

BAB 2 TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Tanaman Kratom

Indonesia memiliki hutan yang luas dan menjadi rumah bagi beragam spesies tumbuhan. Meskipun keanekaragaman hayatinya kaya, terdapat kesenjangan informasi yang signifikan mengenai manfaat dan potensi banyak tumbuhan yang belum teridentifikasi dan kurang dimanfaatkan ini. Misalnya, kratom (*Mitragyna speciosa*), tumbuhan tropis asli Asia Tenggara, termasuk negara-negara seperti Thailand, Malaysia, dan Indonesia, secara tradisional telah digunakan untuk mengobati berbagai penyakit (D. Susanto *et al.*, 2023). Daunnya telah lama dimanfaatkan karena efeknya yang mirip opioid dan sifat stimulannya, yang membantu melawan kelelahan dan meningkatkan daya tahan tubuh. Tumbuhan ini juga menawarkan manfaat medis, yang secara tradisional digunakan untuk mengobati kondisi seperti diare. Selain itu, kratom telah digunakan sebagai cara untuk membantu mereka yang kecanduan morfin, menunjukkan potensinya yang serbaguna. Kurangnya dokumentasi yang komprehensif ini menyoroti hilangnya kesempatan untuk memanfaatkan sepenuhnya potensi kekayaan botani Indonesia untuk tujuan pengobatan, ekonomi, dan lainnya (Putri *et al.*, 2023).

Pemanfaatan daun kratom, khususnya, menunjukkan potensi flora Indonesia yang belum dimanfaatkan. Di Thailand, misalnya, daunnya telah lama dikonsumsi karena efek stimulasinya, mirip dengan kokain, yang memungkinkan para pekerja bertahan dalam kondisi kerja yang keras dan paparan sinar matahari yang berkepanjangan (Muttaqien, 2024). Penggunaan tradisional ini menggarisbawahi khasiat tanaman ini sebagai stimulan alami dan pereda nyeri. Lebih lanjut, daunnya telah digunakan untuk mengelola gejala diare dan bahkan telah digunakan sebagai pengobatan untuk membantu melepaskan diri dari kecanduan morfin. Aplikasi ini mengungkapkan kekayaan pengetahuan tradisional yang belum sepenuhnya didokumentasikan atau dieksplorasi secara ilmiah di Indonesia (Syamsul *et al.*, 2024). Ada kebutuhan mendesak untuk mengidentifikasi, meneliti, dan memahami khasiat tanaman ini untuk membuka nilai penuhnya, memastikan bahwa warisan alam ini

dilestarikan dan dimanfaatkan secara bertanggung jawab untuk kepentingan kesehatan masyarakat dan pembangunan ekonomi (Hafidzah *et al.*, 2024).

Kratom (*Mitragyna speciosa*) mempunyai nama lain purik, ithang, kakuan, thom, ketum atau biak, ditemukan oleh botanis Pieter Willem Korthals. Secara tradisional. Kratom tumbuh subur di daerah dekat aliran sungai pada jenis tanah aluvial yang kaya bahan organik. Kratom bukan tanaman air namun mempunyai kemampuan bertahan hidup bila kondisi lahan sewaktu-waktu tergenang air. Kratom adalah salah satu tumbuhan tropis yang banyak tumbuh pada wilayah semenanjung Thailand, Myanmar, Malaysia, Philipina, termasuk Indonesia, seperti di daerah Kalimantan dan Sumatra (Fauzi *et al.*, 2022).

Sebutan daun Kratom berbeda beda setiap daerah, di Indonesia Kratom dikenal dengan kata daun purik, di Malaysia dengan sebutan biak-biak, dan pada Thailand dengan sebutan ithang. Kratom banyak digunakan oleh petani, buruh sebagai stimulan untuk mengatasi kelelahan atau beban kerja yang berat dan meningkatkan produktivitas kerja. Kratom banyak digunakan oleh masyarakat di bagian selatan Muang Thai. Pengguna yang baru mengunyah kratom hanya membutuhkan beberapa helai daun setiap hari. Sedangkan pengguna berat mengunyah kratom 3–10 kali perhari dan dapat meningkat sampai 10–30 daun atau lebih setiap hari, rata-rata masyarakat menggunakan 10–60 daun setiap hari. Di beberapa negara Asia, pekerja banyak menggunakan daun ini sebagai teh herbal untuk meningkatkan produktivitas (Raini, 2017).

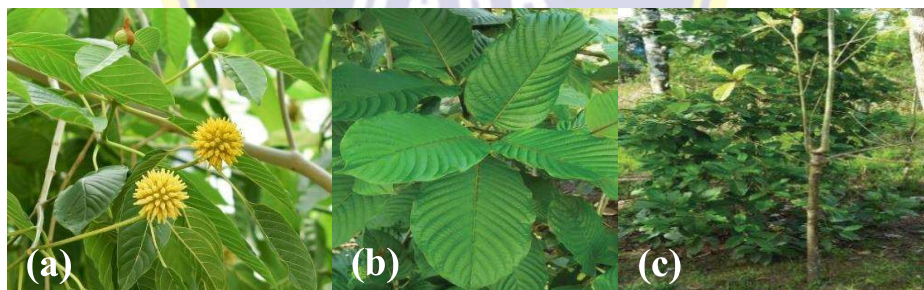
Tabel 2.1 Klasifikasi Tanaman Kratom

Kingdom:	Plantae
kelas:	Magnoliopsida
Ordo:	Gentianales
Famili:	Rubiaceae
Subfamily:	Cinchonoideae
Genus:	<i>Mitragyna</i>
Spesies:	<i>speciosa</i>



Gambar 2.1 Tanaman Kratom (*Mitragyna speciosa*) (a). Tanaman Kratom; (b). Daun kratom (Begum *et al.*, 2024)

Klasifikasi tanaman kratom dapat dilihat pada **Tabel 2.1**. Morfologi tanaman ini berupa pohon berkayu setinggi 10-30 meter, umumnya tumbuh secara soliter atau berdekatan dengan jenis yang serupa. Batang lurus dengan kulit batang berwarna abu-abu kehijauan saat masih muda dan cenderung menjadi abu-abu kecoklatan ketika tua. Tekstur permukaan batang (epidermis) saat muda lebih mulus dibanding saat tua yang cenderung lebih kasar dan memiliki banyak pustular lentisel (pustular lenticels) (Kurniawati *et al.*, 2023). Pada satu batang muda terdapat 10-12 daun yang berpasangan, tumbuh berhadapan dan bersilangan. Sepasang daun tumbuh diikuti dengan dua daun penumpu antar tangkai daun (*interpetiolar stipule*), daun penumpu (*stipule*) tepatnya berada di atas berdekatan atau sedikit di atas dua tangkai daun (*petiole*). Ujung batang pohon diakhiri dengan bunga dan buah yang tumbuh di bagian ketiak daun (*axil*) di antara beberapa daun.



Gambar 2.2 Tanaman Kratom (*Mitragyna speciosa*) (a). Daun Kratom; (b) Bunga Kratom; (c) Pohon Kratom (Isnaeni *et al.*, 2024).

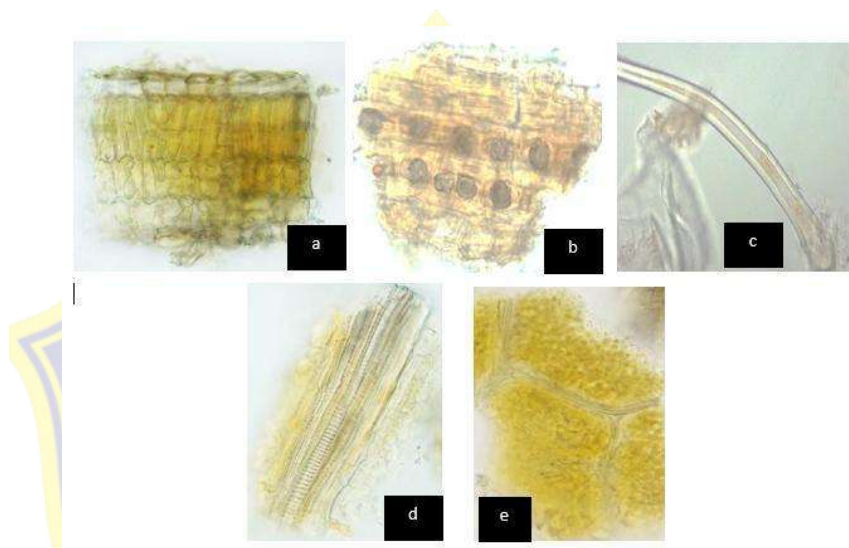
Daun kratom berbentuk elips hingga bulat telur (*ovate*), berukuran 10-20 x 7-12 cm, memiliki tulang daun sekunder yang tampak jelas berjumlah 12-17

pasang. Warna daun hijau dan cenderung lebih muda dan kontras dibanding warna hijau tanaman di sekitarnya. Tekstur daun seperti kertas dengan ujung daun berbentuk lancip dan pangkal daun bulat atau berbentuk seperti hati (sub cordate). Permukaan atas daun tidak berambut, sedangkan permukaan bawah tepatnya pada tulang daun utama dan urat daun lateral sedikit berambut. Umumnya warna tulang dan urat daun berwarna coklat pucat atau coklat kemerahan, tetapi terdapat pula beberapa jenis kratom dengan warna tulang dan urat daun berwarna hijau. Daun penumpu berbentuk seperti tombak (lanceolatus) dengan panjang 2-4 cm, berambut jarang dan memiliki 9 urat daun (Indriyanti *et al.*, 2024).

Bakal bunga umumnya tersusun berkelompok dari tiga bunga, satu bunga memiliki tangkai bunga lebih pendek dibanding dua lainnya, biasanya dilengkapi dengan braktea. Diameter bunga umumnya 1,5- 2,5 cm dengan braktea berambut pucat, dan panjang 4-6 mm. Bonggol bunga berambut lebat. Sepal atau kalik (bagian yang melindungi bunga ketika masih kuncup) memiliki panjang sekitar 2 mm dan terdiri dari 5 lobus. Kelopak bunga berbentuk corong berwarna kuning, dan mulus di bagian luarnya, diameter 3,5- 5 mm dengan panjang 2,5-3 mm dan ujung tergulung (revolute), dikelilingi oleh rambut pada bagian dalam kelopak (Fauzi *et al.*, 2022). Lima benang sari bersatu dengan masing-masing helai kelopak, berhadapan dengan kepala sari berbentuk tombak, lebih tinggi dari kelopak. Panjang tangkai putik sekitar 13 mm, memiliki kepala putik yang bulat dengan diameter 2 mm. Mahkota bunga berwarna putih hingga putih kekuningan. Buah berbentuk bulat yang tersusun atas formasi yang membentuk bulatan kapsul-kapsul kecil, saat muda berwarna hijau dan berubah menjadi kecoklatan saat tua, serta kondisi buah tua sangat rapuh ketika diremas. Bakal buah memiliki diameter sekitar 2-3 mm, memiliki 10 sudut (lobus) dengan panjang 7-9 mm, lebar 4-5 mm, mengandung banyak biji. Biji berbentuk membulat dengan ukuran 1 mm dan memiliki struktur seperti sayap di bagian ujung dengan panjang 1-2 mm (Hafidzah *et al.*, 2024).

Elsa (2016) melakukan analisis mikroskopis terhadap daun kratom segar yang telah dikeringkan dan dihaluskan. Tujuan analisis ini adalah untuk memperoleh gambaran pola anatomi mikroskopis daun kratom yang dapat

dijadikan acuan dalam membandingkan sampel yang sudah dalam bentuk olahan dan sulit dikenali secara morfologi, seperti halnya sampel pada penelitian ini. Hasil pengamatan menunjukkan adanya kristal kalsium oksalat berbentuk druse yang tersusun berderet pada tulang daun (Gambar 3b). Selain itu, ditemukan rambut penutup (trikoma) non-glandular yang terdiri atas satu sel (Gambar 3c), batang daun berbentuk spiral (Gambar 3d), serta stomata bertipe parasitik (Gambar 3e) yang merupakan ciri khas famili Rubiaceae, termasuk *Mitragyna speciosa* (Elsa, 2016).



Gambar 2.3 Hasil uji mikroskopik, (a) bagian epidermis, (b) kristal kalsium oksalat, (c) trikoma/batang penutup, (d) batang daun, dan (e) stomata pada epidemis atas (Elsa, 2016).

Berdasarkan hasil pengamatan mikroskopis **Gambar 2.3** anatomi daun, diperoleh kemiripan hampir di seluruh bagian dengan temuan, sehingga dapat dipastikan bahwa sampel yang digunakan berasal dari daun kratom. Namun demikian, pencirian hanya berdasarkan karakter mikroskopis belum cukup untuk memastikan identitas sampel secara spesifik, sebab pola serupa juga dapat muncul pada spesies lain dalam genus *Mitragyna*. Oleh karena itu, diperlukan analisis kimia untuk melengkapi data dan memberikan informasi yang lebih akurat mengenai identitas sampel (Elsa, 2016).

Kratom mengandung lebih dari 40 jenis alkaloid di antaranya adalah mitraginin, 7-hidroksimitraginin, painantein, spesioginin, spesiosiliatin, beberapa jenis flavonoid, terpenoid, saponin, dan beberapa jenis glikosida.

Kandungan utama kratom adalah mitraginin. Adanya gugus hidroksil pada C-7 meningkatkan potensi analgetik 7-hidroksimitraginin sekitar 13 kali lebih tinggi dari morfin dan 46 kali lebih tinggi dari Mitragininbaik secara in vitro maupun in vivo. Hasil isolasi Mitraginin dari kratom berasal dari Muang Thai diperoleh kadar 66%, sedangkan yang berasal dari Malaysia diperoleh kadar 12% dari total alkaloid (Raini, 2017).

Petani kratom menjual hasil panen berupa daun segar, remahan dan tepung (bubuk). Kratom berupa remahan dan tepung perlu dilakukan penanganan pasca panen yang terdiri dari sortasi, pembersihan, penjemuran serta perubahan bentuk. Penanganan pascapanen oleh petani masih dilakukan secara sederhana yaitu dengan cara dicuci kemudian dijemur di panas matahari. Sebagian petani masih melakukan penjemuran di pinggir jalan. Remahan atau tepung kratom yang dihasilkan masyarakat secara umum terdiri dari dua jenis, yaitu tepung kratom berwarna coklat kemerahan serta hijau. Daun hasil panen disortasi, dicuci, ditiriskan, lalu dikeringkan, untuk menghasilkan tepung berwarna hijau. Remahan dan tepung kratom berwarna coklat kemerahan didapatkan dengan memfermentasi daun, dengan memasukan ke dalam kantong plastik transparan dan ditutup rapat kemudian dibiarkan selama 4 hari. Daun kratom dikeluarkan dari kantong plastik kemudian ditebar merata di atas rak penjemuran setebal + 5 cm sampai kering sekitar 4-5 hari. Remahan dibuat dengan manual maupun menggunakan mesin. Secara manual dilakukan menggunakan cara menggosok-gosokan daun kratom pada alas rak penjemuran sehingga berukuran menjadi kecil, kemudian ditampi supaya bagian tulang daun terpisah, kemudian bagian tulang daun dibuang. Tepung kratom dibuat dengan cara menggiling remahan kratom dan diayak. Remahan maupun tepung ditempatkan di wadah kedap udara. Setelah menjadi remahan kratom siap dipasarkan didalam atau luar negeri. Untuk harga sendiri kratom sendiri dijual dengan kondisi basah, kering, remahan dan bubuk (Herawatiningsih *et al.*, 2024).

2.1.1 Senyawa Kimia Tanaman Kratom

Tanaman kratom (*Mitragyna speciosa*) sejak zaman dahulu telah digunakan secara tradisional oleh masyarakat setempat dengan cara dikunyah daunnya atau direbus untuk ramuan herbal. Masyarakat tradisional menggunakan kratom untuk menghilangkan rasa lelah, meningkatkan stamina, dan mengurangi rasa sakit setelah bekerja keras di ladang atau hutan. Seiring berjalannya waktu, perhatian ilmiah semakin meningkat karena adanya senyawa kimia aktif dalam daunnya yang dapat memiliki efek farmakologis pada tubuh manusia. Senyawa-senyawa ini terutama berinteraksi dengan reseptor opioid di otak, menghasilkan efek yang mirip dengan morfin, meskipun mekanisme dan potensi efeknya berbeda. Hal ini menyebabkan kratom menjadi subjek penelitian intensif di bidang farmasi, toksikologi, dan kesehatan masyarakat (Kurniawati *et al.*, 2023).

Senyawa kimia utama yang ditemukan dalam tanaman kratom adalah alkaloid, dengan lebih dari 40 jenis yang teridentifikasi. Alkaloid adalah senyawa organik, umumnya mengandung nitrogen, yang diketahui memiliki efek biologis yang signifikan. Dalam kratom, dua alkaloid yang paling dominan dan banyak dipelajari adalah Mitraginin dan 7-hidroksimitraginin. Kedua senyawa ini diyakini berkontribusi signifikan terhadap efek psikoaktif dan farmakologis kratom. Selain itu, alkaloid lain, seperti spekioginin, spekiosiliatin, dan paynantein, juga memiliki aktivitas biologis, meskipun tidak sekuat mitraginin. Kandungan alkaloid dalam daun kratom dapat bervariasi tergantung pada asal geografis tanaman, usia daun, dan metode pengolahan atau ekstraksi yang digunakan (Fahmi, 2020). Hal ini menyebabkan efek konsumsi kratom bervariasi dari individu ke individu dan dari sampel daun ke daun.

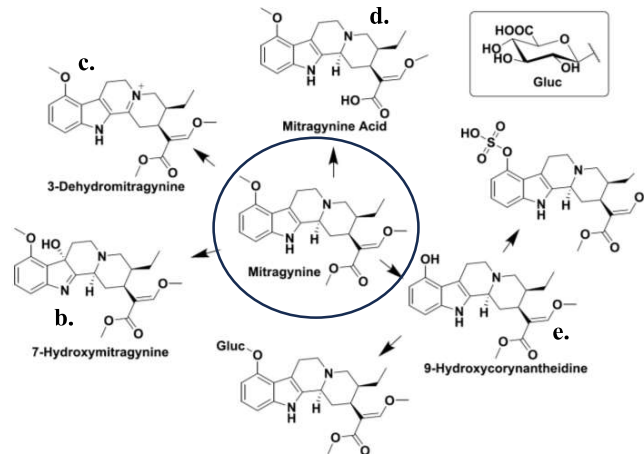
Kurniawati, Fitria, Nainggolan, dan Wardani (2023) melakukan analisis GC-MS terhadap ekstrak daun kratom (*Mitragyna speciosa*) untuk mengevaluasi kandungan bioaktif. Hasil penelitian menunjukkan bahwa senyawa yang paling banyak terkandung adalah asam quinat dan Mitraginin yang termasuk golongan flavonoid dan alkaloid. Prosedur ekstraksi dilakukan melalui metode ransum atau perendaman, kemudian sampel diproses

menggunakan tabung mikro berisi 0,5 g serbuk dengan 1,5 mL etanol, diikuti vorteks, sentrifugasi, dan analisis GC-MS. Instrumen dioperasikan dengan suhu injektor 260 °C, detektor 250 °C, dan kolom pada 325 °C dengan gas helium sebagai pembawa. Hasil kromatografi menghasilkan puncak-puncak yang selanjutnya diidentifikasi melalui spektrum massa untuk memastikan struktur senyawa bioaktif yang terkandung (Kurniawati *et al.*, 2023).



Gambar 2.4 Kandungan metabolit sekunder bioaktif *Mitragyna speciosa*, khususnya indoles (misal Mitraginin) dan oxindoles (misal corynoxine) (Alford *et al.*, 2025)

Mitraginin adalah alkaloid yang paling melimpah dalam daun kratom, mencakup 60–70% dari total alkaloid. Senyawa ini memiliki struktur indol-alkaloid yang memungkinkannya berikatan dengan reseptor opioid di sistem saraf pusat. Efek utama Mitraginin adalah efek analgesik atau pereda nyeri, peningkatan energi, dan euforia ringan pada dosis tertentu. Tidak seperti opioid sintetis atau alami seperti morfin, Mitraginin memiliki profil aktivitas yang lebih kompleks karena juga berinteraksi dengan reseptor adrenergik, serotonergik, dan dopaminergik. Interaksi ini menjelaskan mengapa kratom dapat memiliki efek stimulan pada dosis rendah, sementara pada dosis tinggi dapat menghasilkan efek sedatif. Fenomena ini menjadikan Mitraginin kandidat yang menarik untuk studi lebih lanjut sebagai obat baru dalam farmakologi, khususnya dalam pengobatan nyeri kronis (Suryandari *et al.*, 2018). Namun, terlepas dari potensi manfaat medisnya, penggunaannya masih kontroversial karena potensi ketergantungan jika digunakan secara berlebihan.



Gambar 2.5 Struktur kimia a. Mitraginin, b. 7-hydroxymitraginin, c. 3-dehydromitraginin, d. asam Mitraginin, e. 9-hydroxycorynantheidine. (Chiang *et al.*, 2024)

Selain mitraginin, senyawa lain yang sangat penting adalah 7-hidroksimitraginin. Meskipun jumlahnya jauh lebih kecil daripada mitraginin, senyawa ini memiliki potensi farmakologis yang jauh lebih kuat. Studi menunjukkan bahwa 7-hidroksimitraginin memiliki afinitas yang lebih tinggi terhadap reseptor opioid mu, dan potensi analgesiknya bahkan bisa lebih kuat daripada morfin. Inilah sebabnya kratom dianggap memiliki efek psikoaktif yang signifikan pada pengguna tertentu. Perbedaan kadar 7-hidroksimitraginin dalam setiap daun kratom juga berkontribusi terhadap variasi efek yang dirasakan, dengan beberapa melaporkan efek stimulan ringan sementara yang lain mengalami sedasi berat (Sudarwati, 2021). Senyawa ini juga menjadi salah satu alasan mengapa kratom diperdebatkan secara hukum di berbagai negara, karena efeknya mirip dengan narkotika opioid. Namun, penelitian lebih lanjut diperlukan untuk menentukan manfaat medis dan risiko toksikologi 7-hidroksimitraginin secara lebih jelas (Todd *et al.*, 2020).

Selain kedua senyawa utama ini, kratom juga mengandung alkaloid lain seperti speciociliatine, speciogynine, dan paynantheine. Meskipun ketiga senyawa ini hadir dalam jumlah yang lebih kecil, masing-masing berkontribusi signifikan terhadap keseluruhan efek farmakologis kratom. Speciociliatine, misalnya, diketahui memiliki sifat antagonis yang lemah

pada reseptor opioid, sehingga memodulasi efek Mitraginin (Asmarani *et al.*, 2023). Speciogynine memainkan peran yang lebih menonjol dalam relaksasi otot polos dan berpotensi memberikan efek antispasmodik. Sementara itu, paynantheine juga memiliki efek relaksan otot dan analgesik ringan. Kombinasi berbagai alkaloid ini menjadikan efek kratom unik dan kompleks, sulit dibandingkan dengan opioid konvensional. Dengan banyaknya senyawa aktif ini, para peneliti menganggap kratom sebagai tanaman dengan "koktail alami" yang menghasilkan efek bervariasi tergantung pada dosis, metode konsumsi, dan kondisi fisiologis pengguna (Akbar *et al.*, 2023). Inilah mengapa kratom dianggap menarik sekaligus menantang dalam penelitian medis.

Selain alkaloid, daun kratom juga mengandung senyawa lain yang sama pentingnya, seperti flavonoid, terpenoid, dan polifenol. Senyawa-senyawa ini berkontribusi pada aktivitas antioksidan kratom, yang berpotensi melindungi tubuh dari kerusakan akibat radikal bebas (Dohárszky *et al.*, 2024). Aktivitas antioksidan ini menunjukkan bahwa kratom mungkin memiliki manfaat tambahan dalam mencegah peradangan atau stres oksidatif, meskipun belum banyak penelitian yang secara khusus mengkaji aspek ini. Kandungan polifenol juga dapat berkontribusi pada rasa pahit khas daun kratom, yang sering terasa ketika dikonsumsi langsung. Sementara itu, terpenoid dalam kratom berkontribusi pada aroma khas daun dan kemungkinan berkontribusi pada aktivitas biologis tambahan yang masih perlu dieksplorasi. Dengan keragaman senyawa non-alkaloid ini, kratom tidak hanya dikenal karena efek psikoaktifnya tetapi juga memiliki potensi khasiat lain yang masih belum dieksplorasi (Mutiara *et al.*, 2023).

Penelitian tentang senyawa kimia dalam kratom masih berlangsung, terutama untuk memahami interaksi antara alkaloid dan reseptor biologis dalam tubuh. Hal ini penting karena efek kratom tidak dapat dijelaskan oleh satu senyawa tunggal, melainkan merupakan hasil dari sinergi kompleks berbagai komponen kimia. Studi farmakokinetik menunjukkan bahwa metabolisme Mitraginindan 7-hidroksimitraginin melibatkan enzim hati, khususnya CYP450, yang juga terlibat dalam metabolisme banyak obat lain.

Interaksi ini membuka potensi efek samping ketika kratom dikonsumsi bersamaan dengan obat-obatan tertentu (Lestari *et al.*, 2018). Lebih lanjut, variasi kandungan senyawa dalam daun kratom akibat faktor lingkungan, metode pemanenan, dan teknik ekstraksi menyulitkan penentuan standar kualitas kratom (Sofia *et al.*, 2022). Oleh karena itu, penelitian lebih lanjut sangat dibutuhkan untuk menentukan konsistensi dan keamanan penggunaan kratom.

Komposisi kimia kratom telah memicu perdebatan global mengenai status hukumnya. Di beberapa negara, seperti Thailand dan Malaysia, kratom dilarang karena kekhawatiran akan potensi ketergantungannya. Namun, seiring dengan semakin banyaknya penelitian yang menunjukkan potensi pengobatannya, peraturan telah dilonggarkan, namun tetap diawasi secara ketat. Di Amerika Serikat, kratom belum sepenuhnya dilarang, tetapi Badan Pengawas Obat dan Makanan (FDA) dan Badan Penegakan Narkoba (DEA) terus memantau penggunaannya (Kurniawati *et al.*, 2023). Indonesia tetap menjadi salah satu produsen kratom terbesar, sehingga studi tentang komposisi kimia dan efeknya sangat relevan baik secara ilmiah maupun ekonomi. Perdebatan ini menunjukkan pentingnya pemahaman yang mendalam tentang senyawa aktif kratom sebelum membuat keputusan hukum dan medis yang tepat.

Dengan beragamnya senyawa kimia yang terkandung dalam kratom, jelas bahwa tanaman ini memiliki potensi besar dalam penelitian farmasi dan biomedis (Indriyanti *et al.*, 2024). Alkaloid seperti Mitraginin dan 7-hydroxyMitraginin telah menunjukkan sifat analgesik yang menjanjikan sebagai pengobatan nyeri alternatif. Namun, efek samping, termasuk risiko ketergantungan dan interaksi obat, masih menjadi tantangan besar yang harus diatasi. Senyawa lain seperti speciociliatine, speciogynine, dan paynantheine menambah kompleksitas efek farmakologis kratom, sementara flavonoid dan polifenol membuka peluang penelitian di bidang antioksidan dan antiinflamasi (Syamsul *et al.*, 2024). Dengan pemahaman yang lebih mendalam, kratom dapat dikembangkan sebagai sumber senyawa obat baru, tetapi dengan pengawasan ketat untuk mencegah penyalahgunaan. Oleh

karena itu, penelitian ilmiah yang komprehensif adalah satu-satunya cara untuk mengeksplorasi manfaat dan mengurangi risiko dari kandungan kimia tanaman kratom.

Tanaman Kratom juga memiliki dampak dan efek samping jika digunakan dalam jangka panjang maupun pendek. Penggunaan kratom dalam jangka pendek atau dosis tunggal dapat menghasilkan efek yang sangat bervariasi, mirip dengan stimulan maupun opioid, tergantung pada jumlah yang dikonsumsi. Pada dosis rendah, kratom cenderung memberikan efek seperti stimulan, yaitu peningkatan energi, kewaspadaan, mood yang lebih baik, dan kemampuan bersosialisasi yang meningkat, namun hal ini juga dapat disertai dengan peningkatan detak jantung dan kegelisahan (Wahbeh *et al.*, 2024). Sebaliknya, pada dosis tinggi, efek yang dominan adalah sedatif atau seperti opioid, yang menyebabkan relaksasi, peredaan nyeri (analgesik), dan rasa kantuk. Terlepas dari dosisnya, efek samping yang umum terjadi dalam jangka pendek meliputi mual, muntah, mulut kering, pusing, dan terutama sembelit (konstipasi) karena perlambatan pergerakan saluran cerna (Village *et al.*, 2025). Dalam kasus yang lebih parah, terutama pada dosis sangat tinggi, pengguna dapat mengalami gejala mental dan neurologis serius seperti halusinasi, kebingungan, tremor, dan bahkan risiko depresi pernapasan (napas melambat) yang membahayakan. Efek ini umumnya mulai dirasakan dalam 5 hingga 10 menit setelah konsumsi dan dapat bertahan selama beberapa jam.

Dampak dan bahaya penggunaan kratom jangka panjang konsumsi kratom secara teratur dan dalam jangka panjang menimbulkan risiko kesehatan yang jauh lebih serius, terutama karena potensi besar untuk menyebabkan ketergantungan fisik dan psikologis. Penggunaan kronis dapat mengakibatkan sindrom putus zat (withdrawal syndrome) yang parah saat dihentikan, ditandai dengan nyeri otot dan tulang yang hebat, kecemasan, iritabilitas, tremor, dan gangguan tidur. Secara fisik, penggunaan jangka panjang merusak organ vital; terdapat risiko serius kerusakan hati (hepatotoksitas) dan gagal ginjal, di mana gejala kerusakan hati ditandai dengan kulit dan mata menguning (jaundice) (Widodo, 2020). Dampak lain

adalah penurunan berat badan yang drastis akibat anoreksia dan penurunan nafsu makan, serta perubahan fisik seperti hiperpigmentasi (penggelapan) kulit di wajah. Selain itu, fungsi kognitif pengguna dapat menurun, menyebabkan kesulitan dalam memori dan konsentrasi. Bahaya terbesar adalah peningkatan risiko overdosis yang dapat berujung pada kejang, koma, dan kematian, apalagi jika kratom dicampur dengan zat psikoaktif atau obat lain, yang mana kombinasi tersebut meningkatkan toksisitas dan efek negatif secara signifikan (Heywood *et al.*, 2024). Di Indonesia, zat ini diawasi ketat karena bahaya dan potensi ketergantungannya yang tinggi (Widodo, 2020).

2.1.2 Regulasi Tanaman Kratom

Legalitas kratom di pasar domestik dan internasional menunjukkan kompleksitas regulasi yang sangat beragam. Negara-negara mengadopsi pendekatan berbeda terhadap tanaman *Mitragyna speciosa*, dengan spektrum regulasi yang berkisar dari pelarangan total hingga pengakuan potensi medisnya. Mayoritas negara seperti Malaysia, Latvia, Denmark, Swedia, dan Lithuania menerapkan larangan keras, sementara Thailand secara progresif telah mengubah statusnya menjadi zat yang dikendalikan untuk kepentingan medis. Amerika Serikat menunjukkan variasi regulasi yang signifikan antara hukum federal dan negara bagian, mencerminkan kompleksitas pengaturan komoditas ini (Rabbani *et al.*, 2024).

Pendekatan regulasi kratom memerlukan strategi komprehensif yang mempertimbangkan aspek kesehatan masyarakat, ekonomi, dan penegakan hukum. Organisasi internasional seperti WHO dan UNODC belum menghasilkan rekomendasi seragam, sementara badan pengawas seperti FDA terus melakukan pengawasan ketat. Penelitian ilmiah yang masih terbatas, terutama pada bentuk daun segar dan simplisia, menambah kompleksitas pengaturan. Harmonisasi regulasi internasional menjadi kunci untuk mendukung perdagangan yang bertanggung jawab, melindungi kepentingan publik, dan membuka potensi pengembangan kratom sebagai produk fitofarmaka dan analgetik yang inovatif. Berdasarkan analisis komprehensif, legalitas kratom di pasar domestik dan internasional menunjukkan

kompleksitas regulasi yang sangat beragam (Chairani, 2020). Negara-negara mengadopsi pendekatan berbeda terhadap tanaman *Mitragyna speciosa*, dengan spektrum regulasi yang berkisar dari pelarangan total hingga pengakuan potensi medisnya. Mayoritas negara seperti Malaysia, Latvia, Denmark, Swedia, dan Lithuania menerapkan larangan keras, sementara Thailand secara progresif telah mengubah statusnya menjadi zat yang dikendalikan untuk kepentingan medis.

Di Indonesia Keberadaan kratom bagi masyarakat Kalimantan, selain untuk obat dan bernilai ekonomis juga bermanfaat untuk menahan abrasi sungai dan deforestasi hutan. Bahkan program deforestasi ini telah menjadi program pencegahan perubahan iklim oleh Kementerian Lingkungan Hidup dan Kehutanan dengan menggandeng 16 desa di Kapuas Hulu, 6 Desa di Malinau dan 13 Desa di Berau. Meski kaya manfaat, tanaman kratom sejak 2004 sudah menjadi polemik di tengah masyarakat. Penyebabnya BPOM mengeluarkan surat edaran melarang produk olahan kratom untuk campuran obat dan makanan (Aprilia, 2024).

Edaran pelarangan dari BPOM ini kembali dikeluarkan tahun 2016 dengan mencantumkan kandungan zat Mitraginin, kratom dapat menyebabkan kecanduan seperti narkotika. Sehingga BPOM dengan keras melarang penggunaan tanaman ini dalam campuran obat herbal maupun suplemen makanan. Meski ada edaran resmi dari BPOM terkait kandungan zat berbahaya dalam kratom, regulasi kratom di Indonesia masih sebagai tanaman legal. Karena belum dimasukkan dalam Peraturan Menteri Kesehatan Nomor 7 Tahun 2018 tentang Perubahan Golongan Narkotika, kratom belum masuk daftar narkotika baru. Sehingga masyarakat masih berani untuk membudidayakan, mengonsumsi maupun menjualbelikan. Karena aktivitas masyarakat pembudidaya masih banyak, dan menyikapi potensi kandungan psikoaktif dalam kratom yang berbahaya, Badan Narkotika Nasional kemudian mengeluarkan pernyataan sikap pada tanggal 31 Oktober 2019. Intinya mendukung pelarangan kratom dan mengusulkan kratom masuk dalam narkotika Golongan 1 sesuai rekomendasi Komnas Perubahan Perubahan Penggolongan Narkotika. BNN melalui pernyataan

sikap tersebut juga mendorong Kementerian/Lembaga terkait untuk menyiapkan regulasi dengan memasukkan kratom dalam UU narkotika. Meski dilarang oleh BPOM dan BNN, perlakuan berbeda dilakukan oleh Kementerian Pertanian. Melalui Peraturan Nomor 104 tahun 2020 tentang Komoditas Binaan Kementerian Pertanian, kratom termasuk tanaman yang menjadi binaan kementerian pertanian sebagai tanaman obat. Permentan 104 ini menjadi dasar hukum kratom sebagai tanaman legal yang dapat dibudidayakan oleh petani. Tumpang tindih peraturan inilah yang kemudian menjadi polemik di Masyarakat (Fadholi *et al.*, 2021).

Dasar hukum mengenai peraturan Tanaman Kratom di Indonesia didominasi oleh regulasi dari Kementerian Perdagangan, yang meliputi Peraturan Menteri Perdagangan Nomor 20 Tahun 2024 tentang larangan ekspor untuk beberapa bentuk/jenis kratom, diikuti oleh Peraturan Menteri Perdagangan Nomor 21 Tahun 2024 yang mengatur tata cara ekspor, termasuk syarat eksportir dan bentuk kratom yang diperbolehkan, serta Peraturan Menteri Perdagangan Nomor 9 Tahun 2025 mengenai pengetatan standar teknis ekspor kratom sesuai dengan acuan keamanan dari BPOM. Selain regulasi perdagangan, Peraturan Badan POM Nomor 29 Tahun 2023 mengenai batas cemaran dalam pangan juga dijadikan acuan standar keamanan untuk ekspor kratom, sementara Undang-Undang Nomor 35 Tahun 2009 tentang Narkotika sering dijadikan rujukan hukum utama dalam kajian terkait penggolongan zat psikoaktif.

Badan Pengawas Obat dan Makanan (BPOM) melalui Surat Edaran Kepala Badan POM No: HK.04.4.42.421.09.16.1740 Tahun 2016 (**Lampiran 1.**) telah melarang penggunaan kratom (*Mitragyna speciosa*) dalam produk obat tradisional, suplemen kesehatan, maupun pangan (BPOM, 2016). Kebijakan ini diperkuat oleh Surat Edaran Badan Narkotika Nasional (BNN) Nomor B/3985/X/KA/PL.02/2019/BNN yang menyatakan bahwa kratom mengandung senyawa berbahaya bagi kesehatan dan pada dosis tinggi dapat menimbulkan efek sedatif-narkotika. Daun kratom diketahui mengandung alkaloid utama yaitu Mitraginin, yang memiliki efek farmakologis menyerupai narkotika, seperti menurunkan kesadaran,

menimbulkan ketergantungan, serta memberikan efek analgesik yang kuat. Dalam Undang-Undang No. 35 Tahun 2009 tentang Narkotika, narkotika dibagi menjadi tiga golongan, namun hingga kini kratom belum secara resmi dimasukkan ke dalam salah satu golongan tersebut. Meskipun demikian, produk komersial berbasis kratom, baik dalam bentuk serbuk, teh, kapsul, maupun kopi, masih beredar secara bebas di masyarakat. Kondisi ini menimbulkan urgensi untuk melakukan identifikasi kandungan Mitraginin dalam produk komersial, guna mendukung pengawasan mutu, menjamin keamanan konsumen, serta memastikan kepatuhan terhadap regulasi yang telah ditetapkan oleh pemerintah melalui BPOM maupun BNN.

Regulasi mengenai kratom bervariasi secara signifikan di berbagai negara, dengan beberapa negara seperti Thailand yang melegalkan penggunaannya untuk tujuan medis, sementara negara lain seperti Malaysia dan Latvia menerapkan larangan ketat. Perbedaan ini menciptakan tantangan bagi negara pengekspor, termasuk Indonesia, yang memiliki potensi ekonomi besar dari perdagangan kratom. Meskipun Indonesia telah mengeluarkan regulasi baru untuk meningkatkan kualitas produk, ketidakpastian hukum dan perbedaan standar di berbagai negara tetap menjadi hambatan. Regulasi yang ada juga mencakup aspek legalitas, standar kualitas produk, dan perlindungan konsumen, yang memerlukan penyesuaian oleh pelaku usaha. Untuk mengatasi tantangan ini, diperlukan harmonisasi regulasi di tingkat internasional yang dapat memberikan kepastian hukum dan mendorong pertumbuhan industri secara berkelanjutan (Fadholi *et al.*, 2023). Kerja sama antara negara penghasil dan negara konsumen sangat penting untuk memastikan standar keamanan produk dan perlindungan konsumen yang memadai. Pendekatan berbasis bukti ilmiah yang mempertimbangkan aspek kesehatan masyarakat dan ekonomi harus menjadi landasan dalam pengembangan kerangka regulasi yang efektif untuk perdagangan kratom.

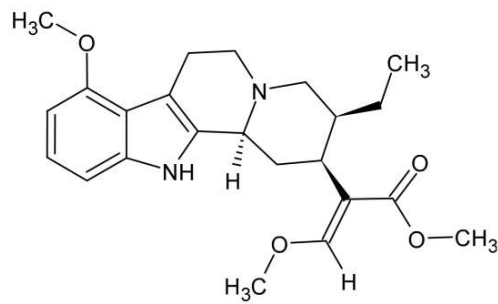
2.2 Mitraginin

Mitraginin adalah alkaloid utama yang ditemukan dalam daun *Mitragyna speciosa* (kratom) dan termasuk golongan alkaloid indol dengan struktur kimia yang kompleks. Senyawa ini memiliki rumus molekul $C_{23}H_{30}N_2O_4$ dan berat

molekul sekitar 398,50 g/mol, dengan kerangka indolo-kuinolin, gugus metoksi pada posisi 9 dan 17, serta metilester pada C16. Struktur ini mengandung gugus metoksil, ester, serta cincin aromatik dan indol yang mendukung aktivitas biologisnya. Mitraginin bersifat tidak larut dalam air, tetapi larut dalam pelarut organik seperti metanol, etanol, dan kloroform, menjadikannya lebih mudah diekstrak melalui metode organik (Ernawati *et al.*, 2024).

Mitraginin merupakan alkaloid paling dominan dalam daun kratom dengan kadar yang sangat bervariasi antar varietas dan kondisi lingkungan. Di varietas Thailand, kandungan Mitraginin dapat mencapai sekitar 66% dari total alkaloid bila diekstraksi secara organik, sedangkan di varietas Malaysia lebih rendah, sekitar 12% bahkan dilaporkan turun menjadi 6–7% pada penelitian terbaru (Karunakaran *et al.*, 2022; Sengnon *et al.*, 2023). Kadar Mitraginin paling tinggi terdapat pada daun, lebih rendah pada batang, dan hampir tidak ada di akar. Faktor-faktor seperti intensitas cahaya, umur daun, asal geografis, serta musim sangat memengaruhi sintesis alkaloid ini. Produk komersial seperti daun kering, bubuk, maupun ekstrak menunjukkan kandungan Mitraginin berkisar 0,5–1,5% dari total berat daun, dengan variasi sesuai varietas dan metode pengolahan (Zhang *et al.*, 2022). Variasi ini menekankan pentingnya standarisasi dan isolasi Mitraginin murni untuk tujuan analitik maupun kontrol kualitas.

Elsa (2016) mengembangkan metode isolasi dan identifikasi Mitraginin dalam daun kratom (*Mitragyna speciosa*) menggunakan kombinasi teknik GC-MS, KLT, dan KLT-densitometri. Isolasi dilakukan dengan metode KLT-Preparatif yang sederhana dan cepat, menghasilkan puncak tunggal pada analisis GC-MS. Instrumen yang digunakan adalah GC-MS Agilent y980 series dengan detektor MSD Agilent 597i, kolom kapiler HP5 (5% difenil 95% metil siloksan) berukuran 30 m × 0,32 mm × 0,25 µm, dengan kondisi injeksi 1 µL sampel. Suhu diatur pada 200 °C (2 menit) kemudian dinaikkan 10 °C/menit hingga 285 °C dan ditahan selama 20 menit, sementara suhu injektor dan detektor dipertahankan pada 280 °C (Elsa, 2016).

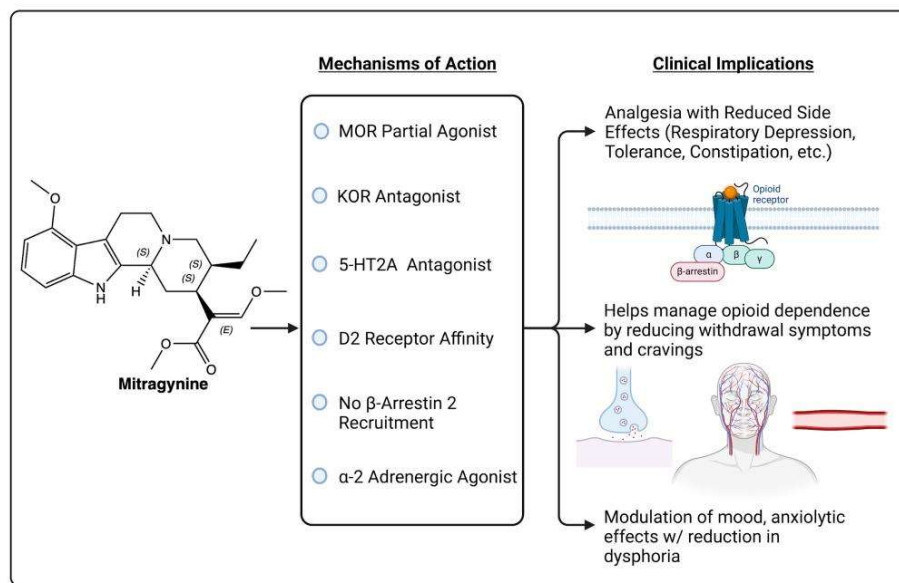


Gambar 2.6 Struktur Kimia Senyawa Mitraginin (Huestis *et al.*, 2024)

Secara farmakologis, Mitraginin memiliki aktivitas analgesik dan bersifat opioid-like dengan mekanisme sebagai agonis parsial pada reseptor μ -opioid (MOR) serta antagonis kompetitif pada reseptor δ (DOR) dan κ (KOR). Afinitas pengikatannya bervariasi, dengan nilai K_i sekitar 7,24 nM pada MOR, 60,3 nM pada DOR, dan 1.100 nM pada KOR, sehingga rasio afinitasnya adalah 1:8:152 (Obeng *et al.*, 2024; Ya *et al.*, 2019). Efikasi agonis parsial pada MOR mencapai sekitar 34%, sementara interaksinya dengan reseptor adrenergik α_2 , dopamin D_2 , dan serotonin diduga turut memberikan efek sedatif, ansiolitik, dan antidepresan meski signifikansi klinisnya masih diteliti. Selain itu, Mitraginin juga menunjukkan efek antiinflamasi, aktivitas pada saluran gastrointestinal, serta potensi sebagai agen relaksasi otot polos (Annuar *et al.*, 2024; Ernawati *et al.*, 2024).

Mitraginin memiliki bioavailabilitas oral yang terbatas akibat metabolisme lintas pertama di hati, namun tetap mampu mencapai kadar plasma yang signifikan. Senyawa ini mudah diserap di saluran pencernaan dan didistribusikan secara luas ke jaringan, termasuk melintasi *blood-brain barrier* berkat sifat lipofiliknya. Dalam plasma, Mitraginin mengalami ikatan protein yang cukup tinggi dan dimetabolisme terutama melalui enzim CYP3A4, menghasilkan metabolit aktif seperti 7-hidroksimitraginin yang memiliki potensi lebih besar. Waktu paruh eliminasi Mitraginin relatif panjang, berkisar 8–24 jam, tergantung pada dosis dan kondisi biologis individu, yang memungkinkan efek farmakologis bertahan lama. Ekskresi utama terjadi melalui urin dalam bentuk metabolit terkonjugasi glukuronida dan sulfat (Alford *et al.*, 2025).

Farmakokinetik Mitraginin menunjukkan sifat linear (orde pertama) dengan bioavailabilitas oral sekitar 21% dan ekskresi urin senyawa tidak berubah $<0,2\%$ (Ya *et al.*, 2019). Studi klinis pada sukarelawan melaporkan nilai $t_{1/2}$ sekitar $23,2 \pm 16,1$ jam dengan rentang 7–39 jam, waktu menuju C_{max} sekitar $0,83 \pm 0,35$ jam, volume distribusi sebesar $38,0 \pm 24,3$ L/kg, dan klirens sekitar $1,4 \pm 0,7$ L/jam (Ya *et al.*, 2019). Di hati, Mitraginin dimetabolisme melalui fase I berupa hidrolisis metilester di C16, O-demetilasi pada posisi 9 dan 17, serta oksidasi/reduksi menghasilkan berbagai metabolit; dilanjutkan fase II berupa glukuronidasi dan sulfatasi sebelum diekskresikan (Hanapi *et al.*, 2021; Karunakaran *et al.*, 2022; Kliewer, 2023). Profil ini membuat Mitraginin memiliki durasi aksi panjang dan relevan untuk terapi, namun sekaligus memerlukan evaluasi toksikologi mendalam.



Gambar 2.7 Polifarmakologi Mitraginin, alkaloid indol utama yang berasal dari Mitraginin (Alford *et al.*, 2025)

Efek fisiologis Mitraginin sangat tergantung dosis. Konsumsi dosis rendah (1–5 g daun kering) menghasilkan efek stimulan, sedangkan dosis tinggi (>5 g) menimbulkan sedasi mirip opioid (Karunakaran *et al.*, 2022). Studi hewan juga menunjukkan efek antidepresan dan ansiolitik melalui peningkatan neurotransmitter monoamin dan penurunan kadar kortikosteron pada model stres (Ernawati *et al.*, 2024). Mitraginin dianggap memiliki efek analgesik yang lebih ringan dalam menimbulkan depresi pernapasan dibanding

opioid klasik, namun penggunaan jangka panjang atau dosis tinggi tetap menimbulkan risiko ketergantungan (Trakulsrichai *et al.*, 2015). Beberapa laporan toksisitas menunjukkan mortalitas pada model zebrafish pada konsentrasi tinggi (100 $\mu\text{g/mL}$), dan kasus klinis menunjukkan kadar plasma Mitraginin 3,5–7.500 ng/mL dapat berhubungan dengan kematian, seringkali dalam konteks konsumsi polysubstansi (Damodaran *et al.*, 2021; Smallets *et al.*, 2025).

Secara farmakodinamik, mitraginin berperan sebagai agonis parsial pada reseptor μ -opioid, yang memberikan efek analgesik dengan risiko depresi pernapasan yang lebih rendah dibandingkan opioid klasik. Selain itu, Mitraginin juga berinteraksi dengan reseptor adrenergik (α_2), serotonergik (5-HT_{2A}), dan dopaminergik, yang berkontribusi terhadap efek stimulatif, ansiolitik, maupun euforik. Metabolit 7-hidroksimitraginin memiliki afinitas lebih kuat pada reseptor μ -opioid dibandingkan senyawa induknya, sehingga sering dianggap sebagai mediator utama efek analgesik. Namun, kombinasi aktivitas multi-reseptor ini juga menimbulkan risiko efek samping seperti takikardia, hipertensi, atau gangguan mood bila dikonsumsi dalam dosis tinggi (Alford *et al.*, 2025).

Mitraginin diketahui menghambat isoenzim sitokrom P450 terutama CYP2D6 dan CYP3A serta P-glikoprotein, sehingga berpotensi meningkatkan paparan obat lain yang dikonsumsi bersamaan (Tanna *et al.*, 2023). Hal ini menimbulkan kekhawatiran terkait interaksi obat dan efek samping yang tidak diinginkan. Dari sisi regulasi, status legal kratom dan Mitraginin masih bervariasi antar negara. Di Amerika Serikat, kratom belum dijadwalkan di bawah Controlled Substances Act tetapi diawasi ketat oleh FDA dan DEA, sementara di beberapa negara lain kratom sudah masuk daftar zat terlarang (Henningfield *et al.*, 2022; Prozialeck, 2016). Penilaian risiko ketergantungan menunjukkan potensi penyalahgunaan Mitraginin relatif lebih ringan dibanding opioid tradisional, namun tetap memerlukan pengawasan dan penelitian lanjutan.

2.3 Produk Komersial Kratom

Kratom (*Mitragyna speciosa*) merupakan tanaman asli Asia Tenggara yang kini beredar luas secara komersial dalam berbagai bentuk sediaan, baik tradisional maupun modern. Produk-produk ini meliputi serbuk daun kering, kapsul, teh celup atau daun seduh, kopi kratom, ekstrak cair, hingga minuman tonik siap konsumsi. Transformasi kratom menjadi produk siap pakai bertujuan meningkatkan kenyamanan konsumen, tetapi juga menimbulkan variasi kadar senyawa aktif seperti Mitraginin serta potensi kontaminan yang perlu diperhatikan dalam aspek keamanan (Prozialeck *et al.*, 2020).

Teh kratom umumnya dibuat dengan cara menyeduh daun kering atau serbuk kratom ke dalam air panas. Produk ini masih mempertahankan cara konsumsi tradisional masyarakat di Thailand dan Malaysia. Teh kratom dipilih konsumen karena dianggap memberikan efek yang lebih “ringan” dibandingkan bentuk ekstrak pekat. Sejumlah laporan menunjukkan bahwa penyeduhan dengan variasi suhu, waktu, dan pH memengaruhi kadar alkaloid yang terekstraksi, sehingga berimplikasi pada perbedaan kadar Mitraginin yang masuk ke tubuh (Leksungnoen *et al.*, 2022; Tanna *et al.*, 2022). Dengan demikian, dalam konteks validasi metode, teh kratom penting dianalisis karena variasi proses seduhan dapat menghasilkan kadar Mitraginin yang sangat beragam.

Kopi kratom merupakan bentuk produk modern, di mana serbuk atau ekstrak kratom dicampur dengan bubuk kopi atau diformulasikan dalam minuman beraroma kopi. Produk ini dipasarkan sebagai minuman energi dan relaksasi. Namun, keberadaan komponen kafeina, gula, atau bahan aromatik dapat memengaruhi proses ekstraksi dan analisis laboratorium, sehingga diperlukan metode analisis yang selektif untuk menghindari interferensi (Huestis *et al.*, 2024). Analisis dengan GC-FID pada produk kopi menantang karena kompleksitas matriks, sehingga validasi metode harus memastikan linearitas dan presisi tetap terjaga.

Kapsul kratom merupakan bentuk yang paling populer di pasaran karena memudahkan konsumen dalam menakar dosis. Kapsul umumnya berisi serbuk

daun kratom kering, namun ada juga yang berisi ekstrak pekat dengan klaim potensi lebih tinggi. Variasi “strain” seperti *green vein*, *red vein*, atau *white vein* kerap dijadikan dasar diferensiasi produk. Dalam penelitian ini, tiga varietas kapsul dipilih sebagai sampel, masing-masing mewakili variasi strain atau formulasi yang berbeda. Perbedaan strain dan teknik pengolahan diketahui memengaruhi kandungan Mitraginin; misalnya, *green vein* cenderung memiliki kadar Mitraginin lebih tinggi dibanding *white vein* (Dewatisari *et al.*, 2025). Oleh karena itu, validasi metode analisis diperlukan agar kadar Mitraginin dalam tiap varietas dapat dikarakterisasi secara akurat.

Kontrol kualitas dan kuantifikasi Mitraginin sangat penting karena kandungan yang terlalu tinggi berpotensi memicu efek opioid-like seperti sedasi, mual, dan risiko adiksi. Sebaliknya, kadar yang terlalu rendah dapat membuat konsumen meningkatkan dosis secara berlebihan. Dengan demikian, metode analisis yang tervalidasi memberikan dasar ilmiah untuk menilai potensi farmakologis dan keamanan produk kratom (Prozialeck *et al.*, 2020).

Sejumlah penelitian terdahulu menegaskan adanya variasi yang signifikan pada kadar Mitraginin di produk komersial. Fowble *et al.* (2019) melaporkan hasil kuantifikasi pada 16 produk kratom yang menunjukkan perbedaan kadar antar produk hingga beberapa kali lipat. Prozialeck *et al.*, 2020 menemukan bahwa selain variasi kadar Mitraginin, beberapa produk juga tercemar logam berat dan mikroba. Studi farmakokinetik oleh Tanna *et al.*, 2022 menggunakan sediaan teh untuk menghubungkan kadar Mitraginin dengan profil farmakologis, sementara Huestis *et al.*, 2024 menilai kadar Mitraginin dan metabolitnya pada subjek manusia setelah konsumsi produk kratom standar. Semua penelitian tersebut menekankan pentingnya validasi metode analisis yang spesifik terhadap matriks komersial agar data kadar Mitraginin dapat dipercaya dan bermanfaat bagi konsumen, regulator, maupun peneliti.

Lebih lanjut, penelitian yang dilakukan oleh Sudmoon *et al.* (2025) yang mengembangkan dan memvalidasi metode GC-FID untuk kuantifikasi Mitraginin dalam produk kratom komersial. Validasi metode dilakukan dengan mengacu pada parameter standar ICH yang meliputi akurasi, presisi,

spesifisitas, *Limit of Detection* (LOD) & *Limit of Quantitation* (LOQ), linieritas, *range*, *robustness*. Hasil menunjukkan adanya variasi kadar Mitraginin yang signifikan antar produk komersial. Kondisi analisis menggunakan kolom kapiler non-polar dengan suhu oven terprogram, detektor FID dioperasikan pada suhu 300 °C, dan injeksi splitless dengan volume 1 µL. Parameter validasi menunjukkan linearitas dengan koefisien determinasi (r^2) > 0,999, akurasi 98–102%, serta LOD < 0,2 µg/mL, yang menegaskan reliabilitas metode GC-FID untuk pengujian Mitraginin (Sudmoon *et al.*, 2025).

Selain itu, Yulikawanti, Phonchai, Janchawee, dan Prutipanlai (2024) juga mengembangkan metode GC-FID untuk menentukan kadar Mitraginin bersama senyawa lain seperti kafein, difenhidramin, prometazin, dan tramadol dalam produk minuman kratom. Penelitian ini menunjukkan bahwa metode GC-FID mampu memisahkan dan mengukur Mitraginin dengan sensitivitas tinggi dan linearitas yang baik, serta memiliki potensi sebagai metode rutin di laboratorium. Instrumen yang digunakan adalah GC-FID dengan kolom kapiler non-polar DB-5, mode injeksi splitless dengan volume 1 µL, suhu injektor 250 °C, oven terprogram dari 200 °C hingga 280 °C, serta detektor FID pada suhu 300 °C. Hasil penelitian ini menegaskan keunggulan GC-FID sebagai teknik analisis yang ekonomis dan aplikatif untuk kontrol mutu produk kratom (Yulikawanti *et al.*, 2024).

2.4 Instrumen Gas Kromatografi

Pemisahan menggunakan dua fase berbeda (kromatografi partisi) pertama kali ditemukan oleh Martin dan Synge pada tahun 1941, ketika mereka berhasil memisahkan asam amino dengan menggunakan dua fase cair yang berbeda. Selanjutnya, kromatografi gas (GC) dikembangkan pada tahun 1952 oleh James dan Martin, yang mendemonstrasikan pemisahan asam lemak volatil menggunakan fase gas–cair. Pada awalnya, metode ini dikenal dengan istilah *vapor chromatography*, namun kini lebih dikenal sebagai GC. Sejak diperkenalkan pada tahun 1950-an, GC berkembang menjadi metode dinamis dalam pemisahan dan deteksi senyawa volatil, serta menjadi instrumen utama di laboratorium analisis. Perkembangan teknologi dalam bidang elektronik, komputer, dan kolom telah menghasilkan batas deteksi yang semakin rendah,

resolusi lebih tinggi, serta identifikasi senyawa yang lebih akurat (Surani *et al.*, 2023).

Secara prinsip, kromatografi gas merupakan teknik pemisahan komponen dalam suatu campuran berdasarkan interaksi antara fase diam (kolom) dan fase gerak berupa gas inert. Aplikasi GC umumnya ditujukan untuk sampel yang bersifat volatil, mudah menguap, serta stabil terhadap pemanasan. Sampel yang tidak memenuhi kriteria tersebut tetap dapat dianalisis melalui perlakuan khusus, seperti derivatisasi, atau dengan teknik tambahan, misalnya metode headspace dan pirolisis. Kromatografi gas banyak digunakan dalam berbagai disiplin ilmu, termasuk kedokteran, biologi, dan analisis kimia. Contoh aplikasinya meliputi penentuan zat esensial seperti senyawa fenolik, flavonoid hasil fermentasi mikroba dalam pangan dan minuman, serta analisis senyawa dalam matriks biologis seperti urin, plasma, dan feses (Kristi, 2021).

GC dikenal unggul karena waktu analisis yang relatif cepat serta sensitivitas yang tinggi. Beberapa detektor yang dapat digunakan pada instrumen ini antara lain FID (*Flame Ionization Detector*), HHD (*Heat Hose Detector*), NPD (*Nitrogen-Phosphorus Detector*), ECD (*Electron Capture Detector*), dan MS (*Mass Spectrometer*) (Pulungan *et al.*, 2018). Di antara detektor tersebut, FID merupakan yang paling luas digunakan karena sangat sensitif terhadap senyawa dengan ikatan C–H, sementara H₂O dan CO₂ tidak memberikan respon, serta halogen dan amina hanya menunjukkan respon lemah (Pulungan *et al.*, 2018).

Dalam penggunaannya, GC mengandalkan fase gerak berupa gas inert seperti nitrogen, helium, hidrogen, atau argon, yang dipilih karena bersifat tidak reaktif. Selain itu, cairan superkritis seperti karbon dioksida, dinitrogen oksida, dan amonia juga dapat digunakan. Gas pembawa harus memiliki kemurnian tinggi dengan aliran yang dikontrol ketat agar efisiensi kolom dan reproduibilitas hasil tetap optimal. Sampel dapat diinjeksi secara manual atau otomatis melalui port injektor yang dipanaskan hingga suhu tinggi sehingga sampel segera menguap dan terbawa ke dalam kolom. Bila senyawa target tidak cukup volatil, derivatisasi diperlukan, misalnya dengan sililasi, alkilasi,

atau asilasi. Sililasi merupakan teknik yang paling umum, di mana atom hidrogen pada gugus aktif digantikan dengan gugus alkilsilil sehingga menghasilkan bentuk yang lebih volatil, kurang polar, dan lebih stabil secara termal (Hasibuan *et al.*, 2022).

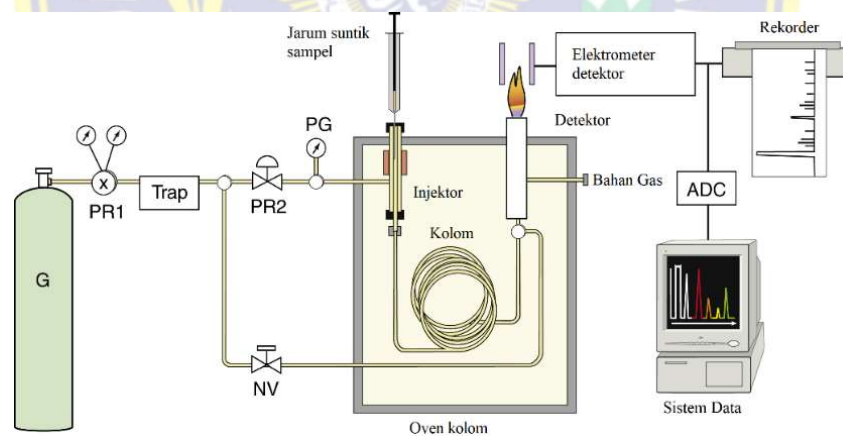
Kondisi retensi dalam kolom GC sangat dipengaruhi oleh pengaturan suhu. Dengan pemilihan suhu awal yang tepat serta gradien suhu yang sesuai, resolusi pemisahan senyawa dengan interaksi kuat maupun lemah dapat ditingkatkan. Kolom GC ditempatkan di dalam oven bersuhu terkontrol, dan tersedia dalam dua tipe utama, yaitu kolom kemas dan kolom kapiler. Kolom kemas umumnya memiliki panjang 1–5 m dan diameter 2–4 mm dengan fase diam yang diisi di dalamnya, sedangkan kolom kapiler berukuran 5–100 m dengan diameter 0,1–0,8 mm dan fase diam yang dilapiskan pada permukaan interior. Kolom kapiler menawarkan efisiensi dan batas deteksi yang lebih baik, sementara kolom kemas memiliki kapasitas sampel lebih besar sehingga sering digunakan untuk pemurnian (Hasibuan *et al.*, 2022).

Berdasarkan jenis fase diam, kromatografi gas dibedakan menjadi kromatografi gas-cair dengan fase diam berupa cairan titik didih tinggi yang diimobilisasi pada penyangga padat, serta kromatografi gas-padat (KGP) dengan fase diam berupa padatan. Pada KGP, pemisahan terjadi melalui mekanisme adsorpsi, sementara pada KGC pemisahan didasarkan pada mekanisme partisi. KGP sebenarnya sudah digunakan sejak sebelum tahun 1800 untuk pemurnian gas, namun perkembangannya terbatas hingga ditemukan material padatan baru. Sebaliknya, KGC yang diperkenalkan James dan Martin pada tahun 1952 berkembang pesat karena lebih efisien, serbaguna, cepat, dan sensitif. Bahkan, sampel dalam jumlah mikrogram hingga gram masih dapat dianalisis. Oleh karena keunggulan tersebut, KGC lebih banyak digunakan dalam berbagai aplikasi kimia organik (Hasibuan *et al.*, 2022).

Prinsip kromatografi gas (GC) adalah memisahkan senyawa organik berdasarkan perbedaan titik didih dan kepolaran masing-masing komponen dengan menggunakan fase gas sebagai fase gerak (Margareta & Wonorahardjo, 2023). Dalam GC, sampel terlebih dahulu diuapkan, kemudian dipisahkan dalam kolom berdasarkan afinitas komponen terhadap fase stasioner dan fase

gerak. Kolom yang digunakan umumnya berupa kolom kapiler, terutama pada instrumen GC yang dilengkapi dengan *mass spectrometer* (GC/MS) untuk menganalisis senyawa organik yang mudah menguap (Thufailah *et al.*, 2023). Kromatografi gas memiliki prinsip dasar yang sama dengan kromatografi lainnya, namun perbedaannya terletak pada fase gerak berupa gas inert serta penggunaan oven dengan suhu yang dapat dikontrol untuk membantu proses pemisahan. Hal ini berbeda dengan kromatografi kolom yang hanya menggunakan fase cair dan tidak melibatkan pengaturan temperatur.

Selain itu, sensitivitas deteksi pada GC sangat tinggi. Misalnya, GC yang dilengkapi dengan *flame ionization detector* (FID) memiliki sensitivitas lebih baik dibandingkan HPLC dalam menganalisis analit pada konsentrasi (Thufailah *et al.*, 2023). Secara lebih rinci, prinsip kerja FID adalah melewati gas melalui nyala hidrogen (*hydrogen flame*), sehingga uap organik yang masuk akan terionisasi dan menghasilkan aliran listrik pada detektor. Besarnya aliran listrik ini sebanding dengan jumlah ion yang terbentuk, sehingga memungkinkan kuantifikasi senyawa organik secara sensitif dan akurat (Hasibuan *et al.*, 2022).



Gambar 2.8 Komponen Utama Sistem Gas Chromatography (Hasibuan *et al.*, 2022)

Komponen utama sistem GC diilustrasikan pada **Gambar 2.9**. Desain dasarnya terdiri dari lima bagian, yaitu tabung gas sebagai sumber fase gerak, injektor sampel, kolom, detektor, dan komputer untuk akuisisi data. Sistem ini dapat diotomatisasi untuk meningkatkan ketepatan dan efisiensi pemisahan.

Gas pembawa (fase gerak) yang digunakan harus bersifat inert secara kimia (Hasibuan *et al.*, 2022).

1. Gas Pengangkut

Gas pengangkut atau *carrier gas* ditempatkan dalam silinder bertekanan tinggi, biasanya sekitar 150 atm. Tekanan ini terlalu besar untuk digunakan secara langsung, sehingga perlu diatur melalui regulator. Gas pengangkut harus memenuhi persyaratan tertentu, yaitu: (1) inert, tidak bereaksi dengan cuplikan, pelarut, atau material kolom; (2) murni, mudah diperoleh, dan murah; (3) sesuai untuk detektor yang digunakan; serta (4) dapat mengurangi difusi gas (Hasibuan *et al.*, 2022).

Gas yang sering digunakan antara lain helium, argon, nitrogen, karbon dioksida, dan hidrogen. Helium dan argon sangat baik karena tidak mudah terbakar, namun relatif mahal. Hidrogen lebih murah, tetapi mudah terbakar sehingga penggunaannya memerlukan kehati-hatian. Kadang-kadang juga digunakan karbon dioksida. Pemilihan gas pembawa ditentukan oleh jenis detektor yang digunakan. Tabung gas pembawa dilengkapi dengan pengatur tekanan keluaran, pengukur tekanan, sistem pengukur kecepatan alir gas, serta penapis molekuler untuk menghilangkan uap air dan pengotor lain. Kecepatan alir gas dikontrol melalui pengatur tekanan dua tingkat, yaitu pengatur kasar pada tabung gas dan pengatur halus pada kromatografi. Tekanan masuk ke kromatograf diatur pada kisaran 10–50 psi untuk menghasilkan laju alir 25–150 mL/menit pada kolom terkemas dan 1–25 mL/menit pada kolom kapiler (Hasibuan *et al.*, 2022).

2. Tempat Injeksi (*Injection Port*)

Pada kromatografi gas, sampel harus dalam bentuk fase uap. Gas dan uap dapat dimasukkan secara langsung, sedangkan senyawa organik yang berbentuk cair atau padat harus diuapkan terlebih dahulu melalui pemanasan sebelum masuk ke kolom. Oleh karena itu, port injeksi selalu dipanaskan dan suhunya dapat diatur. Aturan umum pengaturan suhu adalah sekitar 50 °C lebih tinggi daripada titik didih tertinggi senyawa

dalam sampel. Jika titik didih tidak diketahui, dilakukan percobaan bertahap dengan menaikkan suhu injektor. Namun, suhu tidak boleh terlalu tinggi agar tidak menimbulkan degradasi termal. Sampel dimasukkan ke dalam kolom menggunakan jarum injeksi (*gas tight syringe*). Jumlah sampel yang diinjeksikan harus sedikit, karena GC sangat sensitif. Umumnya, volume injeksi adalah 0,5–50 mL untuk gas dan 0,2–20 mL untuk cairan (Hasibuan *et al.*, 2022).

3. Kolom

Kolom merupakan komponen penting dalam pemisahan senyawa pada GC. Terdapat dua jenis kolom yang digunakan (Hasibuan *et al.*, 2022):

- a. Kolom kemas, berupa tabung dari kaca atau baja tahan karat yang diisi dengan padatan inert. Kolom ini memiliki panjang 1,5–10 m dan diameter 2,2–4 mm.
- b. Kolom kapiler, biasanya terbuat dari silika dengan lapisan poliamida, berukuran panjang 20–26 m dengan diameter sangat kecil.

Pemilihan kolom bergantung pada volatilitas senyawa, selektivitas, serta resolusi yang dibutuhkan. Pada aplikasi *LC–GC multidimensi*, pra-kolom sering digunakan untuk mendukung teknik celah retensi. Pra-kolom harus dapat dibasahi oleh pelarut LC, bersifat inert, dan memiliki daya retensi lebih rendah dibanding kolom utama. Untuk meningkatkan performa, permukaan silika pada pra-kolom biasanya dinonaktifkan menggunakan agen seperti HMDS atau DPTMDS. Panjang pra-kolom umumnya 1–30 m dengan diameter 0,32 mm, disesuaikan dengan volume eluen, jenis pelarut, dan laju alir gas pembawa (Hasibuan *et al.*, 2022).

4. Detektor

Detektor ditempatkan pada ujung kolom untuk mendeteksi analit yang terbawa gas pembawa. Sinyal yang dihasilkan berupa sinyal elektronik, kemudian diubah menjadi kromatogram. Sensor detektor sebaiknya ditempatkan sedekat mungkin dengan ujung kolom untuk memaksimalkan deteksi, sementara rangkaian elektroniknya berfungsi mendigitalkan sinyal (Sugiharto *et al.*, 2022).

Detektor yang ideal harus memiliki sensitivitas tinggi, batas deteksi rendah, stabilitas baik, serta mudah dioperasikan. Namun, karena setiap detektor memiliki karakteristik berbeda, pemilihannya harus disesuaikan dengan kebutuhan analisis (Sugiharto *et al.*, 2022). Beberapa jenis detektor umum yang digunakan antara lain *Thermal Conductivity Detector* (TCD), *Flame Ionization Detector* (FID), *Electron Capture Detector* (ECD), dan *Mass Spectrometer* (MS). Di antara detektor tersebut, FID dan TCD paling sering digunakan. TCD bersifat non-destruktif, dapat mendeteksi hampir semua senyawa kecuali gas pembawa, sedangkan FID bersifat destruktif, sangat sensitif terhadap hidrokarbon, namun tidak mendeteksi air. FID biasanya digunakan bersama GC-MS untuk meningkatkan kemampuan analisis (Hasibuan *et al.*, 2022).

5. Jenis Detektor

Detektor dalam kromatografi gas (GC) dapat diklasifikasikan ke dalam lima kategori utama, yaitu: (1) universal vs. selektif, (2) sensitif terhadap konsentrasi vs. sensitif terhadap massa, (3) destruktif vs. non-destruktif, (4) berdasarkan sifat *bulk* vs. sifat zat terlarut, serta (5) analog vs. digital. Dari kelima klasifikasi tersebut, tiga yang dianggap paling penting adalah klasifikasi berdasarkan universal-selektif, konsentrasi-massa, dan destruktif-non-destruktif (Hasibuan *et al.*, 2022; Sugiharto *et al.*, 2022).

1. Universal vs. Selektif

Detektor dapat dibagi menjadi dua kategori umum, yaitu universal dan selektif (spesifik). Detektor universal mampu mendeteksi hampir semua senyawa. Contohnya adalah *Thermal Conductivity Detector* (TCD). Sebaliknya, detektor selektif mendeteksi senyawa tertentu berdasarkan sifat khususnya, misalnya *Electron Capture Detector* (ECD) yang selektif terhadap senyawa elektronegatif. Pemilihan jenis detektor sangat bergantung pada analit. Detektor universal sangat berguna untuk analisis non-target, terutama ketika senyawa yang terkandung dalam sampel belum diketahui, karena

memungkinkan kuantifikasi semua komponen. Namun, untuk analisis senyawa spesifik, detektor selektif lebih direkomendasikan.

2. Sensitif terhadap Konsentrasi vs. Sensitif terhadap Massa

Klasifikasi lain didasarkan pada jenis responnya. Detektor sensitif terhadap konsentrasi merespons terhadap konsentrasi analit yang terbawa oleh gas pembawa melewati detektor. Contoh detektor jenis ini adalah TCD dan ECD. Responnya dipengaruhi oleh laju alir gas pembawa: semakin rendah laju alir, semakin tinggi puncak yang dihasilkan. Sebaliknya, detektor sensitif terhadap massa merespons jumlah massa analit atau ion yang melewati detektor. Karena mendeteksi massa, responnya tidak dipengaruhi oleh perubahan laju alir. Contoh detektor jenis ini adalah *Flame Ionization Detector* (FID).

3. Destruktif vs. Non-destruktif

Detektor juga dapat dibedakan menjadi destruktif dan non-destruktif. Detektor destruktif mengonsumsi analit melalui reaksi kimia, misalnya pembakaran dalam FID. Sementara itu, detektor non-destruktif memungkinkan analit melewati detektor tanpa mengalami perubahan kimia, sehingga analit masih dapat digunakan untuk analisis lanjutan. TCD termasuk ke dalam detektor non-destruktif karena mendeteksi perubahan konduktivitas termal

4. Detektor Sifat Bulk vs. Sifat Zat Terlarut

Klasifikasi yang kurang umum adalah berdasarkan sifat *bulk* dan sifat zat terlarut. Detektor sifat bulk mengukur sifat fisik secara keseluruhan, seperti indeks bias atau konstanta dielektrik. Prinsipnya adalah membandingkan perbedaan sifat fisik antara analit dalam gas pembawa dengan gas pembawa murni. Namun, detektor ini memiliki sensitivitas rendah dan dipengaruhi kondisi lingkungan, seperti suhu dan tekanan. Contoh detektor jenis ini adalah TCD dan ECD. Sebaliknya, detektor sifat zat terlarut mendeteksi sifat fisik atau kimia yang khas dari suatu analit, seperti fluoresensi.

5. Analog vs. Digital

Klasifikasi ini didasarkan pada sensor yang digunakan. Sensor digital hanya bekerja pada kondisi 0% atau 100%, sedangkan sensor analog mampu mendeteksi nilai kontinu antara 0% hingga 100%. Oleh karena itu, pengukuran dengan detektor analog lebih presisi dibandingkan dengan detektor digital. Umumnya, detektor GC yang digunakan saat ini berbasis sensor analog.

6. Oven Kolom

Kolom ditempatkan dalam oven dengan suhu terkontrol, biasanya sedikit di bawah titik didih sampel. Jika suhu terlalu tinggi, fase diam cair dapat menguap atau senyawa akan bergerak terlalu cepat dalam kolom, sehingga pemisahan tidak optimal.

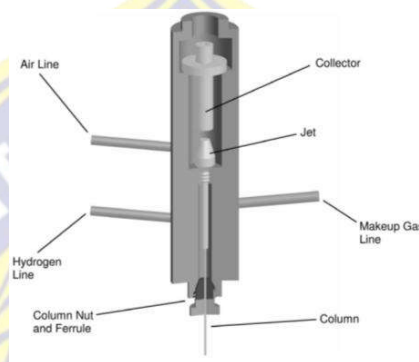
7. Rekorder

Rekorder berfungsi mengubah sinyal dari detektor menjadi kromatogram. Analisis kualitatif dilakukan dengan membandingkan waktu retensi antara sampel dan standar, sedangkan analisis kuantitatif dilakukan dengan menghitung luas area atau tinggi puncak kromatogram. Rekorder bekerja dengan pena yang bergerak di atas kertas sesuai sinyal keluaran detektor, menghasilkan kromatogram berupa puncak-puncak sesuai senyawa dalam sampel.

2.4.1 *Flame Ionization Detector (FID)*

Kromatografi gas banyak menggunakan Flame Ionization Detector (FID) karena detektor ini memiliki sensitivitas yang sangat tinggi terhadap senyawa yang mengandung karbon dan hidrogen, serta memberikan respon yang linear pada berbagai konsentrasi (Skoog *et al.*, 2018). Prinsip kerja FID didasarkan pada proses ionisasi melalui pembakaran sampel dalam nyala hidrogen-udara. Pada proses ini, komponen organik yang keluar dari kolom akan terbakar sehingga menghasilkan ion-ion dan elektron. Ion-ion tersebut kemudian dikumpulkan oleh elektroda, menghasilkan arus listrik yang sebanding dengan jumlah zat yang dianalisis (Djenar *et al.*, 2006 dalam (Kartika, 2022)).

FID dikenal sebagai detektor universal yang umum digunakan dalam kromatografi gas karena mampu mendeteksi hampir semua senyawa organik, khususnya hidrokarbon, dengan sensitivitas tinggi dan respon silang yang rendah terhadap senyawa anorganik. Keunggulan FID meliputi sensitivitas tinggi, jangkauan respon luas, noise rendah, serta kestabilan respon. Namun demikian, FID bersifat destruktif karena sampel dibakar, memerlukan tiga suplai gas (hidrogen sebagai bahan bakar, helium atau nitrogen sebagai gas pembawa, dan oksigen atau udara sebagai agen pembakaran), serta dipengaruhi oleh suhu operasional (Dąbrowski, 2024).



Gambar 2.9 Komponen Utama *Flame Ionization Detector* (Dąbrowski, 2024)

FID terdiri atas tujuh bagian utama, yaitu kolom, ujung nyala (flame tip/anoda), nyala api, kolektor (katoda), catu daya, badan menara (*tower body*), dan pemantik (*igniter*). Sampel dari kolom GC dicampur dengan gas *make-up* hidrogen, lalu dibakar dalam nyala oksigen/udara pada ujung nyala. Proses pembakaran ini menguraikan senyawa organik, menghasilkan ion-ion yang kemudian dikumpulkan oleh kolektor bermuatan positif. Arus listrik yang terbentuk mencerminkan total kandungan karbon dalam sampel (Rood, 2007; Sugiharto *et al.*, 2022).

Selain itu, FID juga dapat dimodifikasi menjadi detektor nitrogen-fosfor (NPD) yang sangat sensitif terhadap molekul tertentu, termasuk banyak obat yang mengandung nitrogen atau fosfor (Hasibuan *et al.*, 2022). Karakteristik ini menjadikan FID sebagai salah satu detektor paling andal, ekonomis, dan banyak digunakan dalam sistem kromatografi gas untuk

analisis throughput tinggi terhadap senyawa-senyawa berbasis karbon (Jumhawan *et al.*, 2015).

Beberapa penelitian menunjukkan keberhasilan penerapan GC-FID untuk analisis senyawa bioaktif dalam tanaman obat dan produk herbal karena kemampuannya menghasilkan puncak yang tajam dan reproduktibilitas tinggi. Penerapan detektor FID dalam analisis Mitraginin juga terbukti efektif, seperti dilaporkan oleh Sudmoon *et al.*, (2025) yang mengembangkan dan memvalidasi metode GC-FID untuk kuantifikasi Mitraginin dalam produk kratom komersial. Hasil validasi menunjukkan linearitas dengan koefisien determinasi (r^2) > 0,999, akurasi 98–102%, serta LOD < 0,2 µg/mL, menegaskan reliabilitas FID untuk analisis Mitraginin.

Selain itu, Yulikawanti *et al.*, (2024) juga mengembangkan metode GC-FID untuk menentukan kadar Mitraginin bersama senyawa lain seperti kafein, difenhidramin, prometazin, dan tramadol dalam produk minuman kratom. Hasil penelitian menunjukkan bahwa metode GC-FID mampu memisahkan dan mengukur Mitraginin dengan sensitivitas tinggi dan linearitas yang baik, serta memiliki potensi sebagai metode rutin di laboratorium untuk kontrol mutu produk kratom. Dengan demikian, berdasarkan hasil-hasil penelitian tersebut, penggunaan GC-FID dinilai efektif, ekonomis, dan aplikatif dalam analisis kadar Mitraginin pada berbagai matriks produk komersial, serta layak dijadikan dasar dalam pengembangan metode validasi analitik yang andal.

2.4.2 Gas Kromatografi-Flame Ionization Detector

Gas Chromatography-Flame Ionization Detector (GC-FID) adalah metode analisis yang menggabungkan kromatografi gas dengan detektor ionisasi nyala (Flame Ionization Detector/FID). Teknik ini banyak digunakan untuk analisis kualitatif maupun kuantitatif senyawa organik yang mudah menguap dan stabil pada suhu tinggi. Prinsip kerja FID didasarkan pada ionisasi senyawa organik di dalam nyala hidrogen–udara. Komponen hasil pemisahan yang keluar dari kolom terbakar dalam ruang detektor, menghasilkan ion dan elektron. Ion-ion tersebut ditarik menuju elektroda kolektor dengan tegangan tertentu sehingga terbentuk arus listrik yang

proporsional dengan jumlah atom karbon dalam senyawa yang terbakar. Arus ini diperkuat dan direkam sebagai sinyal dalam bentuk puncak kromatogram, di mana ketinggian atau luas puncak berbanding lurus dengan konsentrasi senyawa dalam sampel (Budiman *et al.*, 2015; Jumhawan *et al.*, 2015; Skoog *et al.*, 2018).

Sebagai detektor tipe massa destruktif, FID bekerja dengan cara mengionisasi bahan organik menggunakan nyala hidrogen sehingga terbentuk aliran ion yang kemudian diukur intensitasnya (Surani & Asmorob, 2025). Detektor ini sangat sensitif terhadap senyawa organik, memiliki jangkauan respons luas, noise rendah, serta memberikan respon linear untuk berbagai konsentrasi analit. FID sangat selektif terhadap senyawa yang mengandung ikatan C–H dan umumnya tidak merespons senyawa anorganik (Skoog *et al.*, 2018). Karena keunggulannya tersebut, GC-FID banyak digunakan dalam analisis hidrokarbon, alkohol, etanol, serta berbagai senyawa organik lain pada bidang petrokimia, lingkungan, dan farmasi (Jumhawan *et al.*, 2015).

Prinsip pemisahan pada kromatografi gas didasarkan pada perbedaan volatilitas senyawa. Senyawa dengan volatilitas tinggi akan memiliki waktu retensi yang rendah, sedangkan senyawa dengan volatilitas rendah akan memiliki waktu retensi lebih tinggi. Selain itu, pemisahan juga dapat dipengaruhi oleh perbedaan kepolaran antar senyawa, terutama bila digunakan kolom semipolar. Faktor-faktor yang memengaruhi waktu retensi meliputi sifat senyawa, sifat konsentrasi adsorben, temperatur kolom, serta laju alir gas pembawa (Surani *et al.*, 2023). Gas pembawa yang digunakan antara lain helium, nitrogen, hidrogen, atau argon. Helium biasanya dipilih untuk detektor konduktivitas termal karena konduktivitasnya tinggi, sedangkan pada GC-FID digunakan hidrogen sebagai bahan bakar bersama udara atau oksigen sebagai agen pembakaran, dan helium atau nitrogen sebagai gas pembawa (Buse *et al.*, 2019; Surani *et al.*, 2023).

Kolom yang digunakan pada GC-FID dapat berupa kolom kemas maupun kolom kapiler. Kolom kemas biasanya berupa pipa logam, kaca, atau plastik berdiameter sekitar 0,5 cm dengan panjang 5–10 m, berisi penyangga padat inert yang dilapisi fase diam. Namun, kolom kapiler kini lebih banyak

digunakan karena mampu memberikan daya pisah lebih tinggi, sensitivitas lebih baik, serta membutuhkan sedikit sampel. Kolom kapiler umumnya terbuat dari silika atau baja tahan karat dengan diameter sekitar 0,1 mm dan panjang hingga 30 m (Surani *et al.*, 2023).

Untuk memperoleh hasil analisis optimal, pengaturan kondisi kromatografi sangat penting, meliputi pemilihan jenis gas pembawa, kecepatan alir gas, mode dan volume injeksi, suhu injektor, suhu kolom, program kenaikan suhu, serta suhu pada interface dan ion source. Optimasi suhu kolom dan program kenaikan suhu diperlukan untuk meningkatkan resolusi, mempercepat waktu analisis, serta menghasilkan pemisahan yang baik pada campuran senyawa dengan rentang titik didih luas (Surani *et al.*, 2023). Secara umum, GC-FID merupakan metode analisis yang efisien, sensitif, dan luas penggunaannya untuk pengujian senyawa organik dalam berbagai jenis sampel.

Dalam industri farmasi, GC memiliki aplikasi luas, antara lain untuk analisis impuritas dalam bahan baku obat, penentuan residu pelarut organik, serta karakterisasi senyawa volatil dalam produk farmasi (Jwaili, 2019). Detektor yang paling umum digunakan adalah Flame Ionization Detector (FID), karena memiliki sensitivitas tinggi terhadap senyawa organik yang mengandung karbon, serta mampu menghasilkan respon yang linear dalam rentang konsentrasi yang luas.

Beberapa penelitian menunjukkan keberhasilan penerapan GC-FID pada berbagai bidang. Misalnya, metode *headspace* GC-FID telah digunakan untuk penetapan kadar formaldehida dalam eksipien farmasi (Daoudy *et al.*, 2018), Sementara penelitian lain mengembangkan dan memvalidasi metode kromatografi gas dengan detektor ionisasi nyala (GC-FID) untuk analisis impuritas organik volatil dalam zat aktif kemantane secara langsung dari bentuk padat (Djozan & Norouzi, 2022). Selain itu, GC-FID juga diaplikasikan dalam analisis metabolit alami seperti minyak atsiri, kopi, dan bahan herbal, karena mampu memisahkan komponen kompleks dengan presisi yang baik (Sarih *et al.*, 2021). Dengan demikian, penggunaan GC-FID sangat relevan dalam pengembangan metode analisis senyawa aktif alami

seperti Mitraginin, terutama bila senyawa tersebut memiliki volatilitas memadai atau dapat diderivatisasi menjadi bentuk yang lebih mudah menguap.

Sugiharta (2023) melakukan penelitian mengenai analisis dan karakterisasi senyawa aktif daun *Mitragyna speciosa* menggunakan kombinasi GC-MS dan LC-HRMS QToF. Penelitian tersebut bertujuan untuk mengidentifikasi profil senyawa aktif, termasuk Mitraginin dan derivatnya, pada berbagai sampel kratom. Hasil GC-MS menunjukkan bahwa Mitraginin muncul sebagai puncak dominan dengan waktu retensi konsisten, sedangkan LC-HRMS QToF memberikan konfirmasi struktur berdasarkan rasio massa/tetapan waktu (m/z) yang sesuai dengan database referensi. Kombinasi kedua metode ini memberikan gambaran lengkap mengenai komposisi kimia kratom serta memperkuat bukti bahwa teknik berbasis GC memiliki kemampuan andal untuk mendeteksi Mitraginin dalam matriks kompleks. Dengan demikian, hasil penelitian ini menjadi dasar empiris untuk mengembangkan dan memvalidasi metode GC-FID sebagai alternatif yang lebih efisien dalam analisis Mitraginin (Sugiharta *et al.*, 2023). Meskipun GC-FID memiliki keunggulan dalam kuantifikasi, metode ini tetap memerlukan validasi parameter analitik seperti akurasi, presisi, spesifisitas, *Limit of Detection* (LOD) & *Limit of Quantitation* (LOQ), linieritas, *range*, *robustness* agar hasil pengujian dapat diterima secara ilmiah dan memenuhi standar internasional.

Kromatografi Gas (*Gas Chromatography*/GC) merupakan metode analisis instrumental yang memiliki banyak keunggulan, terutama dalam hal kecepatan, efisiensi pemisahan, dan sensitivitas deteksi. Kelebihan utama teknik ini antara lain adalah waktu analisis yang relatif singkat dan ketajaman pemisahan yang tinggi, karena proses partisi antara fase gas dan fase diam berlangsung sangat cepat sehingga menghasilkan puncak kromatogram yang tajam dan terpisah dengan baik. Selain itu, penggunaan kolom dengan panjang yang lebih besar memungkinkan peningkatan efisiensi pemisahan terhadap campuran yang kompleks. Gas pembawa memiliki viskositas yang rendah, sehingga mempercepat perpindahan molekul analit di dalam kolom dan

mengurangi tekanan sistem. Di sisi lain, kesetimbangan partisi antara gas dan cairan yang cepat menjadikan analisis dengan GC lebih sensitif serta mampu mendeteksi senyawa dalam jumlah yang sangat kecil. Pemilihan fase diam yang beragam juga memungkinkan GC untuk memisahkan hampir semua jenis campuran senyawa organik maupun semi-volatil (Hasibuan *et al.*, 2022).

Khusus untuk Gas Chromatography–Flame Ionization Detector (GC–FID), kelebihan utamanya terletak pada kemampuan pemisahan yang tinggi, sensitivitas yang baik, serta presisi kuantitatif yang unggul. Detektor FID memberikan respon yang proporsional terhadap jumlah atom karbon dalam suatu senyawa, sehingga sangat sensitif terhadap senyawa organik dan memberikan hasil kuantitatif yang akurat (Spanjers *et al.*, 2017). FID juga dikenal memiliki rentang linearitas yang sangat luas hingga tujuh orde besaran dan mampu mendeteksi senyawa karbon pada konsentrasi rendah (Breen, 2022). Biaya operasional GC-FID relatif lebih rendah dibandingkan GC-MS karena tidak memerlukan sistem vakum maupun perawatan yang kompleks. Selain itu, kebutuhan volume sampel yang kecil dan kecepatan analisis yang tinggi menjadikan metode ini efisien untuk pengujian rutin di laboratorium kontrol mutu.

Meskipun demikian, kromatografi gas juga memiliki beberapa keterbatasan. Pertama, teknik ini hanya dapat digunakan untuk zat yang mudah menguap dan stabil pada suhu tinggi. Senyawa yang bersifat termolabil atau memiliki berat molekul besar, seperti beberapa alkaloid termasuk Mitraginin, mungkin memerlukan proses derivatisasi agar dapat dianalisis. Kedua, kromatografi gas kurang cocok digunakan untuk memisahkan campuran dalam jumlah besar; teknik ini ideal untuk skala analitik (mikrogram hingga miligram), tetapi kurang efisien untuk pemisahan dalam skala gram hingga kilogram. Ketiga, detektor FID bersifat destruktif karena proses ionisasi dilakukan melalui pembakaran, sehingga sampel tidak dapat digunakan kembali untuk analisis lanjutan. Keempat, FID tidak memberikan informasi struktural mengenai senyawa yang terdeteksi, berbeda dengan detektor spektrometri massa (MS) yang dapat mengidentifikasi pola fragmentasi molekul. Selain itu, kompleksitas matriks pada sampel produk

komersial dapat menyebabkan interferensi sinyal yang menurunkan akurasi hasil apabila proses pemisahan atau pembersihan sampel tidak dilakukan secara optimal (Hasibuan *et al.*, 2022).

Secara keseluruhan, GC-FID tetap menjadi metode analisis yang efisien, ekonomis, dan andal untuk analisis senyawa organik, terutama dalam validasi metode kuantitatif seperti analisis Mitraginin. Keunggulan sensitivitas, linearitas, dan presisi yang tinggi menjadikan GC-FID relevan untuk digunakan di laboratorium farmasi, dengan catatan bahwa tantangan terkait volatilitas dan kestabilan termal senyawa dapat diatasi melalui optimasi kondisi analisis, pemilihan kolom yang tepat, serta strategi preparasi sampel yang sesuai.

2.5 Validasi Metode

Validasi metode analisis merupakan serangkaian studi laboratorium yang bertujuan memastikan bahwa suatu metode memenuhi persyaratan kinerja untuk tujuan tertentu, misalnya identifikasi, penetapan kadar, atau kontrol kualitas produk (ICH, 2024). Proses ini penting untuk menjamin metode analisis menghasilkan data yang akurat, presisi, spesifik, dan andal dalam rentang yang diperlukan. Pedoman internasional yang banyak dijadikan acuan antara lain ICH Q2 (R1/R2), USP <1225>, serta regulasi dari FDA, EMA, dan AOAC yang menjelaskan parameter yang perlu diuji beserta pendekatan statistik yang dianjurkan. Menurut Harmita (2004), validasi metode analisis merupakan tindakan penilaian terhadap parameter tertentu melalui percobaan laboratorium untuk membuktikan kesesuaiannya (Surani & Asmorob, 2025). Hal ini sejalan dengan Aryani, (2023) yang menyatakan bahwa validasi dilakukan untuk mengonfirmasi apakah suatu metode analisis sesuai dengan tujuan penggunaannya. Validasi diperlukan untuk menjamin prosedur analisis memiliki reliabilitas, akurasi, dan presisi yang dapat diterima. Lebih lanjut, Gandjar dan Rohman (2014) dalam Ameliani (2024) menegaskan bahwa validasi metode merupakan langkah penting untuk memastikan kualitas analisis kuantitatif. Parameter yang umum diuji meliputi linearitas, batas deteksi, batas kuantifikasi, spesifisitas, akurasi, presisi, rentang, dan ketegaran (Ameliani *et al.*, 2024). Alwi (2017) dalam Agustina (2020) menambahkan

bahwa validasi merupakan pembuktian bahwa suatu metode, proses, atau sistem dapat menghasilkan hasil yang konsisten, sehingga validasi harus dilakukan baik ketika metode baru dikembangkan, metode baku direvisi, digunakan pada alat atau laboratorium berbeda, maupun ketika perlu menunjukkan kesetaraan antar metode (Agustina *et al.*, 2020).

Validasi juga diartikan sebagai konfirmasi melalui pengujian dan pengadaan bukti objektif bahwa persyaratan tertentu untuk tujuan khusus telah terpenuhi. Dalam SNI 19-17025-2017, disebutkan bahwa laboratorium wajib memvalidasi metode tidak baku, metode yang dikembangkan, serta metode baku yang digunakan di luar lingkup yang dimaksudkan (Muryanto, 2020). Validasi sangat penting untuk memperoleh data yang sesuai dengan tujuannya, karena data yang valid dibutuhkan oleh analis dalam menjamin keandalan proses analisis. Selain itu, validasi juga dilakukan bila terdapat perubahan kondisi analisis maupun metode standar. Validasi bermanfaat untuk mengevaluasi kinerja metode, menjamin keakuratan data, serta meminimalisasi penyimpangan. Menurut SNI ISO/IEC 17025:2017, validasi perlu dilakukan pada metode tidak baku, metode yang dikembangkan laboratorium, metode standar yang digunakan di luar lingkup, metode standar yang dimodifikasi, maupun metode gabungan (BSN, 2017). Parameter yang diuji dalam proses validasi biasanya antara lain akurasi, presisi, spesifisitas, *Limit of Detection* (LOD) & *Limit of Quantitation* (LOQ), linieritas, *range*, *robustness*. Pada penelitian ini, delapan parameter yang menjadi acuan adalah akurasi, presisi, spesifisitas, *Limit of Detection* (LOD) & *Limit of Quantitation* (LOQ), linieritas, *range*, *robustness*.

Lebih lanjut, validasi metode analisis merupakan bentuk penilaian terhadap parameter tertentu berdasarkan percobaan laboratorium, guna membuktikan bahwa metode memenuhi syarat untuk digunakan (Harmono, 2020). USP 2019 juga mendefinisikan validasi sebagai proses untuk memastikan bahwa suatu metode analisis memenuhi karakteristik yang dipersyaratkan untuk aplikasi analisisnya (USP, 2019). Validasi dilakukan agar metode yang digunakan memiliki reliabilitas, akurasi, dan presisi yang konsisten dengan tujuan analisis.

Metode analisis diklasifikasikan ke dalam empat kategori berdasarkan tujuan dan jenis pengujiannya. Kategori I mencakup metode untuk kuantifikasi komponen utama zat aktif, baik dalam bentuk bahan baku maupun dalam produk farmasi jadi, termasuk penetapan kadar pengawet. Kategori II mencakup metode yang digunakan untuk menentukan kadar pengotor atau impuritas dalam bahan baku obat serta senyawa hasil degradasi pada produk jadi, yang dapat berupa uji kuantitatif maupun uji batas. Kategori III mencakup metode analisis yang digunakan untuk menilai karakteristik kinerja sediaan, seperti uji disolusi dan pelepasan obat. Sementara itu, Kategori IV berfokus pada uji identifikasi untuk memastikan kebenaran dan keaslian suatu zat atau senyawa (USP, 2019).

Setiap kategori pengujian membutuhkan informasi analitis yang berbeda yang mana dapat dilihat pada **Tabel 2.2** yaitu elemen data yang biasanya diperlukan untuk setiap kategori pengujian (USP, 2019).

Tabel 2.2 Elemen Data yang Diperlukan untuk Validasi Pengujian.

Karakteristik Kinerja Analisis	Kategori Pengujian I	Kategori Pengujian II		Kategori Pengujian III	Kategori Pengujian IV
		Kuantitatif	Uji Batas		
Akurasi	<i>Yes</i>	<i>Yes</i>	* —	* —	<i>No</i>
Presisi	<i>Yes</i>	<i>Yes</i>	<i>No</i>	<i>Yes</i>	<i>No</i>
Spesifisitas	<i>Yes</i>	<i>Yes</i>	<i>Yes</i>	* —	<i>Yes</i>
<i>Limit of Detection (LOD)</i>	<i>No</i>	<i>No</i>	<i>Yes</i>	* —	<i>No</i>
<i>Limit of Quantitation (LOQ)</i>	<i>No</i>	<i>Yes</i>	<i>No</i>	* —	<i>No</i>
Linearitas	<i>Yes</i>	<i>Yes</i>	<i>No</i>	* —	<i>No</i>
<i>Range</i>	<i>Yes</i>	<i>Yes</i>	* —	* —	<i>No</i>

*Diperlukan, tergantung pada sifat pengujian spesifik

Prosedur analisis yang harus divalidasi meliputi uji pengotor, uji limit, serta uji kuantitatif komponen aktif maupun komponen lain dalam produk obat. Secara umum terdapat delapan parameter validasi metode, yakni akurasi,

presisi, spesifisitas, *Limit of Detection* (LOD) & *Limit of Quantitation* (LOQ), linieritas, *range*, *robustness*. Pemilihan parameter tersebut tergantung pada jenis metode analisis yang divalidasi Riyanto (2020) menekankan bahwa parameter spesifisitas penting dilakukan, karena terkait kemampuan metode untuk membedakan analit dari komponen lain dalam matriks, baik berupa zat endogen maupun eksogen, yang dapat mengganggu identifikasi atau kuantifikasi (Riyanto, 2020).

2.5.1 Selektivitas

Selektivitas merupakan salah satu parameter penting dalam validasi metode analisis yang menggambarkan kemampuan suatu metode untuk mengukur analit tertentu secara cermat dan akurat meskipun terdapat komponen lain dalam matriks sampel. Dalam konteks analisis kromatografi, selektivitas ditunjukkan melalui kemampuan metode untuk membedakan puncak analit target, misalnya Mitraginin, dari senyawa pengganggu lain yang mungkin berasal dari matriks, impurities, ataupun produk degradasi (Fajri, 2020). Penilaian selektivitas dapat dilakukan dengan membandingkan waktu retensi standar, melakukan uji spiking, serta menggunakan blank matriks untuk memastikan tidak terjadi gangguan (ICH, 2024). Parameter ini mencerminkan seberapa baik metode mampu membedakan analit target dari berbagai senyawa lain, termasuk cecaran dan bahan tambahan, sehingga keandalan hasil analisis dapat dipertanggungjawabkan (Wahyuni *et al.*, 2022).

Dalam literatur, selektivitas sering dipertukarkan dengan istilah spesifisitas, meskipun keduanya memiliki perbedaan konseptual. Selektivitas bersifat relatif karena dapat dinilai secara bertingkat dan mengukur kemampuan metode untuk membedakan analit dari komponen lain. Sementara itu, spesifisitas dianggap lebih absolut, yakni kemampuan metode untuk mengidentifikasi suatu senyawa tunggal secara murni tanpa adanya gangguan dari komponen lain (BPOM, 2025).

ICH, 2024 membagi spesifisitas menjadi dua kategori, yaitu uji identifikasi dan uji kemurnian atau pengukuran kadar. Pada uji identifikasi, spesifisitas ditunjukkan dengan kemampuan metode untuk membedakan

antar senyawa yang memiliki struktur molekul hampir serupa. Sedangkan pada uji kemurnian atau kadar, spesifisitas ditunjukkan oleh daya pisah antara dua senyawa yang memiliki waktu retensi berdekatan, khususnya dalam metode kromatografi.

Dengan demikian, baik selektivitas maupun spesifisitas merupakan aspek fundamental dalam validasi metode karena keduanya berperan penting dalam menjamin kualitas hasil analisis. Selektivitas lebih menekankan pada tingkat kemampuan metode untuk membedakan analit dari komponen pengganggu, sedangkan spesifisitas memastikan bahwa senyawa target dapat diidentifikasi dan diukur secara murni tanpa interferensi. Pemahaman yang jelas mengenai perbedaan keduanya sangat penting untuk memastikan keandalan metode analisis, khususnya pada pengujian Mitraginin dalam matriks kompleks (ICH, 2024; Jelali *et al.*, 2024).

2.5.2 Presisi

Presisi merupakan salah satu parameter utama dalam validasi metode analisis yang menunjukkan derajat kedekatan hasil uji ketika prosedur dilakukan secara berulang pada sampel yang homogen. Presisi mencerminkan kesalahan acak dalam suatu metode dan umumnya dinyatakan sebagai simpangan baku relatif (*Relative Standard Deviation*, RSD) atau koefisien variasi (CV) dari serangkaian pengukuran (Riyanto, 2020). Semakin kecil nilai RSD atau CV yang diperoleh, maka metode dianggap semakin tepat dan dapat diandalkan, dengan syarat umum presisi yang baik adalah %RSD \leq 2% dan *Intermediate* %RSD \leq 3% (Sugihartini *et al.*, 2012). Berikut merupakan perhitungan dari SD dan %RSD

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

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

Keterangan:

SD = Standar deviasi

RSD = *Relative Standard Deviation*

n = jumlah sampel

x_i = kadar analit ulangan

\bar{x} = Rata-rata

Menurut ICH (2024), presisi dapat dibagi ke dalam beberapa tingkatan, yaitu keterulangan (*repeatability*), presisi antara (*intermediate precision*), dan ketertiruan (*reproducibility*). Keterulangan diukur pada kondisi percobaan yang sama, meliputi analisis, instrumen, lokasi, dan waktu yang sama. Presisi antara melibatkan variasi pada hari berbeda, instrumen berbeda, atau analisis yang berbeda tetapi masih dalam laboratorium yang sama. Sementara itu, ketertiruan menggambarkan tingkat kesesuaian hasil antar laboratorium yang berbeda, sehingga lebih sering digunakan untuk studi uji banding atau verifikasi metode lintas fasilitas (Agustina *et al.*, 2020; Riyanto, 2020).

ICH (2024) merekomendasikan bahwa pengujian presisi repeatability dilakukan dengan minimal sembilan kali pengukuran, misalnya pada tiga konsentrasi berbeda dengan tiga kali replikasi pada masing-masing konsentrasi, atau minimal enam kali pengukuran pada konsentrasi 100% dari konsentrasi uji. Hal ini sejalan dengan pedoman Rohman (2018) yang menekankan bahwa uji presisi harus dilakukan secara sistematis agar dapat mencerminkan variasi metode secara akurat. Pendekatan ini memastikan bahwa metode dapat menghasilkan data yang konsisten meskipun dilakukan pada kondisi yang berbeda.

Dalam praktiknya, presisi juga sangat penting karena berhubungan langsung dengan reliabilitas metode. Presisi yang buruk dapat mengindikasikan adanya faktor variabilitas yang tidak terkontrol, misalnya kondisi instrumen, keterampilan analisis, atau stabilitas sampel. Oleh karena itu, pengujian presisi tidak hanya menilai konsistensi hasil, tetapi juga berfungsi sebagai indikator kontrol kualitas dalam validasi metode analisis. Dengan demikian, presisi berperan penting untuk menjamin reproducibility dan konsistensi suatu metode analisis, khususnya pada pengujian senyawa kimia kompleks seperti Mitraginin. Evaluasi menyeluruh terhadap

repeatability, intermediate precision, dan reproducibility akan memastikan metode dapat diterapkan secara luas, baik untuk analisis rutin di laboratorium maupun dalam verifikasi antar laboratorium (ICH, 2024; Shinde & Khulbe, 2025).

2.5.3 Spesifisitas

Spesifisitas merupakan salah satu parameter penting dalam validasi metode analisis yang menunjukkan kemampuan metode untuk mengukur analit tertentu secara akurat di tengah keberadaan komponen lain seperti pengotor, degradasi produk, atau matriks sampel (ICH, 2024). Spesifisitas didefinisikan sebagai kemampuan suatu metode analisis untuk memberikan respon yang hanya berasal dari zat yang dianalisis tanpa adanya interferensi dari komponen lain yang mungkin terdapat dalam sampel. Menurut Muzaki *et al.*, (2023) spesifisitas merupakan kemampuan metode analisis untuk mengukur analit yang dituju secara tepat tanpa dipengaruhi oleh prekursor, produk degradasi, atau komponen matriks lainnya. Dalam konteks analisis kromatografi gas, spesifisitas sangat bergantung pada kemampuan kolom kromatografi dalam memisahkan senyawa target dari komponen lain berdasarkan perbedaan volatilitas dan interaksi dengan fase diam. Uji spesifisitas dalam kromatografi biasanya dilakukan dengan membandingkan kromatogram larutan standar dan blanko, di mana metode dikatakan spesifik apabila tidak terdapat puncak interferensi yang memiliki waktu retensi sama dengan puncak analit (Ichsan & Ebtasari, 2023).

Pada metode Gas Chromatography–Flame Ionization Detector (GC-FID), spesifisitas dicapai melalui optimasi kondisi pemisahan, seperti pemilihan kolom kapiler dengan fase diam yang sesuai, pengaturan suhu oven, serta laju alir gas pembawa. FID sendiri memiliki keunggulan dalam mendeteksi senyawa organik yang mengandung ikatan C–H, karena detektor ini memberikan respon proporsional terhadap jumlah atom karbon dalam molekul, sehingga memungkinkan pengukuran yang spesifik dan kuantitatif terhadap senyawa organik seperti Mitraginin.

Uji spesifisitas dilakukan dengan cara membandingkan kromatogram standar Mitraginin dengan kromatogram sampel produk komersial untuk memastikan bahwa puncak yang terdeteksi benar-benar berasal dari Mitraginin dan tidak terpengaruh oleh komponen lain dalam matriks. Tidak adanya puncak pengganggu pada waktu retensi yang sama menunjukkan bahwa metode memiliki spesifisitas yang baik (Kumar *et al.*, 2021). Selain itu, jika tersedia, konfirmasi identitas puncak dapat dilakukan melalui perbandingan waktu retensi atau menggunakan detektor tambahan seperti GC-MS untuk memastikan bahwa sinyal yang diamati benar-benar berasal dari analit target (ICH, 2024). Dengan demikian, parameter spesifisitas berperan penting dalam menjamin keandalan metode GC-FID untuk analisis Mitraginin pada produk komersial, terutama mengingat kemungkinan adanya senyawa lain dalam matriks produk herbal yang dapat menyebabkan interferensi sinyal.

2.5.4 Linieritas

Linearitas merupakan salah satu parameter penting dalam validasi metode analisis, yang menunjukkan kemampuan metode menghasilkan respon yang proporsional terhadap konsentrasi analit dalam sampel pada rentang tertentu (ICH, 2024; Tanjung *et al.*, 2025). Linearitas biasanya ditentukan dengan membuat kurva kalibrasi dari beberapa tingkat konsentrasi (minimal 5–8 titik), kemudian dianalisis dengan regresi linier untuk memperoleh nilai slope, intersep, dan koefisien korelasi (*r*-value) sebagai indikator keterkaitan antara konsentrasi dengan respon instrumen. Penentuan linearitas pada metode kromatografi, seperti GC-FID, dilakukan dengan mengukur luas area puncak dari larutan standar pada konsentrasi berbeda, kemudian mengevaluasi kesesuaian hubungan linier dengan kriteria koefisien korelasi yang baik, yaitu $\geq 0,999$ (Wahyuni *et al.*, 2022).

Menurut Asis *et al.*, 2020, linearitas dapat dinilai melalui persamaan regresi linier $y = a + bx$, dengan *x* sebagai konsentrasi dan *y* sebagai respon instrumen. Nilai slope (*b*), intersep (*a*), serta koefisien korelasi (*r*) menjadi indikator yang menjelaskan sejauh mana metode analisis mampu

memberikan respon yang proporsional. Hubungan linier ideal dicapai ketika nilai intersep mendekati nol dan koefisien korelasi mendekati +1 atau -1, tergantung arah garis. Linearitas ini juga erat kaitannya dengan rentang metode, yaitu batas terendah dan tertinggi konsentrasi analit yang masih dapat ditetapkan dengan ketelitian, kecermatan, serta linearitas yang dapat diterima (ICH, 2024).

Rohman (2018) menekankan bahwa pengujian linearitas sebaiknya dilakukan dengan pengenceran larutan baku secara serial untuk meminimalisasi kesalahan, dibandingkan dengan menimbang baku pada konsentrasi berbeda. Linearitas yang baik dapat dievaluasi dengan pengamatan visual pada kurva kalibrasi yang menunjukkan hubungan konsentrasi dengan respon, seperti absorbansi, luas puncak, atau tinggi puncak (Chen & Chen, 2022). Data yang diperoleh kemudian diolah menggunakan metode kuadrat terkecil untuk menentukan slope, intersep, dan koefisien korelasi.

Lebih lanjut, kurva kalibrasi dalam uji linearitas disusun dari respon instrumen terhadap berbagai konsentrasi larutan standar, kemudian dianalisis untuk menemukan regresi linier yang paling sesuai. Persamaan regresi yang diperoleh ($y = bx + a$) digunakan untuk memperkirakan respon instrumen berdasarkan konsentrasi analit, dengan tujuan meminimalkan residual error atau selisih antara nilai percobaan dengan nilai prediksi.

Sebagai parameter hubungan linier, nilai koefisien korelasi (r) digunakan untuk menilai kedekatan antara konsentrasi analit dengan respon instrumen. Hubungan linier yang ideal ditandai oleh nilai slope mendekati 1, intersep mendekati 0, dan r yang tinggi, yaitu $\geq 0,997$. Dengan demikian, linearitas tidak hanya membuktikan bahwa metode analisis mampu menghasilkan data yang akurat dalam rentang konsentrasi tertentu, tetapi juga menjadi dasar penting dalam perhitungan akurasi, presisi, serta reliabilitas keseluruhan metode analisis.

2.5.5 Akurasi

Akurasi merupakan salah satu parameter penting dalam validasi metode analisis, yang menunjukkan derajat kedekatan antara nilai hasil pengukuran dengan nilai “benar” atau nilai referensi (Rohman, 2018). Akurasi biasanya diuji dengan cara menambahkan analit ke dalam matriks sampel pada level rendah, sedang, dan tinggi, kemudian dihitung persen perolehan kembali (*recovery*) dari analit yang ditambahkan tersebut (USP, 2019). Uji akurasi dilakukan minimal sembilan kali penetapan, terdiri atas tiga konsentrasi berbeda dengan masing-masing tiga replikasi. Hasilnya kemudian dinyatakan sebagai persen *recovery*, dengan syarat penerimaan yang umumnya berada pada rentang 98–120% (AOAC, 2023). %*Recovery* dapat dihitung dengan rumus berikut:

$$\% \text{Recovery} = \left(\frac{C_1 - C_2}{C_3} \right) \times 100\%$$

Keterangan:

C_1 = Konsentrasi analit dalam sampel + standar

C_2 = Konsentrasi mitraginin dalam sampel tanpa standar

C_3 = Konsentrasi standar yang ditambahkan

Akurasi, yang sering digunakan sebagai istilah lain untuk akurasi, didefinisikan sebagai ukuran kedekatan hasil analisis terhadap kadar analit yang sebenarnya (Asis *et al.*, 2020). Nilai ini sangat dipengaruhi oleh keberadaan galat sistematis pada tahapan analisis. Oleh karena itu, untuk memperoleh akurasi yang tinggi, diperlukan upaya meminimalisasi galat melalui kalibrasi peralatan, penggunaan pereaksi dan pelarut berkualitas baik, pengendalian kondisi analisis, serta kepatuhan pada prosedur analisis. Dalam praktiknya, akurasi sering ditentukan dengan metode *spiked-placebo recovery* atau metode penambahan baku (*standard addition method*), di mana hasil analisis kemudian dibandingkan dengan kadar analit yang sebenarnya (Agustina *et al.*, 2020).

Akurasi harus dievaluasi pada beberapa tingkat konsentrasi, dan hasilnya dinyatakan dalam persen *recovery* atau sebagai selisih antara nilai

rata-rata hasil analisis dengan nilai benar yang diterima bersama dengan batas kepercayaannya. Dalam konteks analisis sediaan farmasi, recovery yang dapat diterima biasanya berkisar 98–120% atau dapat dilihat pada **Tabel 2.3** berikut (AOAC, 2023; ICH, 2024):

Tabel 2.3 Kriteria Penerimaan Nilai Akurasi dan Presisi.

Analyte %	Unit	RSD %	Mean Recovery %
100	100%	1.3	98-102
10	10%	1.9	
1	1%	2.7	97-103
0.1	0.1%	3.7	95-105
0.01	100 ppm (mg/kg)	5.3	90-107
0.001	10 ppm (mg/kg)	7.3	80-110
0.0001	1 ppm (mg/kg)	11	
0.00001	100 ppb (µg/kg)	15	
0.000001	10 ppb (µg/kg)	21	60-115
0.0000001	1 ppb (µg/kg)	30	40-120

Sumber: *Association of Official Analytical Chemists, 2023*

Lebih lanjut, terdapat tiga pendekatan umum dalam pengujian akurasi, yaitu (Suseno, 2021):

1. Membandingkan hasil analisis dengan Certified Reference Material (CRM) yang diterbitkan lembaga internasional,
2. Uji perolehan kembali dengan menambahkan analit pada matriks blanko (spiked placebo), dan
3. Metode penambahan standar (standard addition method) pada matriks sampel yang mengandung analit.

Dalam metode simulasi, sejumlah analit murni ditambahkan ke dalam matriks plasebo lalu dianalisis, sedangkan pada metode penambahan baku, analit ditambahkan ke dalam sampel nyata sebelum analisis dilakukan (Rohman, 2018).

Dengan demikian, akurasi merupakan indikator utama untuk menilai ketepatan suatu metode analisis, sekaligus menjamin keandalan data yang

dihasilkan. Parameter ini sangat penting terutama ketika metode akan digunakan untuk analisis rutin maupun pengujian mutu, karena akurasi yang buruk dapat menyebabkan bias hasil analisis dan berpotensi menyesatkan interpretasi data. Oleh sebab itu, evaluasi akurasi tidak hanya sebatas memenuhi rentang recovery yang disyaratkan, melainkan juga memastikan bahwa metode analisis benar-benar sesuai untuk tujuan penggunaannya.

2.5.6 Rentang

Range atau rentang konsentrasi merupakan salah satu parameter penting dalam validasi metode analisis yang menunjukkan batas bawah dan batas atas kadar analit di mana metode analisis masih menunjukkan tingkat ketepatan (*accuracy*), ketelitian (*precision*), dan linearitas yang dapat diterima (ICH, 2024). Penentuan *Range* dilakukan berdasarkan hasil uji linearitas, yaitu pada kisaran konsentrasi di mana respon instrumen terhadap konsentrasi analit masih bersifat proporsional. *Range* yang baik harus mencakup area kerja metode, termasuk konsentrasi terendah dan tertinggi dari sampel yang akan dianalisis. Dalam analisis menggunakan GC-FID, *Range* ditentukan dari kurva kalibrasi yang diperoleh dengan menginjektikan larutan standar Mitraginin pada berbagai konsentrasi, misalnya 0,5–50 µg/mL. Penentuan rentang ini harus menghasilkan nilai koefisien determinasi (r^2) \geq 0,999, deviasi persen (RSD) kurang dari 2%, serta *recovery* dalam rentang 98–102% (A. Susanto *et al.*, 2021). Rentang tersebut memastikan bahwa metode memiliki respon linear dan konsisten terhadap variasi konsentrasi Mitraginin dalam sampel, baik dalam bentuk ekstrak daun maupun produk komersial kratom.

Penelitian oleh Fowble dan Musah (2019) melaporkan metode validasi kuantitatif Mitraginin menggunakan teknik DART-HRMS yang diterapkan pada enam belas produk komersial kratom. Metode tersebut memiliki rentang kalibrasi 5–100 µg/mL dengan batas kuantifikasi terendah (LOQ) sebesar 5 µg/mL, serta menunjukkan korelasi linear yang sangat baik ($R^2 > 0,99$). Hasil analisis terhadap sampel menunjukkan kadar Mitraginin berkisar antara 2,76 hingga 20,05 mg/g bahan tanaman kering (Fowble & Musah, 2019). Hasil serupa juga dilaporkan oleh Isnaeni *et al.* (2024) yang mengembangkan dan

memvalidasi metode HPLC-PDA untuk kuantifikasi Mitraginin dalam sampel kratom. Metode tersebut memiliki rentang kalibrasi 1,96–6,01 $\mu\text{g/mL}$ dengan nilai LOD 0,14 $\mu\text{g/mL}$ dan LOQ 0,45 $\mu\text{g/mL}$, serta presisi intraday dan interday masing-masing 0,67 % dan 1,56 % (Isnaeni *et al.*, 2024). Kedua penelitian ini menunjukkan bahwa metode kromatografi, baik berbasis GC maupun HPLC, mampu memberikan linearitas, presisi, dan sensitivitas tinggi dalam rentang konsentrasi rendah hingga tinggi, sehingga sesuai untuk aplikasi analisis kuantitatif Mitraginin secara rutin pada berbagai jenis produk kratom.

Secara konseptual, *Range* (rentang) dalam validasi metode analitik adalah interval antara batas atas dan batas bawah konsentrasi (atau jumlah) analit dalam sampel yang telah dibuktikan dapat ditentukan dengan tingkat presisi, akurasi, dan linearitas yang sesuai menggunakan metode yang telah ditetapkan (ICH, 2024). *Range* berbeda dengan *reportable Range*, yaitu rentang yang secara khusus diturunkan dari spesifikasi produk dan bergantung pada tujuan penggunaan prosedur analitik. *Reportable Range* dikonfirmasi dengan menunjukkan bahwa prosedur analitik memberikan hasil dengan akurasi, presisi, dan spesifisitas yang dapat diterima, serta harus mencakup batas pelaporan atas dan bawah yang berlaku. Selain itu, terdapat pula *working Range* (rentang kerja), yaitu rentang konsentrasi aktual sampel yang dianalisis oleh instrumen dan berkaitan langsung dengan *reportable Range*, tergantung pada tahap preparasi sampel seperti proses pengenceran (ICH, 2024).

Range biasanya diturunkan dari studi linearitas dan bergantung pada aplikasi metode. Studi linearitas untuk suatu metode mendefinisikan bagian rentang di mana respon instrumen terhadap konsentrasi analit masih proporsional. Bagian linear dari kurva kalibrasi harus mencakup konsentrasi sampel yang dianalisis, umumnya pada konsentrasi kerja 100%, serta sedikit di atas dan di bawahnya untuk memastikan kestabilan respon. *Range* kemudian dikonfirmasi dengan menunjukkan bahwa prosedur analitik memberikan tingkat linearitas, akurasi, dan presisi yang dapat diterima ketika diterapkan pada sampel yang mengandung jumlah analit pada batas ekstrem

rentang yang telah ditetapkan. Untuk penentuan linearitas, disarankan minimal lima titik konsentrasi yang terdistribusi secara merata di sepanjang rentang tersebut.

Pedoman ICH Q2(R1) dan Q2(R2) merekomendasikan batas minimum *Range* untuk berbagai jenis pengujian, seperti: (1) uji penetapan kadar (*assay*) zat aktif atau produk jadi berada pada kisaran 80–120% dari konsentrasi uji; (2) uji keseragaman kandungan (*content uniformity*) mencakup 70–130% dari kadar yang dideklarasikan; (3) uji potensi (*potency*) dari batas bawah spesifikasi dikurangi 20% hingga batas atas spesifikasi ditambah 20%; (4) uji disolusi mencakup 45–130% dari kadar dideklarasikan untuk produk *immediate release* dan dari batas kuantitasi hingga 130% untuk produk *modified release*; (5) uji cemaran (*impurity*) dari ambang pelaporan hingga 120% dari batas spesifikasi; serta (6) uji kemurnian (*purity*) dari 80% hingga 100% dari kriteria penerimaan batas bawah hingga batas spesifikasi (ICH, 2024).

Range divalidasi dengan memverifikasi bahwa metode memberikan presisi, akurasi, dan linearitas yang dapat diterima di seluruh batas rentang, baik di ekstrem maupun di tengah rentang yang telah ditetapkan. Verifikasi dilakukan dengan menguji sampel pada batas atas, batas bawah, dan beberapa titik di antaranya. Data akurasi dievaluasi menggunakan minimal tiga konsentrasi dengan tiga replikasi masing-masing, dan hasilnya dilaporkan sebagai persen perolehan kembali (*percent recovery*) dari jumlah analit yang diketahui atau sebagai selisih antara nilai rata-rata dan nilai benar yang diterima, disertai interval kepercayaan. Presisi, termasuk *repeatability* dan *intermediate precision*, juga harus dievaluasi di seluruh rentang untuk memastikan hasil yang konsisten (Chavan & Desai, 2022).

Apabila atribut kualitas yang diukur menuntut rentang analitik mendekati batas bawah metode, maka batas deteksi (Detection Limit, DL) dan batas kuantisasi (Quantitation Limit, QL) harus ditentukan dan divalidasi sebelum penerapan analisis rutin. DL didefinisikan sebagai konsentrasi terendah analit yang dapat dideteksi secara andal sedangkan QL adalah konsentrasi terendah yang dapat dikuantifikasi dengan akurasi dan presisi

yang dapat diterima (mis. confidence/uncertainty ditetapkan oleh laboratorium), sehingga penetapan keduanya penting untuk kepatuhan pelaporan dan interpretasi hasil (CORESTA, 2020; Kruse *et al.*, 2024). Terdapat empat pendekatan yang umum dipakai untuk estimasi DL/QL pada praktik laboratorium: (1) evaluasi visual terhadap tingkat deteksi terendah melalui analisis sampel berjenjang; (2) pendekatan signal-to-noise (S/N) dengan kriteria $S/N \approx 3:1$ untuk DL dan $\approx 10:1$ untuk QL pada instrumen yang memberikan noise terukur; (3) pendekatan statistik berdasarkan deviasi standar respons dan kemiringan kurva kalibrasi menggunakan rumus $DL = 3.3 \cdot \sigma/S$ dan $QL = 10 \cdot \sigma/S$ (σ = standar deviasi intercept atau residual; S = slope); serta (4) evaluasi empiris langsung berdasarkan data akurasi dan presisi pada tingkat konsentrasi paling rendah yang relevan, metode ke-4 sering digunakan bila penentuan berbasis matriks penuh diperlukan untuk menentukan kemampuan kuantifikasi metode dalam kondisi nyata. Untuk uji cemaran atau pelaporan regulatori, nilai QL disarankan sama dengan atau lebih rendah dari ambang pelaporan yang ditetapkan oleh regulator atau kebijakan laboratorium, dan estimasi DL/QL serta pendekatannya harus didokumentasikan beserta ketidakpastian pengukurannya (CORESTA, 2020; Food and Drug Administration, 2021; Kruse *et al.*, 2024).

Secara keseluruhan, *Range* yang telah ditetapkan dan divalidasi menjadi bukti bahwa metode analisis memberikan hasil yang akurat, presisi, dan linear di seluruh area kerja yang relevan. Semua data hasil linearitas, akurasi, dan presisi di seluruh *Range* harus didokumentasikan secara lengkap dalam protokol dan laporan validasi untuk membuktikan kesesuaian metode terhadap tujuan analitiknya. Dengan demikian, penetapan *Range* yang tepat memastikan bahwa metode GC-FID untuk analisis Mitraginin dapat digunakan secara andal pada berbagai kadar analit, mencakup variabilitas antar produk komersial, serta memenuhi persyaratan mutu dan regulasi (ICH, 2024; Riyanto, 2020).