

PENGARUH PENGECER PBS TERHADAP KUALITAS SPERMA AYAM KUKUAK BALENGGEK UNTUK INSEMINASI BUATAN

Ramadhan Sumarmin

Staf Pengajar Jurusan Fisika FMIPA UNP, email: ramadhan_unp@yahoo.com

ABSTRACT

The balenggek chickens has been raised by rural communities for many generations in Payung Sakaki, Tigo Lurah, and Pinang Awan, Regency of Solok, Province of West Sumatera. The Balenggek chicken had low sperm concentration per ejaculated. This study was carried out to identify the influence of PBS as suspender to the sperm quality of balenggek chickens for Artificial Insemination (AI). Sperm collected by massage technique and suspended in physiologic solution (NaCl 0,9%) or PBS (Phosphate Buffer Saline) with sperm concentration 200 million sperm/ ml suspender. Suspended sperm were places in Cool Case (-4°C), and Room Temperature (26-28°C) for 2 or 4 hours before AI. The egg that resulted in AI was incubated to analysis the egg fertility and hatchability. The results shows there were no significantly higher ($p < 0,05$) to all treatments. The eggs fertility 85-90% and the eggs hatchability was 65-70% in both treatments for all temperature conditions. It can conclude that PBS can suspender and preserve the Balenggek chicken sperm quality for AI.

Keywords: *balenggek chickens, PBS, sperm quality, artificial insemination*

PENDAHULUAN

Indonesia merupakan salah satu negara yang memiliki keanekaragaman hayati ter besar setelah negara Brazil termasuk keanekaragaman Avifauna. Namun keanekaragaman hayati ini mulai terancam dengan adanya pembalakan liar terhadap hutan tropis Indonesia sehingga terjadi kerusakan habitat tempat tinggal berbagai jenis hewan. Kerusakan habitat hewan ini diperparah lagi dengan adanya perladangan liar dan pembakaran hutan untuk aktifitas perladangan. Kerusakan habitat hutan ini lebih jauh akan mengancam keberadaan satwa langka yang dilindungi (*endangered species*) yang terdapat di hutan-hutan Indonesia.

Berbagai jenis hewan liar dan hewan langka yang ada di Indonesia terus berada dalam ancaman kepunahan disamping disebabkan oleh kerusakan habitat, perburuan liar dan konversi hutan menjadi perkebunan, juga disebabkan adanya

introduksi atau masuknya jenis hewan tertentu ke Indonesia untuk maksud meningkatkan kualitas hewan lokal. Hal ini juga terjadi pada bangsa unggas terutama ayam kampung dan ayam hutan.

Ayam kampung atau ayam hutan yang dikenal saat ini secara ilmiah adalah hewan yang termasuk dalam Kelas Aves yang memiliki ciri-ciri utama memiliki bulu (feather umumnya plumae dan filloplumae), paruh (beak), sisik pada kaki dan glandula uropigealis (Nalbandov, 1975).

Didasarkan pada perkembangan awal setelah menetas maka bangsa unggas terbagi atas dua kategori yaitu unggas yang bersifat *precocial* yaitu bangsa unggas mampu mencari makan sendiri setelah proses menetas dan bangsa unggas yang bersifat *atricial* yaitu anakan bangsa unggas setelah proses menetas bergantung pakan pada induk dan makan dengan cara dilolohkan (Gilbert, 1994). Berdasarkan

habitat yang dihuninya Aves terbagi menjadi unggas yang terestrial atau unggas air (*waterfowl*) perairan tawar dan laut (Mc Fadden dan Keeton, 1995).

Berdasarkan tipe suara yang dihasilkan oleh bangsa unggas, ada dua jenis suara pada bangsa unggas yaitu tipe *call* (suara panggilan) dan tipe *song* (suara nyanyian atau suara merdu). Tipe suara *call* digunakan untuk berkomunikasi antar sesama jenis, sebagai isyarat adanya musuh yang datang atau predator, saat terkejut dan saat menemukan makanan. Tipe suara *song* merupakan tipe suara sebagai pernyataan wilayah kekuasaan (*territorial declare*) dan sebagai atraksi untuk memikat betina yang akan dikawini. Tipe suara *call* terdapat pada jantan dan betina sedangkan tipe suara *song* hanya terdapat pada jantan saja (Rusfidra, 2007).

Ayam kukuak balenggek merupakan jenis ayam yang eksotik. Ayam ini khas Sumatera Barat khususnya Solok dan terbatas hanya pada daerah Payung Sakaki, Pinang Awan dan Tigo Lurah. Keindahan lantunan kukuak (kokok) yang panjang dan bertingkat adalah ciri khas suara kokok ayam jantan jenis ini.

Populasi ayam ini sangat terbatas hanya pada beberapa daerah kecamatan Payung Sakaki, Tigo Lurah dan Pinang Awan, sedangkan potensinya cukup terbuka sebagai hewan untuk keperluan souvenir atau hewan kontes kicuau (suara kokok). Berbagai cara dan teknologi telah dicoba selama ini untuk meningkatkan populasinya seperti mendatangkan betina unggul ataupun perbaikan cara beternak. Selain itu teknologi Inseminasi Buatan pada ayam cukup potensial untuk diterapkan agar populasi ayam ini segera dapat ditingkatkan.

Obidi *et al* (2008) berhasil melakukan Inseminasi Buatan pada ayam Shika Brown dengan menggunakan pengencer larutan fisiologis NaCl 0,9 %. Larutan fisiologis NaCl 0,9 % adalah larutan fisiologis standar untuk berbagai keperluan penanganan sel atau jaringan hewan guna tetap mem-

pertahankan aktivitas metabolisme selnya. Keberhasilan ini memperlihatkan bahwa peran pengencer sperma dibutuhkan untuk mempertahankan viabilitas sperma agar dapat melakukan fertilisasi setelah diencerkan pada waktu tertentu.

Pada penelitian ini dilakukan pengenceran sperma AKB dengan Phosphate Buffer Saline (PBS) untuk mengetahui kualitas sperma ayam kokok Balenggek yang berasal dari Solok untuk program Inseminasi Buatan. PBS sama halnya dengan larutan fisiologis NaCl 0,9 % tetapi PBS sering digunakan di laboratorium sebagai pencuci jaringan, isolasi jaringan dan pengencer hormon. Diduga telah terjadi penurunan kualitas sperma ayam kokok Balenggek akibat isolasi pemeliharaan pejantan dengan suara merdu ini pada kandang hias tipe tunggal. Pada umumnya pemilik hewan ini juga keberatan jika ayamnya dilepas bebas bersama ayam lain karena takut menurunkan kualitas suaranya.

METODE PENELITIAN

Ayam jantan kukuak balenggek yang digunakan pada penelitian ini adalah sebanyak 5 ekor berumur antara 4-5 tahun, dengan level kukuak tiga atau lebih. Ayam kukuak balenggek jantan didatangkan dari daerah Payung Sekaki (2 ekor) dan Pinang Awan (3 ekor). Setelah dibiasakan perlakuan koleksi sperma dengan cara masase, kemudian pada ayam kukuak balenggek juga diberi perbaikan pola pakan dengan pakan ComFed yang sejalan dengan pemeriksaan kualitas sperma (jumlah sperma per ejakulat) setiap minggu. Pada kondisi atau keadaan sperma ejakulat 300-400 μ l/ekor yang berhasil ditampung, barulah dilakukan penelitian untuk penyediaan sperma ayam kukuak balenggek yang diencerkan pada berbagai konsentrasi pengencer

Pada tahap awal penelitian dilakukan pembiasaan pada ayam jantan untuk dapat ejakulasi tanpa kopulasi. Ejakulasi pada

ayam jantan dirangsang dengan cara melakukan masase pada bagian *ischio-pubis*. Kontraksi pada otot yang menyebabkan bulu-bulu ornamen posterior berdiri adalah sinyal akan terjadinya ejakulasi (Obidi *et al*, 2008). Setelah ayam terlatih untuk ejakulasi dengan rangsangan masase maka preparasi sperma untuk keperluan pengenceran dan IB dapat dilakukan.

Ejakulat atau sperma ayam AKB yang dikoleksi dari hasil rangsang masase di tampung dalam gelas penampung sperma yang khusus untuk menampung sperma ayam. Pada setiap kali penampungan sperma dicatat jumlah ml, konsistensi (kekentalan), dan warna. Setelah itu dilakukan perhitungan jumlah sperma/ejakulat dengan menggunakan counting chamber Improve Neubauer (Kiernan, 1990; Junqueira dan Corneiro, 1991; Winarto, 2003).

Sperma hasil koleksi pada satu kegiatan (bacth) dikumpul dan dihitung konsentrasinya. Sperma AKB kemudian diencerkan dalam larutan NaCl 0,9 % sebagai kontrol dan dalam larutan PBS. Konsentrasi sperma AKB masing-masing 200 juta sperma/ml larutan, kemudian ditempatkan dalam Cool Case (-4 °C) dan di Ruangan (26 - 28 °C) selama 2 atau 4 jam sebelum Inseminasi Buatan (IB).

IB dilakukan pada 10 ekor betina resipien yang telah disin-kronisasikan fase reproduksinya untuk setiap perlakuan. Telur-telur hasil IB kemudian diinkubasi di dalam Inkubator dengan suhu 37,6 °C selama 23 hari. Pada hari ke 5 atau 7 inkubasi, dilakukan pengamatan terhadap fertilitas dengan cara melakukan *candling* pada telur-telur tersebut. Telur yang tidak fertil atau dibuahi dikeluarkan dari inkubator. Sedangkan daya tetas telur diamati pada hari ke 21-23 inkubasi dengan cara menghitung jumlah telur yang menetas. Persentase fertilitas dan daya tetas telur dihitung dengan rumus:

$$\text{Persentase fertilitas telur (\%)} = \frac{a}{b} \times 100\%$$

$$\text{Persentase daya tetas telur (\%)} = \frac{c}{a} \times 100\%$$

Keterangan:

a = jumlah telur yang fertil

b = jumlah telur yang ditetaskan

c = jumlah telur yang menetas

(Kaharuddin dan Kususiyah, 2006).

Data hasil pengamatan berupa data fertilitas dan daya tetas pada kelompok kontrol dan perlakuan kemudian diuji dengan uji t-Student untuk mengetahui apakah ada perbedaan hasil atau kualitas telur hasil IB dengan menggunakan beberapa pengencer (Steel dan Torrie, 1993).

HASIL DAN PEMBAHASAN

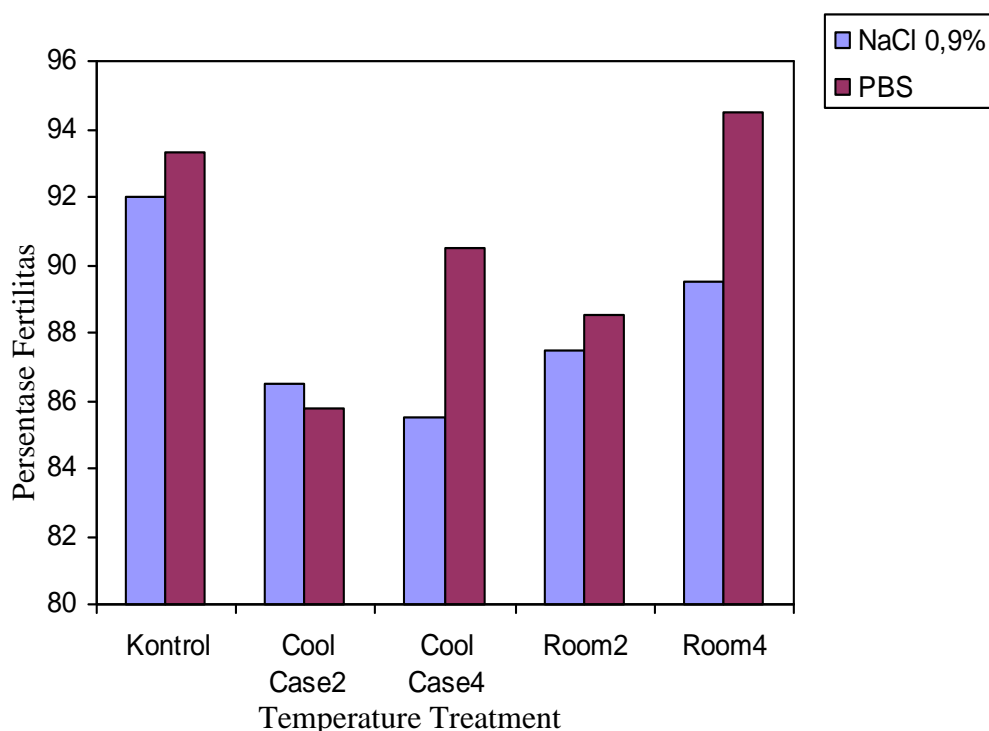
Hasil penelitian berupa data fertilitas dan daya tetas yang didapatkan pada penelitian ini memperlihatkan hasil dengan pola yang sama seperti pada penelitian Obidi *et al* (2008). Hasil ini juga menunjukkan bahwa pada unggas umumnya sperma ejakulat yang dihasilkan memiliki kemampuan atau viabilitas hidup yang terbatas jika tidak berada pada saluran reproduksi unggas betina karena sperma ejakulat unggas tanpa dilengkapi adanya cairan atau lubrikans. Berbeda halnya dengan sperma ejakulat bangsa mamalia yang dilengkapi berbagai cairan yang didapat disepanjang saluran reproduksi mamalia jantan seperti cairan dari Vesikula seminalis, Kelenjar Prostat, Kelenjar Cowper dan disepanjang epididimis, maka pada sperma ayam tidak dilengkapi cairan atau lubrikans karena pada ayam jantan tidak ada glandula asesorius pada saluran reproduksinya.

Pada perkawinan alami bangsa unggas umumnya dan ayam khususnya terjadi pemindahan secara langsung dari kloaka jantan kepada kloaka betina yang dikenal dengan "*cloacal kisses*". Perkawinan ini terjadi dalam waktu singkat. Pada kondisi alami ini satu ekor ayam jantan mampu melayani hingga 12 ekor ayam betina. Adakalanya pada proses perkawinan tersebut tidak seluruh sperma ejakulat tertampung pada kloaka betina disebabkan luas lubang kloaka yang tidak sama besar atau jumlah sperma ejakulat yang cukup banyak.

Hasil pengamatan penelitian mem

perlihatkan bahwa pada kualitas sperma yang diencerkan pada larutan fisiologis NaCl 0,9% (sebagai kontrol) dan pengencer PBS (hingga pengenceran 200 juta sperma/ml) masih memiliki viabilitas dan motilitas yang baik sehingga masih memiliki kemampuan untuk melakukan fertilisasi. Persentase fertilitas yang dicapai pada perlakuan pengenceran dengan kedua jenis pengencer tersebut tidak memperlihatkan perbedaan yang nyata ($p < 0,05$) yaitu masing-masingnya memiliki angka persentase fertilitas berkisar antara 85-90% sebagai mana tersaji pada Gambar 1.

Persentase telur yang fertil dari hasil inseminasi buatan dengan menggunakan pengencer larutan fisiologis NaCl 0,9% dan pengencer larutan PBS pada penelitian ini tidak memperlihatkan perbedaan yang nyata ($p < 0,05$). Baik pengencer larutan NaCl 0,9% maupun larutan PBS memberikan hasil fertilisasi ovum yang tinggi mencapai lebih dari 85%. Obidi *et al* (2008) mengemukakan bahwa angka fertilitas 85% atau lebih adalah angka fertilitas yang tinggi untuk telur-telur yang akan dijadikan bibit atau ditetaskan.



Gambar 1. Grafik pengamatan persentase fertilitas telur hasil IB dengan pengencer NaCl 0,9 % atau PBS, yang disimpan pada berbagai suhu.

Persentase telur yang fertil dari hasil hasil IB dengan menggunakan pengencer larutan fisiologis NaCl 0,9 % dan larutan PBS pada penelitian ini tidak memperlihatkan perbedaan yang nyata ($p < 0,05$). Baik pengencer larutan NaCl 0,9 % maupun larutan PBS memberikan hasil fertilisasi ovum yang tinggi mencapai lebih dari 85 %. Obidi *et al* (2008) mengemukakan bahwa angka fertilitas 85% atau lebih adalah angka fertilitas yang

tinggi. Untuk telur-telur yang memiliki angka fertilitas 85% atau lebih sangat baik untuk dijadikan bibit atau ditetaskan. Sedangkan telur-telur yang memiliki angka fertilitas sedang yaitu di bawah 85% hingga 60% merupakan telur-telur yang kurang baik untuk ditetaskan. Sementara telur-telur dengan angka fertilitas di bawah 60% adalah telur-telur yang tidak baik untuk ditetaskan dan sebaiknya hanya untuk telur konsumsi saja.

Fertilisasi pada ayam sangat tergantung pada jumlah sperma yang diejakulasikan pada saat kawin. Kualitas sperma terutama motilitas sperma memegang peranan penting dalam pembentukan zigot (King *et al.*, 2002). Pada saat dilakukan "candling" fase perkembangan embrio telah berada pada saat organogenesis lanjut sehingga mudah diamati karena embrio telah mulai bergerak. Saat dilakukan IB sperma ditumpahkan pada saluran Muller dan tidak ada yang tertumpah. Hal ini berbeda dengan perkawinan alami yang sering ditemukan terjadinya tumpahan sperma sampai 50 % (Penfold *et al.*, 2002 dan Brillard, 2003). Dengan ditumpahkannya sperma langsung ke dalam saluran Muller akan menjamin sperma akan bertemu dengan ovum. Tingginya angka fertilitas ini sejalan dengan hasil penelitian yang dilakukan oleh Obidi *et al* (2008) pada ayam Shika Brown.

Untuk menentukan fertilitas pada telur ayam yang paling mudah adalah dengan cara "candling". Pada saat dilakukan "candling" fase perkembangan embrio telah berada pada saat organogenesis lanjut sehingga mudah diamati karena embrio telah mulai bergerak

Saat dilakukan IB sperma ditumpahkan pada saluran Muller (saluran reproduksi unggas betina) dan tidak ada sperma yang terbuang atau yang tumpah di

luar kloaka. Keadaan ini jauh berbeda dengan kondisi pada saat proses perkawinan alami yang sering ditemukan terjadinya tumpahan sperma sampai 50% (Penfold *et al.*, 2002 dan Brillard, 2003). Dengan ditumpahkannya sperma langsung ke dalam saluran Muller akan menjamin sperma dengan peluang yang besar untuk bertemu dengan ovum. Tingginya angka fertilitas yang didapatkan pada penelitian ini sejalan dengan hasil penelitian yang dilakukan oleh Obidi *et al* (2008) pada ayam Shika Brown dari Nigeria.

Meskipun ditemukan telur-telur yang memiliki angka fertilitas yang tinggi pada penelitian ini, namun tidak diikuti oleh angka *hatchability* atau daya tetas telur yang tinggi pula. Pada penelitian ini ditemukan angka daya tetas telur 65-70% (Tabel 1) yang termasuk kategori daya tetas sedang. Hasil ini memperlihatkan bahwa kemampuan menetas anak ayam atau daya tetas telur tidak sejalan dengan tingginya angka fertilitas telur (fertilitas kategori tinggi). Meskipun angka fertilitas telur terhitung tinggi tetapi daya tetas telur termasuk kategori sedang, karena bisa jadi kualitas pakan induk betina belum baik dan umur induk betina juga tidak seragam. Baik pola pakan dan umur induk betina diduga berpengaruh terhadap fertilitas dan daya tetas telur.

Tabel 1. Hasil pengamatan daya tetas telur hasil IB dengan sperma yang diencerkan pada larutan NaCl 0,9 % dan PBS setelah disimpan pada berbagai suhu.

| No | Pengencer | Persentase daya tetas telur hasil IB sperma yang disimpan | | | | |
|----|-----------|---|-----------------|-----------------|------------------|-----------------|
| | | Kontrol (segar) | Cool Case 2 jam | Cool Case 4 jam | Suhu Ruang 2 jam | Suhu Ruang 4Jam |
| 1 | PBS | 68±0,7a | 65±0,5a | 65±0,5a | 64±0,3a | 64±0,5a |
| 2 | NaCl 0,9% | 65±0,5a | 62±0,5a | 63±0,6a | 61±0,5a | 63±0,6a |

Keterangan: Angka pada kolom yang sama jika diikuti oleh huruf yang sama tidak berbeda nyata ($p < 0,05$) berdasarkan uji t-Student

Kemampuan menetas atau daya tetas anak ayam yang didapatkan pada penelitian ini termasuk kategori sedang yaitu di atas 60 persen (antara 50-75 %). Adapun kategori daya tetas yang dikemukakan oleh Brillard (2003) dan Obidi *et al* (2008) adalah persentase tetas di bawah 50 % adalah kategori daya tetas telur rendah, persentase tetas 50-75 % adalah kategori daya tetas telur sedang atau moderat dan persentase tetas di atas 75 % adalah kategori daya tetas telur yang tinggi.

Berdasarkan hasil pengamatan terhadap daya tetas yang ditemukan pada penelitian ini, memperlihatkan bahwa kualitas sperma AKB terpelihara hingga 6 jam dan relatif tidak berubah. Kemampuan sperma ayam untuk tetap hidup dan terpelihara dengan viabilitas dan mobilitas yang tinggi ini disebabkan oleh terpeliharanya keseimbangan cairan di dalam dan di luar sel sperma baik pada larutan fisiologis NaCl 0,9 % ataupun larutan PBS sehingga dapat mempertahankan viabilitas membran sel sperma ayam dan proses respirasi sel sperma tetap terjaga.

Pada kondisi suhu ruang, sperma ayam yang tidak diencerkan atau sperma ayam ejakulat saja akan mudah terkoagulasi atau menggumpal karena pada sperma ayam sebagaimana sperma pada unggas umumnya yang tidak dilengkapi dengan adanya lubricant atau cairan yang bersifat menyangga keseimbangan cairan intraseluler dan ekstraseluler untuk dapat mempertahankan viabilitas dan motilitas sperma (Piccione dan Caola, 2002). Biasanya waktu hidup atau *half life* sperma ayam yang tertumpah ke luar tubuh ayam jantan hanya beberapa menit saja sejalan dengan terjadinya proses koagulasi atau penggumpalan yang diikuti oleh proses denaturasi atau kehancuran protein pembangun membran sel sperma.

Pengencer PBS dan larutan NaCl 0,9 % selain mengandung banyak air juga mengandung ion-ion bebas yang dapat

mempertahankan permeabilitas membran sel sperma ayam. Banyaknya ion-ion bebas dan air yang mempertahankan permeabilitas membran sperma menyebabkan sperma ayam kukuak balenggek dapat bertahan untuk jangka waktu yang cukup lama yaitu sekitar 4-6 jam, dan bagi para inseminator akan cukup tersedia waktu untuk melakukan IB. Hal ini sangat menguntungkan untuk program pemuliaan unggas pada umumnya karena sperma ejakulat ayam yang sangat banyak yaitu 7-8 milyar sperma/ml dapat diencerkan untuk IB pada lebih dari 40 ekor ayam betina sekaligus (Piccione, dan Caola (2002). Angka efisiensi IB dengan sperma ayam kukuak balenggek dapat dicapai dengan diencerkannya sperma untuk kebutuhan IB yang sangat efisien dengan hanya 200 juta/sperma per dosis IB. Keuntungan lainnya dengan menggunakan pengencer PBS dan Larutan fisiologis 0,9 % ini adalah keduanya dapat dengan mudah dibeli atau dibuat karena resep untuk pembuatan PBS dapat diunduh dari banyak situs di internet.

Hasil penelitian ini sekaligus menguatkan hasil penelitian ahli reproduksi unggas terdahulu yang mendapatkan hasil daya tetas yang selalu lebih rendah dibandingkan dengan fertilitasnya. Seharusnya dengan fertilitas yang tinggi maka daya tetas juga akan tinggi. Ada beberapa faktor yang menyebabkan daya tetas telur menjadi lebih rendah dibandingkan fertilitas telur. Diantaranya adalah faktor kemampuan anakan memecahkan kerabang, ketebalan dan kualitas kerabang. Diduga pada penelitian ini karena digunakan induk betina ayam kampung yang disuplementasi dengan pakan dengan kandungan kapur yang cukup tinggi menyebabkan kerabang lebih tebal dan kokoh sehingga anakan ayam tidak mampu menetas dan mati. Hal ini terbukti pada penelitian ini ditemukan juga anak ayam yang gagal keluar dari kerabang dan menyebabkan kematian.

KESIMPULAN

Berdasarkan hasil dan pembahasan pada penelitian ini dapat disimpulkan bahwa sperma Ayam Kukuak Balenggek dapat diencerkan dengan pengencer larutan PBS untuk digunakan pada teknik Inseminasi Buatan pada AKB. Larutan PBS dapat mempertahankan fertilitas sperma AKB hingga 6 jam pada suhu ruang sebelum dilakukannya IB.

Perlu dilakukan penelitian tentang pengaruh pengencer lainnya dan lama penyimpanan sperma yang telah diencerkan pada berbagai kondisi temperatur.

DAFTAR PUSTAKA

- Brillard JP. (2003). **Practical aspects of fertility in poultry.** *Worlds Poult. Sci. J.* 59: 441-446
- Gilbert F. Scott. (1994). **Developmental Biology.** 4th edition. Sinauer Association, Inc. Sunderland, Massachusetts. P. 803-805.
- Junqueira LC, and Corneiro J. (1991). **Histologi Dasar.** Edisi 2. Penerjemah Adji Dharma. EGC.Jakarta.
- Kaharuddin, Desia dan Kususiyah. (1989). **Fertilitas dan Daya Tetas Telur Hasil Persilangan Antara Puyuh Asal Bengkulu, Padang dan Yogyakarta.** Fakultas Pertanian Universitas Bengkulu: Bengkulu.
- Kiernan JA. (1990). **Histological & Histochemical Methods.** 2nd Edition. Pergamon Press. Oxford.
- King LM, Brillard JP, Garret WM, Bakst MR, and Donoghue AM. (2002). **Segregation of spermatozoa within sperm storage tubules of fowl and turkey hens.** *Reprod.* 123: 79-86
- Mc Fadden CH, and Keeton WT. (1998). **Biology an exploration of life.** W.W. Norton & Company. New York. London. Pp 678-686.
- Nalbandov AV. (1975). **Reproductive Physiology of Mamals and Birds.** 3rd Edition. WH Freeman & Company. San Fransisco.
- Obidi JA, Onyeanusu BI, Ayo JO, Rekwot PI, and Abdullahi SJ. (2008). **Effect of timing of artificial insemination on fertility and hatchability of Shikabrown breeder hens.** *Poult. Sci.* 7(12): 1224-1226.
- Penfold LM, Wildt DE, Herzog TL, Lynch W, Ware L, Derrickson SE, and Monfort SL. (2000). **Seasonal pattern of LH, testosterone and semen quality in Northern Pintail duck.** *Reprod. Fertility and Dev.* 12: 229-235.
- Piccione, G and Caola G. (2002). **Biological rhythm in Livestock.** *J. Vet. Sci.* 3: 145-157.
- Rusfidra A. (2007). **Kajian bioakustik pada ayam kokok Balenggek "ayam local penyanyi" dari Sumatera Barat.** <http://rusfidra.multiply.com>. Diunduh Januari 2008
- Steel RGD and Torrie JH. (1993). **Prinsip Dan Prosedur Statistik.** Penerjemah Soemantri. Gramedia. Jakarta.
- Winarto A. (2003). **Prosedur pendeteksian bahan aktif dengan metode baku/konvensional. dalam Pemanfaatan Teknik Kultur Jaringan dan Histokimia.** Kerjasama Proyek Peningkatan SDM DIRJEN DIKTI DEPDIKNAS dengan Bagian Anatomi FKH IPB. Bogor.