

Biokonversi Pelepah Daun Nipah Menggunakan Jamur Tiram Putih Ditinjau Dari Komposisi Kimia dan Kecernaan Serat

Suryadi, Hardi Syafria

Dosen Fakultas Peternakan Universitas Jambi

Abstract. *The study aims to determine the chemical composition and digestibility of midrib palm leaves from bioconversion results. Solid bioconversion using white oyster mushroom inoculum as a starter. This study used a completely randomized design (RAL) with 6 treatments and 3 replications. As a treatment the white oyster mushroom inoculum consisted of 6 levels, namely 0g (with inoculum), 5g, 10g, 15g, 20g and 25g kg⁻¹ substrate. The variables measured are the chemical composition and digestibility of nipah leaf midrib fiber bioconversion products. The results showed that organic matter content, ADF digestibility and nipah leaf midrib cellulosa bioconversion results were significantly different ($P < 0.05$) but the dry matter content, crude protein and NDF digestibility did not show significant differences ($P > 0.05$) due to the levels of white oyster mushroom inoculum. The best digestibility occurred at the levels of white oyster mushroom inoculum 20g kg⁻¹ substrate with acid digestibility fiber 27,31% and cellulose 31,08%. It can be concluded that the level of white oyster mushroom inoculum 20g kg⁻¹ substrate for nipah leaf midrib bioconversion results is the best.*

Keyword: *bioconversion; nipah leaf midrib; white oyster mushroom; chemical composition; fiber digestibility*

PENDAHULUAN

Salah satu hasil ikutan tanaman mangrove adalah pelepah daun nipah, yang jumlahnya dapat mencapai 40 juta per hektar/tahun (Baharudin dan Taskirawati, 2011). Pelepah nipah merupakan sisa pengambilan daun nipah sebagai bahan pembuat atap yang belum dimanfaatkan oleh petani dan sangat potensial sebagai bahan pakan ternak, namun karena kualitas nutrisi yang rendah,

Kualitas pelepah daun nipah sebagai pakan dapat ditingkatkan melalui aplikasi bioteknologi, dalam penelitian ini adalah biokonversi dengan menggunakan jamur tiram putih (*Pleurotus ostreatus*). Aplikasi teknologi biokonversi ini lebih menguntungkan karena selain dapat meningkatkan nilai nutrisi, juga tidak berbahaya, tidak menimbulkan polusi dan biaya relatif murah. Jamur tiram putih sebagai jamur penghasil enzim fenol oksidase (laktase, peroksidase, dan tirosinase) mampu mendegradasi lignoselulosa dan lignohemiselulosa (Ghunu dan Tarmizi, 2006). Proses biokonversi dapat menurunkan kadar fraksi serat atau karbohidrat struktural, meningkatkan kadar protein (miselium jamur sebagai sumber nitrogen), selulosa dan hemiselulosa yang didegradasi menjadi tersedia. Pengolahan pelepah daun nipah melalui proses biokonversi akan menghasilkan pakan yang berkualitas baik.

Inokulum jamur tiram putih sebagai starter diinokulasikan dalam substrat biokonversi saat kultur mikroba pada fase pertumbuhan eksponensial. Dosis inokulum jamur tiram putih pada biokonversi substrat padat sangat bervariasi dari 0,5-20% dari total berat bahan fermentasi (Wijono *et al.*, 1988). Hal ini sangat erat kaitannya dengan aktivitas enzim yang dihasilkan jamur. Penggunaan jamur tiram putih di dalam proses biokonversi rumput Kume kering dapat meningkatkan kandungan protein kasar dan menurunkan bahan kering, bahan organik dan serat kasar (Ghunu dan Tarmizi, 2006). Hasil penelitian Ghunu (1998) pada ampas tebu menggunakan inokulum jamur tiram putih menghasilkan kecernaan ADF 42,12% NDF 47,29%, hemiselulosa 52,99%, selulosa 44,39% dan lignin 12,02%.

Pada penelitian ini dipelajari proses biokonversi pelepah daun nipah menggunakan jamur tiram putih ditinjau dari komposisi kimia dan kecernaan komponen serat.

METODE PENELITIAN

Bahan yang digunakan dalam penelitian adalah pelepah nipah, Inokulum jamur tiram putih, kapur CaCO₃, cairan rumen, larutan/bahan kimia dan perlengkapan untuk *in vitro*.

Alat yang digunakan adalah timbangan pakan dan peralatan laboratorium (antara lain: timbangan analitik, oven, aqua shake, kain kasa, tabung fermentor, centrifuge, kertas saring, pompa vakum, termos air, thermometer, dll).

Pelepah daun nipah yang diperoleh di sekitar Muara Sabak di chopper ukuran $\pm 2-4$ cm, lalu dikeringkan dan digiling. Inokulum jamur tiram putih (*Pleurotus ostreatus*), diperoleh dari petani jamur (Edi Jamur) Jl. Swadaya raya No. 5 Rt. 07 Bagan Pete Kota Jambi. Bahan aditif terdiri atas dedak halus (sebagai sumber karbon dan nitrogen); CaCO₃ (sebagai sumber kalsium dan pengatur pH substrat agar tetap berkisar 5,1-7,0). Air digunakan untuk membasahi substrat sehingga tercipta kondisi kadar air substrat yang diperlukan untuk pertumbuhan media jamur dan sebagai bahan pelarut zat-zat makanan. Cairan rumen berasal dari sapi bali berfistula rumen berumur ± 3 tahun

Pelaksanaan Biokonversi

Sebagai media tumbuh jamur disiapkan 65% pelepah daun nipah, 33% dedak padi dan 2% CaCO₃ (kapur) dicampur secara merata, lalu ditambahkan air 70% dan dilakukan pengomposan selama 2 hari. Substrat dimasukkan ke dalam kantong polipropilen masing-masing sebanyak 1 kg dan dipadatkan, mulut kantong plastik ditutup dengan menggunakan cincin paralon dan dilipat keluar dan diikat dengan karet gelang dan ditutup kapas. Substrat disterilisasi dalam drum pengukus selama 8 jam, lalu didinginkan selama 24 jam. Selanjutnya substrat diinokulasi dengan level inokulum jamur tiram putih 0g (tanpa inokulum) 5g, 10g, 15g, 20g

dan, 25g kg⁻¹ substrat dan diinkubasi dalam ruang inkubasi dengan lama inkubasi 35 hari sampai baglog berwarna putih. Suhu ruang inkubasi harus dijaga dalam kondisi yang stabil dan rendah cahaya yaitu 22-28°C dengan kelembaban 70-90°C.

Substrat hasil biokonversi (PDNHB) kemudian dikeluarkan dari baglog dan diambil sampel masing-masing baglog 200 g dan dikeringkan dalam oven selama 48 jam pada suhu 60°C dan 24 pada suhu 105°C. Kemudian sampel digiling halus selanjutnya dilakukan analisis komposisi kimia yaitu bahan kering, bahan organik, dan protein kasar dan kecernaan serat secara *in vitro*.

Penelitian dilakukan menggunakan Rancangan Acak Lengkap (RAL) dengan perlakuan 6 level inokulum jamur tiram putih dan ulangan 3 tiap perlakuan. Data dianalisis dengan analisis ragam (ANOVA) dan bila terdapat perbedaan maka dilanjutkan dengan uji jarak Duncan (Steel and Torrie., 1995)

Peubah yang diamati adalah komposisi kimiawi dan kecernaan serat (KCNDP), kecernaan serat

(KCADF) dan kecernaan selulosa produk biokonversi. Nilai kecernaan KCNDP, KCADF dan KC selulosa ditetapkan dengan menggunakan metode Tilley and Terry yang dimodifikasi oleh Sutardi (1980). Kadar NDF dan ADF dianalisis, masing-masing dengan mengekstraksi contoh dengan larutan detergen netral dan larutan detergen asam (AOAC, 2000). Bahan organik adalah bahan yang hilang setelah pembakaran pada suhu 600°C. Kadar protein diukur secara destruksi dengan asam sulfat dan kjeldahl dilanjutkan dengan pengukuran N menggunakan auto analyzer (AOAC, 2000).

HASIL DAN PEMBAHASAN

Komposisi kimia produk biokonversi

Rataan kandungan bahan kering, bahan organik, dan protein kasar pelepah daun nipah hasil biokonversi pada level inokulum jamur tiram putih yang berbeda dapat dilihat pada Tabel 1.

Tabel 1. Rataan komposisi kimia pelepah daun nipah hasil biokonversi

Level inokulum jamur tiram putih	Komposisi kimia (%) bahan kering		
	Bahan kering	Bahan organik	Protein kasar
0g	41,62±4,38	34,62±2,71 a	3,79±0,71
5g	36,96±1,78	25,63±0,46 c	4,35±0,75
10g	35,43±1,85	29,77±2,65 b	4,37±0,58
15g	37,26±1,24	26,60±0,80 bc	4,61±0,43
20g	36,55±0,45	28,33±1,12 bc	4,91±0,70
25g	36,04±1,76	25,70±1,72 c	4,25±0,96

Keterangan: Superskrip yang berbeda pada kolom yang sama menunjukkan perbedaan nyata sekurang-kurangnya (P<0,05).

Kandungan bahan kering

Hasil analisis ragam menunjukkan bahwa level inokulum jamur tiram putih tidak berpengaruh nyata (P >0,05) terhadap kandungan bahan kering pelepah nipah hasil biokonversi, namun ada kecenderungan berbeda nyata (Tabel 1). Hal ini diduga karena miselium yang tumbuh belum maksimal sehingga belum banyak komponen-komponen lainnya dari substrat yang dirombak oleh enzim fenol oksidase menjadi energi untuk pertumbuhan jamur. Menurut Kasmiran (2011) semakin banyak mikroorganisme yang tumbuh maka semakin banyak pula zat makanan yang dirombak menjadi energi, akibatnya molekul air yang dihasilkan dari proses metabolisme juga meningkat. Sebagian besar molekul air akan tinggal dalam produk dan sebagian lagi akan keluar dari produk (Fardiaz, 1988). Molekulair yang tinggal dalam produk akan meningkatkan kadar air dalam produk dan menurunkan kandungan bahan kering produk (Winarno *et al.*, 1986).

Selain itu mungkin disebabkan waktu fermentasi yang kurang optimal sehingga pertumbuhan miselium belum optimal pada saat proses fermentasi sehingga kandungan bahan kering pelepah daun nipah hasil biokonversi tidak berbeda diantara semua perlakuan. Hal ini sejalan dengan hasil penelitian Hadar *et al* (1993) bahwa fermentasi jerami gandum menggunakan *Pleurotus ostreatus* sampai 30 hari memberikan pengaruh yang tidak nyata terhadap kandungan bahan kering jerami gandum.

Kandungan bahan organik

Level inokulum berpengaruh nyata (P<0,05) terhadap kandungan bahan organik pelepah daun nipah hasil biokonversi, yang pada awalnya (sebelum biokonversi) adalah 34,62±2,71% dan setelah biokonversi menjadi 25,63±0,46%. Level inokulum 10g kg⁻¹ substrat tidak berbedanya nyata (P>0,05) dengan level inokulum 15g dan 20g kg⁻¹ substrat. Penurunan kandungan bahan organik penelitian ini disebabkan terjadinya degradasi terhadap komponen-komponen lainnya di dalam substrat sejak awal inkubasi hingga waktu tertentu (35 hari) oleh aktivitas enzim fenol oksidase yang diproduksi jamur tiram putih.

Penurunan bahan organik selama proses biokonversi ini didukung oleh hasil penelitian Hadar *et al* (1993), dimana terjadi penurunan nutrisi terutama bahan organik pada jerami gandum yang difermentasi oleh *Pleurotus ostreatus* dan penurunan bahan organik tertinggi sebesar 20% dalam waktu fermentasi 30 hari. Perbedaan ini disebabkan oleh perbedaan bahan yang digunakan, keadaan fisik bahan dan waktu inkubasi.

Kandungan Protein Kasar

Level inokulum tidak berpengaruh nyata (P>0,05) terhadap kandungan protein kasar pelepah daun nipah hasil biokonversi, dimana kandungan protein kasar terendah diperoleh pada perlakuan 0% kg⁻¹ (tanpa inokulum), sedangkan yang tertinggi pada level inokulum

20g kg⁻¹ substrat (Tabel 1). Perubahan kandungan protein kasar selama proses biokonversi tidak nyata. Hal ini disebabkan oleh karena miselium yang tumbuh pada baglog masih menipis, belum merata sehingga pertumbuhan miselium belum maksimal pada setiap perlakuan akibatnya berpengaruh terhadap kandungan protein kasar substrat, walaupun terjadi peningkatan protein. Pembentukan protein mencapai puncaknya pada saat pembentukan miselium selesai (Santosa, 1996). Semakin tinggi level inokulum jamur tiram menyebabkan lebih banyaknya miselium terbentuk, disertai dengan meningkatnya nitrogen total secara proporsional karena terdegradasinya komponen serat

(Nicolini *et al.*, 1987), sebaliknya bahan organik menurun.

Peningkatan level jamur tiram putih berpengaruh positif terhadap kepadatan populasi jamur tiram putih, pada gilirannya juga terhadap produksi enzim untuk menguraikan substrat menjadi pembentuk-pembentuk protein (Zadrazil dan Kurtzman Jr., 1984).

Kecernaan komponen serat hasil biokonversi

Hasil pengukuran nilai kecernaan komponen serat secara *in vitro* dan hasil analisis statistik dapat dilihat pada gambar 2.

Tabel 2. Rataan nilai kecernaan serat pelepah daun nipah hasil biokonversi

Level inokulum jamur tiram putih	Kecernaan Serat (%) bahan kering		
	NDF	ADF	Selulosa
0g	14,60±1,20	12,37±4,13 a	16,80±5,86 a
5g	18,12±2,42	14,43±4,27 b	14,43±6,58 b
10g	22,99±1,26	21,77±0,78 c	23,37±3,02 b
15g	16,81±2,96	18,63±2,10 c	23,13±4,09 b
20g	22,45±3,64	27,31±3,25 d	31,08±2,27 c
25g	24,55±3,19	18,76±3,64 d	23,56±4,89 cd

Keterangan: Superskrip yang berbeda pada kolom yang sama menunjukkan perbedaan nyata sekurang-kurangnya (P<0,05).

Kecernaan Neutral Detergent Fiber (NDF)

Neutral Detergent Fiber merupakan zat makanan yang tidak larut dalam detergent neutral dan merupakan bagian terbesar dari dinding sel tanaman. Bahan ini terdiri atas hemiselulosa, selulosa, lignin, silika dan beberapa protein fibrosa (Van Soest, 1994).

Hasil analisis sidik ragam pada inkubasi 48 jam menunjukkan bahwa level inokulum selama proses fermentasi tidak nyata (P>0,05) mempengaruhi kecernaan NDF pelepah daun nipah hasil biokonversi. Hal ini disebabkan karena kandungan serat kasar tidak berbeda nyata (P>0,05) dari masing-masing perlakuan sehingga berpengaruh terhadap kecernaan NDF (Tabel 2).

Selain itu mungkin disebabkan enzim fenol oksidase yang dihasilkan jamur tiram putih belum mampu merenggangkan atau melonggarkan ikatan lignoselulosa dan lignohemiselulosa dari substrat tersebut akibatnya kecernaan NDF pelepah daun nipah hasil biokonversi tidak berbeda atau relatif sama.

Van Soest (1982) menyatakan bahwa kecernaan serat detergent (NDF) tergantung dari lignifikasi fraksi tersebut, selulosa dan hemiselulosa yang terikat lignin tidak dapat dicerna oleh mikroba rumen sehingga akan menurunkan kecernaan bahan pakan. Tillman *et al.* (1991) menyatakan bahwa kandungan serat kasar mempunyai pengaruh terbesar terhadap kecernaan.

Kecernaan Acid Detergent Fiber (ADF)

Acid Detergent Fiber merupakan zat makanan yang tidak larut dalam detergent asam. Acid detergent fiber terdiri atas selulosa, lignin dan silika (Van Soest., 1994)

Level inokulum berpengaruh sangat nyata (P<0,01) terhadap nilai kecernaan ADF pelepah daun nipah hasil biokonversi (Tabel 2). Level inokulum 5g kg⁻¹ substrat berbeda nyata (P<0,05) dengan level inokulum

10g, 15g, 20g, 25g dan 0g kg⁻¹ substrat (tanpa inokulum) terhadap nilai kecernaan ADF pelepah daun nipah produk biokonversi. Level inokulum 25g kg⁻¹ substrat tidak berbeda nyata (P>0,05) dengan level inokulum 15g kg⁻¹ substrat. Demikian pula antara level inokulum 5g kg⁻¹ substrat dengan level 0g kg⁻¹ substrat (tanpa inokulum) tidak berbeda nyata (P>0,05). Pada level inokulum 20g kg⁻¹ substrat diperoleh nilai kecernaan ADF yang lebih tinggi dibandingkan dengan perlakuan lainnya.

Peningkatan nilai kecernaan ADF ini diakibatkan oleh adanya aktivitas enzim fenol oksidase yang diproduksi oleh jamur tiram putih yang berperan mengkomposisi lignoselulosa sehingga nilai nutrisi dan kecernaan meningkat.

Nilai kecernaan ADF sebelum biokonversi adalah 12,37±4,13% dan setelah biokonversi menjadi 27,31±3,25% maka terjadi peningkatan kecernaan ADF sebesar 14,94%. Peningkatan nilai kecernaan ADF penelitian ini lebih rendah dibandingkan hasil penelitian Ghunu (1998) dimana nilai kecernaan ADF ampas tebu sebesar 42,12 %. Perbedaan nilai kecernaan tersebut disebabkan oleh perbedaan bahan dan komposisinya, metode yang digunakan dan lama inkubasi.

Kecernaan Selulosa

Selulosa merupakan komponen utama penyusun dinding sel tanaman, berikatan dengan lignin dan membentuk lignoselulosa.

Hasil analisis statistik pada inkubasi 48 jam menunjukkan bahwa level inokulum berpengaruh nyata (P<0,05) terhadap kecernaan selulosa pelepah daun nipah produk biokonversi (Tabel 2).

Level inokulum 20g kg⁻¹ substrat nyata (P<0,05) lebih tinggi dibandingkan level inokulum 25g, 15g, 10g, 5g dan 0g kg⁻¹ substrat (tanpa inokulum) terhadap kecernaan selulosa pelepah daun nipah hasil

biokonversi. Level inokulum 25g kg⁻¹ substrat tidak berbeda nyata ($P>0,05$) dibandingkan level inokulum 15g dan 10g kg⁻¹ substrat dan antara level inokulum 5g kg⁻¹ substrat dengan level 0g kg⁻¹ substrat (tanpa inokulum) juga tidak berbeda nyata ($P>0,05$).

Peningkatan kecernaan selulosa ini diakibatkan oleh adanya aktivitas enzim fenol oksidase dari jamur tiram putih yang berperan aktif mendegradasi lignoselulosa sehingga kandungan lignin dan silika menjadi rendah dan kecernaan selulosa meningkat. Sesuai dengan pendapat Sullivan (1965) bahwa kandungan lignin berkorelasi negatif dengan degradasi selulosa.

Kecernaan selulosa sebelum biokonversi yaitu 14,43% dan setelah biokonversi menjadi 31,08%, maka terjadi peningkatan sebesar 16,65%. Nilai kecernaan pada penelitian ini lebih rendah dibanding ini tertinggi diperoleh pada level inokulum 20g kg⁻¹ substrat yaitu 31,08% sedangkan terendah pada level inokulum 5g kg⁻¹ substrat yaitu 14,437%. Nilai kecernaan selulosa ini lebih rendah dibandingkan dengan hasil penelitian Ghunu (1998) dimana kecernaan selulosa ampas tebu yaitu sebesar 44,39 %. Perbedaan nilai kecernaan tersebut disebabkan oleh karena perbedaan komposisi bahan dan metode yang digunakan serta lama inkubasi

Nilai kecernaan selulosa pelepah daun nipah produk biokonversi pada level inokulum 25g kg⁻¹ substrat berbeda tidak nyata ($P>0,05$) dibandingkan dengan level inokulum 15g dan 10g kg⁻¹ substrat dan antar level inokulum 5g kg⁻¹ dengan level 0g kg⁻¹ substrat juga tidak berbeda, hal ini karena kandungan lignin pelepah daun nipah produk biokonversi masing-masing perlakuan relatif sama. Smith *et al.* (1970) menyatakan bahwa lignin yang terkandung dalam suatu bahan akan menurunkan tingkat degradasi dinding sel bahan tersebut. Kandungan lignin yang relatif sama akan menyebabkan kecernaan yang relatif sama pula.

SIMPULAN

Kandungan bahan organik, kecernaan ADF dan selulosa pelepah daun nipah hasil biokonversi berbeda nyata ($P<0,05$) tetapi kandungan bahan kering, protein kasar dan kecernaan NDF tidak menunjukkan perbedaan yang nyata ($P<0,05$) akibat level inokulum jamur tiram putih. Kecernaan terbaik terjadi pada level inokulum 20g kg⁻¹ substrat dengan kecernaan Acid Detergent Fiber (ADF) 27,31% dan selulosa 31,08%.

DAFTAR PUSTAKA

AOAC. 2000. Official Methods of Analysis. 12th Edition. Benjamin Franklin, Washington, D.C.

Baharuddin dan I. Taskirawati. 2011. Buku Ajar. Hasil Hutan Bukan Kayu. Fakultas Kehutanan. Universitas Hasanuddin. Makasar.

Ghunu, S. 1998. Efek Dosis Inokulum dan Lama Bioconversi Ampas Tebu Sebagai Bahan Pakan oleh Jamur Tiram Putih (*Pleurotus Ostreatus*) Terhadap Kandungan Komponen Serat, Protein Kasar dan Energi Dapat Dicerna pada Domba. Tesis. Program Pascasarjana, Universitas Padjadjaran, Bandung

Ghunu, S dan Tarmizi, A.R. 2006. Perubahan Komponen Serat Rumput Kume (*Sorghum Plumosum* Var. *Timorensis*) Hasil biokonversi Jamur Tiram Putih (*Pleurotus ostreatus*) Akibat kadar Air Substrat dan Dosis Inokulum yang Berbeda. *Jurnal Ilmu Ternak*. Volume 6 No. 2. Hal: 81 – 86.

Hadar, Y., Z. Kerem and B. Gorodecki. 1993. Biodegradation of Lignocellulose Agricultural Wastes by *Pleurotus ostreatus*. *Jurnal of Biotechnology*. 30: 133-139

Nicolini, I., C. Von Hunolstein, and A. Carilli. 1987. Solid State Fermentation of Orange Peel dan Grape Stalks by *Pleurotus ostreatus*, *Agrocybeaegerita* and *Armillariella mellea*. *Appl. Microbiology Biotechnology*. 26: 95-98

Santosa, U. 1996. Efek Jerami Padi yang Difermentasi oleh Jamur Tiram Putih (*Pleurotus ostreatus*) Terhadap Penggemukan Sapi Jantan Peranakan Onggle. Disertasi. Program Pascasarjana, Universitas Padjadjaran, Bandung.

Smith, L.W., H.K. Goering., D.R. Woldo and C.H. Gordon. 1970. *In vitro* Digestion Rate of Forage Cell wall Component. *Anim. Sci. Reseach Division, USDA, Betsville, Maryland*.

Steel, R.G.D. dan J.H. Torrie. 1995. Prinsip dan Prosedur Statistika. Suatu pendekatan biometrika. Alih bahasa, Bambang Sumantri. Ed. 2. PT. Gramedia Pustaka Utama, Jakarta.

Sullivan, J.T. 1965. Studies of the hemicelluloses of forage plants. *Chemist, Crops Research Division Agricultural Research Service. USDA. University Park. Pa. 16802*.

Sutardi, T. 1980. Landasan Ilmu Nutrisi. Jilid I. Departemen Ilmu Makanan Ternak, Fakultas Peternakan IPB, Bogor.

Tillman, A.P., H. Hartadi., S. Reksohadiprodjo., P. Suharto dan S. Lebdosoekojo. 1991. Ilmu Makanan Ternak Dasar. Gajah Mada University Press, Yogyakarta.

Van Soest, P.J. 1994. Nutrition Ecology of Ruminant: Ruminant Metabolisme, Nutrition strategis Decalullotic Fermentation and the Chemistry of Forage and Plant Fibers. Cornell Univ. O and B. Books, Inc. New York.

Wijono, D.B., B. Sarjono., Haryono dan D. Wibowo. 1988. Prinsip-prinsip Teknologi Fermentasi. Pusat Antar Universitas (PAU) Pangan dan Gizi, Universitas Gajah Mada, Yogyakarta.

Zadrazil, F., and R. H. Kurtz Jr. 1984. The Biology of *Pleurotus* Cultivation in The Tropics. *In: Chang. S. T., and T.H. Quimio (Editors). Tropica Mushrooms, Biological Nature and Cultivation Methods. The Chinese University Press, Hongkong. P.277-296*.