

Skrining Bakteri Kitinolitik Antagonis Terhadap Pertumbuhan Jamur Akar Putih (*Rigidoporus lignosus*) dari Rizosfir Tanaman Karet

MUHARNI DAN HARY WIDJAJANTI

Jurusan Biologi FMIPA, Universitas Sriwijaya, Sumatera Selatan, Indonesia

INTISARI: Skrining bakteri kitinolitik dari rizosfir tanaman karet dilakukan dengan tujuan untuk memperoleh isolat bakteri kitinolitik yang antagonis terhadap pertumbuhan jamur akar putih (*Rigidoporus lignosus*). Bakteri diisolasi dari Perkebunan Karet Sembawa Kab. Banyuasin, dan skrining dilakukan dengan menggunakan media agar kitin dan uji antagonis terhadap jamur patogen dilakukan dengan menggunakan metode Chernin et al., (1995). Hasil penelitian didapatkan dua isolat bakteri kitinolitik yang antagonis terhadap pertumbuhan jamur akar putih (*Rigidoporus lignosus*). Identifikasi kedua isolat antagonis jamur akar putih ini tergolong kedalam genus *Bacillus* yaitu *Bacillus* sp. dan *Bacillus apiarius*

KATA KUNCI: bakteri kitinolitik, antagonis, *Rigidoporus lignosus*

ABSTRACT: The screening of chitinolytic bacteria from rhizosphere in rubber plant was done to get isolate chitinolytic bacteria that antagonist to white root fungus (*Rigidoporus lignosus*). Bacteria were isolated from rubber plantation Sembawa Banyuasin Regency and screening was done by chitin solid media and antagonist test to pathogen fungus was done by using Chernin et al., (1995) method. The results of this research were found two isolates chitinolytic bacteria that antagonist to growing white root fungus (*Rigidoporus lignosus*). Identification both isolate antagonist to white root fungus is a member of genus *Bacillus* (*Bacillus* sp. and *Bacillus apiarius*)

KEYWORDS: bhitinolytic bacteria, antagonist, *Rigidoporus lignosus*

Januari 2011

1 PENDAHULUAN

Karet alam merupakan komoditas ekspor yang sangat penting sebagai sumber devisa Negara, dan merupakan sumber penghidupan sebagian penduduk Indonesia. Secara ekologi tanaman karet mendukung pelestarian lingkungan hidup, sumber daya alam dan keanekaragaman hayati. Di Sumatera Selatan karet merupakan komoditas ekspor utama, luas perkebunan karet mencapai 900.000 hektar, luas ini merupakan lahan karet terluas di Indonesia^[1].

Pengelolaan perkebunan karet sering mengalami kendala, terutama masalah penyakit. Penyakit tanaman karet telah menyebabkan kerugian ekonomi, tidak hanya disebabkan kehilangan produksi akibat kerusakan tanaman tetapi juga mahal biaya yang diperlukan dalam pengendaliannya. Diperkirakan kehilangan produksi setiap tahunnya akibat kerusakan oleh penyakit karet mencapai 5-15 %. Penyakit tanaman karet yang umum ditemukan pada perkebunan diantaranya adalah jamur akar putih. Penyakit jamur akar putih disebabkan oleh jamur *Rigidoporus lignosus*. Serangan jamur akar putih telah menyebabkan

kerusakan pada akar tanaman. Berdasarkan laporan semester pertama pada tahun 2006 serangan jamur akar putih di Sumatera Selatan telah mencapai 20.000 hektar dengan perkiraan kerugian hasil sebesar Rp. 7,82 milyar^[2]

Serangan jamur akar putih akan memperlihatkan gejala pada daun terlihat pucat kuning dan tepi atau ujung daun terlipat kedalam, serta kadang-kadang bunga dan buah muncul lebih awal. Pada perakaran tanaman sakit tampak benang-benang jamur berwarna putih dan agak tebal (rizomorf). Jamur kadang-kadang membentuk badan buah mirip topi berwarna jingga kekuning-kuningan pada pangkal akar tanaman^[3]. Serangan jamur akar putih pada tanaman karet menyebabkan penurunan produksi dan kualitas karet, getah yang dihasilkan lebih encer sehingga harga jualnya menjadi turun.

Pengendalian penyakit jamur akar putih selama ini dilakukan dengan pencegahan dan pengobatan baik secara mekanis maupun kimia. Pengendalian jamur *Rigidoporus lignosus* banyak menggunakan fungisida sintetik, karena dianggap lebih praktis dan cepat terlihat hasilnya. Namun demikian penggunaan bahan

kimia sering menimbulkan residu pada lingkungan dan membunuh organisme yang bukan sasaran^[4]. Oleh karena itu, upaya pengendalian yang efektif dan ramah lingkungan perlu dilakukan, salah satunya adalah dengan menggunakan bakteri kitinolitik (pendegradasi kitin) yang melibatkan enzim kitinase.

Bakteri kitinolitik adalah bakteri penghasil enzim kitinase yang berperan dalam mendegradasi kitin menjadi N-asetilglokosamin. Organisme pendegradasi kitin umumnya berasal dari kelompok mikroorganisme diantaranya adalah dari kelompok bakteri. Bakteri yang dilaporkan memiliki aktivitas kitinase seperti, *Vibrio furnissi*, *Serratia marcescens*^[5], *Bacillus circulans*^[6], *Bacillus thuringensis* subsp. pakistani^[7] dan *Pseudomonas aeruginosa*^[8].

Aktivitas kitinase dari bakteri kitinolitik sangat potensial digunakan sebagai agen pengendalian hayati terhadap jamur patogen maupun serangga hama, karena kedua organisme ini mempunyai komponen kitin pada dinding selnya. Beberapa laporan menyatakan bahwa aktivitas kitinase dari *Aeromonas caviae* efektif digunakan untuk mengontrol serangan jamur patogen *Rizoctonia solani* dan *Fusarium oxysporum* pada kapas, dan *Sclerotium rolfsii* pada buncis^[9]. Di samping itu aktivitas kitinase dari *Bacillus circulans* juga dapat menghambat pertumbuhan jamur patogen *Rizoctonia solani* dengan zona hambat sebesar 0,65 cm^[10].

Mikroorganisme yang dapat hidup pada daerah rizosfir sangat sesuai digunakan sebagai agen pengendalian hayati, mengingat bahwa rizosfir adalah daerah yang utama dimana akar tumbuhan terbuka terhadap patogen. Jika terdapat mikroorganisme antagonis pada daerah ini, patogen akan berhadapan selama menyebar dan menginfeksi akar^[11]

Bakteri penghasil kitinase merupakan salah satu kelompok mikroorganisme yang relatif mudah dikembangkan sehingga akan lebih cepat melimpah jika dikembangkan dari biosfirnya. Oleh karena itu skrining bakteri kitinolitik dari daerah perakaran (rizosfir) dan perbanyakannya yang diikuti dengan pelepasan kembali ke daerah perakaran pertanaman merupakan usaha konservasi lingkungan rizosfir yang akan memberikan prospek cerah dalam usaha pengendalian penyakit jamur akar putih tanaman secara hayati. Isolat bakteri kitinolitik rizosfir tanaman karet yang diperoleh dapat dimanfaatkan sebagai agen pengendalian hayati penyakit jamur akar putih (*Rigidoporus lignosus*) pada tanaman karet dilapangan.

2 METODE PENELITIAN

2.1 Waktu dan Tempat

Penelitian dilaksanakan mulai pada bulan Mei 2009 sampai dengan Desember 2009. Pengambilan sampel

sumber isolat bakteri kitinolitik dilakukan di perkebunan karet di Kabupaten Banyuwangi. Proses skrining bakteri kitinolitik dan uji potensi antagonisme terhadap jamur akar putih dilakukan di Laboratorium Mikrobiologi Jurusan Biologi Fakultas MIPA Universitas Sriwijaya

2.2 Bahan yang digunakan

Bahan yang diperlukan antara lain berupa sampel tanah rizosfir dari perkebunan karet sebagai sumber isolat bakteri kitinolitik. Isolat jamur akar putih (*Rigidoporus lignosus*) diperoleh dari Balai Pusat Penelitian Karet Sembawa Sumatera Selatan. Media agar kitin sebagai media isolasi, media NA sebagai media perbanyakan bakteri, media PDA sebagai media tumbuh jamur, media untuk uji fisiologis (medium *triple sugar iron agar* (TSIA), medium *simon citrat*, medium indol, medium *semi solid*, medium MR-VP broth, *Test medium*, medium *urea broth*), reagen pewarnaan Gram (Pewarna Gram A, Gram B, Gram C, dan Gram D) dan pewarna endospora (Malachite Green dan Safranin).

2.3 Cara Kerja

Pengambilan sampel tanah rizosfir tanaman karet

Sampel berupa tanah rizosfir dari sekitar akar tanaman karet diambil dari lokasi perkebunan karet di Kab. Banyuwangi. Pengambilan sampel dilakukan pada 3 titik sampling yang mewakili dan dari setiap sampling tersebut diambil sampel tanah secara aseptik sebanyak ± 100 g tanah. Masing-masing sampel dimasukkan ke dalam botol sampel yang disterilkan terlebih dahulu.

Isolasi dan Seleksi Bakteri Kitinolitik

Sampel tanah sebanyak 5 g disuspensikan dalam 45 ml larutan fisiologis steril sampai homogen dan dilakukan pengenceran sampai 10^{-6} , tiga pengenceran terakhir dicawakan pada media agar kitin dan diinkubasi selama 48 jam pada suhu ruang. Koloni yang tumbuh dan membentuk zona bening disekitar koloni merupakan isolat bakteri kitinolitik.

Isolat-isolat yang diperoleh ditumbuhkan secara serentak dengan cara ditotolkan pada media agar kitin. Setelah diinkubasi selama 48 jam pada suhu ruang, ditentukan indek kitinolitiknya yang merupakan perbandingan antara diameter zona bening dengan diameter koloni. Uji antagonisme dilakukan dengan menggunakan metode Chernin dkk.^[12] pada media PDA di dalam cawan petri. Koloni jamur diinokulasikan ditengah-tengah media, dan inokulum bakteri kitinolitik digoreskan disekitarnya dengan jarak

2 cm. Biakan diinkubasi pada suhu kamar, kemudian diamati pertumbuhan jamur patogen dengan mengukur diameter zona hambat disekitar koloni. Isolat-isolat bakteri kitinolitik yang mempunyai kemampuan menghambat pertumbuhan jamur akar putih selanjutnya akan diidentifikasi untuk mengetahui nama isolatnya..

Karakterisasi Bakteri Kitinolitik Antagonis JAP

Karakterisasi isolat bakteri termofilik penghasil kitinase meliputi, makroskopis koloni, mikroskopis sel, motilitas dan uji biokimia.

- Makroskopis koloni seperti, bentuk, elevasi dan tepian koloni.
- Mikroskopis sel seperti, bentuk sel, sifat Gram dan ada tidaknya endospora.
- Motilitas
- Uji Biokimia seperti, Hidrolisis pati, hidrolisis kasein, fermentasi glukosa, fermentasi sukrosa, fermentasi laktosa, produksi H₂S, produksi indol, produksi urease, produksi katalase, uji metil merah, uji Voges-Prokauer, uji TSIA, uji Simon's sitrat.

Identifikasi

Hasil karakterisasi dari masing-masing isolat diidentifikasi dengan menggunakan buku Bergey's Manual of Determinative Bacteriology (Buchanan, R.E. & N.E. Gibbons (CoE), 1974)

3 HASIL DAN PEMBAHASAN

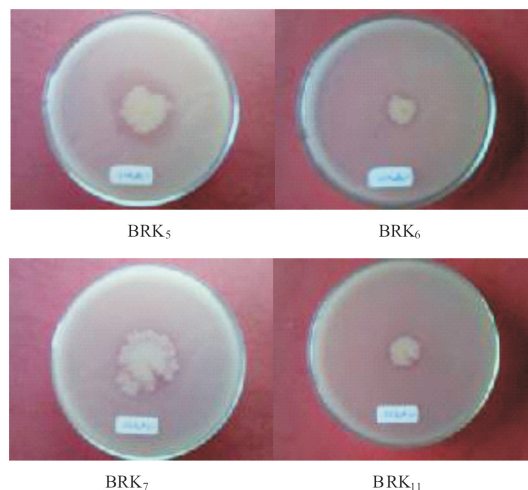
3.1 Isolasi dan Seleksi Bakteri Kitinolitik Rizosfir Tanaman Karet

Hasil isolasi dan seleksi bakteri kitinolitik dari rizosfir tanaman karet diperoleh 11 isolat bakteri kitinolitik seperti yang terdapat pada tabel 3.1 di bawah ini. Pada tabel 3.1 dapat dilihat bahwa sebanyak 11 isolat bakteri rizosfir tanaman karet yang didapatkan hanya 4 isolat yang menunjukkan adanya aktivitas kitinase, dengan indeks kitinolitik tertinggi pada isolat BRK5 sebesar 0,52 dan yang terendah adalah isolat BRK11 sebesar 0,21. Adanya aktivitas kitinase ditandai dengan terbentuknya zona bening disekitar koloni bakteri pada medium agar kitin (Gambar 3.1).

Zona bening yang terbentuk disekitar koloni disebabkan karena isolat bakteri tersebut menghasilkan enzim kitinase. Aktivitas kitinase dapat menguraikan kitin yang terdapat pada media agar, sehingga media yang berada disekitar koloni berwarna bening.

TABEL 1: Hasil seleksi bakteri kitinolitik

Kode Isolat	Aktivitas kitinase	Indeks kitinolitik
BRK ₁	-	-
BRK ₂	-	-
BRK ₃	-	-
BRK ₄	-	-
BRK ₅	+	0,52
BRK ₆	+	0,32
BRK ₇	+	0,23
BRK ₈	-	-
BRK ₉	-	-
BRK ₁₀	-	-
BRK ₁₁	+	0,21



GAMBAR 1: Aktivitas kitinase dari bakteri kitinolitik rizosfir tanaman karet

Menurut Susi^[13] kitinase merupakan metabolit yang tidak berwarna, untuk mengetahui produksi kitinase dari bakteri dapat dilihat dari warna medium menjadi transparan.

Indeks kitinolitik dari masing-masing isolat bakteri kitinolitik berbeda-beda, yang paling tinggi didapatkan pada isolat BRK5 yaitu 0,52, sedangkan yang paling rendah pada isolat BRK11 yaitu 0,21. Terjadinya perbedaan indeks kitinolitik ini disebabkan perbedaan aktivitas enzim kitinase dari masing-masing isolat bakteri. Menurut Susi (2002), besarnya zona bening yang dihasilkan tergantung pada jumlah monomer N-asetilglukosamin yang dihasilkan dari proses hidrolisis kitin dengan memutus ikatan -1,4 homopolimer N-Asetilglukosamin. Semakin besar jumlah monomer N-asetilglukosamin yang dihasilkan maka akan semakin besar zona bening yang terbentuk di sekitar koloni.

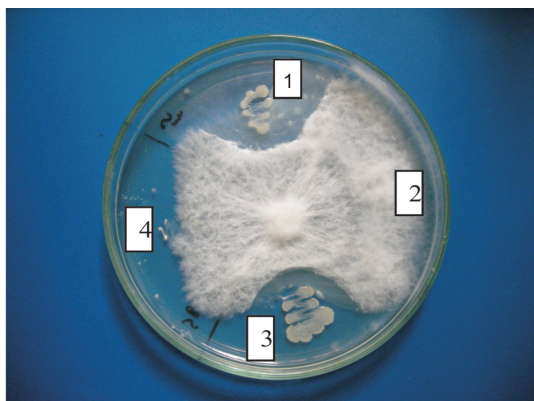
3.2 Uji Antagonis Isolat Bakteri Kitinolitik

Pengujian antagonis dari isolat bakteri kitinolitik rizosfir tanaman karet terhadap pertumbuhan jamur akar putih dilakukan pada media PDA. Hasil dari pengujian tersebut dapat dilihat pada tabel 3.2 di bawah ini.

TABEL 2: Hasil uji antagonis isolat bakteri kitinolitik terhadap JAP

Kode Isolat	Aktivitas antagonis	Zona Hambat (mm)
BRK ₅	+	5, 57
BRK ₆	-	-
BRK ₇	+	6, 12
BRK ₁₁	-	-

Dari 4 isolat yang diuji aktivitas antagonisnya terhadap pertumbuhan jamur akar putih (JAP) hanya 2 isolat yang menunjukkan adanya aktivitas antagonis terhadap JAP yaitu isolat BRK₅ dan BRK₇. Kemampuan antagonis dari bakteri kitinolitik terhadap pertumbuhan jamur akar putih ditandai dengan terhambatnya pertumbuhan jamur akar putih di sekitar koloni bakteri kitinolitik. Kemampuan masing-masing bakteri kitinolitik dalam menghambat pertumbuhan jamur akar putih dapat dilihat pada gambar 3.2 di bawah ini.



GAMBAR 2: Pengujian antagonis isolat bakteri kitinolitik terhadap pertumbuhan jamur akar putih

Keterangan : 1.BRK₅, 2.BRK₆, 3.BRK₇, 4.BRK₁₁

Kemampuan isolat bakteri kitinolitik dalam menghambat pertumbuhan jamur akar putih disebabkan aktivitas enzim kitinase yang dihasilkan oleh isolat tersebut. Aktivitas kitinase dapat mendegradasi dinding sel jamur, karena jamur memiliki kitin pada dinding selnya. Gooday^[14] menyatakan, aktivitas kitinase dapat digunakan sebagai agen biokontrol jamur patogen karena dapat mendegradasi dinding sel jamur yang terdiri dari kitin

Isolat bakteri kitinolitik BRK₆ dan BRK₁₁ tidak menunjukkan adanya sifat antagonis terhadap JAP, karena tidak dapat menghambat pertumbuhan jamur akar putih (*Rigidoporus lignosus*). Hal ini mungkin disebabkan perbedaan jenis kitinase yang dihasilkan oleh masing-masing isolat tersebut. Toharisman^[15] menyatakan, berbagai organisme menghasilkan aneka jenis kitinase dengan spesifitas terhadap substrat yang bervariasi, juga karakteristik yang berlainan. Bakteri menghasilkan kitinase sebagai sarana memperoleh nutrisi dan agen parasitisme, sementara fungi, protozoa dan invertebrata menghasilkan enzim tersebut untuk proses morfogenesis. Tanaman menghasilkan kitinase untuk mempertahankan diri dari serangan patogen. *Baculovirus* yang biasa dimanfaatkan untuk kontrol hama serangga juga menghasilkan kitinase bagi patogenitas. Disamping itu kitinase dilaporkan juga dihasilkan oleh darah manusia, dan diduga terlibat dalam pertahanan diri terhadap fungsi patogen.

3.3 Karakteristik Isolat Bakteri Kitinolitik Antagonis Jamur Akar Putih

Karakterisasi isolat bakteri kitinolitik rizosfir tanaman karet yang antagonis terhadap pertumbuhan jamur akar putih (*Rigidoporus lignosus*) dilakukan berdasarkan morfologi koloni (makroskopis koloni), mikroskopis sel, motilitas dan uji biokimia, hasil karakterisasi dari isolat tersebut dapat dilihat pada tabel 3.3 di bawah ini.

Kedua isolat bakteri kitinolitik yang antagonis terhadap JAP tergolong kedalam genus *Bacillus*, hal ini ditandai dengan sel berbentuk batang, Gram positif dan menghasilkan endospora. Menurut Buchanan & Gibbon^[16], *Bacillus* memiliki bentuk batang atau hampir lurus $0,3 - 2,2 \mu\text{m} \times 1,2 - 7 \mu\text{m}$, Gram positif dan mampu membentuk endospora.

Kedua jenis bakteri ini sangat berpotensi digunakan sebagai agen pengendalian penyakit tanaman yang disebabkan oleh jamur, karena genus *Bacillus* banyak yang berperan sebagai biofungisida. Tombe dkk.^[17] menyatakan, *Bacillus* banyak digunakan sebagai biodekomposer limbah organik dan biofungisida untuk pengendalian patogen tanaman seperti *Bacillus subtilis* dan *Bacillus pantothenicus*.

4 SIMPULAN

Penelitian yang telah dilakukan tentang skrining bakteri kitinolitik rizosfir tanaman karet yang antagonis terhadap pertumbuhan jamur akar putih dapat disimpulkan bahwa :

1. Isolasi bakteri kitinolitik dari rizosfir tanaman karet diperoleh sebanyak 4 isolat, namun hanya 2 isolat yang antagonis terhadap pertumbuhan jamur akar putih (*Rigidoporus lignosus*)

TABEL 3: Hasil karakterisasi isolat bakteri kitinolitik rizosfir tanaman karet yang antagonis terhadap pertumbuhan JAP

Karakter Isolat	Isolat BRK ₅	Isolat BRK ₇
Makroskopis koloni	Irregular, entire raised, opaque	Circular, Serrate, raised, opaque
Mikroskopis Sel	Sel berbentuk batang, Gram positif, menghasilkan endospora	Sel berbentuk batang, Gram positif, menghasilkan endospora
Motilitas	Nonmotil	Motil
Uji Biokimia		
- Hidrolisis pati	Positif	Positif
- Hidrolisis lemak	Negatif	Positif
- Hidrolisis kasein	Positif	Positif
- Hidrolisis gelatin	Positif	Positif
- Fermentasi glukosa	Positif	Positif
- Fermentasi sukrosa	Positif	Negatif
- Fermentasi laktosa	Negatif	Negatif
- Produksi H ₂ S	Negatif	Negatif
- Produksi Indol	Negatif	Negatif
- Produksi Urease	Positif	Negatif
- Produksi Katalase	Positif	Positif
- Uji metil merah	Positif	Positif
- Uji Voges-Proskauer	Negatif	Positif
- Uji TSI	Positif	Positif
- Uji Simmon's sitrat	Negatif	Negatif
- Reduksi nitrat	Positif	Positif
Nama	<i>Bacillus</i> sp.	<i>Bacillus apiarius</i>

2. Hasil karakterisasi diketahui kedua isolat antagonis jamur akar putih ini tergolong kedalam genus *Bacillus* yaitu *Bacillus* sp dan *Bacillus apiarius*

DAFTAR PUSTAKA

- [1] Anonimus, 2006, *Strategi Pengelolaan Penyakit Tanaman Karet Untuk Mempertahankan Potensi Produksi Mendukung Industri Perkebunan Indonesia Tahun 2020*, Pusat Penelitian Karet, Balai Penelitian Sembawa, Palembang
- [2] Anonimus, 2007, *Pengendalian Penyakit Jamur Akar Putih (*Rigidoporus lignosus*) Pada Tanaman Karet Di sentra Pengembangan Karet (Propinsi Sumatera Selatan dan Kalimantan Barat)*, Ditjen Perkebunan
- [3] Anwar, C., 2006, *Majemen dan Teknologi Budidaya Karet, Makalah Pelatihan*, Pusat Penelitian Karet, Medan
- [4] Untung, K., 1996, *Pengantar Pengelolaan Hama Terpadu*, Gajah Mada University Press, Yogyakarta
- [5] Suzuki, K., N. Taiyoji, N. Sugawara, B. Nikaidou, Henrissat and T. Watanabe, 1999, The Third Chitinase gene (*chi C*) of *Serratia marcescens* 2170 and the Relationship of its Product to Other Bacterial Chitinases, *Biochem. J.*, 343: 587 - 596
- [6] Watanabe, A., V.H. Nong, D. Zhang, M. Arahira, N.A. Yeboah, K. Udaka, and C. Fukazawa, 1999, Molecular Cloning and Ethylene Inducible Expression of Chi b1 Chitinase from Soybean (*Glycine max* L.), *Biosci Biotech Biochem.*, 63 : 251- 256
- [7] Thamthiankul, S., S. Suan-Ngay, and S. Tantimavanich, 2001, Chitinase from *Bacillus thuringiensis* subsp. Pakistani, *Journal of Appl Microbiol Biotechnol*, 56 : 395 - 401
- [8] Folders, J., J. Algra, M.C. Roelofs, C.L. Leendert, J. Tommassen, and W. Bitter, 2001, Characterization of *Pseudomonas aeruginosa* Chitinase a Gradually Secreted Protein, *J. Bacteriology*, 183 : 7044-7052
- [9] Panda, F.T., 1999, Regulation and Cloning of Microbial Chitinase Genes, *Appl. Microbiol Biotechnol*, 51 : 141 - 151
- [10] Muharni dan E. Nurnawati, 2007, Pengujian Aktivitas Kitinase *Bacillus circulans* Untuk Dikembangkan Sebagai Agen Biokontrol Pada Penyakit Tanaman, *Jurnal Penelitian Sains*, 1 : 144 - 150
- [11] Hasanuddin, 2003, Peningkatan Peranan Mikroorganisme Dalam Sistem Pengendalian Penyakit Tumbuhan Secara Terpadu, *Makalah*, Jurusan HPT Pertanian USU
- [12] Chernin, L.Z., Ismailov, S. Haran, and I. Chet, 1995, *Chitinolytic Enterobacter agglomerans* antagonistic to Fungal Plant Patogens, *Appl Environ Microbiol*, 61 : 1720 - 1726
- [13] Susi, 2002, Isolasi Kitinase dari *Scleroderma columnae* dan *Trichoderma harzianum*, *Jurnal Ilmu Dasar*, 3(1) : 30 - 35
- [14] Holetz, F.B., G. L. Pessini, N.R. Sanchez, D. Aparicio, G. Cortez, C.V. Nakamura, & B.P.D. Filho, 2002, Screening of Some Plants Used in The Brazillian Folk Medicine for The Treatment of Infectious I, *Journal of Bioline International*, <http://www.bioline-org.br/request?02229>

- [15] Toharisman, A., 2007, Peluang Pemanfaatan Enzim Kitinase Di Industri Gula, *Makalah*, P3GI
- [16] Buchanan, R.E. & N.E. Gibbons (CoE), 1974, *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*, 8th Ed., S.T. Cowan, J.G. Holt, J. Liston, R.G.E. Murray, C.F. Niven, A.W. Ravin & R.Y. Stanier (Eds.), Baltimore
- [17] Tombe M., G. Purnayasa, D. Wahyuno, Sugeng dan Zulhisnain, 2002, Uji Pengendalian Busuk Akar Jambu Mete dengan Kompos, Pestisida Nabati dan Agen Hayati, *Laporan Hasil Penelitian Proyek HPT*, Badan Litbang Pertanian
-