

STATUS IMUNITAS AYAM RAS PETELUR YANG DIBERI KITOSAN IRADIASI

The Immunity Status of Laying Hens Given Irradiated Chitosan

Dede Randian Lubis¹, Diding Latipudin², Andi Mushawwir³

¹Program Studi Ilmu Peternakan, Fakultas Peternakan, Universitas Padjadjaran
Kampus Jatinangor, Jln. Raya Bandung-Sumedang Km. 21, Jatinangor, Sumedang,
Jawa Barat 45363

²Laboratorium Fisiologi Ternak dan Biokimia, Departemen Nutrisi Ternak dan Teknologi
Pakan, Fakultas Peternakan, Universitas Padjadjaran, Bandung
Kampus Jatinangor, Jln. Raya Bandung-Sumedang Km. 21, Jatinangor, Sumedang,
Jawa Barat

ABSTRAK

KORESPONDENSI

Dede Randian Lubis

Fakultas Peternakan,
Universitas Padjadjaran

email:
dederandianl@gmail.com

Penelitian ini dilakukan untuk mengetahui pengaruh pemberian kitosan iradiasi terhadap status imunitas ayam ras petelur. Penelitian dilaksanakan pada bulan Desember 2019 sampai Januari 2020 di peternakan ayam petelur Desa Sukarapih, Kecamatan Sukasari, Kabupaten Sumedang, Jawa Barat. Pengujian sampel darah dilakukan di Laboratorium Fisiologi Ternak dan Biokimia Fakultas Peternakan Universitas Padjadjaran, Kecamatan Jatinangor, Kabupaten Sumedang, Jawa Barat. Penelitian menggunakan metode eksperimental dengan uji *polynomial orthogonal*. Terdapat 50 ekor ayam ras petelur fase layer sebagai objek penelitian dengan 5 jenis perlakuan yaitu P0 = tanpa pemberian kitosan, P1 = diberi kitosan 150 ppm, P2 = diberi kitosan 200 ppm, P3 = diberi kitosan 250 ppm dan P4 = diberi kitosan 300 ppm. Parameter yang diamati pada penelitian ini yaitu sel darah putih/leukosit (limfosit dan neutrofil) dan protein darah (protein total, albumin dan globulin) ayam ras petelur. Hasil penelitian menunjukkan bahwa pemberian kitosan iradiasi berpengaruh nyata ($P < 0,05$) terhadap jumlah sel leukosit, limfosit dan neutrofil. Begitupula dengan pengaruh kitosan iradiasi terhadap kadar protein darah (protein total, albumin dan globulin), yang secara umum berbeda nyata ($P < 0,05$). Namun terdapat inkonsistensi pengaruh kitosan pada masing-masing parameter protein darah, baik protein total, albumin maupun globulin.

Kata Kunci: ayam petelur, kitosan iradiasi, leukosit, protein darah

ABSTRACT

This research was conducted to determine the effect of giving chitosan irradiation on the immunity status of laying hens. The study was conducted in December 2019 to January 2020 at the laying chicken farm in Sukarapih Village, Sukasari District, Sumedang Regency, West Java. Blood sample testing was conducted at the Laboratory of Animal Physiology and Biochemistry of the Faculty of Animal Husbandry, Universitas Padjadjaran, Jatinangor District, Sumedang Regency, West Java. The study used an experimental method with orthogonal polynomial test. There were 50 layers layer layer chicken as research objects with 5 types of treatment, namely P0 = without giving chitosan, P1 = given chitosan 150 ppm, P2 = given chitosan 200 ppm, P3 = given chitosan 250 ppm and P4 = given chitosan 300 ppm. The parameters observed in this study were white blood cells / leukocytes (lymphocytes and neutrophils) and blood proteins (total protein, albumin and globulin) laying hens. The results showed that the administration of chitosan irradiation had a significant effect ($P < 0.05$) on the number of leukocyte, lymphocyte and neutrophil cells. Likewise with the effect of chitosan irradiation on blood protein levels (total protein, albumin and globulin), which were generally significantly different ($P < 0.05$). But there is an inconsistency of the influence of chitosan on each parameter of blood protein, both total protein, albumin and globulin.

Keywords: laying hens; irradiated chitosan; leukocytes; blood protein

PENDAHULUAN

Ayam petelur merupakan ternak yang rentan terhadap temperatur lingkungan, kondisi lingkungan dan manajemen pemeliharaan, yang berakibat terhadap produktivitas dan juga kesehatannya. Temperatur kandang yang ideal tidak menjamin produksi yang optimal, apabila kondisi lingkungan dan manajemen pemeliharaan, seperti pakan, air minum, sanitasi kurang mendapatkan perhatian.

Sistem pemeliharaan ayam petelur bagi peternak, umumnya kurang memperhatikan sanitasi pipa atau tempat air minum dan teknik penyimpanan bahan pakan. Minimnya perhatian terhadap sanitasi air minum dan penyimpanan pakan menjadi pemicu cemaran kapang dan aflatoksin. Meskipun dalam level yang rendah, namun tanpa disadari dapat menjadi faktor menurunnya produktivitas ternak. Paparan kapang dan aflatoksin secara terus menerus menyebabkan sistem tubuh meningkatkan stimulan imun dan kerusakan organ hati menyebabkan

penurunan albumin dan protein plasma secara keseluruhan.

Perlu diupayakan tindakan antisipatif melalui pemberian substrat yang bersifat alami pada ayam petelur. Salah satu upaya tersebut adalah dengan pemberian kitosan sebagai *feed additive*. Kitosan merupakan sebuah kitin deasetilasi, eksoskeleton artropoda seperti kepiting, udang, serangga dan makhluk laut lainnya dalam keluarga crustacea. Kitosan telah dikembangkan menjadi kitosan iradiasi guna memaksimalkan fungsinya untuk ternak. Kitosan iradiasi merupakan hasil perkembangan kitosan melalui radiasi sinar gama. Glukosamina salah satu turunan dari kitosan yang merupakan senyawa yang ditemukan secara alami dalam tubuh, terbuat dari glukosa dan asam amino glutamin. Kitosan hasil iradiasi memiliki keuntungan dengan berat molekul yang lebih rendah, sehingga lebih mudah berinteraksi dengan protein kapang dan aflatoksin.

Hasil-hasil penelitian terdahulu menunjukkan kitosan mampu bertindak sebagai antimikroba dan antibiotik, sehingga diharapkan mampu mencegah

kapang dan aflatoksin memasuki sel-sel absorptif ileum. Dengan demikian sistem imun tidak memproduksi terlalu tinggi leukosit maupun deferensiasinya (limfosit dan neutrofil). Begitu pula terhadap kerusakan sel-sel hati dapat dicegah, yang ditandai dengan produksi protein albumin yang tinggi dan/atau rendah. Jadi jumlah protein albumin yang diproduksi harus optimum atau pada kisaran tertentu.

Oleh karena itu, peneliti tertarik untuk mengkaji pengaruh pemberian kitosan iradiasi terhadap imunitas, melalui indikator kadar leukosit & diferensiasinya (limfosit dan neutrofil) dan protein darah (albumin, globulin dan total protein) plasma darah ayam petelur.

METODE PENELITIAN

Ternak Percobaan

Ternak percobaan yang digunakan untuk penelitian ini adalah ayam petelur fase layer sebanyak 50 ekor dengan bobot badan rata-rata 1800 gram yang berumur 29 bulan. Sampel tersebut dipelihara dalam kandang tipe *semi close house* dengan bentuk *battery* tiga susun individual. Penelitian ini dilaksanakan dengan menggunakan teknik Rancangan Acak Lengkap (RAL). Terdiri atas lima (5) perlakuan penambahan kitosan iradiasi dengan sepuluh (10) kelompok ulangan, yaitu :

- Perlakuan A : Tanpa pemberian kitosan iradiasi (P0)
- Perlakuan B : Kitosan iradiasi 150 ppm dalam air minum (P1)
- Perlakuan C : Kitosan iradiasi 200 ppm dalam air minum (P2)
- Perlakuan D : Kitosan iradiasi 250 ppm dalam air minum (P3)

Perlakuan E : Kitosan iradiasi 300 ppm dalam air minum (P4)

Pembuatan Larutan Kitosan

Kitosan yang digunakan dalam penelitian ini yaitu kitosan yang telah diiradiasi dengan menggunakan teknik radiasi nuklir terhadap kondisi fisiobiokimiawi ternak unggas. Kitosan telah diisolasi dari kulit udang dan diiradiasi di Pusat Aplikasi Isotop dan Radiasi (PAIR), Badan Tenaga Nuklir Indonesia (BATAN), Pasar Jum'at Jakarta. Larutan kitosan dibuat dengan cara 1 mL kitosan induk dicampurkan ke dalam air hingga 1 L, sehingga diperoleh konsentrasi larutan kitosan 50 ppm. Kitosan diberikan dalam bentuk cair yang dicampurkan ke dalam air minum, kemudian diberikan kepada ternak percobaan sesuai dengan perlakuan.

Analisis Statistika

Data respon penelitian dianalisis dengan menggunakan metode ortogonal polinomial. Suatu derajat polynomial ke-n digunakan untuk mengetahui hubungan antara peubah respon Y dan peubah predictor X diujikan sebagai berikut :

$$Y = \alpha + \beta_1 X + \beta_2 X^2 + \dots + \beta_n X^n$$

Data yang diperoleh telah dianalisis dengan software SPSS IBM 21.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Pengaruh pemberian kitosan iradiasi terhadap jumlah sel darah putih (leukosit), limfosit dan neutrofil pada ayam ras petelur berdasarkan hasil penelitian ini dapat dilihat pada Tabel 1 berikut.

Tabel 1. Hasil Uji Beda *Contras Orthogonal* terhadap Rata-rata Jumlah Sel Darah Putih (Leukosit), Limfosit dan Neutrofil

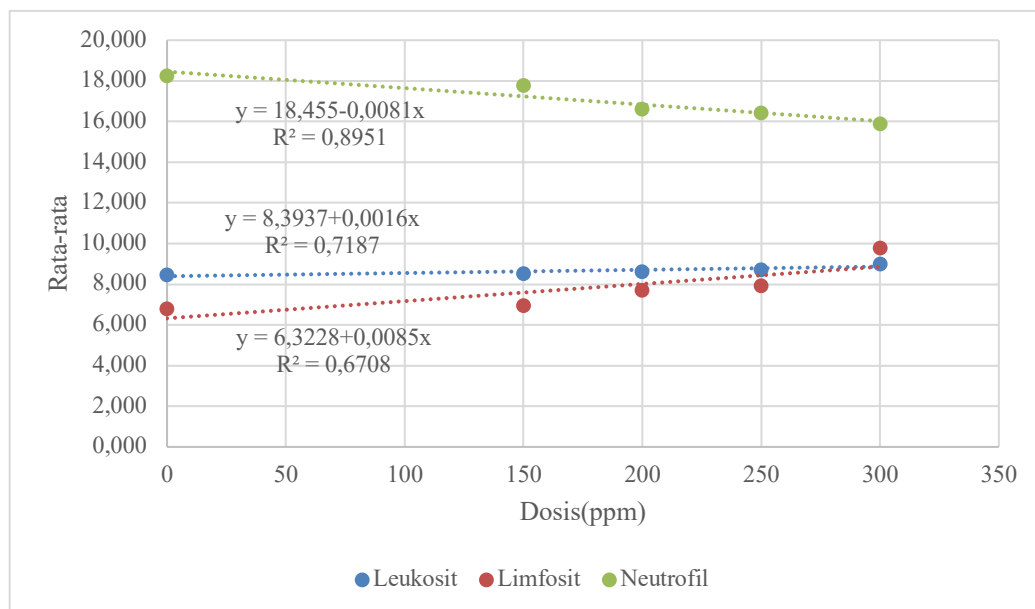
Perlakuan	Leukosit ($\times 10^5$ sel)	Limfosit ($\times 10^2$ sel)	Neutrofil ($\times 10^2$ sel)
P0	8,481 ^a	6,82 ^a	18,25 ^a
P1	8,532 ^b	6,96 ^b	17,79 ^b
P2	8,622 ^c	7,72 ^c	16,62 ^c
P3	8,733 ^d	7,93 ^d	16,42 ^c
P4	9,020 ^e	9,80 ^e	15,89 ^c

Keterangan : Rata-rata yang diikuti superscript unsur abjad yang berbeda pada kolom yang sama menunjukkan perbedaan yang nyata ($P < 0,05$)

Tabel 1 menunjukkan rata-rata jumlah leukosit, limfosit dan neutrofil ayam ras petelur yang diberi berbagai level kitosan iradiasi melalui air minum. Secara keseluruhan pemberian kitosan iradiasi melalui air minum mampu mempengaruhi ($P < 0,05$) profil sel-sel darah putih (leukosit), maupun diferensiasinya (khususnya limfosit dan neutrofil). Hasil penelitian ini pada prinsipnya mampu menunjukkan bahwa

kitosan hasil iradiasi memberikan pengaruh terhadap potensi peningkatan imunitas ayam ras petelur.

Peningkatan jumlah leukosit dan limfosit serta penurunan neutrofil seiring dengan bertambahnya level pemberian kitosan iradiasi melalui air minum (Tabel 1 dan Ilustrasi 1), memberikan petunjuk yang baik bahwa kitosan ini bersifat imunostimulator.



Ilustrasi 1. Grafik Analisis Korelasi Regresi Rata-rata Jumlah Sel Darah Putih (Leukosit), Limfosit dan Neutrofil Plasma Darah Ayam Ras Petelur

Pengaruh pemberian level kitosan terhadap jumlah leukosit sebesar 0,7187 atau 71,87% jumlah leukosit dipengaruhi oleh level kitosan, dengan persamaan regresi pengaruh pemberian level kitosan terhadap leukosit yaitu $y = 8,3937 + 0,0016x$. Persamaan ini menunjukkan bahwa setiap penambahan kitosan sebesar 0,0016 ppm

menyebabkan penambahan 1 sel leukosit. Begitupula terhadap limfosit, akan bertambah 1 sel setiap penambahan 0,0085 ppm kitosan iradiasi. Sebaliknya terhadap jumlah neutrofil, akan mengalami pengurangan 1 sel setiap penambahan 0,0081 ppm kitosan iradiasi.

Berdasarkan hasil penelitian ini (Tabel 1) menunjukkan bahwa jumlah leukosit berbeda paling tinggi ($P < 0,05$) pada kelompok ayam ras petelur yang diberi kitosan iradiasi 300 ppm melalui air minum, yaitu $9,020 \times 10^5$ sel, dibandingkan pada kelompok ayam tanpa pemberian kitosan iradiasi, 150, 200 dan 250 ppm yaitu masing-masing 8,481; 8,532; 8,622 dan $8,733 \times 10^5$ sel. Fenomena yang sama juga terjadi terhadap jumlah limfosit, dimana jumlah limfosit pada pemberian kitosan iradiasi sebesar 300 ppm terhadap ayam ras petelur melalui air minum berbeda paling tinggi ($P < 0,05$) yaitu $9,80 \times 10^2$ sel dibandingkan dengan yang lain. Sebaliknya, jumlah neutrofil semakin menurun dengan meningkatnya level pemberian kitosan iradiasi. Jumlah neutrofil pada kelompok ayam yang diberi kitosan 200, 250 dan 300 ppm melalui air minum yaitu masing-masing 16,62; 16,42 dan $15,89 \times 10^2$ sel, berbeda nyata lebih rendah ($P < 0,05$) dibanding dengan jumlah neutrofil kelompok ayam tanpa pemberian kitosan iradiasi dan pemberian dengan level 150 ppm, yaitu masing-masing 18,25 dan $17,79 \times 10^2$ sel.

Uraian hasil penelitian tersebut diatas secara nyata menunjukkan bahwa kitosan iradiasi mampu berfungsi sebagai imunostimulator yang diindikasikan dengan meningkatnya jumlah leukosit dan limfosit, sebaliknya menurunkan neutrofil.

Berdasarkan hasil ini dapat dijelaskan bahwa kitosan iradiasi meningkatkan pertumbuhan sel-sel leukosit. Peningkatan sel-sel leukosit menstimulasi meningkatnya sel-sel limfosit, baik sel limfosit B maupun T. Peningkatan kedua jenis sel-sel limfosit ini, secara fisiologik menekan pertumbuhan neutrofil. Hasil penelitian Carroll dkk., (2016) menunjukkan bahwa kitosan mampu mencegah aktivasi ROS (Reactive Oxygen Species) melalui pengaktifan Cyclic Guanine Monophosphate-Adenine Monophosphate Synthase (cGAS) dan Stimulator of Interferon Genes (STING) di dalam sel-sel dendrit. Selanjutnya dilaporkan bahwa aktivasi kedua jenis protein spesifik ini (cGAS dan STING) menyebabkan aktivasi sel-sel dendrit.

Terkait dengan aktivasi sel-sel dendrit, Cai dkk., (2014) mengemukakan bahwa aktivasi sel-sel dendrit menyebabkan dampak fisiologik terhadap stimulasi aktivitas imunitas melalui pertumbuhan sel-sel leukosit dan limfosit. Pertumbuhan leukosit dan limfosit terkait dengan inisiasi produksi immunoglobulin, yang distimulan oleh sel-sel dendrit melalui produksi protein sel-sel T-helper.

Pengaruh pemberian kitosan iradiasi terhadap kadar protein darah (protein total, albumin dan globulin) pada ayam ras petelur berdasarkan hasil penelitian ini dapat dilihat pada Tabel 2 berikut.

Tabel 2. Hasil Uji Beda *Contras Orthogonal* terhadap Rata-rata Kadar Protein Darah (Protein Total, Albumin dan Globulin)

Perlakuan	Protein Total	Albumin	Globulin
	mg/dL.....		
P0	6,11 ^a	1,83 ^a	4,29 ^a
P1	7,33 ^b	1,89 ^b	5,44 ^a
P2	7,83 ^b	2,31 ^c	5,51 ^a
P3	7,99 ^{bc}	2,33 ^c	5,66 ^{ab}
P4	6,21 ^{bd}	2,36 ^c	3,85 ^{ac}

Keterangan : Rata-rata yang diikuti superscript unsur abjad yang berbeda pada kolom yang sama menunjukkan perbedaan yang nyata ($P < 0,05$)

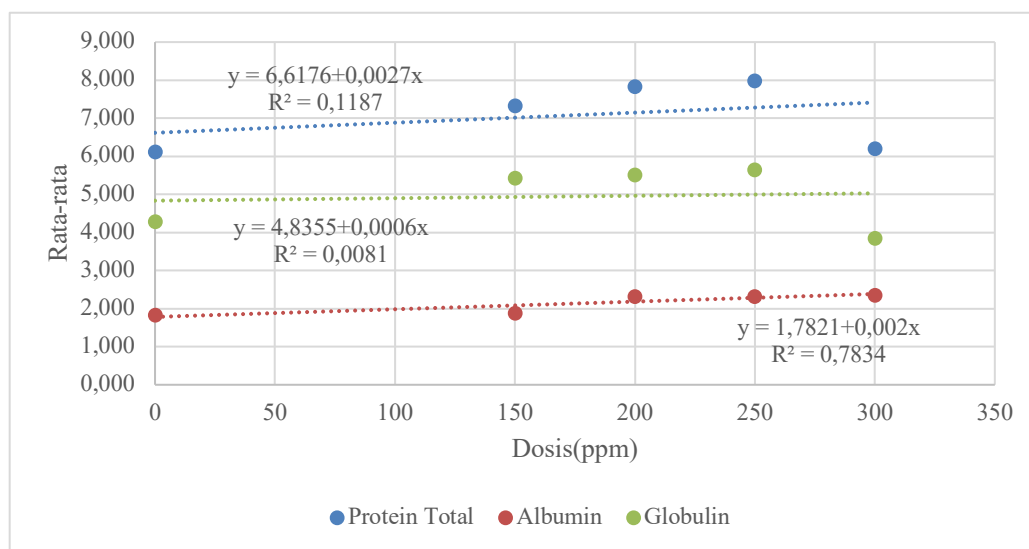
Pengaruh pemberian level kitosan iradiasi pada ayam ras petelur terhadap kadar protein total, albumin dan globulin

berdasarkan hasil penelitian ini, secara keseluruhan menunjukkan pengaruh yang nyata terhadap parameter biokimia darah

tersebut (Tabel 2 dan Ilustrasi 2). Terdapat kecenderungan yang sama bahwa semakin tinggi level pemberian kitosan iradiasi menyebabkan kadar protein total dan albumin plasma darah juga meningkat, meskipun berbeda terhadap respon globulin.

Kadar protein total tanpa pemberian kitosan yaitu 6,11 mg/dL dan kadar albumin sebesar 1,83 mg/dL, keduanya berbeda nyata lebih rendah ($P < 0,05$) dibandingkan dengan kelompok-kelompok ayam yang mendapatkan pemberian kitosan iradiasi dalam air minum, mulai dari level 150 hingga dengan 300 ppm. Tabel 2 juga menunjukkan

bahwa kadar globulin tanpa pemberian kitosan iradiasi yaitu 4,29 mg/dL, tidak berbeda nyata ($P > 0,05$) dibandingkan dengan kelompok-kelompok ayam ras petelur yang mendapatkan perlakuan level kitosan iradiasi melalui air minum. Namun, kelompok ayam yang diberi level kitosan iradiasi 300 ppm menunjukkan kadar globulin plasma darah yaitu 3,85 mg/dL lebih rendah ($P < 0,05$) dibandingkan dengan kelompok ayam ras petelur yang mendapatkan kitosan iradiasi melalui air minum sebesar 250 ppm, yaitu 5,66 mg/dL.



Ilustrasi 2. Grafik Analisis Korelasi Regresi Rata-rata Kadar Protein Darah (Protein Total, Albumin dan Globulin) Plasma Darah Ayam Ras Petelur

Proporsi atau besarnya pengaruh pemberian level kitosan iradiasi terhadap kadar protein total, albumin dan globulin plasma darah ayam ras petelur ditunjukkan melalui persamaan regresi dan koefisien determinasi, sebagaimana ditampilkan pada Ilustrasi 2. Fluktuasi kadar protein total dan kadar albumin hanya mampu dipengaruhi oleh level kitosan iradiasi masing-masing sebesar 0,1187 (11,87%) dan 0,7834 (78,34%). Proporsi pengaruh level kitosan iradiasi tampak sangat kecil terhadap fluktuasi globulin, yaitu sebesar 0,0081 (0,81%). Begitupula persamaan regresi terhadap kadar globulin menunjukkan, pengaruh kuantitas penambahan kitosan iradiasi paling kecil yaitu sebesar 0,0006 ppm. Perbedaan proporsi pengaruh level

kitosan iradiasi terhadap parameter biokimia plasma darah berdasarkan hasil penelitian ini menunjukkan inkonsistensi pengaruh kitosan pada masing-masing parameter yang diukur, baik pada protein total, albumin maupun globulin.

Secara keseluruhan berdasarkan hasil penelitian ini (Tabel 2 dan Ilustrasi 2), tetap menunjukkan kelinieran pengaruh level kitosan iradiasi terhadap peningkatan kadar protein total, albumin dan globulin plasma darah ayam ras petelur. Peningkatan ini terkait dengan fungsi sel-sel liver. Diketahui bahwa sel-sel liver bertanggungjawab terhadap produksi albumin, sehingga semakin tinggi albumin menyebabkan kadar protein total plasma juga meningkat.

Terkait dengan peran kitosan yang diberikan melalui air minum, beberapa peneliti terdahulu telah melaporkan bahwa pemberian kitosan 100-1000 ppm dalam ransum mampu meningkatkan ritme dan laju metabolisme pada ternak, juga menunjukkan respon fisiologik yang baik (Xu dkk., 2013). Peneliti-peneliti yang lain menunjukkan bahwa pemberian kitosan pada hewan dan ternak berdampak terhadap profil biokimiawi hewan dan ternak tersebut. Dalam penelitiannya, ditunjukkan kemampuan kitosan mempengaruhi regulasi biosintesis protein (hormon dan enzim), maupun protein-protein spesifik (Chiu dkk., 2015).

Deregenerasi sel-sel hati (liver) oleh kitosan secara nyata mampu meningkatkan kadar protein total dan albumin. Kuantitas sintesis protein oleh sel-sel liver, meningkat seiring dengan meningkatnya regenerasi populasi sel-sel liver. Perbaikan sel-sel liver merupakan dampak kitosan iradasi, melalui pencegahan aktivasi ROS (Reactive Oxygen Species) oleh kitosan (Carroll dkk., 2016). Senyawa ROS ini merupakan senyawa-senyawa radikal bebas yang menyebabkan kematian sel-sel.

Selain itu, dampak pemberian kitosan dalam mencegah kerusakan sel-sel ditunjukkan dengan mekanisme yang lain, yaitu kemampuan kitosan mengaktifkan realis ATP (Gehrke dkk., 2013), realis ATP menstimulasi pengaktifan nuklear reseptor protein 3 (NLRP3 inflammasome) (Lin dkk., 2014). Sinyal dari NLRP3 menstimulasi ekspresi gen interleukin-1 β (IL-1 β) dan interferon gama (IFN γ). Peningkatan kadar interleukin-1 β (IL-1 β) dan interferon gama (IFN γ) dapat mencegah ROS (Reactive Oxygen Species) dalam menghambat Cyclic Guanine Monophosphate-Adenine Monophosphate Synthase (cGAS) dan Stimulator of Interferon Genes (STING) (Dubensky dkk., 2013). Dengan demikian kitosan iradasi dapat menanggulangi kerusakan sel-sel hati yang terjadi secara efektif.

KESIMPULAN DAN SARAN

Berdasarkan hasil penelitian ini dapat disimpulkan bahwa pemberian kitosan iradasi melalui air minum mampu meningkatkan jumlah leukosit dan limfosit, sebaliknya menurunkan jumlah neutrofil serta meningkatkan kadar protein darah (protein total, albumin dan globulin) plasma darah ayam ras petelur sebagai indikasi meningkatnya imunitas pada ayam ras petelur. Pemberian kitosan iradasi dengan level 250-300 ppm dalam air minum merupakan level yang efektif untuk meningkatkan imunitas pada ayam ras petelur melalui indikasi peningkatan sel darah putih dan protein darah.

UCAPAN TERIMA KASIH

Penelitian ini merupakan kerjasama antara Fakultas Peternakan dengan PAIR-BATAN, oleh karena itu penulis menyampaikan terima kasih kepada Laboratorium Fisiologi Ternak dan Biokimia yang telah membiayai dan mengikutsertakan penulis dalam rangkaian penelitian terkait kerjasama tersebut.

DAFTAR PUSTAKA

- Cai, X., Y. H. Chiu, and Z. J. Chen. 2014. The cGAS-cGAMP-STING Pathway of Cytosolic DNA Sensing and Signaling. *Molecular Cell*. 54:289-296.
- Carroll, E.C., L. Jin, A. Mori, M. N. Wolf, E. Oleszycka, H. B. T. Moran, S. Mansouri, C. P. McEntee, E. Lambe, E. M. Agger, P. Andersen, C. Cunningham, P. Hertzog, K. A. Fitzgerald, A. G. Bowie, and E. C. Lavelle. 2016. *The Vaccine Adjuvant Chitosan Promotes Cellular Immunity Via DNA Sensor Cgas-STING-Dependent Induction of Type I Interferons*. *Immunity*. 44: 1-12.
- Chiu, C.Y., I. L. Chan, T. H. Yang, S. H. Liu and M. T. Chiang. 2015.

- Supplementation of chitosan alleviates high-fat diet-enhanced in rats via adenosine monophosphate (amp)-activated protein kinase activation and inhibition of lipogenesis-associated genes. Journal of Agriculture and Food. Chem.* 63:2979-2988.
- Dubensky, T.W., Jr., D. B. Kanne, and M. L. Leong. 2013. *Ratona, Progres and Development of Vaccines Utilizing STING-Activating Cyclic Dinucleotide Adjuvants. Ther. Adv. Vaccines.* 1:131-143.
- Gehrke, N., C. Mertens, T. Zillinger, J. Wenzel, T. Bald, S. Zahn, T. Tuting, G. Hartmann, and W. Barchet. 2013. *Oxidative Damage of DNA Confers Resistance to Cytosolic Nuclease TREX1 Degradation and Potentiates STING-Dependent Immune Sensing. Immunity.* 39:482-495.
- Lin, Y. C., P. J. Lou, and T. H. Young. 2014. *Chitosan as an Adjuvant-Like Substrate for Dendritic Cell Culture to Enhance Antitumor Effect. Biomaterials* 35, 8867-8875.
- Sudarmono, A. S. 2003. *Pedoman Pemeliharaan Ayam Petelur.* Kanisius. Yogyakarta.
- Sugiharto, S. Turinni Y., Isroli., Endang W., dan Fatan, D. P. 2017. *Intestinal Microbial Ecology and Hematological Parameters of Broiler Fed Cassava Waste Pulp Fermented with Acremonium Charticola. Jurnal Veterinary World.* 10(3) : 324-330.
- Xu, Y., B. Shi, S. Yan, T. Li, Y. Guo, and J. Li. 2013. *Effects of Chitosan on Body Weight Gain, Growth Hormone and Intestinal Morphology in Weaned Pigs. J. Anim. Sci.* Vol. 26, No. 10 : 1484-1489.