

BAB 5 HASIL PENELITIAN

5.1 Parameter Standarisasi Mutu Produk Komersial

Dilakukan parameter standarisasi mutu produk komersial dengan preparasi sampel yang dilakukan mengacu pada Farmakope Indonesia tahun 2020. Untuk produk kapsul dan kantong teh, masing-masing diambil sebanyak 20 unit, kemudian dibuka, dan isi kapsul maupun kantong teh masing-masing dikeluarkan ke dalam mortir. Serbuk dari masing-masing 20 unit tersebut dicampur dan digerus hingga homogen. Selanjutnya ditimbang sesuai kebutuhan analisis (Kemenkes, 2020). Untuk produk komersial kopi penimbangan serbuk langsung diambil dari wadah sejumlah yang dibutuhkan. Produk komersial mengandung kratom yang dianalisis dapat dilihat pada **Lampiran 4**.

Parameter mutu produk komersial dilakukan karena meskipun penggunaan *Mitragyna speciosa* dalam obat tradisional dan suplemen kesehatan dilarang oleh regulasi nasional melalui BPOM, produk yang mengandung kratom masih beredar luas di masyarakat, terutama melalui *online*. Oleh karena itu, penetapan parameter mutu dalam penelitian ini tidak dimaksudkan untuk menilai kelayakan, keamanan, maupun legalitas produk, melainkan sebagai bagian dari pendekatan mitigasi risiko kesehatan masyarakat (*harm reduction*) serta untuk menggambarkan karakteristik fisikokimia sampel yang berperan sebagai matriks dalam validasi metode analisis mitraginin menggunakan GC-FID. Parameter mutu spesifik digunakan untuk memastikan identitas, keaslian, dan keberadaan senyawa penanda, sedangkan parameter non-spesifik berfungsi menilai kemurnian, potensi cemaran, serta variasi mutu yang dapat timbul selama proses produksi dan distribusi. Karakterisasi ini menjadi penting karena belum adanya standar mutu resmi produk kratom di Indonesia, sehingga interpretasi hasil analisis harus mempertimbangkan heterogenitas dan ketidakseragaman produk yang beredar di pasaran.

5.1.1 Parameter Spesifik Produk Komersial

Pengamatan parameter mutu spesifik dilakukan terhadap lima produk komersial yang terdiri atas kopi kratom, teh kratom, kapsul varietas merah, kapsul varietas hijau dan kapsul varietas putih. Parameter yang diuji meliputi bentuk, warna, bau, dan rasa. Hasil pengamatan ditampilkan pada **Tabel 5.1** berikut:

Tabel 5.1 Data hasil pengamatan parameter mutu spesifik pada produk komersial

Produk Komersial	Parameter Spesifik			
	Bentuk	Warna	Bau	Rasa
Teh kratom	Serbuk halus	Hijau	Aroma khas	Pahit
Kopi kratom	Serbuk sedikit kasar	Coklat	Aroma khas kopi	Pahit
Kapsul varietas merah	Kapsul berisi serbuk halus	Coklat	Aroma khas	Pahit
Kapsul varietas hijau	Kapsul berisi serbuk halus	Hijau	Aroma khas	Pahit
Kapsul varietas putih	Kapsul berisi serbuk halus	Coklat kehijauan	Aroma khas	Pahit

Data pada **Tabel 5.1** tersebut merupakan hasil pengamatan visual dan organoleptik sesuai parameter mutu spesifik yang umum digunakan dalam evaluasi awal produk komersial berbentuk serbuk dan kapsul. Hasil parameter menunjukkan karakteristik tersendiri dari masing-masing sediaan komersial.

5.1.2 Parameter Non-Spesifik Produk Komersial

Dilakukan penetapan parameter mutu non-spesifik yang meliputi kadar air, kadar abu total, dan kadar abu tidak larut asam dilakukan pada produk komersial yang diduga mengandung kratom (*Mitragyna speciosa*). Tujuan dilakukan pengujian parameter mutu produk komersial ini tidak dimaksudkan untuk menilai mutu, keamanan, maupun legalitas produk, melainkan untuk menggambarkan kondisi fisikokimia sampel yang berperan sebagai matriks dalam proses validasi metode analisis mitraginin menggunakan GC-FID. Mengingat belum adanya standar mutu resmi untuk produk kratom di Indonesia, parameter mutu non-spesifik digunakan sebagai data pendukung

untuk memahami karakteristik bahan uji. Data hasil pengukuran digunakan sebagai informasi awal untuk memastikan bahwa kondisi sampel tidak memberikan pengaruh signifikan terhadap proses ekstraksi dan keandalan analisis mitraginin menggunakan metode GC–FID.

5.1.2.1 Penetapan Kadar Air

Penetapan kadar air dilakukan untuk mengetahui kandungan air (kelembapan) dan stabilitas fisik dalam setiap produk komersial. Sebanyak 2 gram sampel produk komersial ditimbang ke dalam botol timbang, kemudian dioven pada suhu 105°C selama 20 menit, kemudian didinginkan dan dilakukan penimbangan.

Tabel 5.2 Data hasil penetapan kadar air

Produk Komersial	Kadar air (%)	Persyaratan ($\leq 10\%$)
Kopi	0,54	Memenuhi syarat
Teh	2,21	
Kapsul varietas merah	0,92	
Kapsul varietas hijau	8,14	
Kapsul varietas putih	8,49	

Berdasarkan **Tabel 5.2** tersebut, ketiga sampel produk komersial tersebut menunjukkan kadar air di bawah 10%, sehingga memenuhi persyaratan kadar air untuk simplisia secara umum menurut Farmakope Herbal Indonesia tahun 2017. Kadar air berkaitan dengan potensi pertumbuhan mikroorganisme dan risiko kontaminasi selama penyimpanan. Nilai kadar air yang tinggi menunjukkan bahwa proses pengeringan dan penyimpanan bahan tidak terstandarisasi, sehingga massa sampel yang ditimbang tidak sepenuhnya merupakan bahan kering. Kondisi ini berpotensi memengaruhi homogenitas sampel saat proses fraksinasi dan berpotensi menurunkan akurasi dan presisi penetapan kadar mitraginin.

5.1.2.2 Penetapan Kadar Abu Total

Penetapan kadar abu total dilakukan untuk mengetahui kandungan mineral total, mengukur kemurnian, dan mengevaluasi kualitas produk

komersial. Sebanyak 2 gram sampel teh kratom, kopi kratom, dan kapsul varietas merah dimasukkan ke dalam cawan dan dipijarkan dalam furnace pada suhu 800°C selama 6 jam. Hasil pengukuran kadar abu total dapat dilihat pada tabel berikut:

Tabel 5.3 Data hasil kadar abu total

Produk Komersial	Replikasi	Kadar abu total (%)	Rata Rata (%)	Persyaratan (< 16%)
Kopi	Rep. 1	3,83	3,72	Memenuhi syarat
	Rep. 2	3,84		
	Rep. 3	3,48		
Teh	Rep. 1	3,69	3,66	
	Rep. 2	3,65		
	Rep. 3	3,64		
Kapsul varietas merah	Rep. 1	4,24	4,20	
	Rep. 2	4,29		
	Rep. 3	4,07		
Kapsul varietas hijau	Rep. 1	4,55	4,58	
	Rep. 2	4,69		
	Rep. 3	4,52		
Kapsul varietas putih	Rep. 1	4,01	4,06	
	Rep. 2	4,06		
	Rep. 3	4,10		

Dapat dilihat pada **Tabel 5.3** tersebut bahwa ketiga sampel produk komersial tersebut menunjukkan kadar abu total di bawah batas maksimal, sehingga memenuhi persyaratan kadar abu total untuk simplisia secara umum menurut FHI tahun 2017, yang menunjukkan bahwa kandungan bahan anorganik dalam simplisia berada pada tingkat yang dapat diterima dan tidak berlebihan. Menurut WHO, abu total mencerminkan jumlah mineral fisiologis dari jaringan tanaman serta cemaran non-fisiologis seperti pasir dan tanah, sehingga nilai yang rendah menandakan kualitas bahan

yang lebih baik dan minim kontaminan anorganik. Kondisi ini penting karena matriks sampel yang relatif bersih akan mendukung proses ekstraksi yang lebih efisien dan menghasilkan ekstrak dengan gangguan minimal terhadap sistem analisis instrumen. WHO menyatakan bahwa parameter abu digunakan sebagai indikator kemurnian bahan tanaman dan kesesuaiannya untuk analisis lebih lanjut, sehingga pemenuhan kadar abu total berkontribusi pada kestabilan dan keandalan analisis menggunakan teknik kromatografi seperti GC-FID (WHO, 2015).

5.1.2.3 Kadar Abu Tidak Larut Asam

Penetapan kadar abu tidak larut asam dilakukan dengan melanjutkan hasil pemijaran kadar abu total dan dipijarkan kembali dalam furnace pada suhu 800°C selama 6 jam. Hasil pengukuran kadar abu total tidak larut asam dapat dilihat pada tabel berikut:

Tabel 5.4 Data hasil kadar abu tidak larut asam

Produk Komersial	Replikasi	Kadar abu tidak larut asam (%)	Rata Rata (%)	Persyaratan (< 1–2 %)
Kopi	Rep. 1	3,83	3,72	Tidak memenuhi syarat
	Rep. 2	3,84		
	Rep. 3	3,48		
Teh	Rep. 1	3,69	3,66	
	Rep. 2	3,65		
	Rep. 3	3,64		
Kapsul varietas merah	Rep. 1	4,24	4,19	
	Rep. 2	4,29		
	Rep. 3	4,06		
Kapsul varietas hijau	Rep. 1	0,48	0,48	Memenuhi syarat
	Rep. 2	0,52		
	Rep. 3	0,45		

Tabel 5.4 Data hasil kadar abu tidak larut asam

Produk Komersial	Replikasi	Kadar abu tidak larut asam (%)	Rata Rata (%)	Persyaratan (< 1–2 %)
Kapsul varietas putih	Rep. 1	0,78	0,79	
	Rep. 2	0,82		
	Rep. 3	0,77		

Berdasarkan **Tabel 5.4**, diketahui bahwa tidak semua produk komersial memenuhi persyaratan kadar abu tidak larut asam menurut FHI tahun 2017 ($\leq 1-2\%$). Kopi kratom, teh kratom, dan kapsul varietas merah memiliki nilai rata-rata kadar abu tidak larut asam yang tinggi, masing-masing 3,72%, 3,66%, dan 4,19%, sehingga tidak memenuhi persyaratan mutu. Sebaliknya, kapsul varietas hijau (0,48%) dan kapsul varietas putih (0,79%) memenuhi persyaratan. Parameter kadar abu tidak larut asam menunjukkan bahwa kandungan cemaran anorganik seperti pasir dan silika dalam simplisia relatif rendah, sehingga matriks sampel lebih bersih dan sesuai untuk proses ekstraksi serta analisis instrumen.

WHO menyatakan bahwa abu tidak larut asam mencerminkan keberadaan material silikat dan kontaminan eksternal yang tidak diinginkan dalam bahan tanaman obat (WHO, 2015). Matriks dengan kandungan mineral rendah akan mendukung ekstraksi senyawa aktif yang lebih efisien dan meminimalkan gangguan fisik pada sistem GC-FID. Sebaliknya, kadar abu tidak larut asam yang tidak memenuhi persyaratan menandakan tingginya cemaran mineral, yang dapat menghambat proses ekstraksi, menurunkan homogenitas fraksi, serta meningkatkan risiko kontaminasi residu anorganik pada sistem injeksi dan kolom GC-FID, sehingga berpotensi menurunkan akurasi dan presisi analisis.

5.2 Ekstraksi Fraksinasi Cair-Cair Asam-Basa

Proses fraksinasi cair-cair dilakukan berdasarkan perbedaan kelarutan alkaloid dalam kondisi asam dan basa, sehingga menghasilkan fraksi kloroform yang mengandung mitraginin sebagai senyawa target dan memisahkan

komponen alkaloid dari matriks sampel. Sampel komersial (kopi kratom, teh kratom, kapsul varietas merah, kapsul varietas hijau dan kapsul varietas putih) diekstraksi menggunakan prosedur asam-basa untuk memperoleh fraksi alkaloid yang kemudian akan dianalisis dengan GC-FID. Parameter yang diamati meliputi berat fraksi, rendemen, serta konsentrasi ekstrak. Data hasil pengamatan ditunjukkan pada **Tabel 5.5**.

Tabel 5.5 Data hasil ekstraksi fraksinasi cair-cair asam-basa

Produk Komersial	Rep.	Berat Sampel (g)	Berat Beaker Glass Kosong (g)	Berat Beaker Glass + Sampel (g)	Berat Fraksi Kering (g)	Rendemen (%/fraksi kloroform)	Rata-Rata (g)
Kopi	Rep 1	5,0342	60,9712	60,9812	0,0100	0,1986	0,2678
	Rep 2	5,0275	50,4626	50,4727	0,0101	0,2009	
	Rep 3	5,0031	127,9458	127,9660	0,0202	0,4037	
Teh	Rep 1	5,0218	60,9876	61,0576	0,0700	1,3939	1,3996
	Rep 2	5,0003	62,3545	62,4347	0,0802	1,6039	
	Rep 3	5,0127	126,5609	126,6211	0,0602	1,2009	
Kapsul varietas merah	Rep 1	5,0218	62,9598	62,9898	0,0300	0,5974	0,3998
	Rep 2	5,0308	61,7453	61,7554	0,0101	0,2008	
	Rep 3	5,0096	130,9683	130,9884	0,0201	0,4012	
Kapsul varietas hijau	Rep 1	5,0302	126,2849	126,3238	0,0389	0,7733	1,0547
	Rep 2	5,0112	127,3870	127,4546	0,0676	1,3490	
	Rep 3	5,0678	127,7843	127,8371	0,0528	1,0419	
Kapsul varietas putih	Rep 1	5,0012	126,8388	126,8794	0,0406	0,8118	0,7942
	Rep 2	5,0054	128,5394	128,5859	0,0465	0,9290	
	Rep 3	5,0022	130,2382	130,2703	0,0321	0,6417	

Berdasarkan **Tabel 5.5**, hasil fraksinasi cair–cair menggunakan pelarut kloroform menunjukkan adanya perbedaan rendemen fraksi kering antar jenis produk komersial yang diduga mengandung kratom. Sampel teh menghasilkan fraksi kering paling besar, yaitu berkisar antara 0,0602–0,0802 g, dengan rendemen 1,2009–1,6039% dan nilai rerata sebesar 1,3996%. Sebaliknya, sampel kopi menghasilkan fraksi kering paling kecil, yaitu 0,0100–0,0202 g, dengan rendemen terendah pada rentang 0,1986–0,4037% dan nilai rerata 0,2678%. Pada produk kapsul, diperoleh variasi rendemen antar varietas. Kapsul varietas merah menunjukkan rendemen relatif rendah hingga sedang, yaitu 0,2008–0,5974% dengan rerata 0,3998%. Kapsul varietas hijau menghasilkan rendemen tertinggi di antara kelompok kapsul, dengan nilai 0,7733–1,3490% dan rerata 1,0547%, sedangkan kapsul varietas putih memiliki rendemen menengah, yaitu 0,6417–0,9290% dengan rerata 0,7942%. Secara umum, sampel berbentuk teh dan kapsul menunjukkan rendemen fraksi alkaloid yang lebih tinggi dibandingkan sampel kopi. Perbedaan ini diduga berkaitan dengan bentuk sediaan, tingkat homogenitas bahan, serta efisiensi kontak antara matriks sampel dan pelarut kloroform selama proses fraksinasi cair–cair.

5.3 Identifikasi Awal

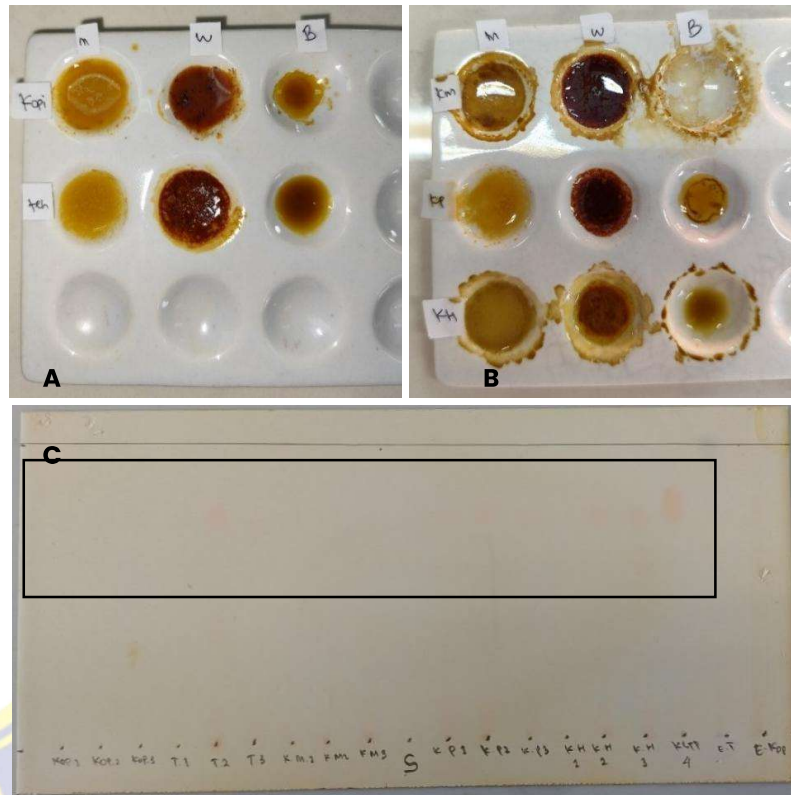
5.3.1 Skrining Fitokimia Alkaloid

Skrining fitokimia dilakukan untuk memastikan bahwa fraksi hasil fraksinasi asam–basa mengandung senyawa golongan alkaloid menggunakan tiga pereaksi yaitu mayer, wagner, dan dragendorff, yang masing-masing memberikan indikator terbentuknya senyawa alkaloid melalui reaksi pengendapan atau perubahan warna. Hasil pengamatan pada seluruh sampel komersial (Teh: teh kratom, Kopi: kopi kratom, Km: kapsul varietas merah, Kh: varietas hijau, dan Kp: varietas putih) tersaji pada **Tabel 5.6** berikut:

Tabel 5.6 Data hasil analisis skrining fitokimia alkaloid

Produk Komersial	Mayer	Wagner	Dragendorff	Keterangan
Teh krarom	Terdapat Kekeruhan	Terbentuk endapan	Timbul warna jingga	+
Kopi kratom	Terdapat Kekeruhan	Terbentuk endapan	Timbul warna jingga	+
Kapsul Varietas merah	Terbentuk endapan	Terdapat Kekeruhan	Timbul warna jingga	+
Kapsul Varietas hijau	Terbentuk endapan	Terbentuk endapan	Timbul warna jingga	+
Kapsul Varietas putih	Terdapat kekeruhan	Terbentuk endapan	Timbul warna jingga	+

Dapat dilihat pada **gambar 5.1** bahwa hasil menunjukkan bahwa fraksi hasil fraksinasi mengandung senyawa basa nitrogen yang tergolong alkaloid dengan pereaksi Mayer, seluruh sampel menunjukkan kekeruhan atau terbentuknya endapan. Pada pereaksi Wagner, seluruh sampel juga memberikan endapan atau kekeruhan. Kemudian, uji dengan pereaksi Dragendorff menghasilkan warna jingga pada semua sampel, yang merupakan reaksi positif khas alkaloid. Secara keseluruhan, seluruh sampel komersial memberikan tanda positif terhadap ketiga pereaksi sehingga dapat dinyatakan bahwa kelima produk tersebut mengandung alkaloid dikarenakan pereaksi tersebut bersifat umum terhadap seluruh golongan alkaloid, hasil skrining ini tidak bersifat spesifik terhadap mitraginin.



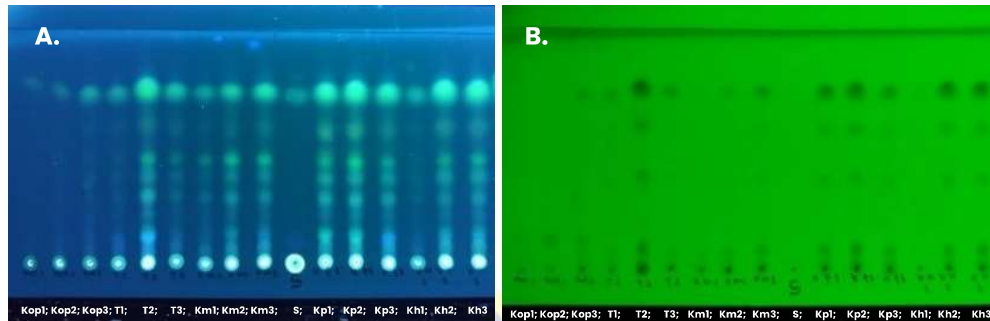
Gambar 5.1 Hasil skrining fitokimia alkaloid (M: Mayer; W: Wagner; B: Blanko); A. Kopi, Teh; B. KM: Kapsul Merah; KP: Kapsul Putih; KH: Kapsul Hijau; C. Hasil pereaksi dragendorf.

5.3.2 Kromatografi Lapis Tipis

Identifikasi kualitatif fraksi hasil fraksinasi cair-cair asam-basa dilakukan menggunakan metode Kromatografi Lapis Tipis (KLT) untuk mengamati profil pemisahan senyawa alkaloid serta membandingkan posisi noda sampel terhadap baku pembanding mitraginin. Analisis dilakukan pada lempeng silika gel GF₂₅₄ dengan fase gerak n-heksan : etil asetat (6 : 4) dan diamati di bawah sinar UV pada panjang gelombang 254 nm dan 366 nm.

Seluruh sampel dianalisis diurut dari sebelah kiri ke kanan yaitu Kop1: Kopi replikasi 1; Kop2: Kopi replikasi 2; Kop3: Kopi replikasi 3; T1: Teh replikasi 1; T2: Teh replikasi 2; T3; Teh replikasi 3; km1: Kapsul merah replikasi 1; Km2: Kapsul merah replikasi 2; Km3: Kapsul merah replikasi 3; S: Standar mitraginin; Kp1: Kapsul putih replikasi 1; Kp2: Kapsul putih replikasi 2; Kp3: Kapsul putih replikasi 3; Kh1: Kapsul hijau replikasi 1; Kh2: Kapsul hijau replikasi 2; Kh3: Kapsul hijau replikasi 3 untuk memastikan

keberadaan senyawa alkaloid dalam fraksi organik yang diperoleh setelah proses ekstraksi. Hasil identifikasi dengan kromatografi lapis tipis dapat dilihat pada **Gambar 5.1** berikut.



Gambar 5.2 Hasil kromatogram identifikasi KLT fraksinasi cair-cair asam basa; kopi, teh, kapsul varietas merah, kapsul varietas hijau dan kapsul varietas putih dengan Kromatografi Lapis Tipis; A. Hasil KLT sinar UV 366 nm; B. Hasil KLT sinar UV 254 nm.

Tabel 5.7 Hasil analisis perhitungan nilai Rf Kromatografi Lapis Tipis

Jenis Sampel	Replikasi	Jarak Noda (cm)	Jarak eluen (cm)	Rf	Rata-Rata
Standar		5,8	8	0,73	
Kopi	Rep. 1	6,2	8	0,78	0,75
	Rep. 2	6	8	0,75	
	Rep. 3	5,8	8	0,73	
Teh	Rep. 1	5,8	8	0,73	0,74
	Rep. 2	6	8	0,75	
	Rep. 3	6	8	0,75	
Kapsul Varietas Merah	Rep. 1	6	8	0,75	0,75
	Rep. 2	6	8	0,75	
	Rep. 3	6	8	0,75	
Kapsul Varietas Putih	Rep. 1	5,7	8	0,71	0,71
	Rep. 2	5,7	8	0,71	
	Rep. 3	5,7	8	0,71	
Kapsul Varietas Hijau	Rep. 1	5,7	8	0,71	0,72
	Rep. 2	5,8	8	0,73	
	Rep. 3	5,8	8	0,73	

Berdasarkan hasil kromatogram (**Gambar 5.2**), seluruh sampel menunjukkan beberapa noda dengan intensitas yang bervariasi pada kedua kondisi pencahayaan. Pada pengamatan UV 366 nm tampak bercak fluoresens, sedangkan pada UV 254 nm terlihat bercak gelap yang mengindikasikan keberadaan senyawa dengan sistem kromofor aromatik terkonjugasi, yang merupakan ciri umum senyawa alkaloid. Pola noda yang relatif konsisten pada masing-masing replikasi menunjukkan bahwa proses fraksinasi menghasilkan fraksi alkaloid yang stabil dan berulang.

Pada seluruh sampel ditemukan noda yang berada pada posisi migrasi yang relatif sejajar dengan baku pembanding mitraginin. Hasil perhitungan faktor retensi (R_f) pada **Tabel 5.7** menunjukkan bahwa nilai R_f baku pembanding mitraginin adalah 0,73, sedangkan nilai R_f noda sampel berada pada rentang 0,71–0,78. Kedekatan nilai R_f tersebut mengindikasikan adanya senyawa alkaloid dengan karakteristik kromatografi (noda) yang mirip dengan standar mitraginin. Namun, kesamaan nilai R_f belum dapat digunakan untuk memastikan identitas senyawa secara spesifik. Oleh karena itu, hasil KLT digunakan sebagai identifikasi awal yang bersifat kualitatif dan indikatif sebelum dilanjutkan ke analisis kuantitatif menggunakan metode GC–FID.

5.3.3 Kromatografi Lapis Tipis-Densitometri

Analisis KLT-densitometri dilakukan terhadap baku pembanding mitraginin dan fraksi alkaloid hasil fraksinasi cair–cair asam–basa dari berbagai produk komersial kratom, meliputi kopi kratom, teh kratom, serta kapsul varietas hijau, merah, dan putih. Analisis ini bertujuan untuk memperkuat interpretasi hasil KLT visual melalui pendekatan densitometri yang memberikan informasi kuantitatif mengenai posisi migrasi dan profil serapan noda pada pelat KLT. Dilakukan perhitungan R_s dari standar komersial dan sampel komersial yang mana hasil perhitungan dapat dilihat pada **Tabel 5.8** berikut.

Tabel 5.8 Data hasil analisis nilai R_s standar mitraginin dan fraksinasi cair-cair asam-basa.

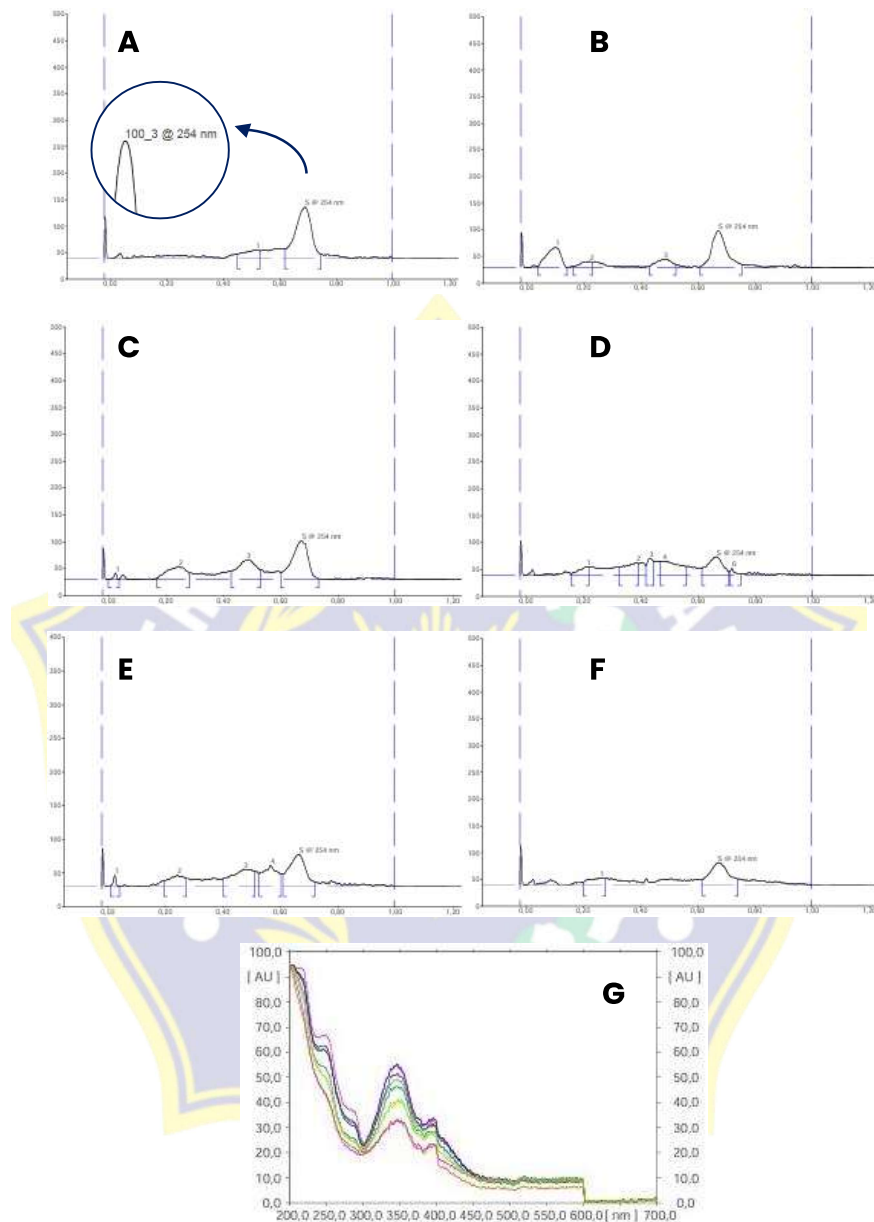
Panjang Gelombang Max 254 nm									
Jenis Sampel	Za	Zb	Rf Start		Rf End		Wa	Wb	Rs
			a	b	a	b			
Fraksinasi Cair-Cair Asam-Basa	0,61	0,43	0,51	0,38	0,68	0,46	0,08	0,17	1,44
Standar Mitraginin	0,63	0,43	0,49	0,33	0,71	0,48	0,15	0,22	1,08

Fraksinasi cair-cair asam-basa (**Tabel 5.8**) menunjukkan nilai parameter retensi $Z_a = 0,61$ dan $Z_b = 0,43$, serta nilai resolusi (R_s) sebesar 1,44, lebih tinggi dibandingkan standar mitraginin ($R_s = 1,08$). Menurut USP, nilai resolusi $R_s \geq 1,0$ dapat diterima untuk analisis kuantitatif, sedangkan $R_s \geq 1,5$ menunjukkan pemisahan baseline yang baik. Hal ini mengindikasikan pemisahan yang memadai antar komponen alkaloid dalam fraksinasi cair-cair asam-basa di atas pelat TLC tanpa interferensi dari matriks pengotor lainnya.

Analisis lebih lanjut dilakukan melalui pemindaian spektrum UV densitometri pada rentang panjang gelombang 200–700 nm. Hasil densitogram pada panjang gelombang deteksi 254 nm (**Gambar 5.3 A–F**) menunjukkan bahwa seluruh sampel menghasilkan puncak pada posisi migrasi yang sejajar atau berdekatan dengan puncak baku pembanding mitraginin, sedangkan hasil spektrum serapan (**Gambar 5.3 G**) menunjukkan bahwa noda sampel dan baku pembanding memiliki profil spektra yang relatif sejajar, dengan panjang gelombang maksimum (λ_{maks}) berada di sekitar 350 nm. Hal ini menegaskan bahwa panjang gelombang 254 nm dalam analisis densitometri berfungsi sebagai panjang gelombang deteksi yang umum digunakan, bukan sebagai λ_{maks} serapan mitraginin.

Kemiripan profil spektrum antara sampel dan baku pembanding menunjukkan adanya kesamaan karakteristik kromofor, yang dapat digunakan sebagai chemical fingerprint untuk memperkuat dugaan keberadaan mitraginin atau alkaloid indol sejenis dalam sampel. Namun, spektrum yang dihasilkan tidak bersifat tunggal dan memperlihatkan kemungkinan kontribusi senyawa alkaloid lain, sehingga identifikasi yang

diperoleh masih bersifat indikatif dan memerlukan teknik analisis lanjutan yang lebih selektif untuk konfirmasi struktur senyawa secara pasti.



Gambar 5.3 Densitogram hasil analisis fraksinasi alkaloid cair-cair asam basa menggunakan TLC-Densitometry. (A: Standar mitraginin; B: Kopi kratom; C: Teh kratom; D: Kapsul varietas hijau; E: Kapsul varietas merah; F: Kapsul varietas putih; G: seluruh track spektra UV produk komersial).

5.4 Optimasi Metode Analisis

Optimasi metode GC-FID dilakukan dengan mengevaluasi dua parameter instrumental utama, yaitu laju alir (*flow rate*) gas pembawa dan rasio

split, untuk memperoleh kondisi pemisahan yang menghasilkan puncak mitraginin dengan waktu retensi stabil, bentuk puncak simetris, dan luas area yang memadai. Hasil optimasi *flow rate* dan rasio split, dapat dilihat pada **Tabel 5.9** berikut:

Tabel 5.9 Data hasil analisis optimasi *flow rate* dan rasio split instrumen GC-FID

Jenis Sampel	Jenis Optimasi		Peak Standar Mitraginin		Peak Internal Standar	
	<i>Flow Rate</i> (mL/min)	Rasio Split	RT	Area	RT	Area
Sampel fraksi alkaloid kratom 500 mg/L + internal diazepam	0,8	1:10	25,73	211,8067	10,98	3,9493
	1,0	1:10	22,79	86,0027	7,16	19,8455
	1,5	1:10	21,17	31,6900	18,87	110,4491
	1,0	1:5	22,82	172,6864	17,59	8,2995
	1,0	1:20	22,80	51,6479	7,17	7,7990

Analisis optimasi *flow rate* menunjukkan bahwa laju alir memberikan pengaruh signifikan terhadap waktu retensi dan luas area puncak mitraginin. Pada *flow rate* 0,8 mL/min, waktu retensi menjadi paling lama (25,73 menit) dengan area puncak yang tinggi (211,8067), namun durasi analisis menjadi tidak efisien. *Flow rate* 1,0 mL/min menghasilkan waktu retensi lebih cepat (22,79 menit) dengan area yang moderat dan lebih stabil, sedangkan *flow rate* 1,5 mL/min menyebabkan waktu retensi terlalu cepat (21,17 menit) serta menghasilkan area yang sangat kecil (31,69), disertai ketidakstabilan internal standar (RT bergeser hingga 18,87 menit). Optimasi rasio split pada *flow rate* 1,0 mL/min menunjukkan bahwa split 1:5 memberikan area terbesar (172,6864) namun berpotensi menimbulkan overload dan distorsi puncak; sedangkan split 1:20 menghasilkan area yang semakin kecil sehingga sensitivitas menurun. Berdasarkan evaluasi keseluruhan parameter waktu retensi, luas area, kestabilan sinyal, dan bentuk puncak kondisi optimum ditetapkan pada *flow rate* 1,0 mL/min dan rasio split 1:10, karena kombinasi ini memberikan pemisahan yang baik, waktu analisis efisien, area yang berada dalam rentang linier detektor dan sensitivitas yang memadai untuk analisis mitraginin menggunakan GC-FID.

5.5 System Suitability Test

System Suitability Test dilakukan untuk memastikan bahwa instrumen GC-FID berada dalam kondisi layak sebelum digunakan untuk analisis kuantitatif mitraginin. Parameter yang diamati mencakup *retention time* (RT), height, area, dan rasio antara area analit konsentrasi 40 ppm dan internal standar pada konsentrasi standar internal diazepam konsentrasi 1000 ppm mg/L. Hasil analisis *system suitability test* dapat dilihat pada **Tabel 5.10**.

Tabel 5.10 Data hasil analisis *system suitability test* dengan standar mitraginin 40 mg/L

Replikasi	Height	RT	Area	Rasio
1	3,8491	22,89	26,7842	0,6967
2	3,8605	22,84	28,1365	0,7039
3	3,7309	22,75	27,6248	0,7037
4	3,1850	22,74	27,2156	0,6971
5	3,1745	22,74	27,5894	0,7053
Rata-rata (\bar{x})				0,7013
Standard Deviasi (SD)				0,0037
<i>Relative Standard Deviation</i> (%RSD)				0,5259

Hasil pengujian menunjukkan bahwa waktu retensi mitraginin berada pada rentang 22,74–22,89 menit, yang menandakan kestabilan sistem pemisahan. Nilai rasio area terhadap internal standar berada pada kisaran 0,6967–0,7053 dengan nilai rata-rata (\bar{x}) sebesar 0,7013. Perhitungan simpangan baku (SD) sebesar 0,0037 dan nilai %RSD sebesar 0,5259%, menunjukkan variasi yang sangat kecil antar replikasi. Nilai %RSD yang diperoleh berada jauh di bawah batas penerimaan umum untuk SST, yaitu $\leq 2\%$ (ICH, 2024; USP, 2019), sehingga sistem GC-FID dinyatakan memenuhi persyaratan kelayakan dan siap digunakan untuk tahap analisis selanjutnya.

5.6 Validasi Metode

5.6.1 Selektivitas

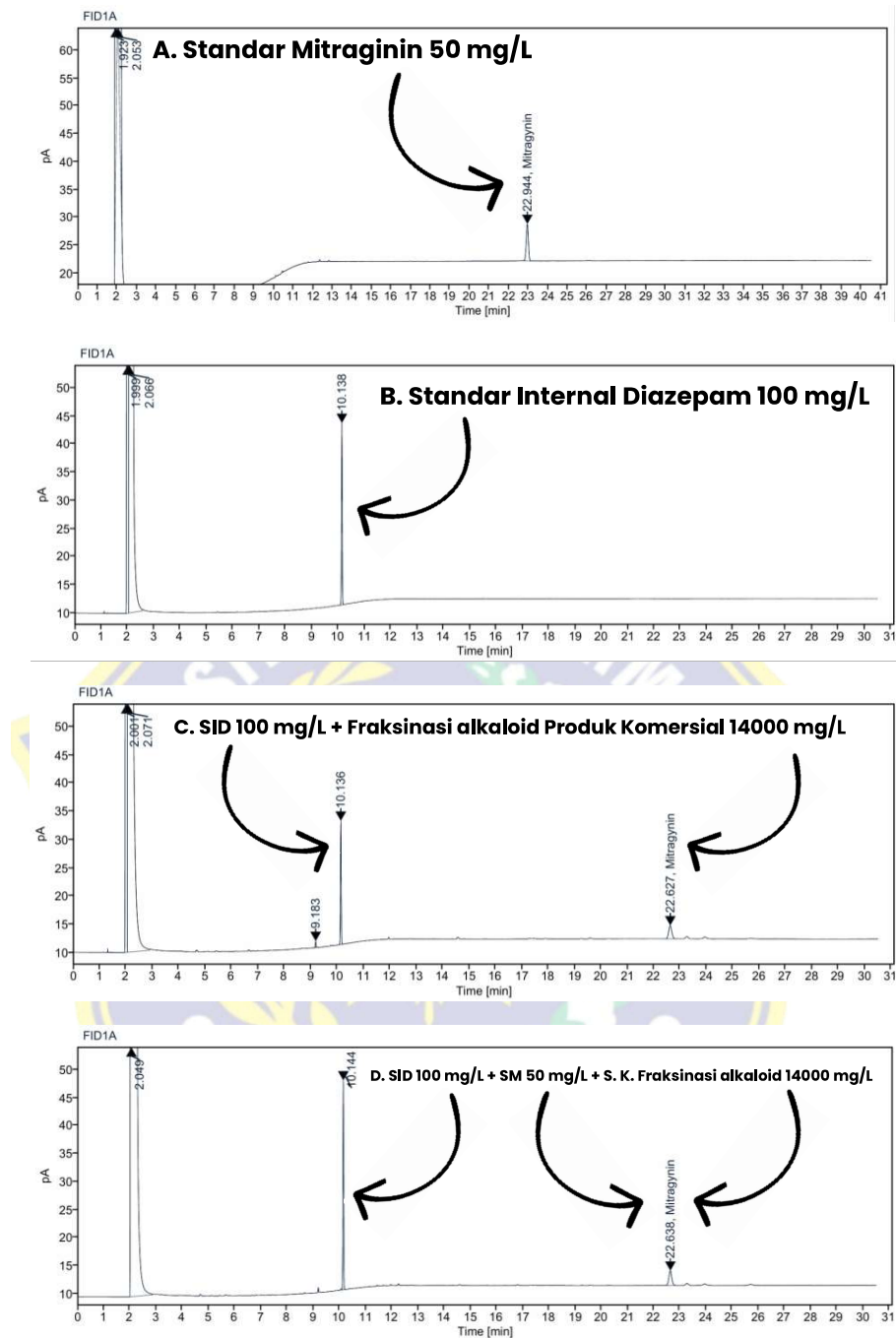
Selektivitas merupakan parameter penting dalam validasi metode GC-FID untuk memastikan bahwa analit utama, yaitu mitraginin, dapat dipisahkan secara spesifik dari komponen lain dalam matriks sampel serta

dari standar internal (diazepam). Pengujian selektivitas dilakukan terhadap empat jenis larutan, yaitu standar mitraginin, fraksinasi alkaloid produk komersial, standar internal diazepam, dan campuran seluruh komponen.

Berdasarkan **Gambar 5.4** standar mitraginin 50 mg/L, kromatogram menunjukkan satu puncak tajam pada waktu retensi sekitar $\pm 22,54$ menit tanpa adanya interferensi dari puncak lain, menandakan bahwa instrumen mampu mendeteksi mitraginin secara spesifik. Fraksinasi alkaloid produk komersial 14.000 mg/L menampilkan beberapa puncak matriks pada awal retensi, namun puncak mitraginin tetap muncul jelas dan konsisten pada RT $\pm 22,57$ menit, menunjukkan tidak adanya tumpang tindih dengan senyawa matriks.

Standar internal diazepam memberikan puncak yang tajam dan simetris pada RT $\pm 10,18$ menit serta terpisah jauh dari mitraginin, memastikan bahwa SID tidak mengalami interferensi dan layak digunakan sebagai korektor variasi injeksi. Pada kromatogram campuran (SID 100 mg/L + SM 50 mg/L + Fraksinasi alkaloid produk komersial 14.000 mg/L), terlihat dua puncak utama yang terpisah sangat baik, yaitu diazepam pada RT $\pm 10,14$ menit dan mitraginin pada RT $\pm 22,58$ menit, tanpa adanya puncak matriks yang berimpit pada keduanya. Hasil tersebut menunjukkan bahwa metode GC-FID memiliki selektivitas tinggi, dengan pemisahan yang stabil, konsisten, dan bebas interferensi untuk analit maupun standar internal.

Secara teoritis, selektivitas metode dinyatakan melalui nilai resolusi (R_s), namun pada penelitian ini perhitungan R_s secara matematis tidak dapat dilakukan karena data lebar puncak tidak ditampilkan secara numerik oleh perangkat lunak instrumen. Meskipun demikian, evaluasi selektivitas dilakukan secara kualitatif berdasarkan profil kromatogram GC-FID. Hasil menunjukkan bahwa puncak mitraginin muncul pada waktu retensi sekitar 22,6 menit dan terpisah jelas dari puncak matriks maupun standar internal, tanpa adanya tumpang tindih antar puncak serta dengan baseline yang kembali stabil. Kondisi pemisahan ini mengindikasikan bahwa metode memiliki selektivitas yang baik dan mampu mendeteksi mitraginin secara spesifik dalam matriks produk komersial kratom.



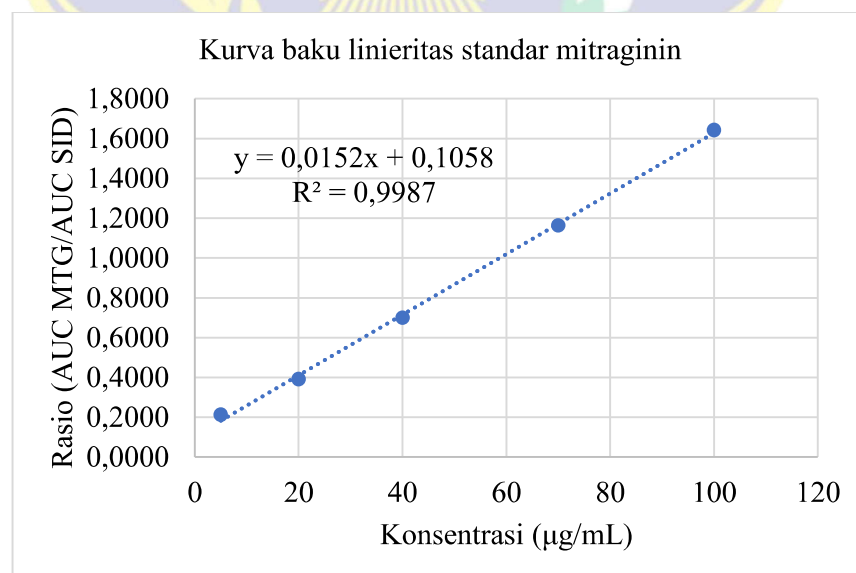
Gambar 5.4 Hasil kromatogram dengan GC-FID; A. Standar Mitragnin 50 mg/L, B. Standar Internal Diazepam 100 mg/L, C. Standar Internal Diazepam + Fraksinasi Alkaloid Produk Komersial 14000 mg/L, D. Standar Internal Diazepam 100 mg/L + Standar Mitragnin 50 mg/L + Fraksinasi Alkaloid Produk Komersial 14000 mg/L.

5.6.2 Linieritas dan Range

Linieritas bertujuan untuk mengetahui kemampuan metode memberikan respons yang proporsional terhadap konsentrasi analit dalam rentang tertentu. Evaluasi dilakukan dengan mengukur area puncak mitraginin pada lima variasi konsentrasi standar, yaitu 5; 20; 40; 70; dan 100 $\mu\text{g/mL}$. Data linieritas dapat dilihat pada **Tabel 5.11**.

Tabel 5.11 Data hasil linieritas mitraginin

Konsentrasi (ppm)	Area Standar Mitraginin	Rasio (Area Mitraginin/Area Internal Standar)
100	107,2576	1,6426
70	75,9262	1,1628
40	45,6491	0,6991
20	25,4938	0,3904
5	13,7871	0,2111
Persaman garis regresi		$y = 0,0152x + 0,1058$
Koefisien determinasi (R^2)		0,9987
Koefisien korelasi (r)		0,9993
V_{x_0}		1,9710



Gambar 5.5 Kurva kalibrasi standar mitraginin

Di plot konsentrasi (ppm) vs rasio yang diperoleh dari perbandingan area standar mitraginin dibagi area standar internal diazepam sehingga diperoleh persamaan kurva kalibrasi $y = 0,0152x + 0,1058$ dengan nilai koefisien determinasi $R^2 = 0,9987$, dan koefisien korelasi $r = 0,9993$ (**Gambar 5.5**). Hasil koefisien korelasi tersebut memenuhi persyaratan kriteria koefisien korelasi yang baik, yaitu $\geq 0,999$ (Wahyuni *et al.*, 2022). Grafik menunjukkan pola hubungan yang linier antara konsentrasi standar mitraginin dan rasio, yang menunjukkan bahwa instrumen memberikan respon yang proporsional dan luas dalam rentang konsentrasi yang diuji. Parameter linieritas yang lain adalah V_{x_0} yang mana evaluasi variasi kurva melalui nilai V_{x_0} sebesar 1,97% yang juga memenuhi persyaratan $V_{x_0} \leq 5\%$ serta mengonfirmasi bahwa linearitas metode berada pada tingkat variasi yang rendah dan konsisten (Galih *et al.*, 2025). Persamaan garis regresi tersebut menjadi dasar penentuan rentang dan perhitungan kadar mitraginin pada tahap analisis validasi berikutnya.

5.6.3 Presisi

Presisi merupakan parameter validasi yang digunakan untuk menilai tingkat kedekatan hasil beberapa pengukuran berulang dari sampel yang sama. Pengujian presisi dilakukan melalui enam kali injeksi sampel fraksinasi alkaloid yang mengandung mitraginin dengan penambahan standar internal diazepam. Data presisi ditampilkan pada **Tabel 5.12**.

Tabel 5.12 Data hasil presisi sampel mitraginin

Rep.	Area sampel	Area Internal	Rasio	Kadar Mitraginin dalam sampel (mg/L)	Kadar Mitraginin dalam produk komersial (mg/L)	Rerata	%RSD (%)
1	63,6933	87,4732	0,7281	57,1315	0,00042	0,00042	1,041
2	69,0305	100,9876	0,6836	62,5015	0,00043		
3	62,9875	84,5318	0,7451	56,4214	0,00042		
4	59,8955	75,1426	0,7971	53,3104	0,00042		
5	76,8450	125,9876	0,6099	70,3639	0,00043		
6	76,2140	124,9235	0,6101	69,7290	0,00043		

Hasil analisis menunjukkan bahwa nilai area sampel dan area internal yang diperoleh menghasilkan rasio respon yang relatif konsisten antar replikasi, dengan nilai kadar mitraginin dalam sampel berada pada rentang 53,31–70,36 mg/L, sedangkan kadar mitraginin yang dihitung dalam produk komersial berada pada kisaran 0,00042–0,00043 mg/L. Nilai rerata kadar mitraginin dalam produk komersial adalah 0,00042 mg/L dengan %RSD sebesar 1,041%, menandakan bahwa variasi antar replikasi sangat rendah. Sesuai kriteria validasi metode (ICH Q2(R2)), presisi dapat diterima apabila %RSD < 2% (ICH, 2024). Dengan demikian, data yang diperoleh menunjukkan bahwa metode GC-FID memiliki presisi yang sangat baik dan stabil untuk pengukuran mitraginin.

5.6.4 Akurasi

Akurasi merupakan parameter validasi yang menggambarkan kedekatan nilai hasil pengukuran terhadap nilai sebenarnya. Pada penelitian ini, akurasi dinilai dengan metode spike recovery pada tiga level konsentrasi, yaitu 80%, 100%, dan 120% dari kadar target mitraginin. Perhitungan akurasi dilakukan dengan membandingkan kadar mitraginin yang diperoleh terhadap kadar teoritis, kemudian dinyatakan dalam persen perolehan kembali (% recovery).

Tabel 5.13 Data hasil akurasi 80%

Rep.	Area (Pax)	Area (PAist)	Rasio (MTG/IS)	Kadar Total (ppm)	Kadar diperoleh (mg/L)	Kadar sebenarnya (mg/L)	%Akurasi (%)
1	43,4415	44,3209	0,9802	36,0261	23,5517	24	98,1319
2	42,1852	41,8436	1,0082	35,7811	23,3067	24	97,1111
3	40,923	38,8005	1,0547	36,0935	23,6190	24	98,4125
Rata-rata (\bar{x})							97,8852
Standard Deviasi (SD)							0,5592
Relative Standard Deviation (%RSD)							0,5713

Tabel 5.14 Data hasil akurasi 100%

Rep.	Area (Pax)	Area (PAist)	Rasio (MTG/IS)	Kadar Total (ppm)	Kadar diperoleh (mg/L)	Kadar sebenarnya (mg/L)	%Akurasi (%)
1	63,6933	87,4732	0,7281	41,6001	29,1256	30	97,0855
2	69,0305	100,9876	0,6836	42,7231	30,2487	30	100,8289
3	62,9875	84,5318	0,7451	42,0415	29,5670	30	98,5567
Rata-rata (\bar{x})							98,8237
Standard Deviasi (SD)							1,5399
<i>Relative Standard Deviation (%RSD)</i>							1,5582

Tabel 5.15 Data hasil akurasi 120%

Rep.	Area (Pax)	Area (PAist)	Rasio (MTG/IS)	Kadar Total (ppm)	Kadar diperoleh (mg/L)	Kadar sebenarnya (mg/L)	%Akurasi (%)
1	55,5318	56,3342	0,9858	48,2231	35,7487	36	99,3018
2	53,7636	53,4801	1,0053	47,3908	34,9163	36	96,9897
3	52,1378	50,4732	1,0330	47,0058	34,5314	36	95,9205
Rata-rata (\bar{x})							97,4040
Standard Deviasi (SD)							1,4112
<i>Relative Standard Deviation (%RSD)</i>							1,4488

Tabel 5.13 menunjukkan hasil pengujian akurasi pada akurasi 80%. Nilai % recovery berkisar antara 97,11–98,41%, dengan rata-rata 97,89%, standar deviasi 0,5592, dan %RSD 0,5713%. Nilai % recovery yang berada dalam rentang $98 \pm 2\%$ menunjukkan bahwa metode mampu mengukur kadar mitraginin pada level rendah dengan tingkat ketepatan yang baik. Berdasarkan **Tabel 5.14** akurasi pada akurasi 100% menghasilkan % recovery antara 97,08–100,83%, dengan rata-rata 98,82%, standar deviasi 1,5399, dan %RSD 1,5582%. Akurasi ini menunjukkan konsentrasi kerja utama, dan hasil menunjukkan bahwa metode dapat mengukur analit secara akurat pada konsentrasi nominal. Pada akurasi 120%, nilai % recovery berada pada kisaran 95,92–99,30%, dengan rata-rata 97,40%, standar deviasi 1,4112, dan %RSD 1,4488% (**Tabel 5.15**). Nilai ini menggambarkan bahwa metode

tetap akurat pada konsentrasi tinggi dan tidak mengalami deviasi signifikan meskipun terjadi peningkatan jumlah analit.

Nilai % recovery dari seluruh level konsentrasi berada dalam rentang 95–105%, yang memenuhi kriteria akurasi menurut pedoman ICH Q2(R2) 2024 dan AOAC 2023. Selain itu, %RSD pada semua akurasi berada jauh di bawah batas maksimal 2%, menandakan bahwa metode memberikan hasil yang stabil dan tidak dipengaruhi variasi replikasi. Dengan demikian, metode GC-FID yang digunakan memenuhi parameter akurasi dan layak digunakan untuk penetapan kadar mitraginin dalam sampel.

5.6.5 Penetapan kadar

Penetapan kadar mitraginin dilakukan terhadap lima jenis produk komersial yang mengandung kratom, yaitu kopi kratom, teh kratom, kapsul varietas merah, kapsul varietas hijau dan kapsul varietas putih. Analisis dilakukan menggunakan metode *Gas Chromatography–Flame Ionization Detector* (GC-FID) yang telah tervalidasi, dengan diazepam sebagai standar internal. Perhitungan kadar mitraginin didasarkan pada rasio area puncak mitraginin terhadap area puncak standar internal, kemudian di kembalikan menjadi kadar mitraginin dalam produk komersial.

5.6.5.1 Produk Komersial Teh

Tabel 5.16 Data hasil penetapan kadar produk komersial teh kratom

Rep.	Rasio (Area Mitraginin/ Area Internal Standar)	Kadar Mitraginin dalam Larutan Sampel (mg/L)	Kadar Mitraginin dalam produk komersial (mg/g)	Kadar Mitraginin dalam satu kantong (mg/kantong)
1	0,7386	23,2718	0,2327	0,7105
2	0,8128	24,4743	0,2447	0,7472
3	0,8709	28,4637	0,2846	0,8691
Rata-Rata				0,7756

Berdasarkan hasil yang disajikan pada **Tabel 5.16**, kadar mitraginin dalam produk teh kratom menunjukkan variasi antar replikasi, dengan nilai kadar mitraginin dalam produk komersial berkisar antara 0,2327–0,2846 mg/g. Jika dikembalikan ke dalam satu kantong teh, kadar mitraginin berada

pada rentang 0,7105–0,8691 mg/kantong, dengan nilai rasio area rata-rata sebesar 0,7756. Hasil ini menunjukkan bahwa teh kratom mengandung mitraginin dalam jumlah terukur dan konsisten antar replikasi.

5.6.5.2 Produk Komersial Kopi

Tabel 5.17 Data hasil penetapan kadar produk komersial kopi

Rep.	Rasio (Area Mitraginin/ Area Internal Standar)	Kadar Mitraginin dalam Larutan Sampel (mg/L)	Kadar Mitraginin dalam produk komersial (mg/g)	Kadar Mitraginin dalam satu wadah kopi (mg/wadah)
1	0,8788	50,0865	0,0501	0,5009
2	0,8829	55,2309	0,0552	0,5523
3	0,9115	54,7451	0,0547	0,5475
Rata-Rata				0,5335

Hasil penetapan kadar mitraginin pada produk kopi kratom ditunjukkan pada **Tabel 5.17**. Kadar mitraginin dalam produk komersial kopi berada pada kisaran 0,0501–0,0552 mg/g, dengan kadar mitraginin dalam satu wadah kopi berkisar antara 0,5009–0,5523 mg. Nilai rasio area relatif konsisten dengan rata-rata kadar mitraginin sebesar 0,5335 mg per wadah kopi, yang menunjukkan bahwa kopi kratom mengandung mitraginin dalam jumlah lebih rendah dibandingkan sediaan teh.

5.6.5.3 Produk Komersial Kapsul Hijau

Tabel 5.18 Data hasil penetapan kadar produk komersial kapsul hijau

Rep.	Rasio (Area Mitraginin/ Area Internal Standar)	Kadar Mitraginin dalam Larutan Sampel (mg/L)	Kadar Mitraginin dalam produk komersial (mg/g)	Kadar Mitraginin dalam satu kapsul (mg/kapsul)
1	0,6977	17,2700	0,0173	0,1727
2	0,5683	10,1949	0,0102	0,1019
3	0,5450	8,2878	0,0083	0,0829
Rata-Rata				0,1192

Berdasarkan **Tabel 5.18**, kapsul varietas hijau menunjukkan kadar mitraginin tertinggi di antara sediaan kapsul yang dianalisis. Kadar mitraginin dalam produk komersial berada pada rentang 0,0083–0,0173 mg/g, dengan

kadar mitraginin per kapsul berkisar 0,0829–0,1727 mg. Nilai rata-rata kadar mitraginin per kapsul sebesar 0,1192 mg menunjukkan bahwa kapsul varietas hijau memiliki kandungan mitraginin yang relatif lebih tinggi dibandingkan kapsul varietas putih dan varietas merah.

5.6.5.4 Produk Komersial Kapsul Putih

Tabel 5.19 Data hasil penetapan kadar produk komersial kapsul putih

Rep.	Rasio (Area Mitraginin/ Area Internal Standar)	Kadar Mitraginin dalam Larutan Sampel (mg/L)	Kadar Mitraginin dalam produk komersial (mg/g)	Kadar Mitraginin dalam satu kapsul (mg/kapsul)
1	0,6291	12,5505	0,0126	0,1255
2	0,5535	8,7273	0,0087	0,0873
3	0,5196	9,2929	0,0093	0,0929
Rata-Rata				0,1019

Hasil penetapan kadar mitraginin pada kapsul varietas putih disajikan pada **Tabel 5.19**. Kadar mitraginin dalam produk komersial berkisar antara 0,0087–0,0126 mg/g, dengan kadar mitraginin per kapsul berada pada rentang 0,0873–0,1255 mg. Nilai rata-rata kadar mitraginin per kapsul sebesar 0,1019 mg, lebih rendah dibandingkan kapsul varietas hijau namun masih lebih tinggi dibandingkan kapsul varietas merah.

5.6.5.5 Produk Komersial Kapsul Merah

Tabel 5.20 Data hasil penetapan kadar produk komersial kapsul merah

Rep.	Rasio (Area Mitraginin/ Area Internal Standar)	Kadar Mitraginin dalam Larutan Sampel (mg/L)	Kadar Mitraginin dalam produk komersial (mg/g)	Kadar Mitraginin dalam satu kapsul (mg/kapsul)
1	0,4994	6,5916	0,0066	0,0659
2	0,4700	5,2890	0,0053	0,0529
3	0,4848	6,4005	0,0064	0,0640
Rata-Rata				0,0609

Hasil penetapan kadar mitraginin pada produk komersial kapsul varietas merah disajikan pada **Tabel 5.20**. Berdasarkan hasil pengukuran,

kadar mitraginin dalam sampel total berada pada rentang 5,2890–6,5916 mg/L. Setelah dikembalikan ke dalam satu kapsul kadar produk komersial, diperoleh kadar mitraginin sebesar 0,0053–0,0066 mg/g, dengan kadar mitraginin per kapsul nilai yang diperoleh berada pada kisaran 0,0529–0,0659 mg per kapsul, dengan nilai rata-rata sebesar 0,0609 mg per kapsul. Nilai rasio area yang relatif konsisten antar replikasi menunjukkan bahwa metode GC-FID memberikan respon yang stabil dan dapat diandalkan dalam penetapan kadar mitraginin pada kapsul varietas merah. Dibandingkan dengan kapsul varietas hijau dan kapsul varietas putih, kapsul varietas merah menunjukkan kadar mitraginin yang paling rendah. Perbedaan ini menggambarkan adanya variasi kandungan alkaloid antar produk kapsul yang kemungkinan dipengaruhi oleh jenis varietas daun kratom, tingkat kematangan daun, serta proses pengolahan bahan baku sebelum diformulasikan menjadi sediaan kapsul.

