

Pengembangan Metode Analisis Asam Format dan Asam Laktat sebagai Pengatur Keasaman pada Pakan Ternak Menggunakan Metode Kromatografi Cair Kinerja Tinggi

Analysis Method Development of Formic Acid dan Lactic Acid as Acidifier in Animal Fed Using High Performance Liquid Chromatography

Ninis Kurnia Asih¹, Harmita¹, Baitha Palanggatan Maggadani^{1*}

¹Fakultas Farmasi, Universitas Indonesia, Depok 16424, Indonesia

Email : baitha.p@farmasi.ui.ac.id; *corresponding author

Abstrak

Analisis kuantitatif asam organik dalam produk *acidifier* diperlukan untuk menjaga efektivitas produk dalam menekan pertumbuhan mikroba dan menurunkan pH pakan serta saluran cerna. Pada penelitian ini dilakukan penetapan kadar asam organik dalam dua sediaan *acidifier* yang terdapat di pasaran. Analisis dilakukan menggunakan Kromatografi Cair Kinerja Tinggi (KCKT) fase terbalik dengan kolom LiChrospher® 100 RP-18 (5µm, Merck) dengan panjang kolom 250x4,0 mm dan fase gerak dapar kalium dihidrogenfosfat 50 mM-TEA 0,5% pH 4,00 pada laju alir 0,6 mL/menit. Panjang gelombang yang digunakan pada analisis adalah 214 nm. Validasi metode analisis memberikan hasil UPK asam format sebesar 98,02%-101,97% dan 97,09%-102,78% untuk asam laktat, KV <0,59% untuk asam format dan KV <1,28% untuk asam laktat, LOD sebesar 63,05 µg/mL untuk asam format dan LOD sebesar 4,55 µg/mL untuk asam laktat, LOQ sebesar 210,16 µg/mL untuk asam format dan LOD sebesar 15,18 µg/mL untuk asam laktat. Metode analisis linear pada rentang 439,2 µg/mL-1764,61 µg/mL untuk asam format dengan nilai koefisien korelasi (r) sebesar 0,9992 sedangkan rentang linearitas untuk asam adalah 47,88 µg/mL-193,44 µg/mL dengan nilai koefisien korelasi (r) sebesar 0,9994. Kesesuaian kadar terhadap label untuk produk A memberikan hasil sebesar 108,19%-109,82% asam format dan 156,88%-167,90% asam laktat sedangkan untuk produk B memberikan hasil sebesar 101,65%-109,95% asam format dan 151,10%-172,82% asam laktat.

Abstract

Quantitative analysis of organic acid in acidifier product is needed to maintain product effectiveness in repressing microbial growth and lowering feed and gastrointestinal tract pH. The aim of this research is determining the level of formic and lactic acid in two acidifiers from the market. Analysis were performed using reversed phase High Performance Liquid Chromatography (HPLC) with LiChrospher® 100 RP-18 column (250 x 4.0 mm, 5µm, Merck), buffer potassium dihydrogenphosphate 50 mM-TEA 0,5% pH 4,00 as mobile phase and flow rate 0,6 mL/min. Wavelength used in the analysis was 214 nm. Validation methods provide results of recovery by 98.02%-101.97% for formic acid and 97.09%-102.78% for lactic acid, RSD <0.59% for formic acid and 1.28% for lactic acid, LOD 63.05 µg/mL for formic acid 4.55 µg/mL for lactic acid, LOQ 210.16 µg/mL for formic acid and LOD 15.18 µg/mL for lactic acid. The analysis method gives linearity in the range of 439.2 -1764.61 µg/mL for formic acid with correlation coefficient (r) 0.9992 while lactic acid linearity range was 47.88 µg/mL-193.44 g/mL with a correlation coefficient (r) 0.9994. Conformity product A to its label provides the results of 108.19%-109.82% formic acid and 156.88%-167.90% lactic acid whereas the result for product B were 101.65%-109.95% formic acid and 151.10%-172.82% lactic acid.

Keywords : Acidifier; formic acid; lactic acid; HPLC

PENDAHULUAN

Acidifier merupakan asam organik yang tidak hanya bermanfaat dalam preservasi dan proteksi pakan dari kerusakan oleh mikroba dan jamur, namun juga berdampak langsung terhadap mekanisme perbaikan pencernaan pakan pada ternak (Silalahi & Sinaga, 2013). Efek antimikroba tersebut dikarenakan kemampuan asam organik dalam menghambat pertumbuhan bakteri tertentu melalui penurunan pH pakan (Partanen & Mroz, 1999).

Dalam beberapa dekade terakhir, *acidifier* digunakan sebagai alternatif antibiotik dalam pakan ternak untuk meningkatkan pertumbuhan dan mencegah berbagai penyakit enterik (Papatsiros & Billinis, 2012). *Acidifier* berperan dalam menurunkan pH saluran cerna sehingga meningkatkan aktivitas enzim proteolitik, meningkatkan pencernaan protein dan menghambat proliferasi bakteri patogen di dalam saluran pencernaan (Kim *et al.*, 2005). Pada unggas, efek asam organik dalam *acidifier* dapat meningkatkan respon kekebalan tubuh alami, menurunkan aktivitas bakteri patogen dan menyeimbangkan populasi bakteri pada unggas (Hedayati *et al.*, 2013). Di pasaran, terdapat berbagai produk *acidifier* dengan berbagai komposisi asam organik. Penetapan kadar asam organik dalam *acidifier* secara kuantitatif menjadi sangat penting untuk menjaga efektifitas produk dalam menekan pertumbuhan mikroba dan menurunkan pH pakan serta saluran cerna. Berbagai metode sudah dikembangkan untuk analisis asam organik, diantaranya menggunakan

kromatografi cair kinerja tinggi (KCKT) penukar ion dan KCKT fase balik tetapi dengan derivatisasi. Analisis asam organik dengan metode kromatografi ion (Baziramakenga *et al.*, 1994) membutuhkan peralatan dan biaya yang relatif mahal sedangkan bila menggunakan KCKT fase terbalik dengan derivatisasi (Albert & Martens, 1996) cenderung lebih rumit. Oleh karena itu, pada penelitian kali ini dilakukan analisis menggunakan metode KCKT fase terbalik tanpa derivatisasi. Pemilihan fase terbalik dengan kolom C18 dipilih berdasarkan penelitian Tormo dan Izco (2004) dimana penggunaan sistem tersebut tersebut lebih sederhana namun tetap memberikan nilai batas deteksi yang baik. Pada umumnya, analisis asam organik menggunakan pH fase gerak yang sangat asam (pH 2-3). Metode yang dikembangkan oleh Suo *et al.* pada tahun 2014 dapat menganalisis 5 jenis asam organik pada pakan ternak dengan metode KCKT menggunakan fase gerak asam pH 2,5. pH yang rendah akan berdampak pada lepasnya ikatan antara silika dengan fase diam sehingga akan menyebabkan pendeknya umur kolom. Oleh karena itu, pada penelitian kali ini akan dilakukan modifikasi terhadap pH fase gerak sehingga analisis dapat dilakukan pada pH yang lebih tinggi dengan tetap mempertahankan kualitas pemisahan yang baik dari komponen asam organik.

Penelitian ini bertujuan untuk memperoleh metode analisis yang optimum dan valid untuk penetapan kadar asam format dan asam laktat. Metode tersebut dapat diaplikasikan

untuk penetapan kadar asam format dan asam laktat dalam produk *acidifier*.

METODE

Alat yang digunakan adalah Kromatografi Cair Kinerja Tinggi (Shimadzu), kolom LiChrospher® 100 RP-18 (5µm, Merck) dengan dimensi kolom 250 x 4,0 mm, detektor UV-Vis (Shimadzu), timbangan analitik (Acculab), pH meter (Eutech), kertas saring 0,45 µm (Whatman), degasser sonikator (Elmasonic), mikropipet 100 µL dan 1000 µL (Soccorex) dan alat-alat gelas lain yang biasa digunakan dalam laboratorium kimia analisis.

Bahan-bahan kimia yang digunakan dalam penelitian ini meliputi aqua bidestilata (Ika pharmindo), Kalium dihidrogenfosfat (Merck), Trietilamin (Merck), asam fosfat 85% (Merck), asam format (Merck), asam sitrat (Merck), asam laktat (Merck), asam asetat (Merck), silika gel (wakogel) dan sampel berupa dua merk *acidifier*.

Optimasi fase gerak untuk analisis

Sebanyak 20 µl larutan baku campuran asam format dan asam laktat dengan konsentrasi masing-masing 1100 µg/mL dan 120 µg/mL dalam matriks plasebo (asam sitrat, asam asetat dan silika) disuntikan ke dalam kolom. Optimasi metode analisis dilakukan pada panjang gelombang 214 nm, pH fase gerak 4,0 ; 4,25; 4,5 dan laju alir 0,6 ; 1,0 dan 1,2 mL/menit. Dicatat dan dibandingkan waktu

retensi dan resolusi dari dari asam format dan asam laktat dengan pengaruh fase gerak yang berbeda.

Uji kesesuaian sistem

Sebanyak 20 µl campuran larutan baku campuran disuntikan ke dalam kolom dengan kondisi analisis terpilih. Dicatat waktu retensi, area, nilai N, faktor ikutan (Tf), HETP dan presisi dari asam format dan asam laktat pada enam kali penyuntikan.

Validasi metode analisis

Uji akurasi dan presisi dilakukan pada larutan baku campuran dalam matriks plasebo (asam sitrat, asam asetat dan silika) dengan konsentrasi 60%, 80%, 100%, 120% dan 140% dari yang tertera pada label sediaan. Sebanyak 20 µl masing-masing konsentrasi larutan disuntikan ke dalam kolom sebanyak 6 kali. Parameter akurasi memenuhi syarat bila persen perolehan kembali (%UPK) berada diantara rentang 98-102% untuk kadar analit 10%-100% dan persyaratan perolehan kembali sebesar 97%-103% untuk kadar analit 1%-10% (Harmita, 2006). Parameter akurasi memenuhi syarat bila persen koefisien variasi (%KV) < 2% .

Uji selektivitas dilakukan dengan menyuntikan larutan matriks plasebo (asam sitrat, asam asetat dan silika) ke dalam kolom. Metode dikatakan selektif bila pada kromatogram hasil tidak ada gangguan di sekitar waktu retensi asam format maupun asam laktat.

Kurva kalibrasi dan linieritas

Larutan baku campuran asam format dan asam laktat dibuat dalam matriks dengan konsentrasi 40%, 60%, 80%, 100%, 120%, 140% dan 160% untuk kurva kalibrasi. Variasi konsentrasi tersebut yaitu 439,2; 663,68; 883,28; 1102,88; 1322,48; 1542,08; 1764,61 $\mu\text{g/ml}$ untuk asam format dan 47,88; 72,06; 96,24; 120,9; 145,08; 169,26; 193,44 $\mu\text{g/ml}$ untuk asam laktat. Masing-masing konsentrasi kemudian disuntikan sebanyak 20 μl ke dalam kolom dengan kondisi analisis terpilih.

Batas deteksi dan batas kuantitasi dihitung secara statistik melalui garis regresi linier dan kurva kalibrasi. Batas deteksi diperoleh dengan membagi sejumlah 3 kali simpangan baku residual (S_y/x) dengan slope (b) sedangkan batas kuantitasi diperoleh dengan membagi sejumlah 10 kali simpangan baku residual (S_y/x) dengan slope (b).

Analisis sampel

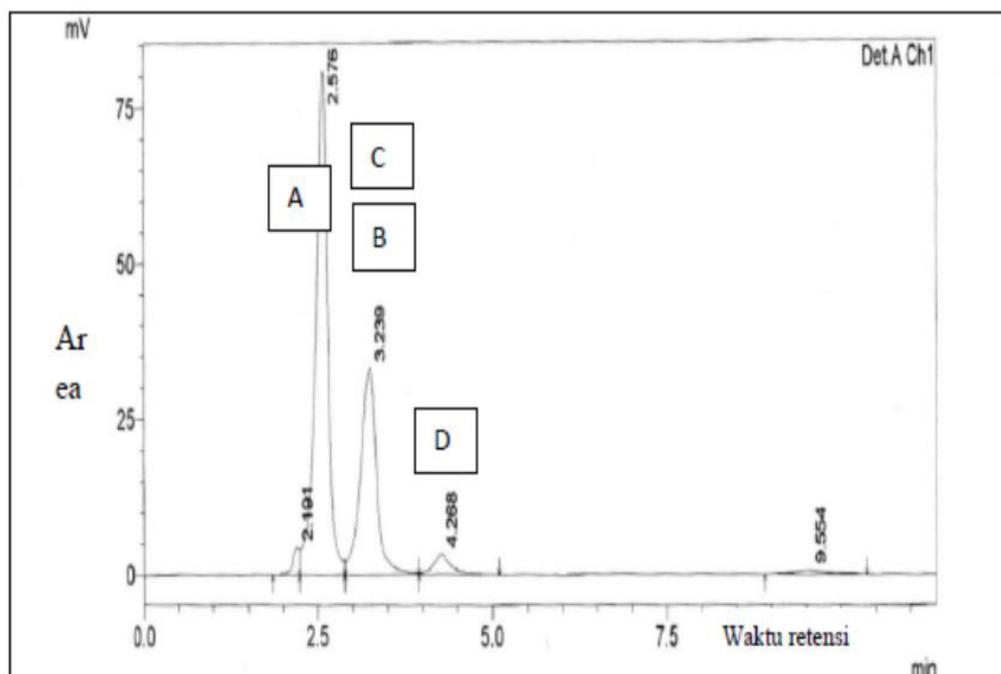
Sebanyak 300 mg sampel *acidifier* ditimbang dan dimasukkan ke dalam labu ukur 25 mL. Encerkan larutan menggunakan fase gerak hingga batas labu. Pipet sebanyak 2 mL lalu masukan ke dalam labu ukur 10 mL dan diencerkan menggunakan fase gerak hingga batas labu. Sebanyak 20 μl larutan sampel disuntikkan ke dalam kolom dengan kondisi terpilih. Luas puncak yang diperoleh dicatat dan dihitung konsentrasi sampel menggunakan kurva kalibrasi.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Hasil analisis menunjukkan bahwa asam laktat dan asam sitrat memiliki waktu retensi yang berdekatan sehingga pada analisis campuran standar dalam matriks plasebo yang mengandung asam asetat, asam sitrat dan silika, kedua asam tersebut terbaca dalam satu puncak kromatogram. Hal ini disebabkan karena penggunaan fase gerak dengan pH yang mendekati pKa dari asam laktat, namun cukup jauh terhadap asam sitrat. Oleh karena pKa asam laktat sebesar 3,86, hal ini membuat asam laktat berada dalam dua bentuk yaitu bentuk molekul dan ionnya sehingga polaritas asam laktat meningkat dengan adanya bentuk ion tersebut dan menyebabkan asam laktat kurang tertahan pada fase gerak. Sedangkan asam sitrat memiliki 3 pKa yaitu 3,08, 4,74 dan 5,40. Perbedaan ketiga pKa tersebut dengan pH fase gerak cukup jauh sehingga menyebabkan asam sitrat berada dalam bentuk ion dengan jumlah lebih besar dan menjadikan asam sitrat semakin polar dalam kondisi analisis. Akibatnya asam sitrat semakin tidak tertahan pada kolom dan menyebabkan waktu retensinya menyamai dari waktu retensi asam laktat. Pada prinsipnya, bila suatu asam berada pada suatu pelarut dengan pH yang berbeda lebih dari 2 poin, maka hampir 99% asam tersebut berada dalam kondisi terion yang berarti bersifat polar.

Tabel 1. Data optimasi fase gerak untuk analisis

Fase Gerak	Kalium dihidrogenfosfat 50 mM pH 4,0		Kalium dihidrogenfosfat 50 mM-TEA 0,5% pH 4,0	
	Asam format	Asam laktat	Asam format	Asam laktat
Waktu retensi (menit)	2,576	-	2,757	3,516
Resolusi	-		3,481	



Keterangan : Analisis menggunakan kolom LiChrospher® 100 RP-18, 5 µm, 4,0 x 250 mm, fase gerak dapar kalium dihydrogen fosfat 50 mM-TEA 0,5% pH 4,00, laju alir 0,6 mL/menit dan detektor UV-Vis pada panjang gelombang 214 nm.

Gambar 1. Kromatogram standar asam format (A), asam asetat (B), asam sitrat (C) dan asam laktat (D).

Penggunaan kalium dihidrogenfosfat 50 mM-TEA 0,5% dengan pH 4,0 memberikan nilai resolusi yang baik untuk asam format dan asam laktat walaupun asam sitrat dan asam asetat tidak terpisah dengan baik. Asam format memiliki waktu retensi 2,757 menit sedangkan waktu retensi asam laktat adalah 3,516 menit dengan resolusi sebesar 3,481. Penambahan trietilamin (TEA) pada fase gerak akan berfungsi sebagai *ion-pair agent*. Pada pH fase gerak 4, TEA yang memiliki pKa sebesar 10,75 akan berada

dalam kondisi 99% terion dan akan melapisi fase diam. Kation dari TEA pada fase gerak akan berinteraksi dengan asam sitrat dan menjadikannya lebih tertahan (waktu retensinya meningkat) bila dibandingkan pada analisis tanpa penambahan TEA. Asam asetat sendiri tidak terlalu terpengaruh dengan adanya penambahan TEA karena pKa asam asetat sebesar 4,75 sehingga asam asetat akan terdapat dalam bentuk molekul dan tidak akan berinteraksi terhadap kation dari TEA pada fase diam. Analisis pada

penelitian ini berfokus terhadap asam format dan asam laktat, sehingga kondisi tersebut tidak dipermasalahkan selama asam format maupun asam laktat memiliki resolusi yang baik. Data optimasi fase gerak dapat dilihat pada Tabel 1. Untuk gambar kromatogram campuran asam laktat, asam format, asam sitrat, asam asetat dalam matriks dalam dilihat di Gambar 1.

Waktu retensi yang hampir mirip diperoleh pada optimasi pH fase gerak. Fase gerak pH 4,00 memberikan nilai resolusi yang paling baik. Optimasi selanjutnya adalah laju alir fase gerak (1,0; 0,8; dan 0,6 mL/menit). Hasil yang paling baik diperoleh pada laju alir 0,6 mL/menit. Semakin kecil laju alir maka waktu retensi yang dihasilkan akan semakin lama namun ternyata memberikan nilai resolusi yang lebih baik (Tabel 2 dan 3).

Tabel 2. Data optimasi pH fase gerak untuk analisis campuran asam format dan asam laktat

Fase Gerak	pH 4,50		pH 4,25		pH 4,00	
	Asam Format	Asam Laktat	Asam Format	Asam Laktat	Asam Format	Asam Laktat
Waktu retensi (menit)	2,801	3,447	2,780	3,436	2,757	3,516
Resolusi	2,626		2,811		3,481	
<i>Tailing Factor</i> (Tf)	2,142	1,319	2,277	1,369	2,097	1,353
Plat Teoritis (N)	2016,740	3224,250	2212,421	3556,568	2629,878	4055,985
HETP	74,377	46,522	67,799	42,175	57,037	36,982

Tabel 3. Data optimasi laju alir fase gerak untuk analisis (panjang kolom 25 cm)

Laju Alir (mL/menit)	1,0		0,8		0,6	
	Asam Format	Asam Laktat	Asam Format	Asam laktat	Asam Format	Asam Laktat
Waktu retensi (menit)	2,749	3,509	3,419	4,367	4,542	5,798
Resolusi	2,874		3,046		3,156	
<i>Tailing factor</i> (Tf)	2,134	1,218	2,208	1,194	2,163	1,139
Plat Teoritis (N)	1708,645	2908,678	2044,355	2985,261	2292,57	3297,961
HETP	0,0015	0,0086	0,0122	0,0084	0,0109	0,0076

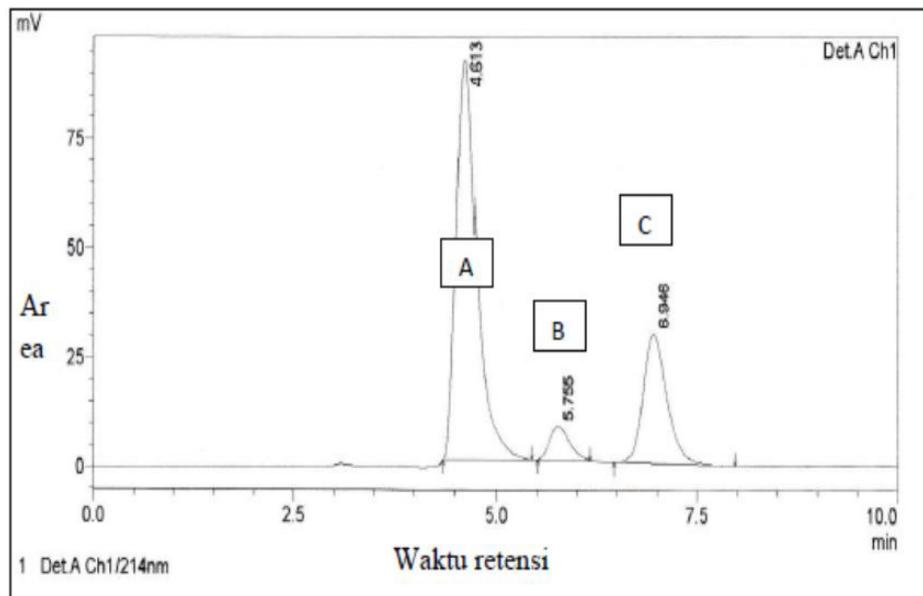
Dari hasil uji kesesuaian sistem, % KV asam format sebesar 1,26% dan asam laktat sebesar 1,92%. Nilai KV tersebut masih di bawah 2% sehingga masih memenuhi kriteria kecermatan (Harmita, 2006). Nilai plat teoritis 2000, nilai resolusi lebih dari 1,5 dan nilai faktor ikutan dibawah 2 untuk asam laktat masih dapat dikategorikan memenuhi syarat dari uji kesesuaian sistem (*Center of Drug Evaluation and Research*, 1994). Nilai faktor ikutan asam format masih sedikit di atas 2 namun masih memberikan resolusi yang baik. Metode ini masih dapat dikembangkan lagi agar mendapatkan nilai faktor ikutan asam format kurang dari 2. Pada uji akurasi, uji perolehan kembali sebesar 98,19%-101,57% untuk asam format. Hasil tersebut memenuhi persyaratan perolehan kembali (%UPK) sebesar 98%-102% untuk kadar analit 10%-100%. Sedangkan asam laktat memberikan hasil uji perolehan kembali (%UPK) sebesar

97,35%-101,86%. Hasil tersebut memenuhi persyaratan perolehan kembali sebesar 97%-103% untuk kadar analit 1%-10% (Harmita, 2006). Uji Presisi memberikan nilai KV untuk asam format sebesar 0,23%-0,59% dan nilai KV untuk asam laktat sebesar 0,27%-1,28%. Nilai KV tersebut masih dibawah 2% sehingga masih memenuhi kriteria kecermatan (Harmita, 2006).

Persamaan regresi linear untuk asam format yaitu $y=1213,7x + 115204$ dengan nilai koefisien korelasi (r) yang diperoleh sebesar 0,9992 sedangkan persamaan regresi linear untuk asam laktat yaitu $y= 620,9x - 1564,6$ dengan nilai koefisien korelasi (r) yang diperoleh sebesar 0,9996. Hal tersebut menunjukkan bahwa kurva kalibrasi memenuhi persyaratan linearitas yaitu nilai r mendekati satu (Snyder dan Kirkland, 2010). Nilai LOD asam format adalah $63,05\mu\text{g/mL}$ dan LOQ

Tabel 4. Data penetapan kadar sampel

Zat	% Kadar terhadap etiket sampel A	% Kadar terhadap etiket sampel B
Asam Format	108,40	101,65
	107,26	104,95
	109,05	107,32
	108,91	105,22
	109,82	104,16
	108,19	109,95
Asam Laktat	156,88	168,25
	158,79	172,82
	160,65	163,71
	160,06	151,10
	161,99	162,42
	167,90	170,01



Keterangan : Analisis menggunakan kolom Li Chrospher ® 100 RP-18, 5 µm, 4,0 x 250 mm, fase gerak dapar kalium dihidrogen fosfat 50 mM-TEA 0,5% pH 4,00, laju alir 0,6 mL/menit dan detektor UV-Vis pada panjang gelombang 214 nm.

Gambar 2. Kromatogram sampel mengandung asam format (A), asam laktat (B), dan asam sitrat (C)

sebesar 210,16 µg/mL. Sedangkan untuk asam laktat diperoleh LOD sebesar 4,55 µg/mL dan LOQ sebesar 15,18 µg/mL. Nilai LOD dan LOQ yang cukup besar tidak terlalu masalah karena konsentrasi analit sendiri di dalam sampel terkandung dalam konsentrasi yang cukup besar sehingga metode masih sesuai untuk diaplikasikan.

Pada analisis sampel memberikan hasil yaitu sampel A memiliki kadar asam format terhadap label sebesar 107,26%-109,82% dan kadar asam laktat sebesar 156,88%-167,90%. Sedangkan untuk sampel B memiliki kadar asam format terhadap label sebesar 101,65%-109,95% dan memiliki kadar asam laktat terhadap label sebesar 151,10%-172,82%. Pada sediaan *acidifier* sendiri, belum terdapat aturan yang jelas dari pemerintah mengenai rentang yang diperbolehkan terdapat dalam

sediaan sehingga hasil dari penetapan kadar dengan rentang analit di atas masih dianggap layak. Data penetapan kadar sampel dapat dilihat pada Tabel 4, gambar kromatogram sampel dapat dilihat di Gambar 2.

KESIMPULAN

Metode analisis yang dikembangkan dengan menggunakan kromatografi cair kinerja tinggi terbukti dapat menganalisis asam laktat dan asam format yang terdapat pada *acidifier* pakan ternak secara valid. Dengan demikian metode ini berpotensi untuk dapat digunakan dalam analisis rutin *acidifier* pada pakan ternak. Modifikasi dan pengembangan metode selanjutnya memungkinkan untuk dilakukan pada jenis sediaan yang lain yang mengandung asam organik tersebut.

DAFTAR ACUAN

- Albert, Daniel B., & Martens, Christopher S. (1996). Determination of low molecular-weight organic acid concentrations in seawater and pore-water samples via HPLC. *Marine Chemistry*, 56, 27-37
- Baziramakenga, R., Simard, R. R., Leroux, G.D. (1995). Determination of Organic Acids in Soil Extracts by Ion Chromatography. *Soil Biol. Biochem*, 27 (3), 349-356
- Chemical book. (2010). *Formic acid*. Diakses pada Juni 10, 2015, dari http://www.chemicalbook.com/ChemicalProductProperty_EN_CB4854063.htm
- Chemical book. (2010). *L(+)-Lactic acid*. Diakses pada Juni 10, 2015, dari http://www.chemicalbook.com/ChemicalProductProperty_EN_CB1138319.htm
- Dibner, J.J. & Buttin, B. (2002). Use of Organic Acids as a Model to Study the Impact of Gut Microflora on Nutrition and Metabolism. *J. Appl. Poult. Res.*, 11, 453–463
- Harmita. (2004). Petunjuk Pelaksanaan Validasi Metode dan Cara Perhitungannya. *Majalah Ilmu Kefarmasian*, 1(3), 117-135
- Harmita. (2006). *Buku Ajar Analisis Fisikokimia*. Depok: Departemen Farmasi FMIPA Universitas Indonesia
- Harmita. (2006). *Petunjuk Pelaksanaan Validasi Metode dan Cara Perhitungannya*. Depok: Departemen Farmasi FMIPA Universitas Indonesia
- Hedayati, M., Manafi, M., Yari, M., & Vafei, P. (2013). Effects of Supplementing Diets with an Acidifier on Performance Parameters and Visceral Organ Weights of Broilers. *European Journal of Zoological Research*, 2 (6), 49-55
- Validation and Analytical Procedures: Text and Methodology*. (1994). International Harmonized Tripartite Guideline
- Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives (JECFA). (1996). Lactic acid. *Food and Nutrition Paper 52 (4)*
- Kil, D.Y., Kwon, W.B., Kim, B.G., (2011). Dietary Acidifiers in Weanling Pig Diets: a Review. *Colombian journal of animal science and veterinary medicine*, 24 (3), 231-247
- Kim, Y. Y., Kil, D. Y., Oh, H.K., & Han, I. K. (2005). Acidifier as an Alternative Material to Antibiotics in Animal Feed. *Asian-Aust. J. Anim. Sci*, 18 (7), 1048-1060
- Papatsiros, V.G. & Billinis, C. (2012). The Prophylactic Use of Acidifiers as Antibacterial Agents in Swine. *Antimicrobial Agents*, 295-310
- Partanen, K.H. & Mroz, Zdzislaw. (1999). Organic Acids for Performance Enhancement in Pig Diets. *Nutrition Research Reviews*, 12, 117-145
- Silalahi, Marsudin & Sinaga, Sauland S. (2013). Pengaruh Penambahan Sari Buah Belimbing Wuluh (*Averrhoa bilimbi*) kedalam Ransum Marmot Lepas Sapih

- Terhadap Kecernaan Energi dan Protein. *Seminar Nasional Teknologi Peternakan dan Veteriner*, 141-146
- Snyder, L.R. & Kirkland, J.J. (2010). *Introduction to Modern Liquid Chromatography (3rded.)*. USA: John Wiley & Sons, Inc
- Suo Decheng, Li Lan, Fan Xia. (2014). Determination of formic acid, acetic acid, propionic acid, lactic acid, citric acid in feed acidifier. *Feed Additive*. 2012-2021
- Suryanarayana, M.V.A.N., Suresh, J., & Rajasekhar, M.V. (2012). Organic Acids in Swine Feeding - A Review. *Agricultural Science Research Journals*, 2(9), 523- 533
- Tormo, M., & Izco, J.M. (2004). Alternative reversed-phase high-performance liquid chromatography method to analyse organic acids in dairy products. *Journal of Chromatography*, 305-310
- Tung, C.M. & Pettigrew, J.E. (2006). Critical Review of Acidifiers. National Pork Board. Diakses pada Desember 29, 2014, dari <http://www.pork.org/Documents/PorkScience/ReviewOfAcidifiers.pdf>
- United States Pharmacopoeia (32nded.)*. (2008). Rockville: The United States Pharmacopoeia Convention
- Validation of Chromatography Methods*. (1994). Center for Drug Evaluation Research
- Validation of Compendial Procedures. (2013). Dalam *United States Pharmacopoeia (36th ed.)*. Rockville : The United States Pharmacopoeia Convention.