

KEBERADAAN BAKTERI PENGHASIL FITASE UNTUK PERBAIKAN KESUBURAN TANAH VERTISOL PADA BERBAGAI SISTEM BUDIDAYA TANAM DI KECAMATAN GONDANGREJO KABUPATEN KARANGANYAR

Slamet Santoso, Sajidan
Pendidikan Biologi FKIP UNS
E-mail: slametsantosa_bio@yahoo.co.id

Diterima 02 Desember 2012, Disetujui 21 Januari 2013

ABSTRAK- Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui apakah bakteri-bakteri yang diisolasi dari tanah vertisol daerah Kecamatan Gondangrejo mempunyai keragaman bakteri dan kemampuan untuk menghasilkan fitase. Penelitian ini bersifat eksploratif, pengumpulan data dari eksperimen laboratorium. Bakteri perakaran padi (PJ2, PJ3, PP2, PP8, PU2, dan PU+1) memiliki kemampuan tumbuh pada suhu 70°C, dan aktivitas enzimnya masih aktif suhu 80°C serta pH 4 – 8. Bakteri perakaran jagung (JP1, JW1, JPJ1, JPS1) pertumbuhannya masih aktif suhu 60°C, dan aktivitas enzimnya aktif suhu 60°C serta pH 4 – 8. Perakaran kacang (KPTU4, KPJW1, KPTU3, KTJ2) pertumbuhannya masih aktif suhu 60°C, dan aktivitas enzimnya aktif suhu 60°C serta pH 4 – 7. Perakaran tebu (TS1, TS2, TU1, TJ4) pertumbuhannya masih aktif suhu 60°C dan aktivitas enzimnya aktif suhu 60°C serta pH 4 – 8. Perakaran singkong (SW2) pertumbuhannya masih aktif suhu 60°C, dan aktivitas enzimnya aktif pada suhu 90°C serta pH 4 – 8. Perakaran waluh (WP1, WP3) pertumbuhannya masih aktif suhu 60°C, dan aktivitas enzimnya aktif suhu 60°C serta pH 5 – 8. Perakaran gambas (GPP2, OU1,OU2) pertumbuhannya masih aktif pada suhu 60°C, dan aktivitas enzimnya aktif suhu 60°C serta pH 4 – 8. Ekstrak enzim kasar dari isolat terpilih untuk daerah perakaran padi yang paling bagus PU+2 dan PU+1, perakaran kacang KTJ2 dan KPJW1, perakaran tebu TU1 dan TU2, perakaran jagung JP1 dan JPJ1, perakaran gambas GPP2 dan OU2 keseluruhan ekstrak enzim stabil sampai suhu 80°C. Isolat terpilih aktif pada kondisi pH 6-8 PJ3, OU 2, WP1, WP4, JW1, JP1, KPtU2, KJP1, KPtU4, TJ2, sedangkan pH 6-9 PJ2 dan TU1.

Kata kunci: Fitase, vertisol, kesuburan, pengaruh suhu, pengaruh pH.

ABSTRACT- This experiment aimed to investigate whether phytase-producing bacteria isolated from vertisol soil in Gondangrejo have bacterial diversity and the ability to fertilize the soil. This research is exploratif and laboratory experiments. Bacteria in the rice roots (PJ2, PJ3, PP2, PP8, PU2, and PU +1) has the ability to grow at 70°C, and its enzyme activity is stable at 80°C and pH 4-8. Bacteria in the corn roots still grow (JP1, JW1, JPJ1, JPS1) and still active at 60°C, and the enzyme still active at 60°C and pH 4-8. Bacteria on the beans roots grew well (KPTU4, KPJW1, KPTU3, KTJ2) and still active at 60°C, and the enzyme activity at 60°C and pH 4-7. Bacteria on the sugar cane roots grew well (TS1, TS2, TU1, TJ4), active at 60°C and the enzyme activity at 60°C and pH 4-8. Bacteria on the cassava roots were good (SW2) and still active grow at 60°C, and at 90°C and pH 4-8, the enzyme still active. Bacteria on the great pumpkin roots were good (WP1, WP3), still active at 60°C, and the active enzyme activity at 60°C and pH 5-8. Bacteria on the “gambas” roots grow well (GPP2, OU1, OU2) and still active at 60°C, and the enzyme still active at 60°C and pH 4-8. Rough of extracted enzyme from isolates of the best area of rice roots PU+2 and PU+1, beans

KTJ2 and KPJW, sugar cane TU1 and TU2, corn JP1 and JP1, “gambas” GPP2 and OU2, were stable at 80°C. Selected isolates activated at pH 6-8 are PJ3, OU 2, WP1, WP4, JW1, JP1, KPtU 2, KJP1, KPtU4, TJ2, while PJ2 and TU1 were active in pH 6-9.

Key Words : Phytase, vertisol, fertility, temperature, acid degree

Pendahuluan

Fitase telah dimanfaatkan sebagai probiotik pada hewan ternak monogastrik, sebagai campuran *wheat pollard* pakan ternak unggas (Sajidan, 2004), sebagai sumber fosfat organik pada pakan ayam broiler (Yunus, 2004). Fitase dihasilkan oleh mikroorganisme (bakteri, jamur, yeast) dan jaringan tubuh ternak. Fitase dapat juga dihasilkan dari proses cloning dan dicirikan berasal dari fungi *Aspergillus ficum* (Ullah, 1998a). Mikroorganisme antara lain bakteri sebagai salah satu penghasil enzim yang potensial menjadi faktor penting dalam produksi enzim. Oleh karena itu diperlukan usaha penggalian galur galur bakteri penghasil fitase.

Indonesia sebagai negara tropis mempunyai potensi keanekaragaman bakteri yang tinggi. Karakteristik wilayah Indonesia yang mempunyai banyak area vulkanik menambah potensi diversitas bakteri. Aktifitas bakteri fitase telah berhasil diidentifikasi pada beberapa daerah dengan karakteristik yang berbeda, antara lain; pada suhu tinggi dari sumber air panas di Sumatera Barat (Guzmanizar, et al. 2009),

pada ekosistem sawah, pada ladang gandum (Shobirin, 2009). 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), *Bacillus Substilis* TS16-111 (Youn-Je Park, 2001) dan *Klebsiellapneumoniae* (Sajidan, 2002).

Kecamatan Gondangrejo, Kabupaten Karanganyar termasuk daerah yang kondisi tanahnya termasuk kurang subur, apalagi pada kondisi tanah yang bersifat Vertisol. Kondisi fisik, kimia dan biologis sangat menentukan produksi pangan dan memiliki kesanggupan untuk menjaga kualitas ekosistem yang mencakup air dan tanah. Sifat tanah dikemukakan dalam sistem klasifikasi nasional terutama memiliki tekstur kasar hingga agak kasar dari bahan endapan muda (bahan induk alluvium). Berdasarkan sistem klasifikasi taksonomi tanah (USDA, 1992) sifat-sifat tanah tersebut sepadan dengan jenis tanah.

Berbagai sistem budidaya tanam yang dilakukan oleh petani Gondangrejo di tanah vertisol untuk memenuhi kebutuhan hidup. Kandungan tanah vertisol yaitu kapur lebih dari 10% dan merupakan tanah yang kandungan liat tinggi (lebih dari 30%), mempunyai sifat mengembang dan mengkerut. Kalau kering tanah mengkerut sehingga tanah pecah-pecah dan keras. Kalau basah mengembang dan lengket. Penerapan tindakan budidaya pertanian di tanah vertisol diharapkan berwawasan lingkungan agar pengaruh negatif terhadap yang membuat tanah menjadi subur hilang. Tanah vertisol menggambarkan penyebaran tanah-tanah dengan tekstur liat dan mempunyai warna gelap, pH yang relatif tinggi serta kapasitas tukar kation dan kejenuhan basa yang juga relatif tinggi. Umumnya berwarna hitam legam atau abu-abu kehitaman yang mempunyai ciri fisik mudah membentuk rekahan lebar dan dalam di musim kemarau dan mengalami pembalikan alami di musim hujan. Vertisol adalah tanah-tanah mineral yang mempunyai warna abu kehitaman, bertekstur liat dengan kandungan 30% pada horizon permukaan sampai kedalaman 50 cm dan didominasi jenis lempung montmorillonit. Faktor dominan yang mempengaruhi pembentukan tanah ini adalah iklim utamanya iklim kering dan batuan tanah yang kaya terhadap kation.

Jenis tanah vertisol bila digunakan sebagai lahan pertanian akan memberikan banyak masalah terutama kesuburan yang cenderung rendah.

Bakteri mempunyai kemampuan untuk beradaptasi dengan lingkungan dan merupakan salah satu faktor penyelamat yang melestarikan suatu spesies dari seleksi alamiah (Hanafiah *et al.*, 2005). Penggunaan lahan yang memiliki keanekaragaman tanaman tinggi adalah sistem agroforestri yang lebih bermakna terhadap kehidupan biota tanah (Wardani, 2004). Hale *et al.* (2006) perubahan struktur kimia tanah dan dinamika hara akan mempengaruhi invasi mikroba tanah. Pengelolaan lahan dengan menggunakan sistem pertanian organik memberikan kontribusi rata-rata 50% untuk kelimpahan organisme (Bengtsson *et al.*, 2005). Dekomposer mikroba dalam tanah akan mempengaruhi kinerja tanaman (Partsch *et al.*, 2006).

Tempat seperti dalam tanah selalu dijumpai mikroba, bahkan jumlah dan jenisnya berbeda. Umumnya jumlah mikroba dalam tanah lebih banyak daripada dalam air ataupun udara. Bahan organik dan senyawa anorganik dalam tanah yang tinggi lebih cocok untuk pertumbuhan mikroba heterotrof maupun autotrof serta sumber energi utama bagi

kehidupan biota tanah (Sugiyarto et al., 2007).

Berkaitan dengan pemanfaatan mikroba pada sektor pertanian untuk kesuburan tanah, maka diperlukan mikroba isolat lokal yang potensial. Pemakaian enzim termofilik pertanian lebih menguntungkan dibanding yang mesofilik karena lebih stabil dan aktivitasnya maksimum serta tidak menurun. Mikroba penghasil fitase dapat diperoleh dari berbagai macam kondisi tanah, walaupun perbedaan tempat secara geo morfologi juga menentukan jenis bakteri yang ditemukan. Asam fitat dan garamnya menyimpan mineral fosfor dari dalam tanaman (Greiner and Konietzny, 2006). Adiyoga *et al.* (2004) berpendapat bahwa polikultur sebuah upaya pemadatan areal dengan berbagai tanaman untuk perbaikan kondisi tanah (konservasi) sekaligus menciptakan nilai tambah ekonomi.

Mikroba tanah berperan di dalam penyediaan unsur hara adalah mikroba pelarut fosfat (P) dan kalium (K). Di sinilah peranan mikroba pelarut fosfat karena mikroba ini akan melepaskan ikatan P dari mineral liat dan menyediakannya bagi tanaman. Banyak sekali mikroba yang mampu melarutkan P, antara lain: *Aspergillus* sp, *Penicillium* sp, *Pseudomonas* sp dan *Bacillus*

megatherium. Mikroba yang berkemampuan tinggi melarutkan fosfat umumnya juga berkemampuan tinggi dalam melarutkan kalium.

Fitase (mio-inositol heksakisfosfat fosfohidrolase) merupakan enzim yang mengkatalisis reaksi hidrolisis ikatan fosfoester pada asam fitat (mio-inositol heksakisfosfat) dengan menghasilkan fosfat anorganik dan ester-ester fosfat (Wyss, 1999). Fitase yang sudah diisolasi dari *Aspergillus niger* (Nagashima, 1999), *Escherichia coli* (Greiner et al., 1993), *Bacillus subtilis* (Kerovuo et al., 1998), *Klebsiella pneumoniae* (Sajidan et al., 2004). Beberapa mikroba tanah mampu menghasilkan hormon tanaman yang dapat merangsang pertumbuhan tanaman. Hormon yang dihasilkan oleh mikroba akan diserap oleh tanaman sehingga tanaman akan tumbuh lebih cepat atau lebih besar. Kelompok mikroba yang mampu menghasilkan hormon tanaman, antara lain: *Pseudomonas* sp dan *Azotobacter* sp. Mikroba-mikroba bermanfaat tersebut diformulasikan dalam bahan pembawa khusus dan digunakan sebagai biofertilizer.

Struktur tanah apapun dapat dijumpai berbagai mikrokoloni seperti mikroba heterotrof pengguna bahan organik maupun bakteri autotrof, dan bakteri aerob maupun

anaerob. Kehidupannya, setiap jenis mikroba mempunyai kemampuan untuk merubah satu senyawa menjadi senyawa lain dalam rangka mendapatkan energi dan nutrien.

Tujuan penelitian ini untuk memperoleh isolat bakteri dari pertanian di daerah kecamatan Gondangrejo Karanganyar yang potensial menghasilkan enzim fitase.

Metode Penelitian

A. Alat dan Bahan Penelitian

Alat: Laminar air flow, inkubator, oven, shaker inkubator, sentrifuge, magnetik stirer, vorteks, spektrofotometer UV-VIS, autoklaf, neraca analitik, almari es, freezer. **Bahan:** luria bertani (LB) cair, Nutrien agar (NA), Nutrien cair (NB), bacto-triptone 1%, yeast ekstrak 0,5%, NaCl 1%, bactoagar 2%, glukosa 2%, Na-fitat 0,4%, CaCl₂ 0,2%, NH₄NO₃ 0,5%, KCl 0,05%, MgSO₄.7 H₂O 0,05%, bacto-triptone 1,5%, FeSO₄.7 H₂O 0,001%, Mn SO₄. H₂O 0,001%, Amonium metavanadat, H₃PO₄, alkohol 70%, spirtus, NaH₂PO₄, HCl.

B. Pengambilan Sampel dan Isolasi bakteri

Sampel tanah diambil dari sekitar perakaran tanaman di daerah 5 kalurahan berdasarkan peta tanah vertisol. Lokasi: Jati Uwung, Plesungan, Selokaton, Jeruk Sawit, dan Wonorejo. Penanaman pada

media padat (NA) dengan penambahan Na-fitat, kemudian diinkubasi pada suhu ruang selama 24 jam.

C. Screening bakteri

Masing-masing koloni yang terpilih, digores pada media padat lagi agar lebih banyak. Koloni-koloni tunggal ditumbuhkan pada media cair dengan ditambah Na-fitat, dan diinkubasi pada suhu ruang, 37°C, 42°C, 50°C, 60°C, dan 70°C.

D. Isolasi enzim ekstrak kasar dan Penentuan aktivitas fitase.

Menumbuhkan koloni tunggal, di inkubasi pada suhu ruang (28°C). Pemanenan ekstrak enzim kasar dengan cara di sentrifugasi dengan kecepatan 4000 rpm dengan waktu 5 menit, supernatan diambil atau cairan. Suhu 28, 37, 40, 50, 60, 70, 80, 90°C Dilakukan preparasi dengan penambahan Na-Fitit 2mM yang dicampur dengan CaCl₂. Selanjutnya larutan tersebut ditambah 425 µl filtrat diinkubasi selama 15 menit. Penambahan Amonium Molibdat-fanadat untuk menghentikan aktivitas. Di ukur absorbansinya spektrofotometer UV-Vis dengan panjang gelombang 415 nm.

Hasil Dan Pembahasan

1). Pemilihan Sampel (screening).

Sampel yang diambil diinokulasikan pada nutrien cair ditambah Na-fitate dan diinkubasi pada variasi suhu, sreening

yang potensial (Tabel 1) dan Pengujian beberapa sampel terpilih dapat dilihat pada Tabel 2.

2). Pengujian Aktivitas Enzim.

Uji aktivitas enzim fitase sampel pilihan dari tanah sekitar perakaran padi (Gambar 1a) dan sampel tanah sekitar perakaran kacang (Gambar 1b).

Tabel 1. Sampel Yang Terpilih Terhadap Kemampuan Suhu

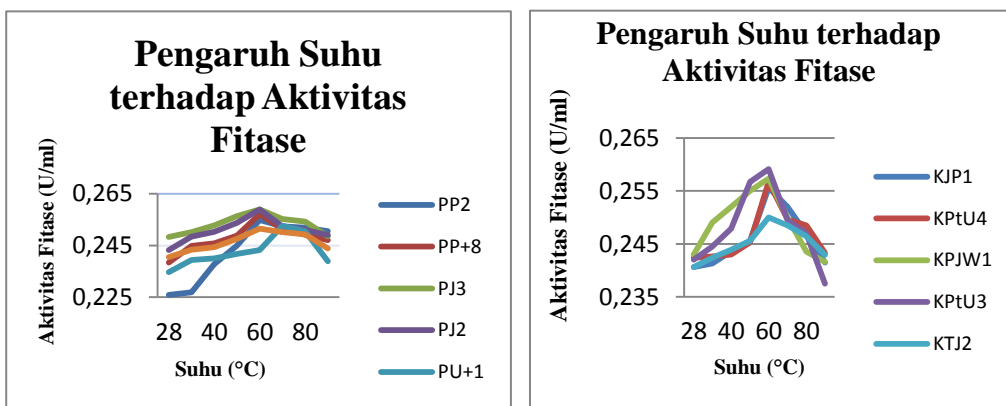
No	Jenis Tanaman	Nama Sampel Yang Dipilih
1.	Padi	PJ2, PJ3, PP2, PP8, PU2, dan PU+1
2.	Jagung	JP1, JW1, JPJ1, JPS1
3.	Kacang	KPTU4, KPJW1, KPTU3, KTJ2
4.	Tebu	TS1, TS2, TU1, TJ4
5.	Singkong	SW2
6.	Waluh	WP1, WP3
7.	Gambas	GPP2, OU1,OU2

Tabel 2. Hasil Pewarnaan Gram

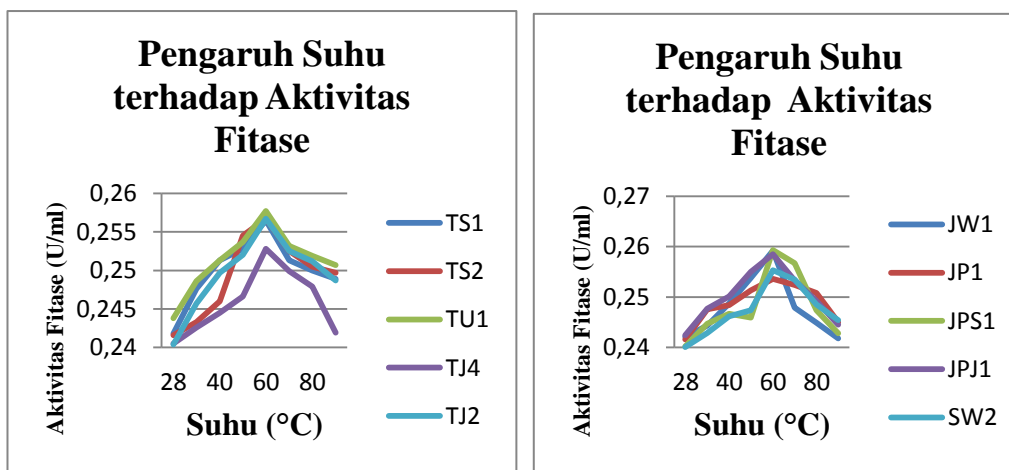
No	Nama Sampel	Hasil Pewarnaan Gram	No	Nama Sampel	Hasil Pewarnaan Gram	No	Nama Sampel	Hasil Pewarnaan Gram
1.	PJ2	-	9	JPJ1	-	17	TU1	-
2.	PJ3	-	10	JPS1	-	18	TJ4	-
3.	PP2	-	11	KPTU4	-	19	SW2	-
4.	PP8	-	12	KPJW1	-	20	WP1	+
5.	PU2	-	13	KPTU3	-	21	WP3	-
6.	PU+1	+	14	KTJ2	-	22	GPP2	+
7.	JP1	-	15	TS1	-	23	OU1	+
8.	JW1	-	16	TS2	-	24	OU2	-

Uji aktivitas enzim fitase dari pilihan sampel tanah sekitar perakarantebu di dapatkan data seperti pada Gambar 2a dan sekitar perakaran jagung dan singkong di dapatkan data seperti pada Gambar 2b.

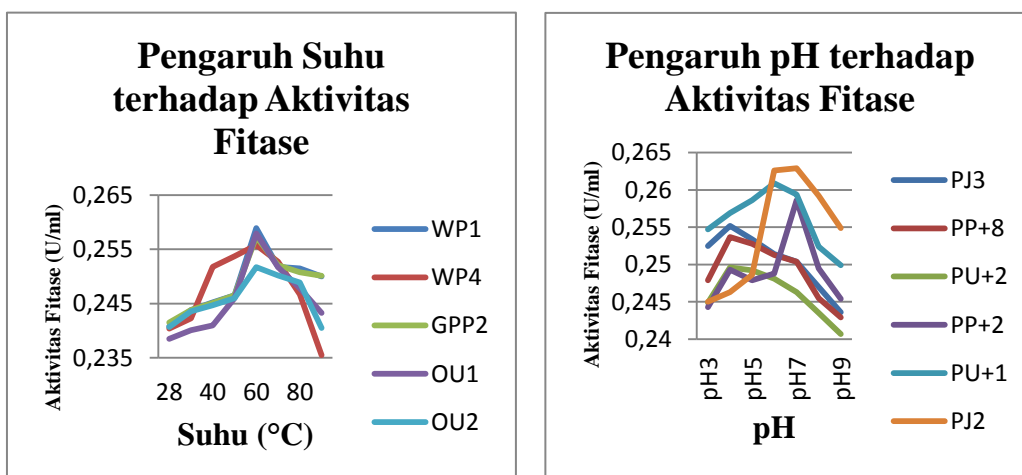
Uji aktivitas enzim fitase dari pilihan sampel tanah sekitar perakaran gambas dan waluh di dapatkan data seperti pada Gambar 3a. Uji aktivitas enzim fitase terhadap pH di dapatkan data seperti pada Gambar 3b.



(1a) (1b)
Gambar 1a Aktivitas Fitase Perakaran Padi dan 1b Kacang



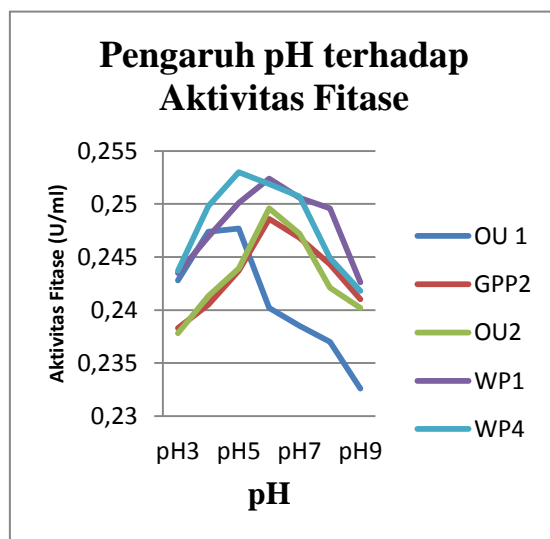
(2a) (2b)
Gambar 2a Aktivitas Fitase Perakaran Tebu dan 2b Jagung



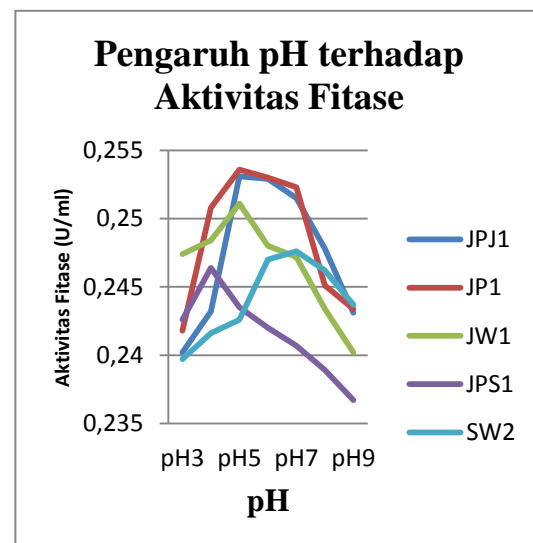
(3a) (3b)
Gambar 3a. Aktivitas Fitase Perakaran Gambas dan Waluh dan 3b. Aktivitas Fitase pada Perakaran Padi

Uji aktivitas enzim fitase dari pilihan sampel tanah sekitar perakaran gambas dan waluh terhadap pH di dapatkan data seperti pada Gambar 4a dan 4b sekitar perakaran jagung dan singkong terhadap pH. Uji aktivitas

enzim fitase dari pilihan sampel tanah sekitar perakaran kacang terhadap pH di dapatkan data Gambar 5a dan 5b enzim fitase dari pilihan sampel tanah sekitar perakaran tebu.

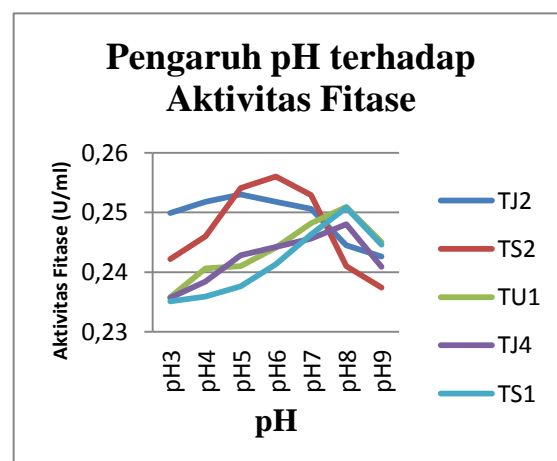
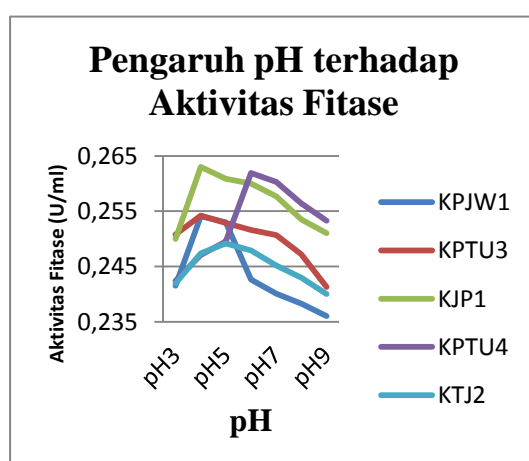


(a)



(b)

Gambar 4a. Aktivitas Fitase Perakaran Gambas dan Waluh dan 4b Aktivitas Fitase Perakaran Jagung dan Singkong



Gambar 5a Aktivitas Fitase Perakaran Kacang dan 5b Perakaran Tebu

Pembahasan

Aktivitas bakteri sampel terpilih mempunyai kemampuan untuk tumbuh pada suhu 28°C, 60°C dan 70°C. Oleh karena itu, bakteri sampel terpilih mampu hidup pada kondisi suhu 60°C dan 70°C walaupun diisolasi bukan dari kondisi daerah panas. Sesuai dengan Vielle and Zeikus. (2001), mikroba hidup pada kondisi 40-80°C termasuk mikroba termofilik.

Aktivitas sampel terpilih termasuk jenis fitase yang mempunyai range double domain aktif pada suhu ruang dan suhu 60-80°C. Aktivitas tertinggi rata-rata pada suhu 60°C, setelah pada suhu 90°C mengalami penurunan aktivitas. Hal ini disebabkan oleh kurangnya ikatan-ikatan kovalen terputus sehingga terjadi kerusakan enzim (Bulati et al. 2007).

Hasil pengujian aktivitas fitase pada pH 2-3 rendah, sedangkan pada pH 4-8 kondisinya stabilitas, pada pH 9 menurun. PH berpengaruh terhadap enzim, karena jika kondisi ekstrim menyebabkan denaturasi (Nelson and Cox. 2000). Aktivitas enzim fitase tertinggi ada pada pH 4 dan ada pula pada pH 7.

Kesimpulan

Isolat terpilih aktif pada kondisi suhu sampai 70°C ada sebanyak 22 isolat seperti pada tabel 1. Ekstrak enzim kasar

dari isolat terpilih daerah perakaran padi PU+2 dan PU+1, daerah perakaran kacang KTJ2 dan KPJW1, daerah perakaran tebu TU1 dan TU2, daerah perakaran jagung JP1 dan JPJ1, daerah perakaran gambas GPP2 dan OU2 keseluruhan ekstrak enzim stabil sampai suhu 80°C. Isolat terpilih aktif pada kondisi pH 6-8 PJ3, OU 2, WP1, WP4, JW1, JP1, KPtU2, KJP1, KPtU4, TJ2, sedangkan pH 6-9 PJ2 dan TU1.

Perlu diuji penghambat enzim fitase pada masing-masing isolat, uji lapangan dan produksi enzim.

Daftar Pustaka

- Adiyoga, W., R. Suherman, N. Gunadi, dan A. Hidayat. (2004). Karakteristik Teknis Sistem Pertanaman Polikultur Sayuran Dataran Tinggi. *J. Hort.* 14(4):287-301.
- Ansyori. (2004). *Potensi Cacing Tanah Sebagai Alternatif Bio-Indikator Pertanian Berkelanjutan*. Makalah pribadi. S3 Institut Pertanian Bogor.
- Bengtsson, J., Ahnstrom, J., and Weibull, A-C. 2005. The effects of organic agriculture on biodiversity and abundance: meta-analysis. *Journal of applied Ecology*.2005.42,261-269.
- Finzi, A.C., Breemen.N.V, Canham C.D,. (1998). Canopy Tree-Soil Interactions Within Temperate Forest: Species Effects on Soil Carbon and Nitrogen. *Ecological Applications*, Vol.8, No.2 (May,1998),pp.440-446.

- Greiner, R., Koniety, U. (2006). Phytase for Food Application. *Food Technol. Biotechnol.*, 44 (2): 125-140.
- Greiner, R., Koniety, U. And Jany, K.D. (1993). Purification and Characterization of two Phytases from *Escherichia coli*, *Archives of Bio Chemistry and Biophysics*, 303: 107 – 113.
- Gulati, H. K., Chadha, B. S., and Saini, H. S. (2007). Production and Characterization of Thermostable Alkaline Phytase from *Bacillus laevolacticus* Isolated from Rhizosphere Soil, *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.*, 34 : 91-98
- Gusmanizar. N, Shukor.M.Y.P. (2009). Isolasi Dan Identifikasi Bakteri Penghasil Enzim Fitase Dari Sumber Air Panas Di Sumatera Barat. Artikel Penelitian Fundamental. TA.
- Hanafiah, K.A., Anas, I., Napoleon, A., Ghoffar, N. (2005). *Biologi Tanah. Ekologi dan Makrobiologi Tanah*. Jakarta: PT Raja Grafindo Persada.
- Kerovuo, J., Lauraeus, M., Nurminen, P., Kalkinen, N. And Apajalahti, J. (1998). Isolation, Characterization, Molecular Gene Cloning and Sequencing of a Novel Phytase from *Bacillus subtilis*, *Applied and Environmental Microbiology*, 64: 2079-2085.
- Nagashima, T., Tange, T. And Anazawa, H. (1999). Dephosphorylation of Phytate by using The *Aspergillus niger* Phytase with A High Affinity for Phytate. *Applied and Environmental Microbiology*, 65: 4682-4688.
- Sajidan, A., Farouk, A., Greiner, R., Jungblut, P. Muller, E.C. and Borriss, R. (2004). Molecular and Physiological Characterization of A 3-Phytase from Soil Bacterium *Klebsiella* sp. ASR 1. *Applied and Environmental Microbiology*, 65: 110-118.
- Sajidan, A. Ratriyanto dan A. M. P. Nuhriawangsa, (2004). Pengaruh Bakteri Penghasil Fitase pada Pakan Campuran *Wheat Pollard* terhadap Performan Ayam Broiler. *Buletin Peternakan*. Fakultas Peternakan UGM. Volume 28 (3): 105-114.
- Shobirin. K, A. Farouk, R. Greiner. (2009). Potential phytate-degrading enzyme producing bacteria isolated from Malaysian maize plantation. *African Journal of Biotechnology* Vol. 8 (15), pp. 3540-3546,
- Sugiyarto, Effendi.M., Mahajoeno, E., Sugito, Y., Handayanto, E. Agustina, L. (2007). Preferensi Berbagai Jenis Makrofauna Tanah Terhadap Sisa Bahan Organik Tanaman Pada Intensitas Cahaya Berbeda. *Biodiversitas*, Vol. 7, No. 4. Pp. 96-100.
- Ullah, A. H. J. (1988a) *Aspergillus ficuum* phytase: partial primary structure, substrate selectivity, and kinetic characterization. *Prep. Biochem.* 18, 459-471.
- Vielle, C., and Zeikus, G. (2001). Hyperthermophilic Enzymes: Source, Uses, and Molecular Mechanisms for Thermostability, *Microbiol. And Mol. Biol. Rev.*, 65: 1-43
- Youn-Je Park. (2001). Expression, Characterization, and Antifungal Activity of Phytase from *Bacillus subtilis* TS16-111. Disertation. Department of Agricultural Biology Graduate School of Seoul National University

- Yunus, A., Nuhriawangsa, A. M. P., Swastike, W. (2004). Pemanfaatan Bakteri Penghasil Fitase Asli Indonesia Untuk Meningkatkan Ketersediaan Sumber Phosphat Organik Pada Pakan Ayam Broiler Ramah Lingkungan. Laporan Penelitian.
- Wardani, E.T. (2004). *Intersepsi Air Hujan Pada Beberapa Sistem Agroforestri*. Malang: Jurusan Tanah. Fakultas Pertanian Universitas Brawijaya. Serial: on line.
- Wyss, M., Brugger, R., Kronenberger, A., Remmy, R., Fimbel, R., Oesterhelt, G., Lehman, M. And van Loon, A.P.G.M., (1999b). Biochemical Characterization of Fungal Phytases (myo-inositol hexakisphosphatephosphohidrolases): Catalytic Properties, Applied and Environmental Microbiology, 65: 367-373.