

Uji Aktivitas Antibakteri Tepung Cacing Tanah (*Lumbricus rubellus* Hoffmeister) terhadap *Escherichia coli* serta Formulasinya menjadi Sediaan Pakan Kucing Berbentuk Kornet

Gita Ratu Kuswantara, Gita Cahya Eka Darma, Bayu Febram Prasetyo
Prodi Farmasi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Islam Bandung,
Bandung, Indonesia
email: gitaratuk@gmail.com, gitacahyaekadarma@unisba.ac.id, bayupr@apps.ipb.ac.id

ABSTRACT: Diarrhea is the most common digestive disorder for cats which can cause cats to become dehydrated until death. *Escherichia coli* is one of the infectious agents that be able to cause diarrhea to cats. Earthworms are known to have a bioactive component, which is lumbricin the one of bioactive components that has antibacterial activity. This research aimed to determine the antibacterial activity potential of earthworm flour and make cat food preparations containing earthworm flour. Earthworm flour was tested by in vitro, antibacterial activity test used the agar diffusion with cup plate technique. The results of the antibacterial activity test showed the formation of inhibitory zones at concentrations of 5, 10 and 15% against *Escherichia coli* bacteria, with a minimum inhibitory concentration (MIC) at 5% concentration. The best formula for a cat food base contained 40% chicken meat, 30% tuna and 10% tempeh. The best cat food formula is the formula that has been added by 5% concentration of earthworm flour. The formulated cat food is cornet form or semi-solid, brown in color, has a distinctive odor to earthworm flour and has an optimum storage temperature at 4°C. Cat food preparation were stated to have good physical stability based on organoleptic test and storage stability test.

Keywords: Earthworm flour (*Lumbricus rubellus* Hoffmeister), Antibacterial, MIC, Cat food.

ABSTRAK: Diare merupakan gangguan pencernaan paling umum pada kucing yang dapat menyebabkan kucing mengalami dehidrasi hingga sampai kematian. Bakteri *Escherichia coli* salah satu agen infeksi yang dapat menyebabkan diare pada kucing. Cacing tanah diketahui memiliki komponen bioaktif, yaitu lumbricin yang mempunyai aktivitas antimikroba. Penelitian ini bertujuan untuk menentukan potensi aktivitas antibakteri dari tepung cacing tanah dan membuat sediaan pakan kucing mengandung tepung cacing tanah. Tepung cacing tanah dilakukan pengujian aktivitas antibakteri secara *in vitro* menggunakan metode difusi agar teknik sumuran. Hasil pengujian aktivitas antibakteri menunjukkan terbentuknya zona hambat pada konsentrasi 5, 10 dan 15% terhadap bakteri *Escherichia coli*, dengan konsentrasi hambat minimum (KHM) pada konsentrasi 5%. Formula terbaik basis pakan kucing mengandung daging ayam 40%, ikan tongkol 30% dan tempe 10%. Formula terbaik sediaan pakan kucing dengan penambahan tepung cacing tanah pada konsentrasi 5%. Sediaan pakan kucing yang dihasilkan berbentuk kornet atau setengah padat, berwarna coklat, berbau khas tepung cacing tanah dan memiliki suhu optimum penyimpanan pada suhu 4°C. Sediaan dinyatakan memiliki stabilitas fisik yang baik berdasarkan pengujian organoleptis dan stabilitas penyimpanan.

Kata Kunci: Tepung cacing tanah (*Lumbricus rubellus* Hoffmeister), Antibakteri, KHM, Pakan kucing

1. PENDAHULUAN

Kucing merupakan hewan yang sangat digemari karena memiliki daya adaptasi yang baik dan dikenal sebagai hewan yang dipelihara oleh Rasulullah SAW. Perlu diperhatikan dalam

memelihara kucing, yaitu pemahaman pemelihara terhadap kesehatan tubuh kucing.

Kesehatan tubuh kucing bergantung kepada asupan nutrisi yang diberikan oleh pemelihara, asupan nutrisi berguna untuk memelihara kondisi normal tubuh, kesehatan dan pertumbuhan.

Menurut *National Research Council* (2006:3), angka kecukupan protein dan lemak yang direkomendasikan setiap harinya pada berat kucing normal 4 kg/bb, yaitu 12,5 g protein dan 5,5 g lemak. Makanan kucing tidak perlu memiliki lebih dari 10% serat. Bentuk makanan kucing yang paling umum dijumpai adalah makanan kering (*dry food*), basah (*wet food*) dan kalengan (*canned*).

Aktivitas yang diperlihatkan kucing dapat menandakan adanya gangguan kesehatan terhadap kucing, sehingga perlu diperhatikan pemahaman pemelihara agar dapat mengatasi penyakit infeksi dan penanganannya. Gangguan kesehatan yang umum pada kucing dengan tingkat prevalensi 45%, yaitu gangguan pencernaan (*Cornell Feline Health Centre*, 2002). Diare merupakan gangguan pencernaan paling umum pada kucing. Salah satu agen infeksi yang dapat menyebabkan diare pada kucing, yaitu bakteri *Escherichia coli* (Triakoso, 2016:44). Diare terkadang dianggap sepele oleh pemelihara sedangkan jika diare yang frekuensinya sering dapat menyebabkan kucing mengalami dehidrasi hingga sampai kematian.

Makanan kucing produk lokal yang tersedia dipasaran rata-rata hanya mengutamakan terhadap pemenuhan energi pada kucing, sedangkan dari segi kesehatan kucing kurang ketersediaannya. Ketersediaan pakan kucing yang dapat meningkatkan kesehatan kucing di Indonesia masih didominasi oleh produk impor. Informasi penelitian mengenai pakan kucing yang memiliki aktivitas antibakteri cukup jarang ditemukan. Bahan hewani yang memiliki aktivitas antibakteri salah satunya, yaitu cacing tanah. Cacing tanah (*Lumbricus rubellus*) mengandung gizi yang cukup tinggi terutama protein 64-76% dari bahan kering. Kandungan gizi lainnya meliputi lemak 7-10%, kalsium 0,55%, fosfor 1% dan serat kasar 1,08% (Palungkun, 1999:12-13). Cacing tanah mengandung komponen bioaktif lumbricin yang mempunyai aktivitas antimikroba (Cho *et al.*, 1998), dilihat dari kandungan yang terdapat dalam cacing tanah dan kurangnya ketersediaan pakan kucing produk lokal yang memiliki manfaat tambahan di samping nilai gizinya membuat penulis tertarik untuk melakukan penelitian terhadap formulasi pakan kucing berbentuk kornet menggunakan tepung cacing tanah (*Lumbricus rubellus* Hoffmeister) sebagai pakan yang dapat

menunjang kesehatan ketika kucing mengalami diare.

Berdasarkan latar belakang di atas dapat rumusan masalah penelitian ini, yaitu apakah tepung cacing tanah (*Lumbricus rubellus* Hoffmeister) mampu menghambat bakteri penyebab diare pada kucing, yaitu bakteri *Escherichia coli*, berapa persentase kandungan nutrisi dari basis sediaan pakan kucing yang memiliki formula terbaik dan apakah sediaan pakan kucing mengandung tepung cacing tanah (*Lumbricus rubellus* Hoffmeister) memiliki stabilitas fisik yang baik.

Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui aktivitas antibakteri dari tepung cacing tanah (*Lumbricus rubellus* Hoffmeister) terhadap bakteri *Escherichia coli*, mengetahui kandungan nutrisi dari basis sediaan pakan kucing yang memiliki formula terbaik dan memperoleh sediaan pakan kucing yang mengandung tepung cacing tanah (*Lumbricus rubellus* Hoffmeister) yang memiliki stabilitas fisik yang baik.

2. LANDASAN TEORI

Kucing lokal atau kucing kampung (*Felis domestica*) sulit disebut sebagai kucing bergalur murni secara genetik karena perkawinan hewan ini sulit diamati dan dikontrol, sehingga keturunan yang dihasilkan sudah tergolong campuran yang tidak jelas (Endrawati, 2005).

Pakan kucing komersial tersedia dalam berbagai bentuk. Jenis yang paling umum adalah kering, basah, dan kalengan. Kucing membutuhkan beberapa jenis nutrisi yang berbeda untuk bertahan hidup: asam amino dari protein, asam lemak dan karbohidrat, vitamin, mineral, dan air. Angka kecukupan protein dan lemak yang direkomendasikan setiap harinya pada kucing dewasa dengan berat 4 kg/bb, yaitu 12,5 g protein dan 5,5 g lemak. Makanan kucing tidak harus memiliki lebih dari 10% serat, karena kucing adalah karnivora yang memiliki usus pendek yang panjang, (*National Research Council*, 2006:2,12).

Keuntungan makanan kering (*dry food*) meliputi biaya lebih rendah atau murah, dapat disimpan untuk jangka waktu yang lama dibandingkan makanan dalam bentuk lain. Makanan basah (*wet food*) memiliki kenyamanan yang baik dalam penggunaan, mudah dicerna, lezat dan palatabilitas yang lebih tinggi dari makanan kering. Makanan kaleng (*canned*) mudah dicerna,

dan lezat. Bahan apapun dapat dimasukkan dalam makanan kaleng karena panas dan tekanan diterapkan pada kaleng disegel untuk memastikan sterilitas. (Buffington *et al.*, 2004:40-41).

Kornet dibagi menjadi dua, yaitu kornet daging sterilisasi dan non sterilisasi. Kornet daging sterilisasi merupakan produk yang dibuat dari potongan daging ternak atau unggas, segar atau beku, dapat dicampur dengan daging bagian kepala maupun jantung, dengan proses *curing*, menggunakan atau tanpa penambahan bahan pangan lain, dan bahan tambahan pangan yang diizinkan, dikemas dalam wadah tertutup kedap udara, dan diproses dengan sterilisasi. Kornet daging non sterilisasi sama dengan kornet daging dengan sterilisasi yang membedakan pada prosesnya tanpa sterilisasi dan dikemas dalam wadah tertutup (Badan Standarisasi Nasional, 2015:2). Kornet daging sapi merupakan produk makanan semipadat yang dapat dibuat dari daging sapi, kentang, bahan *curing*, bumbu-bumbu dan bahan pilihan lainnya (Jackson dan Shinn, 1979 dalam Matondang, 2015).

Pengujian aktivitas antibakteri dengan metode difusi agar plate dapat dilakukan dengan cara Kirby Bauer dengan teknik *disc diffusion* (cakram disk) atau dapat menggunakan teknik sumuran. Pengujian aktivitas antibakteri dengan teknik sumuran dilakukan dengan cara membuat suatu lubang atau sumuran pada media agar plate sehingga antibiotik dapat dimasukkan (Khusuma dkk., 2019).

Lumbricin dinyatakan mempunyai aktivitas antimikroba berspektrum luas, yaitu dapat menghambat bakteri Gram positif dan Gram negatif maupun fungi. *Lumbricus rubellus* mengandung komponen bioaktif lumbricin yang mempunyai aktivitas antimikroba golongan peptida antimikroba (Cho *et al.*, 1998).

Diare merupakan meningkatnya frekuensi dan perubahan konsistensi feses. Kondisi tersebut menggambarkan adanya gangguan umum penyakit intestinal, pada kucing muda biasanya terjadi akibat makanan atau infeksi. Gejala klinis tergantung pada jumlah parasite dalam usus. Agen penginfeksi meliputi virus (parvovirus, coronavirus, rotavirus), bacterial (*Escherichia coli*, *Salmonella*, *Bacillus piliformis*, *Clostridium*, *Campylobacter*), rickettsia (Neorickettsia), fungi dan parasit (Triakoso, 2016:43-444).

METODOLOGI PENELITIAN

Tepung cacing tanah yang digunakan sebagai bahan aktif diperoleh CV. Bengkelden Agrobisnis, Cimahi, Jawa Barat. Tahap penelitian ini meliputi pengumpulan bahan, determinasi, pengujian aktivitas antibakteri, penentuan KHM serta analisis kandungan tepung cacing tanah.

Pengujian aktivitas antibakteri dan KHM dilakukan pada tepung cacing tanah terhadap bakteri *Escherichia coli* secara *in vitro* menggunakan metode difusi agar cara sumuran, serta dilakukan analisis kandungan tepung cacing tanah. Tahap selanjutnya dilakukan optimasi basis pakan dengan variasi komposisi yang berbeda pada tiap formula untuk mendapatkan formula basis terbaik, setelah didapatkan formula dengan basis terbaik dilakukan proses formulasi sediaan pakan kucing yang mengandung tepung cacing tanah. Pada tahap akhir dilakukan evaluasi sediaan pakan kucing meliputi organoleptis dan stabilitas.

3. HASIL PENELITIAN DAN PEMBAHASAN

Pengumpulan Bahan dan Determinasi

Tepung cacing tanah yang diperoleh dari CV. Bengkelden Agrobisnis, Cimahi, Jawa Barat dilakukan determinasi di Laboratorium Zoologi, Sekolah Ilmu dan Teknologi Hayati ITB. Hasil determinasi menunjukkan bahwa sampel hewan yang digunakan adalah *Lumbricus rubellus* Hoffmeister dari suku Lumbricidae dengan nama umum cacing tanah merah.

Pengujian Aktivitas Antibakteri Tepung Cacing Tanah

Pengujian aktivitas antibakteri dilakukan dengan metode difusi agar cara sumuran, aktivitas antibakteri ditunjukkan dengan terbentuknya zona hambat di sekitar lubang sumuran yang telah diisi oleh bahan uji atau tepung cacing tanah yang telah diencerkan. Konsentrasi bahan uji yang digunakan, yaitu 1, 5, 10 dan 15%. Bahan uji atau tepung cacing tanah diencerkan dengan pelarut dimetilsulfoksida (DMSO). Tetrasiklin digunakan sebagai kontrol positif, dimana kontrol positif digunakan sebagai pembanding. Dimetilsulfoksida (DMSO) digunakan sebagai kontrol negatif pada pengujian, kontrol negatif digunakan untuk membuktikan bahwa tidak adanya aktivitas pelarut terhadap bakteri uji.

Tabel 1. Hasil uji aktivitas antibakteri

Bahan Uji	Konsentrasi	Rata-rata diameter hambat (mm) ± SD
		<i>Escherichia coli</i>
Tepung Cacing Tanah	1%	0
	5%	10,775 ± 0,106
	10%	12,24 ± 0,127
	15%	14,59 ± 0,226
	DMSO	0
	Tetrasiklin	36,335 ± 0,163

Berdasarkan dari hasil pengujian yang dilakukan menunjukkan bahwa tepung cacing tanah memiliki aktivitas antibakteri terhadap bakteri *Escherichia coli*, ditunjukkan dengan terbentuknya zona hambat pada konsentrasi 5, 10, 15% tepung cacing tanah. Sementara itu, pada konsentrasi 1% tidak menunjukkan adanya diameter hambat atau tidak memiliki aktivitas antibakteri.

Menurut Davis and Stout (1971), kategori kekuatan daya antibakteri menyatakan diameter zona hambat >20 mm dikategorikan sangat kuat, diameter zona hambat 10-20 mm dikategorikan kuat, diameter zona hambat 5-10 mm dikategorikan sedang dan diameter zona hambat <5 mm dikategorikan lemah. Berdasarkan kategori tersebut, maka daya hambat yang dihasilkan tepung cacing tanah terhadap bakteri *Escherichia coli* dikategorikan memiliki daya hambat kuat karena menghasilkan zona hambat lebih dari 10 mm. Cacing tanah memiliki kandungan komponen bioaktif lumbricin yang mempunyai aktivitas antimikroba termasuk dalam golongan peptida antimikroba (Cho *et al.*, 1998). Peptida antimikroba memiliki kemampuan untuk merusak membran plasma bakteri (Willey *et al.*, 2009).

Penetapan Konsentrasi Hambat KHM

Tabel 2. Hasil pengujian KHM

Bahan Uji	Konsentrasi	Rata-rata diameter hambat (mm) ± SD
		<i>Escherichia coli</i>
Tepung Cacing Tanah	2%	0
	3%	0
	4%	0
	5%	10,49 ± 0,198
	DMSO	0
	Tetrasiklin	31,97 ± 0,820

Berdasarkan dari hasil pengujian diketahui bahwa konsentrasi terkecil yang masih dapat menghambat pertumbuhan bakteri *Escherichia coli*, yaitu konsentrasi 5%, sedangkan konsentrasi 2, 3 dan 4% tidak menunjukkan adanya diameter hambat, hal tersebut dapat dikarenakan konsentrasi tersebut terlalu kecil untuk dapat menghambat pertumbuhan bakteri uji.

Optimasi Basis Pakan Kucing

Tabel 3. Formula optimasi basis pakan kucing

Bahan	Formula					
	F1 (%)	F2 (%)	F3 (%)	F4 (%)	F5 (%)	F6 (%)
Daging Ayam	40	40	35	35	30	30
Ikan Tongkol	30	25	30	25	30	25
Tempe	10	10	10	10	10	10
Air Kaldu	ad 100	ad 100	ad 100	ad 100	ad 100	ad 100

Basis pakan kucing terdiri dari variasi antara daging ayam dan ikan tongkol. Keenam formula basis dievaluasi secara fisik meliputi organoleptis, stabilitas penyimpanan dan analisis kandungan nutrisi basis. Berdasarkan hasil evaluasi dari keenam basis, sediaan pakan kucing dibuat dengan formula F1 sebagai basis terbaik karena memiliki konsistensi sangat kental sebagaimana pendekatan sediaan ini pada bentuk kornet maupun bentuk setengah padat, sedangkan pada formula F2 dan F3 memiliki konsistensi kental serta formula F4, F5 dan F6 memiliki konsistensi agak cair. Kandungan nutrisi basis formula F1 lebih tinggi dibandingkan formula lainnya untuk kandungan protein dan lemak, yaitu 16,82 g protein, 8,42 g lemak dan serat kasar tidak lebih dari 10%. Pengujian stabilitas penyimpanan basis pakan kucing dilakukan pada tiga suhu meliputi suhu 40°C, ±20-25°C dan 4°C selama 1 minggu dan dilakukan pengamatan setiap hari. Basis pakan kucing memiliki suhu optimum penyimpanan pada suhu 4°C atau di lemari pendingin.

Tabel 4. Hasil uji organoleptis terhadap basis

Pemerian	Formula					
	F1	F2	F3	F4	F5	F6
Bau	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal
Konsistensi	Sangat kental	Kental	Kental	Agak cair	Agak cair	Agak cair
Warna	Coklat muda	Coklat muda	Coklat muda	Putih kecoklatan	Putih kecoklatan	Putih kecoklatan

Formulasi Sediaan Pakan Kucing mengandung Tepung Cacing Tanah

Tabel 5. Formulasi Sediaan Pakan Kucing

Bahan	Formula		
	F1A (%)	F1B (%)	F1C (%)
Tepung Cacing Tanah (TCT)	15	10	5
Daging Ayam	40	40	40
Ikan Tongkol	30	30	30
Tempe	10	10	10
Air Kaldu	ad 100	ad 100	ad 100

Formula sediaan pakan kucing dibuat dengan

penambahan tepung cacing tanah pada konsentrasi yang telah didapat dari pengujian aktivitas antibakteri dengan basis yang terpilih. Pembuatan sediaan pakan kucing dilakukan dengan teknik *pressure cooker* dan *boil* terhadap bahan tambahan. Tepung cacing tanah ditambahkan ke dalam basis pakan kucing hingga homogen dan dikemas menggunakan kemasan primernya dengan menggunakan kemasan aluminium foil untuk produk makanan.

Evaluasi Sediaan Pakan Kucing

Pada pengujian organoleptis sediaan pakan kucing dilakukan untuk mengetahui wujud fisik dari sediaan pakan kucing meliputi organoleptis dan stabilitas penyimpanan. Sediaan pakan kucing yang mengandung tepung cacing tanah yang dihasilkan pada formula F1A berwarna hitam, formula F1B berwarna agak kehitaman dan formula F1C berwarna coklat kehitaman. Bau yang dihasilkan dari seluruh formula memiliki bau khas tepung cacing tanah dan konsistensi yang dihasilkan dari seluruh formula, yaitu memiliki konsistensi yang kental sebagaimana pendekatan sediaan ini pada bentuk kornet maupun bentuk setengah padat. Berdasarkan hasil pengujian organoleptis yang diamati penampilan fisik sediaan secara visual menunjukkan bahwa formula terbaik dari ke tiga formula, yaitu formula F1C karena dilihat dari warna yang dimiliki formula F1C secara penampilan warna coklat akan lebih diterima oleh pemelihara dari segi penampilan. Menurut Jones (2000:109-110) dalam Wahyuni dkk. (2019) beberapa faktor yang mempengaruhi kualitas makanan agar dapat diterima, yaitu meliputi warna, penampilan, bentuk, tekstur, aroma dan rasa.

Pengujian stabilitas penyimpanan sediaan pakan kucing dilakukan pada suhu 4°C dan suhu ±20-25°C selama 1 minggu dan dilakukan pengamatan setiap hari. Parameter yang diamati dari pengujian ini, yaitu secara organoleptis. Berdasarkan hasil pengamatan stabilitas penyimpanan selama 1 minggu menunjukkan bahwa suhu optimum penyimpanan sediaan pakan kucing pada suhu 4°C atau penyimpanan di lemari pendingin, serta menunjukkan bahwa sediaan pakan kucing yang dibuat memiliki stabilitas fisik yang baik.

4. KESIMPULAN

Berdasarkan pembahasan dalam penelitian ini, peneliti menyimpulkan hasil penelitian sebagai

berikut:

1. Tepung cacing tanah (*Lumbricus rubellus* Hoffmeister) dapat menghambat bakteri *Escherichia coli* penyebab diare pada kucing dengan konsentrasi 5, 10 dan 15%, serta Konsentrasi Hambat Minimum (KHM) tepung cacing tanah terhadap bakteri *Escherichia coli* terdapat pada konsentrasi 5%.
2. Kandungan nutrisi pada basis sediaan pakan kucing terbaik, yaitu 16,82 g protein, 8,42 g lemak dan 0,507 g serat kasar.
3. Sediaan pakan kucing yang mengandung tepung cacing tanah telah memiliki stabilitas fisik yang baik. Formula F1C merupakan formula sediaan pakan kucing paling baik dari segi penampilan fisik yang terdiri dari tepung cacing tanah 5%, daging ayam 50%, ikan tongkol 30% dan tempe 10%. Sediaan yang dihasilkan berbentuk kornet atau setengah padat, berwarna coklat, berbau khas tepung cacing tanah dan memiliki suhu optimum penyimpanan pada suhu 4°C.

SARAN

Perlu dilakukan penelitian lanjutan untuk analisis Angka Kecukupan Gizi (AKG) sediaan pakan kucing mengandung tepung cacing tanah, evaluasi sesuai syarat mutu yang telah ditetapkan Standar Nasional Indonesia (SNI) dan pengujian aktivitas antibakteri sediaan pakan kucing mengandung tepung cacing tanah terhadap bakteri *Escherichia coli*, serta dilakukan penelitian lanjutan palatabilitas kucing untuk mengetahui tingkat penerimaan pada kucing.

DAFTAR PUSTAKA

- Badan Standarisasi Nasional. (2015). *Standar Nasional Indonesia (SNI) Kornet Daging (SNI 3775:2015)*, Badan Standarisasi Nasional, Jakarta, Hal:2.
- Buffington, C. T., Holloway, C., & Abood, S. K. (2004). *Manual of veterinary dietetics*, WB Saunders, Elsevier Science, Page:40-41.
- Cho, J. H., Park, C. B., Yoon, Y. G., & Kim, S. C. (1998). Lumbricin I, a novel proline-rich antimicrobial peptide from the earthworm: purification, cDNA cloning and molecular characterization, *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular basis of disease*, 1408(1):67-76.

- Cornell Feline Health Center. (2002). *Gastrointestinal Parasites of Cat*, Cornell University, Collage of Veterinary Medicine, Ithaca, New York.
- Davis, W.W. and T.R. Stout. (1971). Disc Plate Methods of Microbiological Antibiotic Assay, *Applied Microbiology*, 22 (1): 659-665.
- Endrawati, D. (2005). *Studi Identifikasi Golongan Darah dan Kemungkinan Hubungannya Dengan Warna Rambut Pada Kucing Kampung (Felis familliaris)* [Skripsi], Fakultas Kedokteran Hewan Institut Pertanian Bogor, Bogor.
- Khusuma, A., Safitri, Y., Yuniarni, A., & Rizki, K. (2019). Uji Teknik Difusi Menggunakan Kertas Saring Media Tampung Antibiotik dengan Escherichia Coli Sebagai Bakteri Uji, *Jurnal Kesehatan Prima*, 13(2), 151-155.
- Matondang, N. S. (2015). *Penentuan Kadar Nitrit dan Nitrat pada Kornek Daging Sapi dan Daging Sapi Asap Secara Spektrofotometri Sinar Tampak* [Skripsi], Fakultas Farmasi Universitas Sumatera Utara, Medan.
- National Research Council. (2006). Nutrient Requirements of Dogs and Cats, *National Academies Press*, Page:2,3,12.
- Palungkun, R. (1999). *Sukses Berternak Cacing Tanah (Lumbricus rumbellus)*, Penebar Swadaya, Depok, Hal:12-13.
- Triakoso, N. (2020). *Buku Ajar Ilmu Penyakit Dalam Veteriner Anjing dan Kucing*, Airlangga University Press, Hal:43-44.
- Wahyuni, F., Usman, B., & Safwadi, I. (2019). Analisa Pengaruh Kualitas Makanan dan Citra Merek Terhadap Keputusan Pembelian Konsumen, *Jurnal Humaniora: Jurnal Ilmu Sosial, Ekonomi dan Hukum*, 3(2), 142-154.
- Willey J.M., L.M. Sherwood, and C.J. Woolverton. (2009). *Prescott's Principles of Microbiology*, McGraw-Hill International Edition, New York.