

Aktivitas Antibakteri dan Retensi Protein Tepung Cacing Tanah (*Lumbricus rubellus*) sebagai Pakan Imbuhan dengan Taraf Penambahan Kitosan

A. SOFYAN, E. DAMAYANTI dan H. JULENDRA

Bagian Pakan dan Nutrisi Ternak,
Balai Pengembangan Proses dan Teknologi Kimia (BPPTK) – LIPI
Jl. Yogya-Wonosari Km. 31, Gading, Playen, Gunungkidul, Yogyakarta 55861
Email: ahmad.sofyan@lipi.go.id

(Diterima dewan redaksi 11 Juni 2008)

ABSTRACT

SOFYAN, A., E. DAMAYANTI and H. JULENDRA. 2008. Antibacterial activity and retained protein of earthworm meal (*Lumbricus rubellus*) as feed additive combined with chitosan. *JITV* 13(3): 182-188.

This research was conducted to enhance the bacterial growth inhibition of *E. coli* by using earthworm (*Lumbricus rubellus*) meal (TCT) with chitosan addition and its effect on the retained protein in broilers. Inhibition of *E. coli* growth was tested using dilution method on the nutrient broth by additional 2% TCT combined with 0, 0.5, 1.0 and 1.5% chitosan. Retained protein was measured using broiler fed diet containing 2% TCT (w/w) and chitosan addition was: 0, 0.5, 1.0 and 1.50% of TCT (w/w). Fifteen Cobb strain 35 day old broilers were arranged based on Completely Randomized Design (CRD). Results showed that inhibition of *E. coli* increased using TCT chitosan mixed. The highest inhibition to *E. coli* growth obtained from TCT + 0.5% chitosan. Retained protein tended to increase up to 1% (w/w) chitosan. Otherwise, chitosan level more than 1% could reduce protein retention. It is concluded that the use of 1% chitosan increased TCT capability to inhibit *E. coli* and protein retention in the broilers.

Key Words: Feed Additive, Chitosan, *L. rubellus*, *E. coli*

ABSTRAK

SOFYAN, A., E. DAMAYANTI dan H. JULENDRA. 2008. Aktivitas antibakteri dan retensi protein tepung cacing tanah (*L. rubellus*) sebagai pakan imbuhan dengan taraf penambahan kitosan. *JITV* 13(3): 182-188.

Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui pengaruh penambahan kitosan pada tepung cacing tanah (TCT) *Lumbricus rubellus* untuk meningkatkan daya hambat terhadap pertumbuhan *Escherichia coli* dan pengaruhnya terhadap nilai protein teretensi pada ayam broiler. Uji penghambatan terhadap *E. coli* dilakukan dengan metode dilusi pada media *nutrient broth* yang diberi tambahan 2% TCT (b/v) dan kitosan yang ditambahkan sebanyak 0; 0,5; 1,0 dan 1,5% dari TCT yang ditambahkan. Pengukuran nilai retensi protein menggunakan ayam broiler yang diberi pakan mengandung 2% TCT yang ditambahkan 0; 0,5; 1,0 dan 1,5% kitosan (b/b). Ayam broiler strain *Cobb* umur 35 hari sebanyak 15 ekor diberi pakan perlakuan secara acak dalam Rancangan Acak Lengkap (RAL). Hasil pengujian aktivitas antibakteri menunjukkan adanya peningkatan daya hambat TCT terhadap *E. coli* yang diberi tambahan kitosan. Peningkatan daya hambat tertinggi dicapai pada perlakuan TCT + 0,5% kitosan. Nilai protein teretensi cenderung meningkat dengan penambahan kitosan sampai taraf 1% (b/b). Namun penambahan kitosan lebih dari 1% cenderung menurunkan nilai retensi protein. Penambahan 1% kitosan dalam TCT mampu meningkatkan daya hambat terhadap *E. coli* dan memperbaiki retensi protein dari TCT yang dikonsumsi ayam broiler.

Kata kunci: Pakan Imbuhan, Kitosan, *L. rubellus*, *E. coli*

PENDAHULUAN

Penggunaan antibiotik sebagai pakan imbuhan pemacu pertumbuhan (growth promoter) semakin ditinggalkan sejak dikeluarkannya larangan penggunaan pakan imbuhan tersebut oleh Masyarakat Ekonomi Eropa (MEE) pada tahun 1998. Penggunaan beberapa jenis antibiotik seperti bacitracin, tilosin, spiramicin, dan virginiamicin telah dilarang, karena dalam jangka lama dapat menyebabkan resistensi bakteri patogen

(SOFYAN dan RAMLI, 2008) dan dapat menimbulkan efek negatif terhadap kesehatan konsumen (EEC, 1998). Oleh karena itu, perlu dicari bahan pakan imbuhan alternatif untuk menggantikan antibiotik.

Salah satu bahan yang berpotensi sebagai pakan imbuhan adalah tepung cacing tanah (*Lumbricus rubellus*). Cacing tanah memiliki kadar protein yang tinggi (50-65%) dan telah dijadikan pakan alternatif untuk ayam broiler (RESNAWATI, 2004). Selain itu, cacing tanah golongan *Lumbricidae* memiliki

komponen bioaktif 'lumbricin' (0,1 µg/g) yang merupakan senyawa peptida dengan susunan asam amino yang lengkap terutama prolin (CHO *et al.*, 1998), dan secara *in vitro* mampu menghambat pertumbuhan bakteri *Escherichia coli* (JULENDRA dan SOFYAN, 2007), *Salmonella enteritidis*, *Staphylococcus aureus* dan *Streptococcus aureus* (POPOVIĆ *et al.*, 2005).

Kemampuan penghambatan tepung cacing tanah (TCT) sangat ditentukan oleh keberadaan bioaktif 'lumbricin'. Namun, karena tersusun dari asam-asam amino, senyawa ini mudah rusak (perishable) akibat proses pemanasan, pengolahan maupun penyimpanan. Upaya perlindungan terhadap komponen bioaktif sangat diperlukan, dan salah satunya adalah dengan penambahan bahan pelindung (*protecting agent*). Salah satu bahan yang dapat digunakan sebagai pelindung adalah kitosan.

Kitosan merupakan senyawa kompleks gliko-protein yang tersusun dari polimer 2-amino-2-deoksi-D-glukosa. Pemakaian kitosan dalam bidang pangan diantaranya untuk pelapis makanan yang berfungsi sebagai agen pelindung dari kerusakan akibat bakteri pembusuk. KOFUJI *et al.* (2008) melaporkan bahwa kitosan dapat melindungi senyawa antioksidan asam α -lipoat dari kerusakan akibat panas, cahaya dan kondisi asam. HIRANO *et al.* (1990) menyatakan bahwa kitosan dapat digunakan sebagai bahan pakan, baik unggas maupun ruminansia dengan tingkat pencernaan hingga 88%, namun penambahan yang berlebih dapat menurunkan tingkat pencernaan zat makanan. Selain sebagai agen pelindung, kitosan bermanfaat untuk meningkatkan kualitas daging unggas, diantaranya dapat mereduksi kadar kolesterol plasma darah ayam (RAZDAN *et al.*, 1997).

Keuntungan lain dari penggunaan kitosan adalah memiliki aktivitas antimikroba sehingga dapat mendukung aktivitas antibakteri dari bioaktif 'lumbricin' pada cacing tanah. Namun, kitosan pada taraf berlebih sulit dicerna dalam saluran pencernaan ruminansia dengan laju degradasi yang sangat lambat (FADEL EL-SEED *et al.*, 2003). Oleh karena itu, taraf penggunaan kitosan sebagai agen pelindung pakan maupun pakan imbuhan perlu dioptimasi. Penelitian ini bertujuan mengetahui pengaruh penambahan kitosan pada TCT terhadap pertumbuhan *E. coli*. dan mengevaluasi taraf penambahan TCT dan kitosan terhadap tingkat pencernaan pakan pada ayam broiler.

MATERI DAN METODE

Pembuatan tepung cacing tanah

Cacing tanah (*Lumbricus rubellus*) diperoleh dari peternak cacing di Yogyakarta. Tepung cacing tanah (TCT) dibuat menggunakan metode EDWARDS (1985) yang dimodifikasi. Cacing segar hidup dibersihkan dari

media tumbuh, kemudian dicuci dengan air mengalir. Cacing yang sudah bersih disimpan dalam lemari pendingin ($\pm 4^{\circ}\text{C}$) selama 12 jam. Sebelum digiling, cacing ditambahkan larutan asam format sebanyak 3% dari berat sampel. Proses penggilingan dilakukan hingga partikel sampel halus dan dikeringkan dalam oven 50°C selama 10-12 jam. Sampel yang telah kering dihaluskan dan disaring dengan ayakan dengan ukuran partikel ± 40 mesh.

Uji antibakteri

Pengujian aktivitas antibakteri dilakukan secara *in vitro* terhadap bakteri *E. coli* dengan melihat parameter daya hambat TCT yang ditambah kitosan. Pengujian *in vitro* ini dilakukan dengan menggunakan metode dilusi (SEELEY *et al.*, 2001), dengan menambahkan 2% TCT (dari berat media) dan kitosan 0; 0,5; 1,0; dan 1,5% dari berat TCT ke dalam media *nutrient broth* yang telah ditambahkan inokulum *E. coli*. Penambahan 2% TCT dalam media merupakan taraf optimum hasil penelitian sebelumnya. Jumlah koloni inokulum *E. coli* sebanyak 10^7 cfu/ml. Sampel kitosan yang digunakan adalah kitosan produksi Aldrich® dengan rumus kimia $\text{C}_{12}\text{H}_{24}\text{O}_2\text{N}_9$ (berat molekul 340 g/mol).

Perlakuan yang diberikan dalam pengujian ini adalah: R0 (kontrol), R1 (media + 2% TCT + 0% kitosan), R2 (media + 2% TCT + 0,5% kitosan), R3 (media + 2% TCT + 1,0% kitosan), R4 (media + 2% TCT + 1,5% kitosan), dengan ulangan sebanyak 2 kali. Perhitungan koloni *E. coli* setelah diinkubasi selama 0 dan 24 jam pada suhu 37°C dengan menggunakan metode *spread plate*. Jumlah koloni mikroba (cfu, *colony forming unit*) dikonversi kedalam satuan nilai logaritma (log cfu). Perhitungan persentase daya hambat dikalkulasikan dengan rumus sebagai berikut:

$$\text{Persentase penghambatan} = \frac{(H_1 - H_0)}{H_0} \times 100\%$$

H_0 : Jumlah koloni awal dalam log cfu.

H_1 : Jumlah koloni akhir dalam log cfu.

Uji protein teretensi

Pengukuran protein teretensi secara *in vivo* dilakukan dengan pengujian nilai retensi protein dari pakan basal yang diberikan perlakuan TCT dan kitosan yang mengacu pada metode uji retensi protein yang disarankan oleh ZAREI (2006). Sebanyak 15 ekor ayam broiler strain *Cobb* umur 35 hari (bobot hidup rata-rata 1650 g/e) diacak dalam 15 satuan percobaan (5 perlakuan dan 3 ulangan) dalam Rancangan Acak Lengkap (RAL) dan ayam dipelihara dalam kandang individu.

Tahap adaptasi dilakukan selama 1 x 24 jam dengan memberikan pakan basal ke ayam broiler. Ayam dipuaskan selama 24 jam, namun tetap diberikan air minum. Komposisi pakan yang diujicobakan mengandung protein kasar 20% yang merupakan campuran 50% jagung giling dan 50% konsentrat ayam petelur. Pakan basal tersebut dihaluskan dan kemudian ditambahkan TCT dan kitosan sesuai dengan perlakuan yang diberikan (Tabel 1).

Total pakan perlakuan yang diberikan sebanyak 3 - 4% dari bobot hidup ayam. Sampel ekskreta dikoleksi selama 24 jam kemudian dikeringkan dan diukur kadar proteinnya dengan menggunakan metode Kjeldahl (AOAC, 1990). Nilai retensi protein dihitung dengan persamaan sebagai berikut:

$$\text{Retensi protein} = \frac{(\text{Bp} \times \text{Pp}) - (\text{Be} \times \text{Pe})}{(\text{Bp} \times \text{Pp})} \times 100\%$$

Bp: Bobot pakan yang dikonsumsi (gram BK)

Pp: Kadar protein pakan (% BK)

Be: Bobot ekskreta (gram BK)

Pe: Kadar protein ekskreta (% BK)

Analisis Data

Data jumlah koloni *E. coli* dari uji aktivitas antibakteri dianalisis secara deskriptif, sedangkan data dari uji protein teretensi dianalisis secara statistik dengan sidik ragam (Anova) dan dilanjutkan dengan uji ortogonal kontras (STEEL dan TORRIE, 1986).

HASIL DAN PEMBAHASAN

Aktivitas Antibakteri

Penambahan kitosan pada TCT dapat meningkatkan kemampuan penghambatan terhadap pertumbuhan *E. coli* secara *in vitro*. Jumlah koloni pada pengamatan t=0 jam berkisar 5,9 – 12,0 x 10³ cfu/ml, sedangkan pengamatan pada t=24 jam setelah perlakuan (0,5-1,5%

kitosan) secara umum terjadi penurunan jumlah koloni rata-rata menjadi 5,1 x 10³ cfu/ml, sementara pada kontrol (0% kitosan) jumlah koloni mencapai 1,8x 10⁴ cfu/ml (Tabel 2).

Jumlah koloni terendah pada pengamatan t=24 jam ditemukan pada perlakuan penambahan TCT dan 1% kitosan (R3), diikuti dengan perlakuan R2, R4 dan R0 (Gambar 1). Pola yang sama juga ditunjukkan dari persentase penghambatan, dan hal ini menunjukkan bahwa penambahan kitosan dapat meningkatkan daya hambat TCT terhadap *E. coli*. Persentase daya hambat tertinggi dicapai pada perlakuan penambahan 0,5% (R1) kitosan pada TCT, diikuti berturut-turut dengan penambahan 1,5% (R3) dan 1,0% (R2) (Gambar 2). Penurunan daya hambat pada penambahan kitosan 1,0% dibandingkan dengan penambahan kitosan 0,5% dan 1,5% lebih disebabkan jumlah koloni awal (t=0 jam) relatif beragam. Meskipun, terjadi fluktuasi daya hambat pada taraf penambahan 0,5 - 1,5%, kemampuan penghambatan relatif terhadap kontrol berkisar 97-150%. Hal ini menunjukkan bahwa penambahan kitosan dalam TCT cukup efektif dalam meningkatkan fungsi TCT sebagai pakan imbuhan dalam menekan populasi *E. coli*.

Peningkatan daya hambat dari TCT ini menunjukkan kitosan berfungsi sebagai zat antimikroba. Pengujian kitosan secara *in vitro* dengan pelarut asam asetat dapat menghambat bakteri *Salmonella enterica* (YADAV dan BHISE, 2004), dimana *S. enterica* merupakan penyebab penyakit thypoid pada unggas. Hal ini juga didukung hasil penelitian NO *et al.* (2006) yang menyebutkan bahwa kitosan yang dilarutkan dalam 1% asam asetat dapat menghambat perkembangbiakan beberapa bakteri patogen seperti *Salmonella enteritidis* dan *Streptococcus aureus*.

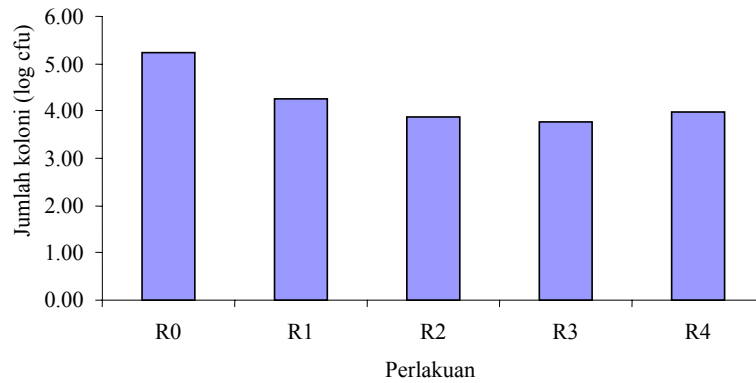
Selain itu, keberadaan kitosan akan mengoptimasi kemampuan bioaktif yang terdapat pada TCT. Keberadaan bioaktif 'lumbrikin' pada TCT (CHO *et al.*, 1998) akan teroptimasi daya hambatnya terhadap *E. coli* dengan penambahan kitosan 0,5 % akan menjadi optimal. Namun, penambahan kitosan yang melebihi

Tabel 1. Pakan perlakuan dengan penambahan TCT dan kitosan

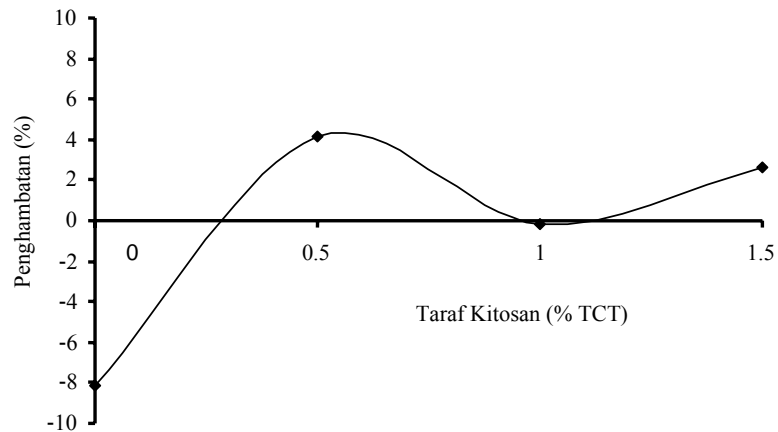
Perlakuan	Kode	Pakan basal (g)	TCT (g)	Kitosan (mg)
Kontrol	K	40	0	0
TCT + 0% kitosan	P0	40	0,8	0
TCT + 0,5% kitosan	P1	40	0,8	0,40
TCT + 1,0% kitosan	P2	40	0,8	0,80
TCT + 1,5% kitosan	P3	40	0,8	1,20

Tabel 2. Jumlah koloni *E. coli* pada media yang diberi TCT dan kitosan

Hari pengamatan	Tarf penambahan kitosan pada TCT			
	0%	0,5%	1,0%	1,5%
Pengamatan ke-0 jam	$8,6 \times 10^3$	$1,1 \times 10^4$	$5,9 \times 10^3$	$1,2 \times 10^4$
Pengamatan ke-24 jam	$1,8 \times 10^4$	$7,5 \times 10^3$	$6,0 \times 10^3$	$9,4 \times 10^3$



Gambar 1. Jumlah koloni *E. coli* setelah penambahan TCT dan kitosan



Gambar 2. Persentase penghambatan TCT yang ditambah kitosan

0,5% akan menurunkan nilai daya hambat itu sendiri. Hal ini dimungkinkan karena adanya penambahan kitosan yang berlebih dapat berakibat penetrasi zat aktif

dalam sel *E. coli* terhalang karena tingkat kepekatan larutan yang mengandung TCT dan kitosan. Kondisi demikian didukung oleh penelitian JULENDRA dan

SOFYAN (2007) yang menyatakan bahwa penambahan TCT dalam media sumuran (agar well) akan menurunkan daya hambatnya jika melebihi 50%. Keadaan yang demikian diduga dapat menghambat masuknya senyawa aktif antimikroba ke dalam sel bakteri.

Protein Teretensi

Nilai retensi protein dari pakan yang ditambah kitosan dan TCT rata-rata 64,2%, sedangkan kontrol (K) hanya 61,9%. Penambahan kitosan pada TCT sampai taraf 0,5% (P1) dapat meningkatkan (P=0,318) nilai pencernaan protein pakan perlakuan. Walaupun secara statistik pada taraf uji P<0,05 tidak memperlihatkan perbedaan yang nyata, taraf kitosan melebihi 0,5% dari TCT berdampak pada penurunan jumlah protein yang teretensi (Tabel 3).

Pola hubungan taraf penambahan kitosan (% TCT) terhadap tingkat protein teretensi mengikuti persamaan kuadratik (Gambar 3) dengan koefisien korelasi (r) 0,897. Nilai optimum taraf pemakaian kitosan

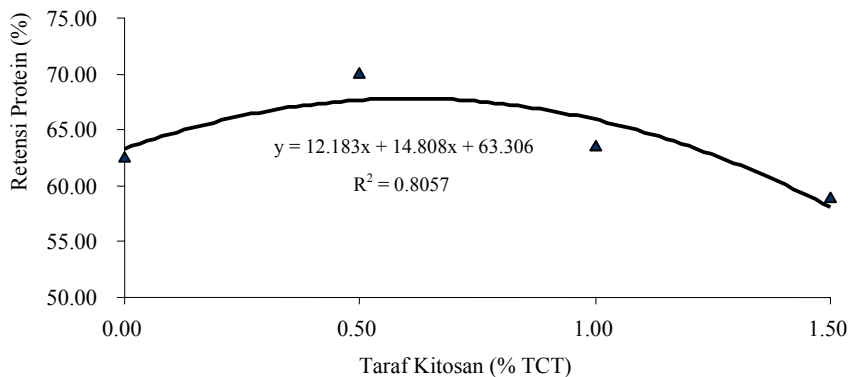
berdasarkan dari persamaan tersebut adalah 0,61% yang mendekati taraf perlakuan 0,5% kitosan (P1). Hal ini menunjukkan bahwa penambahan 1% kitosan dalam 2% TCT sebagai pakan imbuhan, dapat untuk menurunkan populasi *E. coli* dan meningkatkan nilai biologis zat makanan yang diindikasikan dari peningkatan nilai protein teretensi.

Peningkatan nilai retensi protein yang merupakan indikasi dari peningkatan pencernaan zat makanan pada ayam yang diberi perlakuan TCT dan kitosan diduga disebabkan adanya peningkatan waktu retensi sehingga bahan pakan lebih lama tinggal dalam saluran pencernaan. Kitosan mempunyai kemampuan dalam mengikat senyawa organik tertentu. Kitosan memiliki karakteristik membentuk kompleks ikatan (spherical gel) dengan asam amino sehingga akan meningkatkan viskositas (KOFUJI *et al.*, 2005; KACHANECHAIA *et al.*, 2008). Kondisi ini disatu sisi menguntungkan, karena proses enzimatik akan lebih optimal, namun pada penambahan yang terlalu tinggi, kitosan akan menyelimuti (coating) partikel bahan (SAKAI *et al.*, 2002) sehingga pakan sulit tercerna.

Tabel 3. Nilai retensi protein pakan dengan penambahan TCT dan kitosan

Peubah	Perlakuan				
	K	P0	P1	P2	P3
Protein Terkonsumsi (g)	9,05	9,33	9,33	9,34	9,34
Protein Terekskresi (g)	3,490	3,48	2,78	3,39	3,03
Protein Teretensi (%)	61,30	62,51	70,04	63,55	58,90

K (Kontrol) = pakan tanpa tambahan TCT dan kitosan
 P0 = pakan + 2%TCT
 P1 = pakan +2%TCT + 0,5% kitosan dalam TCT
 P2 = pakan +2%TCT + 1,0% kitosan dalam TCT
 P3 = pakan +2%TCT + 1,5% kitosan dalam TCT



Gambar 3. Hubungan taraf kitosan dalam TCT terhadap retensi protein

Keberadaan kitosan dalam saluran pencernaan akan mempengaruhi tingkat degradasi zat makanan. Penelitian HERDIAN *et al.* (2007), menyebutkan bahwa penambahan kitosan pada pakan sampai taraf 1% mampu meningkatkan kecernaan *in vitro*, namun pada taraf lebih dari 2% tingkat kecernaan pakan cenderung menurun. Penurunan tingkat kecernaan bahan pakan yang ditambahkan kitosan berlebih menyebabkan laju degradasi yang lambat dengan *lag time* hingga 18 jam (FADEL EL-SEED *et al.*, 2003).

KESIMPULAN

Penambahan kitosan pada tepung cacing tanah (TCT) mampu meningkatkan penghambatan terhadap *E. coli*. Daya hambat tertinggi dicapai pada perlakuan TCT + 0,5% kitosan. Protein teretensi dari TCT menunjukkan peningkatan dengan penambahan kitosan sampai taraf 1%. Namun penambahan kitosan lebih dari 1% dapat berakibat pada penurunan nilai retensi protein. Penambahan 1% kitosan dalam TCT mampu meningkatkan daya hambat terhadap *E. coli* dan memperbaiki retensi protein dari TCT dalam pakan yang dikonsumsi ayam broiler.

DAFTAR PUSTAKA

- AOAC. 1990. Official Method of Analysis. *In*: K. Helrich (ed.). 15th Edition. Association of Official Analytical Chemists (AOAC), Arlington, VA.
- CHO, J.H., C.B. PARK, Y.G. YOON and S.C. KIM. 1998. Lumbricin I, a novel proline-rich antimicrobial peptide from the earthworm: purification, cDNA cloning and molecular characterization. *Biochim. Biophys. Acta*. 1408: 67-76.
- EUROPEAN ECONOMIC COMMUNITY (EEC). 1998. Council Regulation (EC) No. 2821/98 of 17 December 1998 Amending, as Regards Withdrawal of The Authorization of Certain Antibiotics, Directive 70/524/EEC Concerning Additives in Feedingstuffs. <http://eur-lex.europa.eu> (24 March 2008).
- EDWARDS, C.A. 1985. Production of feed protein from animal waste by earthworm. *Phil. Trans. R. Soc. Lond* B310, 299-307.
- FADEL EL-SEED, A.N.M.A., H.E.M. KAMEL, J. SEKINE, M. HISHINUMA and K. HAMAN. 2003. Chitin and chitosan as possible novel nitrogen sources for ruminants. *Can. J. Anim. Sci.* 83: 161-163.
- HERDIAN, H., A. FEBRISANTOSA dan A. SOFYAN. 2007. Kecernaan *in vitro* pakan konsentrat sapi potong dengan penambahan kitosan. Prosiding Seminar Nasional Asosiasi Ahli Nutrisi dan Pakan Indonesia (AINI). Fakultas Peternakan Universitas Gajah Mada, Yogyakarta, 26-27 Juli 2007. hlm. 403-407.
- HIRANO, S., C. ITAKURA, H. SEINO, Y. AKIYAMA, I. NONAKA, N. ANBARA and T. KAWAKAMI. 1990. Chitosan as an ingredient for domestic animal feeds. *J. Agric. Food Chem.* 38: 1214-1217.
- JULENDRA, H. dan A. SOFYAN. 2007. Uji *in vitro* penghambatan aktivitas *Escherichia coli* dengan tepung cacing tanah (*Lumbricus rubellus*). *Med. Pet.* 30 (1): 41-47.
- KACHANECHAIA, T., P. JANTAWATA and R. PICHYANGKURA. 2008. The influence of chitosan on physico-chemical properties of chicken salt-soluble protein gel. *J. Food Hyrocol.* 22: 74-83.
- KOFUJI, K., C-J. QIAN, M. NISHIMURA, I. SUGIYAMA, Y. MURATA and S. KAWASHIMA. 2005. Relationship between physicochemical characteristics and functional properties of chitosan. *Eur. Polym. J.* 41: 2784-2791.
- KOFUJI, K., M. NAKAMURA, T. ISOBE, Y. MURATA and S. KAWASHIMA. 2008. Stabilization of α -lipoic acid by complex formation with chitosan. *Food Chem.* 109: 167-171.
- LIU, Y.Q., Z.J. SUN, C. WANG, S.J. LI and Y.Z. LIU. 2004. Purification of novel antibacterial short peptide in earthworm. *Acta. Biochim. Biophys. Sinica.* 36: 297-302.
- NO, H.K., S.H. KIM, S.H. LEE, N.Y. PARK and W. PRINYAWIWATKUL. 2006. Stability and antibacterial activity of chitosan solutions affected by storage temperature and time. *Carbohydr. Polym.* 65: 174-178.
- POPOVIĆ, M., M. GRDIŠA and T.M. HRZENJAK. 2005. Glycolipoprotein G-90 obtained from the earthworm *Eisenia foetida* exerts antibacterial activity. *Vet. Arhiv.* 75: 119-128.
- RAZDAN, A., D. PETERSSON and J. PETERSSON. 1997. Broiler chicken body weights, feed intakes, plasma lipid and small-intestinal bile acid concentrations in response to feeding of chitosan and pectin. *Br. J. Nutr.* 78: 283-291 [Abstr.].
- RESNAWATI, H. 2004. Bobot potongan karkas dan lemak abdomen ayam ras pedaging yang diberi ransum mengandung tepung cacing tanah (*Lumbricus rubellus*). Prosiding Seminar Nasional Teknologi Peternakan dan Veteriner. Bogor, 4-5 Agustus 2004. hlm: 473-478.
- SAKAI, Y., K. HAYANO, H. YOSHIOKA, T. FUJIEDA, K. SAITO and H. YOSHIOKA. 2002. Chitosan-coating of cellulosic materials using an aqueous chitosan-CO₂ solution. *Polym. J.* 34: 144-148.
- SEELEY, H.W., J.R., P.J. VANDEMARK and J.J. LEE. 2001. *Microbes in Action: A Laboratory Manual of Microbiology.* 4th Edition. W.H. Freeman and Company, New York.
- SOFYAN, A. dan N. RAMLI. 2008. Kombucha: Feed Additive Alami Antikolesterol. *Poultry Indonesia.* Edisi Maret Vol. III. hlm. 60-61.

- STEEL, R.G.D. and J.H. TORRIE. 1986. Principles and Procedures of Statistics. Mc Graw Hill Book Co. Inc. New York.
- ZAREI, A. 2006. Apparent and true metabolizable energy in artemia meal. *Int. J. Poultry Sci.* 5: 627-628.
- YADAV, A.V. and S.B. BHISE. 2004. Chitosan: A potential biomaterial effective against typhoid. *Cur. Sci.* 87: 1176-1178.