

SINTESIS Zn-FITAT DAN DEGRADASINYA DI DALAM CAIRAN RUMEN SECARA IN VITRO

Iman Hernaman, Fakultas Peternakan, UNPAD
Toto Toharmat, Departemen Nutrisi dan Teknologi Pakan, IPB
Wasmen Manalu, Fakultas Kedokteran Hewan, IPB
Putut Irwan Pudjiono, Lembaga Ilmu Pengetahuan Indonesia
e-mail : iman_hernaman@yahoo.com

Asam fitat banyak terdapat dalam biji-bijian. Senyawa ini dapat mengikat kuat Zn. Penelitian ini mempelajari sintesis Zn-fitat dan degradasinya di dalam cairan rumen secara *in vitro*. Asam fitat diekstraksi dari pollard menggunakan larutan asam cuka 1% dengan rasio 1:3 kg/L. Ekstrak asam fitat direaksikan dengan larutan $ZnCl_2$ pada perbandingan molaritas 1:2. Karakteristik Zn-fitat ditentukan dengan mengukur bahan kering dan kadar mineral endapan. Produk Zn-fitat diinkubasikan dan diukur degradasinya dalam sistem rumen *in vitro*. Hasil penelitian menunjukkan bahwa pembentukan kompleks Zn-fitat dari campuran ekstrak pollard dengan $ZnCl_2$ (2726 mg/L Zn) menghasilkan endapan sebanyak 10,7 mg/L yang mengandung 814,5 mg/L Zn atau 29,87% dari Zn yang direaksikan. Selain itu juga turut mengendapkan Mg dan Na sebesar 65,06 dan 13,48 mg/L. Kompleks Zn-fitat didegradasi lambat dalam cairan rumen dan secara perlahan-lahan degradasinya meningkat yang dimulai pada jam ke-8.

Kata Kunci : asam fitat, Zn-fitat, degradasi, rumen, *in vitro*

Zn-FITAT SYNTHESIZED AND ITS DEGRADATION IN RUMEN FLUID IN VITRO

Phytic acid was high in cereals grain and had high affinity to bound Zn. The present experiments aimed to synthesize Zn-phytate and its degradation in rumen fluid *in vitro*. Phytic acid was extracted from pollard using acetic acids solution at concentration 1%. Solution of acetic acid at concentration of 1% was used to produce phytic acid from pollard at ratio of 1:3 kg/L. Phytic acid solution was mixed with $ZnCl_2$ solution at a molarity ratio of 1:2. Zn-phytate characteristics were identify with dry matter and minerals in the sediment. *In vitro* studies were conducted to evaluate the degradation of Zn-phytate. Result indicated that formation of Zn-phytate in the pollard extract mixed with $ZnCl_2$ solution (2726 mg/L Zn) at molarities ratio of 1:2 was 10,7 mg/L. Total Zn bound the phytic acid was 814,5 mg/L or 29,87% from Zn mixed. Magnesium and Na precipitated in the sediment were 65.06 and 13.48 mg/L. Zn-phytate complex was degraded slowly in rumen fluid. Zn-phytate degradation was likely commenced after 8 h of incubation.

Keywords : phytic acid, Zn-phytate, degradation, rumen, *in vitro*

PENDAHULUAN

Suplementasi Zn dalam berbagai bentuk penyajian telah banyak dilakukan untuk memenuhi kebutuhan ternak dan menghasilkan respons yang berbeda-beda. Pemanfaatan Zn-anorganik menghambat aktivitas enzim proteolitik dan mengurangi proteolisis protein pakan di dalam rumen (Karr, *et al.* 1991). Selain itu, Zn-anorganik lebih liar di dalam rumen dan kemungkinan akan membentuk kompleks-kompleks tak larut sehingga kurang bermanfaat bagi ternak (Church, 1984). Ketersediaan Zn-organik (Zn-lisinat dan Zn-metionin) lebih tinggi dibandingkan Zn-anorganik (ZnSO₄ dan ZnO) serta dimetabolisme secara berbeda pada beberapa jaringan (Rojas, *et al.* 1995).

Biji-bijian dalam konsentrat yang merupakan komponen pakan ruminansia banyak mengandung asam fitat. Asam fitat (C₆H₁₈O₂₄P₆ atau IP6) adalah suatu cincin *myo-inositol* yang mengikat penuh fosfat (Turk, 1999). Asam fitat dengan kadar cukup tinggi banyak ditemukan pada hasil samping atau limbah pengolahan biji-bijian. Sumiati (2006) melaporkan bahwa dedak padi mengandung asam fitat 6,9%. Kandungan asam fitat pada *wheat bran* adalah 4,46-5,56%, barley 1,08-1,16%, jagung 0,76%, oats 0,8-1,02% (Cosgrove, 1980). Ravindran, *et al.* (1995) melaporkan kandungan asam fitat pada kacang kedelai, *repeseed meal*, *cottonseed meal*, dan *sunflower meal* berturut-turut sebesar 0,39%, 0,70%, 0,84%, dan 0,89% dari bahan kering. Kadar asam fitat pada tanaman bergantung pada varietas, iklim (Hidvegi dan Lasztity, 2002) dan kadar P dalam tanah (Maga, 1982).

Molekul asam fitat mengandung 12 proton dengan sisi terdisosiasi. Enam sisi merupakan asam kuat dengan nilai pKa kira-kira 1,5, tiga sisi dengan nilai pKa 5,7, 6,8, 7,6, dan sisanya tiga sisi adalah asam sangat lemah dengan nilai pKa >10 (Costello, *et al.* 1976). Struktur molekul tersebut secara konsisten memiliki kapasitas sebagai *chelating agent* dengan kation multivalensi. Di dalam larutan, stabilitas kompleks mineral dapat diukur dengan metode penurunan pH dimana logam akan menggantikan ion hidrogen untuk mengikat grup fosfat pada molekul fitat (Vohra dan Kratzer, 1965). Dengan menggunakan metode penurunan pH, Cheryan (1980) menyimpulkan bahwa asam fitat siap membentuk kompleks dengan kation multivalensi, dengan Zn²⁺ membentuk kompleks paling stabil yang diikuti oleh Cu²⁺, Ni²⁺, Co²⁺, Mn²⁺, Ca²⁺, dan Fe²⁺. Potensi asam fitat membentuk kompleks dengan Zn memberikan peluang sebagai alternatif dalam penyajian Zn sebagai suplemen untuk ternak.

Mikroflora dalam rumen ternak ruminansia menghasilkan fitase dalam jumlah besar. Keberadaan asam fitat bagi ternak ruminansia tidak menjadi masalah karena dapat menghidrolisis senyawa tersebut (Park, *et al.* 1999). Yanke, *et al.* (1998) mendemonstrasikan adanya aktivitas fitase pada lima spesies bakteri rumen terutama bakteri *Selenomonas ruminantium*. Bagi ternak ruminansia, asam fitat menyediakan *myo-inositol* dan fosfat anorganik pada sapi perah yang diberi ransum dengan konsentrat tinggi (Marounek, *et al.* 2000). Ternak ruminansia dilaporkan sangat efisien dalam menggunakan P dari asam fitat (Morse, *et al.* 1992). Kurang dari 1% asam fitat yang dikonsumsi masih terdapat dalam feses sapi (Nelson, *et al.* 1976). Namun demikian, degradasi asam fitat akan lambat dan hanya sebagian dari P yang dimanfaatkan ketika dalam ransum mengandung Ca dalam jumlah yang tinggi (Morse, *et al.* 1992).

Penelitian ini bertujuan untuk mensintesis Zn-organik melalui pengikatan Zn dengan asam fitat yang diharapkan ketersediaan Zn untuk ternak ruminansia menjadi lebih baik.

MATERI DAN METODE

Produksi dan Penentuan Karakteristik Zn-Fitat

Pollard sebanyak 2 kg dicampur dengan asam asetat 1% pada perbandingan pollard dengan larutan asam asetat sebesar 1:3. Rendaman tersebut diaduk secara manual selama 3 jam. Hasil rendaman kemudian dimasukkan ke dalam kantong yang terbuat dari kain dan dimasukkan ke dalam bagian pengering mesin cuci dan disentrifuge.

Filtrat yang keluar ditampung dan direaksikan dengan larutan $ZnCl_2$ pada perbandingan molaritas 1:2. Seng ($ZnCl_2$) yang direaksikan sebanyak 2726 mg/L dan yang mengendap sebesar 814,5 mg/L atau 29,7%. Hasil reaksi tersebut kemudian diambil 5 mL, lalu disentrifuse dengan kecepatan 3000 rpm selama 15 menit, kemudian dipisahkan antara endapan dan supernatannya, kemudian dicuci tiga kali dengan aquades. Endapan yang terbentuk diukur kadar bahan keringnya dengan cara dimasukkan ke dalam oven $105^{\circ}C$ selama 24 jam.

Masing-masing endapan yang terbentuk diukur kadar mineral P, Zn, K, Mg, dan Na. Sebagai pembanding dilakukan hal yang sama dengan ekstrak asam fitat pollard tanpa direaksikan dengan larutan $ZnCl_2$. Pengukuran kadar mineral sampel terlebih dahulu dilakukan preparasi dengan metode *wet ashing* (Restz, *et al.* 1960). Sampel ditimbang dalam Erlenmeyer 100 ml, kemudian ditambahkan HNO_3 pekat 5 mL dan dibiarkan selama ± 1 jam sampai menjadi bening. Berikutnya sampel dipanaskan selama ± 4 jam di atas *hot plate*. Setelah ± 4 jam lalu sampel didinginkan dan ditambahkan 0,4 mL H_2SO_4 pekat, kemudian dipanaskan kembali selama ± 30 menit. Pada saat perubahan warna sampel diteteskan 2-3 tetes larutan campuran $HClO_4 + HNO_3$ (2:1) dan setelah itu dipanaskan lagi selama ± 15 menit. Terakhir, sampel ditambahkan 2 mL aquades dan secara bersamaan ditambahkan 0,6 mL HCl pekat, setelah itu dipanaskan selama ± 15 menit sampai larut. Sampel dibiarkan menjadi dingin dalam suhu kamar, lalu dilarutkan dengan aquades sampai 100 mL dalam labu takar. Sampel hasil *wet ashing* ditambahkan 0,05 mL larutan $C_5La.7H_2O$, lalu disentrifuse dengan kecepatan 2500 rpm selama 10 menit, kemudian diukur absorbansinya dengan *atomic absorption spectroscopy* pada panjang gelombang sesuai dengan jenis mineral yang akan dibaca.

Untuk mengukur P, sampel hasil proses *wet ashing* ditambahkan aquades sampai 3 mL, lalu ditambahkan 2 mL larutan B lalu divorteks dan dibaca dengan spektrofotometer pada panjang gelombang 660 nm. Larutan B dibuat dari campuran 10 mL larutan A yang dilarutkan dengan 60 mL aquades ditambah dengan 5 g $FeSO_4.7H_2O$, kemudian ditambah dengan aquades sampai 100 mL. Larutan A diperoleh dengan mereaksikan 10 g amonium molibdat yang ditambah dengan 60 mL aquades dan 28 mL H_2SO_4 pekat, lalu ditambah aquades sampai 100 mL. Semua hasil pembacaan dibandingkan dengan kurva standar.

Perhitungan asam fitat didasarkan pada nilai asumsi bahwa kandungan fosfor dalam asam fitat sebesar 28,2 %. BM asam fitat = 660,08 g/mol (Tokyo

Kasei Kogyo Co. LTD, produk kemasan asam fitat murni), sedangkan BM fosfor = 30,9738 g/mol. Fosfor yang terkandung dalam senyawa asam fitat sebanyak 6.

Uji Degradasi Zn-Fitat dalam Cairan Rumen

Produk Zn-fitat dicampur dengan onggok (total 76,81 mg/kg Zn) dan ditambahkan dengan urea sebanyak 1%. Campuran tersebut diinkubasikan dalam sistem rumen *in vitro*. Degradasi Zn-fitat diukur dengan melihat kadar P dalam cairan rumen pada jam ke-4, 6, 8, 12, 18, dan 24, kemudian dibandingkan dengan substrat yang sama yang dicampur dengan ekstrak asam fitat pada proporsi yang sama.

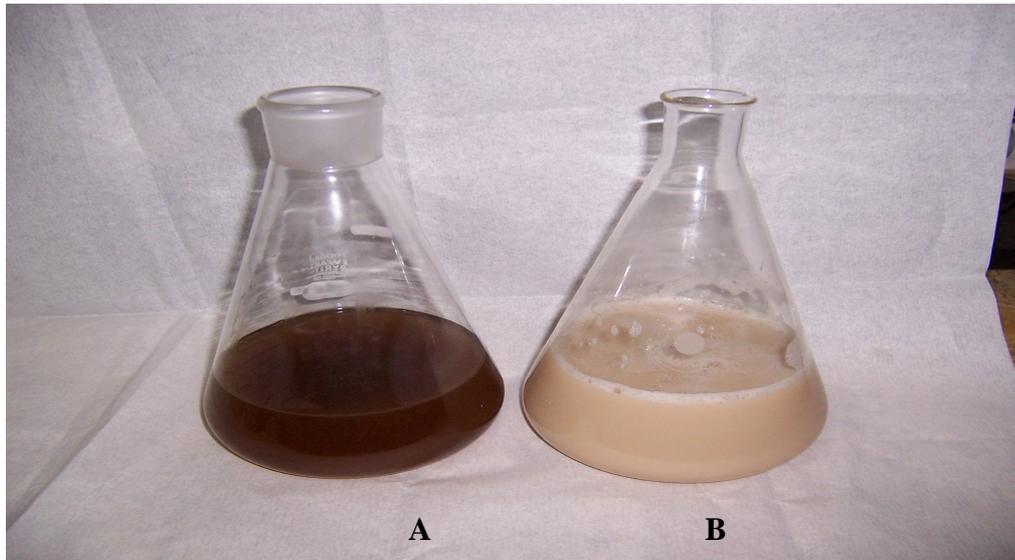
Percobaan *in vitro* dilakukan dengan menggunakan metode Tilley dan Terry (1963) yang telah dimodifikasi. Sebanyak ± 1 g sampel perlakuan dimasukkan ke dalam tabung fermentor yang ditempatkan dalam *shakerbath* pada suhu $\pm 39^{\circ}\text{C}$, lalu ditambahkan dengan larutan saliva buatan (larutan McDougall) sebanyak 12 mL dan cairan rumen domba masih segar sebanyak 8 mL sebagai inokulan. Domba tersebut sebelumnya hanya diberi rumput lapangan. Selama proses memasukan cairan rumen yang telah dicampur saliva buatan ke dalam tabung fermentor, dialirkan gas CO_2 untuk memberikan suasana *anaerob*.

HASIL DAN PEMBAHASAN

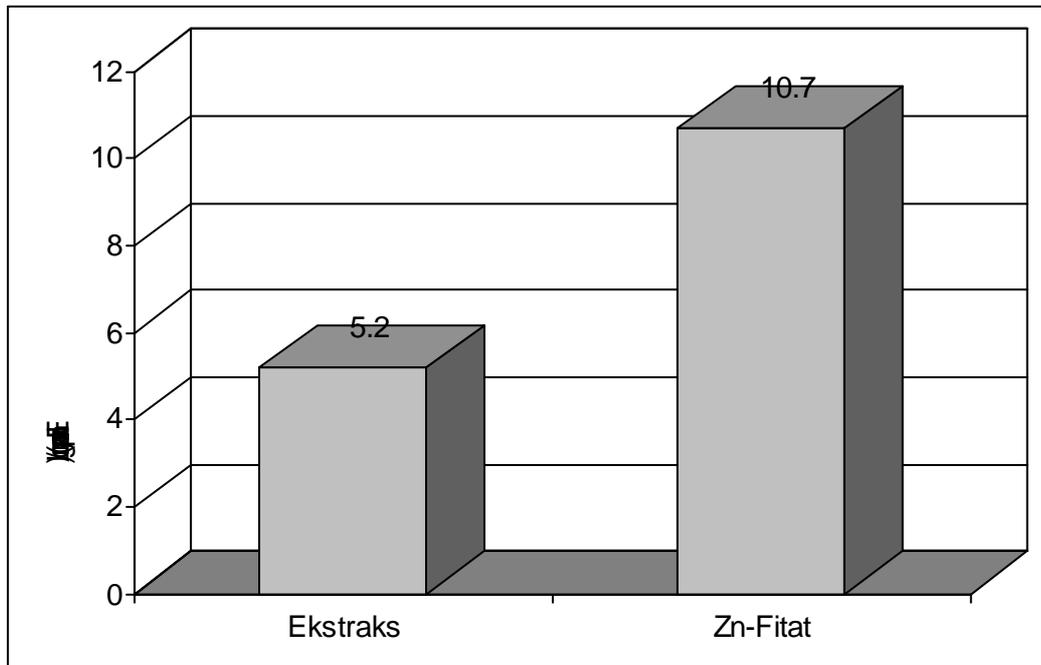
Karakteristik Zn-Fitat

Produk Zn-fitat diperoleh dengan mereaksikan larutan ZnCl_2 yang berwarna bening dengan filtrat yang mengandung asam fitat hasil ekstraksi dari pollard pada rasio 2:1. Hasil reaksi tersebut tampak dengan adanya perubahan warna putih pada larutan dibandingkan dengan hanya ekstrak pollard saja dan bila dibiarkan atau disentrifuse fraksi yang berwarna putih (Zn-fitat) akan mengendap (Gambar 1).

Reaksi antara filtrat hasil ekstraksi pollard dan larutan ZnCl_2 menghasilkan endapan dengan karakteristik seperti yang disajikan pada Gambar 2-4. Gambar 2 menunjukkan bahwa reaksi filtrat ekstrak pollard dengan larutan ZnCl_2 menghasilkan endapan 2 kali lebih banyak dibandingkan ekstrak pollard yang tidak mengalami reaksi dengan ZnCl_2 (10,7 vs 5,2 mg/L). Terbentuknya endapan yang lebih banyak pada campuran ekstrak pollard dengan ZnCl_2 disebabkan terbentuknya kompleks stabil antara asam fitat dan Zn yang ditunjukkan dengan banyaknya asam fitat dan Zn yang turut mengendap.



Gambar 1. a) Produk ekstrak pollard b) Zn-fitat hasil reaksi antara ekstrak pollard dan $ZnCl_2$

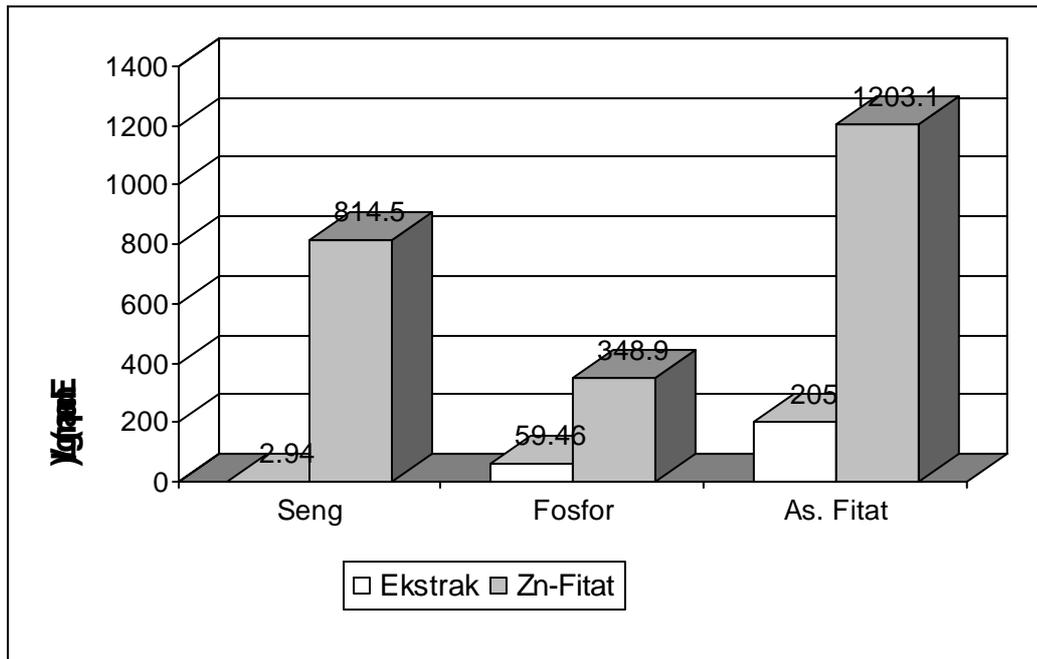


Gambar 2. Endapan terbentuk dari reaksi ekstrak pollard dengan $ZnCl_2$

Endapan Zn-fitat rata-rata mengandung 814,5 mg/L Zn dan 348,9 mg/L P. Kadar P terbentuk setara dengan jumlah asam fitat sebanyak 1203,1 mg/L (Gambar 3) dan menunjukkan kadar asam fitat yang jauh lebih tinggi dibandingkan dengan yang dikandung oleh ekstrak pollard saja. Akan tetapi,

masih banyak Zn yang tidak mengendap karena dari 2726 mg/L Zn yang direaksikan hanya 814,5 mg/L Zn yang mengendap atau sebanyak 29,87%.

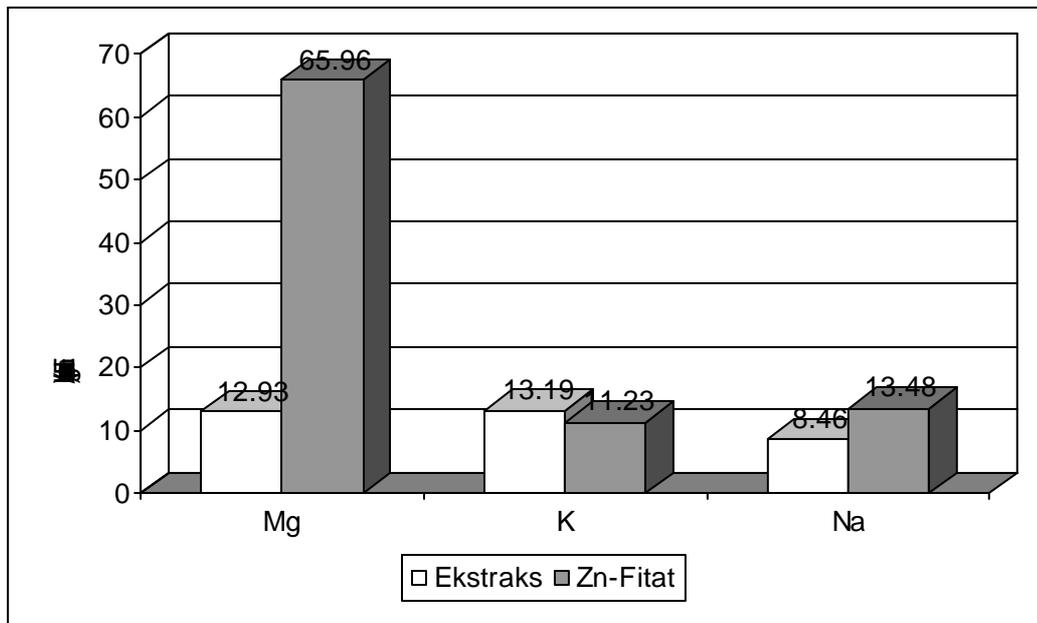
Filtrat hasil ekstraksi pollard tidak hanya mengandung asam fitat, tetapi juga senyawa-senyawa lain yang ikut terekstraksi. Hadirnya senyawa lain tersebut akan mengganggu proses reaksi antara Zn dengan asam fitat sehingga Zn yang terendapkan sangat sedikit dibandingkan jumlah Zn yang ditambahkan.



Gambar 3. Kandungan Zn, P, dan asam fitat dalam endapan

Secara alami asam fitat tidak berdiri sendiri, senyawa ini terikat dengan kation lain misalnya dengan K, Mg, Na, Ca, dan protein (Irving, 1980; Prattley dan Stanley, 1982). Ekstraksi pollard saja ternyata hanya menghasilkan endapan, P dan asam fitat yang rendah meskipun sudah membentuk kompleks dengan kation lain. Hal ini berarti kompleks asam fitat dengan kation lain akan membentuk endapan bila gugus aktif asam fitat terikat kation yang memiliki kekuatan lebih kuat dalam mengikatnya. Perbedaan kekuatan pengikatan antara kation dan asam fitat disebabkan berbedanya tipe dari gugus aktif yang dimiliki oleh masing-masing kation (Chan, 1988).

Sebab lainnya adalah pH yang terukur setelah reaksi antara ekstrak pollard dengan Zn mencapai rata-rata 4,08. Nilai ini belum mencapai pH yang optimum untuk pembentukan kompleks stabil. Kompleks stabil antara Zn dan asam fitat dicapai pada pH 6-7 (Davidek, *et al.* 1999). Menurut Cheryan (1980), kompleks mineral-fitat ada dalam bentuk khlelat yang larut ataupun tak larut, bergantung pada konsentrasi asam fitat, mineral, dan pH larutan.



Gambar 4. Kandungan Mg, K, dan Na dalam endapan

Hadirnya Zn dalam ekstrak pollard ternyata meningkatkan kandungan mineral lain dalam endapan terutama Mg dan Na (Gambar 4). Hal ini terjadi karena Zn terikat pada beberapa gugus aktif asam fitat dimana gugus-gugus aktif yang lain diduga mengikat Mg atau Na. Terikatnya Zn pada sebagian gugus aktif asam fitat menyebabkan senyawa tersebut mengendap.

Terbentuknya endapan Zn-fitat dapat membuktikan bahwa kompleks asam fitat dan Zn dapat dimanfaatkan untuk tujuan lain. Hal ini akan memberikan peluang bahwa asam fitat dapat dijadikan kendaraan bagi beberapa mineral esensial atau senyawa lainnya seperti Cu, Ca, dan protein yang dapat dimanfaatkan sebagai suplemen bagi ternak. Keberadaan Mg, K, dan Na pada endapan menunjukkan bahwa asam fitat secara alami membentuk kompleks dengan mengikat beberapa mineral. Hidrolisis asam fitat dapat menyumbangkan P dan inositol juga kation lain yang dapat dimanfaatkan oleh ternak.

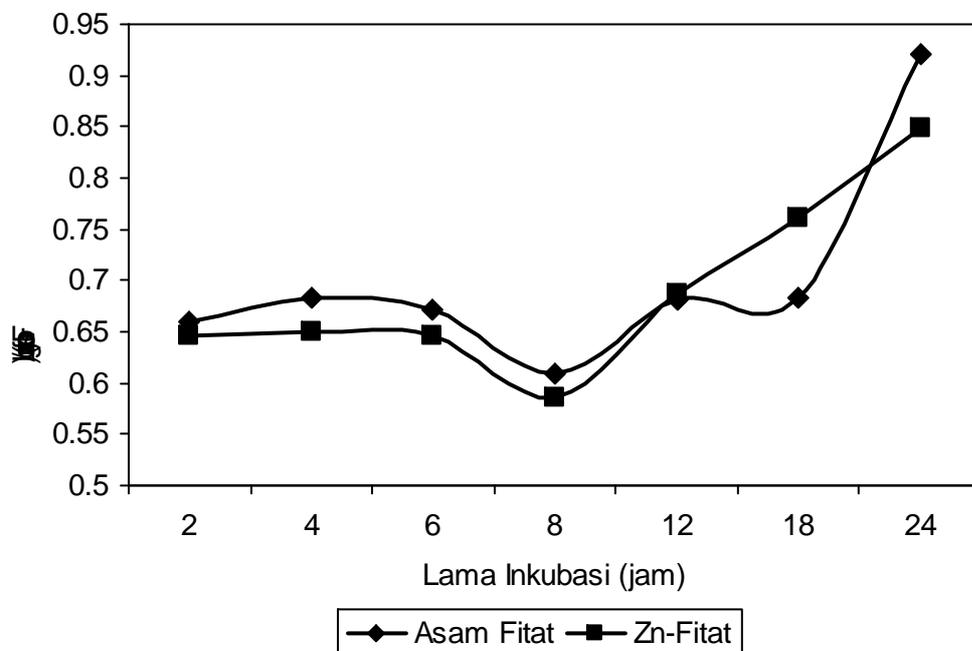
Degradasi Zn-Fitat dalam Cairan Rumen

Ternak ruminansia memiliki kemampuan mendegradasi asam fitat/garam fitat yang berasal dari tumbuhan akibat adanya mikroba rumen penghasil enzim fitase. Degradasi asam fitat tersebut akan melepaskan inositol dan ion P bebas Turk (199). Namun, bila asam fitat bereaksi dengan Zn maka akan mengalami perubahan konfigurasi asam fitat. Beberapa gugus aktif asam fitat mengikat Zn. Perubahan konfigurasi asam fitat diduga menyebabkan enzim fitase membutuhkan waktu yang lebih lama untuk mendegradasi molekul Zn-fitat tersebut. Di samping itu, pH yang mendekati netral pada cairan rumen menyebabkan ikatan Zn-fitat lebih stabil atau kelarutannya rendah sehingga mikroba rumen sulit mendegradasinya. Hal ini ditunjukkan pada Gambar 5, P yang dilepas pada

perlakuan Zn-fitat rata-rata lebih rendah dibandingkan dengan P yang dilepas dari asam fitat dalam ekstrak pollard.

Laju pelepasan P pada perlakuan Zn-fitat menunjukkan lambat sampai jam ke-8, kemudian meningkat terus sampai jam ke-24 dan pada jam ke-18 memiliki jumlah yang lebih tinggi dibandingkan dengan perlakuan ekstrak pollard, namun pada jam ke-24 menjadi lebih rendah. Hal ini berarti kompleks Zn-fitat awalnya sulit didegradasi dan akan mengalami percepatan degradasi setelah jam ke-8. Lepasnya P, maka Zn yang diikat dalam kompleks Zn-fitat akan dilepaskan juga, karena Zn terikat pada gugus fosfat.

Lambatnya Zn-fitat didegradasi menunjukkan telah terjadi aktivitas *slow release* pada Zn yang terikat asam fitat dan diharapkan dapat dimanfaatkan secara efektif bagi ternak. Fenomena ini hampir sama dengan yang dilaporkan Morse, *et al.* (1992) bahwa kehadiran Ca yang terikat dalam konfigurasi asam fitat memperlambat degradasi asam fitat oleh mikroba rumen dan mengurangi ketersediaan P bagi ternak ruminansia.



Gambar 5. Degradasi Zn-fitat dalam cairan rumen

Gambar 5 juga menunjukkan bahwa asam fitat dalam ekstrak pollard memiliki pola laju pelepasan P yang sama dengan Zn-fitat. Asam fitat didegradasi lambat sampai jam ke-8 dan akan cepat meningkat setelah waktu tersebut. Hal ini menunjukkan pula bahwa degradasi asam fitat dalam ekstrak pollard membutuhkan waktu yang lama. Bila suatu pakan yang mengandung asam fitat tinggi memiliki laju degradasi yang cepat (<8 jam), menyebabkan terbatasnya degradasi asam fitat oleh mikroba rumen dan peluang asam fitat pakan lolos menuju pascarumen menjadi lebih besar. Kondisi ini akan berdampak positif

apabila asam fitat berinteraksi dengan kation atau senyawa yang bersifat racun. Sebaliknya, kondisi ketika kation atau senyawa yang bersifat racun rendah akan berdampak negatif karena asam fitat sebagai agen pengkhelat dapat mengikat beberapa mineral atau senyawa yang dibutuhkan ternak ruminansia. Enzim fitase banyak dihasilkan mikroba rumen, namun enzim ini di pascarumen sedikit (Park, *et al.* 1999) dan tidak cukup memecah asam fitat menjadi inositol dan fosfat bebas. Fosfor yang terikat asam fitat dalam *oilseed meal* yang dilindungi dengan formaldehid dari degradasi mikroba rumen menyebabkan tidak dimanfaatkan oleh induk semang (Park, *et al.* 1999).

KESIMPULAN

Zn-fitat dapat disintesis dari ekstrak pollard hasil ekstraksi dengan asam cuka 1% yang dicampur dengan $ZnCl_2$ pada perbandingan molar 1:2. Senyawa ini didegradasi lambat (*slow release*) dalam cairan rumen *in vitro*, sehingga diharapkan dapat menyediakan Zn lebih baik bagi ternak ruminansia.

DAFTAR PUSTAKA

- Chan, H.C. 1988. Phytate and cation binding activity. M.S. Thesis, Texas Tech University, Lubbock, TX.
- Cheryan, M. 1980. Phytic acid interactions in food system. *CRC Critical reviews in Food Science and Nutrition* 13, 297-335.
- Church, D.C. 1984. *Livestock Feeds and Feeding*. Second ed. O&B Books Inc. Corvallis, Oregon.
- Cosgrove, D.J. 1980. Inositol Phosphate: Their Chemistry, Biochemistry and Physiology. Elsevier Scientific Publishing Company. Amsterdam.
- Costello, A.J.R., T. Glonek, and T.C. Meyers. 1976. ^{31}P -nuclear magnetic resonance-pH titration of myo-inositol hexaphosphate. *Carbohydrate Research* 46:159-171.
- Davidek, J., J. Velisek, and I. Pokorny. 1999. Chemical Changes During Food Processing. Elsevier Science Publisher. Amsterdam, The Netherlands.
- Hidvegi, M. and R. Lasztity. 2002. Phytic acid content of cereals and legumes and interaction with protein. *Periodica polytechnica Ser. Chem. Eng.* 46 (1-2): 59-64.
- Irving, G.C.J. 1980. Phytase, in: *D.J. Cosgrove (Ed.) : Inositol Phosphates*. Elsevier, Amsterdam.
- Karr, K.J., K.A. Dawson, and G.E. Mitchell Jr. 1991. Inhibitory effects of zinc on the growth and proteolytic activity of selected strains of ruminal bacteria. p 27. Beef Cattle Res. Rep. No. 337, Univ. of Kentucky, Lexington.

- Maga, J.A. 1982. Phytate : Its Chemistry, Occurrence, Food Interactions, Nutritional Significance, and Method of Analysis. *J. Agric. and Food Chem.* 30 (1) : 1-8.
- Marounek, M, D. Duskova, V. Skrivanoka, and O.G. Savka. 2000. Isotachophoretic determination of phytate phosphorus in feces of cattle, pigs and hens. *Reprod. Ntr. Dev.* 40:223-231.
- Morse, D., H.H. Head, and C.J. Wilcox. 1992. Disappearance of phosphorus in phytate from concentrates in vitro and from rations fed to lactating dairy cows. *J. Dairy Sci.* 75:1979-1986.
- Nelson, T.S., L.B. Daniels, J.R. Hall, and L.G. Shields. 1976. Hydrolysis of natural phytate phosphorus in the digestive tract of calves. *J. Anim. Sci.* 42:1509-1512.
- Park, W.Y., T. Matsui, C. Konishi, S.W. Kim, F. Yano, and H. Yano. 1999. Formaldehyde treatment suppresses ruminal degradation of phytate in soyabean meal and rapeseed meal. *Br. J. Nutr.* 81(6): 467-71.
- Prattley, C.A., and D.W. Stanley. 1982. Protein-phytate interaction in soybean : I. Localization of phytate in protein bodies and globoids. *J Food Biochem.* 6:243-253.
- Ravindran, V., W.L. Bryden, and E.T. Kornegay. 1995. Phytases: Occurrence, bioavailability and implications in poultry nutrition. *Poultry and Avian Biology Reviews* 6, 125-143 (5.1.9).
- Restz, L.L., W.H. Smith, and M.P. Plumlee. 1960. A simple wet oxidation procedure for biological material. Animal Science Department, Purdue University, West La Fayette. *Animal Chemistry* 32:1728-1734.
- Rojas, L.X., L.R. McDowell, R.J. Cousins, F.G. Martin, N.S. Wilkinson, A.B. Johnson, and J.B. Velasquez. 1995. Relative bioavailability of two organic and two inorganic zinc sources fed to sheep. *J. Anim. Sci.* 73:1202-1207.
- Sumiati. 2005. Rasio Molar Asam Fitat : Zn untuk Menentukan Suplementasi Zn dan Enzim Phytase dalam Ransum Berkadar Asam Fitat Tinggi [disertasi]. Bogor : Sekolah Pascasarjana Institut Pertanian Bogor.
- Tilley, J.M.A. and R.A. Terry. 1963. A two stage technique for the in-vitro digestion of forage crops. *J. Br. Grassl. Soc.* 18; 104-111.
- Turk, M. 1999. Cereal and Microbial Phytase. Phytase Degradation, Mineral Binding and Absorption. Doctoral Thesis. Department of Food Science, Chalmers University of Technology. Chalmers Reproservice, Gotenborg, Sweden.
- Vohra, P. and F.H. Kratzer. 1965. Influence of various chelating agents on the availability of zinc. *J. Nutr.* 82: 249-256.
- Yanke, L.J., H.D. Bae, L.B. Selinger, and K.J. Cheng. 1998. Phytase activity of anaerobic ruminal bacteria. *Microbiology* 144:1565-1573.