

Pengantar Falsafah Sains (PPS 702)
Sekolah Pascasarjana/S3
Insitut Pertanian Bogor

1 Desember 2004

Dosen :

Prof. Dr. Ir. Rudy C. Tarumingkeng (Penanggung Jawab)

Prof. Dr. Ir. Zahrial Coto

**PENGARUH ENZIM FITASE MIKROBIAL *Aspergillus niger* TERHADAP
Bioavaibility FOSFOR DAN CALSIUM PADA AYAM ROILER.**

Oleh:

Sofia Sandi

D061040071

Email@ sandi70 telkomnet

PENDAHULUAN

Latar Belakang

Kebutuhan unsur mineral fosfor dan calsium penting dalam pertumbuhan ternak ayam broiler, unsur fosfor berfungsi untuk pengaturan pembentukan tulang, metabolisme karbohidrat dan lemak, penyimpanan, pembebasan dan transfer energi, pengaturan keseimbangan asam dan basa cairan tubuh, pembentukan fosfolipid, fospoprotein, nukleoprotein dan beberapa enzim. Sedangkan Ca berfungsi dalam pembentukan dan pemeliharaan tulang dan gigi, yang merupakan 99% Ca dalam tubuh dan sisanya 1% terdapat diluar jaringan tulang dan gigi. Selain itu diperlukan juga untuk pembekuan darah bersama dengan vitamin K.

I Ketersediaan unsur fosfor dalam tanaman sebagai bahan baku pakan dibatasi oleh adanya antinutrisi yang mengikat unsur P dan unsur-unsur lainnya sehingga tidak bisa dimanfaatkan oleh hewan. Antinutrisi tersebut yaitu Asam fitat yang merupakan garam-garaman dari Asam fitik. Kandungan asam fitat ini dapat diatasi dengan enzim fitase yang menghidrolisa asam fitase sehingga unsur mineralnya terlepas dari ikatannya. Enzim tersebut secara alami sudah ada pada tanaman dan usus hewan atau manusia, akan tetapi jumlahnya jauh lebih rendah dibandingkan dengan kandungan asam fitatnya sehingga perlu suplementasi enzim fitase dari luar.

Suplementasi enzim fitase pada bahan pakan bisa didapat dari enzim fitase yang dihasilkan oleh mikroorganisme, para peneliti telah meneliti beberapa mikroorganisme yang dapat memproduksi enzim ini baik dari bakteri maupun dari

jenis kapang. Mikroorganisme yang sering digunakan untuk produksi enzim ini adalah dari jenis kapang *Aspergillus niger*.

Suplementasi enzim ini juga diharapkan dapat mendukung penggunaan bahan baku lokal sebagai pakan alternatif dengan cara meningkatkan kualitas mutunya dan mengurangi adanya pengaruh senyawa antinutrisi Asam fitat dalam bahan baku pakan tersebut.

Tujuan dari penulisan ini adalah untuk mengetahui pengaruh enzim fitase mikrobial yang dihasilkan oleh *Aspergillus niger* terhadap *bioavailability* fosfor dan calsium pada ayam broiler.

UNSUR POSFOR DAN CALSIUM DALAM RANSUM AYAM BROILER

Kebutuhan Unsur Fosfor dan Calsium Untuk Ayam Broiler

Mineral dan fosfor dibutuhkan oleh semua hewan, tetapi kebutuhannya lebih sedikit dibanding dengan calsium. Posfor cepat diserap yaitu dalam lima menit setelah mencapai duodenum dan efisiensi penyerapan tergantung pada beberapa faktor dari ransum, bentuk dan cara pencernaan makanan, pH usus halus, rasio Ca : P dan jumlah vitamin D yang tersedia.

Kebutuhan unsur P dan Ca untuk ayam broiler yaitu 0,7% dan 0,9% (NRC 1984), dan menurut Titus dan Fritz (1971) penyediaan posfor dalam ransum ayam untuk pertumbuhan maksimal dan pertumbuhan yang baik yaitu 0,6 - 0,65% P total, minimal 0,5% dari P total harus dalam bentuk P anorganik.

Manfaat Unsur Fosfor Dalam Ransum Ayam Broiler

Scott *et. al.* (1982) menyatakan bahwa disamping memainkan peranan dalam pengaturan pembentukan tulang, fosfor juga berperan dalam metabolisme karbohidrat dan lemak, zat tersebut masuk ke dalam komposisi bagian-bagian penting dari semua sel hidup, dan garam-garam yang dibentuk memainkan peranan penting dalam memelihara keseimbangan asam basa. Fosfor diperlukan untuk pembentukan fosfat energi tinggi, DNA, RNA dan enzim. Penyerapannya tergantung pada struktur kristal, jumlah total dari ransum dan rasio Ca : P.

Menurut Ewing (1963) fosfor terlibat dalam penyimpanan, pembebasan dan transfer energi, pengaturan keseimbangan asam basa cairan tubuh, pembentukan posfolipid, Posfoprotein, Nukleoprotein, dan beberapa enzim.

Beberapa defisiensi fosfor menyebabkan riketsia pada hewan muda, pertumbuhan terhambat, aktifitas terbatas disamping terjadinya perubahan metabolisme beberapa zat makanan, tetapi tidak menurunkan kadar fosfor dalam plasma darah (Scott et. al 1982). Ransum dengan rasio Ca : P yang luas akan menghasilkan penambahan berat badan yang kurang atau kecil dibandingkan dengan rasio yang lebih sempit pada pertumbuhan anak ayam (Nelson *at al.*, 1981).

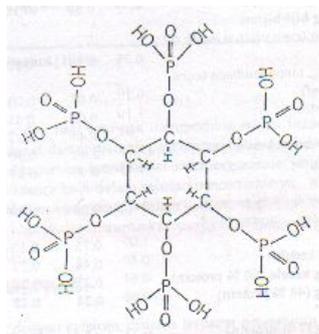
Peningkatan fosfor dari 0,48% menjadi 0,7% (diantaranya 0,3% fosfor berasal dari tanaman) akan menyebabkan naiknya berat badan dan abu tulang, begitu juga terhadap keseimbangan Ca : P , maka rasio 1:1 Dan .4 :1 nyata menaikkan berat badan (Waldroup *et al.*, 1963).

ASAM FITAT SEBAGAI ANTI NUTRISI

Struktur Asam Fitat

Asam fitat merupakan zat antinutrisi yang secara alamiah terdapat pada tanaman. Asam fitat kehadirannya dalam bentuk garam-garaman dari asam fitik yang mengandung kira-kira 2/3 dari fosfor dalam tanaman sereal dan Biji-bijian yang menjadi faktor utama dalam pakan unggas (Tanveer, A. *et. al.*, 2000).

Bedford, M. R (2000) menyatakan bahwa Asam fitat merupakan senyawa kimia yang bersifat *Fixed chemical entity* yang kehadirannya benar-benar ada dalam tanaman, kehadirannya sebagai ikatan Ca-Mg-NA dan sebagai hexaphosphate ester dari inositol (Inositol hexakisphosphate (IP6)). Lihat gambar 1. Asam fitat yang terjadi secara alam dalam semua makanan asal tanaman merupakan bentuk simpan utama pati fosfat dan inositol dalam hampir semua biji-bijian, bentuk kimia asam fitat mioinositol 1,2,3,4,5, dan 6 hexakishidrogen fosfat (Oberleas, 1966)



Gambar 1. Asam Pitat

Tabel 1. Kandungan Fitat Fosfor dari beberapa bahan makanan menurut berbagai sumber.

Bahan	Matthaus (1997)	McKnight (1997)	Lantzsch et al (1992)	NRC (1994)	Mean \pm SD
Maize	0.265	0.196	-	0.2	0.220 \pm 0.038
Wheat	0.235	0.255	-	0.24	0.24 \pm 0.010
Barley	0.223	0.230	-	0.19	0.214 \pm 0.021
Soybean	-	-	1.2 \pm 0.03	-	1.2 \pm 0.03
rapeseed	-	-	1.35 \pm 0.10		1.35 \pm 0.10
Soybean meal	-	0.372	-	0.40	0.306 \pm 0.02
Rapeseed meal	-	0.870	-	0.87	0.87

Sumber : Bedford, M. R. (2000)

Tabel 2. Kandungan Fosfor Non Fitat dan Fitat Fosfor Dalam Bahan Makanan

Bahan Makanan	% Fosfor			Non Fitat
	Total	Fitat	Nonfitat	% Total P
Biji-bijian :				
Jagung	0.26	0.17	0.09	34
Barley	0.34	0.19	0.15	44
Milo	0.31	0.21	1.10	32
Oats, Whole	0.34	0.19	0.15	44
Oats, hulled	0.45	0.35	0.10	22
Gandum	0.30	0.20	0.10	22
By-Produk Biji-Bijian				
Dedak Padi	1.67	1.44	0.23	41
Dedak Padi	2.72	2.42	0.30	14
Dedak Gandum	1.37	0.96	0.41	11
Protein Suplemen :				
Protein yang diisolasi	0.80	0.48	0.32	40
Bungkil kedelai (50% Protein)	0.61	0.37	0.24	39
Bungkil kedelai (40% protein)	0.66	0.38	0.28	42
Lain-lain :				
Tepung alfalfa (17% protein)	0.23	0.01	0.23	100

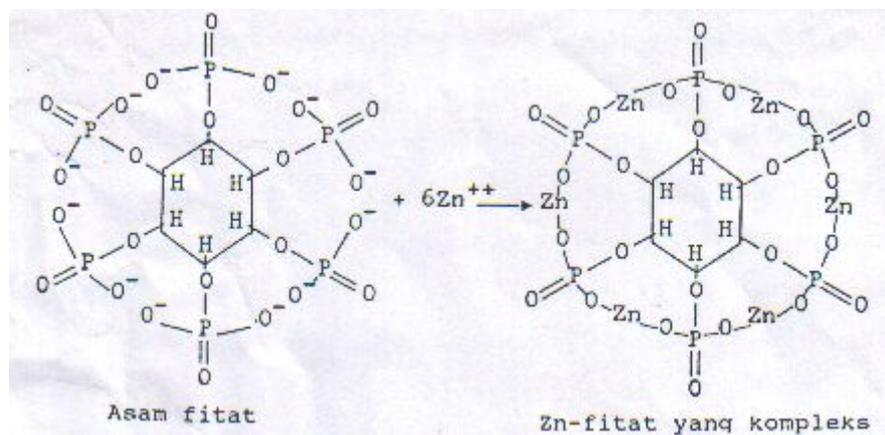
Sumber : Nelson dalam Halloran (1980)

Fosfor merupakan unsur utama dalam kompleks asam fitat dan unsur-unsur lainnya juga ditemukan terikat seperti Zn, Mn, Fe, Ca, Mg dan Na yang menyebabkan berkurangnya unsur-unsur tersebut yang dapat dimanfaatkan oleh hewan. Kandungan asam fitat yang tinggi dalam bahan makanan terdapat dalam dedak padi, dedak gandum dan kedelai.

Pengaruh Asam Fitat Terhadap Ketersediaan Mineral

Komplek fitat mineral adalah senyawa yang sukar larut terbentuk dari gabungan asam fitat dengan mineral. Asam fitat terikat dengan beberapa mineral antara lain Ca, Zn, Co, Mg, dan Cu untuk membentuk fitat mineral yang tidak larut dan juga fitat-Protein-Mineral (Oberleas, 1966).

Sifat anti nutrisi asam fitat yang berdasarkan kemampuannya untuk bergabung dengan mineral bervalensi dua membuat ion mineral secara metabolik tidak tersedia untuk ternak dan mengakibatkan terjadinya defisiensi. Defisiensi Zn pada ayam (O'Dell *et al.*, 1964) diakibatkan penambahan kadar Fitat-Fosfor yang tinggi dalam makanan, sehingga inositol hexapوسفat bereaksi dengan kation dan protein.



Gambar 2. Reaksi Asam Fitat dengan mineral Zn membentuk kompleks pitat-Zn (Scott *et al* 1982)

Pengaruh fitat terhadap riketsia tidak sepenuhnya dimengerti, tetapi sebagian disebabkan ketersediaan fitat-fosfor yang jelek dan kemampuan fitat mengikat Ca untuk membentuk kompleks tidak larut sehingga Ca tidak tersedia untuk penyerapan. Kalsium yang bergabung dengan asam fitat tidak diserap dalam saluran pencernaan, kecuali pitat di hidrolisi secara enzimatis (Reinhold *et al.*, 1973).

Komplek fitat-zn yang tidak larut terbentuk dalam saluran pencernaan, sehingga mengganggu penyerapan dan reabsorpsi Zn makanan. Percobaan secara *in vitro* menunjukkan bahwa kompleks fitat-zn mempunyai daya larut rendah pada pH 5 - 7 (Oberleas *et al* 1966). Pada studi keseimbangan mineral dan pertumbuhan tikus (Likusky dan Forbes 1965) mempelajari pengaruh Ca dan asam fitat makanan terhadap penggunaan mineral zn, mg, dan Ca serta Fosfor dalam makanan "semi

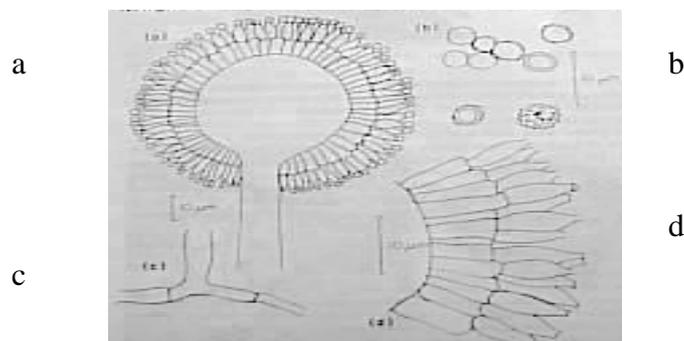
purified diet" ternyata Ca menurunkan penyerapan mineral Zn makanan yang mengandung asam fitat, tetapi tidak nyata menurunkan penyerapan Zn makanan tanpa asam fitat. Penyerapan Mg dan fosfor diturunkan oleh Ca yang berlebihan dalam makanan tanpa atau mengandung asam fitat, dan penyerapan mineral Ca itu sendiri juga menurun. Penambahan 2% asam fitat akan menurunkan pertambahan berat badan.

KAPANG *Aspergillus Niger*

Aspergillus niger merupakan salah satu jamur genus *Aspergillus*, famili Moniliceae, oedo Moniliales dn sub difisio Eumycota (Rapper dan fennel 1977). Jamur ini terdapat dimana-mana sebagai saprofit. Ciri khas dari jamur ini adalah berupa benang-benang tunggal yang disebut hifa atau berupa kumpulan benang-benang padat menjadi satu, tidak mempunya klorofil, bersifat aerobik serta berkembang biak secara veetatif dan generatif dengan berbagai macam spora (Smith dan Pateman 1977). *Aspergillus niger* menghasilkan enzin N-acetylglucosamine, glukos, mannose, dan galactose juga menghasilkan enzin alpa-amilase, gluukoamilase, selulase, b-D-galaktosidase(laktase), endo 1,3 (4)glukanase, gluuko-oksidade, Phitase, katalase, pektinesterase, pektinliase dan poligalakturinase.

Dalam pertumbuhannya *Asprgillus niger* berhubungan langsung dengan zat-zat makanan dalam substrat. Molekul sederhana seperti gula dan komponen lain yang larut disekeliling hifa dapat langsung diserap molekul lainnya yang lebih kompleks seperti selulosa, pati dan protein harus dipecah dahulu sebelum diserap kedalam selnya.

Aspergillus niger bersifat aerobik sehingga dalam pertumbuhannya memerlukan oksigen dalam jumlah yang cukup banyak dan pada kisaran pH 2,8 - 8,8 sedangkan temperatur optimum bagi pertumbuhannya adalah 37⁰ C.



Gambar 4. Jamur *Aspergillus niger* (a) conidoal head (b) conidia (c) foot cell (d)methuale and phialides

ENZIM FITASE

Fungsi Enzim Fitase

Fitase (myoinositol hezafosfat fosfohidrolase) adalah suatu fosfor menesterase yang menghidrolisa asam fitat menjadi fosfat dan mioinositol. Enzim ini tersebar luas dalam tanaman, jaringan ternak atau usus halus, juga pada beberapa spesies kapang dan bakteri tertentu (Cosgrove, 1966). Aktiviats fitase dipengaruhi oleh pH, optimumnya 5 - 7,5. Suhu juga mmpengaruhinya dengan suhu optimum untuk aktivitas enzim ini kira-kira 50°C pada buncis dan 55 °C pada gandum (Mandal *et al.*, 1972).

Peers (1953) melaporkan bahwa dalam butiran gandum enzim fitase tersebar pada berbagai bagian dan enzim fitase yang tinggi ditemukan pada bagian endosperm dan aleuron biji berturut-turut 34,1 dan 39,5% dari tolatal enzim fitase. Fitase yang dihasilkan oleh mikroorganimse seperti kapang adalah *Aspergillus niger*. Kapang tersebut menghasilkan enzim fitase ekstraseluler dengan deposforilasi kalsium fitat dalam larutan asam. Fitase juga dihasilkan oleh mikroorganisme *Aerobacter aerogenes* dan beberapa bakteri tanah (Cosgrove 1966).

Produksi Enzim Fitase dari Kapang *Aspergillus niger*

Enzim fitase dihasilkan dari kapang *Aspergillus niger* melalui fermentasi selama 10 hari pada suhu 28 °C pada medium *Maize Starch*, kandungan medium tersebut adalah (g/l) : pati maize 91, glukose 1 H₂O 38, KNO₃ 12,0., FeSO₄.7H₂O 0,20, KCl 0,60; MgSO₄.7H₂O 0,60; dengan pH 4,5 dari penggunaan 1N NaOH atau 1 N NH₂SO₄..

Medium difermentasi selama 10 hari dal selanjutnya difiltrasi dengan menggunakan kain kapas, kertas saring sampai mendapatkan filtrat yang bersih. Filtrat ini yang dignakansebagai crude enzim dan disimpan pada suhu 4 °C tidak lebih dari 7 hari. Metode ini dilakukan sesuai dengan metode oleh Tanverr, A *et al*(2000).

Uji Enzim Fitase

Filtar yang dihasilkan diuji aktifitas fitaseny dengan menggunakan metode simons *et al* (1990). Uji dilakukan dengan shaking mixer bath 40°C, dengan reaksi pencampurannya 0,1 ml filtrat, 0,9 ml bufer sodium asetat 0,1 M dan Bahan yang mengandung asam pitat sampai konsentrasinya 1 mg/ml, Shaking dilakukan selama 60 menit dan dihentikan dengan penambahan 6 M HCl setelah reaksi 15, 30 dan 60

menit sampai akhirnya konsentrasinya 1 M. Sebagai blankonya adalah sample yang tidak dikasih asam fitat sehingga bebas dari fosfat. Selanjutnya sample disentrifuse selama 10 menit pada 3000 rpm. Jumlah fosfat yang bebas dideteksi dengan spektropotometrical dengan metode Fiske dan Subbarow (1925) pada fraksi supernatan yang bersihnya. 1 unit pitase adalah aktifitas untuk membebaskan 1 umol fosfat dari asam fitat dalam 1 menit pada pH 5.5 dan suhu 40°C. Aktivitas enzim menurut Tanverr A *et al* (2000) ini adalah 1.075 ftase unit (PU) permenit per ml dari filtart crud cultur pada pH 5.5 dan suhu 40°C.

Perlakuan Enzim pada Substrat

Dalam penelitian yang dilakukan oleh Tanveer A. *et al* (2000) ini perbandingan antara substrat dan enzim adalah 1 : 1, waktu inkubasi 8 jam untuk jagung dan 10 jam untuk tepaung kedelai pada pH 5,5 suhu 40°C yang telah nyata sebagai kondisi yang optimum untuk membebaskan fosfat dari asam fitat. Perlakuan yang diberi adalah dengan cara menyemprot jagung dan tepung kedelai tersebut dengan Crude Enzim fitase yang dihasilkan untuk degradasi fosfor fitat oleh enzim. Setelah perlakuan enzim maka bahan tersebut dikeringkan pada suhu 60°C di oven selama 12 jam dan digunakan sebagai campuran pakan broiler.

Metode fermentasi yang dilakukan diatas adalah metode fermentasi medium padat yaitu proses fermentasi yang substartnya tidak mengandung air berlebih tetapi cukup mengandung air untuk keperluan mikroba.

Disamping itu substart dedak padi juga dapat digunakan, hal ini dilaporkan oleh Refnita (1990) yang menggunakan Dedak padi sebagai substart yang difermentasi dengan *Aspergillus niger* untuk campuran pakan broiler.

PENGARUH ENZIM FITASE TERHADAP *BIOAVAILABILITY* FOSFOR DAN KALSIUM PADA AYAM BROILER

Berdasarkan hasil penelitian Tanveer A *et al* (2000) melaporkan bahwa fitase yang dihasilkan dari *Aspergillus niger* selama 10 hari fermentasi pada medium *Maize Starch-based*, aktifitasnya ditemukan optimum pada 1.075 Pitase unit/menit/ml dari filtrat crude culture pada pH 5.5 suhu 40°C. Percobaannya pada pakan ayam broiler dengan menggunakan ransum yang mengandung jagung dan kedelai yang telah difermentasi dengan *Aspergillus niger* menghasilkan bahwa Suplementasi enzim fitase meningkatkan pertambahan bobot badan 2.65% dari kontrol dan juga meningkatkan konsumsinya. Hasil tersebut menunjukkan bahwa perlakuan mikrobial fitase dari bahan yang rendah fosfor menambah pertumbuhannya dan retensi ratio P : Ca dan juga meningkatkan mineralisasi tulang pada ayam broiler.

Sedangkan Refnita (1990) melaporkan bahwa *Aspergillus niger* yang dibiakkan pada dedak padi sebagai substrat dapat menghasilkan enzim fitase, aktifitasnya dihasilkan pada lama fermentasi 3, 4 dan 5 hari, dan lamanya fermentasi ini tidak nyata mempengaruhi aktifitas enzim pitase. Tingkat pemberian dedak terfermentasi 50%, 40%, 30% dan 10% dan periode umur sangat nyata mempengaruhi konsumsi ransum ayam broiler. Pada periode starter hubungan tingkat dedak terfermentasi (X) dengan konsumsi ransum (Y) bersifat kuadrat dengan persamaan $Y_{1-28} = 45.8 + 0.225X - 0.0034X^2$. sedangkan pada periode finisher bersifat linier dengan persamaan $Y_{29-49} = 114 + 0.304X$.

Pengembangan Penggunaan Enzim untuk Pakan di Masa Depan

Dalam menggunakan enzim untuk meningkatkan mutu pakan dapat dilakukan agar peningkatannya lebih baik dengan melakukan pengembangan-pengembangan pemanfaatan enzim seperti :

1. Identifikasi substrat

Substrat yang memiliki kandungan miskin nutrien dapat saling dikombinasikan untuk mendapatkan hasil yang baik,

2. Karakteristik Enzim yang digunakan

Enzim yang digunakan saat ini belum dapat diketahui secara baik bagaimana penggunaannya jika dilakukan teknologi prosesing pakan seperti pelleting dan ekstrusing pada suhu lebih besar dari 95 °C. Hal ini sulit karena memerlukan peralatan yang mahal untuk melakukan Termotoleran, akan tetapi mungkin dapat

diatasi dengan menggunakan peralatan yang ada. Pengembangan dari termotoleran enzim banyak dilakukan untuk pengeringan, enzim bubuk yang bisa dipakai pada proses suhu tinggi dan tidak perlu menggunakan peralatan yang mahal.

3. Formasi Produk

Akhir produk dari aktivitas enzim tidak hanya penting dalam menghidrolisa substrat target, tapi juga harus melihat biaya khusus yang juga penting yaitu meyakinkan akan kepastian bahwa keuntungan menggunakan mikroorganisme lebih baik dari pada mengusir bakteri patogen dengan menggunakan antibiotik

KESIMPULAN

Keterbatasan sumber bahan pakan yang mengandung enzim fitase dapat diatasi dengan suplementasi enzim fitase dari kapang *Aspergillus niger* yang memfermentasi substrat sehingga unsur mineral yang terikat oleh asam fitat dapat dimanfaatkan oleh Ayam broiler. Enzim fitase mikroorganisme yang dihasilkan perlu dikembangkan kearah penggunaannya secara efisiensi secara ekonomis, lingkungan dan teknis.

DAFTAR PUSTAKA

- Bedford, M. R. 2000. Exogenous enzymes in monogastric nutrition- their current value and future benefits. *Anim Feed Sci and Tech J.* 36 (2000) 1 – 13
- Cosgrove, D.J. 1966. The chemistry and biochemistry of inositol polyphosphate. *Rev Pure and appl. Chem.* 16 : 269.
- Ewing, W. R. 1963. *Poultry Nutrition*, The Ray Ewing Co. Publ, Pasadena, California.
- Halloran, H. R. 1980. Phytate Phosphorus in feed formulation. *Feedstuffs*, august 4.
- Likusky, H.J.A. and R.M. Fobes. 1965. Effect of calcium and phytic acid on the utilization of dietary zinc. *J. Nutrition.* 85:230-234.
- Mandal, N. C., S. Burman and B.B. Biswas, 1972. Isolation purification and characterization of phytase from germinating mung bean. *Phytochemistry.* 11:495.

- Nelson, T.S., L.K. Kirby and Z.B. Johnson. 1981. The effect of altering the cation-anion content with calcium and phosphorus on digestion of dry matter and amino acids and on energy utilization. *Poultry Sci.* 60 : 786 – 789
- N.R.C. 1984. Nutrient Requirement of Poultry. 8th Ed. National Research Council, National Academic of Sciences, Washington.
- Oberleas, D. , M.E. Muhrer and B. L. O'Dell. 1966. Dietary metal-complexing agents and zinc availability in the rat *J. Nutr.*90:56-62.
- O'Deal, B.L. , J.M. Yihe dan J.E. savage. 1964. Zinc availability in the chicks as affected by phytates, calcium and ethylene diaminetetraacetate. *Poultry sci.* 43:415.
- Peers, F.G. 1953. The Phytase of Wheat. *Biochem. J.* 53 : 102.
- Rapper, K. B. and D.I. Fennel. 1977. The genus *Aspergillus*. Robert E. Krieger Publishing Company Huntington, New York.
- Refnita, 1990. Pengaruh Penggunaan Dedak padi yang difermentasi dengan *Aspergillus niger* dalam ransum dengan serat kasar tinggi terhadap penampilan produksi dan ketersediaan mineral P,Ca dan Mg Ayam Pedaging. Tesis Pasca Sarjana IPB, Bogor
- Reinhold, J.G. K. Nasr, A. Lahingarczaden, and H. Hendayati. 1973. Effects of purified phytate and phytate rich bread upon metabolism of Zn, Ca, P in man. *Lancet.* 1 : 293.
- Scott, M.L., M. C. Nesheim and R.J. Young. 1982. Nutrition of the Chicken. 3th Ed. Publ. By M.L. Scott and Assoc. Ithaca, New York.
- Smith, J.E. and J.A. Pateman. 1977. Genetics and Physiology of *Aspergillus*. Academic Press. London.
- Tanveer, A., S. Rasool, M. Sarwar, A. Haq and Z. Haq. 2000. Effect of Microbial Phytase produced from a fungus *Aspergillus niger* on Bioavailability of Phosphorus and calcium in Broiler Chickens. *Animal Feed Science and Technology Journal.* 83 (2000) 103-114.
- Titus, H.W. and J.C. Fritz. 1971. The Scientific feeding Chickens. 5th ed. the interstate, Danville. Illinois.
- Waldorup, P.W. C.B. Ammerman and R.H. Harms. 1963. The relation of phosphorus, calcium and vitamin D3 in the diet of broiler-type chicks. *Poultry Sci.* 45 : 982.