

Isolasi dan Identifikasi *Agrobacterium Tumefaciens* pada Tanaman Mawar (*Rosa sp.*).

NADIAH SILITONGA
I GEDE PUTU WIRAWAN*)
I GEDE KETUT SUSRAMA

Program Study Agroekoteknologi, Fakultas Pertanian, Universitas Udayana
Jl. PB. Sudirman Denpasar 80362 Bali
*) E-mail: putu_wirawan@unud.ac.id

ABSTRACT

Isolation and Identification of *Agrobacterium tumefaciens* At Plant roses (*Rosa sp.*).

Agrobacterium tumefaciens caused crown gall tumor in many of dicotyledonous plants. The purpose of this study tried to isolate and identify the *A. tumefaciens* from rose plant. Various techniques were used such as selection media, colonies shape and color, Koch's postulate test, DNA isolation and agarose gel elektroforesis.

The results of this study showed that *A. tumefaciens* can be isolated through culturing in LB medium and selection AB medium that was specific for *A. tumefaciens*. The isolate caused crown gall tumor on carrot slice 3 weeks after inoculation by using a modified Koch's postulate test. The characteristics of colony formed in this research are round shaped, cream coloured with pink tint, smooth edge, and convex elevation. DNA isolation and its running in agarose gel elektroforesis showed positive result.

Key words : *Agrobacterium tumefaciens*, AB medium and Agarose gel elektroforesis.

1. Pendahuluan

1.1 Latar Belakang

Mawar merupakan salah satu tanaman hias paling dikenal dan disukai orang sebagai tanaman hias dan bunga potong. Tanaman mawar digemari karena bunganya yang cantik, warnanya yang semarak dan baunya harum. Mawar juga sering disebut tanaman hias pioner karena sudah dibudidayakan sejak berabad-abad silam. Spesies mawar umumnya merupakan tanaman semak yang berduri yang tingginya bisa mencapai 2 sampai 5 meter. Bunga mawar dikenal mempunyai banyak spesies sehingga disebutlah dengan Rosaceae atau keluarga mawar mawaran (Rukmana, 1995).

Penemuan gen sebagai substansi penentu sifat, diikuti dengan penemuan teknik isolasi gen, transfer gen, dan pengeksresiannya pada sel lain memberikan alternatif baru dalam peningkatan kualitas tanaman melalui bioteknologi (Suwanto 1998). Bioteknologi menyediakan suatu pendekatan baru untuk mengembangkan varietas – varietas baru dengan produksi yang lebih tinggi dan lebih bergizi, lebih tahan

terhadap serangan hama dan penyakit, serta lebih tahan terhadap keadaan yang merugikan, atau mengurangi kebutuhan terhadap pupuk dan bahan – bahan kimia lainnya. Aplikasi bioteknologi memungkinkan penyisipan gen-gen penting saja, sedangkan sifat baik yang telah ada dibiarkan tidak berubah. Menurut Tjokrokusumo (2003), bahwa munculnya ilmu bioteknologi tanaman memberikan kontribusi yang besar kepada manusia dalam memproduksi pangan dan industri pertanian melalui perbaikan tanaman atau pemuliaan tanaman, terutama dalam hal rekayasa genetika atau teknologi transformasi gen.

Tanaman transgenik pada umumnya dibuat dengan cara memasukkan gen yang diinginkan (*gene of interest*) kepada tanaman tertentu (padi, jagung, tomat, kedelai, dan lain-lain). Memasukkan suatu gen ke dalam tanaman bukanlah serta merta seperti menyuntikkan obat kepada orang yang sakit, namun memerlukan perantara. Salah satu perantaranya adalah *Agrobacterium*, yaitu bakteri tanah yang menyebabkan tumor pada tanaman. Meskipun ada banyak galur *Agrobacterium*, sampai saat ini hanya *A. tumefaciens* yang digunakan untuk perantara transfer gen pada tanaman.

A. tumefaciens adalah bakteri patogen pada tanaman yang banyak digunakan untuk memasukkan gen asing ke dalam sel tanaman untuk menghasilkan suatu tanaman transgenik. Secara alami, *A. tumefaciens* dapat menginfeksi tanaman dikotil melalui bagian tanaman yang terluka sehingga menyebabkan tumor (*crown gall*). Bakteri yang tergolong ke dalam gram negatif ini memiliki sebuah plasmid besar yang disebut plasmid-Ti yang berisi gen penyandi faktor virulensi penyebab infeksi bakteri ini pada tanaman. Untuk memulai pembentukan tumor, *A. tumefaciens* harus menempel terlebih dahulu pada permukaan sel inang dengan memanfaatkan polisakarida yang akan digunakan untuk mengkolonisi atau menguasai sel tanaman.

1.2 Rumusan Masalah

1.2.1 Bagaimana cara mengisolasi dan mengidentifikasi *A. tumefaciens* penyebab Tumor Crown Gall pada tanaman mawar secara molekuler?

1.2.2 Bagaimana cara mengkultur strain *A. tumefaciens* dari tanaman mawar tersebut pada media kultur bakteri dan media seleksi *A. tumefaciens*?

1.3 Tujuan Penelitian

Adapun tujuan dari penelitian ini untuk mengidentifikasi *A. tumefaciens* penyebab *Crown Gall* pada tanaman mawar dengan menggunakan media seleksi dan Uji Postulat Koch.

1.4 Manfaat Penelitian

Manfaat yang diharapkan dari penelitian ini adalah dapat menemukan metode deteksi awal infeksi *A. tumefaciens* pada tanaman mawar, serta dapat mengetahui cara mengidentifikasi *A. tumefaciens* dan sebagai bahan informasi dalam

mengisolasi dan mengidentifikasi *A. tumefaciens* pada tanaman mawar secara molekuler.

1.5 Hipotesis Penelitian

Adapun hipotesis penelitian ini yaitu *Agrobacterium tumefaciens* dari tanaman mawar yang menunjukkan gejala crown gall dapat diisolasi dan diidentifikasi dengan media seleksi dan Uji Postulat Koch.

2. Metode Penelitian

2.1 Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian dilaksanakan di Laboratorium Sumber Daya Genetika dan Biologi Molekuler, Universitas Udayana, Denpasar. Penelitian ini dilaksanakan sejak bulan Juli 2013 sampai bulan Januari 2014.

2.2 Bahan dan Alat Penelitian

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah batang dan akar tanaman mawar yang menunjukkan gejala crown gall, aquades, alkohol 70%, agar. tryptone, yeast extract, NaCl, 1N NaOH, DNA NucleoSpin Tissue kit, Loading buffer dan Etidium bromida (EtBr).

Alat yang digunakan adalah *laminar air flow*, jarum ose, cawan petri, pinset, tusuk gigi, autoclave, *shaker incubator*, sentrifuse berpendingin, inkubator, mikrotube, refrigerator, timbangan digital, *freezer*, pipet mikro, perangkat elektroforesis, gel doc, sarung tangan, dan peralatan gelas berbagai ukuran yang umum digunakan di laboratorium.

2.3 Pelaksanaan Penelitian

2.3.1 Pembuatan Media.

Media yang digunakan adalah Media Luria Bertani (LB) Broth. Pembuatan Media Luria Bertani (LB) Broth dibuat dengan melarutkan 5 gram yeast ekstrak, 5 gram NaCl, 10 gram trypton dan 1 ml 1 N NaOH dalam 1 L aquades dalam erlenmeyer kemudian diaduk hingga homogen lalu tuangkan kedalam botol simpan didalam freezer pada suhu -20.

2.3.2 Pengumpulan Sampel.

Pengumpulan sampel dilakukan disekitar daerah Denpasar dengan mencari tanaman mawar yang ada gall atau terinfeksi *Agrobacterium tumefaciens*. Sampel dicuci bersih, dibilas dengan aquades steril dan dengan alkohol 70%. Kemudian potong kecil-kecil lalu di kultur pada media LB.

2.3.3 Kultur *A. tumefaciens*.

Kultur akar dan batang tanaman mawar yang terinfeksi *Agrobacterium* ditumbuhkan pada media LB padat didalam inkubator pada suhu 28 °C selama 2 hari.

Kemudian dilakukan subkultur bakteri pada media LB padat baru, di simpan didalam inkubator pada suhu 28°C selama 24 jam. Koloni bakteri diambil dari cawan petri dan ditumbuhkan pada 3 ml LB cair. Bakteri diinkubasi pada suhu 28 °C di shaker 150rpm dalam keadaan gelap selama satu malam dengan penggoyangan 150 rpm.

2.3.4 Media seleksi *A. tumefaciens*.

Bakteri yang tumbuh pada media LB kemudian dikultur pada media seleksi AB (3 g K₂HPO₄ + 1 g NaH₂PO₄ + 0.3 g MgSO₄ 7H₂O + 0.15 g KCL + 0.01 g CaCl₂ + 2.5 mg FeSO₄ 7H₂O + 5 g glucose). Kultur diinkubasi pada ruang kultur dengan suhu 28°C dengan fotoperiodisitas cahaya 16 jam terang/8 jam gelap dan dibiarkan tumbuh selama 24 jam. Sel kemudian di panen dan disuspensikan dalam medium inokulasi cair.

2.3.5 Uji postulat Koch.

Uji postulat Koch digunakan untuk mengkonfirmasi apakah bakteri patogen berhasil diisolasi dari tanaman mawar yang bergejala crown gall pada bagian batang dan akar tanaman mampu menginfeksi kembali tanaman yang sehat dengan gejala yang sama. Tanaman yang digunakan untuk inokulasi yaitu tanaman wortel yang sehat. Pertama, cuci bersih umbi wortel lalu bilas dengan alkohol 70%. Kemudian, potong umbi wortel dengan tebal 1,0 x 1,5 cm. Kedua, koloni tunggal *A. tumefaciens* hasil pemurnian terakhir diinokulasi pada irisan wortel dengan cara mengoleskan secara merata diatas dan dibawah permukaan irisan wortel menggunakan tusuk gigi steril dan dilakukan di dalam Laminar Air Flow (LAF). Untuk Kontrol hanya mengoleskan aquades tanpa diolesi *A. tumefaciens* pada irisan wortel. Tiga irisan yang sudah diinokulasi, diletakkan dalam cawan petri, ditutup dengan kertas parafilm lalu disimpan didalam inkubator pada suhu 28 °C. Kemudian diamati pertumbuhan pembentukan gall pada permukaan irisan yang diinokulasi setelah 14 hari.

2.3.6 Isolasi Total DNA.

Isolasi Total DNA menggunakan DNA *Nucleospin tissue kit* (Macherey-Nagel). Tahapan isolasi DNA sesuai dengan standar protokol dari produk tersebut. Isolasi DNA dilakukan dengan bakteri dikultivasi ke media LB cair 3 ml dengan cara memindahkan 1 koloni bakteri ke media LB cair. Inkubasi dilakukan pada shaker dengan kecepatan rotasi 150 rpm pada suhu 37 C selama 24 jam (semalam). Sebanyak 1,5 ml bakteri yang berhasil tumbuh dipindahkan ke dalam eppendorf tube, lalu disentrifugasi 5000 rpm selama 5 menit, dan supernatannya dibuang.

Pada pellet bakteri ditambahkan 200 µl buffer T1 dan bakterinya disuspensi, lalu ditambahkan 25 µl proitenase K dan 200 µl buffer T3 dan diinkubasi pada suhu 70 selama 10-15 menit. Kemudian ditambahkan 210 µl etanol (96%) dan divortex. NucleoSpin Tissue Column ditempatkan pada Collection tube, lalu sampel dituangkan ke dalam column dan disentrifugasi selama 2 menit dengan kecepatan 12000 rpm. Kemudian cairan yang ada di collection tube dibuang. Column

diletakkan kembali pada collection tube. Ditambahkan 500 μ l buffer BW dan disentrifugasi lagi selama 2 menit pada kecepatan 12000 rpm. Cairan yang ada pada collection tube dibuang, dan column ditempatkan lagi pada collection tube.

Selanjutnya sebanyak 600 μ l buffer B5 dituangkan ke dalam column dan disentrifugasi selama 2 menit dengan kecepatan 12000 rpm. Cairan yang di collection tube dibuang kembali dan column diletakkan lagi pada collection tube. NucleoSpin Tissue column diletakkan pada 1,5 ml eppendorf tube yang baru, ditambahkan 100 μ l prewarmed buffer BE dan diinkubasikan selama 1 menit pada suhu ruangan, lalu disentrifugasi selama 2 Menit pada 12000 rpm. Cairan yang keluar dari column adalah cairan DNA dan disimpan didalam freezer pada suhu -20°C .

2.3.7 Elektroforesis Gel Agarosa DNA Template.

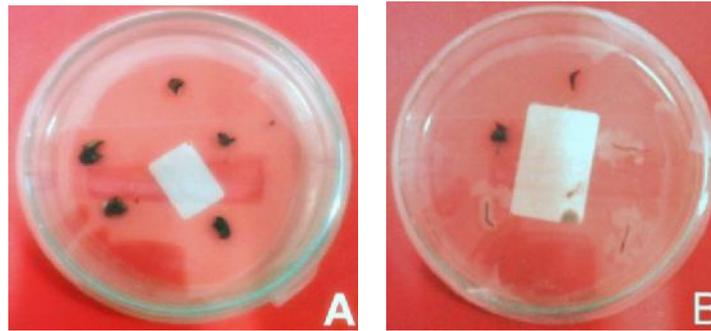
Gel agarosa terdiri dari 1% agarose dilarutkan dalam 100 ml TAE *buffer* (terdiri dari 40 mM tris asetat Ph 7,9 dan 2 mM Sodium EDTA), dimasukkan ke dalam oven selama 15 menit dengan suhu 150°C kemudian larutan dituang ke dalam baki agarosa, lalu sisir di pasang pada baki agarosa. Setelah gel padat, sisir dicabut hingga terbentuk well (lubang sisir) pada gel agarosa. Gel agarosa tersebut beserta bakinya dimasukan ke dalam alat elektroforesis, ditambahkan TAE buffer hingga lubang well tertutupi.

Kedalam setiap sumur (*well*) gel agarosa, dimasukkan 10 μ l sampel DNA dan 10 μ l *loading dye* ke dalam sumuran gel agarosa dengan cara mencampurkan kedua bahan tersebut terlebih dahulu secara merata pada kertas parafilm menggunakan mikropipet. Kemudian gel agarose di elektroforesis pada 100 volt selama 30 menit. Setelah selesai di elektroforesis, gel agarosa diangkat dari baki agarosa dan direndam dalam larutan Etidium Bromida selama ± 15 menit. Kemudian hasil elektroforesis divisualisasikan dengan UV transiluminator untuk melihat posisi pita (*band*) DNA dari tiap sampel dan didokumentasikan.

3. Hasil dan Pembahasan

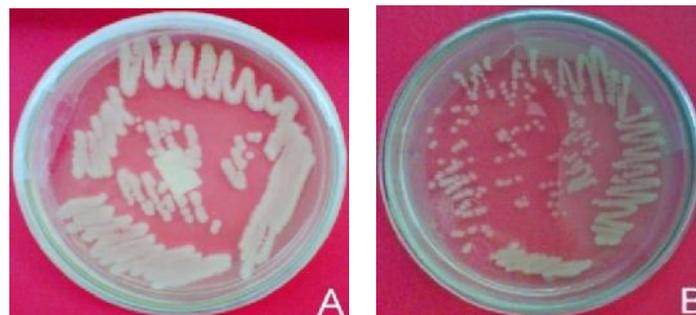
3.1 Isolasi bakteri pada media Luria Bertani (LB).

Pada penelitian ini, kultur *A. tumefaciens* menggunakan sampel tanaman mawar yang menunjukkan gejala crown gall pada bagian batang dan akar tanaman. Sampel yang diambil ditemukan di pekarangan rumah di jalan tukad irawadi, Denpasar selatan. Permukaan sampel dibersihkan, dibilas dengan aquades steril dan disterilkan dengan alkohol 70%. Kemudian dipotong kecil-kecil lalu dikultur pada media LB padat. Dapat dilihat pada gambar 1 Kultur bakteri pada media LB. Menurut Dewi (2008), isolasi bakteri merupakan pengambilan atau memindahkan mikroba dari lingkungannya di alam dan menumbuhkannya sebagai biakan murni dalam medium buatan.



Gambar 1. Kultur bakteri pada media LB (A) kultur batang tanaman mawar, (B) kultur akar tanaman mawar.

Bakteri yang tumbuh pada media LB terdapat berbagai jenis bakteri. Koloni bakteri tunggal yang tumbuh kemudian dipindahkan ke media selanjutnya agar didapatkan bakteri yang diinginkan atau biakan murni. Pada suhu 28°C selama 48 jam bakteri diinkubasi, hasilnya tumbuh koloni bakteri tunggal dan tumbuh koloni bakteri secara mengelempok pada titik biakkan dan alur goresan terakhir. Koloni bakteri pada sampel akar lebih banyak dibandingkan sampel batang. Hasil kultur bakteri pada media LB seperti pada gambar 2.

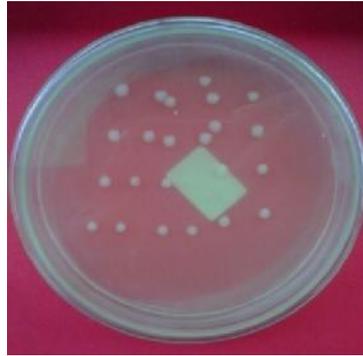


Gambar 2 Hasil kultur bakteri menggunakan metode penggoresan pada media LB (A) Bakteri yang di isolasi dari batang, (B) Bakteri yang di isolasi dari akar.

Pada penelitian ini peneliti hanya melakukan pemurnian bakteri pada hasil subkultur akar tanaman mawar karena koloni bakteri tunggal pada subkultur akar tanaman mawar hasilnya lebih banyak dibandingkan koloni bakteri tunggal subkultur batang tanaman mawar. Hasil pemurnian setelah diinkubasi selama 24 jam pada suhu 28°C didapat 23 koloni bakteri tunggal yang tumbuh. Pemurnian isolat ini dimaksudkan untuk mendapatkan biakan murni. Menurut Lay (1994) menyatakan bahwa biakan murni merupakan biakan yang hanya mengandung satu jenis bakteri.

Menurut Pradhika (2008), koloni bakteri memiliki ciri-ciri yang berbeda, tergantung jenisnya dan mediumnya. Morfologi koloni bakteri dapat dibedakan berdasarkan ukuran, pigmentasi, form, margin dan elevasi. Koloni bakteri tunggal yang tumbuh pada media LB hasil pemurnian memiliki ciri-ciri ukurannya moderat atau sedang, memiliki pigmentasi koloni berwarna krem, yang berbentuk bulat

dengan garis pinggir rata. Bakteri yang tumbuh pada media LB ini memiliki elevasi cembung. Hasil pemurnian pada media LB tertera pada gambar 3.



Gambar 3. Hasil pemurnian bakteri pada media LB padat.

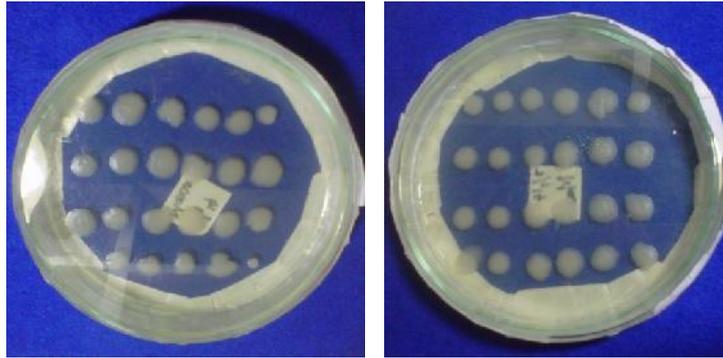
3.2 Isolasi bakteri pada media seleksi AB

Hasil subkultur bakteri pada media LB yang berhasil ditumbuhkan pada media AB pada suhu 28°C selama 96 jam dapat dilihat pada gambar 4. Pada hasil pengamatan yang telah dilakukan dalam penelitian ini, dapat diamati pada gambar 4 bakteri dari media LB yang telah diisolasi dan di inkubasi dalam media AB telah menunjukkan reaksinya yaitu dengan tumbuhnya koloni bakteri. Dengan tumbuhnya koloni bakteri pada media AB tersebut membuktikan bahwa bakteri yang tumbuh adalah *Agrobacterium*.



Gambar 3. Pertumbuhan koloni *Agrobacterium* pada media AB pada suhu 28°C selama 96 jam

Pada media seleksi AB koloni bakteri tunggal yang tumbuh dapat diidentifikasi morfologinya. Pada hasil subkultur koloni tunggal bakteri diidentifikasi memiliki ciri-ciri ukurannya kecil, memiliki pigmentasi koloni berwarna krem ada nuansa merah muda, berbentuk bulat dengan garis pinggir yang rata. Bakteri yang tumbuh pada media AB ini memiliki elevasi rata dan tipis. Perbanyakkan bakteri dilakukan dengan melakukan pemurnian isolat bakteri dari media AB ke media LB. Hasil pemurnian tersebut dapat dilihat pada gambar 5.

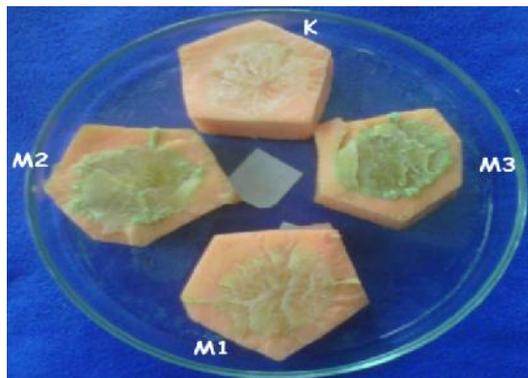


Gambar 5. Isolat *Agrobacterium* dari tanaman mawar pada media LB.

Agrobacterium yang tumbuh pada media LB setelah dikultur pada media seleksi AB didapat 48 koloni bakteri tunggal yang tumbuh dan memiliki ciri-ciri ukurannya yang membesar, memiliki pigmentasi koloni berwarna krem bernuansa merah muda, yang berbentuk bulat dengan garis pinggir rata dan memiliki elevasi cembung. Menurut Rini (2012), kumpulan bakteri *A. tumefaciens* biasanya berbentuk cembung, bulat, lembut, tak berpigmen, dan berwarna pink.

3.3 Uji postulat Koch.

Hasil Uji postulat Koch dapat dilihat pada gambar 6.

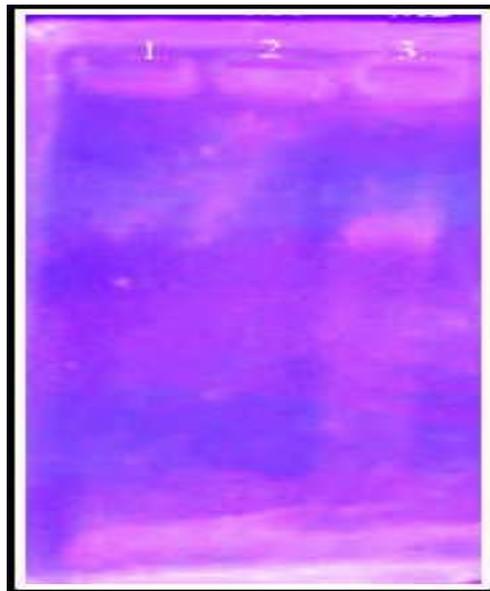


Gambar 6. Gejala *crown gall* hasil inokulasi isolat pada irisan wortel minggu ke-3.

Pada gambar 6, terlihat bahwa isolat yang diinokulasikan pada irisan wortel M1, M2, M3 menunjukkan gejala *crown gall*. Wortel yang terinfeksi mulai dari minggu kedua yakni warna wortel mulai memucat dan muncul bintik-bintik kecil berwarna putih kehijauan. Gejala yang muncul setelah tiga minggu adalah bintik-bintik kecil tersebut tumbuh menjadi lebih besar menjadi *gall* yang berwarna hijau muda. Gejala yang tampak pada gambar 6 tersebut menunjukkan infeksi dari *A. tumefaciens*. Kondisi ini berbeda dengan kontrol (K) yang tidak diolesi dengan isolat *A. tumefaciens*, seperti terlihat pada gambar 6, tidak menunjukkan gejala tumor dari minggu pertama hingga minggu ketiga.

3.4 Hasil isolasi Total DNA dengan elektroforesis gel agarose.

Isolasi Total DNA pada dasarnya dapat dilakukan dengan merusak dinding dan membran sel dan juga membran inti. Isolasi Total DNA dilakukan dengan kit isolasi total DNA yaitu DNA NucleoSpin Tissue. DNA NucleoSpin Tissue merupakan kit khusus untuk bakteri gram negatif. Adapun hasil dari isolasi total DNA dalam visualisasi yang diperoleh menggunakan elektroforesis gel agarosa dapat dilihat pada gambar 7.



Gambar 7. Visualisasi hasil isolasi total DNA pada elektroforesis Gel Agarosa.

Pada hasil elektroforesis seperti terlihat pada gambar 7, sampel dari tanaman mawar adalah sampel pada sumur 1, 2, dan 3. Pita (fragmen) total DNA yang diisolasi dari *A. tumefaciens* menunjukkan pita yang jelas pada urutan sumur ke 3, tetapi kurang jelas pada urutan sumur ke 1 dan ke 2. Berdasarkan hasil penelitian ini, maka dapat dinyatakan bahwa isolasi total DNA berhasil untuk total DNA yang di running pada sumuran ke 3. Ada beberapa kemungkinan yang menyebabkan pita-pita DNA tidak terbentuk seperti seharusnya, diantaranya adalah DNA yang dimasukkan kedalam sumur dengan tidak hati-hati sehingga DNA hilang karena larut. Perendaman yang terlalu lama pada buffer TAE dengan alat elektroforesis menyebabkan DNA tidak berada didalam gel agarosa. DNA terus menembus gel tersebut hingga keluar dari gel. Akibatnya tidak ada satu pun garis cahaya yang muncul pada gel. Setiap DNA tersebut mempunyai ukuran berbeda-beda sehingga kecepatan migrasinya juga berbeda. Hal tersebut menyebabkan letak DNA tersebut berurutan sesuai dengan kecepatan laju migrasinya (Sambrook & Russel, 2001). Berdasarkan hasil penelitian ini, maka dapat dinyatakan bahwa isolat yang digunakan untuk isolasi total DNA ini adalah bakteri gram negatif karena pita (*band*) Total DNA muncul pada gel elektroforesis.

4. Kesimpulan dan saran

4.1. Kesimpulan

Berdasarkan penelitian yang telah dilaksanakan dapat ditarik kesimpulan bahwa :

1. *Agrobacterium tumefaciens* bisa di isolasi dengan media seleksi AB.
2. Gall yang terbentuk pada irisan wortel dalam uji postulat Koch menunjukkan bahwa isolat yang dihasilkan adalah *Agrobacterium tumefaciens*.
3. Koloni strain *A. tumefaciens* pada media LB berbentuk bulat, berwarna krem bernuansa merah muda, memiliki garis pinggir rata dan elevasinya cembung.
4. Total DNA strain *A. tumefaciens* akar tanaman mawar berhasil di isolasi.

4.2 Saran

Perlu dilakukan penelitian lebih lanjut dengan melakukan teknik PCR (*Polymerase chain reaction*) dan menentukan strain dari *Agrobacterium tumefaciens* yang diisolasi.

Daftar pustaka

- Dewi, I. M. (2008). *Isolasi Bakteri dan Uji Aktifitas Kitinase Termofilik Kasar dari Sumber Air Panas Tinggi Raja, Simalungun, Sumatera Utara*. Tesis. Sekolah Pascasarjana Universitas Sumatera Utara, Medan.
- Lay, W.B. (1994). *Analisa Mikroba di Laboratorium*. Edisi I. Jakarta : PT.Raja Grafindo Persada.
- Pradhika, E.I. 2008. MIKRO-BA NGET: Bab 4. Isolasi Mikroorganisme. [terhubung berkala] <http://ekmon-saurus.blogspot.com> (Diakses tanggal 10 Februari 2014).
- Putri, Rini. 2012. Macam-macam Bakteri yang Merugikan dan Menguntungkan. [terhubung berkala 1 April 2014] <http://rinclove.blogspot.com/2012/03/macam-macam-bakteri-yang-merugikan-dan.html>
- Rukmana, Rahmat. (1995). *Mawar*. Yogyakarta: Penerbit Kanisius.
- Sambrook J, Russel DW . 2001 . *Ed. Molecular Cloning: A Laboratory Manual 3rd Ed.* New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Suwanto, A. (1998). *Bioteknologi molekuler: Mengoptimalkan manfaat kegunaan hayati melalui teknologi DNA rekombinan (in Indonesian)*. Bogor: IPB.
- Tjokrokusumo, D. (2003). Penerapan Kultur Sel dan Jaringan Tanaman dalam Industri Pertanian. *Jurnal Sains dan Teknologi Indonesia* 2 (1): 72-80. , 2 (1): 72-80.