

PENGARUH ASAM SITRAT DAN FITASE *Bacillus subtilis* HOLIWOOD GRESIK PADA JAGUNG (*Zea mays* L.) TERHADAP DAYA CERNA PROTEIN DAN BIOAVAILABILITAS ZINK

THE EFFECT OF CITRIC ACID AND PHYTASE *Bacillus subtilis* HOLIWOOD GRESIK IN CORN (*Zea mays* L.) TOWARDS PROTEIN DIGESTIBILITY AND ZINC BIOAVAILABILITY

Amalia Khufyatun Nisa* dan Leny Yuanita

Jurusan Kimia FMIPA, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam

Universitas Negeri Surabaya, Jl. Ketintang, Surabaya, 60231

e-mail: adeliaumarsaid@gmail.com

Abstrak. Tujuan penelitian ini adalah untuk mengetahui pengaruh asam sitrat dan fitase *Bacillus subtilis* Holiwood Gresik pada jagung (*Zea mays* L.) terhadap kadar fitat, daya cerna protein dan bioavailabilitas Zn. Fitase yang digunakan merupakan ekstrak kasar dari isolat *Bacillus subtilis* HG. Rancangan penelitian yang digunakan adalah Post Test-Only Control Group Design. Tahapan penelitian: 1) untuk analisis kadar fitat jagung dengan variasi bahan perendam berupa asam sitrat 9%, 50 mL/50 g (12 jam) dan fitase 250 µL/50 g (30 menit). P₁ adalah jagung tanpa perendaman (kontrol), P₂ perendaman asam sitrat dan P₃ kombinasi perendaman asam sitrat, kemudian fitase., 2) untuk analisis daya cerna protein-Protein Efficiency Ratio (PER) pada *Mus musculus*, digunakan jagung hasil tahap I. Data yang diperoleh dianalisis dengan Anava satu arah ($\alpha = 0.05$). Hasil: 1) ada pengaruh variasi bahan perendam terhadap kadar fitat jagung. Kadar fitat secara berturut-turut dari P₁, P₂, dan P₃ adalah 11.378, 3.975, and 1.402 (mg/g)., 2) penurunan kadar fitat jagung tahap I dapat meningkatkan PER dan bioavailabilitas Zn *Mus musculus*. Nilai PER dan % bioavailabilitas Zn secara berturut-turut dari P₁, P₂ dan P₃ adalah 1.9 dan 12.31; 2.5 dan 25.22; 2.7 dan 36.68.

Kata Kunci: Asam sitrat, fitase, Protein Efficiency Ratio, bioavailabilitas Zn.

Abstract. The aim of this research was describe the effect of variation soaking with citric acid and phytase *Bacillus subtilis* Holiwood Gresik in corn toward concentration of phytate, protein digestibility, and Zn bioavailability. In this research used crude extract of *Bacillus subtilis* HG isolate. Research design used Post Test-Only Control Group Design. Phases of research: 1) for analyze phytate concentration in corn with variation soaking were citric acid 9%, 50 mL/50 g (12 hour) and phytase 250 µL/50 g (30 minutes). P₁ was corn without soaking as control, P₂ soaking with citric acid, and P₃ combination soaking with citric acid, then phytase., 2) for analyze protein digestibility-Protein Efficiency Ratio (PER) and Zn bioavailability *Mus musculus*, used corn result phase I. Data were analyze by One-way Anava ($\alpha = 0.05$). Results: 1) there was effect of variation soaking toward phytate concentration in corn. Phytate concentration from P₁, P₂, and P₃ were 11.378, 3.975, and 1.402 (mg/g) respectively., 2) decreasing concentration of phytate in phase I obtained increasing protein digestibility and Zn bioavailability *Mus musculus*. PER value and % Zn bioavailability from P₁, P₂, and P₃ were 1.9 and 12.31; 2.5 and 25.22; 2.7 and 36.68 repectively.

Keywords: citric acid, phytase, Protein Efficiency Ratio, bioavailability Zn.

PENDAHULUAN

Jagung (*Zea mays* L.) merupakan salah satu tanaman pangan dunia yang terpenting selain gandum dan padi. Selain itu juga dibutuhkan oleh pabrik makanan ternak [1]. Seiring dengan pesatnya perkembangan industri ternak, maka semakin tinggi pula

permintaan jagung sebagai bahan baku pakan ternak [2].

Jagung mengandung pati, protein, asam lemak, dan mineral esensial seperti K, Na, P, Ca, Fe, dan Zn. Jagung juga mengandung senyawa antinutrisi berupa asam fitat sebesar

0.29% [3] yang dapat mengikat protein dan ion logam seperti Zn membentuk kompleks fitat-protein dan fitat-Zn yang sukar larut [4]. Sehingga akan memberikan efek yang kurang baik pada tubuh.

Protein merupakan salah satu makromolekul utama yang dibutuhkan tubuh. Defisiensi protein menyebabkan terganggunya pertumbuhan dan berbagai reaksi dalam tubuh. Zn merupakan mineral yang dibutuhkan dalam berbagai reaksi metabolisme. Defisiensi Zn menyebabkan penyakit genetik, stress traumatik, anorexia [5].

Selama ini masalah tersebut belum menjadi perhatian banyak pihak terkait, baik oleh industri pakan, peternakan maupun oleh konsumen, sehingga perlu adanya upaya untuk meminimalkan kadar fitat dalam jagung agar dapat meningkatkan kualitas gizi jagung terutama daya cerna protein dan bioavailabilitas Zn. Langkah yang dapat dilakukan untuk meminimalkan kadar fitat dalam jagung antara lain perendaman (dengan beberapa pelarut seperti air dan asam-asam organik), pemanasan, perebusan, pengukusan, fermentasi, maupun melalui penambahan enzim fitase [6].

Pada penelitian ini, penurunan kadar fitat jagung dilakukan melalui perendaman dengan variasi bahan perendam. Jagung yang telah direndam dianalisis kadar fitatnya kemudian digunakan sebagai salah satu komponen pembuat pakan *Mus musculus*. Pada *Mus musculus* tersebut dilakukan analisis daya cerna protein dan bioavailabilitas Zn.

METODE PENELITIAN

Penelitian ini terdiri dari dua tahap, tahap I adalah pemberian variasi bahan perendam pada jagung, tahap II adalah penggunaan jagung hasil penelitian Tahap I pada *Mus musculus* untuk observasi daya cerna protein dan bioavailabilitas Zn. Penelitian diawali dengan mengekstrak fitase dari *Bacillus subtilis* HG, perendaman jagung dengan variasi bahan perendam (asam sitrat dan fitase), analisis kadar fitat jagung, pembuatan pakan dengan jagung hasil Tahap I (kadar fitat berbeda) sebagai salah satu komponen pakan, pemberian pakan *Mus musculus*, observasi untuk daya cerna protein dan bioavailabilitas Zn). Pakan yang diberikan

pada *Mus musculus* adalah pakan yang iso-protein dan iso-kalori dengan rata-rata kandungan protein 12.2% dan kalori 3664.1 kal/kg pakan. Dasar penyusunan pakan adalah 70% pati, 10% protein, 8% lemak, 1% vitamin, 5% mineral, 5% air dan 1% serat. Data yang diperoleh dianalisis dengan Anova satu arah ($\alpha=0.05$).

Alat:

Gelas kimia, gelas ukur, labu ukur, pipet ukur, tabung reaksi, rak tabung reaksi, vial, neraca, labu ukur, spatula, *shaker*, *sentrifuge*, penangas air, neraca, tanur, cawan pengabuh, Spektrofotometer UV-Vis, dan AAS.

Bahan:

Serbuk Fe, HCl, sampel tepung jagung lolos ayakan 100 mesh, TCA, FeCl₃, Na₂SO₄, akuades, NaOH, hidrosilamin, *o*-phenantrolin, Na-asetat, reagen Biuret, BSA, akuades, TCA, etil eter, sampel feses, HCl pekat, HNO₃ pekat, akuadem.

Prosedur Penelitian

Persiapan Sampel Jagung

50 gram butiran jagung, dicuci bersih dengan akuades. Kemudian jagung ditimbang, lalu: 1) tanpa diberi perendam (P₁), 2) direndam dalam 50 mL larutan asam sitrat 9% selama 12 jam (P₂), 3) direndam dalam 50 mL larutan asam sitrat 9%, 12 jam kemudian fitase 250 μ L/50 mL 30 menit (P₃). selanjutnya dicuci, kemudian ditiriskan, dioven sampai kering pada suhu 50-60 °C. Setelah itu jagung dihaluskan lalu diayak sampai lolos ayakan 100 mesh.

Penentuan Kadar Fitat

Penentuan kadar fitat dilakukan dengan menggunakan metode Metode Makower, dan Wheeler dan Farrel [7].

Penentuan Kadar Protein Pakan

Penentuan kadar protein dilakukan dengan menggunakan spektrofotometer UV-Vis menggunakan reagen biuret [8]

Penentuan Kadar Zn Pakan dan Feses

Penentuan kadar Zn pada pakan dan feses dilakukan dengan menggunakan

spektrofotometer serapan atom (AAS), dengan sampel awal didestruksi terlebih dahulu [9].

HASIL DAN PEMBAHASAN

Kadar Fitat

Hasil analisis kadar fitat pada penelitian ini adalah sebagai berikut:

Tabel 1. Kadar Fitat (mg/g) pada Jagung dengan Variasi Bahan Perendam

Perlakuan	Kadar Fitat (mg/g)	%Penurunan Fitat
P ₁	11.378 ^a	-
P ₂	3.975 ^b	65.06
P ₃	1.402 ^c	87.68
F= 283.580, p= 0.000		

Keterangan: huruf yang berbeda pada kolom dan baris menunjukkan perbedaan secara signifikan

Data kadar fitat berdistribusi normal dan homogen, dan analisis Anova satu arah menunjukkan nilai signifikan kurang dari 0.05. Hal tersebut berarti bahwa ada pengaruh variasi bahan perendam terhadap kadar fitat jagung.

Tabel 1 pada perendaman dengan kombinasi asam sitrat kemudian fitase menghasilkan penurunan kadar fitat terbesar yaitu 87.68%. Hal tersebut dikarenakan gugus karboksil (COO⁻) dan hidroksil (OH⁻) yang dimiliki asam sitrat dapat mengkelat logam pada senyawa fitat [10].

Hal tersebut diperkuat dengan hasil penelitian [11] yang menyatakan bahwa asam sitrat merupakan agen pengkelat logam Ca, Zn, Mg, dan Mn yang paling efisien. Begitu juga dengan hasil penelitian [12] menunjukkan bahwa asam sitrat dapat membentuk kompleks dengan logam yang terikat dengan fitat sehingga perendaman jagung dengan asam sitrat akan menurunkan jumlah fitat.

Selain menggunakan asam sitrat, penurunan kadar fitat juga dapat dilakukan oleh fitase. Degradasi fitat oleh fitase terjadi melalui reaksi hidrolisis.

Hidrolisis fitat oleh fitase terjadi pada C3 atau C6 dari bentuk mio-inositol heksakisfosfat menjadi bentuk lebih sederhana, yaitu: D-inositol(1,2,4,5,6)P5 menjadi inositol(2,4,5,6)P4 menjadi inositol(2,4,6)P3 atau inositol(2,4,5)P3 atau

inositol(1,2,6)P3 dan akhirnya menjadi inositol-2-P, sehingga nutrisi yang terikat pada asam fitat terhidrolisis dan lepas dari ikatannya [13].

Melalui teknik enzimatik sangat mungkin terjadi degradasi sempurna terhadap fitat sereal maupun kacang-kacangan [14]. Hal tersebut didukung dengan hasil penelitian [6] yaitu perlakuan terbaik dalam penurunan kadar fitat diperoleh dengan perendaman jagung menggunakan kombinasi asam sitrat dan fitase.

Daya Cerna Protein

Pada penelitian ini, ditambahkan pakan standar PER (P₀) dengan sumber protein pakan bukan kasein murni seperti yang disebutkan dalam AOAC [15], melainkan digantikan oleh skim (susu protein bebas lemak). Skim terdiri dari 20% *whey protein* dan 80% kasein, sehingga komposisinya disesuaikan untuk protein pakan 10%. Hasil penelitian daya cerna protein pada penelitian ini adalah sebagai berikut:

Tabel 2. Daya Cerna Protein Berdasarkan *Protein Efficiency Ratio* (PER) pada *Mus musculus* dengan Variasi Kadar Fitat Pakan

Perlakuan	<i>Protein Efficiency Ratio</i> (PER)	Nilai F, p
P ₀	0.562 ^a	F= 28.713 p= 0.000
P ₁	1.883 ^b	
P ₂	2.499 ^{cd}	
P ₃	2.706 ^{cd}	

Keterangan: huruf yang berbeda pada kolom dan baris menunjukkan perbedaan secara signifikan

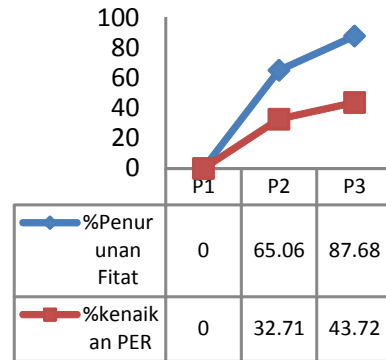
Daya cerna protein berdasarkan *Protein Efficiency Ratio* (PER) menunjukkan tingkat kemanfaatan protein pangan yang dikonsumsi oleh hewan coba. Tabel 4.2 pada pakan standar (standar kasein) diperoleh nilai PER 0.562. Nilai PER yang kecil pada perlakuan pakan standar tersebut dikarenakan kadar protein pada pakan yang dikonsumsi lebih besar dari kelompok lain sedangkan pertumbuhan berat badannya tidak jauh berbeda.

Pada kelompok standar, pakan mengandung protein paling tinggi, tetapi tidak

memberikan pertumbuhan berat badan yang berarti dibandingkan kelompok lain yang kandungan proteinnya lebih rendah. Kandungan energi pakan kelompok standar dengan kelompok lain diasumsikan sama, karena komponen pakan yang berbeda hanya pada sumber proteinnya, yaitu kasein pada pakan kelompok standar dan tepung ikan pada pakan kelompok lain. Begitu juga dengan aktivitas fisik yang diperkirakan sama antara kelompok standar dengan kelompok lain karena lingkungan hidup yang sama, meliputi ruangan dan kandang yang identik.

Pertumbuhan berat badan yang tidak jauh berbeda pada kelompok standar dan kelompok lain tersebut disebabkan oleh kemampuan hewan coba dalam mencerna nutrisi ransum yang dikonsumsi relatif sama [16]. Dengan kata lain *Mus musculus* memiliki batas maksimal dalam mencerna protein. Sehingga perbedaan kadar protein pakan akan tidak terlalu memberikan efek yang berbeda pada berat badan apabila telah sampai pada batas pencernaan protein. Selain itu, sumber protein pakan standar PER berupa skim juga diduga berpengaruh karena bukan protein kasein murni seperti pada komposisi pakan pada [15]. Untuk selanjutnya, pembahasan akan difokuskan pada P₁, P₂ dan P₃ dengan P₁ sebagai kelompok kontrol.

Pada analisis statistik, data daya cerna protein berdistribusi normal tetapi tidak homogen, sehingga dilakukan analisis statistik *Kruskal-Wallis*. Pada analisis *Kruskal-Wallis*, diperoleh nilai signifikan 0.00. Hal tersebut berarti bahwa ada pengaruh variasi kadar fitat pakan terhadap daya cerna protein. Hubungan antara kadar fitat jagung pada pakan dengan daya cerna protein ditunjukkan pada grafik berikut:



Gambar 1. Grafik Persentase Penurunan Kadar Fitat Jagung dengan Peningkatan Daya Cerna Protein

Gambar 4.5 menunjukkan bahwa dengan menurunkan kadar fitat pada suatu produk pakan akan dapat meningkatkan daya cerna protein pada ternak. Hal tersebut dikarenakan fitat merupakan senyawa antinutrisi yang dapat mengikat protein [17]. Asam fitat yang berikatan dengan protein akan membentuk senyawa kompleks yang sukar larut [4].

Fitat mampu mengikat protein dikarenakan sifat rakhitogenik yang dimilikinya, yaitu membentuk garam yang sukar larut [18]. Garam yang sukar larut itu terbentuk karena baik pada pH rendah, netral maupun tinggi, asam fitat bermuatan negatif, sehingga akan membentuk ikatan dengan protein yang memiliki gugus positif. Sesuai dengan [4] yang menyatakan bahwa asam fitat seringkali berikatan dengan asam-asam amino pada protein.

Pada penelitian tahap ini, peningkatan PER terbesar diperoleh pada P₃ kemudian P₂. Peningkatan PER pada P₂ dan P₃ disebabkan oleh kemampuan asam sitrat untuk mendegradasi fitat, kemudian kombinasi fitase dapat meningkatkan degradasi fitat lebih banyak sehingga memudahkan protein terserap oleh tubuh. Hal tersebut menunjukkan bahwa dengan semakin menurunnya kadar fitat pakan, maka daya cerna protein akan meningkat.

Penelitian ini diperkuat dengan hasil penelitian [19] yaitu dengan suplementasi fitase pada pakan benih *Pangasius pangasius* dapat meningkatkan kecernaan protein secara maksimal sebesar 500 FTU /kg dibanding kontrol dan PER 2.1. Hasil penelitian [20] juga menunjukkan efek positif dari

suplementasi fitase pada pakan ikan air tawar rainbow (*Oncorhynchus mykiss*) terhadap pencernaan protein. Begitu juga pada babi, dilaporkan bahwa fitase mampu meningkatkan pemanfaatan asam amino protein [21]

Bioavailabilitas Zn

Bioavailabilitas Zn merupakan jumlah atau proporsi Zn dari pakan yang dapat diabsorpsi ke dalam tubuh [22]. Penentuan bioavailabilitas Zn dilakukan dengan menghitung selisih antara jumlah Zn pada pakan terkonsumsi dengan Zn pada feses yang dikeluarkan.

Untuk mengetahui kadarnya, dilakukan analisis pada sampel pakan dan feses *Mus musculus*. Pengukurannya dilakukan dengan menggunakan AAS, kemudian kadarnya akan dikonversi dengan jumlah pakan yang terkonsumsi dan feses yang dikeluarkan. Pada penelitian tahap ini diperoleh data sebagai berikut:

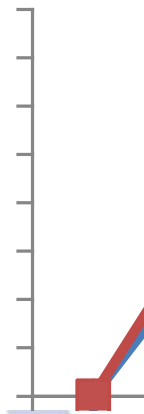
Tabel 3. Bioavailabilitas Zn pada *Mus musculus* dengan Variasi Kadar Fitat Pakan dari Perbedaan Perlakuan Jagung

Perlakuan	Bioavailabilitas Zn (μg)	% Bioavailabilitas Zn	Nilai F, p
P ₁	360.87 ^a	12.31	F= 114.118 p= 0.000
P ₂	645.13 ^b	25.22	
P ₃	897.60 ^c	36.68	

Keterangan: huruf yang berbeda pada kolom dan baris menunjukkan perbedaan secara signifikan

Pada analisis statistik, data % bioavailabilitas Zn berdistribusi normal dan homogen, serta analisis Anova satu arah menghasilkan nilai signifikan kurang dari 0.05. Hal tersebut menunjukkan bahwa ada pengaruh variasi kadar fitat pakan terhadap bioavailabilitas Zn.

Hubungan antara penurunan kadar fitat jagung pada pakan dengan bioavailabilitas Zn ditunjukkan pada grafik berikut:



Gambar 2. Grafik Persentase Penurunan Kadar Fitat Jagung dengan Kenaikan Bioavailabilitas Zn *Mus musculus*

Gambar 4.8 menunjukkan bahwa dengan menurunnya kadar fitat pakan, maka bioavailabilitas Zn akan meningkat.

Menurunnya kadar fitat pakan yang dapat meningkatkan bioavailabilitas Zn tersebut dikarenakan fitat merupakan senyawa antinutrisi yang dapat mengikat mineral [17] dalam hal ini Zn. Seperti halnya dengan protein, asam fitat juga dapat berikatan dengan Zn membentuk senyawa kompleks yang sukar larut [4].

Pada penelitian tahap ini, peningkatan bioavailabilitas terbesar diperoleh pada P³ kemudian P². Hal tersebut disebabkan oleh kemampuan asam sitrat untuk mendegradasi fitat, kemudian kombinasi fitase dapat meningkatkan degradasi fitat lebih banyak sehingga memudahkan Zn terserap oleh tubuh.

Hal tersebut membuktikan bahwa penggunaan asam sitrat dan fitase dalam mengurangi kadar fitat mampu meningkatkan bioavailabilitas Zn. Dengan begitu peningkatan pemanfaatan mineral alami dalam bahan pakan dapat mengurangi kebutuhan untuk suplemen mineral dalam pakan [23].

Suplementasi fitase menyebabkan peningkatan ketersediaan mineral [21]. Hal tersebut sesuai dengan hasil penelitian [24] menunjukkan bahwa suplementasi fitase dalam ransum mampu meningkatkan absorpsi Zn ayam boiler. Dilaporkan bahwa suplementasi fitase dapat menghidrolisis fitat dan meningkatkan konsentrasi mineral seperti magnesium, kalsium, mangan, dan seng dalam plasma, tulang dan seluruh tubuh [25]. Begitu

juga dengan hasil penelitian [26] yaitu tingkat fitase 8.000U/kg pada pakan lele (*Ictalurus Punctatus*) secara signifikan meningkatkan bioavailabilitas alami Zn dalam bahan pakan.

SIMPULAN DAN SARAN

Simpulan

Berdasarkan hasil penelitian dan pembahasan diatas, maka disimpulkan bahwa:

1. Ada pengaruh penambahan variasi bahan perendam terhadap kadar fitat jagung. Kadar fitat terendah diperoleh pada kombinasi bahan perendam asam sitrat kemudian fitase (P_3) yaitu 1.402 mg/g atau menurun 87.68%.
2. Ada pengaruh variasi kadar fitat pakan terhadap daya cerna protein berdasarkan *Protein Efficiency Ratio* (PER) *Mus musculus*. Nilai PER tertinggi diperoleh pada pakan dengan kadar fitat terendah pada penelitian Tahap I yaitu 2.706 atau meningkat 43.72%
3. Ada pengaruh variasi kadar fitat pakan terhadap bioavailabilitas Zn *Mus musculus*. Bioavailabilitas Zn tertinggi diperoleh pada pakan dengan kadar fitat terendah pada penelitian Tahap I yaitu 897.60 μg (36.68%) atau meningkat 148.73%.

Saran

Perlu dilakukan penelitian mengenai bioavailabilitas mineral lain selain Zn.

DAFTAR PUSTAKA

1. PT. iPASAR INDONESIA. 2010. *Jagung/ Corn – Industrial Grade, per September 2010. Komoditas Indonesia. www.ipasar.co.id*. Diakses pada 26 April 2012 pukul 11.52.
2. Fernando, Yosep. 2009. *Analisis Daya Saing Dan Faktor-Faktor Yang Mempengaruhi Ekspor Jagung Indonesia Di Pasar Malaysia Pra Dan Pasca Krisis Ekonomi*. Bogor: IPB Press.
3. Sari, Meisji Liana dan F. Gurki N Ginting. 2012. *Pengaruh Penambahan Enzim Fitase Pada Ransum terhadap Berat Relatif Organ Pencernaan Ayam Broiler*. *Agripet* 12(2): 37-41. Palembang: Universitas Sriwijaya.
4. Irianingrum, Retno. 2009. *Kandungan Asam Fitat dan Kualitas Dedak Padi yang Disimpan Dalam Keadaan Anaerob*. Bogor: IPB Press.
5. Arifin, Zainal. 2008. *Beberapa Unsur Mineral Esensial Mikro Dalam Sistem Biologi Dan Metode Analisisnya*. *Jurnal Litbang Pertanian*, 27(3): 99-105.
6. Mulyati, Tri Ana. 2011. *Pengaruh Variasi Lama Perendaman Dan Konsentrasi Asam Sitrat Dengan Penambahan Enzim Fitase Pada Jagung (*Zea Mays L*) Terhadap Bioavailabilitas Mineral Zn (In-Vitro)*. *Skripsi yang tidak dipublikasikan*. Surabaya: Universitas Negeri Surabaya.
7. Sudarmadji, S., Bambang H., Suhardi. 2007. *Prosedur Analisa untuk Bahan Makanan Dan Pertanian*. Yogyakarta: Liberty Yogyakarta.
8. Tim. 2012. *Petunjuk Praktikum Biokimia*. Surabaya: jurusan Kimia, Unesa.
9. Sudarmadji, Slamet. 1997. *Teknik Analisa Biokimiawi*. Yogyakarta: Liberty.
10. Ismangil dan Eko Hanudin. 2005. *Degradasi Mineral Batuan oleh Asam-Asam Organik*. *Jurnal Ilmu Tanah dan Lingkungan* Vol 5 (1): 1-17.
11. Ekholm, Päivi, Liisa Virkki, Maija Ylinen, Liisa Johansson, and Pertti Varo. 2000. *Effects of Natural Chelating Agents on the Solubility of Some Physiologically Important Mineral Elements in Oat Bran and Oat Flakes*. *Cereal Chem*, 77(5):562–566.
12. Sukria, H.A. dan F. Liebert. 2004. *Citric Acid and Microbial Phytase Inclusion in The Diet to Improve Utilization Phytate Phosphorus and Growth of Broiler*. *Media Peternakan*, 27(1): 21-24.
13. Nuhriawangsa, Adi Magna Patriadi. 2012. *Produksi Serbuk Fitase Hasil Teknologi Rekombinan dan Aplikasinya untuk Meningkatkan Kualitas Pakan dan Kinerja Ayam Broiler*. Disertasi. Yogyakarta: UGM.
14. Yuanita, Leny dkk.. 2010. *Isolasi, Pemurnian dan Karakterisasi Fitase *Bacillus subtilis* Dari Holiwood Gresik*.

- Surabaya: Jurusan Kimia FMIPA Universitas Negeri Surabaya.
15. Muchtadi, Deddy. 2010. *Teknik Evaluasi Nilai Gizi Protein*. Bandung: Alfabeta.
16. Arifin, M., Liman, K. Ahianto. 2012. *Pengaruh Penambahan Konsentrat dengan Kadar Protein Kasar yang Berbeda pada Ransum Basal terhadap Performans Kambing Boerawa Pasca Sapih*. Lampung: Universitas Lampung.
17. Tejasari. 2005. *Nilai-Gizi Pangan*. Yogyakarta: Graha Ilmu.
18. Sangadji, Insun. 2004. *Enzim Fitase dan Perannya dalam Memecah Ikatan Asam Fitat pada Pakan*. Makalah Pengantar Falsafah Sains, Program Pasca Sarjana ITB.
19. Debnath, Dipesh *et al.*. 2005. Effect of Dietary Microbial phytase Supplementation on Growth and Nutrient Digestibility of Pangasius pangasius (Hamilton) Fingerlings. *Aquaculture Research*. 36: 180–187.
20. Vielma, J., *et al.* 2004. Top-Spraying Soybean Mealbased Diets with Phytase Improves Protein and Mineral Digestibilities but not Lysine Utilization in Rainbow Trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum). *Aquaculture Research*. 35: 955–964.
21. Ling, Cao *et al.* 2007. Application of Microbial Phytase in Fish Feed. *Science Direct. Enzyme and Microbial Technology*. 40: 497–507.
22. Palupi, NS, FR Zakaria dan E Prangdimurti. 2007. *Evaluasi Nilai Biologis Vitamin dan Mineral*. Bogor: IPB Press.
23. Yan W., Reigh, R.C. & Xu, Z. 2002. *Effects of Fungal Phytase on Utilization of Dietary Protein and Minerals, and Dephosphorylation of Phytic Acid in The Alimentary Tract of Channel Catfish Ictalurus Punctatus Fed an All-Plant-Protein Diet*. *Journal World Aquaculture Social*, 33(1):10.
24. Setiyatwan, H., dkk. 2007. *Suplementasi Fitase, Seng dan Tembaga dalam Ransum Sebagai Stimulan Pertumbuhan Ayam Broiler*. *Media Peternakan* Vol. 30 No.2: 122-128.
25. Vielma, J., *et al.* 1998. *Effects of dietary phytase and cholecalciferol on phosphorus bioavailability in rainbow trout (Oncorhynchus mykiss)*. *Aquaculture Research*, 163: 3-4.
26. Yan, W., *et al.* 2002. Effects of Fungal Phytase on Utilization of Dietary Protein and Minerals, and Dephosphorylation of Phytic Acid in The Alimentary Tract of Channel Catfish *Ictalurus Punctatus* Fed an All-Plant-Protein Diet. *Journal World Aquaculture Social*. 33(1):10–22.