

**PENGARUH BAKTERI PENGHASIL FITASE PADA PAKAN CAMPURAN
WHEAT POLLARD TERHADAP PERFORMAN AYAM BROILER**Sajidan¹, Adi Magna Patriadi Nuhriawangsa² dan Adi Ratriyanto²**INTISARI**

Tujuan dari penelitian ini adalah untuk mengetahui pengaruh bakteri penghasil fitase dan aplikasinya sebagai probiotik pada pakan ayam broiler strain New Lohmann dengan campuran *wheat pollard*. *Screening* bakteri penghasil fitase dilakukan dengan menggunakan medium padat dan cair. Karakterisasi bakteri penghasil fitase mengacu kepada *Bergey's manual of determinative bacteriology*. Karakterisasi molekuler dari bakteri penghasil fitase dilakukan dengan metode PCR dari 16SrDNA. Penelitian menggunakan 180 ekor ayam broiler jantan strain New Lohmann dengan empat perlakuan level *wheat pollard* (0, 10, 20, dan 30%) sebagai pengganti bekatul padi dan tiga level probiotik (0, $10^{2.5}$, dan 10^5 koloni/kg pakan) dengan tiga ulangan. Masing-masing ulangan menggunakan lima ekor ayam. Pemberian probiotik menggunakan kombinasi *E. coli* dan *K. pneumoniae* yang dicampurkan ke dalam pakan. Perlakuan dilaksanakan pada umur ayam delapan sampai 42 minggu. Analisis statistik yang digunakan adalah *Completely Randomized Design (CRD)* Pola Faktorial 4x3 dan diteruskan uji Duncan. Perhitungan dilakukan dengan program MINITAB. Hasil penelitian menunjukkan bahwa bakteri penghasil fitase homolog dengan karakter makroskopis, mikroskopis, uji biokimia, dan 16SrDNA dari *E. coli* dan *K. pneumoniae*. pH optimum fitase pada *E. coli* adalah 4,0 dan fitase *K. pneumoniae* sangat aktif pada pH 5. Optimasi temperatur fitase *E. coli* pada suhu 50-55 °C dan fitase *K. pneumoniae* pada suhu 45-50C. Level probiotik tidak berpengaruh terhadap performan (pertambahan berat badan, konsumsi pakan, dan konversi pakan). Namun demikian, terdapat kecenderungan perbaikan tingkat konversi pakan yang berimplikasi pada efisiensi pakan. Level *wheat pollard* berpengaruh terhadap pertambahan berat badan dan konsumsi pakan tetapi tidak berpengaruh pada konversi pakan. Level *white pollard* 30% menghasilkan performan yang terbaik. Kombinasi probiotik sampai 10^5 koloni/kg pakan dan 30% *wheat pollard* dapat diaplikasikan untuk memperbaiki performan ayam broiler.

(Kata kunci : Bakteri fitase, Level probiotik, Level *wheat pollard*, Performan, Broiler).

Buletin Peternakan 28 (3) : 114 - 121, 2004

¹ Fakultas Keguruan dan Ilmu Pendidikan Biologi UNS, Surakarta.

² Program Studi Produksi Ternak, Fakultas Pertanian UNS, Surakarta.

EFFECT OF PHYTASE PRODUCING BACTERIA ON THE WHEAT POLLARD MIXED DIET ON BROILER PERFORMANCE

ABSTRACT

The purpose of this research was to investigate the influence of phytase producing bacteria as probiotic on the mixed wheat pollard diet on New Lohmann strain broiler. The bacteria screening was done with solid and liquid medium. The characteristic properties of the bacteria were determined following Bergey's manual of determinative bacteriology. The molecular characterisation phytase bacteria was done using PCR method on 16SrDNA. This research used 180 male New Lohmann strain, treatment with four wheat pollard levels (0, 10, 20, and 30%) to replace rice bran and three probiotic levels (0, $10^{2.5}$, and 10^5 colony/feed kg). The dietary treatment had three replications with five broiler chicks each. The probiotic being used was a combination of *E. coli* and *K. pneumoniae*, mixed on feed. The treatment was applied on broiler of eight to 42 days old. The collected data was analyzed following a Completely Randomized Design of Factorial 4x3 and followed by Duncan test. The analysis used MINITAB computer program. The results indicated that phytase bacteria was homologous with macroscopic as well as microscopic characters, biochemist test and 16SrDNA from *E. coli* and *K. pneumoniae*. The phytase from *E. coli* was found active optimally on pH 4.0 and *K. pneumoniae* on pH 5. The phytase from *E. coli* activity was found optimum on temperature 50-55C and *K. pneumoniae* on temperature 45-50C. The performance (average daily gain/ADG, feed consumption/FC, and feed conversion ratio/FCR) were not significantly different on probiotic levels, but showed the tendency of decreasing FCR, which was the implication of feed efficiency. The ADG and FC were significantly different caused by wheat pollard levels, but the FCR did not differ significantly. The 30% of wheat pollard level showed highest performance. The combination until 10^5 colony/feed kg of probiotic level with 30% of wheat pollard level could be applied to improve the performance of broiler chicken.

(Key words : Phytase bacteria, probiotic levels, wheat pollard levels, performance, broiler).

Pendahuluan

Bekatul padi mempunyai keterbatasan untuk pemakaian dalam pakan ternak non ruminansia karena tingginya kandungan serat kasar dan lemak sehingga daya cernanya rendah dan mudah ransid. Selain itu, ketersediaan bekatul padi bersifat musiman sesuai dengan karakteristik produk pertanian. *Wheat pollard* merupakan *by-product* dari gandum yang telah dipergunakan oleh produsen pakan ternak dalam formulasi ransum.

Wheat pollard sebagai bahan pakan asal tanaman memiliki kandungan fosfor (P) yang tinggi dalam bentuk fitat (*myo-inositol hexaphosphates*). Fitat merupakan senyawa fosfat kompleks yang disimpan hingga 80 % dalam biji-bijian oleh tanaman (Reddy *et al.*, 1989). Senyawa ini mampu mengikat logam-

logam seperti: Mg^{++} , Fe^{++} , Zn^{++} , Mn^{++} , Ca^{++} (Pallauf *et al.*, 1998; Rimbach dan Pallauf, 1999) dan merupakan protein yang sangat berguna bagi pertumbuhan hewan (Inagawa *et al.*, 1987). Ketiadaan enzim fitase pada saluran pencernaan non ruminansia menyebabkan kandungan senyawa fitat dalam biji tidak bisa dicerna karena kuatnya sifat *chelating* (Shin *et al.*, 2001).

Sampai saat ini beberapa fitase dari strain bakteri berhasil diisolasi, dikloning, *di-sequencing*, dan diekspresikan, misalnya *Escherichia coli* (Greiner *et al.*, 1993 dan Rodriguez *et al.*, 1999), *Bacillus sp.* (Kim *et al.*, 1998; Idriss *et al.*, 2002); *Selenomonas ruminantium* (Yanke *et al.*, 1999), dan *Klebsiella pneumoniae* (Sajidan, 2002).

Salah satu studi melaporkan bahwa enzim fitase dari mikrobia dapat memperbaiki nutrisi,

dan menguntungkan secara ekologi (Pallauf dan Rimbach, 1977). Studi tentang pemberian mikrobial fitase pada pakan ternak dapat meningkatkan pertumbuhan hewan non ruminansia seperti ayam broiler (Biehl dan Baker, 1997). Pemanfaatan fitase pada pakan ternak dapat mengoptimalkan pemanfaatan unsur P pada hewan monogastrik, serta dapat mereduksi polusi P di lingkungan, sehingga eutrofikasi dipermukaan perairan (waduk dan sungai) dapat dicegah (Shin *et al.*, 2001).

Berdasar beberapa pertimbangan di atas, maka perlu dilakukan upaya peningkatan kualitas pakan ayam broiler dengan probiotik dari mikrobia yang berupa bakteri penghasil fitase sehingga dapat mengurangi penggunaan fosfor anorganik yang harganya mahal, mengurangi biaya pembuatan pakan, dan meningkatkan performan ayam broiler.

Tujuan dari penelitian ini adalah untuk mengetahui pengaruh bakteri penghasil fitase dan aplikasinya sebagai probiotik pada pakan ayam broiler strain New Lohmann dengan campuran *wheat pollard*.

Materi dan Metode

Screening dan karakterisasi terhadap bakteri penghasil fitase

Screening bakteri penghasil fitase dengan menggunakan medium agar (Bae *et al.*, 1999 dan Sajidan, 2002) dan medium cair (Kerovuo *et al.*, 1999 dan Sajidan, 2002). Karakterisasi bakteri penghasil fitase dilakukan secara

makroskopis dan mikroskopis. Sedangkan uji biokimia terhadap karakteristik bakteri dilakukan dengan mengacu kepada *Bergey's manual of determinative bacteriology* (Holt *et al.*, 1994). Amplifikasi (PCR) gen penyandi 16SrRNA dari bakteri dilakukan dengan metode dari Damiani *et al.* (1996) dan Goto *et al.* (2000).

Aplikasi probiotik

Penelitian menggunakan 180 ekor ayam broiler jantan strain New Lohman dengan empat perlakuan *level wheat pollard* (0, 10, 20, dan 30%) sebagai pengganti bekatul dan tiga level probiotik (0, $10^{2.5}$, dan 10^5 koloni/kg pakan) dengan tiga ulangan. Masing-masing ulangan menggunakan lima ekor ayam. Ayam broiler dipelihara pada lantai *litter*.

Strain bakteri yang digunakan adalah kombinasi *Eschericia coli* (E) dan *Klebsiella pneumoniae* (K). Probiotik dalam bentuk cair dicampurkan dalam ransum. Kandungan nutrisi ransum disajikan pada Tabel 1 dan 2. Pemberian pakan berdasarkan kebutuhan dilakukan dua kali sehari pada pagi dan sore dan pemberian air minum dilakukan secara *ad libitum*. Perlakuan penelitian dilaksanakan setelah satu minggu masa pemeliharaan sampai ayam berumur 42 hari.

Rancangan dan analisis statistik percobaan menggunakan CRD Pola Faktorial 4x3 (Astuti, 1980). Perhitungan statistik menggunakan program MINITAB. Data yang diamati adalah berat badan, konsumsi pakan dan konversi pakan.

Tabel 1. Kandungan nutrisi pakan fase starter (*Nutrient content of feed for starter*)

Nutrien (<i>Nutrient</i>)	Level wheat pollard (<i>Level of wheat pollard</i>) (%)			
	0	10	20	30
CP (%)	20,94	21,22	21,50	21,78
ME (kkal/kg)	3.094	3.076	3.058	3.040
Ca (%)	0,98	0,99	1,00	1,00
P (%)	0,49	0,50	0,51	0,52

Tabel 2. Kandungan nutrisi pakan fase finisher (*Nutrient content of feed for finisher*)

Nutrien (<i>Nutrient</i>)	Level wheat pollard (<i>Level of wheat pollard</i>) (%)			
	0	10	20	30
CP (%)	19,83	20,11	20,39	20,67
ME (kkal/kg)	3.107	3.088	3.070	3.052
Ca (%)	1,01	1,02	1,02	1,03
P (%)	0,45	0,46	0,47	0,48

Tabel 3. Screening dan karakterisasi terhadap bakteri penghasil fitase (*Screening and characterization of phytate bacteria*)

Strain (<i>Strain</i>)	Lokasi fitase (<i>Location of phytate</i>)	Karakter bakteri (<i>Character of bacteria</i>)	Bakteri (<i>Bacteria</i>)
AS1	Intraseluler	Gram negatif, bentuk basil, tidak bergerak, <i>Indoltest</i> negatif, <i>Voges-Proskauer</i> negatif, <i>Methylrot</i> negatif, <i>Simmon Citrat</i> positif, galaktosidase positif, dan resisten terhadap ampicillin (<i>Bacillar, gram negative, immobile, Indoltest negative, Voges-proskauer negative, Methylrot negative, Simmon Citrat positive, galactosidase positive, and is resistant to ampicillin</i>)	<i>Klebsiella pneumoniae</i>
AS2	Intraseluler (periplasma)	Gram negatif, bentuk basil, tidak bergerak, <i>Indoltest</i> negatif, <i>Voges-Proskauer</i> negatif, <i>Methylrot</i> negatif, <i>Simmon Citrat</i> positif, galaktosidase negatif, dan tidak resisten terhadap ampicillin (<i>Bacillar, gram negative, immobile, Indoltest negative, Voges-proskauer negative, Methylrot negative, Simmon Citrat positive, galactosidase negative, and is not resistant to ampicillin</i>)	<i>Escherichia coli</i>

Tabel 4. Hasil karakterisasi bakteri penghasil fitase (*Result of characterization of phytate bacteria*)

Bakteri (<i>Bacteria</i>)	pH optimum enzim (<i>Optimum pH of enzyme</i>)	Temperatur optimum enzim (<i>Optimum temperature of enzyme</i>)
<i>Escherichia coli</i>	4	50-55 C
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	5	45-50 C

Tabel 5. Pertambahan berat badan (g/ekor/hari), konsumsi pakan (g/ekor/hari), dan konversi pakan broiler (*Average daily gain (ADG), feed consumption (FC) and feed conversion ratio (FCR) of broiler*)

Level probiotik (Level of probiotic)	Level wheat pollard ((Level of wheat pollard) (%))				Rata-rata ^{ns} (Average)
	0	10	20	30	
ADG					
0	78,29	88,36	86,45	100,58	29,47
10 ^{2,5}	68,17	80,69	93,86	95,64	27,95
10 ⁵	78,74	82,59	93,47	93,64	29,04
Rata-rata ^{**} (Average)	25,02 ^a	27,96	30,09	32,21 ^b	
FC					
0	68,52	70,41	73,38	76,76	72,27
10 ^{2,5}	55,63	65,17	74,19	75,73	67,68
10 ⁵	64,38	66,37	80,16	74,54	71,36
Rata-rata ^{**} (Average)	62,85 ^a	67,32	75,92 ^b	75,68 ^{b,c}	
FCR					
0	2,66	2,41	2,58	2,29	2,49
10 ^{2,5}	2,58	2,47	2,48	2,37	2,48
10 ⁵	2,45	2,43	2,59	2,38	2,47
Rata-rata ^{ns} (Average)	2,56	2,44	2,55	2,35	

ns : non significant ($P < 0,05$)

** : $P < 0,01$

^{a,b,c} Rerata pada lajur yang sama dengan superskrip berbeda menunjukkan perbedaan yang nyata ($P < 0,05$) (Different superscript at the same colum indicating significant differences ($P < 0,05$)).

Hasil dan Pembahasan

Hasil *screening* dan karakterisasi bakteri penghasil fitase ditampilkan pada Tabel 3.

Karakterisasi enzim fitase dari bakteri

Hasil karakterisasi enzim fitase dari bakteri yang digunakan dalam penelitian ini ditampilkan pada Tabel 4.

Greiner (1993) menyatakan bahwa *E. coli* mempunyai pH optimum 4,5 dan temperatur optimum 55°C. Sajidan (2002) menyatakan bahwa *K. pneumoniae* mempunyai pH optimum 5 dan temperatur optimum 50°C. Enzim fitase mikrobial aktif pada suhu 35 sampai 63°C (Wodzinski dan Ullah, 1996).

Aplikasi probiotik penghasil fitase pada pakan ayam broiler

Hasil penelitian aplikasi level jumlah bakteri penghasil fitase dengan ransum substitusi level *wheat pollard* dengan bekatul ditampilkan pada Tabel 5.

Pertambahan berat badan

Hasil analisis statistik menunjukkan perbedaan yang tidak nyata ($P > 0,05$) pada perlakuan level probiotik terhadap pertambahan berat badan. Hal ini sesuai dengan pendapat Mohanna dan Nys (1999) yang menyatakan bahwa pakan dengan fitase tidak mempengaruhi pertambahan berat hidup.

Hasil penelitian menunjukkan perbedaan yang nyata ($P < 0,01$) pada level *wheat pollard*

terhadap penambahan berat badan. Bertambahnya level *wheat pollard* menunjukkan kenaikan nilai penambahan berat badan dan penambahan berat badan tampak nyata pada penggunaan level substitusi bekatul padi dengan *wheat pollard* 30% dengan nilai tertinggi. *Wheat pollard* mempunyai kandungan protein kasar, Ca, dan P yang lebih tinggi dibanding bekatul padi (NRC, 1994). Nutrien tersebut turut berperan untuk pertumbuhan sehingga akan meningkatkan penambahan berat badan. Pertumbuhan dan perkembangan ternak dapat dilihat dengan melihat komposisi bagian-bagian tubuh ternak yang mengikuti kurva pertumbuhan normal (Swatland, 1989). Komposisi bagian-bagian tubuh ternak tersebut dapat diukur dengan melihat berat tubuh ternak.

Pertambahan berat badan pada level jumlah bakteri tidak berbeda nyata. Hal ini menunjukkan bahwa antar level perlakuan tersebut mempunyai kesamaan sampai level 10^5 koloni/kg pakan. Level *white pollard* menunjukkan perbedaan yang nyata dimana pertumbuhan berat badan semakin meningkat sampai level 30%. Pemakaian level jumlah probiotik sampai 10^5 koloni/kg pakan dan level substitusi *wheat pollard* sampai 30 % dapat digunakan untuk memperbaiki pertumbuhan ternak.

Konsumsi pakan

Hasil penelitian menunjukkan bahwa tidak terdapat perbedaan yang nyata ($P>0,05$) pada level probiotik terhadap konsumsi pakan tetapi terdapat kecenderungan penurunan dibanding kontrol. Probiotik dapat meningkatkan daya cerna dan daya scrap nutrien pakan dalam pencernaan ternak (Ramia, 2000). Penambahan mikrobial penghasil fitase dapat meningkatkan kecernaan protein (Yi *et al.*, 1996). Peningkatan kecernaan bahan pakan mengakibatkan perbaikan nutrisi pada pakan sehingga kebutuhan nutrisi pada ternak dapat tercukupi. Hal tersebut mempengaruhi pola makan pada ternak, sehingga dapat menyebabkan penurunan pada konsumsi pakan.

Hasil penelitian menunjukkan perbedaan yang nyata ($P<0,01$) pada pemakaian level *wheat pollard* terhadap konsumsi pakan. Kenaikan

konsumsi pakan tampak nyata sampai level 20%. Konsumsi pakan dipengaruhi oleh kandungan serat kasar di dalam pakan. Pakan dengan kandungan *wheat pollard* meningkat, diikuti oleh penurunan bekatul padi mengandung serat kasar yang lebih rendah. Semakin tinggi serat kasar akan mengakibatkan penurunan konsumsi ransum. Hal ini disebabkan karena serat kasar mengakibatkan ternak lebih cepat kenyang dengan sifat *bulky*-nya. Bo Gohl (1981) menyatakan bahwa jumlah konsumsi pakan dipengaruhi oleh sifat *bulky* dari pakan.

Konversi pakan

Hasil penelitian tidak menunjukkan adanya perbedaan yang nyata pada level probiotik terhadap konversi pakan ($P>0,05$) tetapi terdapat kecenderungan penurunan konversi pakan dengan bertambahnya kandungan jumlah level probiotik. Probiotik dapat meningkatkan nilai nutrisi pakan ternak (Wenk *et al.*, 1993). Jumlah bakteri penghasil pitase yang meningkat akan mengakibatkan penambahan enzim fitase sehingga ikatan pitat dapat didegradasi. Hal ini menyebabkan terlepasnya mineral dan protein yang terikat oleh pitat sehingga dapat dimanfaatkan oleh unggas secara optimal untuk tumbuh. Hal tersebut sesuai dengan pendapat Sudiastira (2001) yang menyatakan bahwa probiotik dapat meningkatkan retensi protein dan mineral dan Sterling *et al.* (1988) yang menyatakan bahwa probiotik dapat meningkatkan pertumbuhan ayam.

Hasil penelitian tidak menunjukkan perbedaan yang nyata ($P>0,05$) pada level *wheat pollard* terhadap konversi pakan tetapi menunjukkan kecenderungan penurunan dengan meningkatnya level *wheat pollard*. Kecenderungan penurunan tersebut disebabkan karena dengan efisiennya penggunaan pakan untuk pertumbuhan. Hal ini dapat dilihat pada peningkatan konsumsi pakan yang disertai dengan peningkatan penambahan berat badan dengan adanya penambahan level *wheat pollard*. Semakin tinggi level *wheat pollard* sebagai substitusi bekatul padi menunjukkan kecenderungan perbaikan konversi pakan.

Bekatul padi mengandung serat yang lebih tinggi serta protein kasar dan mineral (Ca dan P) lebih rendah dibanding *wheat pollard* (NRC, 1994). Kualitas nutrisi bahan pakan dari *wheat pollard* lebih baik dibanding bekatul padi sehingga pemanfaatannya untuk mengubah pakan menjadi daging akan lebih baik pada ransum dengan *wheat pollard*. Nesheim *et al.* (1979) menyatakan bahwa kebutuhan untuk produksi ditentukan oleh komposisi dan kandungan nutrisi pada pakan.

Secara kualitatif dapat dilaporkan bahwa dimungkinkan ada efisiensi penggunaan pakan dengan melihat perbaikan konversi pakan sebesar 0,02 untuk pemakaian jumlah bakteri 10^5 koloni/kg pakan dan 0,21 untuk substitusi level *wheat pollard* 30%. Hal ini memungkinkan terjadi penurunan jumlah kebutuhan pakan per ekor bila diaplikasikan dalam skala industri peternakan sehingga dapat menghemat biaya pakan.

Kesimpulan

Level probiotik tidak mempengaruhi performan ayam broiler tetapi terdapat kecenderungan perbaikan performan dengan kenaikan level probiotik.

Level *wheat pollard* mempengaruhi performan ayam broiler (pertambahan berat badan dan konsumsi ransum) dan mempunyai kecenderungan perbaikan konversi pakan dengan bertambahnya level *wheat pollard*.

Level probiotik 10^5 koloni/kg pakan dan level *wheat pollard* 30% dapat diaplikasikan untuk meningkatkan performan ayam broiler.

Ucapan Terima Kasih

Terima kasih kepada P.T. IndoFood Sukses Makmur Tbk. yang telah memberikan dana penelitian Bogasari Nugraha VI/2004 sampai penelitian ini selesai.

Daftar Pustaka

Astuti, M. 1980. Rancangan Percobaan dan Analisa Statistik. Bagian ke-1. Bagian

Pemuliaan Ternak, Fakultas Peternakan, Universitas Gadjah Mada. Yogyakarta.

Bae, H. D., L. J. Yanke, K. J. Cheng, and L. B. Selinger. 1999). A novel staining method for detecting phytase activity. *J. Microbio. Methods*. 39: 17-22

Biehl, R. R and D. H. Baker. 1997. Microbial phytase improve amino acid in young chicks feed diets based on soya bean meal but not diets based on peanut meal. *Poultry Sci*. 76: 355-360.

Bo Gohl. 1981. Tropical Feeds, Feeds Information Summaries and Nutritive Value. FAO of The United Nations Roma.

Damiani G, P. Amedeo, C. Bandi, R. Fani, D. Bellizzi, and V. Sgarrella. 1996. In: Adolph, K.W: *Microbial Genome methods*. CRC pp 167-178.

Goto, K., T. Omura, Y. Hara, and Y. Spadaie. 2000. Application of the partial 16S rDNA sequence as an index for rapid identification of species in the genus *Bacillus*. *J. Gen. Appl. Microbiol.* 46: 1-8.

Greiner, R. 1993. Reinigung Charakterisierung und Überexpression einer Phytase aus *Escherichia coli* ATCC 33965. Dissertation. Institut für Biochemie der Universität Stuttgart. Stuttgart.

Greiner, R., E. Haller, U. Konietzny, and K. D. Jany. 1993. Purification and characterization of two phytases from *Escherichia coli*. *Arch. Biochem. Biophys.* 303: 107-113.

Holt, J. G., N. R. Krieg, P. H. A. Sneath, J. C., Stacey and S. T. Williams. 1994. *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*. 9th ed. Williams & Wilkins, Baltimore, Maryland. 178-211.

Idriss, E. E., O. Makarewicz, A. Farouk, R. Greiner, K. Rosner, H. Bochow, T. Richter, and R. Borris. 2002. Extracellular phytase activity of *Bacillus amyloliquefaciens* FZB45 contributes to its plant-growth-promoting effect. *Microbiology*. 148: 1-13.

Inagawa, J., I. Kiyosawa, and T. Nagasawa. 1987. Effect of phytic acid on the hydrolysis of lactose with beta-galactosidase. *Agric. Biol. Chem.*

- 51:3027-3032.
- Kerovuo, J., M.Lauraeus, P. Nurminen, N. Kalkinen, and J. Apajalahti. 1998. Isolation, characterization, molecular gene cloning, and sequencing of a novel phytase from *Bacillus subtilis*. *Appl. Environ. Microbiol.* 64:2079-2086.
- Kim, Y.O., J. K. Lee, H. K. Kim, J. H. Yu, and T. K. Oh. 1998. Cloning of the thermostable phytase gene (phy)^h from *Bacillus* sp. DS11 and its overexpression in *Escherichia coli*. *FEMS Microbiol. Lett.* 162:185-191.
- Mohanna, C. and Y. Nys. 1999. Changes in zinc and manganese availability in broiler chick induced by vegetal and microbial phytases. *Anim. Feed. Sci. and Tech.* 77:241-253.
- National Research Council. 1994. *Nutrient Requirement of Poultry*. National Academic Press. Washington DC.
- Nesheim, M. C., R. E. Austic and L. E. Card. 1979. *Poultry Production*. 11th ed. Lea and Febiger, Philadelphia.
- Pallauf, J. and G.Rimbach. 1997. Nutritional significance of phytic acid and phytase. *Arch. Anim. Nutr.* 50: 301-319.
- Pallauf, J., M. Pietsch, and G. Rimbach. 1998. Dietary phytase reduces magnesium bioavailability in growing rats. *Nutr. Res.* 18: 1029-1037..
- Ramia, I. K., 2000. Suplementasi Probiotik dalam Ransum Berprotein Rendah terhadap Penampilan Itik Bali. *Majalah Ilmiah Peternakan. Fakultas Peternakan, Universitas Udayana, Denpasar.* 3(3): 45-54.
- Reddy, N. R., M. D. Pierson, S. K. Sathe, and D. K. Salunkhe. 1989. *Phytases in cereals and legumes*. CRC Press. Inc. Boca Raton. Fla.
- Rimbach, G and G. Pallauf. 1999. Effect of dietary phytate on magnesium bioavailability and liver oxidant status in growing rats. *Food Chem. Toxicol.* 37: 37-45.
- Rodriguez, E., Y. Han, and X. G. Lei. 1999. Cloning, sequencing, and expression of an *Escherichia coli* acid phosphatase/phytase gene (appA2) isolated from pig colon. *Biochem. And Biophys. Res. Comm.* 257: 117-123.
- Sajidan. 2002. *Molekulare Charakterisierung einer Phytase (Myo-inositol Hexakisphosphate Hydrolase) und von Phosphatasen aus Bakterienisolaten Indonesischer Reisfelder (Klebsiella pneumoniae)*. Dissertation. Institut fuer Biologie. Humboldt Universitat zu Berlin. Deutschland (Germany).
- Shin, S., N. C. Ha, B.C. Oh, T. K. Oh, and B. H. Oh. 2001. Enzyme mechanism and catalytic property of propeller phytase. *Structure.* 9:851-858.
- Sterling, K. G., J. M. Harter-Dennis, M. J. Estienne and K. V. McElwain. 1998. Effect of enzyme addition in pelleted vs. mash barley based diets for broilers. *American Society of Animal Science Northeast Section. (Abstract)*.
- Sudiasra, I. W. 2001. Pengaruh Penambahan EM-4 dalam Ransum Berprotein Rendah terhadap Komposisi Fisik Karkas Ayam Jantan Tipe Petelur. *Majalah Ilmiah Peternakan. Fakultas Peternakan Udayana, Denpasar.* 4(3): 84-89.
- Swatland, H. G. 1989. *Structure and Development of Meat Animals*. Prentice-Hall Inc., Englewood Cliffs, New Jersey.
- Yanke, L. J., H. D. Bae, L. B. Selinger, and K. J. Cheng. 1998. Phytase activity of anaerobic ruminal bacteria. *Microbiology.* 144: 1565-1573.
- Yi, Z., E. T. Kornegay and D. M. Denbow. 1996. Effect of microbial phytase on nitrogen and amino acid digestibility and nitrogen retention of turkey poults fed corn-soybean meal diets. *Poult. Sci.* 75:979-990.
- Wenk, C. R., Koelliker, and R. Messikommer. 1993. Whole Maize Plants in Diets for Growing Pig: Effect of Three Different Enzymes on The Feed Utilization. In: *Proceeding of The First Symposium of Enzymes in Animal Nutrition*. Kartause Ittingen, Switzerland.
- Wodzinski, R. J., and A. H. J. Ullah, 1996. Phytase. *Adv. App. Microbiol.* 42:263-302.