

PENGAMATAN INFEKSI JAMUR PATOGEN SERANGGA
Metarhizium anisopliae (Metsch. Sorokin) PADA WERENG COKLAT
[Observation on Infection of Fungus Entomopathogen
Metarhizium anisopliae (Metsch. Sorokin) on Brown Plant Hopper]

Y Suryadi^{1H} dan Triny S Kadir²

¹Peneliti Fitopatologi

Balai Besar Penelitian dan Pengembangan
Bioteknologi dan Sumberdaya Genetik Pertanian (BB-Biogen)
Badan Penelitian dan Pengembangan Pertanian, Bogor

²Peneliti Hama Penyakit

Balai Besar Penelitian dan Pengembangan Padi (BB Padi)
Badan Penelitian dan Pengembangan Pertanian, Sukamandi

ABSTRACT

Observation on infection of fungus entomopathogen *Metarhizium anisopliae* on insect brown plant hopper was carried out using scanning electron microscope (SEM). The infection of *M. anisopliae* on insect bodies was shown by conidia sporulation on divergent chain with conidia size of 1.6 x 7.8 µm. Based upon SEM observation, the results revealed that fungus hyphae of *M. anisopliae* was found on insect body i.e. on cuticle as well as on segment between abdomen, legs and insect facet eyes. In epizootic condition, the cadavers were shown can act as source of fungus dissemination on healthy insect when environment (temperature and humidity) was suitable for primary infection.

Kata kunci: Jamur patogen serangga, wereng coklat, *Nilaparvata lugens*, *Metarhizium anisopliae*, SEM, mikroskop elektron skaning, pengendalian hayati.

PENDAHULUAN

Serangga wereng coklat (*Nilaparvata lugens*) merupakan salah satu hama yang menjadi kendala peningkatan produksi padi. Serangga ini, selain menyebabkan kerusakan langsung juga dapat menularkan berbagai penyakit virus (Soper, 1985). Pada tingkat serangan yang berat dapat mengakibatkan tanaman padi menjadi puso. Akhir-akhir ini serangan wereng coklat dilaporkan kembali meluas di beberapa daerah Pantai Utara (Pantura) Jawa Barat dan Jawa Tengah. Ini antara lain disebabkan oleh penggunaan varietas padi yang tidak tahan wereng coklat seperti IR 64. Di Jawa Tengah dilaporkan serangan hama wereng coklat pada tanaman padi mencapai luas areal 26.000 Ha yang tersebar di 23 kabupaten (Anonim, 2005).

Strategi pengendalian saat ini masih ditekankan pada penggunaan varietas tahan dan pengendalian secara kimiawi. Metode tersebut ternyata tidak selalu efektif dalam menekan hama sehingga perlu dikembangkan cara pengendalian yang lainnya. Salah satu di antaranya adalah peranan musuh alami dalam pengendalian hayati.

Dewasa ini, minat terhadap penggunaan Jamur Patogen Serangga (JPS) untuk mengendalikan hama secara hayati telah dipacu karena adanya masalah lingkungan seperti efek samping penggunaan bahan kimia yang berbahaya bagi organisme bukan sasaran (Kaaya *et al.*, 1996). Sebagai contoh insektisida Bufrofezin yang efektif terhadap serangga hama wereng coklat dilaporkan beracun terhadap nener bandeng, mujairdanudang windu (Sunarjo *et al.*, 1988). Beberapa laporan penelitian menyebutkan sebagian besar fungisida maupun insektisida dapat berdampak negatif terhadap eksistensi jamur patogen serangga (Suryadi dan Hendarsih, 1992; Tsaie *et al.*, 1993; Ropek, 2002).

Salah satu jamur penting pada pengendalian hama secara hayati yaitu jamur *Metarhizium anisopliae* Metsch. Sorokin. Jamur *M. anisopliae* var *anisopliae* dapat menginfeksi serangga dari kelompok ordo Orthoptera, Coleoptera, Hemiptera, Lepidoptera dan Hymenoptera (Lee dan Hou, 2003). Di lapangan jamur ini banyak menginfeksi wereng hijau selain wereng coklat (Tsaie *et al.*, 1993). Menurut Aguda *et al.*, (1988) pada kondisi tropik, *M. anisopliae* cukup efektif menekan populasi wereng coklat di lapangan, karena

kondisi panas dan lembab sangat efektif untuk menginfeksi serangga wereng coklat. Di Brazil, jamur *M. anisopliae* telah digunakan untuk mengendalikan populasi serangga kepik (Holdom, 1986), serta wereng batang dan wereng daun pada tanaman alfalfa (Hall dan Payne, 1986). Serangga yang terinfeksi oleh jamur *M. anisopliae* dan mati berwarna ke hijau-hijauan; hal ini disebabkan oleh warna konidia jamur. Kematian serangga dapat diakibatkan oleh toksin yang dikeluarkan oleh jamur tersebut (Roberts, 1966). Miselium jamur dilaporkan mampu memproduksi senyawa metabolit yang toksik terhadap serangga (Dumas *et al.*, 1996). Di sisi lain, Holdom (1986) mengemukakan bahwa dalam proses infeksi konidia jamur patogen menginfeksi bagian kutikula serangga, namun sampai saat ini belum jelas mekanisme infeksi.

Oleh karena itu penelitian ini bertujuan untuk mempelajari proses infeksi jamur *M. anisopliae* pada tubuh serangga wereng coklat. Pemahaman yang akurat proses infeksi pada tubuh serangga, diharapkan dapat semakin mengetahui mengenai patogenesis JPS pada tubuh serangga wereng coklat maupun serangga lainnya. Tulisan ini melaporkan kajian infeksi JPS *M. anisopliae* pada tubuh serangga wereng coklat yang diamati dengan menggunakan mikroskop elektron skaning (SEM - Scanning Electron Microscope).

BAHAN DAN CARA KERJA

Infestasi wereng coklat dan inokulasi *M. anisopliae*

Isolat *M. anisopliae* diperoleh dari serangga wereng coklat sakit terinfeksi *M. anisopliae* dari daerah Kembaran, Purwokerto. Permukaan jaringan tubuh serangga yang mati mula-mula disterilisasi dengan cara perendaman menggunakan larutan etanol 70 % selama 1 menit dan air steril selama 5 menit, kemudian ditempatkan pada cawan petri steril berisi media agar. Perbanyakkan JPS *M. anisopliae* secara *in vitro* dilakukan berdasarkan petunjuk Doust dan Roberts (1982), menggunakan media agar *Emerson Yeast Soluble Starch* (YPSS) selama dua minggu yang diinkubasikan pada suhu kamar. Biakan JPS berupa suspensi konidia *M. anisopliae* dihitung dengan alat *haemocytometer* hingga diperoleh kerapatan inokulum 10^{10} konidia/ml. Selanjutnya konidia JPS diencerkan

dengan air steril dan ditambahkan 10 ml larutan Tween 80 0,5 % untuk mencegah penggumpalan inokulum.

Sebanyak 20 ekor serangga dewasa wereng coklat yang sebelumnya telah diinfestasikan pada tanaman padi disemprot masing-masing dengan inokulum konidia jamur *M. anisopliae* dengan konsentrasi 10^4 , 10^7 dan 10^{10} konidia/ml. Selanjutnya serangga dimasukkan ke dalam pot-pot berdiameter 30 cm berisi tanaman padi varietas TN-1, kemudian ditutup dengan kurungan plastik mylar. Pada perlakuan kontrol dilakukan penyemprotan dengan air steril. Untuk menjaga suhu dan kelembaban tanaman dilakukan penyiraman secara berkala, selanjutnya pot-pot ditempatkan di rumah kaca. Data suhu dan kelembaban harian dicatat. Setelah tiga sampai empat hari infestasi, dilakukan penghitungan pada serangga yang mati.

Penyiapan contoh serangga untuk pengamatan SEM

Sebanyak sepuluh serangga hidup maupun yang sudah mati hasil koleksi dikumpulkan dan kemudian dikering-anginkankan sesuai dengan petunjuk baku untuk pengamatan morfologi menggunakan mikroskop elektron skaning/SEM (Pusposendojo, 1985). Sediaan (preparat) yang telah kering selanjutnya difiksasi dengan larutan glutaraldehyde 2 % dan osmium tetraoksida (OsO_4) 4 %. Selanjutnya proses dehidrasi menggunakan seri pengeringan dengan etanol (70-100 %) dan pengeringan menggunakan alat vakum evaporasi.

Bahan yang sudah dikeringkan kemudian dilekatkan pada alat pemegang spesimen (*aluminium stub*) dengan perekat koloid pasta perak dan dilapisi logam emas (Au) (ketebalan logam kira-kira 15 nm) dengan mengikuti proses evaporasi; selanjutnya diamati menggunakan mikroskop elektron skaning - SEM (Hitachi S 520). Pengamatan dilakukan secara visual terhadap hasil fotomikrograf yang diproses dengan foto hitam putih Fuji film.

HASIL

Infestasi wereng coklat dan inokulasi *M. anisopliae*

Hasil penelitian rumah kaca ini menunjukkan bahwa wereng coklat yang diinfestasikan pada tanaman padi terinfeksi JPS, dan mengalami tingkat mortalitas berkisar antara 40 sampai 45 % pada berbagai konsentrasi (Gambar 1). Mulai saat empat hari setelah

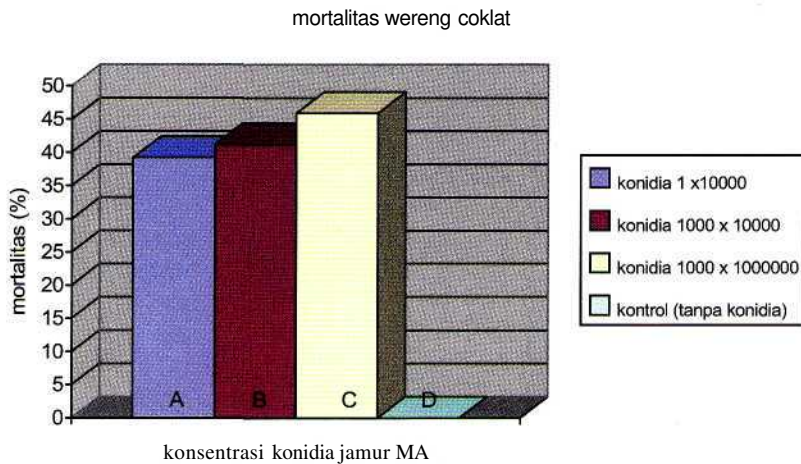
aplikasi penyemprotan, konidia jamur menurunkan populasi wereng coklat. Secara makroskopis, dari seluruh tubuh serangga wereng coklat yang dikoleksi dan diamati menunjukkan adanya koloni jamur pada serangga yang mati terinfeksi jamur *M. anisopliae*. Tingkat virulensi IPS ini didukung dengan kondisi suhu dan kelembaban harian yang cukup tinggi, masing-masing berkisar dari 28°C-37°C dan 78 % - 90 % (Tabel 1).

Pengamatan dengan SEM

Dari hasil pengamatan mikroskopis SEM, dapat

dilihat adanya infeksi jamur pada serangga wereng coklat tersebut, yang mati melalui proses penetrasi hifa jamur yang dihasilkan oleh konidia yang berkecambah di beberapa bagian tubuh serangga (Foto 1).

Tubuh serangga wereng coklat yang mati berwarna kehijau-hijauan karena warna konidia jamur, dan tubuh serangga ini dipenuhi konidia dengan sebaran tidak merata. Tampak dalam pengamatan, jamur bersporulasi menghasilkan konidia pada kondiofor secara berantai dan saling berpencar (*divergent*) (Foto 2).



Gambar 1. Mortalitas wereng coklat akibat perlakuan konidia *M. anisopliae*

Tabel 1. Data pengamatan suhu dan kelembaban nisbi harian di rumah kaca

Waktu pengamatan (hari)	Suhu (°C)	Kelembaban nisbi (%)	Waktu pengamatan (hari)	Suhu (°C)	Kelembaban nisbi (%)
1	29	89	16	31	89
2	30	89	17	32	89
3	35	85	18	31	90
4	33	90	19	32	88
5	31	89	20	31	87
6	29	89	21	31	80
7	29	88	22	30	87
8	37	78	23	31	85
9	37	79	24	28	88
10	36	82	25	29	90
11	35	88	26	30	85
12	35	87	27	27	82
13	36	80	28	27	85
14	29	89	29	28	86
15	30	89	30	28	86

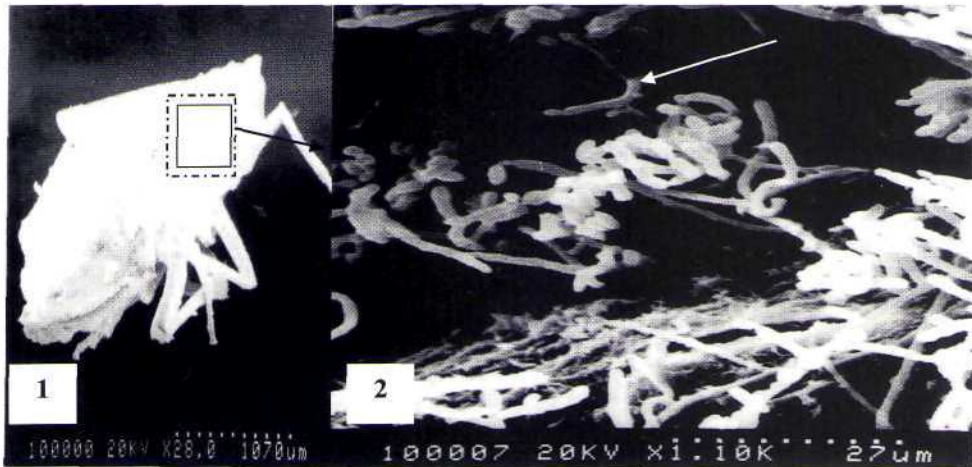


Foto 1. Kondisi tubuh serangga wereng coklat mati akibat infeksi *Manisopliae*.
Foto 2. Infeksi *M. anisopliae* pada bagian kutikula serangga wereng coklat. Tanda panah menunjukkan konidia *M. anisopliae* pada kutikula serangga dan perkecambahan konidia.



Foto 3. Sporulasi *M. anisopliae* pada bagian abdomen serangga wereng coklat.

Secara morfologis, semua konidia homogen dengan berbagai ukuran dari konidia tunggal sampai konidia yang bergerombol selain adanya kelompok hifa (*hyphae*), yang menunjukkan tahapan perkembangan konidia pada kutikula serangga. Tanda adanya hifa yang menetrasi tubuh serangga banyak dijumpai pada bagian abdomen (Foto 3).

Berdasarkan hasil pengukuran SEM, terlihat ukuran konidia relatif sangat kecil dan terlepas satu sama lainnya. Konidia *M. anisopliae* berukuran 1,6 x 7,8 μm banyak ditemukan pada bagian kutikula serangga (Foto 4). Pada penelitian ini terlihat JPS *M. anisopliae* kebanyakan dapat ditemukan pada bagian abdomen, kaki dan mata/ace? serangga (Foto 5).

PEMBAHASAN

Mortalitas serangga wereng coklat antara lain dapat dipengaruhi oleh faktor lingkungan seperti kelembaban, suhu dan dosis minimal konidia jamur yang efektif mematikan serangga. Disebutkan oleh Yusmani dan Marwoto (2005) bahwa dosis minimal konidia jamur patogen yang dapat menyebabkan kematian serangga adalah kira-kira mencapai 10-11 x 1000 konidia/ml. Suhu dan kelembaban pada penelitian ini (berkisar dari 28-37°C dan 78-90 %) cukup mendukung epizootik JPS pada serangga wereng coklat. Tanada *et al.* (1973) menyatakan bahwa kelembaban yang tinggi pada tanaman alfalfa meningkatkan epizootik jamur patogen serangga.

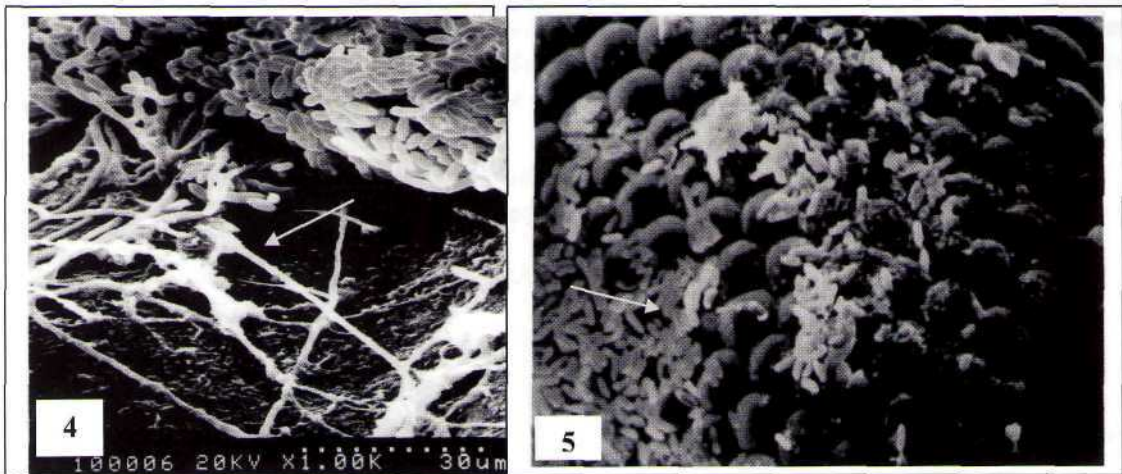


Foto 4. Sporulasi *M. anisopliae* pada bagian membran antar segmen abdomen serangga wereng coklat.

Foto5. Konidia *M. anisopliae* pada bagian mata majemuk (mata facet) serangga wereng coklat (perbesaran 900 x 38 [j.m]).

Pada penelitian ini dapat dijelaskan mekanisme kematian serangga setelah adanya penetrasi hifa jamur pada bagian dalam tubuh serangga wereng coklat. Proses kematian serangga terjadi beberapa saat setelah proses penetrasi, karena untuk mematikan serangga menurut Dumas *et al.* (1996), disyaratkan adanya kondisi konidia yang virulen, selain produk toksin yang dihasilkannya. *M. anisopliae* pada serangga wereng hijau (*Nephotettix virescens*) bekerja lambat dimana mortalitas hanya mencapai 84% pada enam hari setelah inokulasi (Suryadi dan Hendarsih, 1991). Menurut Rombach *et al.* (1986) faktor lain yang mempengaruhi infeksi jamur *M. anisopliae* di lapangan adalah dosis konidia. Dosis minimal yang paling mematikan serangga wereng coklat, adalah sebanyak 5×10^{12} konidia/ha. Dengan demikian semakin banyak jumlah konidia yang digunakan maka semakin banyak propagul jamur yang berfungsi sebagai agensia penularan.

Infeksi JPS umumnya dapat terjadi melalui penetrasi integumen serangga (Ferron, 1978). Holdom (1986) menyatakan bahwa konidia JPS *M. anisopliae* yang virulen akan berkecambah dan memasuki bagian kutikula serangga dibantu oleh proses mekanik dan enzimatik, berlanjut dengan proses kematian serangga karena toksin yang dihasilkan JPS. Mekanisme adanya aktifitas enzim seperti lipase, protease dan kitinase untuk mendegradasi lapisan kutikula, dilaporkan sudah

terjadi saat spora jamur patogen berkecambah pada permukaan integumen (StLeger dan Carnley, 1986). Apresoria yang berada pada ujung tabung kecambah (*germ tube*) dibentuk sewaktu terjadi perkecambahan spora. Melimpahnya konidia *M. anisopliae* pada beberapa bagian tubuh serangga yang disebabkan oleh kondisi saat inokulasi, sangat membantu pertumbuhan konidia menghasilkan tabung kecambah sehingga dapat menetrasi tubuh serangga. Menurut StLeger dan Carnley (1986) sekresi enzim pendegradasi kutikula mencapai puncaknya 24 sampai 72 jam setelah inokulasi (jsi). Ukuran konidia *M. anisopliae* yang diamati dengan SEM relatif kecil ($1,6 \times 7,8 \mu\text{m}$) dan diduga konidia ini termasuk ke dalam spesies *M. anisopliae* var. *anisopliae* seperti dikemukakan oleh Soper (1985) bahwa panjang konidia jamur tersebut berkisar dari 3,5 sampai 9,0 μm .

Konidiofor jamur yang tipikal untuk famili *Deuteromycetes* dengan konidia-konidia yang keluar dari ujung tangkainya banyak ditemukan pada berbagai bagian lain tubuh serangga, sebagai contoh pada bagian mata facet serangga. Namun demikian, frekwensi jamur yang teramati pada bagian-bagian lain tubuh serangga sangat rendah dibandingkan pada bagian kutikula serangga.

Konidia *M. anisopliae* berkecambah menghasilkan miselia atau kumpulan hifa yang berfungsi untuk membantu penyebaran, dan pada

proses infeksi selanjutnya menghasilkan alat infeksi tabung kecambah. Alat infeksi ini akan melakukan penetrasi secara aktif pada bagian kutikula dan bagian lainnya pada tubuh serangga. Propagul miselia akan disebarkan ke seluruh rongga tubuh serangga melalui aliran haemolymph (Soper, 1985). Menurut Samson *et al.* (1988) setelah struktur perkecambahan terbentuk, penetrasi dilanjutkan pada bagian antar segmen.

Sementara itu, hasil penelitian ini mengindikasikan adanya infeksi penyakit dan penyebaran JPS dapat disebabkan oleh serangga itu sendiri, baik pada serangga yang telah mati maupun serangga yang masih hidup. Hal ini dapat dilihat dari banyaknya deposit atau kumpulan agregat konidia pada bagian lain tubuh serangga yang tidak secara langsung mematikan seperti pada bagian sayap, membran antar segmen abdomen, serta mata *facet* serangga.

Pada proses penyebaran penyakit yang mewabah (*epizootic*) di lapangan, selain faktor lingkungan (suhu dan kelembaban) yang optimal untuk perkembangan JPS, kontak langsung antara kutikula serangga hidup dengan serangga yang sudah mati yang terinfeksi diduga merupakan sumber penularan yang cukup efektif. Namun demikian frekwensi infeksi jamur *M. anisopliae* pada tanaman padi di lapangan masih rendah meskipun serangga sakit dapat menjadi agen penular jamur *M. anisopliae* (Suryadi dan Hendarsih, 1991). Berbeda dengan hasil penelitian di lapangan terhadap jamur *Verticilium alboatrum* pada tanaman alfalfa, Huang dan Richards (1983) melaporkan banyaknya infeksi konidia jamur patogen pada tubuh serangga kumbang *Megachile rotundata*. Hasil penelitian terdahulu menunjukkan bahwa mortalitas wereng hijau stadia dewasa lebih tinggi dibandingkan dengan mortalitas nimfa; hal ini diduga karena terdapat perbedaan kerentanan kutikula serangga (Suryadi dan Hendarsih, 1991).

Hasil penelitian ini mengindikasikan bahwa konidia yang terdeposit pada tubuh serangga merupakan agen penting untuk penyebaran patogen. Kondisi ini akan menguntungkan, apabila serangga yang mati kemudian kontak dengan serangga lainnya, sehingga terjadi penularan penyakit dan menyebabkan kematian serangga. Uraian di atas penting sebagai

salah satu cara untuk mengendalikan populasi serangga wereng coklat secara alami. Bagaimana tepatnya mekanisme patogenesis antara jamur patogen dengan tubuh serangga lainnya serta keterkaitan fisiologis/enzimatis serangga dengan virulensi jamur patogen masih perlu dipelajari lebih lanjut.

KESEMPULAN

Konidia atau hifa jamur *M. anisopliae* (berukuran kira-kira 1,6 x 7,8 μ m) dapat diamati menginfeksi berbagai bagian tubuh serangga wereng coklat. Hifa jamur yang tumbuh pada bagian tubuh serangga mati dapat menyebar ke serangga lainnya bila terjadi kontak dan didukung oleh kondisi lingkungan (suhu dan kelembaban) yang cocok untuk pertumbuhan jamur patogen.

SARAN

Proses interaksi antara inang dan jamur patogen masih perlu dikaji lebih lanjut.

UCAPAN TERMAKASIH

Penulis mengucapkan terima kasih kepada Sdr. Suwaji yang telah membantu perbanyakan isolat jamur *M. anisopliae* di laboratorium.

DAFTAR PUSTAKA

- Anonim. 2005. Petani ganti varietas padi. *Kompas*, 2 Agustus 2005.
- Doust RA and DW Roberts. 1982. Virulence of natural and insect passaged strains of *Metarhizium anisopliae* to mosquito larvae. *J. Invert. Pathol.* 40,107-117.
- Dumas CM, Ravallea, V Matha and A Vey. 1996. Comparative study of the cytological aspects of the mode of action of destruxions and other peptidic fungal metabolites on target epithelial cells. *J. Invert. Pathol.* 67,137-146.
- Ferron P. 1978. Biological control of insect pest by entomogenous fungi. *Annu. Rev. Entomol.* 23, 409-442.
- Hall RA and CC Payne. 1986. Potential of insect pathogens in the tropics, 187-196. In: MY Husein and AG Ibrahim (Eds). *Biological Control in the Tropics*.
- Holdom DG. 1986. The use of fungal pathogens to control brown plant hopper and other pest insects. *Seminar Balitran Sukamandi* (mimeograph).
- Huang HC and KW Richards. 1983. *Verticilium alboatrum* contamination on leaf pieces forming cells for the alfalfa leaf cutter bee. *Can. J. Plant Pathol.* 5, 248-250.
- Kaaya GP, EN Mwangi and EA Ouna. 1996. Prospect for biological control of livestock ticks *Rhipicephalus*

appendiculus and *Amblyoma variegatum* using entomogenous fungi *Beuveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae*. *J. Invert. Pathol.* 67, 15-20.

- Lee PC and RF Hou. 2003.** Pathogenesis of *Metarhizium anisopliae* van *anisopliae* in the smaller brown plant hopper *Laodelphax striatellus*. *Chinese. J. Entomol.* 9, 13-19.
- Pusposendjojo N. 1985.** Petunjuk praktikum mikroskop elektron skaning (SEM). LAKFIP UGM (mimeograph).
- Roberts DW. 1966.** Toxin from the entomogenous fungus *M. anisopliae*. *J. Invert. Pathol.* 8, 212-227.
- Rombach MC, RM Aguda, BM Sheppard and DW Roberts. 1986.** Infections of rice brown planthopper *Nilaparvata lugens* (homopterous, delphacidae) by field application of EPN Hypomycetetes (Deuteromycotina). *Environ. Entomol.* 15, 1070-1073.
- Ropek D. 2002.** The effect of heavy metal ions and their complexions up the growth sporulation and pathogenicity of the entomopathogenic fungus *V. lecanii*. *J. Invert. Pathol.* 79, 123-125.
- Samson RA, HC Evans and JP Latge. 1988.** *Atlas of Entomopathogenic Fungi*. Watenschappelijke Uitgeverij Bunge. Utrecht.
- Soper RS. 1985.** Pathogens of leaf hoppers and plant hoppers In: *The Leaf Hoppers and Plant Hoppers*, 469-489. LR Naults and JG Rodriguez (Eds). John Willey and Sons Inc. New York.
- StLeger RM and AK Carnley. 1986.** Cuticle-degrading enzymes of entomopathogenic fungi: cuticle degradation in vitro by enzyme from entomopathogens. *J. Invert. Pathol.* 47, 167-177.
- Sunarjo PI, A Nasarudin, N Agus dan DS Dewi. 1988.** Pengaruh Applaud 10 WP terhadap benur (*Panaeus monodori*), nener bandeng (*Chanos chanos*) dan mujair (*Tilapia mossambica*). p: Dalam: J Sujitno *et al*, (Ed.). *Penelitianwerengcoklat 1987/1988*, 101-113. Balai penelitianTanaman Pangan, Bogor.
- Suryadi Y dan S Hendarsih. 1991.** Kepekaan wereng hijau terhadap jamur patogen serangga *Metarhizium anisopliae* (Metsch) Sorokin. Dalam: *BiologiDasar Dalam Menunjang Produktivitas dan Kualitas Hayati-Proc. Sem. BiolDasarll*, 222-225. Suhirman (Ed.). Pusat Penelitian dan Pengembangan Biologi LIPI.
- Suryadi Y dan S Hendarsih. 1992.** Efektifitas campuran jamur patogen serangga *M. anisopliae* dengan insektisida terhadap wereng coklat. *Kumpulan Makalah Kongres IVPEL* Yogyakarta.
- Tanada Y. 1973.** Epizootiology of insect diseases p:548-585. In: P de Bach (Ed). *Biological Control Insect Pest and Weeds*. Chapman and Hall, London.
- Tsai YS, CW Kau and SS Kao. 1993.** Screening of fungicide resistant of *M. anisopliae* var. *anisoplae*. *Chinese J. Entomol.* 13,45-57.
- Yusmani P dan Marwoto. 2005.** Kerentanan jamur entomopatogen *Verticilium lecanii* terhadap beberapa jenis fungsida. *Agrivita* 27 (1), 51-59.