapasan dan ketergantungan berat (Flores-Bocanegra *et al.* 2020). Mitraginin juga memodulasi reseptor serotonin dan dopamin, menghasilkan efek stimulan dan antidepresan ringan pada dosis rendah.

Farmakokinetiknya menunjukkan absorpsi cepat dengan T_{max} 1-2 jam dan waktu paruh 3-4 jam (Chakraborty *et al.*, 2021). Metabolisme utama melalui enzim CYP3A4 dan CYP2D6 menghasilkan metabolit aktif 7-hydroxymitragynine sebelum diekskresikan melalui empedu dan urin. Fraksi

n-heksan kratom yang kaya mitraginin menunjukkan efek antinosiseptif melebihi morfin pada dosis tinggi (Hughes *et al.*, 2022).

Uji toksisitas pra-klinik menunjukkan dosis tunggal hingga 100 mg/kg relatif aman, namun paparan kronis >50 mg/kg per hari selama 28 hari dapat menyebabkan perubahan histopatologi ringan pada hati dan ginjal serta penurunan berat badan. Mitraginin berpotensi menyebabkan ketergantungan pada penggunaan kronis dan menghambat CYP2D6 dan CYP3A4, sehingga dapat menimbulkan interaksi farmakokinetik dengan obat lain (Todd *et al.* 2020; Kamble *et al.*, 2023).

2.2.4 Metabolisme Mitraginin

Mitraginin merupakan alkaloid utama yang diproduksi secara alami oleh tanaman *Mitragyna speciosa* melalui jalur biosintesis alkaloid indol-monoterpenoid, yang merupakan hasil lintasan gabungan antara jalur biosintesis asam amino aromatik (shikimat/indol) dan jalur mevalonat yang menghasilkan senyawa terpenoid. Proses awal sintesis senyawa ini dimulai dari L-triptofan, yang mengalami reaksi dekarboksilasi dengan bantuan enzim tryptophan decarboxylase (TDC), membentuk tryptamin, yaitu senyawa dengan gugus indol yang menjadi kerangka dasar pembentukan alkaloid. Selanjutnya, tryptamin mengalami kondensasi dengan geranyl pirofosfat (GPP), yang merupakan produk dari jalur mevalonat, melalui reaksi yang dikatalisis oleh enzim strictosidin sintase (STR). Reaksi ini menghasilkan strictosidin, yang berperan sebagai prekursor penting dalam pembentukan hampir seluruh jenis alkaloid indol-monoterpen (Kruegel and Grundmann 2018; Karunakaran *et al.* 2022).

Tahap berikutnya mencakup berbagai proses enzimatik lanjutan seperti pemutusan glikosida, oksidasi, metilasi, hidroksilasi, dan pembentukan cincin, yang dimediasi oleh enzim-enzim seperti strictosidin β -D-glucosidase (SGD), O-methyltransferase (OMT), serta enzim cytochrome P450 monooxygenase. Kombinasi reaksi tersebut memungkinkan terbentuknya struktur khas alkaloid corynanthe-type tetracyclic, yang menjadi ciri utama dari mitraginin, termasuk penambahan gugus metoksi dan etil pada posisi tertentu. Produk akhir dari rangkaian biosintesis ini adalah mitraginin, serta sejumlah isomer lainnya

seperti speciogynine dan speciociliatine, yang kemudian terakumulasi dalam jaringan daun tanaman (Flores-Bocanegra *et al.*, 2020). Selain itu, aktivitas enzim pada tahap akhir biosintesis turut memengaruhi pembentukan alkaloid lain seperti 7-hydroxymitragynine, meskipun senyawa ini lebih banyak dihasilkan sebagai hasil metabolisme mitraginin di dalam tubuh hewan atau manusia.

2.2.5 Faktor yang Mempengaruhi Kadar Mitraginin

Kandungan mitraginin sebagai alkaloid mayor dalam daun *Mitragyna speciosa* sangat dipengaruhi oleh kombinasi berbagai faktor, baik dari dalam tanaman (intrinsik) maupun dari lingkungan eksternal (ekstrinsik). Variasi kadar mitraginin antar varietas dan wilayah geografis menunjukkan bahwa faktor lokasi tumbuh memiliki peran penting. Beberapa laporan menyebutkan bahwa tanaman kratom dari Thailand mengandung mitraginin hingga sekitar 66% dari total alkaloid, sedangkan dari Malaysia hanya sekitar 12–13%, dan dari daerah Kapuas Hulu di Indonesia mengandung sekitar 54% (Collins *et al.*, 2021; Karunakaran *et al.*, 2022). Perbedaan tersebut mencerminkan dampak dari kondisi lingkungan seperti iklim, ketinggian, jenis tanah, intensitas cahaya matahari, dan ketersediaan air terhadap ekspresi genetik tanaman yang mengatur biosintesis metabolit sekunder.

Tidak hanya lokasi tumbuh, varietas kratom juga menentukan kandungan mitraginin. Jenis kratom berdasarkan warna tulang daun, seperti varietas merah, diketahui memiliki kandungan mitraginin lebih tinggi dibandingkan dengan varietas hijau maupun putih. Variasi ini sering kali disertai perbedaan kadar senyawa bioaktif lain seperti 7-hydroxymitragynine, speciogynine, dan speciociliatine (Todd *et al.*, 2020). Perbedaan ini mencerminkan adanya perbedaan tipe kimia (*chemotype*) dan aktivitas jalur biosintetik antar-varietas, yang dikendalikan oleh ekspresi enzim seperti strictosidin synthase (STR), O-methyltransferase (OMT), dan cytochrome P450 monooxygenase (Flores-Bocanegra *et al.*, 2020).

Selain itu, tingkat kematangan daun juga memengaruhi kandungan mitraginin. Daun yang lebih tua cenderung memiliki kadar senyawa lebih tinggi dibandingkan daun muda, seiring meningkatnya akumulasi metabolit

sekunder sebagai bagian dari mekanisme pertahanan tanaman terhadap tekanan lingkungan. Faktor musim juga turut berperan, dalam hal ini paparan sinar matahari dan rendahnya kelembapan selama musim kemarau cenderung merangsang produksi metabolit aktif yang lebih tinggi dibandingkan musim penghujan (Herawatiningsih *et al.*, 2024; Kruegel & Grundmann, 2018). Oleh karena itu, penentuan waktu panen yang tepat menjadi aspek penting dalam menjamin kualitas bahan baku.

Tahapan pascapanen dan proses pengolahan, turut serta memengaruhi stabilitas kandungan mitraginin. Misalnya, pengeringan yang dilakukan secara langsung di bawah sinar matahari dalam waktu lama dapat menyebabkan degradasi senyawa akibat paparan sinar UV dan proses oksidatif. Sebaliknya, metode pengeringan di ruang tertutup atau dengan sirkulasi udara terkontrol dinilai lebih efektif dalam menjaga stabilitas kandungan alkaloid (Karunakaran *et al.*, 2022).

2.3 Ekstraksi

2.3.1 Pengertian Ekstraksi

Ekstraksi merupakan teknik penting dalam bidang farmasi, kimia, dan bioteknologi yang digunakan untuk memisahkan zat aktif atau komponen kimia tertentu dari bahan alami, biasanya dengan menggunakan pelarut yang sesuai. Secara garis besar, proses ini melibatkan pemisahan suatu zat terlarut dari campurannya berdasarkan perbedaan tingkat kelarutan antara zat target dengan senyawa lainnya di dalam pelarut tertentu (Mosić *et al.*, 2020). Tujuan utama dari ekstraksi adalah memperoleh senyawa yang bernilai guna, seperti komponen bioaktif yang banyak dimanfaatkan dalam produk obat-obatan, makanan, maupun kosmetik. Dalam pengolahan simplisia atau tanaman obat, teknik ini digunakan untuk mengambil metabolit sekunder seperti alkaloid, flavonoid, tanin, saponin, dan senyawa bioaktif lain yang memiliki potensi farmakologis (Mueller, 2022).

Proses ekstraksi dapat dibedakan berdasarkan apakah prosedurnya melibatkan pemanasan atau tidak. Penggunaan suhu berpengaruh besar terhadap keberhasilan ekstraksi, tergantung pada jenis senyawa yang ingin diisolasi setelah proses berlangsung (Poole, 2023). Berdasarkan

pendekatannya, metode ekstraksi terbagi menjadi dua kelompok utama: metode konvensional dan non-konvensional (modern). Ekstraksi modern mencakup teknik seperti *Ultrasonic-Assisted Extraction* (UAE), *Supercritical Fluid Extraction* (SFE), *Pressurized Liquid Extraction* (PLE), *High Pressure Assisted Extraction* (HPAE), *Accelerated Solvent Extraction* (ASE), dan *Microwave-Assisted Extraction* (MAE). Keunggulan teknik-teknik ini antara lain durasi ekstraksi yang lebih singkat, penggunaan pelarut yang ramah lingkungan, dan tidak memerlukan proses penyaringan tambahan. Namun demikian, metode ini kurang cocok untuk senyawa yang sensitif terhadap panas, serta memerlukan alat khusus dan biaya yang tidak murah (Farooq *et al.*, 2022; Yao, 2022).

Metode ekstraksi konvensional digolongkan berdasarkan bentuk substansi dalam campuran (meliputi ekstraksi padat-cair, dan ekstraksi cair-cair), penggunaan panas (meliputi ekstraksi secara dingin dan panas), dan proses pelaksanaan (meliputi ekstraksi berkesinambungan dan ekstraksi bertahap) (Hammad *et al.*, 2021). Ekstraksi secara panas meliputi sokletasi, refluks, digesti, dan infusa. Sedangkan ekstraksi secara dingin meliputi maserasi dan perkolasi. Pada proses ekstraksi secara panas membutuhkan pemanasan yang mendekati suhu didih karena dengan adanya pemanasan akan mempercepat proses ekstraksi, sedangkan pada ekstraksi secara dingin dilakukan dalam suhu kamar dan dapat memperkecil terjadinya kerusakan senyawa yang tidak tahan panas (Lee, 2019).

2.3.2 Ekstraksi Maserasi

Maserasi adalah metode ekstraksi yang sangat sederhana yang dilakukan pada suhu kamar, umumnya digunakan untuk mengekstraksi senyawa dari bahan alam seperti daun, bunga, atau rempah-rempah. Teknik ini dilakukan dengan merendam bahan padat ke dalam pelarut selama waktu tertentu agar senyawa aktif terlarut secara perlahan. Maserasi sangat cocok digunakan untuk bahan yang sensitif terhadap panas (termolabil) atau berserat yang sulit diekstraksi menggunakan metode lain (Mungwari *et al.* 2025; Baladraf *et al.*, 2022). Selama proses berlangsung, pelarut akan meresap ke dalam jaringan tanaman, menghancurkan dinding sel, dan memungkinkan senyawa target

keluar melalui proses difusi secara bertahap. Durasi maserasi bisa bervariasi tergantung pada jenis bahan dan sifat senyawa yang diinginkan, dengan rasio pelarut terhadap bahan yang tepat menjadi faktor penting dalam menentukan efektivitas hasil ekstraksi. Secara umum, waktu maserasi berlangsung antara 3 hingga 7 hari, namun dapat disesuaikan tergantung pada tujuan ekstraksi dan karakteristik bahan yang digunakan (Vassilis Athanasiadis, 2023).

Proses ini dipengaruhi oleh sejumlah faktor seperti ukuran partikel, porositas bahan, serta komposisi kimia bahan yang memengaruhi efisiensi pelepasan senyawa. Sifat pelarut, seperti polaritas dan viskositas, turut menentukan stabilitas dan kemampuan ekstraksinya (Dong *et al.*, 2022). Suhu dan durasi maserasi juga berperan besar, meskipun suhu yang lebih tinggi cenderung meningkatkan hasil ekstrak, hal ini juga dapat mempercepat degradasi senyawa sensitif. Oleh karena itu, maserasi pada suhu ruang sering dipilih untuk menjaga kestabilan komponen bioaktif. Intensitas pengadukan juga menjadi aspek penting karena mempercepat kontak antara pelarut dan bahan, meningkatkan difusi senyawa. Selain itu, pengaturan pH dan kekuatan ionik pelarut dapat membantu meningkatkan kelarutan dan stabilitas senyawa selama proses berlangsung (Baladraf *et al.*, 2022).

Meskipun memiliki kelebihan dalam mempertahankan integritas senyawa termolabil, metode maserasi juga memiliki beberapa kelemahan. Waktu ekstraksi yang relatif lama menjadi salah satu kendala utama, karena membutuhkan beberapa hari untuk mencapai hasil maksimal. Selain itu, efisiensi ekstraksi cenderung lebih rendah dibandingkan metode modern yang memanfaatkan tekanan, suhu, atau gelombang tertentu. Metode ini juga membutuhkan volume pelarut yang besar, dan dalam skala industri, hal ini bisa berdampak pada biaya dan limbah pelarut yang dihasilkan (Lazarevska *et al.*, 2022).

2.3.3 Pelarut Ekstraksi

Pelarut menentukan efektivitas ekstraksi berdasarkan sifat kimia senyawa target, khususnya polaritasnya. Pelarut polar (air, etanol, metanol) mengekstraksi senyawa polar seperti flavonoid dan tanin, sedangkan pelarut non-polar (heksana, etil asetat, kloroform) untuk senyawa non-polar seperti

minyak atsiri. Prinsip *like dissolves like* menjadi dasar pemilihan pelarut yang sesuai.

Kriteria pelarut ideal meliputi kemampuan ekstraktif tinggi, toksisitas rendah, mudah menguap, stabil terhadap suhu, ramah lingkungan, dan mudah didaur ulang (Yaseen *et al.*, 2021). Penggunaan campuran pelarut seringkali lebih efektif daripada pelarut tunggal untuk mengekstraksi seluruh senyawa bioaktif. Kombinasi etil asetat dan air banyak digunakan dalam fraksinasi bertingkat atau ekstraksi cair-cair.

Ekstraksi daun kratom (*Mitragyna speciosa*) menggunakan kombinasi etil asetat-air efektif untuk pemurnian alkaloid seperti mitraginin. Setelah ekstraksi awal dengan pelarut polar, fraksinasi lanjutan dengan etil asetat-air memisahkan alkaloid dari komponen polar non-aktif. Etil asetat melarutkan alkaloid bebas karena sifat semi-polarnya, sementara air mempertahankan senyawa polar di fasa air. Teknik ini meningkatkan selektivitas dan kemurnian ekstrak untuk isolasi senyawa aktif kratom (Purwayantie *et al.*, 2022; Lelono *et al.*, 2021).

2.3.4 Studi Terdahulu Terkait Analisis Mitraginin

Berbagai penelitian telah dilakukan untuk mengidentifikasi dan menganalisis kandungan mitraginin dari daun *Mitragyna speciosa* menggunakan teknik kromatografi dan spektrometri. Mitraginin, sebagai senyawa alkaloid utama dalam daun kratom, sering dianalisis menggunakan metode seperti Kromatografi Lapis Tipis (KLT), *Gas Chromatography* (GC), *Gas Chromatography-Mass Spectrometry* (GC-MS), dan *Liquid Chromatography-High Resolution Mass Spectrometry* (LC-HRMS). Metode ini digunakan tidak hanya untuk tujuan identifikasi, tetapi juga untuk kuantifikasi dan pemurnian senyawa target secara akurat, yang sangat penting dalam penelitian farmakologi dan pengembangan obat.

Penelitian oleh Livia Elsa *et al.* (2016) menunjukkan bahwa fraksi mitraginin berhasil dipisahkan dari ekstrak metanol:kloroform (4:1) menggunakan metode KLT preparatif, menghasilkan nilai R_f sekitar 0,5. Fraksi dan dianalisis lebih lanjut menggunakan GC-MS dan KLT-densitometri. Hasil analisis menunjukkan puncak kromatogram yang konsisten pada waktu retensi

tertentu, menandakan keberadaan mitraginin dengan jelas. Temuan ini menunjukkan bahwa metode sederhana seperti KLT masih dapat digunakan secara efektif bila dikombinasikan dengan teknik instrumentasi modern seperti GC-MS.

Penelitian lainnya oleh Dona Fitria *et al.* (2016) menggunakan kombinasi pelarut n-heksan:etil asetat:amonia 25% dengan rasio 30:15:1 untuk mengekstraksi mitraginin. Identifikasi dilakukan menggunakan dua metode, yaitu LC-HRMS QToF dan GC-MS. Hasil analisis menunjukkan waktu retensi (Rt) mitraginin sebesar 7,14 menit dan nilai m/z sebesar 399,2274 [M+H]⁺, yang merupakan ciri khas senyawa mitraginin. Data ini menjadi referensi penting dalam pengembangan metode analisis dan validasi senyawa bioaktif dari kratom, serta berguna dalam studi metabolomik dan farmakokinetik.

Sementara itu, Annisa Dwi Fahmi (2020) melaporkan penggunaan GC-MS (Shimadzu GCMS QP-2010) untuk menganalisis fraksi mitraginin yang diekstrak dari campuran metanol:kloroform (4:1) setelah dilakukan proses sonikasi selama 60 menit. Hasil kromatogram menunjukkan puncak mitraginin yang jelas pada waktu retensi tertentu, mengindikasikan bahwa senyawa tersebut berhasil diisolasi dengan baik. Penelitian ini juga menggarisbawahi manfaat sonikasi dalam mempercepat proses ekstraksi dan meningkatkan hasil senyawa aktif yang diinginkan, sangat relevan dalam praktik yang menuntut efisiensi tinggi. Lebih lanjut, riset oleh Chakraborty *et al.* (2021) mengungkap bahwa teknik GC juga mampu memberikan gambaran menyeluruh mengenai profil metabolit mitraginin, termasuk potensi interaksinya dengan senyawa lain.

2.4 Fraksinasi Cair-Cair Asam-Basa

Fraksinasi merupakan proses pemisahan komponen-komponen kimia berdasarkan perbedaan sifat kepolaran dan kelarutan dalam pelarut tertentu. Fraksinasi adalah proses untuk memisahkan golongan utama kandungan senyawa yang satu dengan golongan utama yang lainnya dari suatu ekstrak sebelum dilakukan kromatografi lebih lanjut (Putri *et al.*, 2023). Metode fraksinasi asam basa merupakan teknik pemisahan yang efektif untuk mengisolasi senyawa-senyawa alkaloid dari ekstrak kasar tanaman. Proses ini

didasarkan pada sifat kimia alkaloid yang bersifat basa lemah dan dapat membentuk garam dengan asam mineral, sehingga kelarutannya dalam air meningkat (Khafid *et al.*, 2023). Senyawa akan lebih terlarut pada pelarut yang memiliki kemiripan sifat dengan senyawa tersebut. Sifat kimia yang membedakan senyawa nitrogen (alkaloid mitraginin) dari senyawa organik lain adalah dari sifat kebiasaannya, jadi membentuk garam dengan asam mineral. Alkaloid memiliki struktur heterosiklik dengan atom nitrogen sebagai komponen utama yang memberikan sifat basa pada senyawa tersebut, sehingga mudah bereaksi dengan asam membentuk garam yang larut air.

Prinsip fraksinasi asam basa melibatkan perubahan alkaloid bebas menjadi garam alkaloid dengan penambahan asam lemah seperti asam asetat 10%. Pada kondisi asam (pH 2-3), alkaloid terprotonasi membentuk garam yang larut dalam fase air, sedangkan senyawa nonpolar tetap di fase organik. Ekstraksi dilakukan dengan pelarut asam lemah, lalu alkaloid dibebaskan kembali menggunakan basa lemah sesuai reaksi pada **Gambar 2.11**. Menurut Divekar *et al.* (2022), alkaloid sebagai metabolit sekunder berperan dalam pertahanan tanaman dan berpotensi sebagai bahan farmasi melalui proses ekstraksi dan fraksinasi yang tepat. Alkaloid amina mitraginin bereaksi dengan asam asetat akan membentuk garam alkilamonium. Jenis reaksi amina ini digunakan untuk memisahkan amina dari zat netral atau zat yang larut dalam air bersuasana asam. Reaksi amina dapat dilihat pada **Gambar 2.10** berikut ini:



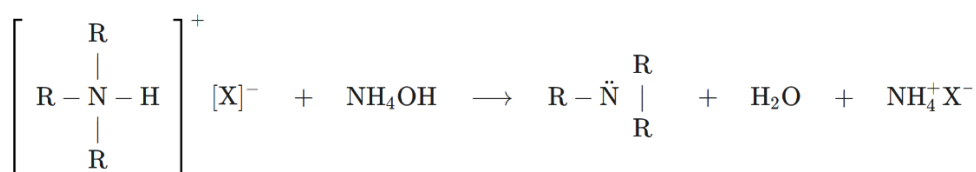
Gambar 2.10 Reaksi Amina dengan Asam Kuat

Metode ekstraksi cair-cair merupakan teknik pemisahan yang memanfaatkan perbedaan kelarutan suatu zat dalam dua pelarut yang tidak saling campur (immiscible). Pemisahan senyawa alkaloid menggunakan metode ini didasarkan pada prinsip distribusi zat terlarut antara dua fase cair yang berbeda tingkat kepolarannya (Ganjar & Rohman, 2012). Keberhasilan metode ini sangat bergantung pada koefisien distribusi (Kd) alkaloid antara fase organik dan fase air, yang dipengaruhi oleh pH larutan, jenis pelarut organik yang digunakan, dan struktur kimia alkaloid itu sendiri (Adysti, 2023).

Partisi menggunakan pelarut organik seperti etil asetat atau kloroform bertujuan agar senyawa-senyawa yang memiliki kepolaran yang sama dengan pelarut tersebut akan berpartisipasi ke fase organik. Nassel (2008) telah melakukan fraksinasi ekstrak metanol dari daun kratom (*Mitragyna speciosa*) dengan penambahan asam asetat 10% dan basa kemudian dipartisi dengan kloroform menghasilkan rendemen fraksi alkaloid sebesar 2,5%, sedangkan fraksi etil asetat basa 0,077% dan keduanya diuji dengan pereaksi menghasilkan positif alkaloid.

Robinson (1995) menjelaskan pemisahan alkaloid mitraginin melalui penyekatan pada pH tertentu dengan pelarut organik (asam asetat). Pada sampel daun kratom, alkaloid dalam bentuk garam akibat pengasaman dibebaskan dari ikatan garamnya dengan penambahan basa yang lebih kuat, sehingga terbentuk alkaloid bebas. Alkaloid bebas kemudian diekstraksi dengan pelarut tertentu, misalnya kloroform. Secara umum, proses dimulai dengan ekstraksi bahan yang diasamkan untuk membentuk garam amina, lalu meningkatkan kelarutan alkaloid dalam air dan memisahkannya melalui pelepasan garam sebelum ekstraksi pelarut (Robinson, 1995).

Alkaloid amina mitraginin bereaksi dengan asam asetat akan membentuk garam alkilamonium. Jenis reaksi amina ini digunakan untuk memisahkan amina dari zat netral atau zat yang larut dalam air bersuasana asam. Reaksi amina dapat dilihat pada **Gambar 2.11** berikut ini:



Gambar 2.11 Reaksi Pembebasan Amina dengan Cara Pembasaan

Garam alkaloid mitraginin dari hasil pengasaman dapat dibasakan dengan penambahan NH_4OH yang semula dalam bentuk garamnya yang larut dalam air akan menjadi alkaloid bebas yang tidak larut dalam air tapi larut dalam pelarut organik seperti kloroform atau eter. Proses ini merupakan proses terendapkan secara terpisah dari ekstrak tersebut dengan menambahkan ammonia (Harborne, 1987).

Prosedur fraksinasi asam-basa mitraginin dari daun kratom meliputi beberapa tahap. Ekstrak daun kratom diasamkan dengan asam asetat 10% untuk membentuk garam alkaloid mitraginin yang larut dalam fase air. Fase air kemudian dipartisi dengan pelarut organik non-polar seperti etil asetat untuk memisahkan senyawa non-alkaloid. Garam alkaloid dalam fase air dibasakan dengan NH_4OH untuk membebaskan alkaloid dari bentuk garamnya menjadi alkaloid bebas. Alkaloid bebas diekstraksi dengan kloroform karena larut dalam pelarut organik non-polar. Fraksi kloroform yang mengandung alkaloid mitraginin dipadatkan untuk langkah pemurnian selanjutnya dengan kromatografi.

2.5 TLC Densitometer

Thin Layer Chromatography-Densitometry merupakan teknik analisis yang menggabungkan pemisahan kromatografi lapis tipis dengan deteksi densitometri untuk analisis kuantitatif senyawa. Densitometer mengukur intensitas cahaya yang diabsorpsi atau dipantulkan oleh senyawa yang telah terpisah pada plat KLT kemudian mengubahnya menjadi sinyal listrik yang dapat dikuantifikasi. Metode ini memiliki keunggulan berupa biaya operasional rendah, preparasi sampel sederhana, dan kemampuan menganalisis banyak sampel secara simultan.

Deteksi menggunakan panjang gelombang ultraviolet merupakan mode yang paling umum digunakan dalam TLC-densitometri karena banyak senyawa organik memiliki gugus kromofor yang dapat mengabsorpsi radiasi UV. Deteksi UV dilakukan pada rentang panjang gelombang 190-400 nm, dengan panjang gelombang 254 nm dan 366 nm sebagai pilihan standar. Pada mode absorpsi, senyawa yang memiliki sistem ikatan rangkap terkonjugasi atau gugus aromatik akan menyerap radiasi UV dan menghasilkan puncak pada densitogram yang sebanding dengan konsentrasi senyawa.

TLC-densitometri telah banyak diaplikasikan untuk analisis alkaloid dari berbagai sumber tanaman. Alkaloid indol seperti mitraginin memiliki struktur aromatik dengan sistem terkonjugasi yang memberikan absorpsi kuat pada daerah UV, sehingga TLC-densitometri efektif untuk analisis kuantitatif alkaloid dengan sensitivitas dan selektivitas yang optimal. Mitraginin sebagai

alkaloid indol utama dalam kratom memiliki struktur molekul dengan gugus indol yang terkonjugasi dengan sistem aromatik sehingga memberikan absorpsi maksimum pada panjang gelombang sekitar 254 nm.

Chittrakarn *et al.* (2010) mengembangkan metode TLC-densitometri untuk penetapan kadar mitraginin dalam daun kratom menggunakan plat silika gel 60 F₂₅₄ dengan fase gerak campuran pelarut organik. Deteksi dilakukan pada panjang gelombang 254 nm dengan nilai R_f mitraginin berkisar 0,35-0,45 tergantung komposisi fase gerak. Metode ini menunjukkan linearitas yang baik dengan nilai r lebih besar dari 0,99, presisi tinggi dengan persentase RSD kurang dari 2 persen, dan akurasi optimal untuk analisis kuantitatif mitraginin.

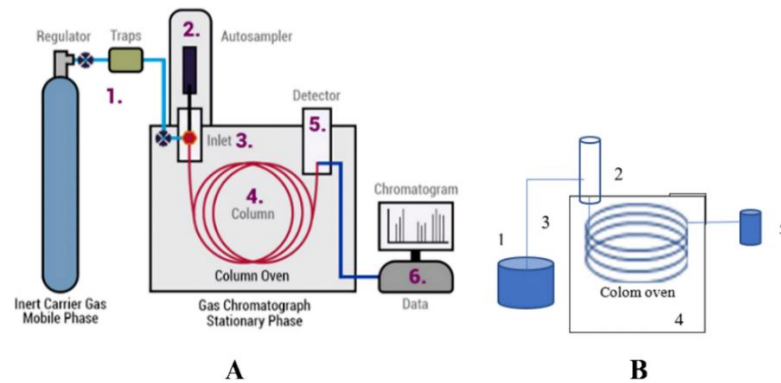
Spesifisitas dalam TLC-densitometri dicapai melalui pemisahan berdasarkan polaritas dan interaksi dengan fase diam, serta deteksi pada panjang gelombang spesifik. Spesifisitas metode analisis mitraginin dikonfirmasi dengan kesamaan nilai R_f ($\pm 0,02$), profil spektra UV, dan tidak adanya interferensi pada puncak mitraginin, serta resolusi antar puncak ($R_s \geq 1,0$) yang menunjukkan pemisahan yang baik.

2.6 Gas Chromatography

Gas chromatography (GC) merupakan teknik analisis instrumental yang sangat penting dalam bidang kimia analitik modern. Metode ini didasarkan pada prinsip pemisahan senyawa-senyawa volatil atau semi-volatil berdasarkan perbedaan afinitas terhadap fase diam dan fase gerak gas. Teknik ini pertama kali dikembangkan oleh Martin dan Synge pada tahun 1952 dan telah mengalami perkembangan pesat hingga saat ini (Leppert, 2022).

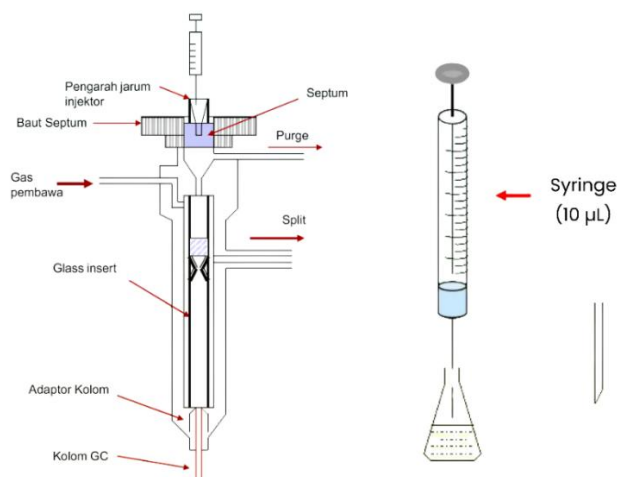
2.6.1 Instrumen Gas Chromatography

Sistem *gas chromatography* (GC) terdiri dari beberapa komponen utama yang bekerja secara terintegrasi untuk menghasilkan analisis yang akurat dan presisi. Komponen-komponen tersebut meliputi sistem injeksi sampel, kolom kromatografi, detektor, dan sistem pengolahan data (Patil *et al.*, 2023). Setiap komponen memiliki peran penting dalam memastikan bahwa analisis dapat dilakukan dengan efisien dan keakuratan hasil yang diperoleh.



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 *et al.*, 2023)

Sistem injeksi sampel berfungsi untuk memasukkan sampel ke dalam aliran gas pembawa dengan cara yang terstandarisasi dan dapat diulang. Terdapat beberapa jenis metode injeksi yang umum digunakan, yaitu split injection, splitless injection, dan on-column injection. Split injection digunakan untuk sampel dengan konsentrasi tinggi, di mana sebagian dari sampel dibuang untuk mencegah overload pada kolom. Splitless injection, di sisi lain, digunakan untuk sampel dengan konsentrasi rendah, memungkinkan seluruh sampel masuk ke dalam kolom untuk analisis yang lebih sensitif. On-column injection adalah metode yang lebih lembut, di mana sampel dimasukkan langsung ke dalam kolom tanpa pemanasan awal, sehingga cocok untuk analit yang termolabil (Wang & Zhou, 2020). Pemilihan jenis injeksi bergantung pada konsentrasi analit, volatilitas sampel, dan tujuan analisis, yang semuanya harus dipertimbangkan untuk mencapai hasil yang optimal.

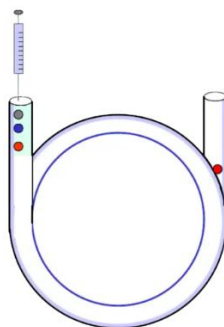


Gambar 2.13 Bagan letak injeksi (Injektor) GC (Andriana, Y., 2019)

kolom kromatografi merupakan inti dari sistem GC yang berperan dalam pemisahan komponen-komponen sampel. Kolom dapat berupa kolom packed atau kolom kapiler, dengan kolom kapiler lebih umum digunakan karena memberikan efisiensi pemisahan yang lebih tinggi. Kolom kapiler memiliki diameter yang lebih kecil dan panjang yang lebih besar, yang memungkinkan interaksi yang lebih baik antara fase diam dan analit. Fase diam yang digunakan dapat berupa cairan non-polar, polar, atau chiral tergantung pada sifat analit yang akan dianalisis. Terdapat tiga jenis utama fase diam dalam kromatografi gas, yaitu: fase diam non-polar seperti dimetilpolisiloksan yang cocok untuk senyawa non-polar, fase diam polar seperti polietilen glikol untuk senyawa polar, dan fase diam kiral yang dirancang khusus untuk memisahkan enansiomer (senyawa optis aktif) dalam campuran (Mametov *et al.*, 2021). Pemilihan fase diam yang tepat sangat penting untuk mencapai pemisahan yang baik, karena sifat polaritas dan interaksi kimiawi antara analit dan fase diam akan mempengaruhi waktu retensi dan resolusi pemisahan.



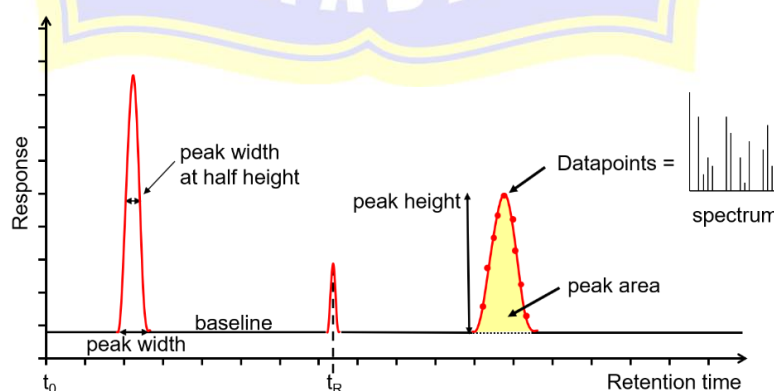
Gambar 2.14 Tiga jenis kolom kromatografi gas (GC) berdasarkan jenis fasa diam yang digunakan (Andriana, Y., 2019)



Gambar 2.15 Mekanisme Pemisahan Didalam Kolom
(Andriana, Y., 2019)

Sistem kontrol suhu ruang kolom sangat krusial dalam operasi GC karena suhu mempengaruhi volatilitas senyawa dan efisiensi pemisahan. Program suhu dapat berupa *isothermal* (suhu konstan) atau *temperature programming* (peningkatan suhu secara bertahap) sesuai dengan karakteristik sampel yang dianalisis. Dalam *temperature programming*, suhu awal biasanya ditetapkan rendah untuk memisahkan senyawa yang lebih volatil, kemudian suhu dinaikkan secara bertahap untuk memisahkan senyawa yang kurang volatil. Metode ini memungkinkan analisis yang lebih komprehensif terhadap campuran kompleks (Chow & Górecki, 2017).

Detektor dalam sistem GC berfungsi untuk mendeteksi dan mengukur konsentrasi komponen yang telah dipisahkan. Berbagai jenis detektor tersedia, seperti *Flame Ionization Detector* (FID), *Mass Spectrometry Detector* (MS), dan *Thermal Conductivity Detector* (TCD), masing-masing dengan kelebihan dan kekurangan tersendiri. Detektor FID, misalnya, sangat sensitif terhadap senyawa organik, sementara detektor MS memberikan informasi struktural yang lebih mendalam tentang analit (Shuttleworth & Johnson, 2022).



Gambar 2.16 Hasil Kromatogram GC (Brown *et al.*, 2012)

Sistem pengolahan data berfungsi untuk menganalisis sinyal yang dihasilkan oleh detektor dan menghasilkan kromatogram yang menunjukkan waktu retensi dan intensitas puncak untuk setiap komponen. Kromatogram ini adalah representasi visual dari hasil analisis dan digunakan untuk mengidentifikasi serta mengkuantifikasi komponen dalam sampel (Kudo, 2020).

2.6.2 Prinsip Kerja Gas Chromatography

Gas chromatography (GC) bekerja berdasarkan prinsip distribusi senyawa uji (analit) antara dua fase: fase gerak berupa gas inert (seperti helium, nitrogen, atau hidrogen), dan fase diam, yaitu lapisan cairan atau padatan yang melapisi dinding kolom atau partikel pendukung di dalam kolom. Pemisahan komponen dalam suatu sampel terjadi karena perbedaan koefisien distribusi (K) masing-masing komponen terhadap kedua fase tersebut. Setiap analit memiliki tingkat afinitas berbeda terhadap fase diam, analit yang lebih suka berinteraksi dengan fase diam akan tertahan lebih lama di kolom dan bergerak lebih lambat, sementara analit yang lebih mudah menguap atau memiliki afinitas rendah akan keluar lebih cepat (Leppert, 2022).

Efisiensi pemisahan dalam GC dapat dijelaskan melalui **persamaan Van Deemter**, yang menggambarkan hubungan antara efisiensi kolom (dinyatakan sebagai HETP (*High Equivalent Theoretical Plate*, H)) dan kecepatan alir gas pembawa (u). Persamaan ini dirumuskan sebagai:

$$H = A + \frac{B}{u} + Cu$$

Keterangan:

A = Efek dari *Eddy diffusion* atau jalur aliran yang tidak seragam dalam kolom, umum terjadi pada kolom packed.

B = *Longitudinal diffusion*, yaitu difusi molekul analit sepanjang kolom dalam fase gerak.

C = *Resistensi transfer massa* antara fase gerak dan fase diam

Tujuan dari optimasi sistem GC adalah meminimalkan nilai H , yang artinya meningkatkan efisiensi pemisahan. Hal ini dapat dicapai dengan

mengatur kecepatan alir gas pembawa secara tepat, memilih kolom yang sesuai, serta mengatur suhu kolom secara optimal.

Salah satu parameter penting dalam GC adalah **waktu retensi (t_R)**, yaitu waktu yang dibutuhkan suatu senyawa untuk melewati kolom dari titik injeksi hingga mencapai detektor (Mommers *et al.*, 2016). Waktu retensi sangat dipengaruhi oleh interaksi antara analit dan fase diam, serta oleh kondisi seperti suhu kolom dan laju alir gas pembawa. Waktu retensi dapat dijelaskan dengan rumus berikut:

$$t_R = t_M (1 + k')$$

Keterangan:

t_M = waktu retensi senyawa non-interaktif (waktu yang dibutuhkan oleh komponen yang tidak tertahan sama sekali di fase diam).

k' = Faktor kapasitas, yang menunjukkan seberapa besar senyawa tertahan oleh fase diam dibandingkan dengan fase gerak. Nilai k' dapat dihitung dari rasio konsentrasi analit di fase diam terhadap fase gerak.

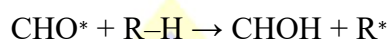
Faktor kapasitas ini memberikan gambaran penting mengenai kekuatan interaksi antara analit dengan fase diam. Nilai k' yang terlalu kecil atau terlalu besar dapat menyebabkan pemisahan yang buruk atau waktu analisis yang terlalu lama. Selain itu, pemilihan fase diam sangat berpengaruh terhadap hasil pemisahan. Fase diam yang bersifat polar akan lebih cocok untuk menganalisis senyawa polar, sedangkan fase diam non-polar sesuai untuk senyawa non-polar. Pengaturan suhu kolom juga memiliki peran penting karena suhu yang terlalu tinggi dapat mempercepat elusi, namun bisa mengurangi resolusi pemisahan (Horvath *et al.*, 2022).

2.6.3 Prinsip Kerja *Flame Ionization Detector* (FID)

Flame Ionization Detector (FID) merupakan salah satu detektor paling umum yang digunakan dalam instrumen *Gas Chromatography* (GC) karena kemampuannya yang sangat baik dalam mendeteksi senyawa organik dengan sensitivitas tinggi dan rentang linier yang luas (Spanjers *et al.*, 2017). Prinsip kerja FID didasarkan pada proses ionisasi senyawa organik dalam nyala api yang dihasilkan dari campuran gas hidrogen dan udara. Ketika senyawa

organik terbakar dalam nyala tersebut, terbentuklah ion dan elektron yang kemudian terdeteksi sebagai arus listrik oleh elektroda kolektor. Besarnya arus ini berbanding lurus dengan jumlah karbon dalam senyawa, terutama karbon yang tidak terikat pada oksigen, menjadikan FID sangat ideal untuk analisis senyawa hidrokarbon (Yacout *et al.*, 2021).

Proses ionisasi dimulai dari reaksi antara senyawa organik (R-H) dengan radikal CHO* yang terbentuk di dalam nyala:



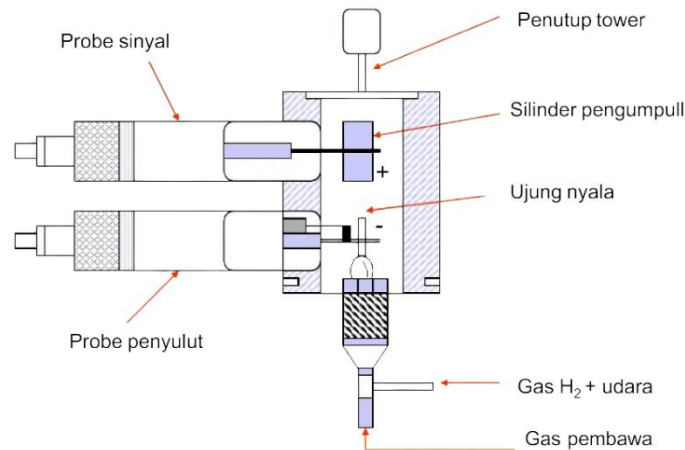
Radikal R* tersebut kemudian bereaksi lebih lanjut dengan O₂ membentuk produk ionisasi dan elektron:



Ion-ion dan elektron yang terbentuk akan ditangkap oleh sistem elektroda (kolektor dan kutub negatif), menghasilkan arus ionisasi yang sebanding dengan konsentrasi senyawa organik yang terbakar.

Kelebihan utama FID terletak pada batas deteksinya yang sangat rendah, yakni hingga 10⁻¹² g/s, serta rentang linier yang luas. Oleh karena itu, detektor ini sering digunakan dalam berbagai aplikasi, termasuk di bidang lingkungan, industri makanan, dan laboratorium farmasi. Namun demikian, FID tidak dapat mendeteksi senyawa anorganik (seperti H₂O, CO₂, NH₃) maupun beberapa senyawa organik sederhana yang tidak membentuk ion secara efisien dalam nyala api (Thurbide, 2023). Selain itu, FID tidak memberikan informasi struktural senyawa, sehingga biasanya digunakan bersama detektor lain seperti *Mass Spectrometry* (MS) untuk analisis yang lebih lengkap (Li *et al.*, 2022).

Agar detektor ini bekerja optimal, diperlukan pengaturan aliran gas yang tepat (hidrogen, udara, dan gas pembawa), serta suhu kerja yang stabil agar nyala tetap konstan dan ionisasi berlangsung maksimal.



Gambar 2.17 Detektor Flame Ionization Detector (FID)
(Andriana, Y., 2019)

Gambar di atas ini menunjukkan skema struktur dan komponen utama dari detektor FID. Terlihat bahwa aliran gas pembawa membawa sampel menuju ujung nyala, tempat terjadinya pembakaran. Di sana, ion yang terbentuk bergerak menuju silinder pengumpul (kolektor) yang terhubung ke sistem probe sinyal, yang kemudian menghasilkan sinyal listrik untuk dicatat dan dianalisis. Komponen penting lainnya dalam sistem ini meliputi probe penyulut untuk memicu nyala api, serta pengaturan gas hidrogen dan udara sebagai bahan bakar dan oksidator.

2.6.4 Alasan Pemilihan GC-FID

Penggunaan GC-FID dalam analisis senyawa organik volatil memiliki keunggulan teknis berupa sensitivitas tinggi dengan batas deteksi tingkat pikogram (10^{-12} g), rentang dinamis luas hingga 10^7 , dan respon linier terhadap jumlah atom karbon dalam molekul (Shuttleworth & Johnson, 2022). Karakteristik ini memungkinkan deteksi komponen mayor dan minor dalam satu injeksi serta kuantifikasi tanpa standar individual untuk setiap komponen. FID juga memberikan baseline stabil, tingkat noise rendah, dan tahan terhadap fluktuasi lingkungan (Mátyási *et al.*, 2020).

Namun, analisis mitraginin terdapat tantangan karena struktur kimia yang tidak stabil dan dapat terdegradasi pada kondisi ekstrim seperti suhu tinggi, cahaya, pH ekstrem, dan oksigen. Mitraginin mulai degradasi signifikan pada suhu di atas 200°C dengan terbentuknya produk degradasi seperti 7-hydroxymitragynine (Trager *et al.*, 2021). Paparan sinar matahari langsung

selama lebih dari 6 jam dapat mengurangi konsentrasi mitraginin secara signifikan (Leong Bin Abdullah *et al.*, 2019). Proses GC yang membutuhkan suhu tinggi (200-300°C) pada tahap injeksi dan kolom meningkatkan risiko degradasi termal, menghasilkan senyawa turunan yang dapat mengganggu akurasi kuantifikasi (Basiliere & Kerrigan, 2020).

Optimasi parameter GC-FID sangat penting dengan mengontrol suhu injektor, kolom, dan waktu tinggal untuk mencegah degradasi. Pendekatan derivatisasi dapat membuat mitraginin lebih stabil dan mudah diuapkan. Preparasi sampel dengan penambahan antioksidan, penyimpanan suhu rendah, dan menghindari paparan cahaya langsung dapat meminimalkan degradasi sebelum analisis (Adouani *et al.*, 2023).

2.6.5 Internal Standar

Internal standar adalah senyawa yang ditambahkan dalam jumlah diketahui ke sampel, standar kalibrasi, dan blanko untuk mengkompensasi variabilitas preparasi sampel dan analisis instrumental. Penggunaannya krusial dalam validasi metode GC karena meningkatkan akurasi, presisi, dan robustness hasil analisis melalui titik referensi untuk koreksi variabilitas. Internal standar tidak ada dalam matriks sampel dan ditambahkan konsisten ke semua larutan. Prinsipnya mengukur rasio respons analit terhadap internal standar, bukan respons absolut, sehingga mengoreksi kesalahan acak/sistematis dan fluktuasi instrumen secara independent (Capoun & Kryorkova, 2020).

Dalam analisis GC, internal standar mengatasi ketidakreproduksibilitas injeksi manual karena volume injeksi kecil (1 μL atau kurang) sulit dikontrol, menyebabkan variasi area puncak. Penambahan internal standar konstan memastikan rasio area analit/internal standar tetap stabil meskipun volume injeksi bervariasi. Pemilihan internal standar ideal harus memiliki kemiripan struktur kimia dengan analit untuk karakteristik ekstraksi, waktu retensi, stabilitas, dan respons detektor yang serupa, sehingga terpengaruh proporsional oleh variasi kondisi analisis (Scion Instruments, 2024).

Internal standar harus dipastikan tidak ada dalam matriks sampel asli untuk menghindari interferensi yang menyebabkan kesalahan perhitungan

konsentrasi analit, sehingga analisis pendahuluan pada sampel blanko diperlukan. Waktu retensi internal standar sebaiknya dekat analit target untuk mengeliminasi diskriminasi area puncak, namun harus terpisah baik dari puncak analit dan senyawa lain tanpa interferensi (Capoun & Krykorkova, 2020). Internal standar juga harus stabil selama preparasi dan analisis, tersedia murni dengan kemurnian optimal, serta tidak bereaksi kimia dengan analit atau komponen sampel lainnya.

Response factor (RF) adalah parameter kunci dalam metode internal standar yang mendefinisikan hubungan respons detektor dengan konsentrasi senyawa. RF didefinisikan sebagai rasio area puncak kromatografi terhadap konsentrasi senyawa, dinyatakan dalam persamaan:

$$RF = \frac{\text{Area}}{\text{Konsentrasi}}$$

Dalam konteks internal standar, yang lebih sering digunakan adalah relative response factor (RRF), yang merepresentasikan rasio antara response factor analit terhadap response factor internal standar. Relative response factor dihitung menggunakan persamaan:

$$RF = \frac{(\text{Area}_{\text{analit}}/\text{Konsentrasi}_{\text{analit}})}{(\text{Area}_{\text{IS}}/\text{Konsentrasi}_{\text{IS}})}$$

Response factor ditentukan sebagai rasio gradien fungsi linier antara area puncak dan konsentrasi senyawa. Penentuannya memerlukan dua prasyarat: pertama, intersep sumbu area puncak dapat diabaikan dibandingkan produk gradien dan batas bawah rentang linieritas untuk analit dan internal standar; kedua, RF hanya berlaku dalam rentang konsentrasi di mana fungsi area puncak analit dan internal standar linier (Capoun & Krykorkova, 2020). Konsentrasi analit sampel tidak diketahui dapat dihitung menggunakan persamaan:

$$RF = \frac{\text{Area}_{\text{analit}} \times \text{Konsentrasi}_{\text{IS}}}{\text{Area}_{\text{IS}} \times \text{RRF}}$$

Persamaan ini menunjukkan bahwa konsentrasi analit ditentukan dengan mengukur rasio area puncak analit terhadap internal standar, dikalikan

konsentrasi internal standar yang diketahui, lalu dibagi relative response factor yang telah ditentukan melalui kurva kalibrasi.

Dalam validasi metode GC menurut ICH Q2(R2) dan FDA, internal standar berperan penting dalam menilai kinerja metode analisis. Penggunaannya dapat meningkatkan presisi secara signifikan, dengan repeatability hasil dilaporkan dapat membaik hingga sekitar 4,4 kali, menghasilkan RSD tipikal di bawah 2% untuk repeatability dan di bawah 3% untuk intermediate precision. Internal standar juga mengoreksi kehilangan sampel selama preparasi dan variasi respons instrumen, sehingga meningkatkan keakuratan hasil.

Linieritas dengan internal standar divalidasi pada rentang konsentrasi yang sesuai, umumnya dari LOQ hingga sekitar 120% level kerja, menggunakan kurva kalibrasi yang memplot rasio area analit terhadap internal standar versus rasio konsentrasi keduanya. Robustness metode meningkat karena pendekatan berbasis internal standar lebih tahan terhadap variasi kecil parameter kromatografi, seperti laju alir gas pembawa dan temperatur oven.

Penggunaan internal standar dalam analisis GC memberikan beberapa keuntungan utama, seperti peningkatan akurasi melalui koreksi kehilangan sampel dan variasi respons instrumen, serta peningkatan presisi dengan meminimalkan pengaruh variabilitas volume injeksi dan efek matriks pada sampel kompleks. Metode ini juga membuat hasil lebih independen terhadap variasi volume injeksi dan memfasilitasi transfer metode antar laboratorium atau instrumen berbeda.

Namun, metode internal standar memiliki keterbatasan, antara lain peningkatan biaya dan kompleksitas, terutama ketika menggunakan senyawa berlabel isotop, serta perlunya pemilihan internal standar yang cermat agar tidak mengganggu analit dan konsentrasinya tetap berada dalam rentang yang sesuai untuk kuantifikasi akurat. Internal standar yang tidak tepat atau penambahan yang dilakukan setelah terjadi variabilitas sampel dapat menyebabkan koreksi yang tidak efektif terhadap sumber variabilitas. Penggunaan internal standar sangat direkomendasikan untuk metode GC dengan preparasi sampel multi-tahap atau potensi kehilangan volume, dengan

syarat validasi metode menunjukkan bahwa internal standar yang dipilih benar-benar sesuai dan efektif mengoreksi variabilitas yang relevan. (ICH, 2024; FDA, 2024).

2.7 *System Suitability Test* (SST)

System Suitability Test (SST) atau uji kesesuaian sistem merupakan bagian penting validasi dan kontrol kualitas metode analitik yang memastikan sistem analisis bekerja dengan baik dan menghasilkan data andal sebelum digunakan untuk menganalisis sampel. Uji ini dilakukan sebelum analisis rutin menggunakan larutan standar dan dievaluasi berdasarkan parameter tertentu yang menunjukkan performa sistem secara keseluruhan. Konsep dasarnya adalah sistem analitik (instrumen, kolom, fase gerak, dan kondisi operasional) harus divalidasi sebagai satu kesatuan agar menghasilkan hasil yang akurat dan presisi (ICH, 2024). Parameter yang umum digunakan dalam SST sebagai berikut:

a) Faktor Kepastian (k')

Faktor kapasitas digunakan untuk menilai apakah puncak kromatografi cukup terpisah dari volume kosong. Nilai k' yang baik menunjukkan bahwa senyawa memiliki waktu retensi yang cukup dan tidak keluar terlalu cepat dari kolom. Nilai k' yang direkomendasikan untuk menunjukkan pemisahan yang optimal adalah $k' > 2$.

b) Presisi (%RSD)

Presisi sistem dievaluasi dari hasil penyuntikan berulang larutan standar secara berurutan (biasanya 5 atau 6 kali). Nilai presisi dinyatakan sebagai simpangan baku relatif (%RSD) dari area atau tinggi puncak. Sistem dikatakan presisi apabila $\%RSD \leq 1\%$ untuk minimal lima replikasi ($n \geq 5$).

c) Retensi Relatif

Retensi relatif membandingkan waktu retensi senyawa target terhadap senyawa standar atau internal standard dalam satu kromatogram. Parameter ini penting untuk memastikan identifikasi puncak target tetap konsisten antar injeksi. Nilai retensi relatif yang dapat diterima biasanya berada dalam rentang 95%-101%.

d) Resolusi (R_s)

Resolusi mengukur derajat keterpisahan antara dua puncak yang berdekatan dalam kromatogram. Parameter ini memastikan tidak terjadi tumpang tindih (*overlap*) antar puncak yang dapat mengganggu kuantifikasi. Nilai resolusi minimal yang direkomendasikan adalah $R_s > 2$ agar kedua senyawa dapat terpisah secara optimal.

e) Faktor Ikutan (Tailing Factor, T)

Faktor ikutan menunjukkan tingkat simetri puncak kromatografi. Puncak yang simetris mencerminkan kondisi kolom dan sistem yang baik. Nilai tailing factor yang terlalu besar menandakan adanya interaksi yang tidak diinginkan di dalam kolom. Nilai tailing factor yang sesuai adalah $T \leq 2$.

f) Jumlah Lempeng Teoritis (N)

Jumlah lempeng teoritis menggambarkan efisiensi kolom dalam menghasilkan puncak yang tajam dan sempit. Semakin tinggi jumlah lempeng teoritis, semakin baik efisiensi pemisahan kolom. Nilai jumlah pelat teoritis yang diterima dalam SST umumnya $N > 2000$.

g) Koefisien Variasi (KV)

Koefisien variasi menilai konsistensi area atau tinggi puncak pada penyuntikan berulang. Nilai KV yang rendah menunjukkan kestabilan sistem selama proses injeksi. Batas maksimal KV yang dapat diterima dalam uji kesesuaian sistem adalah $KV < 10\%$.

Dalam praktik validasi, SST dilakukan sebelum analisis sampel dimulai, dan hasilnya menjadi dasar apakah metode layak digunakan untuk analisis selanjutnya. Apabila terdapat satu atau lebih parameter yang tidak memenuhi batas yang telah ditetapkan, maka metode tersebut tidak boleh digunakan hingga penyebab ketidaksesuaian diidentifikasi dan diperbaiki.

2.8 Validasi Metode

Validasi metode analitik merupakan proses konfirmasi bahwa metode analitik yang digunakan sesuai dengan tujuan penggunaannya dan memenuhi persyaratan yang telah ditetapkan. Validasi dilakukan untuk membuktikan bahwa metode analitik dapat memberikan hasil yang akurat, tepat, dan dapat dipercaya (ICH, 2024). Validasi metode analisis adalah suatu tindakan melalui

percobaan laboratorium untuk membuktikan bahwa parameter tersebut telah memenuhi persyaratan untuk penggunaannya (Chavan & Desai, 2022). Proses validasi metode sangat penting dalam analisis kuantitatif untuk memastikan bahwa data yang dihasilkan memiliki kualitas yang baik dan dapat dipertanggungjawabkan secara ilmiah.

Menurut USP 43-NF 38 (2020), setiap metode analisis memerlukan skema validasi yang berbeda tergantung pada tujuan dan kategori pengujiannya. Bagian ini mencakup kategori pengujian secara umum yang menjadi persyaratan data validasi metode analisis. Kategori-kategori tersebut meliputi:

- a) Kategori I (Prosedur analisis untuk penetapan kadar bahan baku obat atau bahan aktif (termasuk pengawet) dalam sediaan obat jadi): Menentukan konsentrasi bahan aktif dalam produk akhir dengan validasi parameter akurasi, presisi, dan batas deteksi.
- b) Kategori II (Penetapan cemaran dalam bahan baku obat atau senyawa hasil degradasi dalam sediaan obat jadi): Menilai kontaminan atau produk degradasi dengan validasi sensitivitas dan spesifisitas untuk deteksi cemaran pada tingkat sangat rendah.
- c) Kategori III (Prosedur penetapan karakteristik kinerja sediaan seperti disolusi, pelepasan obat): Mengevaluasi laju disolusi dan pelepasan obat dengan validasi ketepatan dan *reproducibility*.
- d) Kategori IV (Prosedur analisis untuk identifikasi): Mengidentifikasi bahan baku atau senyawa dengan validasi spesifisitas dan sensitivitas untuk membedakan senyawa yang mirip.

Pada setiap kategori yang berbeda diperlukan informasi analitik yang berbeda. Unsur data yang diperlukan untuk setiap kategori dicantumkan dalam tabel berikut ini:

Tabel 2.1 Unsur Data yang Dibutuhkan untuk Validasi Prosedur Analisis (*USP 43-NF 38, 2020*)

Parameter Kinerja Analisis	Kategori I	Kategori II		Kategori III	Kategori IV
		Kuantitatif	Uji Batas		
Akurasi	Ya	Ya	*	*	Tidak
Presisi	Ya	Ya	Tidak	Ya	Tidak
Spesifitas	Ya	Ya	Ya	*	Ya
Batas Deteksi	Tidak	Tidak	Ya	*	Tidak
Batas Kuantifikasi	Tidak	Ya	Tidak	*	Tidak
Linieritas	Ya	Ya	Tidak	*	Tidak
Rentang	Ya	Ya	*	*	Tidak

* Mungkin diperlukan, tergantung pada spesifikasi tes yang dilakukan

Menurut ICH Q2(R1) 2024 dan USP 43-NF 38 (2020), validasi metode analitik untuk penetapan kadar bahan aktif yang termasuk **kategori I (uji kuantitatif)** harus mencakup evaluasi parameter spesifitas, linieritas, range, akurasi, dan presisi sebagai parameter wajib. Dalam penelitian ini, selain parameter wajib tersebut, selektivitas juga diuji meskipun bukan merupakan persyaratan wajib untuk Kategori I. Hal ini dilakukan untuk memastikan bahwa metode yang dikembangkan mampu memisahkan dan mengidentifikasi mitraginin secara spesifik tanpa interferensi dari senyawa alkaloid lain, sehingga meningkatkan kredibilitas dan keandalan hasil analisis. Seluruh parameter ini merupakan satu kesatuan yang sangat penting untuk memastikan mutu dan keandalan metode analitik secara ilmiah serta memenuhi persyaratan regulasi industri farmasi. (ICH, 2024; USP, 2020).

2.8.1 Selektivitas

Selektivitas adalah kemampuan suatu metode analitik untuk mengukur analit target secara tidak terganggu oleh keberadaan komponen lain dalam sampel, termasuk impuritas, produk degradasi, matriks, atau pelarut. ICH Q2(R2) menekankan pentingnya evaluasi selektivitas yang komprehensif sebagai fondasi validasi metode yang robust (ICH, 2024). Validasi selektivitas dilakukan untuk memastikan bahwa metode mampu secara spesifik mendeteksi

analit di tengah campuran kompleks, tanpa terganggu oleh eksipien, kontaminan, atau senyawa serupa lainnya.

Evaluasi selektivitas dilakukan melalui beberapa pendekatan strategis: (1) analisis sampel blanko untuk memastikan tidak ada interferensi dari matriks sampel, (2) analisis sampel yang mengandung senyawa yang berpotensi mengganggu pada konsentrasi yang relevan, (3) perbandingan spektrum atau profil kromatografi analit murni dengan sampel yang mengandung analit, dan (4) pengujian forced degradation untuk memastikan metode dapat membedakan analit dari produk degradasi (Shah *et al.*, 2024).

Dalam *Gas Chromatography* (GC), selektivitas dibuktikan melalui pemisahan puncak yang baik antara analit dengan senyawa pengganggu, yang diukur dengan nilai resolusi kromatografi (R_s). Nilai resolusi dihitung menggunakan rumus berikut:

$$R_s = \frac{2(t_{R2} - t_{R1})}{w_1 + w_2}$$

Keterangan:

t_{R1} dan t_{R2} : Waktu retensi dari dua puncak yang berdekatan

w_1 dan w_2 : Lebar dasar dari masing-masing puncak

Menurut USP <621> Chromatography (edisi 2022) dan pedoman (AOAC, 2023), nilai resolusi kromatografi (R_s) $\geq 1,5$ menunjukkan bahwa dua puncak telah terpisah dengan baik dan selektivitas metode dapat diterima. Untuk analisis kritis seperti deteksi degradasi atau impuritas, nilai $R_s \geq 2,0$ menjadi target yang lebih ideal. Jika terjadi tumpang tindih puncak (*co-elution*), maka analisis kemurnian puncak (*peak purity*) harus dilakukan menggunakan detektor spektral seperti GC-MS atau DAD, guna memastikan sinyal berasal dari satu komponen murni.

ICH Q2(R2) juga menggarisbawahi bahwa interferensi dari komponen lain tidak boleh melebihi 5% dari respons analit pada konsentrasi terendah yang dapat diukur (LLOQ). Untuk metode bioanalitik, batas interferensi standar internal adalah $\leq 20\%$ (U.S. Food and Drug Administration (FDA), 2024). Selain itu, selektivitas harus diuji pada setidaknya enam sumber matriks

berbeda, terutama dalam pengujian berbasis sampel biologis atau lingkungan yang bervariasi (Shah *et al.*, 2024).

2.8.2 Linieritas

Linieritas menunjukkan kemampuan metode analitik untuk menghasilkan respons yang secara langsung proporsional dengan konsentrasi analit dalam rentang konsentrasi yang ditetapkan. ICH Q2(R2) menekankan pentingnya pemahaman matematis yang kuat antara konsentrasi analit dan respons instrumen dalam metode kuantitatif (ICH, 2024). Evaluasi linieritas penting untuk memastikan bahwa metode mampu memberikan hasil yang akurat dalam rentang kerja tertentu dan tidak terjadi penyimpangan signifikan dari hubungan linier.

Rentang (range) adalah interval antara konsentrasi terendah hingga tertinggi analit yang dapat ditentukan secara akurat, presisi, dan linier. Menurut ICH Q2(R2), range harus mencakup rentang konsentrasi yang diharapkan dalam aplikasi praktis, umumnya 80-120% dari konsentrasi target untuk penetapan kadar dalam bahan baku atau produk jadi (ICH, 2024).

Evaluasi linieritas dilakukan dengan kurva kalibrasi menggunakan minimum lima konsentrasi yang tersebar merata, dianalisis secara triplikasi (European Medicines Agency, 2024). Analisis varians (ANOVA), uji *lack-of-fit*, dan evaluasi residual plot juga dilakukan untuk memastikan tidak ada deviasi signifikan dari hubungan linier dan mendeteksi penyimpangan sistematis yang dapat memengaruhi akurasi model regresi (Borman & Elder, 2024).

Hubungan antara konsentrasi analit dan respons instrumen biasanya dinyatakan dalam persamaan regresi linier $y = bx + a$ di mana (b) adalah slope dan (a) adalah intersep. Salah satu parameter tambahan yang digunakan adalah koefisien variasi regresi ($\%V_{x_0}$), yang dihitung dengan rumus:

$$V_{x_0} = \frac{S_{x_0}}{\bar{x}} \times 100\%$$

$$\text{Dimana, } \bar{y} = b_{x_i} + a$$

$$S_{x_0} = \frac{S_y}{b}, \quad S_y = \sqrt{\frac{\sum(y_i - \bar{y})^2}{N - 2}}$$

Keterangan:

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

Persyaratan linieritas menurut (AOAC, 2023) adalah menghasilkan nilai koefisien korelasi ($r \geq 0,999$) dan nilai koefisien variasi dari regresi (V_{x_0}) tidak lebih dari 5% ($\leq 5\%$). Range dinyatakan valid apabila seluruh konsentrasi dalam rentang tersebut memenuhi kriteria akurasi (recovery 98-102%), presisi ($RSD \leq 2\%$), dan linieritas ($r \geq 0,999$).

2.8.3 Akurasi

Akurasi adalah suatu prosedur analisis yang menunjukkan kedekatan antara hasil pengujian dengan prosedur yang sedang divalidasi terhadap nilai benar. Penentuan akurasi diukur dengan menambahkan sejumlah analit ke konsentrasi tertentu. Dalam metode adisi standar dilakukan penambahan baku pada larutan uji sebesar 80%, 100%, 120%. Akurasi dinyatakan sebagai persen perolehan Kembali (%Recovery) dalam kaitannya dengan jumlah analit yang diketahui yang ditambahkan ke dalam sampel atau sebagai perbedaan antara jumlah yang diketahui dan jumlah yang ditentukan oleh analisis. Dalam ICH (2024), data akurasi diperoleh dari 9 kali penetapan kadar dengan 3 konsentrasi.

Evaluasi akurasi dapat dilakukan melalui berbagai pendekatan: (1) analisis material acuan bersertifikat (CRM) yang memiliki *traceability* ke standar internasional, (2) metode *spike-recovery* dengan menambahkan analit standar ke dalam matriks sampel pada berbagai konsentrasi, (3) perbandingan

dengan metode referensi yang telah tervalidasi dan memiliki prinsip pengukuran yang berbeda, atau (4) analisis sampel sintetik dengan komposisi yang diketahui secara akurat (Ermer and Nethercote, 2024). Dalam metode adisi standar, akurasi dinilai dari persen perolehan kembali (%Recovery), yang dapat dihitung menggunakan rumus berikut:

$$\% Recovery = \left(\frac{C_f - C_u}{C_a} \right) \times 100\%$$

Keterangan:

C_f = Konsentrasi analit setelah penambahan standar

C_u = Konsentrasi analit tanpa penambahan standar

C_a = Konsentrasi analit standar yang ditambahkan

Tabel 2.2 Kriteria Keberterimaan Akurasi dan Presisi (AOAC, 2023)

Konsentrasi Analit 100%	Rasio Analit	Unit	RSD (%)	Recovery (%)
100	1	100%	1,3	98-102
10	10	10%	1,9	
1	10	1%	2,7	97-103
0,1	10	0,1%	3,7	95-105
0,01	10	100 ppm (mg/kg)	5,3	90-107
0,001	10	10 ppm (mg/kg)	7,3	80-110
0,0001	10	1 ppm (mg/kg)	11	
0,00001	10	100 ppm (g/kg)	15	
0,000001	10	10 pbb (g/kg)	21	60-115
0,0000001	10	1 pbb (g/kg)	30	40-120

Syarat keberterimaan persen perolehan Kembali (%Recovery) mengacu AOAC (2023) yaitu memberikan nilai sebesar 95-105%.

Kriteria penerimaan akurasi menurut ICH Q2(R2) bervariasi tergantung pada konsentrasi analit dapat dilihat pada tabel kriteria keberterimaan berikut:

Tabel 2.3 Tabel Kriteria Keberterimaan Akurasi menurut ICH Q2(R2)

Jenis Analisis	Konsentrasi Analit	Unit	Recovery (%)
Assay	100	100%	98-102
Impuritas	1,0	1,0%	90-110
Impuritas	0,1	0,1%	
Impuritas	<0,1	<0,1%	80-120

2.8.4 Presisi

Presisi menggambarkan kedekatan hasil pengukuran berulang dari sampel yang sama atau sampel yang serupa di bawah kondisi yang telah ditetapkan. Penentuan presisi berdasarkan ICH Q2(R2) (2024) dapat dilakukan dengan tiga metode, yaitu:

a) Keterulangan (*Repeatability*)

Repeatability (precision under the same conditions) dievaluasi dengan menganalisis sampel identik secara berulang dalam kondisi yang sama (analisis, instrumen, laboratorium, dan waktu yang sama). Pengujian *repeatability* atau presisi *intra-assay* dilakukan dengan minimal tiga konsentrasi yang masing-masing diukur tiga kali, atau satu konsentrasi (100%) dengan enam kali replikasi.

b) Presisi antara (*Intermediate precision*)

Intermediate precision (within-laboratory precision) mengevaluasi variabilitas dalam laboratorium yang sama dengan kondisi berbeda (hari, analisis, atau instrumen berbeda). Pengujian dilakukan minimal sembilan kali (tiga konsentrasi dan tiga replikasi) atau minimal enam kali pengukuran pada satu konsentrasi (ICH, 2024).

c) Ketertiruan (*Reproducibility*)

Reproducibility (between-laboratory precision) mengevaluasi variabilitas antar laboratorium yang berbeda (European Medicines Agency, 2024; ICH, 2024).

Presisi dinyatakan sebagai simpangan baku (*standard deviation, SD*), simpangan baku relatif (%RSD), atau koefisien variasi (CV). Perhitungan %RSD mengikuti rumus:

$$SD = \sqrt{\frac{\sum(x - \bar{x})^2}{N - 1}}$$

$$\% RSD = \frac{SD}{\bar{x}} \times 100$$

Keterangan:

SD = Standar Deviasi

RSD = Simpangan Baku Relative

\bar{x} = Rata-rata dari jumlah data terhadap N pengukuran

N = Jumlah Pengukuran

Menurut AOAC (2023), syarat keberterimaan presisi adalah $\%RSD \leq 2\%$ untuk metode analisis umum. Sementara itu, ICH (2024) menetapkan kriteria penerimaan presisi untuk metode *assay* sebesar $CV \leq 2,0\%$, untuk impuritas pada konsentrasi 0,1–1,0% adalah $CV \leq 5,0\%$, dan untuk impuritas dengan konsentrasi $<0,1\%$ adalah $CV \leq 10,0\%$.

