



TLC Video Densitometry Method for Determination Thiamphenicol in Dry Syrup

Winasih Rachmawati^{1*}, Ellen R. Pratiwi¹, Anne Yuliantini¹

¹Fakultas Farmasi, Universitas Bhakti Kencana Bandung, Jl. Soekarno Hatta No. 754 Bandung, Indonesia

Submitted 20 October 2023; Revised 21 December 2023; Accepted 18 December 2023; Published 30 December 2023

*Corresponding author: winasih.rachmawati@bku.ac.id

Abstract

An analytical method for the determination of thiamphenicol in dry syrup has been developed by the TLC video densitometry method. Identification and quantification of thiamphenicol in simple pharmaceutical preparations were performed on a silica gel GF₂₅₄ plate using mobile phase ethyl acetate:chloroform:methanol (7.5:2:0.5, v/v/v). The detection was carried out under a UV lamp at 254 nm and then captured by a digital camera with ISO 100 sensitivity, 50 mm focal point, f/6 aperture, and 1/15 sec shutter speed. The captured images were analyzed using ImageJ software to determine the AUC values of each spot. The selectivity result was 1.52. Method validation results obtained regression equation $y = 1.7481x + 16498$ ($r = 0.9995$; $V_{x0} = 0.80\%$). The limit of detection and the limit of quantitation were 21.78 and 72.60 ppm respectively. The precision (%RSD) intra-day and inter-day precisions were 1.07 and 1.34% respectively. The method has mean recoveries in the range of 96.62 - 100.91%. The levels of thiamphenicol in three dry syrup samples were 99.26, 101.25, and 101.81%, respectively. The TLC video densitometry method can be used as a routine analysis of thiamphenicol in dry syrup.

Keywords: dry syrup, thiamphenicol, TLC video densitometry.

Metode KLT Video Densitometri untuk Penetapan Kadar Tiamfenikol dalam Sirup Kering

Abstrak

Metode analitik untuk penentuan tiamfenikol dalam sirup kering telah dikembangkan menggunakan metode KLT video densitometri. Identifikasi dan kuantifikasi tiamfenikol dalam sediaan tablet dilakukan pada lempeng silika gel GF₂₅₄ menggunakan fase gerak etil asetat: kloroform: metanol (7,5: 2: 0,5, v/v/v). Deteksi dilakukan di bawah lampu UV 254 nm dan kemudian diambil menggunakan kamera digital dengan sensitivitas ISO 100, titik fokus 50 mm, *aperture* f/6, dan *shutter speed* 1/15 detik. Gambar yang diambil dianalisis menggunakan perangkat lunak ImageJ untuk menentukan nilai AUC dari setiap bercak. Hasil selektivitasnya adalah 1,52. Persamaan regresi tiamfenikol diperoleh persamaan $y = 1,7481x + 16498$ ($r = 0,9995$; $V_{x0} = 0,80\%$). Batas deteksi dan batas kuantitasi masing-masing sebesar 21,78 dan 72,60 bpj. Presisi (%RSD) dalam satu hari dan antar hari masing-masing adalah 1,07 dan 1,34%. Metode ini menghasilkan rata-rata perolehan kembali direntang 96,62 hingga 100,91%. Kandungan tiamfenikol dalam tiga sampel sirup kering masing-masing sebesar 99,26, 101,25, dan 101,81%. Metode KLT video densitometri dapat digunakan sebagai analisis rutin tiamfenikol dalam sirup kering.

Kata Kunci: sirup kering, tiamfenikol, KLT video densitometri.

1. Pendahuluan

Tiamfenikol merupakan antibiotik spektrum luas turunan kloramfenikol yang mempunyai indikasi untuk infeksi¹. Saat ini produk yang beredar dan mengandung tiamfenikol hanya berupa kapsul dan suspensi kering. Tiamfenikol dibuat sediaan suspensi kering karena zatnya sukar larut dalam air² dan bentuk sediaan nyaman untuk diberikan untuk pediatri³. Rasa antibiotik yang pahit dapat tertutupi jika dibuat sediaan sirup⁴.

Metode standar dalam penentuan kadar tiamfenikol dalam sediaan jadi tidak terdapat di dalam Farmakope Indonesia, namun beberapa penelitian telah melaporkan analisis kadar tiamfenikol dalam sediaan dapat dilakukan menggunakan Kromatografi Cair Kinerja Tinggi (KCKT) dan spektrofotometri ultraviolet⁵⁻⁷. Selain itu, metode KLT-KCKT telah dilakukan untuk identifikasi tiamfenikol dalam makanan ternak⁸. Kontrol kualitas suatu zat aktif dalam sediaan dapat menggunakan Kromatografi Lapis Tipis (KLT). Kombinasi KLT dan densitometri merupakan metode pemisahan analitik secara simultan yang bercaknya dapat dipindai secara optik elektronik sehingga dapat digunakan untuk penetapan kadar. Dibandingkan dengan KCKT, fase gerak yang digunakan di KLT dapat lebih luas dan bervariasi. Sampel suspensi dapat ditetapkan kadarnya secara langsung tanpa proses preparasi sampel yang rumit⁹. Selain itu metode KLT Video densitometri ini memiliki kelebihan diantara lain instrumennya sederhana, biaya operasional relatif murah, volume pelarut yang digunakan sedikit, selektif dan sensitif, serta kromatogramnya dapat diamati secara visual¹⁰⁻¹². Kromatogram direkam menggunakan kamera video warna yang sensitif, dan sinyal video dikirim ke papan digitalisasi khusus (*frame grabber*) yang membantu pemrosesan gambar secara cepat melalui sistem komputer pribadi (seperti *ImageJ*). Perangkat lunak khusus yang dikembangkan untuk evaluasi kuantitatif kromatogram mendukung pengeditan dokumen gambar di layar, termasuk pemilihan posisi pemindaian, ekstraksi data, dan integrasi¹³. Penerapan metode KLT video

densitometri untuk analisis tiamfenikol belum terdapat publikasi yang pernah dilakukan. Berdasarkan uraian di atas, maka peneliti tertarik untuk mengembangkan metode Kromatografi Lapis Tipis (KLT) video densitometri sebagai metode alternatif dalam analisis kadar tiamfenikol dalam sediaan sirup kering. Validasi metode merupakan tahapan yang penting dalam melakukan analisis kadar. Parameter validasi yang harus dipenuhi meliputi selektivitas, linearitas, sensitivitas (batas kuantitasi dan batas deteksi), presisi, dan akurasi^{14,15}.

2. Metode

2.1. Alat

Lempeng KLT silika gel 60 F₂₅₄ aluminium 20 x 20 cm (Merck), bejana pengembang 10 x 10 cm, aplikator Camag linomat 4, *injector* Camag, kamera digital Sony Alpha tipe A5100, dan perangkat lunak *ImageJ* versi 1.53h20.

2.2. Bahan

Tiamfenikol baku (PT Sanbe Farma), tiamfenikol sirup yang mengandung 125 mg/5 mL tiamfenikol (3 merk di apotek), metanol p.a (Merck), kloroform p.a (Merck), etil asetat p.a (Merck), dan aquades.

2.3. Prosedur

2.3.1. Penyiapan Larutan Standar dan Larutan Baku Kerja

Larutan standar dibuat dengan menimbang seksama sejumlah kurang lebih 100 mg tiamfenikol dilarutkan dengan 50,0 mL metanol. Larutan baku kerja dibuat dari pengenceran larutan standar hingga diperoleh konsentrasi direntang 600-1200 bpj.

2.3.2. Optimasi Kondisi Analisis

Pelat KLT silika gel GF₂₅₄ diaktivasi dengan cara dipanaskan pada suhu 105°C selama 30 menit. Larutan kerja 1000 bpj ditotolkan penotolan menggunakan aplikator Camag sebanyak 5 µL pada pelat KLT. Fase gerak disiapkan dengan cara mengkombinasikan beberapa pelarut seperti metanol, etil asetat dan kloroform hingga menghasilkan pemisahan bercak yang baik.

Lempeng KLT kemudian dimasukkan dalam *chamber* yang telah jenuh. Setelah eluen mencapai batas elusi, lempeng diangkat dan dikeringkan kemudian diamati di bawah lampu UV. Hasil kombinasi pelarut terbaik diperoleh dari bercak yang menghasilkan nilai Rf di rentang 0,2-0,8. Bercak difoto menggunakan kamera Sony Alpha A5100 dengan sensitivitas ISO 100, titik fokus 50 mm, *aperture* f/6, dan *shutter speed* 1/15 detik. File foto dibaca dengan perangkat lunak *ImageJ* menghasilkan AUC untuk data perhitungan berikutnya.

2.3.3. Selektivitas dan Spesifisitas

Preparasi standar: Larutan baku kerja tiamfenikol 1000 bpj disiapkan kemudian ditotolkan sebanyak 5 μ L pada lempeng KLT Silika Gel F₂₅₄.

Preparasi sampel: Sirup yang telah direkonstitusi ditimbang setara 125 mg tiamfenikol (menggunakan kesetaraan BJ) kemudian dimasukkan ke dalam labu ukur 25,0 mL dan dilarutkan dengan metanol. Larutan tersebut diencerkan lima kali menggunakan metanol. Larutan sampel disaring dan dipindahkan kedalam vial kemudian ditotolkan sebanyak 5 μ L pada lempeng KLT Silika Gel F₂₅₄.

Preparasi fase gerak: Sebanyak 10 mL campuran pelarut etil asetat : kloroform : metanol (7,5: 2 : 0,5) digunakan sebagai fase gerak dimasukkan ke dalam bejana (*chamber*) hingga jenuh. Pelat yang telah ditotolkan larutan baku dan sampel dimasukkan ke dalam *chamber* yang telah jenuh. Setelah eluen mencapai batas elusi, lempeng diangkat dan dikeringkan. Lempeng noda yang dihasilkan diamati di bawah lampu UV 254 nm, kemudian direkam dan *file* hasilnya dibaca dengan perangkat *ImageJ*. Nilai resolusi puncak tiamfenikol mempunyai nilai pemisahan lebih dari 1,5.

2.4. Validasi Metode Analisis

2.4.1. Linearitas

Larutan baku kerja tiamfenikol dibuat sebanyak tujuh konsentrasi yang berbeda yaitu 600, 700, 800, 900, 1000, 1100, dan 1200 bpj. Larutan seri tersebut ditotolkan sebanyak 5

μ L pada pelat menggunakan aplikator Camag. Setelah itu dilakukan pengembangan dengan fase gerak terpilih. Setelah pengembangan, pelat yang akan dianalisis dikeringkan untuk menghilangkan uap dari fase gerak dan divisualisasikan di bawah sinar UV 254 nm untuk mendeteksi bercak senyawa analit tiamfenikol. Kemudian, gambar pelat KLT di bawah sinar UV diambil menggunakan kamera digital Sony Alpha tipe A5100 yang sudah diletakkan di atas pelat. Gambar yang dihasilkan berupa bercak yang terlihat jelas kemudian dianalisis dengan perangkat lunak *ImageJ* untuk menghasilkan nilai AUC dari masing-masing bercak. Selanjutnya dilakukan perhitungan regresi linear dimasukkan dalam persamaan garis $y=bx+a$. Dari persamaan berikut dapat diperoleh nilai koefisien korelasi (r) dan V_{x0} .

2.4.2. Sensitivitas

Proses analisis sama dengan linieritas yang dilanjutkan dengan perhitungan nilai parameter batas deteksi dan batas kuantitasi dari data hasil pemindaian. Menghitung nilai parameter batas deteksi dan batas kuantitasi menggunakan persamaan Batas deteksi (BD) = $(3 \times S_{y/x})/b$. Batas kuantitasi (BK) = $(10 \times S_{y/x})/b$.

2.4.3. Akurasi

Uji akurasi dilakukan dengan membuat sampel simulasi dengan formulasi yang terdiri dari tiamfenikol, sukrosa, xanthan gum, asam sitrat dan aerosil⁴. Sampel simulasi dibuat konsentrasi tiamfenikol yang berbeda yaitu 80, 100, dan 120% dari kekuatan sediaan yang tertera di etiket.

Larutan sirup simulasi ditimbang setara dengan 5 mL (kesetaraan BJ), kemudian dilarutkan menggunakan metanol p.a dalam labu ukur 25,0 mL. Kemudian dilakukan pengenceran sebanyak lima kali. Larutan disaring kemudian ditotolkan sebanyak 5 μ L di pelat KLT. Proses penotolan, pengembangan, penampakan dan perekaman bercak serta analisis kromatografi sama dengan linearitas. Kemudian dilakukan analisis kromatogram sehingga diperoleh nilai respon luas puncak (AUC).

$$\% \text{ perolehan kembali} = \frac{\text{Kadar yang dihitung}}{\text{Kadar teoritis}} \times 100\%$$

2.4.4. Presisi

Presisi dilakukan dengan menggunakan sampel simulasi konsentrasi 100% diulang sebanyak 6 kali, kemudian larutan ditotolkan pada pelat KLT masing-masing sebanyak 5 μ L. Kemudian dikembangkan dalam *chamber*, diangkat lalu dikeringkan. Prosedur ini dilakukan sebanyak tiga kali pada hari yang berbeda untuk menentukan presisi antara atau *intermediate precision*. Setelah pelat kering, visualisasi dan pengambilan gambar dilakukan. Selanjutnya, nilai respon luas puncak (AUC) dihitung melalui analisis kromatogram.

2.4.5. Penetapan Kadar Sampel

Sampel sirup kering tiamfenikol dipilih tiga merk berbeda yang didapatkan dari salah satu apotek daerah Bandung. Pembuatan larutan uji dilakukan dengan menimbang setara 5,0 mL sirup kemudian dilarutkan menggunakan metanol p.a dalam labu ukur 25,0 mL. Larutan tersebut diencerkan 5 kali kemudian ditotolkan pada pelat KLT. Penotolan sampel pada pelat KLT dilakukan sebanyak tiga kali pengulangan. Setelah itu, AUC bercak dan rata-rata AUC dihitung, dan kromatogram *baseline* yang dipilih berwarna hijau karena memberikan bentuk puncak terbaik. Selanjutnya, dianalisis menggunakan perangkat lunak *ImageJ* hingga diperoleh

nilai luas area kemudian kemudian dihitung konsentrasinya dari persamaan regresi linier yang telah diperoleh. Nilai kadar yang diperoleh harus memenuhi syarat yaitu 97% - 103%².

3. Hasil

3.1. Selektivitas dan spesifisitas

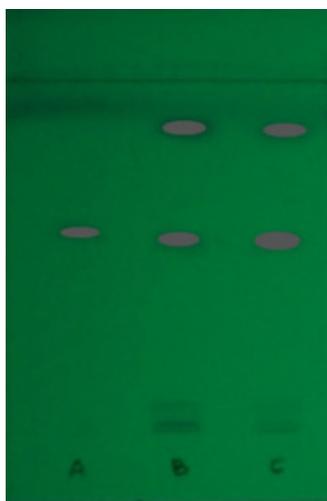
Pada pengujian ini dilakukan percobaan dengan delapan variasi fase gerak. Hasil optimasi dapat dilihat pada Tabel 1. Sistem KLT yang terbaik yaitu menggunakan fase diam silika gel GF₂₅₄ dan fase gerak No. 8 yaitu etil asetat : kloroform : metanol (7,5:2:0,5, v/v) dengan nilai selektivitas (α) sebesar 1,52. Hasil selektivitas ditunjukkan pada Gambar 1. Bercak yang dihasilkan kemudian divisualisasikan menggunakan *software ImageJ* sehingga diperoleh kromatogram seperti pada Gambar 2.

3.2. Linearitas

Berdasarkan hasil yang didapat nilai koefisien korelasi (r) tiamfenikol adalah 0,9992 (n=7). Persamaan yang didapat sebesar $y = 1,7481x + 16498$ dengan hasil nilai V_{x0} yang didapatkan sebesar 0,80%.

3.3. Sensitivitas

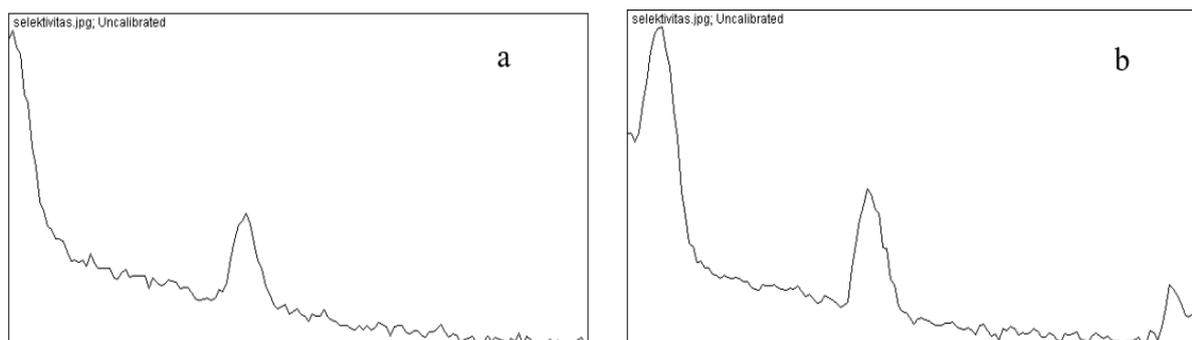
Dari hasil perhitungan, diperoleh nilai batas deteksi dan batas kuantitasi tiamfenikol dengan metode KLT video densitometri berturut-turut adalah 21,78 bpj dan 72,60 bpj.



Gambar 1. Hasil Uji Selektivitas, Baku (A); Sampel (B); Sampel + Baku Tiamfenikol (C)

Tabel 1. Optimasi Fase Gerak menggunakan pelat KLT silika gel GF₂₅₄

Fase Gerak (v/v)	Rf	Bentuk Bercak
Metanol : Etil Asetat (3:97)	0,92	Pipih
Metanol : Etil Asetat (97:3)	1	Sedikit Bulat
Etil Asetat 100%	0,76	Pipih, Lonjong
Kloroform 100%	0,07	Bulat
Etil Asetat : Kloroform (1:1)	0,13	Bulat
Etil Asetat : Kloroform (8:2)	0,27	Bulat
Etil Asetat : Kloroform : Metanol (7:2:1)	0,72	Pipih, Lonjong
Etil Asetat : Kloroform : Metanol (7,5 : 2 : 0,5)	0,63	Pipih, Lonjong



Gambar 2. Kromatogram hasil ImageJ (a) tiamfenikol baku (b) sampel

3.4. Akurasi

Dari hasil uji akurasi menunjukkan persen perolehan kembali direntang 96,62-100,91% yang dapat dilihat pada Tabel 2.

3.5. Presisi

Uji presisi dilakukan menggunakan metode sampel simulasi dengan konsentrasi 100%. Data presisi interday diperoleh dari tiga hari percobaan (n=6). Hasil presisi yang diperoleh memenuhi persyaratan yaitu nilai RSD kurang dari 2%¹⁶ dapat dilihat pada Tabel 3.

3.6. Penetapan Kadar

Pada penelitian ini dilakukan analisis tiamfenikol di dalam tiga merek sirup kering yang beredar di pasaran. Hasil rata-ratanya dapat dilihat pada Tabel 4 berikut ini:

4. Pembahasan

Berdasarkan hasil penelitian yang telah dilakukan, menunjukkan bahwa hasil optimasi fase gerak dari delapan variasi campuran yang telah dilakukan dipilih sistem No 8 yaitu campuran etil asetat : kloroform : metanol (7,5: 2 : 0,5) digunakan sebagai fase gerak, hasil pengujian yang dilakukan memberikan nilai Rf sebesar 0,63. Nilai Rf yang diperoleh

menunjukkan bahwa hasil berada pada rentang nilai persyaratan yaitu 0,2-0,8. Pelarut 7 dan 8 mempunyai campuran yang sama dengan komposisi yang berbeda. Penambahan volume etil asetat dapat menurunkan polaritas dari fase gerak sehingga menurunkan nilai Rf tiamfenikol. Komponen dari senyawa akan melewati fase diam dengan tingkatan yang berbeda sehingga memiliki faktor retensi yang berbeda juga¹⁷. Sistem kromatografi yang lain menunjukkan nilai Rf sangat rendah untuk fase gerak nomor 2, 4, 5 dan 6, sedangkan Rf yang sangat tinggi ditunjukkan pada sistem kromatografi nomor 1, 3 dan 7. Nilai Rf yang terlalu rendah atau tinggi akan mengganggu terhadap visualisasi bercak yang berasal dari pelarut¹⁸. Selektivitas dapat dilihat dari pemisahan analit yang diperiksa dan analit yang terdapat di dalam sampel dapat berpisah. nilai selektivitas (α) sebesar 1,52, dimana persyaratan untuk nilai adalah $\alpha > 1,5$ ². Nilai selektivitas menunjukkan adanya pemisahan yang baik antara satu analit dengan yang lainnya. Semakin besar nilai selektivitas dapat menyatakan pemisahan yang besar perbedaannya. Linearitas yaitu kemampuan metode analitik untuk merespon berbanding lurus dengan konsentrasi analit dalam sampel. Berdasarkan hasil yang didapat nilai koefisien

Tabel 2. Hasil Akurasi

Konsentrasi	Massa teoritis (mg)	Massa hasil percobaan (mg)	Perolehan kembali (%)	Rata-rata
80%	100	96,05	96,05	96,62 %
	100	96,76	96,76	
	100	97,05	97,05	
100%	125	124,01	99,21	98,72 %
	125	123,09	98,47	
	125	123,10	98,48	
120%	150	151,62	101,07	100,91 %
	150	150,09	100,06	
	150	152,38	101,59	

Tabel 3. Data Presisi

Hari ke-	Kadar (%) ± SD	RSD interday (%)
1	99,22 ± 1,06	1,07
2	100,73 ± 1,11	1,10
3	101,21 ± 1,88	1,86

baku tiamfenikol adalah 0,9992. Persamaan yang didapat sebesar $y = 1,7481x + 16498$. Koefisien korelasi dapat diartikan sebagai kedekatan antara titik dan garis. Korelasi menjadi lebih kuat semakin dekat titik ke garis. Nilai r sebesar 0,9995 tersebut akan semakin linear karena mendekati satu¹⁹. Jika persyaratan $Vx0$ kurang dari 2%, maka hasil nilai $Vx0$ yang didapatkan sebesar 0,80% dapat dinyatakan nilai tersebut memenuhi syarat yang dapat diartikan bahwa ada korelasi linear antara jumlah tiamfenikol dengan luas area yang diperoleh. Maka, persamaan linearitas pada kurva baku tiamfenikol dapat digunakan untuk menentukan jumlah tiamfenikol yang terkandung dalam sampel sirup kering.

Batas deteksi (BD) merupakan konsentrasi terendah yang masih dapat terdeteksi di dalam sampel¹⁶. Dari hasil penelitian diperoleh konsentrasi 21,78 bpj. Sedangkan batas kuantitasi (BK) adalah konsentrasi terkecil dari sampel yang dapat ditentukan secara kuantitatif¹⁶. Hasil BK diperoleh konsentrasi sebesar 72,60 bpj. BD dan BK diperoleh dari hasil perhitungan secara statistik melalui regresi linier kurva kalibrasi. Akurasi adalah kedekatan kesepakatan antara nilai yang diterima baik sebagai nilai konvensional yang sebenarnya atau sebagai nilai referensi yang diterima dan nilai yang ditemukan²⁰. Rentang keberterimaan ditunjukkan dengan batas persen *recovery* untuk setiap konsentrasi analit pada matriks. Berdasarkan Tabel 3 menunjukkan tingkat perolehan kembali tiamfenikol pada konsentrasi sampel simulasi, masing-masing sebesar 96,62; 98,7; dan 100,9%. Dapat diartikan hasil perolehan kembali yang diperoleh berada pada rentang 95-105%²⁰. Presisi merupakan kedekatan nilai antara setiap pengukuran dalam kondisi analisis yang sama. Parameter deviasi standar relatif (RSD) dapat digunakan untuk mengukur

Tabel 4. Kadar Tiamfenikol dalam Sirup Kering

Sampel Merk	Kadar (mg/5mL)	Kadar (%)
A	124,08 ± 2,14	99,26 ± 1,71
B	126,57 ± 2,38	101,25 ± 1,91
C	127,26 ± 1,34	101,81 ± 1,07

presisi. Berdasarkan Tabel 6 hasil presisi yang diperoleh memenuhi persyaratan yaitu nilai RSD kurang dari 2%¹⁵.

Jika semua parameter validasi metode terpenuhi, dapat disimpulkan bahwa metode yang digunakan dalam penelitian ini memenuhi persyaratan validasi dan dapat digunakan untuk menetapkan kadar sampel. Sampel yang digunakan adalah sampel sirup kering tiamfenikol dengan tiga merek yang berbeda. Setelah didapatkan bercak berupa gambar selanjutnya dianalisis menggunakan perangkat lunak *ImageJ* hingga mendapatkan AUC tiamfenikol, kemudian dimasukkan ke persamaan garis linear. Berdasarkan Tabel 5 diketahui hasil penetapan kadar tiamfenikol dalam sirup kering untuk ketiga sampel diperoleh hasil berturut-turut sebesar 99,26, 101,25, dan 101,81%, hal ini menunjukkan bahwa kadar tiamfenikol diperoleh memenuhi persyaratan yang tertera pada Farmakope Edisi VI dimana tiamfenikol mengandung tidak kurang dari 98,0% dan tidak lebih dari 100,5%².

5. Kesimpulan

Dari hasil penelitian dapat disimpulkan bahwa metode KLT video densitometri yang telah divalidasi dapat digunakan untuk analisis rutin tiamfenikol dalam sediaan sirup kering.

Referensi

- Balbi HJ. Chloramphenicol: A review. *Pediatr Rev.* 2004;25(8):284–8.
- Kemendes RI. Farmakope Indonesia. 6th ed. Jakarta: Kementerian Kesehatan RI; 2020.
- Swarnalatha KM, Harshika A, Iswariya VT, Madhavi N. Dry Syrup: A Comprehensive Review. *Int J Life Sci Pharma Res.* 2022;13(1):39–46.
- Akre HS, Mundhada DR, Bhaskaran S, Asghar S, Gandhi GS. Dry suspension

- formulation of taste masked antibiotic drug for pediatric use. *J Appl Pharm Sci.* 2012;2(7):166–71.
5. Tarinc D, Golcu A. Development and Validation of Spectrophotometric Methods for Determination of Thiamphenicol in Capsule Forms. *KSU J Eng Sci.* 2011;14(1):35–8.
 6. Martins YA, De Oliveira CLCG. Development and Validation of an UV Spectrophotometric Method for Determination of Thiamphenicol in Dosage Form. *J Appl Spectrosc.* 2019;86(4):629–35.
 7. Pramita ED. Validasi Metode Penetapan Kadar Tiamfenikol Dalam Sediaan Suspensi Kering (Dry Syrup) Secara Kromatografi Cair Kinerja Tinggi. 2020;
 8. Wang JM, Yang JJ, Qian MR, Zhou DN, Ke XB, Sun GZ, et al. A TLC-HPLC Method for Determination of Thiamphenicol in Pig, Chicken, and Fish Feedstuffs. *Food Anal Methods.* 2018;11(11):3103–12.
 9. Yuangsoi B, Jintataporn O, Areechon N, Tabthipwon P. Validated TLC-densitometric analysis for determination of carotenoids in fancy carp (*Cyprinus carpio*) serum and the application for pharmacokinetic parameter assessment. *Songklanakarin J Sci Technol.* 2008;30(6):693–700.
 10. Kimel K, Zienkiewicz M, Spzrak-Stefanowska B, Krauze-Baranowska M. TLC-densitometric analysis of allantoin in *Symphytum officinale* L. roots. *Acta Pharm.* 2019;70(1):101–10.
 11. Oldham PB. Development of a video densitometer for thin-layer chromatography. *Instrum Sci Technol.* 1990;19(1):49–77.
 12. Misra H, Dwivedi BK, Mehta D, Mehta BK, Jain DC. Development and validation of high performance thin-layer chromatographic method for determination of α -mangostin in fruit pericarp of mangosteen plant (*Garcinia mangostana* L.) using ultraviolet - Visible detection. *Rec Nat Prod.* 2009;
 13. Petrovic M, Kastelan-Macan M, Lazaric K, Babic S. Validation of Thin-Layer Chromatography Quantitation Determination with CCD Camera and Slit-Scanning Densitometer. *J AOAC Int.* 1999;82(1):25–30.
 14. Mukherjee A, Bera A. A detailed study of validation parameters and system suitability test in HPLC. *Res J Pharm Biol Chem Sci.* 2012;3(4):426–47.
 15. ICH. Guidance for Industry Q2B Validation of Analytical Procedures: Methodology. In: the Drug Information Branch (HFD-210) [Internet]. 1996. p. 301–827. Available from: <http://www.fda.gov/cder/guidance/index.htm%5Chttp://www.fda.gov/cber/guidelines.htm>
 16. Sonawane L V., Poul BN, Usnale, Sharad V. Waghmare P V, Surwase LH. Bioanalytical Method Validation and Its Pharmaceutical Application- A Review. *Pharm Anal Acta.* 2014;05(03).
 17. Kumar S, Jyotirmayee K, Sarangi M. Thin layer chromatography: A tool of biotechnology for isolation of bioactive compounds from medicinal plants. *Int J Pharm Sci Rev Res.* 2013;18(1):126–32.
 18. Muttaqin FZ, Yuliantini A, Fitriawati A, Asnawi A. Penetapan Kadar Senyawa Metampiron dan Diazepam dalam Sediaan Kombinasi Obat Menggunakan Metode KLT Video Densitometri. *Pharmacy.* 2016;13(2):127–36.
 19. Chan CC, Lam H, Lee YC, Pharma N. ANALYTICAL METHOD VALIDATION AND INSTRUMENT PERFORMANCE VERIFICATION. 2004.
 20. Harmita. Petunjuk Pelaksanaan Validasi Metode dan Cara Perhitungannya. *Maj Ilmu Kefarmasian.* 2004;1(3):117–35.