

**ISOLASI DAN KARAKTERISASI KITINASE AKAR TUSAM
(*Pinus merkusii* Jungh. et de Vriese) YANG BERSIMBIOSIS
DENGAN FUNGI EKTOMIKORISA**

***ISOLATION AND CHARACTERIZATION CHITINASE IN TUSAM
(Pinus merkusii Jungh. et de Vriese) ROOTS DURING SYMBIOSIS WITH
ECTOMYCORRHIZAL***

A. Handayani

PS. Bioteknologi, Pasca Sarjana Universitas Gadjah Mada, Yogyakarta

S.M. Widyastuti

Fakultas Kehutanan Universitas Gadjah Mada, Yogyakarta

S. Margino

Fakultas Pertanian Universitas Gadjah Mada, Yogyakarta

e-mail: smwidyastuti@yahoo.com

website: <http://smwidyastuti.staff.ugm.ac.id>

ABSTRACT

The experiment was aimed to detect the activity and characterize the chitinase of tusam root during ectomycorrhizal symbiosis. Tusam inoculated with tusam stands soil from Kaliurang as fungi inocula. Crude proteins were isolated from 4, 6, and 8 weeks age of tusam. Chitinase activity and isoform were detected using glycol chitin as a subtrat. The enzyme was purified by ammonium sulfat precipitation, dialysis, followed by gel filtration chromatography. The results showed that tusam produced chitinase with a molecular weight of approximately 52 kDa. The optimum activity was at pH 5 and temperature of 30°C.

Key words: *isolation, characterization, chitinase, ectomycorrhizal, tusam*

INTISARI

Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui aktivitas dan karakterisasi kitinase yang terjadi waktu akar tusam bersimbiosis dengan fungi ektomikorisa. Semai tusam diinokulasi dengan fungi ektomikorisa, yang berasal dari tanah dibawah tegakan di Kaliurang. Protein kasar diisolasi dari semai tusam pada umur 4, 6, dan 8 minggu. Aktivitas kitinase dan isoform dideteksi menggunakan substrat glikol kitin. Pemisahan protein diawali pengendapan dengan ammonium sulfat, dialisis, dilanjutkan dengan kromatografi gel filtrasi. Hasil penelitian menunjukkan bahwa tusam memproduksi kitinase yang mempunyai berat molekul 52 kDa, suhu 30°C, dan pH optimum 5.

Kata kunci: isolasi, karakterisasi, kitinase, ektomikorisa, tusam

PENGANTAR

Tusam (*Pinus merkusii* Jungh. *et de* Vriese.) merupakan salah satu komoditas hutan yang cukup penting untuk dikembangkan di Indonesia. Kelebihan tusam 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 yang dihadapi dalam pengembangan tusam berkaitan dengan masih rendahnya kualitas dan kuantitas semai tusam. Kegagalan penyediaan bibit tusam di Indonesia khususnya di Jawa Tengah banyak disebabkan oleh fungi patogen tular tanah *Fusarium* sp., dengan tingkat serangan mencapai 45% (Sumardi dan Widyastuti, 2000).

Inokulasi mikorisa mampu melindungi semai tusam dari serangan patogen terutama patogen penyebab penyakit lodoh (*damping off*). Mekanisme perlindungan tanaman oleh fungi ektomikorisa berkaitan dengan kemampuannya dalam: 1) barrier fisik yaitu adanya mantel fungi yang menyelimuti perakaran tanaman, 2) antibiosis, 3) sintesis substansi antifungal (Duschene, 1996).

Respon tanaman akibat adanya fungi mikorisa salah satunya melalui akumulasi *pathogen related protein* yaitu kitinase. Infeksi mikorisa 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*-asetilglukosamin (Cabib, 1987; Hunyh, 2002).

Aktivitas kitinase akar tusam sebagai respon masuknya hifa fungi mikorisa belum diketahui dengan jelas. Penelitian ini bertujuan untuk 1) mengetahui aktivitas kitinase pada akar tusam yang diinfeksi fungi ektomikorisa 2) karakterisasi kitinase meliputi berat molekul, pH

optimum dan suhu optimum. Penelitian ini diharapkan dapat memberikan informasi mengenai peran mikorisa dalam mekanisme ketahanan tanaman dari serangan fungi patogen penyebab lodoh.

BAHAN DAN METODE

Inokulasi. Media tanam diinokulasi dengan menggunakan campuran inokulum tanah bermikorisa yang berasal dari tanah tegakan tusam di Kaliurang, dan pasir steril dengan perbandingan 30% dan 70%. Sebagai kontrol digunakan tanah tidak bermikorisa. Semai tusam dipanen pada umur 4, 6, dan 8 minggu.

Eksktraksi. Prosedur ekstraksi berdasar metode Vannini *et al.*, (1999) Semua prosedur kerja dilakukan pada suhu 4°C. 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% *Polyvinylpirolidone* 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 dkk., 1998). Campuran diinkubasikan dalam *waterbath* pada suhu 37°C selama 30 menit. Reaksi dihentikan dengan penambahan 0,5 ml DNS selanjutnya campuran dimasukkan dalam air mendidih selama 15 menit (Wen *et al.*, 2002). Absorbansi sampel dilihat pada OD_{540 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.

Konsentrasi protein. Konsentrasi protein ditentukan dengan menggunakan metode Biorad. Sebagai standar digunakan *bovine serum albumin* (BSA) untuk menghitung kadar protein sampel.

Deteksi isoform kitinase. Sampel protein dianalisis menggunakan natif PAGE (Muzarelli dan Peter, 1997). Gel diinkubasikan dalam 100 ml 0,1 M sodium acetat pH 5 selama 5 menit. Gel ditempelkan di atas gel substrat yang mengandung 0,01% glikol kitin (0,75% acrylamide; 0,75 mm). Kedua gel diapit diantara dua *plate glass* lalu diinkubasi pada suhu 37°C dalam kondisi lembab (4-16 jam). Setelah inkubasi gel substrat dicat dengan 0,01% M2R dalam 0,5 M Tris HCl pH 8,8 selama 5 menit dalam keadaan gelap. *Destaining* dilakukan dalam gelap dengan akuades selama satu jam. Aktivitas kitinase tampak dari zona gelap yang dihasilkan menutupi flouresence pada saat dilihat di bawah sinar UV (Trudel dan Asselin, 1989).

Pemisahan protein. *Crude protein* dipekatkan dengan menggunakan amonium sulfat 70%, disentrifugasi dengan kecepatan 3500 rpm selama 30 menit. Pelet diresuspensi dengan akuades kemudian didialisis menggunakan 20 mM bufer tris HCl pH 8,2 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-fraksi yang telah terkumpul diuji (1) kandungan protein total tiap fraksi pada OD_{280nm}, dan (2) aktivitas kitinase pada fraksi yang menunjukkan adanya protein dari uji kandungan total. Fraksi yang menunjukkan aktivitas kitinase dipekatkan

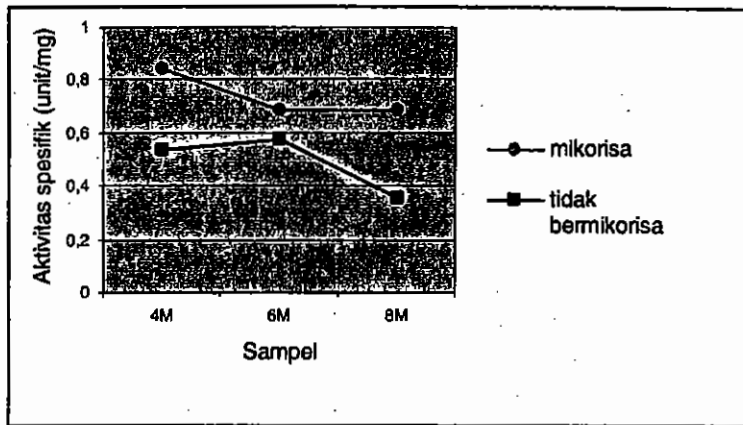
dengan PEG (Hartman dkk., 1993).

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

HASIL DAN PEMBAHASAN

Aktivitas kitinase akar tusam bermikorisa. Hasil yang diperoleh menunjukkan bahwa semai tusam bermikorisa umur 4, 6, dan 8 minggu mempunyai aktivitas kitinase lebih tinggi dibanding semai yang tidak bermikorisa (Gambar 1). Peningkatan aktivitas kitinase pada semai bermikorisa menunjukkan bahwa semai tusam merespon masuknya hifa fungi mikorisa dengan cara memproduksi enzim-enzim hidrolitik yang berperan dalam mekanisme ketahanan tanaman.

Penelitian yang dilakukan Sauter dan Hager (1989) menunjukkan hasil yang sama yaitu terjadinya peningkatan aktivitas kitinase oleh infeksi fungi ektomikorisa *A. muscaria* pada akar *P. abies*. Penelitian tersebut juga memberikan informasi bahwa komponen dinding sel fungi ektomikorisa *A. muscaria* berperan sebagai elisitor atau senyawa dengan berat molekul rendah yang dapat mengimbas reaksi-reaksi ketahanan. Peningkatan aktivitas kitinase pada tanaman bermikorisa diduga karena elisitor kitin dipotong oleh kitinase apoplastik pada membran plasma menjadi monomer N-asetylglukosamine (Salzer *et al.*, 2002).



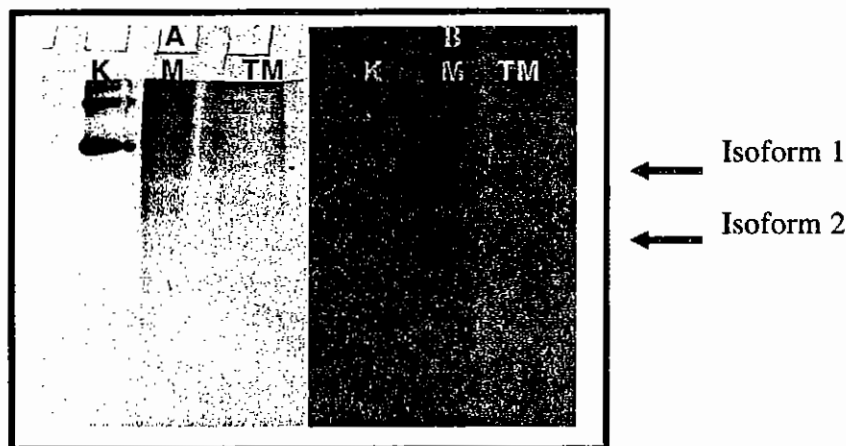
Gambar 1. Aktivitas spesifik kitinase dari *crude protein* semai tusam bermikorisa dan tidak bermikorisa umur 4, 6, dan 8 minggu.

Pertambahan umur tanaman mempengaruhi aktivitas kitinase. Aktivitas kitinase tertinggi ditunjukkan pada akar tusam umur 4 minggu kemudian mengalami penurunan pada umur 6 dan 8 minggu (Gambar 1). Berdasarkan hasil ini maka untuk analisis selanjutnya digunakan semai tusam umur 4 minggu. Tingginya aktivitas kitinase pada semai tusam umur 4 minggu berkaitan dengan terjadinya proses awal berkembangnya hifa fungi pada perakaran tanaman. Proses penetrasi diawali dengan terjadinya kontak hifa dengan akar. Setelah terjadi pengenalan dan penempelan, miselium memperbanyak diri di permukaan akar dan terdiferensiasi membentuk mantel, yang selanjutnya hifa mulai melakukan penetrasi pada sel epidermis untuk membentuk jala hartig (Brundrett *et al.*, 1996). Pada 4 minggu awal diduga terjadi perubahan metabolisme akibat adanya proses penetrasi tersebut sedangkan dengan pertambahan umur tanaman diduga hifa fungi sudah mulai berasosiasi dengan jaringan tanaman sehingga akumulasi kitinase sudah mulai mengalami penurunan dan relatif stabil.

Penelitian yang dilakukan Albrect *et al.*, (1994) menunjukkan masuknya hifa mikorisa tidak hanya diikuti peningkatan

aktivitas kitinase tetapi adanya peningkatan senyawa lain yaitu peroksida yang berperan juga dalam mekanisme ketahanan tanaman. Penelitian terdahulu (Anggoro, 2003) menunjukkan adanya peningkatan β ,1-3 glukonase pada tusam umur 6 minggu. Hal ini mengindikasikan bahwa diduga pertambahan umur tanaman menyebabkan terdegradasinya kitinase dan mengaktifkan mekanisme ketahanan yang lain salah satunya adalah β ,1-3 glukonase.

Deteksi isoform kitinase. Isoform kitinase dideteksi menggunakan *crude protein* akar tusam. Elektroforesis dilakukan dalam kondisi natif agar enzim masih dalam konformasi alaminya. *Crude protein* di-running dalam satu gel dengan dua perlakuan yang sama (Gambar 2A dan 2B). Setelah elektroforesis selesai gel dipotong menjadi dua, gel pertama dilakukan pengecatan menggunakan *coomassie brilliant blue R-250*, dan gel kedua ditempelkan pada gel substrat agar diketahui band-band yang tervisualisasi pada saat dicat dengan *coomassie brilliant blue R-250* dan band yang mempunyai aktivitas kitinase. Sebagai kontrol digunakan *Bovine Serum Albumin (BSA)*.



Gambar 2. Natif PAGE *crude protein* akar semai tusam umur 4 minggu. Gel A: pengecatan dengan *coomassie brilliant blue* R-250. Gel B: pengecatan aktivitas kitinase. Mikorisa (M), Tidak bermikorisa (TM), BSA (K). Tanda panah menunjukkan isoform.

Pada gel yang dicat dengan *coomassie brilliant blue* R-250, band BSA tampak sedangkan *crude protein* tidak menunjukkan adanya band karena konsentrasi proteinnya rendah. *Crude protein* tidak tampak pada pengecatan dengan *coomassie brilliant blue* R-250, namun demikian pada pengecatan aktivitas terdapat band dengan warna yang lebih gelap di bawah sinar UV. Berbeda dengan *crude protein*, BSA tidak mempunyai aktivitas kitinase sehingga tidak terdeteksi pada pengecatan aktivitas.

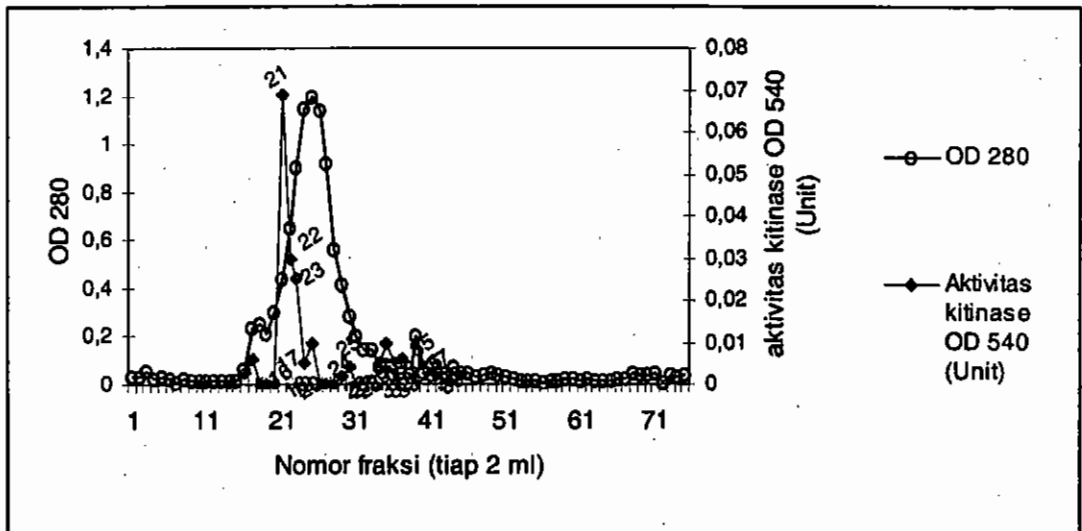
Hasil deteksi menunjukkan tidak ada perbedaan jumlah isoform kitinase (Gambar 2B). Akar tusam bermikorisa mempunyai band lebih tebal jika dibandingkan dengan akar tidak bermikorisa. Penelitian yang dilakukan oleh Albrecht dkk. (1994) pada akar *E. globulus* menunjukkan hasil yang sama yaitu tidak ada perbedaan jumlah isoform antara kontrol dengan akar yang diinokulasi mikorisa. Hasil deteksi isoform kitinase tersebut berkorelasi dengan aktivitas kitinase.

Pemisahan kitinase. Fraksi-fraksi hasil elusi selanjutnya diukur serapannya pada $OD_{280\text{ nm}}$

untuk melihat gambaran pola pemisahan protein sampel. Fraksi-fraksi yang membentuk puncak pada $OD_{280\text{ nm}}$ yaitu fraksi nomor 17 sampai fraksi 39 (Gambar 3).

Gambar 3 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, ditunjukkan dengan penurunan nilai absorbansi 280 nm pada fraksi berikutnya. Fraksi-fraksi yang membentuk puncak tersebut selanjutnya dianalisis aktivitas kitinasenya pada 540 nm. Aktivitas kitinase tertinggi pada fraksi nomor 21, 22, dan 23.

Rekapitulasi pemisahan dengan kromatografi gel filtrasi menghasilkan tingkat pemisahan yang lebih baik jika dibandingkan dengan pengendapan menggunakan amonium sulfat dan dialisis (Tabel 1). 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.



Gambar 3. Profil elusi protein kolom kromatografi gel filtrasi dan aktivitas kitinase. Aktivitas kitinase tertinggi pada fraksi ke 21,22,23.

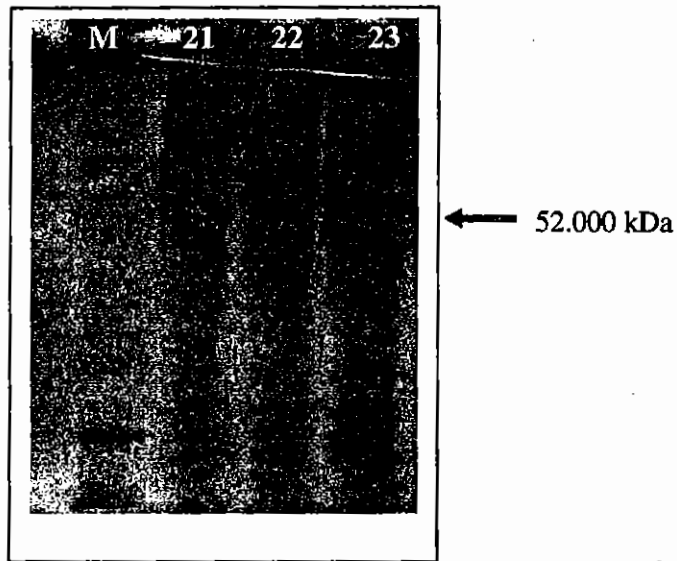
Tabel 1. Rekapitulasi pemisahan kitinase akar semai tusam

Langkah pemurnian	protein		Kitinase		Jumlah total (unit tot)	Tingkat pemurnian	Recovery (%)
	Vol (ml)	Protein total (mg)	Konsentrasi (unit/ml)	Aktv. spesifik (unit.mg ⁻¹)			
<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

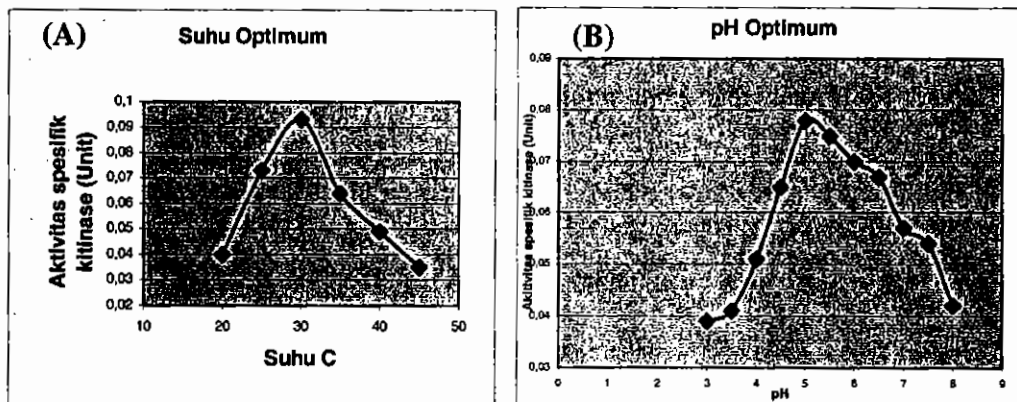
Berat molekul. Hasil visualisasi dari fraksi ke 21, 22, dan 23 yang mempunyai aktivitas kitinase tertinggi menunjukkan bahwa ketiga fraksi mempunyai BM yang sama (Gambar 4). Berat molekul kitinase yang dihasilkan sekitar 52 kDa berdasarkan kurva kalibrasi mobilitas relatif protein standar.

Kitinase yang dimurnikan dari tanaman pada umumnya mempunyai berat molekul

sekitar 30 kDa (Chang dkk., 1992; Yamagami dan Funatsu, 1993), namun demikian berat molekul kitinase cukup bervariasi dan pada satu tanaman seringkali ditemukan lebih dari satu kitinase. Salzer *et al.*, (1997) memurnikan kitinase dari akar *P. abis* yang bersimbiosis dengan ektomikorisa dengan berat molekul 36 kDa dan 28 kDa.



Gambar 4. Profil protein hasil kromatografi gel filtrasi dengan pengecatan *silver*. Lajur 1 Marker, lajur 2: fraksi ke-21, lajur 3 : fraksi ke-22, lajur 23 : fraksi ke-23.



Gambar 5. Pengaruh suhu dan pH terhadap aktivitas kitinase. (A) Nilai suhu optimum dicapai pada suhu 30° C. (B) Nilai pH optimum dicapai pada pH 5. Konsentrasi protein yang digunakan untuk masing – masing pengamatan adalah 0,156 $\mu\text{g ml}^{-1}$. Data merupakan hasil rata-rata dua ulangan percobaan.

Suhu optimum. Kisaran suhu untuk aktivitas kitinase relatif sempit yaitu sekitar 20–45°C (Gambar 5A). Aktivitas kitinase meningkat seiring dengan kenaikan suhu dan mencapai aktivitas optimumnya pada suhu 30°C, setelah itu terjadi penurunan. Pada beberapa penelitian sebelumnya didapatkan hasil bahwa kitinase

mempunyai kisaran suhu optimum yang bervariasi. Tanaman kentang memiliki aktivitas suhu optimum 25°C (Hou *et al.*, 1998), padi jagung 45°C (Lin *et al.*, 1982) dan kubis 40 sampai 50°C (Chang *et al.*, 1992). Pada penelitian ini dapat dikatakan bahwa kitinase relatif kurang tahan terhadap pemanasan.

pH optimum. Uji aktivitas kitinase pada berbagai tingkat pH relatif lebar, aktivitas tertinggi berada pada pH 5 dan turun seiring dengan naiknya pH (Gambar 5B). Penelitian lain yang menunjukkan aktivitas kitinase optimum pada pH 5 antara lain pada kubis (Chang *et al.*, 1992), jagung (Lin *et al.*, 1982) dan rye (Yamagami dan Funatsu, 1993). Penelitian yang telah dilakukan menunjukkan bahwa kitinase pada umumnya mempunyai aktivitas optimum pada pH asam.

KESIMPULAN

Kitinase dari akar tusam mempunyai berat molekul 52 kDa dengan menunjukkan aktivitas optimum pada pH optimum 5 dan suhu optimum 30°C.

UNGKAPAN TERIMA KASIH

Penulis menyampaikan terimakasih kepada Proyek Hibah Bersaing X tahun anggaran 2004 (No kontrak:19/P21PT/DPPM/PHBL/III/2004) yang telah membiayai penelitian ini.

DAFTAR PUSTAKA

- Albrecht, C., A. Asselin., Y. Piche & F. Lapeyrie. 1994. Chitinase Activities are Induced in *Eucalyptus globulus* Roots by Ectomycorrhizal or Pathogenic Fungi During Early Colonization. *Physiol. Plantarum.* 91: 104-110.
- Anggoro, M.D. 2003. Isolasi dan Karakterisasi α -1,3 Glukanase Akar Tusam (*Pinus merkusii* Jungh. et de Vriese) yang Berasosiasi dengan Jamur Pembentuk Ektomikorisa. *Tesis. Pusat Studi Bioteknologi, UGM, Yogyakarta.* Tidak dipublikasikan.
- Brundrett, M., N. Bougher., B. Dell., T. Grove & N. Malajczuk. 1996. Working with *Mycorrhizas in Forestry and Agriculture.* ACIAR, Canberra. 374p.
- 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.
- Chang, C.T., H.F. Lo., C.J. Wu & H.Y. Sung. 1992. Purification and Properties of Chitinase from Cabbage. *Biochem. Int.* 28: 707-715.
- Duschene, L.C. 1996. Role of Mycorrhizae Fungi in Biocontrol *dalam.* Pflieger, F.L. dan R.G. Linderman. *Mychorrhizae and Plant Health.* APS Press. St Paul, Minesota. 334p.
- Hartman, G.E., C.K. Hayes., M. Lorito., R.M. Broadway., A. Diepitro., C. Peterbeauer & A. Tronsmo. 1993. Chitinolytic Enzymes of *Trichoderma harzianum*: Purification Chitobiosidase and Endochitinase. *Phitopathol.* 83: 313-318.
- Hou, W.C., Y.C. Chen & Y.H. Lin. 1998. Chitinase Activity of Sweet Potato (*Ipomoea batatas* [L.] Lam var Tainong 57). *Bot. Bull. Acad. Sin.* 39: 93-97.
- Hunyh, N.V. 2002. *Volarization of Chitin with the Aim of Production of Biofungicides.* VAR Venetrinary and Agrochemical Research Centre.
- Laemmli, U.K. 1970. Cleavage of Sturtural Protein During The Asembly of The Head of Bacteriophage T4. *Nature, London.* 227: 680-685.
- Lin, Z.F., D. Wu., A. Luo & W. Zhang. 1982. Chitinase from Seed of *Zea mays* and *Coix lachrymajobi* L. Purification and some Properties. *Process Biochem.* 27: 83-88.

- Muzarelli, R.A.A. & M.G. Peter. 1997. Gel Electrophoretic analysis of Chitinase, Chitonase and Chitin Deacetylase In *Chitin Handbook*. European Chitin Society. Torrette, AN, Italy. 237-242.
- Pozo, M.J., C.A. Aguilar., E.D. Gaudot & J.M. Barea. 1998. Chitonase and Chitinase Activities in Tomato Roots During Interactions with Arbuscular Mycorrhizal Fungi or *Phytophthora parasitica*. *Experimen. Botan.* 49 (327): 1729-1739.
- Salzer, P., B. Hubner, A. Sirrenberg & A. Hager. 1997. Differential Effect of Purified Spruce Chitinase and α -1,3 Glucanases on the Activity of Elicitors from Ectomycorrhizal Fungi. *Plant. Physiol.* 114: 957-968.
- Salzer, P., H. Corbiere., M. Engelhard., R. Godat., T. Boller & A. Wiemkema. 2002. Molecular Biology of Symbiosis. *Molecular Biology of Symbiosis*. Htm. 1-5.
- Sauter, M. & A. Hager. 1989. The Mycorrhizal Fungus *Amanita muscaria* Induces Chitinase Activity in Roots Suspension-Cultured Cells of Its Host *Picea abies*. *Planta.* 179: 61-66.
- Soerianegara, I. & M.J. Lemmens. 1996. *PROSEA. Plant Resources of South -East Asia 5 : (1) Timber Trees; Major Commercial Timbers*. Prosea Foundation, Bogor. 349-357.
- Sumardi & S.M. Widyastuti. 2000. Identifikasi Gangguan pada Persemaian Pinus penanggulangan Serta Pencegahannya. *Laporan Penelitian Kerjasama Fakultas Kehutanan UGM-Perhutani*.
- Trudel, J. & A. Asselin. 1989. Detection of Chitinase Activity after Polyacrylamide Gel Electrophoresis. *Anal. Biochem.* 178: 362-366.
- Vannini, A., C. Coruso., L. Leonardi., E. Rugini., E. Chiarot., C. Caporale. & V. Buonocore. 1999. Antifungal Properties of Chitinase from *Castanea sativa* against Hypovirulent and Virulent Strains of the Chesnut Blight Fungus *Crryponectria parasitica*. *Physiol. Mol. Plant. Pathol.* 55: 29- 35.
- Wen, M., T. Sheng., C. Yu & L. Kuen. 2002. Purification, Characterization and Cloning of a Chitinase from *Bacillus* sp. NCTU2. *Biotechnol. Appl. Biochem.* 35: 213-219.
- Yamagami, T. & G. Funatsu. 1993. Purification and some Properties of Three Chitinases from the Seed of Rye. *Biosic. Biotech. Biochem.* 57: 643-647.