

**EFEK ANTIFUNGAL KITINASE AKAR SEMAI TUSAM
YANG TERINFEKSI EKTOMIKORIZA (CHIT 52) TERHADAP
R. SOLANI dan FUSARIUM SP.**

Alfina Handayani
Balitbang Provinsi Jawa Tengah

ABSTRACT

Tusam is a fast growing tree, adaptable and useful in industry. Mycorrhizal association protect tusam from root pathogen. Disease protection by mycorrhizal fungi has been associated with several mechanism, one of which, antifungal substances chitinase. However, chitinase accumulation in tusam during mycorrhizal symbiosis is not fully understand. The objective of the research was to determine the effect of chitinase antifungal activity of CHIT 52 that purified from 4 weeks age of tusam seedling root. Tusam inoculated with tusam stands soil from Kaliurang as fungi inoculate. The enzyme was purified by ammonium sulfat precipitation, dialysis, followed by gel filtration chromatography. Purified enzyme applied in R. Solani dan Fusarium sp. mycelia. The results showed that CHIT 52 can block fusarium sp. mycelia but in same enzyme concentration, CHIT 52 cannot block R. solani mycelia.

Keywords: *Chitinase, Tusam, R. solani, Fusarium sp, mycorrhiza*

PENDAHULUAN

Tusam (*Pinus merkusii* Jungh. et de Vries) merupakan komoditas hutan yang cukup penting untuk dikembangkan di Indonesia. Tusam memiliki beberapa kelebihan antara lain: kemampuan tumbuhnya yang cepat, mampu beradaptasi pada tanah yang kurang subur dan mampu tumbuh di dataran tinggi. Tusam juga mempunyai nilai ekonomis yang cukup tinggi dalam bidang industri (Soerianegara dan Lemmens, 1996). Kendala utama yang dihadapi dalam pengembangan tusam berkaitan dengan masih rendahnya kualitas dan kuantitas semai tusam. Persemaian tusam banyak mengalami kegagalan akibat serangan patogen penyebab penyakit rebah semai (*damping off*). Patogen penyebab penyakit rebah semai yang banyak menyerang tusam antara lain jamur *Fusarium sp.* dan *R. solani*. Penelitian yang dilakukan Sumardi dan Widayastuti

(2000) menunjukkan bahwa kegagalan penyediaan bibit tusam di Indonesia khususnya di Jawa Tengah banyak disebabkan oleh jamur patogen tular tanah *Fusarium sp.*, dengan tingkat serangan mencapai 45%.

Inokulasi mikoriza ternyata mampu melindungi semai tusam dari serangan patogen terutama patogen penyebab penyakit rebah semai (*damping off*) seperti *R. solani* dan *Fusarium sp.*. Jamur-jamur ini bersifat fakultatif dapat hidup di atas permukaan tanah secara sapofit dan dapat berubah sebagai parasit apabila kondisinya memungkinkan. Mekanisme perlindungan tanaman oleh jamur mikoriza-ekto berkaitan dengan kemampuannya dalam: 1) barier fisik yaitu adanya mantel jamur yang menyelimuti perakaran tanaman, 2) antibiosis, 3) sintesis substansi antifungal (Duschene, 1996).

Respon tanaman akibat adanya jamur mikoriza salah satunya melalui akumulasi *pathogen related protein* yaitu kitinase. Infeksi mikoriza pada akar tanaman mampu meningkatkan aktivitas kitinase (Albrecht *et al.*, 1994, Pozo, *et al.*, 1998). Kitinase (EC 3.2.1.14) merupakan enzim yang berperan dalam mekanisme ketahanan tanaman. Kitinase berfungsi dalam hidrolisis kitin, homopolimer linear β -1,4 N-acetylglukosamin (Cabib, 1987, Hunyh, 2002).

Enzim kitinase yang terimbas akibat adanya respon masuknya hifa jamur mikoriza pada tanaman tusam sudah dikarakterisasi yaitu CHIT 52 (Handayani, *et.al.*, 2005). CHIT 52 diduga berperan penting dalam mengimbas reaksi ketahanan pada tusam. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui pengaruh aktivitas *antifungal* kitinase CHIT 52 secara invitro pada jamur penyebab penyakit damping off, *R. solani* dan *Fusarium* sp. Apabila terbukti secara invitro kitinase yang dimurnikan dari semai tusam yang terinfeksi ektomikoriza mampu menghambat koloni jamur *R. solani* dan *Fusarium* sp maka penelitian ini dapat memberikan informasi lebih jauh mengenai peran mikoriza dalam mengimbas mekanisme ketahanan pada tanaman.

BAHAN DAN METODA

Inokulasi. Jamur mikoriza diinokulasi dengan menggunakan campuran inokulum tanah bermikoriza yang berasal dari tanah tegakan tusam di Kaliurang dan pasir steril dengan perbandingan 30% dan 70%. Semai tusam yang berumur 4 minggu kemudian diekstraksi.

Ekstraksi. Prosedur ekstraksi berdasar metode Vannini, *et al.* (1999) Semua prosedur kerja dilakukan pada suhu 4°C kecuali disebutkan lain. Sampel

akar sebanyak 50 g yang telah dimasukkan dalam -80°C ditumbuk dengan menggunakan mortar sampai menjadi serbuk, kemudian ditambahkan larutan bufer 100 ml 0,05 M Tris HCl pH 8,2 yang mengandung 15 ml 0,5 M NaCl 5% Polyvinilpirolidone dan 15 ml 7,5% mercaptoetanol selama satu jam setelah itu disentrifugasi 3500 rpm selama 35 menit.

Uji aktivitas kitinase. Volume ekstrak protein sebanyak 0,1 ml ditambahkan ke dalam campuran 0,05% glikol kitin dalam 50 mM bufer asam asetat pH 5 sampai volume 1 ml (Hou *et al.*, 1998). Campuran diinkubasikan dalam waterbath pada suhu 37°C selama 30 menit. Reaksi dihentikan dengan ssspenambahan 0,5 ml DNS selanjutnya campuran dimasukkan dalam air mendidih selama 15 menit (Wen *et al.*, 2002). Absorbansi sampel dilihat pada OD540 nm, visible. Hasil pembacaan absorbansi dihitung menggunakan kurva standar N-acetylglukosamin. Satu Unit aktivitas kitinase didefinisikan sebagai jumlah enzim yang diperlukan untuk melepaskan 1 μ l gula reduksi selama 1 menit pada suhu 37°C.

Pemisahan protein. *Crude protein* dipekatkan dengan menggunakan amonium sulfat 70%, disentrifugasi dengan kecepatan 3500 rpm selama 30 menit. Pelet diresuspensi dengan aquades kemudian didialisis menggunakan 20 mM bufer tris HCl pH 8,2 selama semalam. Hasil dialisis dipekatkan dengan PEG 35.000. Protein dalam dialisat dipisahkan lebih lanjut dengan menggunakan kromatografi gel filtrasi dengan matriks *Sepachril* S-300 HR (Pharmacia, biotech) pada kolom dengan ukuran 1x 60 cm. *Start bufer* dan bufer elusi yang digunakan adalah 20 mM bufer tris HCl pH 8,2. Fraksi dikoleksi setiap 2 ml dengan kecepatan alir 6 ml/jam dengan tekanan pompa 20. Fraksi yang

menunjukkan aktivitas kitinase dipekatkan dengan PEG (Hartman, *et al.*, 1993).

Karakterisasi kitinase. SDS PAGE 12,5% mengacu kepada metode dasar Laemmli (1970). Protein divisualisasikan menggunakan *silver stain*. Berat molekul kitinase didapat dari persamaan regresi log berat molekul standar dengan mobilitas relatif (rf). Suhu optimal diketahui dengan menginkubasikan enzim substrat pada kisaran 20-80 C. Nilai pH optimal dicari pada kisaran pH 3-8 dalam larutan bufer asam sitrat, asam asetat dan phosphat sampai diperoleh kisaran pH yang dikehendaki.

Uji aktivitas antifungal kitinase terhadap *Fusarium* sp. dan *R. solani*. Uji aktivitas antifungal kitinase dilakukan dengan menggunakan metode *cup plate*. Medium *water agar* (WA) disiapkan dengan konsentrasi agar 3% (w/v). WA dicairkan terlebih dahulu kemudian sebanyak 5 ml dituang ke dalam cawan Petri. Setelah beku empat ring plastik dengan diameter 5 mm diletakkan pada keempat jari-jari cawan Petri dengan jarak sama. Setelah semua silinder tertata rapi *water agar* sebanyak 10 ml dituang di atas lapisan sebelumnya dan kemudian setelah membeku keempat silinder diambil, sehingga diperoleh lubang pada permukaan dengan ukuran dan jarak yang seragam. Potongan koloni *Fusarium* sp. dan *R. solani* ditumbuhkan di tengah-tengah cawan Petri. Setelah biakan berumur kurang lebih dua hari atau pada saat miselia jamur sudah mencapai jarak \pm 1 cm dari lubang tiap lubang diisi larutan enzim. Selain dengan metode *cup plate* pengujian dilakukan pula dengan menggunakan kertas saring Whatman No 4. Medium PDA dicairkan, kemudian 5 ml media diletakkan pada cawan Petri steril dan diratakan. Potongan koloni *Fusarium* sp. diletakkan pada tengah

cawan Petri. Setelah miselia jamur berkembang kurang lebih 2 hari, potongan kertas saring steril yang sudah dipotong bulat-bulat dan diaplikasikan larutan enzim dalam buffer asetat pH 5 diletakkan pada keempat jari-jari cawan. Zona penghambatan diamati setelah 3 hari.

Pengamatan mikroskopi. Miselia jamur diambil dari kultur *R. solani* dan *Fusarium* sp. yang ditumbuhkan pada suhu 30°C selama tiga hari pada medium PDA. Miselia ditumbuhkan pada *water agar* 3% (w/v) yang diletakkan pada gelas benda cekung dan dijaga dalam kondisi lembab selama semalam. Setelah inokulasi selama 24 jam pada gelas benda, protein dengan konsentrasi 0,156 μ g/ml sebanyak 10 μ l enzim kitinase dalam buffer asetat pH 5,6 hasil pemisahan kromatografi gel filtrasi diteteskan pada *water agar* 3% (w/v). *Slide* selanjutnya diamati tiap interval waktu 30 menit dengan menambahkan *laktofenol blue* menggunakan mikroskop *phase contrast* dan divisualisasikan menggunakan kamera Nikon.

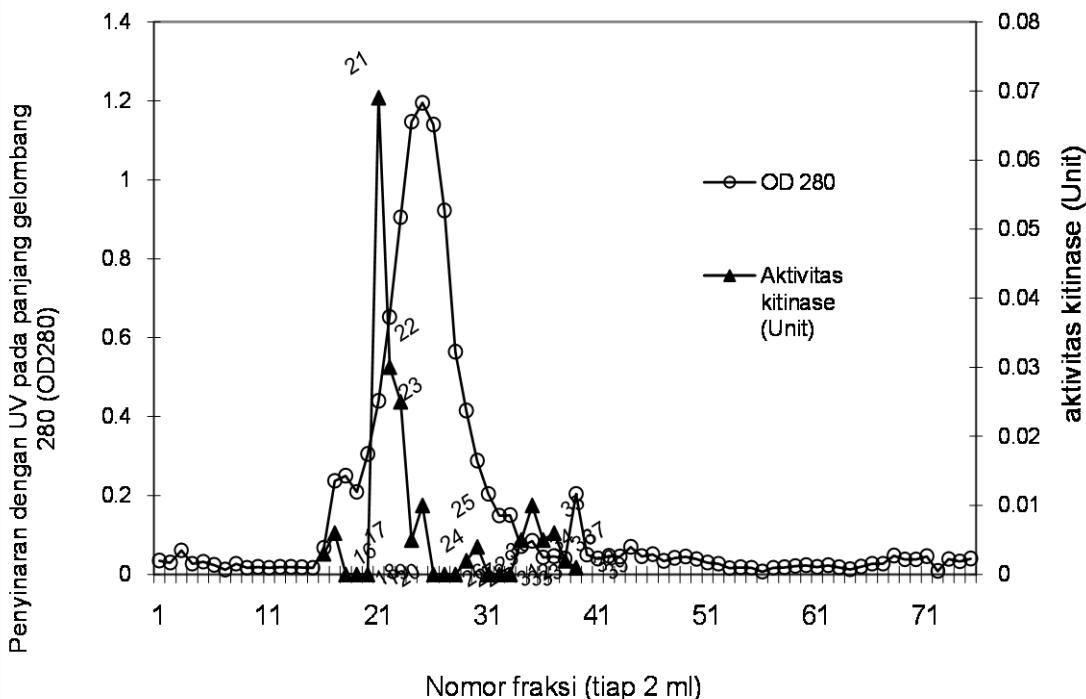
HASIL DAN PEMBAHASAN

Pemurnian kitinase.

Pemisahan kitinase diawali dengan pengendapan protein dengan menggunakan amonium sulfat 70%. Fraksi-fraksi hasil elusi selanjutnya diukur serapannya pada OD_{280 nm} untuk melihat gambaran pola pemisahan protein sampel. Fraksi-fraksi yang membentuk puncak pada OD_{280 nm} yaitu fraksi nomor 17 sampai fraksi 39 (Gambar 1). Gambar 1 juga menunjukkan bahwa setelah proses elusi dengan menggunakan bufer Tris-HCl pH 8,2, protein yang terikat pada matriks setelah fraksi ke 26 semakin berkurang. Hal ini dapat dilihat dari penurunan nilai absorbansi 280 nm pada fraksi berikutnya. Fraksi-fraksi yang membentuk puncak tersebut selanjutnya

dianalisis aktivitas kitinasenya. Aktivitas kitinase tertinggi pada fraksi no 21, 22

dan 23.



Gambar 1. Profil Elusi Protein kolom kromatografi gel filtrasi dan aktivitas kitinase. Aktivitas kitinase tertinggi pada fraksi ke 21,22,23.

Rekapitulasi pemisahan dengan kromatografi gel filtrasi menghasilkan tingkat pemisahan yang lebih baik jika dibandingkan dengan pengendapan menggunakan amonium sulfat dan dialisis seperti dirujuk pada Tabel 2. Kromatografi gel filtrasi mampu

mengurangi jumlah protein total cukup banyak dari 0,01943 menjadi 0,00093 (kurang lebih 20 kali dari tahap sebelumnya), sedangkan aktivitas kitinase berkurang mencapai kurang lebih 6,8 kali dari tahap sebelumnya.

Tabel 1. Rekapitulasi pemisahan kitinase akar semai tusam

Langkah Pemurnian	Protein		Kitinase			Tingkat pemurnian	Recovery (%)
	Vol (ml)	Protein total (mg)	Konsentrasi (unit/ml)	Aktv. spesifik (unit.mg ⁻¹)	Jumlah total (unit tot)		
<i>Crude protein</i>	100	0,12930	0,00106	0,008198	0,10600	1	100,00
Pengendapan amonium sulfat dan dialisis	25	0,01943	0,00090	0,046641	0,02265	5,69	21,37
Sephacril S-300 HR	6	0,00093	0,00055	0,594624	0,00332	72,53	3,13

Sumber: Data Primer (diolah)

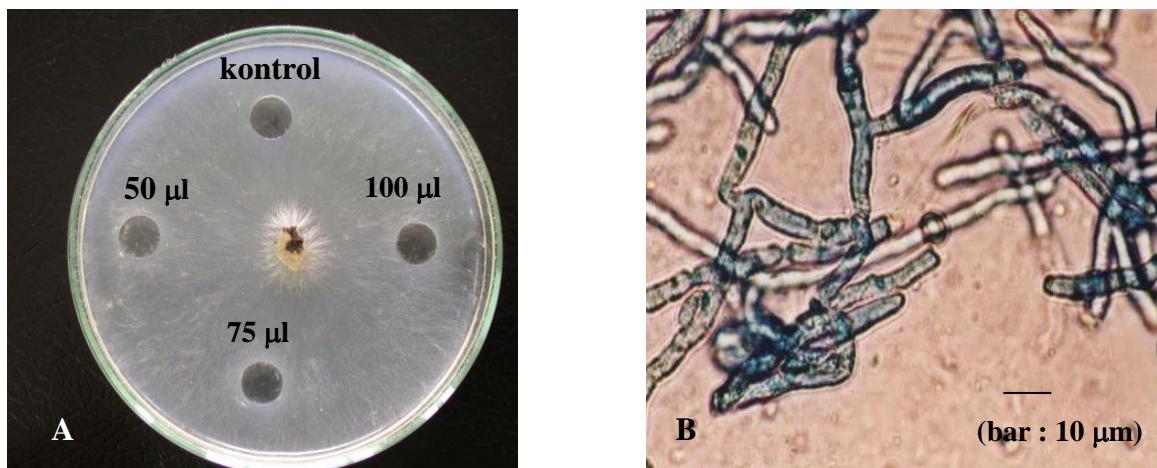
Pemisahan dan berat molekul protein dicari dengan menggunakan SDS PAGE 12,5% dan divisualisasikan menggunakan silver stain kemudian dihitung menggunakan kurva kalibrasi mobilitas relatif polipeptida standar. Kurva kalibrasi diukur dari jarak migrasi protein standar mulai dari sumuran tempat migrasi protein yang selanjutnya digunakan sebagai sumbu x. Ukuran fragmen protein standar dibuat logaritmanya dan nilai logaritma dijadikan sebagai nilai sumbu y. Persamaan kurva kalibrasi tersebut menunjukkan berat molekul kitinase yang dihasilkan sekitar 52 kDa yang selanjutnya disingkat menjadi CHIT 52 (Handayani, et.al. 2005)

Uji Aktivitas Antifungal CHIT 52 Terhadap Pertumbuhan Koloni *R. solani*.

Uji aktivitas antifungal kitinase menggunakan metode *cup plate* dengan medium *water agar* 3%. Kitinase yang diaplikasikan adalah hasil kromatografi gel filtrasi yang mempunyai aktivitas kitinase tertinggi. Fraksi yang mempunyai

aktivitas kitinase tertinggi dijadikan satu dan diukur konsentrasi yaitu sebesar 0,156 $\mu\text{g ml}^{-1}$. Sampel protein dengan volume 1 ml ditambah 0,25 ml bufer asetat pH 5 digunakan untuk uji antiifungal dengan variasi volume protein 50, 75 dan 100 μl . Sebagai kontrol digunakan bufer tanpa larutan enzim.

Aktivitas antifungal kitinase terhadap pertumbuhan miselium jamur *R. solani* diamati tiap interval waktu 12 jam sampai seluruh media ditumbuhi miselium jamur (3 hari). Hasil pengamatan yang disajikan pada Gambar 3A, tidak menunjukkan adanya zona penghambatan di sekitar *cup plate* yang diaplikasikan larutan enzim kitinase. Aplikasi kitinase dengan volume tertinggi 100 μl tetap sama seperti kontrol. Pengamatan lebih lanjut enzim diaplikasikan dengan menggunakan *paper disk*. Konsentrasi protein dipekatkan menjadi 0,312 $\mu\text{g ml}^{-1}$. Zona penghambatan diamati setiap 12 jam, setelah tiga hari pengamatan disekitar *paper disk* tetap tidak menunjukkan adanya zona penghambatan,



Gambar 2. Aktivitas penghambatan CHIT 52 terhadap perkembangan koloni *R. solani*. A. Medium *water agar* 3%. Konsentrasi protein yang digunakan adalah: 0 (kontrol), 50, 75, 100 μl . B. Hifa jamur *R. solani* tidak mengalami perubahan setelah aplikasi CHIT 52. (Pembesaran 100 x).

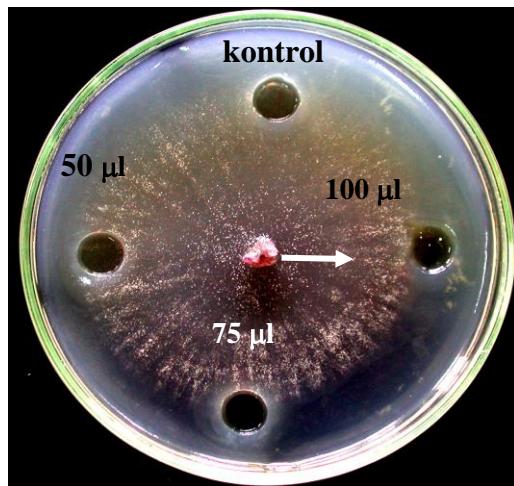
Pengamatan mikroskopi terhadap pertumbuhan hifa *R. solani* dengan pembesaran 100 x dilakukan dengan cara menumbuhkan miselium jamur *R. solani* pada *water agar* 3% yang diletakkan pada gelas benda cekung selanjutnya ditetesi dengan 10 μ l sampel protein dalam 50 mM bufer asetat pH 5. Reaksi dihentikan dengan penambahan *lactofenol blue*. Pengamatan dilakukan tiap interval waktu 30, 60, 90, 120 menit dan 7 jam aplikasi enzim. Pada 30 menit awal setelah aplikasi CHIT 52 pada kontrol maupun *slide* yang diaplikasikan enzim tidak menunjukkan adanya perubahan morfologi pertumbuhan hifa. Pengamatan dilanjutkan setelah inkubasi selama 7 jam, pertumbuhan hifa juga tetap normal (Gambar 2.B.). Berdasarkan hasil tersebut menunjukkan bahwa CHIT 52 tidak efektif dalam menghambat *R. Solani*.

Penelitian pendahuluan yang dilakukan Widyaningsih (2003) menunjukkan secara *invivo* ketahanan semai tusam relatif tinggi terhadap penyakit rebah semai oleh *R. solani*. Penelitian secara *invitro* menunjukkan hasil yang berbeda, enzim kitinase ternyata tidak mampu menghambat pertumbuhan miselium *R. Solani* dan juga tidak menyebabkan abnormalitas pertumbuhan hifa. Ketidakaktifan aktifitas antifungal CHIT 52 terhadap *R. solani* ada tiga kemungkinan, pertama konsentrasi CHIT 52 yang diaplikasikan belum tepat untuk menghambat pertumbuhan koloni *R. solani*, kedua diduga CHIT 52 ini memang kurang spesifik untuk menghambat *R. solani*

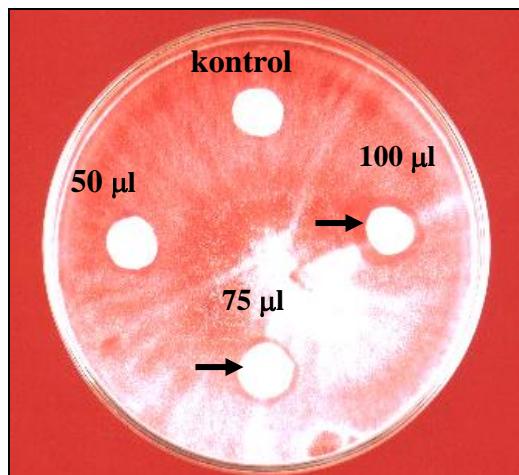
karena pengaruh senyawa tertentu yang dikeluarkan oleh *R. solani* sehingga kitinase menjadi tidak aktif. Kerja enzim kitinase kurang optimal dapat pula karena tidak ada kerjasama dengan enzim lain seperti β ,1-3 glukanase. Kitin dan glukan merupakan komponen utama penyusun dinding sel jamur sehingga adanya kitinase dan β ,1-3 glukanase akan meningkatkan degradasi dinding sel jamur lebih efisien. Penelitian yang dilakukan oleh Ji and Kuc (1996) menunjukkan enzim kitinase bekerja secara sinergis dengan β ,1-3 glukanase dalam menghambat perkecambahan spora jamur patogen *Coletrichum lagenarium*, sedangkan kitinase sendiri atau glukanase sendiri tidak begitu efektif menghambat pertumbuhan jamur tersebut.

Uji aktivitas antifungal CHIT 52 terhadap pertumbuhan koloni *Fusarium sp.*

Uji aktivitas antifungal CHIT 52 terhadap miselium jamur *Fusarium* sp. disajikan pada Gambar 3. Pengamatan dilakukan tiap interval waktu 12 jam, zona penghambatan mulai terlihat setelah 3 hari aplikasi enzim. Miselium jamur memenuhi media selama 5 hari. Berbeda dengan *R. solani*, miselium *Fusarium* sp. lebih lambat perkembangannya. Zona penghambatan mulai terlihat pada aplikasi kitinase dengan volume 100 μ l, meskipun pada volume 50 dan 75 μ l, belum menunjukkan adanya zona penghambatan atau relatif sama dengan kontrol.



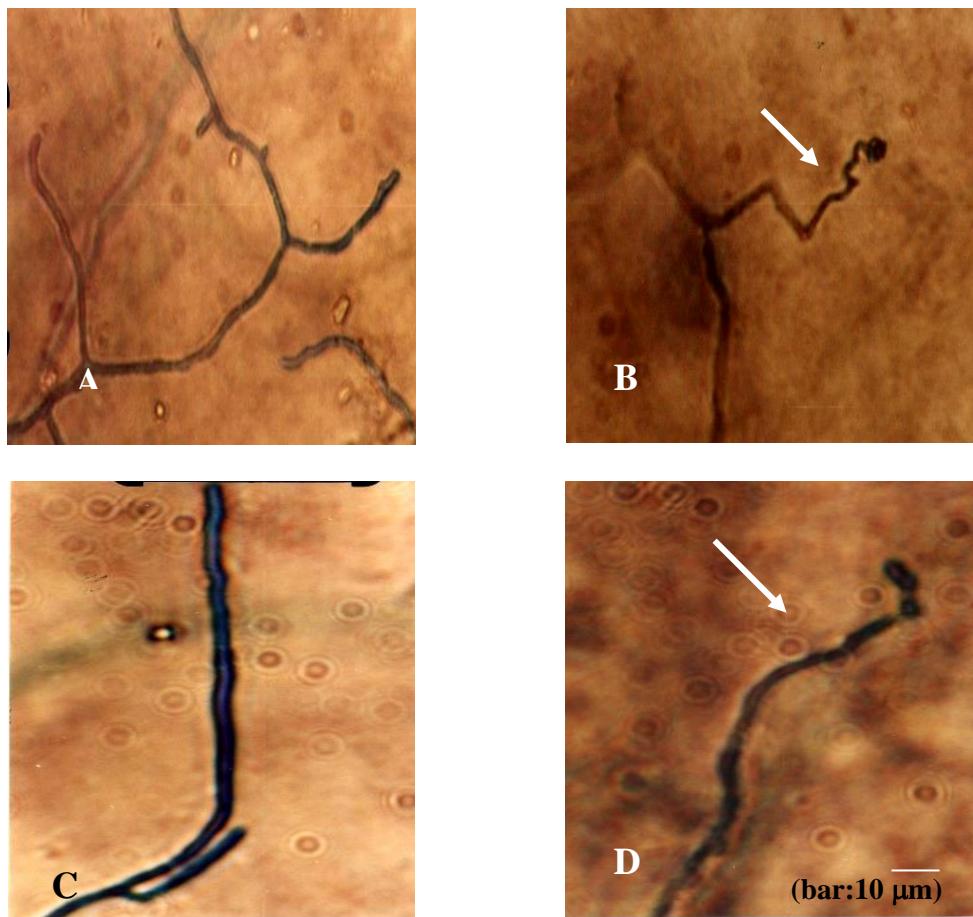
Gambar 3. Aktivitas penghambatan CHIT 52 terhadap perkembangan koloni *Fusarium* sp. pada medium *water agar* 3%. Tampak dari depan berlawanan arah dengan jarum jam: kontrol, 50, 75 dan 100 µl. **Tanda panah** menunjukkan zona penghambatan.



Gambar 4. Aktivitas penghambatan CHIT 52 terhadap perkembangan koloni *Fusarium* sp. dengan menggunakan *paper disk*. Konsentrasi protein yang digunakan dipekatkan menjadi $0,312 \mu\text{g ml}^{-1}$, berlawanan arah dengan jarum jam kontrol, 50, 75 dan 100 µl. Tanda panah menunjukkan zona penghambatan.

Pengamatan lebih lanjut enzim diaplikasikan dengan menggunakan *paper disk* (Gambar 4.). Konsentrasi protein dipekatkan menjadi $0,312 \mu\text{g ml}^{-1}$. Zona penghambatan diamati setiap 12 jam, setelah tiga hari pengamatan disekitar *paper disk* miselium mulai terhambat. Pada kontrol maupun *crude protein* tidak

menunjukkan adanya zona penghambatan, sedangkan pada aplikasi CHIT 52 dengan volume 50 µl dan 75 µl mulai sedikit terlihat adanya zona penghambatan. Zona penghambatan terlihat jelas pada aplikasi 100 µl.



Gambar 5. Misarium *Fusarium* sp. A. Hifa normal tanpa aplikasi CHIT 52. B. Pembengkakan ujung hifa C. Hifa normal tanpa aplikasi CHIT 52, D. Hifa mengalami lisis. Pengamatan dilakukan setelah 7 jam aplikasi CHIT 52. (Pembesaran 100 x).

Pengamatan mikroskopi terhadap pertumbuhan hifa dengan pembesaran 100 x menunjukkan adanya abnormalitas pertumbuhan hifa pada preparat yang diaplikasikan CHIT 52. Pengamatan dilakukan secara bertahap yaitu : 30, 60, 90, 120 menit dan 7 jam. Pada interval waktu 30 sampai 2 jam belum menunjukkan adanya perubahan morfologi hifa jamur jika dibandingkan dengan kontrol. Perubahan morfologi terlihat dengan adanya pembengkakan yang terjadi pada ujung hifa setelah 7 jam aplikasi (Gambar 5.B). Hasil penelitian ini juga menunjukkan CHIT 52 mampu melisiskan ujung hifa (Gambar 5. D.). Lisisnya ujung hifa ini terjadi akibat

terhidrolisisnya kitin yang terdapat pada dinding sel jamur. Hifa yang mengalami abnormalitas pertumbuhan kurang lebih mencapai 40 % dari total pengamatan.

KESIMPULAN

Secara *invitro* aktivitas antifungal CHIT 52 dapat menghambat patogen penyebab penyakit rebah semai *Fusarium* sp dengan melisiskan ujung hifa.

SARAN

Pengaruh CHIT 52 terhadap *R. solani* perlu dikaji lebih lanjut melalui peningkatan konsentrasi protein dan kombinasi dengan enzim β ,1-3 glukanase.

DAFTAR PUSTAKA

- Albrecht, C., Asselin, A., Piche, Y. and Lapeyrie F. 1994. Chitinase Activities are Induced in *Eucaliptus globulus* Roots by Ectomycorrhizal or Phatogenic Fungi During Early Colonization. *Physiol. Plantarum.* 91: 104–110.
- Cabib, E. 1987. The Synthesis and Degradation of Chitin *dalam* A. Meister (Ed). *Advances in Enzymology and Related Areas of Molecular Biology.* John Wiley and Sons, New York. 59: 59-101.
- Duschene, L.C. 1996. Role of Mychorrhizae Fungi in Biocontrol *dalam*. Pfleger, F.L. and Linderman, R.G. *Mychorrhizae and Plant Health.* APS Press. St Paul, Minnesota. 334.
- Handayani, A, S.M. Widyastuti, S. Margino, 2005. Isolasi Dan Karakterisasi Kitinase Akar Tusam (*Pinus merkusii* Jungh. *et de Vriese*) Yang Bersimbiosis Dengan Jamur Mikoriza-Ekto. *Jurnal Perlindungan Tanaman*, Vol. 11 (2), 2005: 96 - 104.
- Hartman, G.E., Hayes, C.K., Lorito, M., Broadway, R.M., Diepitro A., Peterbeauer, C. and Tronsmo, A. 1993. Chitynolityc Enzymes of *Trichodherma harzianum*: Purification Chitobiosidase and Endochitinase. *Phitopathol.* 83: 313-318.
- Hou, W.C., Chen, Y.C. and Lin, Y.H. 1998. Chitinase Activity of Sweet Potato (*Ipomoea batatas* [L.] Lam var Tainong 57). *Bot. Bull. Acad. Sin.* 39: 93-97.
- Huynh, N.V. 2002. Volarization of Chitin with the Aim of Production of Biofungicides. VAR Venterinary and Agrochemical Research Centre.
- Ji, C. and Kuc, J. 1996. Antifungal Activity of Cucumbar β -1,3 Glucanase and Chitinase. *Physiol. and Mol. Plant. Pathol.* 49: 257-265.
- Pozo, M.J., Aguilar, C.A., Gaudot, E.D. and Barea, J.M. 1998. Chitonase and *Chitinase Activities in Tomato Roots During Interactions with Arbuscular Mycorrhizal Fungi or Phytophthora parasitica*. *Experimen. Botan.* 49 (327): 1729-1739.
- Sorionegara, I. dan Lemmens, M.J. 1996. *PROSEA. Plant Resources of South -East Asia* 5: (1) Timber Trees; Major Commercial Timbers. Prosea Fondation, Bogor. 349-357.
- Sumardi dan Widyastuti, S.M. 2000. Identifikasi Gangguan pada Persemaian Pinus penanggulangan Serta Pencegahannya. Laporan Penelitian Kerjasama Fakultas Kehutanan UGM-Perhutani.
- Vannini, A., Coruso, C., Leonardi, L., Rugini, E., Chiarot, E., Caporale, C. and Buonocore, V. 1999. Antifungal Properties of Chitinase from *Castenea sativa* against Hypovirulent and Virulent Strains of the Chesnut Blight Fungus *Crypponectria parasitica*. *Physiol. Mol. Plant. Pathol.* 55: 29- 35.
- Widyaningsih, S. 2003. Produksi Fitoaleksin pada Tusam (*Pinus merkusii* Jungh. *et de Vriese*) sebagai Respon Infeksi Jamur Mikorisa. Tesis.Fakultas kehutanan UGM, Yogyakarta.
- Wen, M., Sheng, T., Yu, C. and Kuen, L. 2002. Purification, Characterization and Cloning of a Chitinase from *Bacillus* sp. NCTU2. *Biotehnol. Appl. Biochem.* 35: 213-219.

