

DEGRADASI DINDING SEL *Phytophthora capsici* OLEH ENZIM KARBOSI METIL SELULASE ASAL *Trichoderma harzianum*

KARDEN MULYA¹ dan MELLY HARMEN²

¹ Balai Penelitian Tanaman Rempah dan Obat

² Mahasiswa Fakultas MIPA, Institut Pertanian Bogor

RINGKASAN

Phytophthora capsici Leonian adalah patogen penyebab penyakit busuk pangkal batang lada (*Piper nigrum* L.). *Trichoderma harzianum* Rifai merupakan agen hayati yang efektif dan menyebabkan lisis miselia *P. capsici*. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui peran enzim karboksimetilaselulase (CMC-ase) yang diproduksi oleh *T. harzianum* dalam mendegradasi dinding sel *P. capsici*. Penelitian terdiri atas tiga aktivitas yaitu (a) deteksi produksi enzim CMC-ase, (b) hidrolisis dinding sel *P. capsici*, dan (c) penggunaan siapan kasar dinding sel (SKDS) *P. capsici* oleh *T. harzianum* sebagai satu-satunya sumber karbon dalam media tumbuhnya. Aktivitas enzim dideteksi secara kualitatif dengan membandingkan zona bening yang terbentuk pada medium karboksi metil selulosa (CMC) yang diperlakukan dengan satu tetes filtrat kultur *T. harzianum* dan diwarnai dengan larutan *congo red*, sedangkan aktivitas CMC-ase secara kuantitatif diukur sebagai nilai setara glukosa yang terlepas dari substrat setelah diinkubasi dengan ekstrak kasar CMC-ase. Enzim CMC-ase diekstrak dari kultur filtrat *T. harzianum* E51 melalui pengendapan protein dengan 85% ammonium sulfat pada suhu 4°C diikuti dengan sentrifusi dan dialisis. Aktivitas spesifik enzim tersebut dalam mendegradasi CMC (30,29 unit/ μ g protein) lebih rendah dari aktivitas enzim selulase komersial (97,18 unit/ μ g protein). Enzim selulase komersial dan ekstrak enzim dari kultur *T. harzianum* juga dapat menghidrolisis SKDS *P. capsici* N2 dengan aktivitas masing-masing 31,18 unit dan 19,26 unit. Isolat E51 tumbuh dan menghasilkan aktivitas enzim serupa manakala karboksimetil selulosa pada media tumbuh diganti dengan SKDS sebagai sumber karbon tunggal. Hasil ini menunjukkan bahwa CMC-ase berperan penting dalam mekanisme antagonis *T. harzianum* terhadap *P. capsici*. Penelitian lebih lanjut dalam mekanisme produksi enzim ini berpeluang untuk meningkatkan potensi agen hayati.

Kata kunci: *Piper nigrum* L., *Trichoderma harzianum* Rifai, *Phytophthora capsici*, karboksimetilaselulase, agen hayati

ABSTRACT

Degradation of cell wall of Phytophthora capsici N2 by carboxy methyl cellulose of Trichoderma harzianum E51

Phytophthora capsici Leonian is a causal agent of foot rot disease on black pepper (*Piper nigrum* L.). *Trichoderma harzianum* Rifai is an effective biocontrol agent and causes lyses on *P. capsici* mycelium. This experiment was aimed to study the role of carboxymethylcellulose (CMC-ase) produced by *T. harzianum* in degrading *P. capsici* cell wall. The experiment was composed in three activities (a) detection of the CMC-ase enzyme production, (b) degradation of *P. capsici* cell wall by crude extract of the enzyme, and (c) utilization of crude cell wall preparation (cwp) of *P. capsici* by *T. harzianum* as single carbon source in its growth medium. CMC-ase activity was detected qualitatively on carboxymethylcellulose (CMC) medium, and quantitatively it was measured as glucose equivalent released from substrate after treated with crude extract of CMC-ase. CMC-ase was extracted from culture filtrate of *T. harzianum* E51 by precipitation of protein with 85% ammonium sulphate at 4°C followed by dialysis with distilled water and lyophilized. Activity of the extracted enzyme on degradation of CMC (30.29 unit/ μ g protein) was lower than activity of commercial cellulase (97.18 unit/ μ g protein). Commercial cellulase and the extracted enzyme also degraded crude cell wall prepared (CWP) from *P. capsici* N2 as indicated with the presence of glucose equivalent released from CWP after incubation with the enzyme; with

specific activity of 31.18 unit and 19.26 unit respectively. *Trichoderma harzianum* grown in medium supplemented with the crude cell wall of *P. capsici* as a single carbon source produced CMC-ase. Those results indicated that CMC-ase has important role on parasitism of *T. harzianum* on *P. capsici*. Further investigation is required to elucidate mechanism of production of CMC-ase in *T. harzianum* for improvement of biocontrol activity of the fungus.

Key words: *Piper nigrum* L., *Trichoderma harzianum* Rifai, *Phytophthora capsici*, carboxymethylcellulose, biocontrol

PENDAHULUAN

Penyakit busuk pangkal batang merupakan salah satu kendala utama dalam budidaya lada (*Piper nigrum* L.). Penyakit ini disebabkan oleh *Phytophthora capsici* Leonian yang termasuk ke dalam Oomycetes. *P. capsici* terutama menginfeksi akar dan bagian pangkal batang. Gejala berupa layu hanya muncul setelah bagian akar atau pangkal batang rusak (HOLIDAY dan MOWAT, 1963), sehingga upaya pengendalian secara kuratif dengan fungisida sering gagal. Pemakaian fungisida yang intensif menjadi beban dalam usahatani lada dan berpotensi menyebabkan resistensi patogen terhadap fungisida tersebut. Di samping itu, belum ada kultivar lada yang tahan terhadap infeksi *P. capsici*. Untuk itu, alternatif lain yang dapat mengurangi pemakaian fungisida perlu dicari.

Pengendalian hayati merupakan salah satu komponen pengendalian penyakit tular tanah yang ramah lingkungan (PAPAVIZAS dan LEWIS, 1991). *Trichoderma* spp. adalah agen hayati yang paling potensial untuk mengendalikan jamur patogen antara lain karena menghasilkan enzim β -1,3-glukanase yang dapat menghancurkan dinding sel miselia jamur (WHIPPS, 2001). Beberapa jamur patogen yang dapat dihambat pertumbuhannya oleh *T. harzianum* Rifai antara lain *Sclerotium cepivorum* Berk, *Rhizoctonia solani* Kuhn, *Pythium* spp., *P. capsici* dan *Verticillium dahliae* Klebb (SMITH *et al.*, 1990). MULYA dan MANOHARA (1988) berhasil mengisolasi jamur *T. harzianum* galur TSM dari tanah tanaman lada yang dapat menyebabkan pertumbuhan *P. capsici* terhambat dan miselinya mengalami lisis. Menurut IRAWADI (1990), *T. harzianum* menghasilkan enzim endoglukanase atau *carboxymethyl cellulase* (CMC-ase) yang termasuk dalam kompleks enzim selulase.

Kemampuan *T. harzianum* memparasit jamur patogen merupakan komponen penting dalam mekanisme

pengendalian hayati. Mekanisme parasitismenya bergantung terhadap produksi enzim litik termasuk khitinase, β -1,3-glukanase dan protease (COTES *et al.* dalam LIMON *et al.*, 1999). Penelitian terhadap peran khitinase dalam pengendalian hayati telah banyak dilaporkan, namun sedikit sekali informasi tentang enzim selulolitik dalam pengendalian jamur patogenik Oomycetes termasuk *Phytophthora* yang mengandung banyak selulosa sebagai komponen dinding selnya (MIGHELI *et al.*, 1998).

Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui peran CMC-ase dari *T. harzianum* E51 dalam menghambat pertumbuhan *P. capsici* N2. Informasi ini dapat menjadi salah satu dasar dalam meningkatkan pemanfaatan *T. harzianum* untuk mengendalikan penyakit busuk pangkal batang pada tanaman lada.

BAHAN DAN METODE

Jamur dan kondisi kultur Tiga galur *T. harzianum* (E51, N3A, dan TSM) dipelihara pada media agar dekstrosa kentang (ADK) dalam tabung kultur. Inokulum dipersiapkan dengan menumbuhkan dahulu pada media agar karbosi metil selulosa (CORONEL dan JOSON, 1986) pada suhu ruang di bawah sinar TL terus menerus selama 4 hari. Jamur *P. capsici* N2 dibiakan pada media V-8 juice agar (RIBERO, 1978) pada kondisi yang sama dengan pembiakan *T. harzianum*.

Produksi enzim karbositiliselulase Empat sampai lima potong (diameter 5 mm) biakan *T. harzianum* E51 dipindahkan ke dalam 50 ml media karbosi metil selulosa (CMC) cair (6 g $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 1 g K_2HPO_4 , 0.1 g MgSO_4 , 0.1 g CaCl_2 , 0.5 g ekstrak khamir, 16.7 mg FeCl_3 , 6 H_2O , 0.18 mg $\text{ZnSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$, 20.1 mg ethylene diamine tetra acetic acid dan 1% CMC) atau media CMC yang sumber karbonnya diganti berupa siapan kasar dinding sel (SKDS) *P. capsici* N2 (1%) dalam 300 ml-labu erlenmeyer. Kultur diinkubasi pada suhu kamar di bawah sinar TL terus menerus selama 2 minggu tanpa dikocok. Kultur disaring dengan kertas saring Whatman No. 2 dan filtratnya disimpan. Protein (termasuk enzim) yang ada di dalam filtrat diendapkan dengan cara menambahkan sambil diaduk serbuk ammonium sulfat hingga tingkat kejenuhan 85%. Proses ini dilakukan pada suhu sekitar 4°C dengan cara menempatkan filtrat dalam lemari pendingin. Setelah didiamkan semalam, filtrat tersebut disentrifusi selama 40 menit pada suhu 4°C dengan kecepatan 17 400 g untuk menyempurnakan pengendapan. Endapan protein yang diperoleh disuspensikan dalam akuades, kemudian suspensi didialisis semalam pada suhu 4°C dengan 1 500 ml akuades. Dialisat disimpan pada suhu 4°C sampai digunakan.

Isolasi dinding sel *P. capsici* N2 Isolasi dinding sel *P. capsici* dilakukan berdasarkan metode HAHN *et al.*

(1992) dengan beberapa modifikasi. Miselia *P. capsici* diproduksi pada medium V8 cair selama 10 hari dan dipisahkan dari kultur dengan kertas saring Whatman No.2. Untuk menghilangkan sisa media tumbuh, setiap miselia yang diperoleh dari 100 ml kultur dicuci dengan larutan air destilat dan 0.5 M NaCl yang telah didinginkan selama semalam pada suhu 4°C masing-masing 3 kali, dengan 100 ml cairan pencuci untuk setiap pencucian. Dinding sel *P. capsici* diperoleh dengan cara mengeluarkan sitoplasma dari miselia secara mekanis, yaitu masa miselia dalam 100 ml air destilat dingin dihomogenisasi secara bertahap pada suhu 4°C. Dinding sel dimurnikan dengan cara mengekstraksi komponen sitoplasma dengan 500 ml campuran kloroform:etanol 1:1 (v/v). Untuk menghilangkan sisa kloroform, dinding sel dicuci dengan 500 ml aseton. Sisa aseton dihilangkan dengan cara kering angin, kemudian dinding sel didialisis dalam 0.5 M asam asetat dan 8000 ml air destilat. Dinding sel yang diperoleh diliofilisasi.

Pengukuran aktivitas enzim Aktivitas enzim selulase dari *T. harzianum* E51 diukur secara kualitatif dan kuantitatif. Pengukuran secara kualitatif dilakukan dengan cara meneteskan 20 μl filtrat pada media CMC, diinkubasikan selama 60 menit pada suhu 37°C, kemudian diwarnai dengan larutan *congo red* (1 mg/ml) dan dicuci dengan larutan 1 M NaCl masing-masing 15 menit (CORONEL dan JOSON, 1986). Aktivitas enzim diindikasikan dengan terbentuknya zona bening dan dinyatakan dalam skoring diameter zona bening, + : diameter zona bening < 5 mm; ++ : diameter zona bening > 5 mm - < 10 mm; +++ : > 10 mm.

Pengukuran aktivitas enzim secara kuantitatif dilakukan dengan mengukur kadar gula setara glukosa asal substrat yang diinkubasi dengan enzim. Substrat yang digunakan adalah 0.7% (w/v) CMC dalam buffer asetat pH 5.2. Campuran 1 ml substrat dan 1 ml enzim diinkubasi pada suhu 37°C. Setelah diinkubasi selama 60 menit, ditambahkan 2 ml pereaksi DNS kemudian dipanaskan selama 10-15 menit pada penangas air mendidih. Intensitas warna diukur secara spektrofotometri pada panjang gelombang 575 nm (MILLER, 1959). Jumlah glukosa ekuivalen sebagai hasil hidrolisis diperoleh dengan membandingkan nilai absorbansi dengan kurva standar glukosa. Sebagai pembanding untuk menunjukkan aktivitas enzim digunakan enzim selulase komersial (Onozuka®). Kadar protein diukur dengan mengikuti prosedur SEDMAK dan GROSSBERG (1977). Suspensi siapan enzim kasar (2 ml) ditambah pereaksi 5 ml Sedmak dan Grossberg (0.12% coomasie blue G250 dalam 2.2% HCl) kemudian larutan dikocok dan didiamkan selama 5 menit. Larutan lalu diukur absorbansinya pada panjang gelombang 620 nm. Untuk larutan standar protein digunakan BSA (*Bovine Serum Albumin*). Aktivitas dinyatakan dalam aktivitas total (unit per ml filtrat) dan aktivitas spesifik (unit/ μg protein/ml filtrat). Satu unit aktivitas enzim adalah sebanding dengan 1 μmol gula yang dilepaskan oleh 1 ml larutan enzim setiap satu jam.

Hidrolisis dinding sel *P. capsici* Pengujian hidrolisis dilakukan dengan mengukur aktivitas setara glukosa yang terlepas selama hidrolisis dinding sel *P. capsici* oleh CMC-ase hasil perolehan. Prosedur pengujian dilakukan seperti pada pengukuran aktivitas enzim, hanya substrat yang digunakan adalah 0.9% ekstrak dinding sel.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Aktivitas CMC-ase dari tiga galur *T. harzianum*

Aktivitas enzim karboksi metil selulase (CMC-ase) ditunjukkan dengan terbentuknya noktah berwarna bening pada substrat yang mengandung CMC yang ditetesi dengan filtrat dan diwarnai dengan pewarna *congo red*. Zat warna yang berwarna merah terikat pada senyawa CMC tetapi tidak terikat pada senyawa sakarida turunannya (CORONEL dan JOSON, 1986), sehingga pada tempat dimana CMC telah terurai oleh enzim menjadi sakarida, zat warna tidak terikat dan luntur apabila dicuci dengan larutan garam NaCl.

Hasil pengujian aktivitas enzim CMC-ase dari filtrat kultur tiga isolat *T. harzianum* E51, N3A, dan TSM, menunjukkan bahwa isolat E51 memiliki aktivitas lebih besar dari kedua isolat lainnya pada masa inkubasi 30 dan 60 menit (Tabel 1). Untuk itu isolat ini digunakan pada tahap percobaan selanjutnya.

Produksi enzim CMC-ase pada media dengan sumber karbon CMC Aktivitas pemecahan CMC ditunjukkan secara kuantitatif dengan membandingkan aktivitas penguraian CMC oleh filtrat dan enzim selulase komersil, Onozuka® (Gambar 1). CMC dalam substrat diurai oleh enzim menjadi sakarida dan jumlah sakarida yang terurai diukur secara spektrofotometer dan dapat dihitung setara dengan glukosa (SOMOGYI, 1952). Filtrat kultur *T. harzianum* E51 memiliki aktivitas CMC-ase sebesar 34,8 unit dengan aktivitas spesifik sebesar 0,48 unit/ μ g protein, yang meningkat menjadi 1450,08 unit dengan nilai aktivitas spesifik sebesar 30,29 unit/ μ g protein setelah protein yang berada dalam filtrat diendapkan secara parsial dengan 85% ammonium sulfat. Nilai aktivitas spesifik dari 1 000 ppm enzim selulosa komersial adalah 97,18 unit/ μ g protein atau tiga kali lebih kuat dari filtrat.

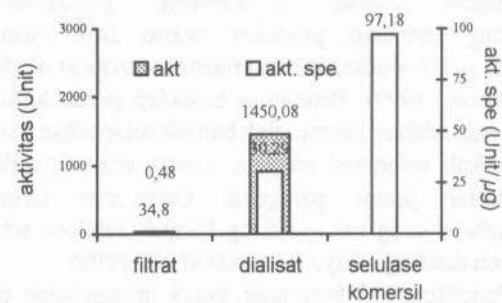
Tabel 1. Aktivitas enzim karboksi metil selulase dari filtrat tiga isolat *Trichoderma harzianum*

Table 1. Activity of carboxy methyl cellulose enzyme in filtrate of three isolates of *Trichoderma harzianum*

Isolat Isolates	Waktu inkubasi filtrat pada substrat agar CMC (menit) Incubation period of filtrate on CMC agar (minutes)			
	15	30	60	120
E51	++*	++ / +++	+++	++
N3A	++	++	++ / +++	++
TSM	+	+	+	+

Keterangan : * Tingkat aktivitas enzim : rendah (+), sedang (++), dan kuat (+++)

Notes : * Enzyme activity : low (+), medium (++), and strong (+++)



Keterangan : akt = aktivitas
Notes : akt = activity

akt. spe = aktivitas spesifik
akt spe = activity spesifik

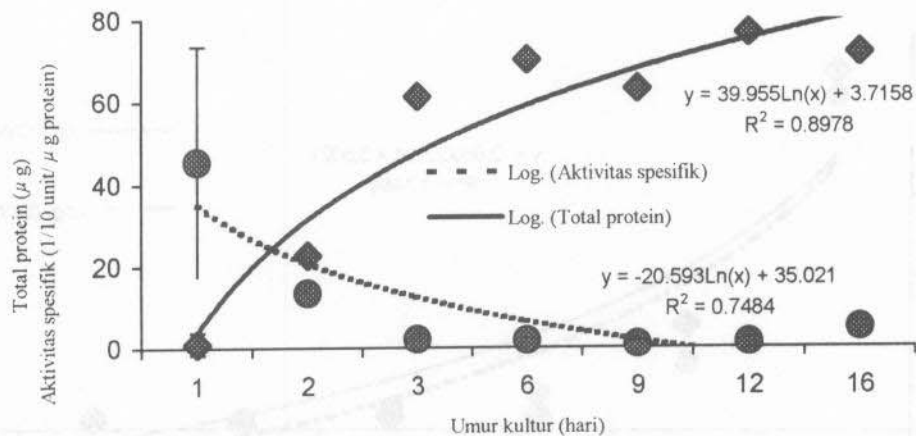
Gambar 1. Degradasi karboksimetil selulase oleh enzim CMC-ase asal filtrat *Trichoderma harzianum* E51

Figure 1. Degradation of carboxy methyl cellulose by CMC-ase in filtrate of *Trichoderma harzianum* E51 culture

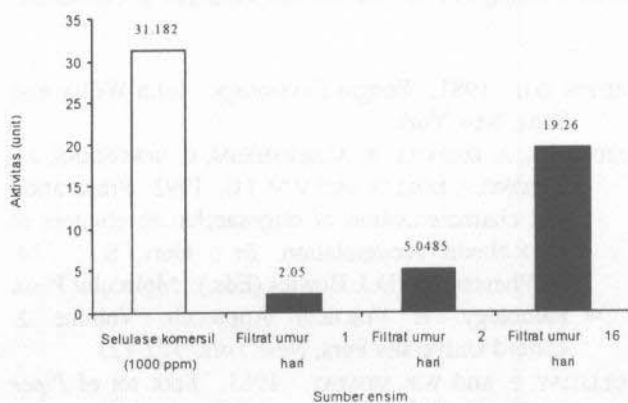
Hasil pengukuran aktivitas CMC-ase dalam filtrat menunjukkan bahwa aktivitas spesifik enzim dalam filtrat turun sejalan dengan bertambahnya umur kultur (Gambar 2). Penurunan aktivitas spesifik CMC-ase dari hari ke dua ke hari ke dua belas berkaitan dengan meningkatnya total protein. Karena protein yang diukur bukan hasil purifikasi, diduga ekskresi protein *T. harzianum* ke media tidak hanya enzim CMC-ase saja tetapi protein-protein lain. Pada pengamatan ini terlihat bahwa enzim CMC-ase diproduksi sejak awal pertumbuhan *T. harzianum*. CMC yang merupakan satu-satunya sumber karbon yang ada dalam medium dipecah oleh jamur menjadi sakarida lebih sederhana (GRIFFIN, 1981). Salah satu kunci penting dalam proses mikoparasitisme adalah transfer nutrisi dari inang ke mikoparasit (WHIPPS, 2001). Dinding sel *P. capsici* yang didominasi oleh selulosa dan ikatan β -glukan dapat menjadi target awal sumber C bagi *T. harzianum* pada proses mikoparasitisme. Dengan demikian tampak bahwa enzim CMC-ase berperan pada awal parasitasi *T. harzianum* pada *P. capsici*.

Menurut CORONEL dan JOSON (1986) enzim selulase merupakan kompleks enzim yang terdiri atas tiga tipe enzim yang saling berkaitan kerjanya, yaitu ekso-1,4 β -D-glukanase yang menghidrolisis kristal selulosa menjadi selobiosa, β -glukosidase yang menghidrolisis selobiosa menjadi glukosa, dan endo-1,4- β -D-glukanase (CMC-ase) yang menghidrolisis selulosa dan turunannya seperti CMC. Berdasarkan hasil penelitian BARTNICKI-GARCIA dan WANG (1983) dinding sel *P. capsici* mengandung sekitar 80-90% selulosa dan β -glukan.

Aktivitas filtrat *T. harzianum* E51 yang dikulturkan pada media CMC untuk mendegradasi dinding sel meningkat sejalan dengan pertambahan umur kultur (Gambar 3). Pada kultur umur 1 hari aktivitas CMC-ase adalah 2,05 unit, meningkat dua kali lipat menjadi 5,05 unit pada hari ke dua dan 19,26 unit pada hari ke 16.



Gambar 2. Produksi enzim karboksimetil selulase oleh *Trichoderma harzianum* dalam medium CMC
Figure 2. Production of carboxymethyl cellulase enzyme by *Trichoderma harzianum* in CMC medium

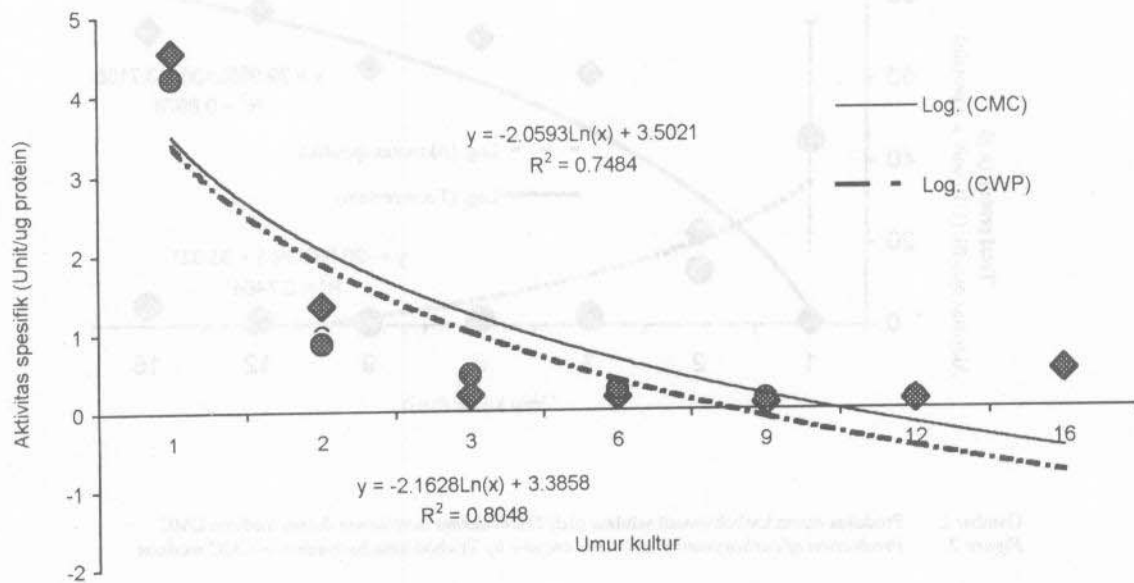


Gambar 3. Degradasi dinding sel *Phytophthora capsici* N2 dengan enzim CMC-ase asal *Trichoderma harzianum* E51
Figure 3. Degradation of cell wall of *Phytophthora capsici* N2 with CMC-ase of *Trichoderma harzianum* E51

Produksi enzim CMC-ase pada media dengan sumber karbon dinding sel *P. capsici* N2 Kapang *T. harzianum* dapat tumbuh baik pada media dengan sumber karbon tunggal berupa siapan kasar dinding sel *P. capsici*. Hasil pengamatan terhadap filtrat *T. harzianum* E51 yang dibiakan pada media dengan sumber karbon dinding sel *P. capsici* menunjukkan pola aktivitas enzim CMC-ase yang sama dengan pola pada saat *T. harzianum* dikulturkan pada media dengan sumber karbon CMC (Gambar 4). Hal ini menunjukkan bahwa enzim CMC-ase terbentuk pada awal

pertumbuhan kapang. Hasil ini juga memperkuat dugaan bahwa peningkatan aktivitas degradasi dinding sel pada filtrat dari kultur lebih tua (Gambar 3) disebabkan akumulasi enzim-enzim lain seperti ekso 1.4-glukanase dan glukosidase.

Informasi mekanisme aktivitas lisis enzim selulase dari *T. harzianum* terhadap dinding sel *P. capsici*, sejalan dengan penemuan KITAMOTO *et al.* (1987) pada *C. cinereus*. Untuk meningkatkan produktivitas enzim ini maka *T. harzianum* perlu direkayasa. MIGHELI *et al.* (1998) berhasil meningkatkan potensi *T. longibrachiatum* untuk mengendalikan *Pythium ultimum* dengan merekayasa ekspresi gen *egl1* untuk meningkatkan produksi β -1.3-glukanase. Ekspresi enzim khitinase pada *T. harzianum* dapat ditingkatkan 200 kali lebih tinggi dengan mengkontruksikan gen *chit33* yang mengkode khitinase dengan dibawah kendali promotor *pki* asal *T. reesei* (LIMON *et al.*, 1999). Peningkatan 5 kali lipat produksi enzim protease pada *T. harzianum* telah dilakukan oleh FLORES *et al.* (1996) dengan merekayasa gen *prb1*. *Trichoderma harzianum* transgenik tersebut meningkat kemampuannya dalam mengendalikan penyakit patah rebah pada kapas yang disebabkan oleh *Rhizoctonia solani*. Namun efektivitas pengendalian paling efektif dicapai oleh *T. harzianum* dengan peningkatan produksi protease yang tidak terlalu tinggi, karena produksi protease yang terlalu tinggi (WHIPPS, 2001) mengganggu enzim lain yang dibutuhkan untuk pertumbuhan agen hayati tersebut. Peluang serupa mungkin dapat diterapkan dalam meningkatkan produksi CMC-ase pada *T. harzianum*.



Gambar 4. Pola aktivitas enzim CMC-ase dari *Trichoderma harzianum* pada media dengan sumber karbon CMC atau siapan asar dinding sel *Phytophthora capsici* N2 (SKDS)

Figure 4. Activity pattern of CMC-ase of *Trichoderma harzianum* cultivated in medium containing CMC or crude cell wall preparation of *Phytophthora capsici* N2 (CWP)

KESIMPULAN

Enzim CMC-ase yang diproduksi *T. harzianum* dapat memecah dinding sel *P. capsici*.

UCAPAN TERIMA KASIH

Penulis mengucapkan terimakasih kepada Dr. Dyah Manohara yang telah memberi peluang untuk menggunakan isolat *Trichoderma harzianum* dan *Phytophthora capsici* dalam penelitian ini.

DAFTAR PUSTAKA

- BARTNICKI-GARCIA, S. and M.C. WANG. 1983. Biochemical aspect of morphogenesis in *Phytophthora*. In : Erwin, D.C., S. Bartnicki-Garcia and Tsao (Eds.). *Phytophthora, Its Biology, Ecology, Taxonomy and Pathology*, APS, Minnesota : 121-137.
- FLORES, A. I. CHET and A. HERRERA-ESTRELLA. 1996. Improved biocontrol activity of *Trichoderma harzianum* by over expression of the proteinase-encoding gene *prb1* Current Genetics 31:30 - 37
- GRIFFIN, D.H. 1981. Fungal Physiology. John Willey and Sons, New York.
- HAHN, M.G., A. DARVILL, P. ALBERSHEIM, C. BERGMANN, J.J. CHEONG, A. KOLLER and V.M. LO. 1992. Preparation and characterization of oligosaccharide elicitors of phytoalexin accumulation. In : Gurr, S.J., J.M. McPherson and D.J. Bowles (Eds.). *Molecular Plant Pathology. A Practical Approach. Volume 2*. Oxford University Press, New York :122-123.
- HOLLIDAY, P. and W.P. MOWAT. 1963. Foot rot of *Piper nigrum* L. (*Phytophthora palmivora*). Phytopathological notes No. 5, Commonwealth Mycological Institute, Kew, Surrey. 70 pp.
- IRAWADI, T. 1990. Selulase. Pusat Antar Universitas Bioteknologi IPB, Bogor.
- CORONEL L.M. and L.M. JOSON. 1986. Isolation, screening and characterization of cellulose-utilizing bacteria. The Philippine J. of Sci. 115(3): 223-232.
- KITAMOTO, Y., I. KAGAWA, N. NAGAO, M. NAKAMATA, and Y. ICHIKAWA. 1987. High productivity protoplasting and reversion of protoplast in *Coprinus cinereus* with a single preparation of lytic enzyme from *Trichoderma harzianum*. Trans. Mycol. Soc. Japan 28 :217-227.
- LIMON, M.C., J.A. PINTOR-TORRO and T. BENITEZ. 1999. Increased antifungal activity of *Trichoderma harzianum* transformant that overexpress a 33-kDa Chitinase. Phytopathology. 89:254-261