Volume 2, Nomor 1, April 2017 ISSN: 2503-0523 ■ e-ISSN: 2548-8023

Kajian Asam Amino pada Fermentasi Talas (Colocasia esculenta L. Schott)

The study of Amino Acids in Fermentation of Talas (Colocasia esculenta L. Schott)

Trisna Darmayanti¹, IDG. Mayun Permana¹, AAGN Anom Jambe¹, AAI Sri Wiadnyani¹, IP Suparthana¹, IDP Kartika Pratiwi¹

Jurusan Ilmu dan Teknologi Pangan, Universitas Udayana, Kampus Bukit Jimbaran, Badung, 80211, Indonesia E-mail: trisnadarmayanti@unud.ac.id

Info Artikel

Diserahkan: 20 Februari 2017 Diterima dengan revisi: 21 Maret 2017 Disetujui: 30 April 2017

Abstrak

Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui kadar total protein serta jenis asam amino yang terdapat pada tape talas (fermentasi talas). Pengukuran kadar protein dilakukan dengan menggunakan metode Kjeldahl, sedangkan kadar asam-asam amino dianalisis dengan menggunakan peralatan *High Performance Liquid Chromatography*. Hasil penelitian menunjukkan bahwa terjadi peningkatan kadar protein dari talas sebelum difermentasi (talas kukus) sebesar 0,767% menjadi 0,870% setelah difermentasi (tape talas). Pada tape talas terkandung sebanyak 13 asam amino, yaitu asam aspartat, asam glutamat, serin, histidin, glisin, treonin, arginin, alanin, tirosin, valin, fenilalanin, isoleusin, dan lisin dimana 4 diantaranya merupakan asam-asam amino esensial. Dengan menggunakan uji t-student dari sampel berpasangan, yaitu talas sebelum dan sesudah difermentasi diketahui bahwa terdapat perbedaan antara kadar protein dan asam-asam amino pada kedua perlakuan. Talas yang difermentasi menjadi tape talas cenderung memiliki kadar protein dan asam-asam amino yang lebih tinggi dibandingkan dengan talas yang tidak difermentasi (talas kukus).

Kata kunci: Talas (Colocasia esculenta), asam-asam amino, fermentasi, tape talas

Abstract

This study aims to determine the levels of total protein and amino acids contained in the *tape* taro (fermented taro). Protein content measurement is conducted by using the Kjeldahl method, while the levels of amino acids were analyzed using High-Performance Liquid Chromatography equipment. The results showed that increased levels of the protein before fermentation (taro steamed) 0.767% to 0.870% after fermentation (*tape* taro). The fermented taro contained 13 amino acids, namely aspartic acid, glutamic acid, serine, histidine, glycine, threonine, arginine, alanine, tyrosine, valine, phenylalanine, isoleucine and lysine which 4 of them are essential amino acids. By using the paired sample t-student test, i.e. before and after fermentation of taro, there is a difference between the levels of protein and amino acids in both treatments. The fermented taro tends to have levels of protein and amino acids higher than unfermented taro.

Keyword: Taro (Colocasia esculenta), amino acids, fermentation, fermented taro

PENDAHULUAN

Umbi-umbian merupakan tumbuhan yang dapat dimanfaatkan pada bagian yang berada di dalam tanah. Potensi alam Indonesia yang kaya akan berbagai jenis tumbuhan umbi-umbian, upaya pemanfaatannya sudah berkembang pada masyarakat tradisional sejak dulu. Di beberapa daerah di Indonesia yang tidak dapat ditumbuhi

Volume 2, Nomor 1, April 2017 ISSN: 2503-0523 ■ e-ISSN: 2548-8023

padi, seperti di Kepulauan Mentawai dan Papua, umbi-umbian dari keluarga Araceae (talasmenjadi makanan pokok talasan) masyarakatnya (Kurniawan, 2010; Rauf dan Lestari, 2009). Selain sebagai sumber karbohidrat, umbi-umbian juga digunakan sebagai sumber obat-obatan khususnya obat tradisional. Beberapa jenis umbi-umbian dari keluarga Araceae yang banyak tumbuh di daerah Propinsi Bali seperti: Colocasia esculenta L. Schott (talas/keladi), *Alocasia sp.* (keladi hitam), Amorphophalus muelleri BI (kula-kula), Acorus calamus L (jangu), Xanthosoma sp. (keladi tabah), Dioscorea alata L. (ubi kepit), Dioscorea esculenta (ubi aung sunda) dimanfaatkan sebagai pangan, obat tradisional, sarana upacara agama Hindu Bali dan tanaman hias (Kurniawan, 2010). Talas (Colocasia esculenta L. Schott.) diduga berasal dari Asia Tenggara atau Asia Tengah selatan. bagian Talas dikenal mempunyai beberapa nama umum, yaitu Taro, Old Cocoyam, Abalong (Philipina), Taioba (Brazil), Arvi (India), Keladi (Malaya), Satoimo (Jepang), Tayoba (Spanyol) dan Yu-tao (China). Sebagai sumber karbohidrat umumnya dapat dijumpai hampir di seluruh Indonesia, dari daerah dataran rendah sampai pegunungan (1300 m dpl). Beberapa daerah seperti Malang, Bogor, dan Bali merupakan daerah yang cukup banyak menghasilkan talas (Anon, 2014a). Talas-talasan tergolong mudah untuk dibudidayakan, dan harga umbi-umbiannya relatif lebih murah dibandingkan dengan biji-bijan dan serealia. Pemanfaatan umbi talas secara optimum sebagai produk pangan lokal sangat diperlukan sebagai penyangga ketahanan pangan pada tingkat rumah tangga, sehingga masyarakat dapat terhindar dari kekurangan gizi. Talas diketahui mengandung berbagai nutrisi seperti karbohidrat, protein, lemak, Vitamin A, Vitamin C, Vitamin B1, kalsium, fosfor, dan besi. Kandungan nutrisi terbesar dalam talas adalah karbohidrat dan protein. Dalam setiap 100 g talas mentah mengandung energi (98 kal), protein (1,9 g), lemak (0,2 g), karbohidrat (23,7 g), kalsium (28,0 mg), fosfor (61 mg), besi (1,0 mg), vitamin A (3 RE), vitamin C (4,0 mg), vitamin B1 (0,13

mg), air (73 g), bahan dapat dimakan (85 %) (Direktorat Gizi Depkes RI, 1979) dalam Koswara (2014)). Menurut Onayemi dan Nwigwe (1987) talas memiliki kadar lemak yang rendah, pati yang mudah dicerna, tiamin, riboflavin, niasin serta protein dan asam-asam amino esensial. Darkwa dan Darkwa (2013) menyebutkan tepung talas yang difermentasi (poi) mengandung nutrisi yang bernilai seperti karbohidrat berupa pati, protein, lemak, serat kasar, air, abu, kalsium, potasium, fosfor, magnesium, vitamin B, vitamin A, dan C, menyebabkan sehingga poi bersifat hipoalergenik. Talas mengandung protein terbesar di keluarga umbi-umbian Protein umum dijumpai pada produk hewan maupun produk tumbuhan. Protein merupakan polimer dari kurang lebih 20 jenis asam amino yang berbeda yang disambungkan dengan ikatan peptida. Asam amino dengan ikatan peptida ini akan membentuk struktur primer protein. Asam amino terbagi menjadi dua kelompok, yaitu asam amino non-esensial dan asam amino esensial. Sebanyak 12 jenis asam amino non-esensial diproduksi oleh tubuh, sedangkan 8 asam amino merupakan jenis asam amino esensial yang harus didapatkan melalui makanan. Selain mengandung nutrisi, tanaman talas juga mengandung antinutrisi kristal kalsium oksalat, seperti yang menimbulkan rasa gatal dan iritasi pada kulit, mulut, tenggorokan serta saluran cerna (Koswara, 2014), proteinase inhibitor, asam pitat, tanin, alkaloid, steroid dan cyanogenicglucoside (Darkwa dan Darkwa, Pengolahan seperti pemasakan dan fermentasi dapat mengurangi zat antinutrisi sehingga talas dapat dikonsumsi. Talas memiliki sifat mudah mengalami kerusakan setelah dipanen, baik secara fisik, kimia maupun mikrobiologi. Untuk mengurangi kerusakan, talas sebaiknya diolah agar memiliki umur simpan yang lebih lama dan aman dikonsumsi. Umbi talas biasanya diolah dengan berbagai cara seperti dikukus, direbus, ataupun digoreng. Selain itu talas juga dapat diolah menjadi tepung talas maupun difermentasi menjadi tape talas. Tape talas merupakan salah satu produk pangan

Volume 2, Nomor 1, April 2017 ISSN: 2503-0523 ■ e-ISSN: 2548-8023

terfermentasi. Pangan terfermentasi memiliki peran penting karena mudah dicerna sistem pencernaan manusia, memiliki properti sensoris yang unik, serta mengandung nutrien yang bermanfaat bagi kesehatan (Granato et al, 2010 dalam Lu, 2010). Penelitian ini dilakukan dengan tujuan untuk mengetahui kadar protein serta jenis asam amino yang terdapat pada tape talas (*Colocasia esculenta* L. Schott.).

METODE PENELITIAN

Rancangan Penelitian

Penelitian ini menggunakan Rancangan Acak Lengkap (RAL) dengan perlakuan yang terdiri dari 2 taraf yaitu: (1) talas sebelum difermentasi (talas kukus), (2) talas setelah difermentasi (tape talas). Masing-masing perlakuan diulang sebanyak 3 kali. Variabel yang diamati yaitu (1) kadar total protein (dengan metode Kjeldahl); (2) kadar air, (3) kandungan asam-asam amino, (4) profil asam-asam amino.

Bahan dan Alat

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini vaitu: talas (diperoleh dari lahan masyarakat di Desa Bongkasa, Abiansemal Badung), H2O, NaCl, garam natrium bisulfit, ragi NKL, Aquades, alkohol 95 persen, H2SO4 0,01N, Standar asam amino (Merck). Peralatan yang digunakan dalam penelitian ini: laminair flow, sentrifugasi, timbangan analitik (Ohaus), pH meter (Istek), labu erlenmeyer, gelas beker, corong, tabung reaksi, gelas ukur, pipet volume (Iwaki), aluminium foil, lampu bunsen, vorteks (Barnstead), jarum ose, Freezer, autoclave (Tomy), pipet mikro (Tricontinent), blender (Philips), magnetic stirer (Ratek Instruments), labu ukur (Pyrex) 50 ml, dan peralatan High Performance Liquid Chromatography (HPLC).

Produksi Tape Talas

Pembuatan tape talas dilakukan menurut metode dari Koswara (2014). Tahapan pembuatan tape talas meliputi sortasi, pengupasan kulit talas, pemotongan talas (ukuran 2 x 2 x 2 cm), pengukusan selama 20 menit, pendinginan selama 45 menit, penambahan ragi sebanyak

0,1%, pencampuran dan fermentasi selama 36 jam.

Analisis Proksimat

Kadar air dan kadar abu diukur dengan metode thermogravimetri, kadar protein kasar diukur dengan menggunakan metode Kjeldahl (AOAC, 2012). Kadar lemak diukur dengan metode Sohxlet (AOAC, 2012).

Analisis Kandungan Asam Amino

Analisis kandungan asam-asam amino dilakukan dengan peralatan High Performance Liquid Chromatography menurut metode dari AOAC (1995) dan manual ICI instrument (1985). Prosedur meliputi preparasi sampel dan analisis sampel. Prosedur diawali dengan membuat pereaksi OPA (Ortoftaldehida). Sebanyak 50 mg OPA dilarutkan dalam 4 ml metanol, kemudian ditambahkan merkap-toetanol. Campuran tersebut dihomogenkan dan ditambahkan larutan Brij-30 dan bufer borat. Larutan disimpan dalam botol berwarna gelap pada suhu 4°C dan akan stabil selama 2 minggu. Pereaksi derivatisasi dibuat dengan cara mencampurkan satu bagian larutan stok dengan dua bagian larutan bufer kalium borat pH 10,4 dan harus dibuat segar setiap hari. Fase mobil terdiri dari Bufer A: Naasetat (0,025 M, pH 6,5); Na.EDTA (0,05%); Metanol (9,0%), THF (1,0%). Bufer A dilarutkan dalam 1 L air murni, disaring dengan kertas saring millipore 0,45 mikron. Bufer A akan stabil selama 5 hari pada suhu kamar, disimpan di dalam botol berwarna gelap yang diisi dengan gas helium atau nitrogen; Bufer B terdiri dari metanol 95% dalam air. Larutan ini akan stabil dalam waktu tak terbatas. Kondisi alat HPLC diatur sebagai berikut: kolom yang digunakan: Ultra techspere; Laju aliran fase mobil1 ml/menit; Detektor Fluoresensi; Fase mobil: Bufer A (bufer asetat 0,025 M, pH 6,5); Bufer B (larutan metanol 95%) dengan gradien. Analisis asam amino dilakukan dengan cara sampel yang telah dihidrolisis dilarutkan dalam 5 ml HCl 0,01 n kemudian disaring dengan kertas saring millipore 0,45 mikron. Selanjutnya ditambahkan bufer kalium borat pH10,4 dengan

Volume 2, Nomor 1, April 2017 ISSN: 2503-0523 ■ e-ISSN: 2548-8023

perbandingan 1:1. Sebanyak 5 µl sampel dimasukkan ke dalam vial kosong yang bersih, dan ditambahkan 25 µl pereaksi OPA, dibiarkan selama 1 menit agar proses derivatisasi sempurna. Selanjutnya sebanyak 5 µl sampel diinjeksikan ke dalam kolom HPLC, ditunggu sampai pemisahan semua asam amino selesai. Waktu yang diperlukan sekitar 25 menit.

HASIL DAN PEMBAHASAN Kandungan Proksimat Tape Talas

Penelitian terhadap kadar protein dan proksimat dari talas sebelum fermentasi (talas kukus) dan talas sesudah fermentasi (tape talas), diperoleh hasil seperti ditunjukkan pada tabel 1. Kadar protein, lemak, kadar air dan kadar abu pada tape talas lebih tinggi dibandingkan dengan talas sebelum difermentasi (talas kukus), sedangkan kadar karbohidrat dan serat pada tape talas mengalami penurunan. Kadar protein pada talas kukus sebesar 0,767%, dan mengalami peningkatan setelah difermentasi menjadi 0,870%.

Tabel 1. Kandungan proksimat pada talas kukus dan tape talas.

Proksimat	Talas sebelum	Talas setelah
(dalam % bb)	difermentasi	difermentasi
	(Talas Kukus)	(Tape Talas)
Protein	$0,767 \pm 0,031$	$0,870 \pm 0,00$
Lemak	$0,709 \pm 0,001$	$0,947 \pm 0,016$
Karbohidrat	$30,754 \pm 0,182$	$25,525 \pm 0,800$
Kadar Air	$65,213 \pm 0,245$	$68,967 \pm 0,707$
Kadar Abu	$2,454 \pm 0,062$	$3,795 \pm 0,032$
Serat Kasar	$20,138 \pm 0,368$	$7,836 \pm 0,024$

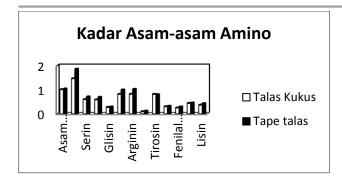
Kadar asam amino pada talas sebelum fermentasi (talas kukus) dan talas sesudah fermentasi (tape talas) dianalisis dengan peralatan HPLC. Adapun kadar asam-asam amino pada penelitian ini dapat dilihat pada tabel 2

Tabel 2. Persentase asam-asam amino pada talas kukus dan tape talas.

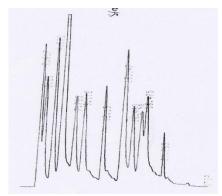
No	Asam Amino (dalam % bk)	Talas sebelum difermentasi (Talas Kukus)	Talas setelah difermentasi (Tape Talas)
1	Asam	$1,009 \pm$	$1,038 \pm$
	Aspartat	0,038	0,105
2	Asam		$1,852 \pm$
	Glutamat	$1,462\pm0,025$	0,009
3	Serin	$0,601\pm0,018$	$0,709\pm0,082$
4			$0,692 \pm$
	Histidin	$0,587\pm0,012$	0,010
5		$0,\!278 \pm$	
	Glisin	0,001	$0,293\pm0,001$
6			$0,995 \pm$
	Treonin	$0,817\pm0,134$	0,004
7		$0,822 \pm$	$1,021 \pm$
	Arginin	0,144	0,026
8			$0,124 \pm$
	Alanin	$0,099\pm0,004$	0,006
9	·	$0.815 \pm$	$0.802 \pm$
	Tirosin	0,040	0,042
10		0,305 ±	0,324 ±
	Valin	0,001	0,003
11		0,252 ±	0,294 ±
10	Fenilalanin	0,025	0,001
12	т 1 .	0,442 ±	0,459 ±
1.0	Isoleusin	0,018	0,009
13	.	0,370 ±	0.422 + 0.022
	Lisin	0,011	$0,432\pm0,033$

Dari tabel 2 terlihat bahwa talas mengandung 13 jenis asam amino, 4 diantaranya merupakan jenis asam amino esensial yaitu: valin, fenilalanin, isoleusin, dan lisin. Secara umum kandungan asam amino pada talas sebelum fermentasi (talas kukus) dan sesudah fermentasi (tape talas) berbeda. Pada tape talas kadar asam amino lebih tinggi dibandingkan dengan talas sebelum

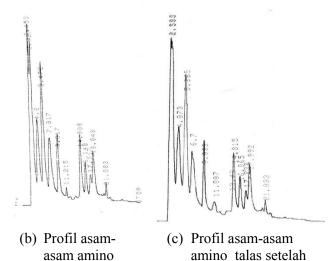
Volume 2, Nomor 1, April 2017 ISSN: 2503-0523 ■ e-ISSN: 2548-8023



Gambar 2. Perkembangan kadar asam-asam amino pada talas sebelum fermentasi (talas kukus) dan setelah fermentasi (tape talas)



(a) Kromatogram Standar



Gambar 3. Profil Asam-asam Amino

difermentasi (tape

talas)

talas sebelum

difermentasi

(talas kukus)

difermentasi (Gambar 2). Dari hasil analisis dengan HPLC diperoleh kromatogram yang menunjukkan profil asam-asam amino pada talas sebelum fermentasi (talas kukus) dan sesudah fermentasi (tape talas), seperti dapat dilihat pada Gambar 3.

Tanaman Talas (Colocasia esculenta L. Schott) yang banyak ditanam di areal tegalan /pekarangan masyarakat di Desa Bongkasa, Kecamatan Abiansemal, Kabupaten Badung selama ini belum banyak dimanfaatkan selain sebagai pakan ternak. Dilihat dari kandungan nutrisinya, talas berpotensi untuk diolah menjadi produk pangan terfermentasi yang bernutrisi. Tape talas dibuat dengan cara pembuatan tape pada umumnya, yaitu dengan menambahkan ragi NKL pada talas kukus. Hasil penelitian menunjukkan bahwa talas memiliki kadar protein kasar sebesar 0,767% b/b pada talas kukus dan meningkat menjadi 0,870% b/b setelah difermentasi menjadi tape talas (tabel 4.1). Menurut Sahlin (1999) selama proses fermentasi terjadi peningkatan signifikan terhadap fraksi-fraksi terlarut dari suatu produk pangan. Penambahan ragi NKL (starter) pada proses fermentasi tape menyebabkan terjadinya peningkatan kadar protein. Starter yang terdiri dari mikroorganisme baik bakteri, kapang, dan khamir dapat mengubah substrat secara biokimia dan organoleptik sehingga menjadi produk pangan terfermentasi yang bernutrisi. Bakteri dapat memecah protein menjadi peptida, selanjutnya peptida dapat diurai menjadi asam bebas. **Proteolisis** amino protein yang menghasilkan peptida dan asam amino bebas memiliki kontribusi dalam menghasilkan aroma khas produk fermentasi baik volatil dan nonvolatil. Peningkatan kadar protein pada talas setelah difermentasi berbanding lurus dengan kadar asam-asam peningkatan aminonya. Apabila dibandingkan dengan talas kukus, konsentrasi asam-asam amino pada talas yang difermentasi (tape talas) berbeda signifikan (Steel dan Torrie, 1980). Konsentrasi masingmasing jenis asam amino pada tape talas secara umum lebih tinggi dari talas kukus (Gambar 2). Dari profil asam amino (Gambar 3) dapat dilihat

Volume 2, Nomor 1, April 2017 ISSN: 2503-0523 ■ e-ISSN: 2548-8023

bahwa kromatogram talas fermentasi (tape talas) (Gambar 3c) memiliki luas area yang lebih besar dibandingkan dengan talas kukus (3b). Adapun asam-asam amino yang terkandung pada talas kukus dan tape talas sesuai urutan kemunculannya (retention time) seperti terlihat pada kromatogram, yaitu: asam aspartat, asam glutamat, serin, histidin, glisin, treonin, arginin, alanin, tirosin, valin, fenilalanin, isoleusin, dan lisin. Hanya metionin dan leusin yang tidak terdeteksi. Sebanyak 13 jenis asam amino yang terdeteksi, 4 jenis diantaranya merupakan asam amino esensial (indispensable amino acid), vaitu valin, fenilalanin, isoleusin dan lisin. Sisanya (9 jenis) merupakan asam amino non esensial. Asam amino esensial biasanya diperlukan untuk pertumbuhan tubuh namun tidak bisa dibentuk oleh tubuh manusia sehingga harus diperoleh dari asupan makanan (de Man, 1997). Dari uraian di atas, talas yang diolah menjadi tape talas (talas fermentasi) dapat dijadikan sebagai pangan alternatif sumber asam-asam amino baik asam amino esensial maupun non esensial.

KESIMPULAN DAN SARAN Kesimpulan

Berdasarkan uraian dapat disimpulkan bahwa dapat menyebabkan fermentasi teriadinya peningkatan kadar protein. Talas yang difermentasi (tape talas) memiliki kadar protein kasar yang lebih tinggi dibandingkan talas yang tidak difermentasi (talas kukus). Kadar protein pada tape talas berbanding lurus dengan kadar asam aminonya. Secara umum konsentrasi asamasam amino pada tape talas lebih tinggi dibandingkan dengan talas kukus. Asam amino yang terdapat pada tape talas sebanyak 13 jenis, yaitu: asam aspartat, asam glutamat, serin, histidin, glisin, treonin, arginin, alanin, tirosin, valin, fenilalanin, isoleusin, dan lisin di mana 4 jenis diantaranya merupakan asam amino esensial (valin, fenilalanin, isoleusin, dan lisin).

Saran

Dalam upaya pengembangan produk pangan fungsional berbasis tanaman pangan lokal,

diperlukan penelitian lebih lanjut untuk meningkatkan nilai tambah tanaman talas. Pengolahan talas menjadi produk pangan terfermentasi seperti tape talas diharapkan dapat menambah diversifikasi produk pangan yang bernilai nutrisi tinggi, memberikan nilai manfaat secara ekonomis serta dapat mendukung program ketahanan pangan.

UCAPAN TERIMA KASIH

Peneliti mengucapkan terima kasih kepada Universitas Udayana, melalui Lembaga Penelitian dan Pengabdian Kepada Masyarakat serta Fakultas Teknologi Pertanian yang membiayai penelitian ini berdasarkan Surat Perjanjian Kerja No. 822A /UN.14.1.26/HK.00.04.03/2014.

DAFTAR PUSTAKA

- Anon. 2014a. Detil data *Colocasia esculenta* L. Schott.
 - http://www.proseanet.org/prohati2/browse r.php?docsid=477 (diakses 17 Juni 2014).
- AOAC. 2012. Official Methods of Analysis of the Association of Official Analytical Chemists. Washington DC.
- AOAC, 1995. Official Methods of Analysis of the Association of Official Analytical Chemists. Washington DC.
- Darkwa, S. and Darkwa, AA. 2013. Taro "Colocasia esculenta": It's Utilization in Food Products in Ghana. *J. Food. Process Technol* 4 (5): 225 .http://dx.doi.org/ 10.4172/2157-7110.1000225.
- deMan, J.M. 1997. Kimia Makanan Edisi ke-2. <u>Terjemahan</u>. Kosasih Padmawinata. ITB, Bandung.
- ICI. 1985. ICI Organic Acid Column Instruction Manual. ICI Australia Pty Ltd., Scientific Instrument Division.
- Koswara, S. 2014. Modul Teknologi Pengolahan Umbi-umbian, Bagian 1: Pengolahan Umbi Talas. TPC Project Seafast Center IPB. http://seafast.ipb.ac.id (diakses tanggal 15 Juni 2014).
- Lu, Y. 2010. The Development of a Cured, Fermented Sheepmeat Sausage Design to

Volume 2, Nomor 1, April 2017 ISSN: 2503-0523 ■ e-ISSN: 2548-8023

Minimise Species and Pastoral-diet Flavours. Thesis AUT University. Onayemi, O. and Nwigwe, N.C. 1987. Effect of processing on the oxalate content of cocoyam. *Foof Technology 20: 293-295*. Sahlin, P. 1999. Fermentation as a Method of Food Processing: Production of Organic Acids, pH-Development and Microbial Growth in Fermenting Cereals (Thesis). Lund Institute of Technology. http://www.eden-foundation.org/.../articles. (diakses tanggal 15 Juni 2014).

Steel, RGD. and J.H. Torrie. 1980. *Principles and Procedures of Statistics: A Biometrical Approach*. McGraw-Hill, Inc. Singapore.