

Analisis Kandungan Residu Sulfametazin dalam Daging dan Hati Ayam secara Kromatografi Cair Kinerja Tinggi

ZUHELMI AZIZ^{1*}, YULVIAN SARI¹, RAPHAELA WIDIASTUTI²,
LYDIA SEPTA DESIYANA¹

¹Fakultas Farmasi Universitas Pancasila,
Srengseng Sawah, Jagakarsa, Jakarta Selatan, 12640

²Balai Penelitian Veteriner, Bogor

Diterima 5 Juli 2004, Disetujui 11 Agustus 2004

Abstract: Sulfamethazine is an antimicrobial and anticoccidiocis which usually used in poultry farm. The using of sulfamethazine to cattle has an accumulated residue effect on cattle products. An experiment of the decreasing motive of sulfamethazine residue concentration in chicken meat and liver has been carried out. One day old broiler chicken classified into 4 groups which are negative control, the positive control, the 7 days (7 days before the slaughtering day which on 36th day), and 5 days group (5 days before the slaughtering day which on 36th day). The last three groups are given sulfamethazine solution in oral 3 times a week with 0.2 ml/kg BW or 50 mg/kg BW dosage. After the giving of sulfamethazine stopped, each of those 4 groups slaughtered on 1st, 2nd, 3rd, 4th, 5th, 7th, 24th, 48th, 120th, 168th, 240th hour and then each of chicken meat and liver extracted and analyzed with high performance liquid chromatography (HPLC). The Sulfamethazine residue decreasing along with the increasing of time can be noticed from the experiment. In common, the decreasing of Sulfamethazine can be seen starting form 24th hour, then at 48th hour the sulfamethazine concentration stay at lower state and decrease along with the increasing of time.

Key words: Sulfamethazine, broiler chicken, HPLC

PENDAHULUAN

Ayam merupakan bahan pangan produk hewani yang banyak dikonsumsi masyarakat untuk memenuhi kebutuhan gizi. Ayam sangat digemari karena dapat diolah menjadi berbagai jenis masakan dan bergizi tinggi dengan harga yang relatif murah bila dibandingkan daging hewan lainnya. Salah satu usaha untuk meningkatkan produksi produk hewani adalah meningkatkan usaha peternakan.

Penggunaan obat-obatan dalam upaya pengembangan usaha peternakan ayam hampir tidak dapat dihindari, karena untuk mencapai usaha yang optimal maka kesehatan ternak harus selalu terjaga baik. Oleh karena itu ketersediaan obat hewan dan bibit unggul sangat diperlukan untuk memenuhi tuntutan produksi ternak yang tinggi⁽¹⁾.

Dalam beberapa tahun terakhir ini perhatian masyarakat terhadap keamanan pangan untuk menjamin kesehatannya sangat besar disebagian negara di dunia termasuk Indonesia. Salah satunya

adalah pengamatan terhadap kandungan residu bahan kimia dan obat-obatan dalam produk yang akan dikonsumsi karena dapat mempengaruhi kesehatan masyarakat. Kesadaran akan pentingnya pengawasan keamanan pangan didorong oleh perkembangan yang pesat dalam teknik pengujian seperti biokimia, toksikologi dan fisiologi, sehingga semakin banyak bahan kimia yang dapat dideteksi keberadaannya di dalam makanan termasuk di dalam daging dan hati ayam⁽²⁾.

Banyak penelitian yang telah dilakukan untuk mengetahui adanya residu obat-obatan di dalam daging dan hati ayam yang dijual di pasaran. Beberapa penelitian menyatakan bahwa daging dan hati ayam yang dijual di pasaran mengandung residu obat-obatan, termasuk sulfonamida tetapi masih dalam batas yang diizinkan.

Sulfonamida merupakan obat yang sering digunakan dalam peternakan untuk mengobati penyakit yang disebabkan oleh bakteri dan protozoa⁽³⁾. Salah satu sulfonamida yang banyak digunakan di peternakan adalah sulfametazin. Sulfametazin merupakan antimikroba yang sangat efektif dan mempunyai spektrum yang luas⁽⁴⁾.

* Penulis korespondensi, Hp.08161315784,
e-mail: zuheliiaziz@yahoo.com

Penggunaan sulfametazin dan sulfonamida lainnya dalam pengobatan penyakit hewan dapat menimbulkan residu pada jaringan untuk beberapa waktu setelah penggunaan. Sebuah penelitian yang dilakukan di Jawa Barat menggunakan sampel ayam pedaging siap potong dan dikumpulkan dari beberapa peternak ayam menunjukkan bahwa pada daging dan hati ayam tersebut ditemukan residu sulfametazin pada tingkat antara tidak terdeteksi (tt) - 0,286 $\mu\text{g/g}$ pada daging dan antara tt - 1,507 $\mu\text{g/g}$ pada hati⁽⁵⁾. Selain dosis penggunaan yang berlebihan, adanya residu dapat juga terjadi akibat tidak diperhatikannya waktu henti (*withdrawal time*) dari obat tersebut. Waktu henti adalah kurun waktu dari saat pemberian obat yang terakhir hingga ternak boleh dipotong atau produknya seperti susu dan telur boleh dikonsumsi. Setelah waktu henti terlampaui, diharapkan tidak diketemukan lagi residu obat atau residu telah berada dibawah nilai batas maksimum, sehingga produk tersebut dapat dikatakan aman untuk dikonsumsi^(1,5). Waktu henti tiap obat tidak sama, untuk sulfonamida (termasuk sulfametazin) waktu hentinya berkisar antara 5-15 hari^(6,7).

Bila residu sulfametazin dalam produk peternakan (daging, susu dan telur) dikonsumsi secara terus menerus oleh manusia dapat menimbulkan reaksi hipersensitif, anemia hemolitik akut dan kemungkinan menimbulkan kanker tiroid. Disamping itu bila produk peternakan tersebut dijadikan komoditas ekspor akan menimbulkan kesulitan untuk masuk ke pasar internasional mengingat peraturan-peraturan yang diterapkan pada masing-masing negara sangat ketat maka adanya residu akan menyebabkan produk tersebut tidak dapat diterima. Masalah residu sulfametazin mendapat perhatian yang serius dari pemerintah Kanada. Untuk melindungi konsumen dan menjamin penjualan produk daging maka *The Health Protection Branch of Health and Welfare Canada* menetapkan batas toleransi residu sulfametazin dalam jaringan hewan sebesar 110 ng/g. Sedangkan *Joint WHO/FAO Expert Committee on Food Additives* (JECFA) menyatakan bahwa batas maksimum residu sulfametazin dalam daging adalah 100 $\mu\text{g/kg}$ ⁽³⁾. Sementara itu batas maksimal residu sulfametazin yang diizinkan dalam pangan asal hewan di Indonesia lebih tinggi yang mencapai 0,2 mg/kg⁽⁸⁾. Namun demikian penggunaan obat-obat golongan sulfonamida di dunia kedokteran hewan masih dipertahankan karena mudah diaplikasikan melalui pakan dan air minum, harga yang relatif murah, dan efektif untuk mengobati beberapa penyakit hewan⁽⁵⁾.

Pada penelitian sebelumnya dilakukan penetapan

kadar residu sulfametazin dalam daging dan hati ayam pedaging yang beredar di pasaran secara KCKT⁽⁵⁾, sedangkan pada penelitian ini ayam diberikan sulfametazin dalam bentuk larutan secara oral, kemudian akan diamati pola penurunan kadar residu sulfametazin sehingga dapat diketahui waktu terbaik untuk melakukan panen ayam. Bagian yang diamati adalah daging dan hati ayam, hal ini dikarenakan organ tersebut umumnya dikonsumsi oleh masyarakat. Selain itu sulfametazin merupakan obat yang dimetabolisme di dalam hati. Residu sulfametazin diekstraksi dengan metode Hoori *et al.* dan kemudian dianalisis menggunakan KCKT⁽²⁰⁾.

BAHAN DAN METODE

BAHAN. Daging dan hati ayam, asetonitril p.a., asam trikloroasetat 1%, *n*-heksan p.a., asam trikloroasetat 1% dalam *n*-propanol, trietilamin 0,1%, asam asetat p.a., alumina, bahan baku sulfametazin dan metanol untuk KCKT.

METODE. Perlakuan terhadap ayam. Ayam yang digunakan dalam penelitian ini berjumlah 80 ekor yang berumur 1 hari yang dibeli secara komersial dari pembibitan ayam di Bogor, diadaptasi selama 10 hari. Kemudian ayam tersebut dibagi menjadi 4 kelompok. Kelompok A: kontrol negatif, berjumlah 10 ekor ayam. Kelompok ini tidak diberi larutan sulfametazin secara oral, melainkan hanya diberi aquades. Kelompok B: kontrol positif, berjumlah 10 ekor ayam. Kelompok ini diberi sulfametazin dalam bentuk larutan secara oral dengan dosis sesuai pertumbuhan berat rata-rata badan ayam setiap 3 x seminggu. Kelompok C: kelompok 7 hari, berjumlah 30 ekor ayam. Kelompok ini diberi sulfametazin dalam bentuk larutan secara oral dengan dosis sesuai pertumbuhan berat rata-rata badan ayam setiap 3 x seminggu. Pemberian sulfametazin dihentikan pada hari ke-29 yang merupakan 7 hari sebelum hari potong yang ditentukan yaitu 36 hari. Kemudian ayam dipotong pada saat 1, 2, 3, 5, 7, 24, 48, 72, 120, 168, 240 jam setelah penghentian pemberian larutan sulfametazin. Kelompok D: kelompok 5 hari, berjumlah 30 ekor ayam. Kelompok ini diberi sulfametazin dalam bentuk larutan secara oral dengan dosis sesuai pertumbuhan berat rata-rata badan ayam setiap 3 x seminggu. Pemberian sulfametazin dihentikan pada hari ke-31 yang merupakan 5 hari sebelum hari potong yang ditentukan yaitu 36 hari. Kemudian ayam dipotong pada saat 1, 2, 3, 5, 7, 24, 48, 72, 120, 168, 240 jam setelah penghentian pemberian sulfametazin. Setelah mendapat perlakuan seperti tersebut diatas, daging dan hati ayam dicacah sampai halus, kemudian ditimbang secara seksama

± 10 gram dan selanjutnya diekstraksi.

Ekstraksi bahan uji. Timbang seksama 10 gram sampel daging maupun hati yang telah dihomogenkan dengan cara dicacah, ditambahkan dengan 10 ml trikloroasetat 1% dan diekstraksi dengan 50 ml asetonitril, dikocok menggunakan alat pengocok (*electric shaker*) selama 20 menit. Saring dan pisahkan lapisan asetonitrilnya, ulangi tahap ekstraksi dengan 50 ml asetonitril. Filtrat asetonitril dipindahkan ke dalam corong pisah dan ditambah 20 ml heksan dan kocok kuat, buang lapisan heksan dan pisahkan fraksi asetonitrilnya, ulangi tahap penambahan 20 ml heksan. Selanjutnya fraksi asetonitril ditambahkan 10 ml asam trikloroasetat 1% dalam *n*-propanol dan dipekatkan hingga 1-2 ml. Hasil pemekatan dilarutkan dengan 10 ml asam trikloroasetat 1% dan dilalukan ke kolom berisi Al_2O_3 (panjang ± 10 cm) yang telah dibasahi dengan 5 ml asetonitril dan 10 ml air, kemudian bilas vial hasil pemekatan dengan 10 ml asam trikloroasetat 1% lagi dan lalukan ke dalam kolom, hasil tampungan dibuang. Residu di dalam kolom dibilas dengan 10 ml air dan air bilasan dibuang, kemudian residu di dalam kolom dilarutkan dengan 2 ml trietilamin 0,1% dan selanjutnya filtrat dikeringkan⁽²⁰⁾.

Uji kesesuaian sistem. Untuk uji kesesuaian dibuat larutan baku sulfametazin dengan konsentrasi 0,5 mg/μl. Kemudian sejumlah 20 μl larutan baku 0,5 mg/l disuntikkan dengan 5 x pengulangan ke dalam alat KCKT.

Uji linearitas. Satu seri larutan baku sulfametazin dibuat dengan konsentrasi 0,5; 0,2; 0,1; 0,05 mg/l. Lalu 20 μl dari masing – masing larutan disuntikkan ke dalam alat KCKT.

Penetapan batas deteksi. Satu seri larutan dibuat dengan konsentrasi 0,1; 0,05; 0,025; 0,02; 0,01 mg/l. Lalu 20 μl dari masing – masing larutan disuntikkan ke dalam alat KCKT.

Uji perolehan kembali. Sejumlah 5 gram sampel daging yang sudah dicacah ditambahkan 50 μl larutan baku sulfametazin 1 mg/l, lakukan ekstraksi seperti pada persiapan sampel. Hasil ekstraksi dilarutkan dalam 200 μl metanol kemudian disuntikkan ke dalam alat KCKT. Dilakukan juga uji blanko tanpa penambahan larutan baku.

Analisis residu Sulfametazin menggunakan KCKT. 1) pembuatan fase gerak. Sejumlah 110 ml asetonitril, lalu masukkan ke dalam labu beaker glass 500 ml. Kemudian tambahkan 390 ml air dan 2,5 ml asam asetat. 2) pembuatan larutan baku sulfametazin 0,5 mg/l. Sejumlah 10 mg baku sulfametazin dimasukkan kedalam labu tentukur 10-ml, larutkan dan encerkan dengan metanol hingga tanda (1000 mg/l). Kemudian dari larutan tersebut dibuat larutan

baku dengan konsentrasi 0,5 mg/l. 3) pembuatan larutan uji. Bahan uji yang telah dikeringkan dilarutkan dengan 200 μl metanol untuk dianalisis dengan KCKT. Suntikkan larutan uji dan larutan baku sulfametazin 0,5 mg/l ke dalam alat KCKT, dengan kondisi sebagai berikut: instrumentasi: KCKT Hitachi Corp. Jepang, kolom: μ-Bondapak C_{18} , detektor: ultraviolet, panjang gelombang: 268 nm, fase gerak: asetonitril:air:asam asetat (22:78:0,5), aliran: 1 ml/menit, volume injeksi: 20 μl. Perhitungan residu sulfametazin dalam zat uji menggunakan rumus:

$$\text{Kadar} \left(\frac{\mu\text{g}}{\text{g}} \right) = \frac{A_u \times C_{BP} \times V}{A_{BP} \times B}$$

Keterangan: A_u = luas puncak zat uji, A_{BP} = luas puncak baku, C_{BP} = konsentrasi larutan baku (μg/ml), V = volume akhir (ml), B = bobot (g).

HASIL DAN PEMBAHASAN

Dari hasil uji kesesuaian sistem, diperoleh nilai simpangan baku relatif 1,4433%. Nilai tersebut menunjukkan bahwa sistem pengujian memenuhi persyaratan (d^* 2,00%) dan mempunyai tingkat keakuratan (presisi) yang baik untuk digunakan (Tabel 1). Dari hasil analisis uji linearitas (Tabel 2), diperoleh nilai r untuk larutan baku sulfametazin sebesar 0,9997. Nilai r tersebut menunjukkan nilai yang ideal karena mendekati 1, sehingga koefisien korelasi antara konsentrasi larutan dengan luas puncak yang terdeteksi oleh KCKT adalah baik dan dapat digunakan untuk penelitian. Hasil penetapan batas deteksi diperoleh batas deteksi KCKT yang digunakan adalah 0,02 mg/l dalam 20 μl larutan yang disuntikkan ke alat KCKT atau setara dengan 0,4 ng. (Tabel 3). Alat KCKT dapat digunakan untuk menetapkan kandungan residu sulfametazin. Dari

Tabel 1. Uji kesesuaian sistem

No.	RT (menit)	Luas Puncak
1.	7,01	97960
2.	6,99	98952
3.	6,95	101840
4.	6,96	99799
5.	6,92	99285
Rata-rata	=	99567,20
Simpangan baku	=	1437,0587
Simpangan baku relatif	=	1,4433 %

Tabel 2. Uji linearitas larutan baku sulfametazin

No.	Konsentrasi (mg/l)	RT (menit)	Luas Puncak
1.	0,05	6,91	12920
2.	0,10	6,90	23265
3.	0,20	6,90	43137
4.	0,50	6,89	92982
5.	1,00	6,91	186312

Tabel 3. Penetapan batas deteksi untuk alat KCKT

No.	Konsentrasi (mg/l)	t _R (menit)	Luas Puncak
1.	0,10	6,90	23265
2.	0,05	6,91	12920
3.	0,025	6,89	9435
4.	0,02	6,94	5713
5.	0,01	-	Tidak terdeteksi

Tabel 4. Pertambahan berat rata-rata badan ayam

No.	Hari perlakuan	Berat rata-rata badan ayam (gram)			
		Kontrol -	Kontrol +	Kel. 7 hari	Kel. 5 hari
1.	10	244	232	214	254
2.	12	330	250	270	300
3.	14	392	320	392	364
4.	17	532	362	424	456
5.	19	576	452	494	524
6.	21	750	564	596	642
7.	24	910	716	734	780
8.	26	1000	804	822	874
9.	27	1052,5	834	838	894
10.	28	1130	914	904	924
11.	29	1165	926	984	974
12.	30	-	-	-	1020

Tabel 5. Kandungan residu sulfametazin pada kelompok kontrol

No	Kelompok	Kadar residu sulfametazin (ng/g)	
		Daging	Hati
1.	Kontrol -	1,9849	1,0838
2.	Kontrol +	1	18,5708
		2	1,4094
		3	0,6996
		5,6476	

hasil uji perolehan kembali didapat nilai rata-rata uji perolehan kembali sebesar 91,7033 %.

Pemberian larutan sulfametazin secara oral tidak mempengaruhi pertambahan berat badan ayam (Tabel 4). Ayam tumbuh secara normal dengan berat badan yang cenderung meningkat dari waktu ke waktu. Dari hasil penelitian ini dapat dilihat bahwa residu sulfametazin terdeteksi dalam daging dan hati ayam dari seluruh kelompok. Parameter untuk identifikasi residu adalah waktu tambat, waktu tambat sampel dibandingkan dengan waktu tambat larutan baku sulfametazin dalam toleransi tertentu.

Residu sulfametazin mulai terdeposit di dalam jaringan tubuh ayam sejak minggu pertama pemberian. Masuknya sulfametazin ke dalam tubuh ayam selain berasal dari larutan obat yang diberikan kemungkinan dapat juga berasal dari pakan yang diberikan kepada ayam tersebut. Hal ini terbukti dengan ditemukannya residu pada kelompok kontrol negatif (Tabel 5).

Pola penurunan kadar residu sulfametazin pada kelompok 7 hari dapat dilihat kadar residu mengalami penurunan mulai jam ke-3 (dalam daging) dan jam ke-2 (dalam hati). Sedangkan pada kelompok 5 hari kadar residu sulfametazin mengalami penurunan mulai jam ke-7 (dalam daging) dan jam ke-24 (dalam hati) (Tabel 6). Secara umum dapat disimpulkan bahwa sulfametazin diekskresikan dari tubuh ayam mulai 24 jam setelah pemberian terakhir larutan sulfametazin secara oral. Pada jam ke-48 (hari ke-2) setelah pemberian terakhir kadar residu Sulfametazin berada pada tingkat yang lebih rendah dan terus menurun dengan bertambahnya waktu. Akan tetapi pada beberapa waktu terjadi peningkatan kadar residu sulfametazin dalam jumlah yang relatif kecil. Hal ini kemungkinan dapat disebabkan karena adanya sulfametazin dalam pakan yang dikonsumsi, variasi proses biologis dalam tubuh ayam, dan juga dapat disebabkan oleh faktor lingkungan.

Waktu henti menjadi sangat penting karena merupakan kurun waktu dari saat pemberian obat yang terakhir hingga ternak boleh dipotong atau produknya seperti daging, susu dan telur boleh dikonsumsi. Setelah waktu henti terlampaui, diharapkan tidak ditemukan lagi residu obat atau residu telah berada dibawah nilai batas maksimal residu, sehingga produk ternak tersebut dapat dinyatakan aman untuk dikonsumsi. Adanya residu dalam produk ternak akan menyebabkan turunnya tingkat kesehatan masyarakat karena dapat menyebabkan resistensi, alergi atau keracunan. Untuk sulfametazin dapat disimpulkan bahwa waktu hentinya adalah 5-7 hari (120-168 jam). Kesimpulan ini didukung oleh teori yang menyatakan bahwa

Tabel 6. Kadar residu sulfametazin kelompok 7 hari dan 5 hari sebelum hari potong yang ditentukan (36 hari)

Waktu (jam)	Kadar Residu Sulfametazin (ng/g)			
	Kelompok 7 Hari		Kelompok 5 Hari	
	Daging	Hati	Daging	Hati
1	4,3428	11,4245	4,2566	16,6194
2	8,6884	5,4330	1,9240	13,0300
3	8,0833	4,1591	7,4083	12,1502
5	Tt	4,5001	16,3794	13,8990
7	Tt	3,3439	8,0134	19,2609
24	Tt	0,6191	Tt	15,7414
48	Tt	1,5289	Tt	8,5330
72	1,0129	2,3737	0,6857	2,4101
120	1,6549	3,4098	Tt	2,2882
168	Tt	2,3695	0,7932	1,7679
180	Tt	Tt	3,9082	Tt

Keterangan : Tt = tidak terdeteksi

residu sulfonamida tidak lagi ditemukan 5-15 hari setelah pemberian terakhir dan untuk hewan yang mengkonsumsi sulfametazin daging dan hatinya boleh dikonsumsi manusia 5 hari setelah pemberian terakhir larutan sulfametazin^(7,16).

SIMPULAN

Daging dan hati ayam yang berasal dari ayam yang diberikan larutan sulfametazin secara oral 3 x seminggu mengandung residu sulfametazin dan residu tersebut cenderung menurun seiring dengan bertambahnya waktu. Dari hasil percobaan dapat disimpulkan waktu henti (*withdrawal time*) dari sulfametazin adalah 5-7 hari setelah pemberian larutan sulfametazin secara oral terakhir, dimana pada waktu tersebut kadar residu sulfametazin sudah berada di bawah batas minimal residu sehingga dapat dinyatakan aman untuk dikonsumsi. Untuk menghindari adanya residu di dalam daging dan hati ayam sebaiknya peternak melakukan pemotongan ayam minimal 5 hari setelah pemberian terakhir larutan sulfametazin secara oral.

DAFTAR PUSTAKA

- Murdiati TB. Pemakaian antibiotika dalam usaha peternakan. *Wartazoa*. 1997;6(1):18-22.
- Kajian dan desain sistem monitoring dan keamanan pangan nasional produk pertanian segar. diambil dari: http://www.agrimutu.com/ak/pengawasan_residu.htm. diakses 11 September, 2002.
- Committee for veterinary medicinal product. diambil dari: <http://www.emea.eu.int/pdfs/vet/mrls/002695enpdf>. diakses: 11 September, 2002.
- Boison J and Lily Ken. Determination of sulfamethazine in bovine and porcine tissue by reverse-phase liquid chromatography in journal of AOAC International 1994;77(3).
- Widiastuti R dan Murdiati TB. Residu sulfonamida pada daging dan hati ayam pedaging di Jawa Barat dalam Prosiding Kongres Himpunan Toksikologi Indonesia, Jakarta. 1999. hal. 2-79.
- Lloyd WE and Mercen HD. Toxicity of antibiotics and sulfonamide uses in veterinary medicine in CRC handbook series. In: JH steel and GW Beran, editors. Zoonoses, section d: sulfonamides and public health. Florida: CRC Press Inc; 1984.
- Subronto dan Tjahajati I. Ilmu penyakit ternak II. Yogyakarta: UGM Press; 2001. hal. 267.
- Standar Nasional Indonesia No. 01-6366-2000. Batas maksimum cemaran mikroba dan batas maksimum residu dalam bahan makanan asal hewan. Jakarta: Dewan Nasional Indonesia; 2003. hal. 5-12.
- Ditjen Peternakan. Petunjuk teknis peningkatan usaha ayam pedaging. Jakarta: Direktorat Jendral Peternakan; 1985.
- Budidaya ayam ras pedaging. diambil dari: http://www.ristek.go.id/cd_room/ayam_ras.htm. diakses 11 September, 2004.
- Departemen Kesehatan Republik Indonesia. Farmakope Indonesia. Edisi IV. Jakarta: Direktorat Jendral Pengawasan Obat dan Makanan; 1995. hal. 1009-1017.
- Klein RA. Bacterial drugs. In: Philipson AT, Hall LW, Pritchard WR. Scientific foundation of veterinary medicine. London: William Heinemann Medical

- Books Limiter. p. 163-183.
13. Mann J M, James, Crabbe C. Bacteria and antibacterial agents. USA: Spectrum. p. 1-8.
 14. Booth NH. Toxicology of drug and chemical residue. In: Booth NH and McDonald LE. Veterinary pharmacology and therapeutic 5th Edition. Iowa: Iowa State University Press Ames; 1988. p. 1065-1110.
 15. McDougald LR and Reid WN. Coccidiocis. In: Calnek BW, Barnes HJ, Beard CW, McDougald LR, Saif YM. Diseases in poultry 10th Edition. Iowa: Iowa State University Press; 1997. p. 865-883.
 16. Dep Pertanian RI. Indeks Obat Hewan Indonesia Edisi IV. Direktorat Jendral Produksi Peternakan Departemen Pertanian RI; 2000. hal. 47.
 17. Gritter RJ, Bobbit JM, Schwarting AE. Pengantar kromatografi. Edisi ke-2. Bandung: ITB; 1991. hal. 186-239.
 18. Snyder LR, Kirkland JJ, Glajh JL. Practical hplc method development. 2nd edition. New York: John Willey and Son; 1981. p. 696-706.
 19. Codex Alimentarius. Residues of veterinary drugs in foods. 2nd ed. Italy: Food and Agriculture Organization of the United Nations; 1993.
 20. Horii S, Momm C, Miyohara K, Maruyama T and Matsumoto M. Liquid chromatographic determination of three sulfonamides in animal tissue and egg. *J Assoc of Anal Chem.* 1990;73:990-993.