



Open access article


TEKNIK APLIKASI SAMPEL PADA PENGUJIAN KUANTITATIF KROMATOGRAFI LAPIS TIPIS: TINJAUAN TERHADAP AREA DAN FAKTOR RETENSI

Sample Application Techniques In Quantitative Determination of Thin Layer Chromatography: Review on Area and Retention Factor

Penulis / Author (s)

Hanif Rifqi Prasetyawan¹  ¹ Universitas Airlangga, Surabaya, Indonesia

Idha Kusumawati¹ 

Riesta Primaharinastiti¹ 

Koresponden : Idha Kusumawati

e-mail korespondensi: idha-k@ff.unair.ac.id

Reviewed: 30-05-2024

Accepted: 02-07-2024

DOI: <https://doi.org/10.32382/mf.v20i2.655>

ARTICLE INFO

ABSTRACT / ABSTRAK

Keywords:

Densitometry;
peak area;
retention factor;
thin layer
chromatography;

Kata Kunci

Densitometer;
faktor retensi;
luas area;
kromatografi lapis tipis;

Thin Layer Chromatography (TLC) is one of the most commonly used chromatographic techniques to identify compounds in mixtures and determine the purity of a compound. However, the crucial factor that is difficult to control, which can affect the accuracy of the results, is the stage of sample application. This study focused on investigating the effect of different techniques of sample application (manual and semi-automatic) on the area and retention factor (Rf) of the compound spot. Curcuminoid was used as a sample in this study. The manual sample application techniques used a 2 μ L capillary tube. The semi-automatic sample application techniques used a Camag Linomat-5 instrument with 0,7, and 8 mm band lengths. After the development of the TLC plate using toluene: acetic acid (4:1, v/v), the curcuminoid was separated into three spots: curcumin, demethoxycurcumin, and bisdemethoxycurcumin. A one-way ANOVA was used to analyze the spot area and Rf of the three compounds, followed by a Duncan test. The difference in sample application techniques causes differences in the size and shape of the initial sample spot, which affects the compound spot produced after developing of TLC plate. This study showed that the differences in application techniques cause significant differences in the Rf of the compound spot, but do not show significant differences in the compound spot area. Based on this research, optimizing the application techniques of samples is a critical stage and it is essential to optimize how to apply the sample on TLC plate, including the concentration, volume, shape, and size of the spot on TLC.

Kromatografi Lapis Tipis (KLT) adalah salah satu teknik kromatografi yang paling umum digunakan untuk mengidentifikasi senyawa dalam campuran dan menentukan kemurnian suatu senyawa. Namun, faktor krusial yang sulit dikontrol dan dapat mempengaruhi keakuratan hasil adalah tahap aplikasi sampel. Penelitian ini difokuskan untuk menyelidiki pengaruh teknik aplikasi sampel yang berbeda (manual dan semi-otomatis) terhadap luas area dan faktor retensi (Rf) spot

senyawa. Kurkuminoid digunakan sebagai sampel dalam penelitian ini. Teknik aplikasi sampel secara manual menggunakan tabung kapiler 2 μ L. Teknik aplikasi sampel semi-otomatis menggunakan instrumen Camag Linomat-5 dengan panjang pita 0, 7, dan 8 mm. Setelah pengembangan plat KLT menggunakan toluena: asam asetat (4: 1, v/v), kurkuminoid dipisahkan menjadi tiga bercak: kurkumin, demetoksikurkumin, dan bisdemetoksikurkumin. ANOVA satu arah digunakan untuk menganalisis area bercak dan Rf dari ketiga senyawa tersebut, diikuti dengan uji Duncan. Perbedaan teknik aplikasi sampel menyebabkan perbedaan ukuran dan bentuk bercak sampel awal yang mempengaruhi bercak senyawa yang dihasilkan setelah pengembangan plat KLT. Berdasarkan penelitian ini dapat diketahui bahwa proses pengaplikasian atau penotolan sampel menjadi tahapan penting untuk dilakukan optimasi cara pengaplikasian sampel meliputi konsentrasi atau volume penotolan serta bentuk dan ukuran spot noda penotolan sampel, saat analisis menggunakan metode KLT.

PENDAHULUAN

Komposisi kimia suatu tanaman obat sangat kompleks dengan adanya berbagai macam komponen kimia. Hal ini dipengaruhi oleh berbagai faktor seperti kondisi pertumbuhan dan penyimpanan, komposisi genetik, komponen tanah, waktu panen, metode pengolahan, dan lain-lain (Sevior&Ahokas, 2017). Adanya senyawa multikomponen pada obat dari bahan alam mengakibatkan pentingnya dilakukan pengujian kontrol kualitas untuk memastikan senyawa yang terkandung di dalamnya (Kusumawati, 2021).

Berbagai macam pendekatan untuk tujuan analisis telah dikembangkan, salah satunya yaitu penggunaan Kromatografi Lapis Tipis (KLT). KLT merupakan salah satu teknik kromatografi yang paling umum digunakan untuk mengidentifikasi senyawa dalam campuran maupun menentukan kemurnian suatu senyawa (Arundita et al., 2020; Boulgakov et al., 2020). Analisis ini menggunakan plat KLT yang dilapisi oleh lapisan tipis adsorbent seperti silica gel, aluminum oxide, atau selulosa. Lapisan tipis ini disebut sebagai fase diam (Cid-Hernández et al., 2018). Metode ini telah banyak dikembangkan dalam proses karakterisasi dan kontrol kualitas sediaan farmasi maupun obat herbal (Chen et al., 2021). Hal ini dikarenakan metode KLT memiliki keunggulan meliputi metode yang cepat, sederhana dan murah untuk identifikasi obat-obatan maupun obat herbal dan memiliki beberapa keunggulan dalam hal biaya yang murah, preparasi sampel mudah dan minimal, serta mampu digunakan dalam perbandingan profil sampel secara paralel (Łata et al., 2020).

Prinsip proses pemisahan pada analisis KLT yaitu distribusi dari senyawa analit berdasarkan tingkat polaritas dan afinitasnya

terhadap fase diam dan fase gerak (Coskun, 2016). KLT bekerja berdasarkan prinsip bahwa kapasitas adsorpsi setiap komponen dalam campuran untuk adsorben (fase diam) yang sama dapat menghasilkan hasil yang berbeda. Metode analisis ini didasari oleh senyawa yang mampu dipisahkan dengan adanya bahan adsorpsi pada permukaan plat KLT sebagai fase diam dengan eluen sebagai fase gerak. Pemanfaatan kapasitas adsorpsi yang berbeda dari setiap senyawa terhadap fase diam, proses adsorpsi dan desorpsi yang berkelanjutan dapat dihasilkan selama proses elusi fase gerak untuk mencapai pemisahan komponen yang berbeda dari suatu analit (Wang et al., 2021).

Visualisasi analisis menggunakan KLT dilakukan di bawah sinar UV atau dengan menggunakan reagen derivatisasi. Analisis menggunakan KLT dapat dilanjutkan menggunakan densitometri. Densitometri merupakan suatu teknik yang digunakan untuk mengukur densitas suatu zat yang ada pada setiap spot yang terpisah pada plat KLT. Prinsip pengukuran menggunakan densitometri berdasarkan teori *Kulbeka-munk*, yang menunjukkan hubungan antara remisi yang terukur dan jumlah sampel pada plat KLT (Spangenberg, 2023). Dengan demikian, KLT banyak digunakan dalam analisis sediaan farmasi maupun obat herbal.

Pada prosesnya, faktor utama yang sulit dikontrol pada saat analisis menggunakan KLT yang dapat mempengaruhi ketepatan hasil salah satunya yaitu pada tahap pengaplikasian atau penotolan sampel (Bansal et al., 2014). Sampel yang digunakan untuk analisis diaplikasikan dengan menotolkan sampel pada bagian atas permukaan plat KLT. Proses penotolan sampel pada plat KLT umumnya dilakukan secara

manual menggunakan pipa kapiler dengan berbagai macam ukuran volume. Namun, penotolan secara manual ini memiliki beberapa kekurangan, diantaranya adalah ukuran diameter noda spot yang terbentuk tidak dapat dikontrol dalam ukuran yang sama ketika akan melakukan beberapa seri penotolan sampel. Semakin lebar diameter spot noda yang terbentuk dapat menyebabkan spot noda hasil eluasi menjadi *tailing*, selain itu juga dapat berpotensi tercampur dengan spot noda lain apabila jarak antar penotolan terlalu dekat (Xu, Zhang & Mo, 2022).

Hasil analisis menggunakan metode KLT ditinjau dari 2 faktor utama, meliputi faktor retensi suatu senyawa (Rf) dan juga luas area dari noda yang terbentuk. Rf menunjukkan pergerakan suatu noda dari sampel yang diaplikasikan pada KLT. Nilai ini berupa rasio yang mewakili jarak relatif yang ditempuh suatu noda dibandingkan dengan jarak total (Valle et al., 2016). Parameter kedua yaitu luas area noda yang ditentukan menggunakan densitometer. Luas arena suatu noda pada KLT akan menunjukkan konsentrasi dari masing - masing senyawa (Susanti et al., 2018). Proses penotolan sampel pada KLT dapat berpengaruh pada kedua parameter tersebut.

Saat ini proses penotolan KLT telah banyak dilakukan secara semi-otomatis menggunakan instrumen. Proses penotolan sampel dilakukan menggunakan syringe khusus yang digerakkan menggunakan bantuan gas seperti nitrogen atau udara sehingga volume penotolan sampel dapat diukur secara kuantitatif dan akurat (Reich & Ph, 2014). Untuk mendapatkan hasil yang valid pada proses analisis menggunakan KLT, penotolan sampel merupakan langkah yang sangat penting. Dengan demikian, penotolan sampel untuk analisis KLT perlu diperhatikan.

Pada penelitian ini, dilakukan penelitian mengenai pengaruh penotolan sampel yang berbeda (manual dan semi-otomatis) terhadap hasil luas area dan Rf yang dihasilkan. Proses penotolan secara manual dilakukan menggunakan pipa kapiler dengan ukuran volume 2 μ L dan proses penotolan semi-otomatis dilakukan menggunakan instrumen Camag Linomat-5 dengan kondisi *band length* atau lebar pita (0, 7, dan 8) mm.

METODE

Desain, tempat dan waktu

Jenis penelitian yang dilakukan merupakan penelitian eksperimental. Adapun penelitian yang dilakukan meliputi preparasi standar curcuminoid yang kemudian dilakukan

penotolan pada plat KLT secara manual dan semi-otomatis. Hasil dari penelitian ditinjau melalui nilai Rf dan luas area. Penelitian dilakukan di laboratorium Farmakognosi dan Fitokimia, Fakultas Farmasi, Universitas Airlangg. Penelitian dilakukan pada bulan Januari 2024.

Bahan

Pada penelitian ini, bahan yang digunakan yaitu standar curcuminoid, plat silica gel (NP, 60 GF254, Merck, 20x10 cm), toluena p.a (Merck) dan asam asetat p.a (Merck).

Alat

Pada penelitian ini, alat yang diperlukan adalah: TLC Silica Gel 60 F 254 Merck, Moisture Balance, Sonicator Bransonic 3510, Camag Developer Chamber, Camag TLC Scanner, Linomat-5 pipa kapiler 2 μ L, Wincats versi 1436336, Camag TLC Visualizer, Shimadzu Balance, Microsoft Excel.

Preparasi Standard

Sejumlah 25,0 mg standard curcuminoid dimasukkan dalam labu ukur 100,0mL kemudian ditambahkan etanol p.a hingga tepat tanda, sehingga diperoleh konsentrasi standard 250ppm (*European Pharmacopoeia*).

Kondisi Kromatografi

2,0 μ L curcuminoid dengan 5 kali replikasi ditotolkan pada plat silica gel (NP, 60 GF254, Merck, 20x10 cm) menggunakan dua cara (manual dan semi-otomatis). Penotolan manual dilakukan menggunakan pipa kapiler sedangkan penotolan semi-otomatis menggunakan instrumen (Camag TLC Linomat 5). Aplikasi WinCats digunakan untuk mengatur kondisi kromatografi, meliputi jarak dari tepi bawah plat 10mm dan jarak dari tepi kanan dan kiri plat 15 mm. Eluen yang digunakan adalah campuran toluena dan asam asetat (4:1, v/v). Visualisasi plat hasil eluasi dilakukan pada lampu putih (white lamp), UV 254 nm, dan UV 366nm. Selanjutnya dilakukan scanning kromatogram menggunakan Camag TLC-Scanner pada panjang gelombang 425nm dengan kondisi slit width (10mm x 0,40mm) dan scanning speed (100mm/s).

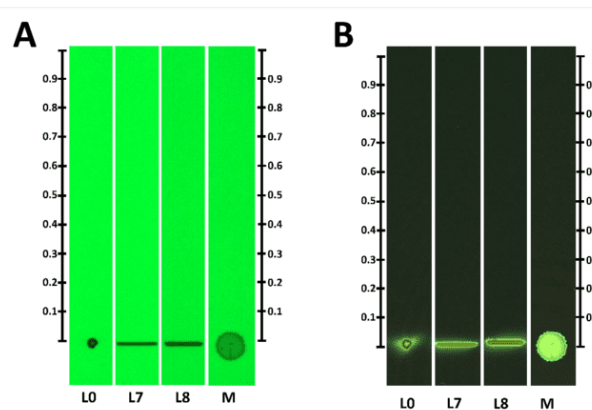
Pengaplikasian Sampel

Curcuminoid dengan volume 2 μ L diaplikasikan pada plat KLT dengan kondisi sebagai berikut (**Gambar 1**) :

1. L0: Semi-automatic (linomat-5) dengan *band length* 0 mm
2. L7: Semi-automatic (linomat-5) dengan *band length* 7 mm

3. L8: Semi-automatic (linomat-5) dengan *band length* 8 mm

4. M: Manual (Pipa Kapiler)



Gambar 1. hasil visualisasi plat KLT sebelum eluasi (A: UV 254nm dan B: UV 366nm) dengan cara penotolan (L0: Linomat *band length* 0mm; L7: Linomat *band length* 7mm; L8: Linomat *band length* 8mm; M: Manual pipa kapiler)

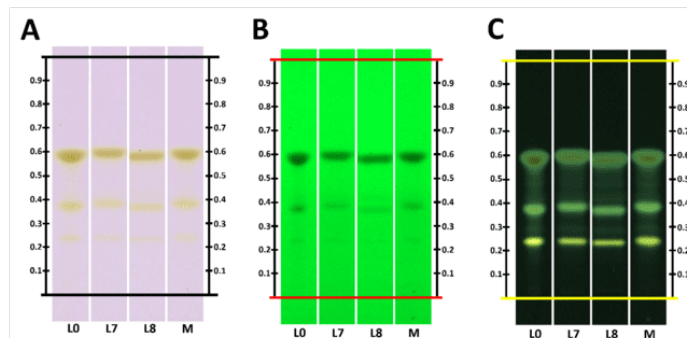
Pengolahan dan analisis data

Pada penelitian ini menggunakan data kualitatif dan kuantitatif. Bentuk noda serta kromatogram yang diperoleh dianalisis secara kualitatif melalui pengamatan secara visual. Evaluasi pengaruh metode penotolan dan bentuk noda yang dihasilkan terhadap nilai R_f dan luas area dianalisis dengan menggunakan GraphPad PRISM 9.02 kemudian dilanjutkan dengan analisis statistika *one way Analysis of*

Variance (ANOVA) dengan derajat kepercayaan 95% ($\alpha = 0.05\%$). Selanjutnya, dilakukan uji *posthoc* dengan menggunakan Tukey HSD untuk menentukan kelompok yang memiliki perbedaan secara signifikan. Perbedaan signifikan diamati berdasarkan nilai signifikansi (p), apabila nilai signifikansi $p < 0,05$, maka dapat disimpulkan bahwa terdapat pengaruh yang bermakna

HASIL

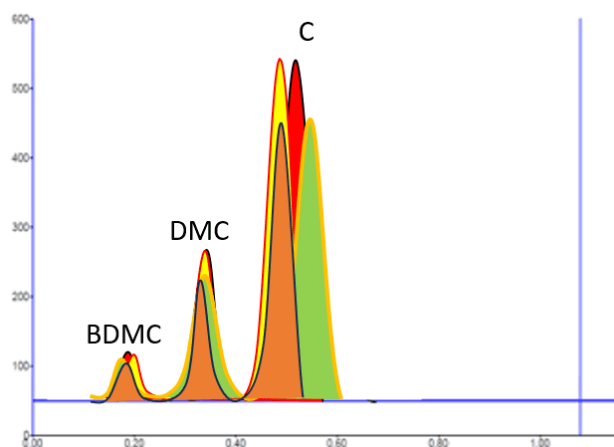
Plat KLT dengan berbagai cara penotolan yang telah dieluasi selanjutnya dilakukan visualisasi di bawah lampu putih (*white lamp*) dan UV pada panjang gelombang 254 nm dan 366 nm ditunjukkan oleh **Gambar 2.**



Gambar 2. hasil visualisasi plat KLT setelah eluasi (A: white lamp; B: UV 254nm; C: UV 366nm) dengan cara penotolan (L0: Linomat *band length* 0mm; L7: Linomat *band length* 7mm; L8: Linomat *band length* 8mm; M: Manual pipa kapiler)

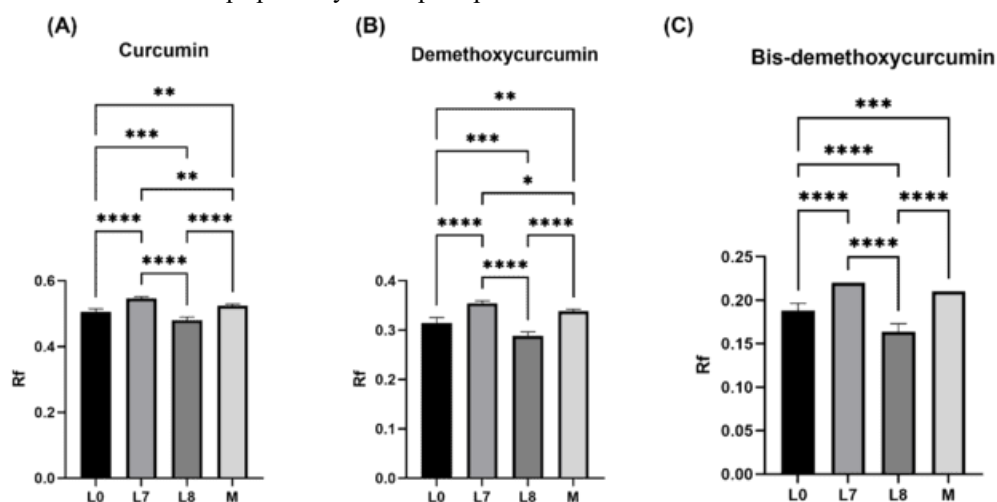
Berdasarkan **Gambar 2** hasil pemisahan plat KLT yang menunjukkan bahwa standard curcuminoid terpisah menjadi 3 spot noda yang berbeda. Masing – masing spot noda tersebut mewakili senyawa yang berbeda – beda. Terbentuknya spot yang terpisah tersebut dikarenakan perbedaan afinitas senyawa terhadap fase diam yaitu silika gel pada plat KLT serta fase gerak.

Selanjutnya dilakukan *scan* kromatogram dengan Camag TLC-Scanner pada panjang gelombang 425nm yang merupakan panjang gelombang maksimum senyawa curcuminoid. Diperoleh hasil kromatogram seperti yang ditunjukkan pada **Gambar 3.**



Gambar 3. Kromatogram *Overlay* standard dari masing masing senyawa (C: *curcumin*; DMC: *demethoxycurcumin*; BDMC: *bis-demethoxycurcumin*) dengan berbagai macam cara penotolan meliputi, (peak warna jingga) Linomat *band length* 0mm; (peak warna hijau) Linomat *band length* 7mm; (peak warna kuning) Linomat *band length* 8mm; dan (peak warna merah): Manual pipa kapiler)

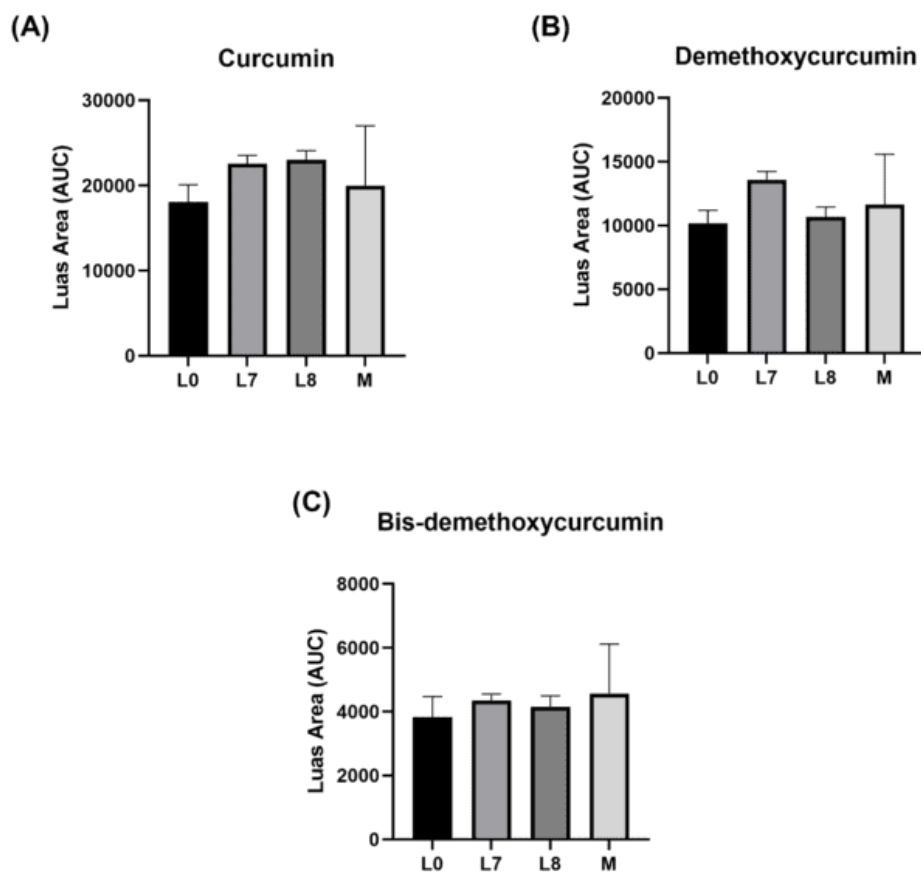
Parameter selanjutnya ditinjau berdasarkan nilai Rf. Berdasarkan hasil scan kromatogram tersebut dapat diketahui data Rf tiap spot senyawa seperti pada **Gambar 4**.



Gambar 4. Perbandingan nilai Rf dari masing masing senyawa, (A) *Curcumin*; (B) *Demethoxycurcumin*, (C) *Bis-demethoxycurcumin* dari masing masing metode penotolan sampel pada plat KLT. * $p < 0.5$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$

Berdasarkan nilai Rf masing – masing senyawa diperoleh bahwa terdapat perbedaan yang signifikan antar masing – masing penotolan. Hal ini menunjukkan bahwa metode penotolan yang berbeda menghasilkan bentuk noda yang berbeda, sehingga migrasi masing masing noda akan mengalami perbedaan.

Parameter selanjutnya ditinjau dari nilai luas area dari masing – masing noda yang ditunjukkan **Gambar 5**. Berdasarkan hasil tersebut tidak terdapat perbedaan yang bermakna dari nilai luas area masing – masing senyawa dikarenakan perbedaan metode penotolan. Hal ini menunjukkan bahwa luas area dari masing – masing senyawa tidak dipengaruhi oleh metode penotolan dan bentuk noda, namun hanya dipengaruhi oleh konsentrasi dari senyawa tersebut.



Gambar 5. Perbandingan luas area puncak dari masing masing senyawa, (A) *Curcumin*; (B) *Demethoxycurcumin*, (C) *Bis-demethoxycurcumin* dari masing masing metode penotolan sampel pada plat KLT. * $p < 0,5$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, **** $p < 0,0001$

PEMBAHASAN

Analisis menggunakan metode KLT - Densitometri merupakan metode analisis yang valid yang dapat digunakan untuk menentukan konsentrasi bahan aktif dalam suatu produk farmasi (Ramadhani et al., 2023). Dalam penggunaannya, banyak faktor yang perlu diperhatikan seperti metode penotolan sampel pada plat KLT. Penelitian ini dilakukan dengan membandingkan metode penotolan meliputi *automatic sample application* Linomat dengan *Band length* 0 mm, 7 mm, dan 8 mm, serta penotolan manual menggunakan pipa kapiler. Hasil pemisahan menunjukkan bahwa meskipun volume penotolan sama tetapi cara penotolan beda akan mempengaruhi bentuk spot noda yang terbentuk.

Setelah proses pemisahan selesai, senyawa akan muncul sebagai noda yang terpisah secara vertikal. Masing – masing noda yang terbentuk menunjukkan senyawa yang berbeda. Senyawa-senyawa ini dapat diidentifikasi dengan membandingkan pola migrasi masing masing senyawa dengan senyawa standar yang diketahui, baik melalui

metode visualisasi langsung maupun dengan menggunakan detektor khusus (Lade et al., 2014).

Analisis dilanjutkan menggunakan instrumen densitometri yang bertujuan untuk menentukan nilai Rf dan luas area dari masing masing spot noda senyawa yang dihasilkan. Pada penelitian ini, penotolan standard *curcuminoid* menghasilkan 3 spot noda yang terpisah mewakili senyawa *curcumin*, *demethoxycurcumin*, dan *bis-demethoxycurcumin* (Huang et al., 2020). Masing – masing noda memiliki nilai Rf yang berbeda. Nilai Rf tersebut menunjukkan jarak migrasi suatu senyawa terhadap total jarak pelarut. Parameter ini digunakan untuk membandingkan dan membantu mengidentifikasi senyawa (Jelena Trifkovic, Filip Andric, Dusanka Milojkovic-Opsenica, 2023).

Berdasarkan penelitian ini, adanya perbedaan cara penotolan mampu mempengaruhi nilai Rf yang dihasilkan dari masing – masing senyawa. Hal ini berkaitan dengan bentuk awal dari noda yang terbentuk baik berupa lingkaran

maupun pita dengan panjang tertentu. Bentuk ini akan mempengaruhi posisi spot noda hasil eluasi yang diaplikasikan pada plat KLT. Semakin tebal suatu noda dapat memperlambat noda yang terbawa fase gerak untuk bergerak vertikal keatas. Akibatnya, noda akan memberikan nilai Rf yang berbeda dengan perbedaan bentuk sampel yang ditotolkan. Karena Rf merupakan salah satu faktor yang penting dalam analisis KLT-Densitometri, maka faktor ini penting untuk diperhatikan (Sabriu-Haxhijaha, Popovska & Mustafa, 2020; Xu, Zhang & Mo, 2022). Dengan demikian, untuk memperoleh pemisahan suatu sampel yang baik dengan nilai Rf sesuai dengan nilai yang dipersyaratkan, perlu dilakukan optimasi proses penotolan sampel pada plat KLT.

Akan tetapi, metode penotolan sampel tidak berpengaruh signifikan ke area yang terbentuk. Hal ini disebabkan karena luas area yg terbentuk hanya dipengaruhi oleh konsentrasi sehingga akan cenderung sama pada tiap penotolan dengan metode apapun. Dibuktikan dengan tidak ada perbedaan bermakna dari luas permukaan masing – masing senyawa dengan perbedaan penotolan yang digunakan. Namun dari **Gambar 5** dapat dilihat pada penotolan dengan teknik manual memberikan variasi area noda cukup besar (SD besar) walaupun perbedaan area tidak signifikan. Hal ini menunjukkan apabila melakukan analisis KLT menggunakan teknik penotolan manual diperlukan kehati-hatian pada proses penotolannya.

KESIMPULAN

Berdasarkan penelitian ini diketahui bahwa proses pengaplikasian atau penotolan sampel meliputi konsentrasi atau volume penotolan serta bentuk dan ukuran spot noda saat penotolan sampel menjadi tahapan penting saat analisis menggunakan KLT.

SARAN

Perlu dilakukan optimasi cara pengaplikasian sampel meliputi konsentrasi atau volume penotolan serta bentuk dan ukuran spot noda saat penotolan sampel untuk mendapatkan pemisahan yang baik pada analisis menggunakan metode KLT.

UCAPAN TERIMA KASIH

Artikel ini didukung oleh pendanaan ARF 2023 (*Airlangga Research Fund*) dari Universitas Airlangga melalui skema penelitian dasar unggulan dengan nomor kontrak : 741/UN3.1.5/PT/2023

DAFTAR PUSTAKA

- Arundita, S., Kurniawan, F., Ismed, F., Rita, R. S., & Putra, D. P. (2020). In vitro alpha glucosidase activity of *uncaria gambir roxb.* And *syzygium polyanthum (wight)* walp. From West Sumatra, Indonesia. *Open Access Macedonian Journal of Medical Sciences*, 8(A), 810–817. <https://doi.org/10.3889/oamjms.2020.4298>
- Bansal, A., Chhabra, V., Rawal, R. K., & Sharma, S. (2014). Chemometrics: A new scenario in herbal drug standardization. *Journal of Pharmaceutical Analysis*, 4(4), 223–233. <https://doi.org/10.1016/j.jpha.2013.12.001>
- Boulgakov, A. A., Moor, S. R., Jo, H. H., Metola, P., Joyce, L. A., Marcotte, E. M., Welch, C. J., & Anslyn, E. V. (2020). Next-Generation TLC: A Quantitative Platform for Parallel Spotting and Imaging. *Journal of Organic Chemistry*, 85(15), 9447–9453. <https://doi.org/10.1021/acs.joc.0c00349>
- Chen, Y., Li, L., Xu, R., Li, F., Gu, L., Liu, H., Wang, Z., & Yang, L. (2021). Characterization of natural herbal medicines by thin-layer chromatography combined with laser ablation-assisted direct analysis in real-time mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 1654, 462461. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2021.462461>
- Cid-Hernández, M., Dellamary-Toral, F. A. L., González-Ortiz, L. J., Sánchez-Peña, M. J., & Pacheco-Moisés, F. P. (2018). Two-Dimensional Thin Layer Chromatography-Bioautography Designed to Separate and Locate Metabolites with Antioxidant Activity Contained on *Spirulina platensis*. *International Journal of Analytical Chemistry*, 2018. <https://doi.org/10.1155/2018/4605373>
- Coskun, O. (2016). Separation Tecniques: Chromatography. *Northern Clinics of Istanbul*, 3(2), 156–160. <https://doi.org/10.14744/nci.2016.32757>
- Huang, C., Lu, H. F., Chen, Y. H., Chen, J. C., Chou, W. H., & Huang, H. C. (2020). Curcumin, demethoxycurcumin, and bisdemethoxycurcumin induced caspase-dependent and -independent apoptosis via Smad or Akt signaling pathways in HOS cells. *BMC Complementary Medicine and Therapies*, 20(1), 68. <https://doi.org/10.1186/s12906-020-2857-1>
- Jelena Trifkovic, Filip Andric, Dusanka

- Milojkovic-Opsenica, P. R. (2023). Data Analysis tools in thin-layer chromatography. In *Instrumental Thin-Layer Chromatography*. <https://doi.org/10.1016/b978-0-323-99970-0.01001-2>
- Kusumawati, I. (2021). *A great Challenge on the Reproducibility of Therapeutic Results of Phytopharmaceuticals* (D. N. C. and K. Shah (ed.)). Scrivener Wiley.
- Lade, B. D., Patil, A. S., Paikrao, H. M., Kale, A. S., & Hire, K. K. (2014). A comprehensive working, principles and applications of thin layer chromatography. *Research Journal of Pharmaceutical, Biological and Chemical Sciences*, 5(4), 486–503.
- Łata, E., Fulczyk, A., Ott, P. G., Kowalska, T., Sajewicz, M., & Móricz, Á. M. (2020). Thin-layer chromatographic quantification of magnolol and honokiol in dietary supplements and selected biological properties of these preparations. *Journal of Chromatography A*, 1625. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2020.461230>
- Ramadhani, F. A., Kusumawati, I., Primaharinastiti, R., Rullyansyah, S., Sandhori, F. J., & Prasetyawan, H. R. (2023). Comparative Study of Densitometry and Videodensitometry for Quantitating the Active Pharmaceutical Ingredients Using Thin Layer Chromatography – Systematic Review. *Jurnal Farmasi Dan Ilmu Kefarmasian Indonesia*, 10(2), 141–150. <https://doi.org/10.20473/jfiki.v10i22023.141-150>
- Reich, E., & Ph, D. (2014). High-Performance Thin-Layer Chromatography for the Analysis of Medicinal Plants. *High-Performance Thin-Layer Chromatography for the Analysis of Medicinal Plants*. <https://doi.org/10.1055/b-002-66241>
- Sabriu-Haxhijaha, A., Popovska, O., & Mustafa, Z. (2020). Thin-layer chromatography analysis of Nigella Sativa L. Essential oil. *Journal of Hygienic Engineering and Design*, 31, 152–156.
- Sevior, D., & Ahokas, J. (2017). Interactions between conventional and herbal medicinal products. In *Toxicology of Herbal Products*. https://doi.org/10.1007/978-3-319-43806-1_5
- Spangenberg, B. (2023). Theory and instrumentation for in situ detection. In *Instrumental Thin-Layer Chromatography*. <https://doi.org/10.1016/b978-0-323-99970-0.01001-2>
- Susanti, M., Ibrahim, S., Harahap, Y., & Dachriyanus. (2018). Comparison between High Performance Thin Layer Chromatography and High Performance Liquid Chromatography methods for determination of rubraxanthone in the stem bark extract of *Garcinia cowa* Roxb. *Pharmacognosy Journal*, 10(6), S42–S47. <https://doi.org/10.5530/pj.2018.6s.8>
- Valle, D. L., Puzon, J. J. M., Cabrera, E. C., & Rivera, W. L. (2016). Thin Layer Chromatography-Bioautography and Gas Chromatography-Mass Spectrometry of Antimicrobial Leaf Extracts from Philippine Piper betle L. against Multidrug-Resistant Bacteria. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2016. <https://doi.org/10.1155/2016/4976791>
- Wang, M., Zhang, Y., Wang, R., Wang, Z., Yang, B., & Kuang, H. (2021). An Evolving Technology That Integrates Classical Methods Chromatography Bioautography. *Multidisciplinary Digital Publishing Institute (MDPI)*, 26, 1–21.
- Xu, H., Zhang, D., & Mo, F. (2022). High-throughput automated platform for thin layer chromatography analysis. *STAR Protocols*, 3(4), 101893. <https://doi.org/10.1016/j.xpro.2022.101893>



Open Access This article is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License, which permits use, sharing, adaptation, distribution, and reproduction in any medium or format, as long as you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons license, and indicate if

changes were made. The images or other third-party material in this article are included in the article's Creative Commons license unless indicated otherwise in a credit line to the material. If material is not included in the article's Creative Commons license and your intended use is not permitted by statutory regulation or exceeds the permitted use, you will need to obtain permission directly from the copyright holder. To view a copy of this license, visit <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>.