

PRODUKSI GAS *IN VITRO* ASAM AMINO METIONIN TERPROTEKSI DENGAN SERBUK MIMOSA SEBAGAI SUMBER *CONDENSED TANNIN* (CT)

Amiril Mukmin¹, Hendrawan Soetanto², Kusmartono², Mashudi²

¹Jurusan Peternakan Fakultas Pertanian UNISKA Kediri

²Bagian Nutrisi dan Makanan Ternak Fakultas Peternakan Universitas Brawijaya

E-mail: amil.lima.87@gmail.com

ABSTRAK

Penelitian ini dilaksanakan pada bulan November sampai bulan Desember 2009 di Laboratorium Nutrisi dan Makanan Ternak, Fakultas Peternakan, Universitas Brawijaya, Malang. Tujuan dari penelitian ini adalah untuk melakukan evaluasi terhadap efektivitas serbuk mimosa sebagai sumber CT dalam melindungi asam amino metionin dari proses degradasi di dalam rumen dengan menggunakan parameter produksi gas secara *in vitro*. Materi yang digunakan dalam penelitian ini adalah metionin Novus dan serbuk mimosa. Metode penelitian yang digunakan adalah Rancangan Acak Kelompok (RAK) dengan 4 perlakuan dan 3 ulangan/kelompok. P0: metionin + 0% CT; P1: metionin + 6% CT; P2: metionin + 8% CT; P3: metionin + 10% CT. Keempat perlakuan tersebut diamati produksi gas secara *in vitro* pada masa inkubasi 2, 4, 8, 12, 16, 24, 36 dan, 48 jam. Hasil penelitian menunjukkan bahwa penambahan CT pada metionin berpengaruh sangat nyata ($P < 0,01$) terhadap produksi gas. Produksi gas pada masa inkubasi 48 jam dari masing-masing perlakuan adalah P0 23,58 ml/500mg BK; P1 22,37 ml/500mg BK; P2 21,54 ml/500mg BK; dan P3 20,62 ml/500mg BK. Berdasarkan hasil penelitian dapat disimpulkan bahwa serbuk mimosa dapat digunakan sebagai sumber CT untuk memproteksi metionin dari degradasi oleh mikroba rumen. Berdasarkan hasil penelitian disarankan agar dilakukan penelitian lebih lanjut untuk mengetahui pengaruh penambahan metionin terproteksi di dalam ransum terhadap produktivitas ternak.

Kata kunci: Metionin, condensed tannin (CT), produksi gas *in vitro*

ABSTRACT

The aim of this research was to evaluate the effect mimosa powder as CT source to protect methionine from degradation using *in-vitro* gas production technique. Four treatments were assigned in a Randomized Block Design: T0 = methionine + 0% CT; T1 = methionine + 6% CT; T2 = methionine + 8% CT; T3 = methionine + 10% CT. Gas production was measured at time intervals and terminated after 48 hour incubation. The results showed that gas production was decreased as the level CT increased. The corresponding values for gas production at 48 hour were respectively 23.58 ml/500mg (P0); 22.37 ml/500mg (P1); 21.54 ml/500mg (P2); and 20.62 ml/500mg (P3). It can be concluded that mimosa powder can be used as CT source to protect methionine from rumen microbes degradation. It is suggested to do further studies on the effect of adding protected methionine in a complete ration on animal production.

Keyword: Methionine, condensed tannin (CT), *in-vitro* gas production

PENDAHULUAN

Protein merupakan zat makanan esensial yang diperlukan ternak untuk mendukung banyak fungsi yang meliputi pergantian jaringan tubuh, pertumbuhan, dan sintesis protein susu. Sumber protein yang dimanfaatkan untuk kepentingan hidup dan berproduksi ternak ruminansia berasal dari dua sumber yaitu protein mikroba dan protein pakan. Protein mikroba berasal dari sel tubuh mikroba rumen yang disintesis di dalam rumen, sedangkan protein pakan merupakan protein dari pakan yang lolos dari degradasi rumen.

Protein pakan di dalam rumen dibedakan menjadi dua yaitu protein yang terdegradasi mikroba dan protein yang lolos degradasi mikroba. Degradasi protein di dalam rumen menghasilkan asam amino yang apabila tidak digunakan oleh mikroba rumen akan didegradasi lebih lanjut menjadi asam lemak terbang (VFA), ammonia (NH_3) dan karbondioksida (CO_2). NH_3 yang terbentuk merupakan sumber nitrogen utama bagi pertumbuhan dan sintesis protein mikroba. Kemampuan mikroba rumen dalam mensintesis protein mikroba adalah terbatas, namun selama masih ada protein yang dapat didegradasi di dalam rumen, proses degradasi oleh mikroba akan terus berlanjut meskipun kadar NH_3 sudah melebihi kebutuhannya. Kelebihan produksi NH_3 akan diserap dalam darah melalui dinding rumen dan dibawa ke hati yang akan diubah menjadi urea.

Salah satu upaya untuk melindungi protein pakan dari degradasi mikroba rumen adalah dengan penambahan senyawa tannin, khususnya tannin yang terkondensasi atau yang

disebut dengan condensed tannin (CT). McLeod (1974) menyatakan bahwa ikatan CT dengan protein stabil pada pH diantara 3,5 – 7,0, akan tetapi ikatan tersebut menjadi tidak stabil dan terurai pada pH di bawah 3 dan di atas 8. Artinya dalam kondisi di rumen ikatan CT-protein sangat stabil dan menjadi labil saat tiba di abomasum, sehingga potensi ini bisa digunakan untuk mendapatkan nilai *by pass* protein yang tinggi.

Metionin merupakan salah satu asam amino esensial bagi ternak, sehingga ketersediannya di dalam pakan sangat dibutuhkan untuk menunjang berlangsungnya produksi. Penelitian tentang proteksi protein menggunakan CT telah banyak dilakukan dan terbukti mampu menurunkan tingkat degradasi di dalam rumen. Barry and Forss (1983) menyimpulkan bahwa imbangannya antara protein : CT yang terbaik adalah 11 : 1 sampai 16 : 1.

Serbuk mimosa adalah produk impor dari Afrika Selatan yang biasa digunakan sebagai sumber CT dalam proses penyamakan kulit. Penelitian tentang perlindungan asam amino metionin menggunakan CT belum banyak dilaporkan, sehingga perlu dilakukan suatu penelitian untuk mengetahui bagaimana produksi gas secara *in vitro* dari asam amino metionin yang terproteksi dengan serbuk mimosa sebagai sumber CT.

MATERI DAN METODE

Materi yang digunakan dalam penelitian ini antara lain adalah:

1. Metionin Novus (metionin yang diproduksi oleh Novus International, Inc., Missouri, USA)

2. Mimosa ME (serbuk mimosa produksi Afrika Selatan)
3. Cairan rumen (berasal dari sapi PFH betina berfistula)
4. Bahan kimia untuk analisa produksi gas secara *in vitro*.

Metode yang digunakan dalam penelitian ini adalah percobaan rancangan acak kelompok (RAK) dengan empat perlakuan dan tiga ulangan. Adapun perlakuan tersebut adalah:

- P0 : metionin + 0% CT
 P1 : metionin + 6% CT
 P2 : metionin + 8% CT
 P3 : metionin + 10% CT

Persiapan sampel

Sampel dianalisa kandungan BK, BO, Metionin (untuk metionin Novus) dan CT (untuk serbuk mimosa). Serbuk mimosa ditambahkan pada Metionin

Novus sesuai dengan perlakuan kemudian dihomogenkan.

Variabel yang Diukur

Variabel yang diukur pada penelitian ini adalah produksi gas secara *in vitro*.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Produksi gas merupakan hasil proses fermentasi BO yang terjadi dalam rumen (Ella dkk., 1997). Jumlah gas yang dibebaskan ketika bahan pakan diinkubasikan secara *in-vitro* dalam cairan rumen berhubungan erat dengan pencernaan pakan (Menke *et al.*, 1979). Pengukuran produksi gas secara periodik selama 48 jam dilakukan untuk mengetahui seberapa besar gas yang dihasilkan pada waktu-waktu tertentu (jam ke-2, 4, 8, 12, 16, 24, 36, dan 48). Pengaruh perlakuan terhadap produksi gas secara *in-vitro* dapat dilihat pada Tabel 1.

Tabel 1. Rataan produksi gas *in-vitro* (ml/500mg BK) pada tiap-tiap perlakuan

Perlakuan	Produksi gas (ml/500mg BK) pada masa inkubasi (jam)							
	2	4	8	12	16	24	36	48
P0	10,79 ^c	17,40 ^d	18,98 ^d	20,24 ^c	20,83 ^b	21,66 ^d	22,83 ^c	23,58 ^c
P1	10,34 ^{bc}	16,32 ^c	18,25 ^c	19,34 ^c	20,10 ^b	20,77 ^c	21,70 ^b	22,37 ^b
P2	9,72 ^b	15,59 ^b	17,60 ^b	18,60 ^b	19,19 ^a	19,86 ^b	20,78 ^{ab}	21,54 ^{ab}
P3	8,92 ^a	14,98 ^a	17,00 ^a	18,09 ^a	18,68 ^a	19,10 ^a	20,03 ^a	20,62 ^a

Keterangan : ^{a-d} Superskrip yang berbeda pada kolom yang sama menunjukkan perbedaan yang sangat nyata (P<0,01)

Hasil analisa statistik menunjukkan bahwa perlakuan memberikan pengaruh sangat nyata (P<0,01) terhadap produksi gas. Semakin tinggi penambahan serbuk mimosa pada metionin Novus maka gas yang dihasilkan semakin rendah. Produksi gas yang rendah menunjukkan bahwa BO yang didegradasi oleh mikroba juga sedikit, sebagaimana yang dinyatakan

oleh Hermanto dkk. (1991), bahwa laju produksi gas berkorelasi positif dengan pencernaan BO dan konsumsi BO tercerna.

Produksi gas setelah masa inkubasi 48 jam menunjukkan bahwa nilai yang paling tinggi dicapai pada P0 (23,58 ml/500mg BK) yang kemudian diikuti secara berurutan P1 (22,37 ml/500mg BK), P2 (21,54 ml/500mg

BK), dan yang paling rendah P3 (20,62 ml/500mg BK). P3 adalah asam amino dengan penambahan CT paling tinggi (10%), artinya penambahan serbuk mimosa berpengaruh menurunkan produksi gas secara *in-vitro*. Tabel 1 juga menunjukkan bahwa pengaruh penambahan CT pada metionin Novus tidak hanya terlihat pada masa inkubasi 48 jam saja, namun pada semua masa inkubasi yang diamati menunjukkan bahwa semakin tinggi penambahan CT volume gas yang dihasilkan semakin rendah.

Ella dkk (1997) menyatakan bahwa produksi gas terjadi setelah 8 - 10 jam masa inkubasi ketika mikroba mulai aktif. Produksi gas akan mencapai puncak pada inkubasi 24 jam pertama, selanjutnya laju produksi gas mengalami penurunan hingga saat 96 jam dan akhirnya mencapai nol. Hasil penelitian yang ditunjukkan pada Tabel 1 di atas tidak sesuai dengan pernyataan tersebut. Pada hasil penelitian, produksi gas sudah terjadi sejak pengamatan jam ke-2 masa inkubasi. Laju produksi gas tertinggi terjadi pada pengamatan jam ke-2 dan ke-4 masa inkubasi. Kondisi ini disebabkan karena pakan yang diberikan berupa asam amino yang sangat mudah didegradasi oleh mikroba rumen. Widiawati dan Thalib (2008) menyatakan bahwa jumlah dan pola dari produk akhir fermentasi pakan oleh mikroba rumen tergantung kepada jenis pakan yang dikonsumsi.

Laju produksi gas dapat dihitung menggunakan program *Naway* menurut petunjuk Ørskov dan McDonald (1979) seperti yang dikutip oleh Kamalak dkk. (2004) dengan persamaan $P = a + b(1 - e^{-ct})$. Parameter P merupakan produksi gas (ml) pada masa inkubasi t, a adalah

produksi gas dari partikel pakan yang terlarut (ml), b adalah produksi gas dari bagian pakan yang tidak larut tetapi berpotensi terfermentasi (ml), (a+b) adalah potensi produksi gas (ml), dan c adalah laju konstan produksi gas selama masa inkubasi (ml/jam). Nilai parameter a, b, a+b, dan c yang diperoleh dari hasil perhitungan dapat dilihat pada Tabel 2.

Analisa statistik menunjukkan bahwa perlakuan berpengaruh sangat nyata ($P < 0,01$) terhadap parameter b dan a+b, namun berpengaruh tidak nyata ($P > 0,05$) terhadap parameter a dan c. Parameter a adalah produksi gas dari partikel pakan yang terlarut. Tabel 2 di atas menunjukkan bahwa nilai parameter a paling tinggi dicapai pada P1 (0,1453 ml/500mg BK), yang kemudian diikuti secara berurutan P2 (0,1243 ml/500mg BK), P0 (0,1226 ml/500mg BK), dan P3 (0,0637 ml/500mg BK). P1 dan P2 yang merupakan metionin Novus dengan penambahan CT masing-masing 6% dan 8% memiliki nilai parameter a yang lebih tinggi daripada P0 (metionin Novus tanpa perlakuan). Kondisi ini dimungkinkan karena pada P1 dan P2 ikatan ionik antara metionin dan Ca terlepas akibat penambahan aquades (pada saat pencampuran metionin Novus dan serbuk mimosa) dan jumlah CT yang ditambahkan tidak mencukupi untuk mengikat kembali metionin yang terlepas dari Ca tersebut sehingga partikel pakan yang terlarut menjadi lebih tinggi dari P0 yang tidak diberi penambahan aquades.

Nilai parameter b tertinggi tercapai pada P0 (21,6923 ml/500mg BK) yang kemudian diikuti secara berurutan P1 (20,7152 ml/500mg BK), P2 (19,9144 ml/500mg BK), dan P3 (19,3237 ml/500mg BK). Nilai parameter b yang

tinggi menunjukkan tingginya partikel pakan yang tidak terlarut tetapi berpotensi terfermentasi di dalam rumen sehingga menghasilkan gas. Nilai parameter a+b menunjukkan pola yang seirama dengan parameter b, yaitu tertinggi tercapai pada P0 (21,8149 ml/500mg BK) yang kemudian diikuti secara berurutan P1 (20,8605 ml/500mg BK), P2 (20,0387 ml/500mg BK), dan P3 (19,3874 ml/500mg BK). Nilai parameter a+b yang tinggi menunjukkan bahan pakan memiliki potensi yang tinggi untuk menghasilkan gas. Parameter b dan a+b bernilai semakin kecil dengan semakin tingginya penambahan CT (P3, 10%CT). Kondisi ini membuktikan bahwa CT mampu menurunkan tingkat degradasi asam amino metionin di dalam rumen. Wallace *et al.*, (2002) menyatakan bahwa CT mempunyai sifat mengikat protein sehingga bisa dianggap menguntungkan

karena mampu melindungi protein pakan dari proses degradasi yang berlebihan di dalam rumen sehingga meningkatkan jumlah protein yang siap diserap di usus halus.

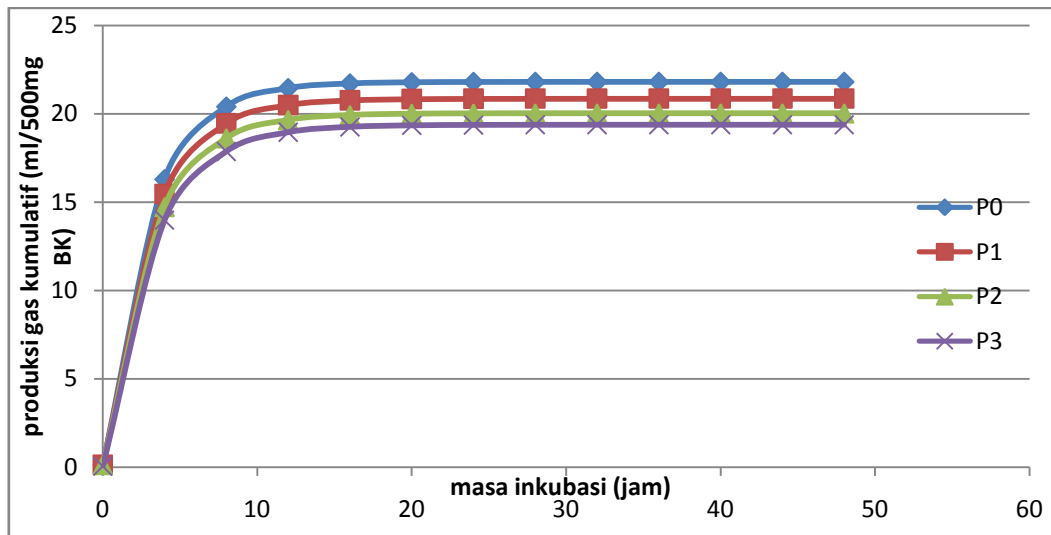
Penambahan CT cenderung menurunkan nilai parameter c meskipun secara statistik menunjukkan pengaruh yang tidak nyata ($P > 0,05$). Pada Tabel 2 dapat dilihat bahwa P0 memiliki nilai yang paling tinggi (0,3424 ml/jam) yang kemudian diikuti secara berurutan P1 (0,3365 ml/jam), P2 (0,3307 ml/jam) dan P3 (0,3187 ml/jam). Nilai c yang tinggi menunjukkan bahwa pakan tersebut didegradasi dengan cepat dalam satuan waktu tertentu (Ørskov dan McDonald, 1979). Hasil pendugaan produksi gas menggunakan parameter a, b, dan c dari Tabel 2 dengan persamaan $P = a + b(1 - e^{-ct})$ dapat dilihat pada Gambar 1.

Tabel 2. Nilai parameter a, b, a+b dan c dari pengukuran gas secara *in vitro* pada masing masing perlakuan

P	Parameter			
	a (ml/500mg BK)	B (ml/500mg BK)	a+b (ml/500mg BK)	c (ml/jam)
P0	0,1226 ^a ± 0,0620	21,6923 ^c ± 0,8603	21,8149 ^c ± 0,8252	0,3424 ^a ± 0,0123
P1	0,1453 ^a ± 0,1074	20,7152 ^b ± 0,8359	20,8605 ^b ± 0,7430	0,3365 ^a ± 0,0088
P2	0,1243 ^a ± 0,1704	19,9144 ^a ± 0,4376	20,0387 ^{ab} ± 0,2947	0,3307 ^a ± 0,0307
P3	0,0637 ^a ± 0,2152	19,3237 ^a ± 0,5889	19,3874 ^a ± 0,3826	0,3187 ^a ± 0,0289

Keterangan : ^a Superskrip yang sama pada kolom yang sama menunjukkan perbedaan yang tidak nyata ($P > 0,05$)

^{a-d} Superskrip yang berbeda pada kolom yang sama menunjukkan perbedaan yang sangat nyata ($P < 0,01$)



Gambar 1. Grafik hasil pendugaan hubungan antara produksi gas kumulatif (ml/500mg BK) dengan masa inkubasi (jam) pada masing-masing perlakuan

KESIMPULAN

Berdasarkan hasil penelitian dapat disimpulkan bahwa serbuk mimosa dapat digunakan sebagai sumber CT untuk memproteksi metionin dari degradasi oleh mikroba rumen. Berdasarkan hasil penelitian disarankan agar dilakukan penelitian lebih lanjut untuk mengetahui pengaruh penambahan metionin terproteksi di dalam ransum terhadap produktivitas ternak.

DAFTAR PUSTAKA

- Arora, S. P., 1995. Pencernaan Mikroba pada Ruminansia. UGM press. Jogjakarta.
- Barry, T. N. and D. A. Forss, 1983. *The Condensed Tannin Content of Vegetative Lotus pedunculatus, Its Regulation By Fertilizer Application and Effect Upon Protein Solubility.* Journal of Science of Food and Agriculture 34:1047
- Blummel, M, H. Steinges, and H. Becker, 1997. *The Relationship Between In-Vitro Gas Production, In-Vitro Mikrobial Massa Yield And 15 N.*

Incorporation And Implication for The Prediction of Voluntary Feed Intake of Roughages. J Nutr. Brit. 77: 911-921

Church, D. C., 1979. *Digestive Physiology and nutrition of Ruminant.* 1st Edition Metropolitan Printing Co. Portland Oregon.

_____. 1984. *Livestock Feeds and Feeding.* 3th Edition. Prentice Hall. Englewood Cliffs. New Jersey.

Czerkwaski, J. W., 1986. *An Introduction to Rumen Studies.* Pergamon Press. Oxford. UK

Ella, A., S. Hardjosoewigyo, T. R. Wiradayawan, dan M. Winugroho, 1997. *Pengukuran Produksi Gas dari Hasil Fermentasi Beberapa Jenis Leguminosa Pakan.* Seminar Nasional Ilmu-ilmu Nutrisi dan Makanan Ternak. Fakultas Peternakan Institut Pertanian Bogor dan Asosiasi Ilmu Nutrisi dan Makanan Ternak Indonesia: 151-152.

Hermanto, E. R. Ørskov, Soebarinoto and J. V. Bruchem, 1991. *In-vitro Gas Production as a Predictor of Digestibility and Voluntary Intake of*

- Rice Straw*. In: *Livestock and Feed Development in The Tropic*. Editor: M. N. M. Ibrahim, R. De jong, J. V. Bruchem, and H. Purnomo, Proceedings of The International Seminar held at Brawijaya university Malang, Indonesia. 239-244
- Hungate, R.E., 1966. *The Rumen and Its Microbes*. Academic Press. New York.
- Iburg, M. and P. Lebzien, 2000. *Requirements of lactating dairy cows for leucine and methionine at the duodenum*. *Livestock Production Science* Vol.62. 2 : 155-168.
- Kamalak, A., O. Canbolat, Y. Gurbuz, O. Ozay, C. O. Ozkan, and M. Sakarya, 2004. *Chemical Composition and In Vitro Gas Production Characteristics of Several Tannin Containing Tree Leaves*. Kahramanmaras Sutcu Imam University, Faculty of Agriculture, Department of Animal Nutrition, Kahramanmaras, turkey. *Livestock Research for Rural Development* 16:6
- Liman, 2006. *Manipulasi Bioproses dalam Rumen dan Pasca Rumen Untuk Meningkatkan Kecernaan Zat-Zat Makanan dan Penampilan Ternak Kambing*. Lampung University Library.
- Makkar, H. P. S., M. Blummel, and K. Becker, 1995. *Formation of Complexes Between Polyvinyl Pyrolidones or Polyethylene Glycols and Tannin and Their Implication in Gas Production and True Digestibility in In-Vitro Techniques*. *Journal of Nutrition*. British. 73:897-913
- Makkar, H. P. S., 2003. *Quantification of Tannins in Tree and Shrub Foliage*. Kluwer Academic Publisher. London
- Mangan, J. L., 1988. *Nutritional Effect of Tannins in Animal Feed*. *Nutrition Research Review* 1:209.
- McDonal, P., R. A. Edwards, and J. F. D. Greenhalgh, 1988. *Animal Nutrition*. 4th Edition. Longman Group. U.
- McLeod, M. N., 1974. *Plant Tannins: Their Role in Forage Quality*. *Nutrition Abstracts and Review* 44:803.
- Menke, K. H., L. Roab, A. Salewski, H. Steingass, D. Fritz, and W. Schnider, 1979. *The Estimation of The Digestibility and Metabolizable Energy Content of Ruminant Feedingstuff from The Gas Production When They are Incubated With Rumen Liquor In-Vitro*. *J. Agric. Sci. Camb.* 3:217-222
- Min, B. R., W. C. McNabb, T. N. Barry and J. S. Peters, 2000. *Solubilization and Degradation of Ribulose-1,5-bisphosphate Carboxylase/Oxygenase (EC.4.1.1.39; Rubisco) Protein From White Clover (trifolium repens) and Lotus corniculatus by Rumen Microorganisms and Effect of Condensed Tannins on These Processed*. *J. Agric. Sci.* 134:305-317.
- NRC, 2001. *Nutrient Requirements of Dairy Cattle*. 7th Revised Edition. New York. USA.
- Ørskov, E. R., 1982. *Processing and Preservation of Cereals and Protein Concentrates In Word Animal Science*. Elsevier Science Publisher Amsterdam – Oxford – New York - Tokyo
- Ørskov, E. R. and M. Ryle, 1990. *Energy Nutrition in Ruminants*. Elsevier Applied Science. London
- Preston, T. R., 1995. *Tropical Animal Feeding*. FAO. Roma
- Rogers, J. A., S. B. Pierce-Sandner, A. M. Papas, C. E. Polan, C. J. Snifen, T. V. Muscato, C. R. Staples, and J. H. Clark, 1989. *Production Responses of Dairy Cows Fed Various Amounts Of Rumen-Protected Methionine and Lysine*. *J. Dairy Sci.* 72: 1800-1817.

- Schwab, C. G., C. K. Bozak, N. L. Whitehouse, and V. M. Olson, 1992. *Amino Acid Limitation and Flow to Duodenum at Four Stages of Lactation. 2. Extent of Lysine and Methionine Limitation.* Journal of Dairy Science. 75:3503-3518
- Sun, T., X. Yu, S. L. Li, Y. X. Dong, and H. T. Zhang, 2009. *Responses of Dairy Cows to Supplemental Highly Digestible Rumen Undegradable Protein and Rumen-Protected Forms of Methionine.* Asian - Australasian Journal of Animal Sciences.
- Uchida, K., P. Mandebvu, C. S. Ballard, C. J. Sniffen, and M. P. Carter, 2003. *Effect of Feeding Methionine Supplements With Different Rumen Escape Values on Performance of High Producing Dairy Cows in Early Lactation.* Elsevier. Animal Feed Science and Technology 107: 1–14
- VanSoest, P. S., 1994. *Nutritional Ecology of the Ruminant.* Book Inc. Oregon
- Waghorn, G. C., A. Jhon, W. T. Jones, and I. D. Shelton, 1987. *Nutritive Value of Lotus corniculatus Containing Low and Medium Concentration of Condensed Tannins for Sheep.* Proceeding of New Zealand Society of Animal Production. 52:89.
- Wallace, R. J., N. R. McEwan, F. M. McIntosh, B. Teferedegne and C. J. Newbold, 2002. *Natural Product as Manipulators of Rumen Fermentation.* Asian-Australian Journal Animal Science. 15:1458-1468.
- Widiawati, Y. dan A. Thalib, 2008. *Comparison of Fermentation Kinetics (In Vitro) of Grass and Shrub Legume Leaves: The Pattern of Gas Production, Organic Matter Degradation, pH and NH₃ Production.* http://balitnak.litbang.deptan.go.id/index.php?option=com_content&task=view&id=72&Itemid=56. Diakses tanggal 30 September 2008
- Yitnosumarto, S., 1993. *Percobaan Perancangan, Analisis dan Interpretasinya.* PT. Gramedia Pustaka Utama. Jakarta