**ABSTRAK**

**Latar belakang** Mitragynine, alkaloid utama daun kratom (*Mitragyna speciosa*), memiliki efek analgesik, ansiolitik, dan banyak dipakai untuk tujuan rekreasional. Pengukuran kadar mitragynine dalam plasma dan urin penting untuk kepentingan identifikasi dan forensik. Analisis laboratorium untuk mendeteksi mitragynine masih memerlukan referensi mitragynine standar untuk penetapan kadar.

**Tujuan penelitian** Penelitian ini bertujuan untuk menvalidasi metode penetapan kadar mitragynine dalam plasma dan urin menggunakan LC-MS/MS tanpa menggunakan referensi mitragynine standar.

**Cara kerja** Metode penetapan mitragynine dikembangkan menggunakan LC-MS/MS. Ekstraksi dilakukan dengan menggunakan *ultrasound assisted extraction*. Plasma dan urin diproses menggunakan tehnik *protein precipitation* dilanjutkan dengan penyaringan menggunakan filter Millipore 0,45µm. Mitragynine dideteksi sebagai ion induk m/z 399,2 > m/z 174,2 sebagai ion produk. Metode validasi meliputi linearitas, akurasi, presisi, batas deteksi (LOD), dan batas kuantifikasi (LOQ).

**Hasil** Prosedur analisis divalidasi sesuai rekomendasi kompendium. Metode ini menunjukkan linearitas yang baik (r2>0,99). Presisi intra-hari berkisar antara 0,189% hingga 3,28% dalam plasma dan 0,41% hingga 1,16% untuk urin. Akurasi berkisar dalam rentang yang masih dapat diterima. LOD dan LOQ mitragynine plasma sebesar 1,83 µg/mL dan 5,55 µg/mL, sedangkan pada urin adalah 1,84 µg/mL dan 5,60 µg/mL.

**Kesimpulan** Metode penetapan kadar mitragynine dalam plasma dan urin tanpa menggunakan standar mitragynine ini telah tervalidasi dan terbukti presisi dan sensitif. Metode ini dapat digunakan untuk penelitian dan praktik klinis yang membutuhkan pengukuran kadar mitragynine.

**Kata kunci:** Kratom, LC-MS/MS, Metode Validasi, Mitragynine, Plasma, Urin