

PENGENDALIAN HAYATI PENYEBAB PENYAKIT REBAH SEMAI *Fusarium subglutinans* DENGAN *Trichoderma harzianum*

Biological Control of Damping Off Disease Caused by Fusarium subglutinans using Trichoderma harzianum

M. Christita¹⁾, S. M. Widyastuti²⁾, dan H. Djoyobisono²⁾

1) Balai Penelitian Kehutanan Manado
Jl.Raya Adipura, Kima Atas, Mapanget, Manado
Email : mchristita@gmail.com

2) Fakultas Kehutanan, Universitas Gadjah Mada
Jl.Agro, Bulak Sumur, Yogyakarta

ABSTRACT

The mortality of pine seedling in nursery was caused by damping off. Damping off disease is caused by soil borne pathogenic fungus Fusarium subglutinans. To get an effective method in controlling the diseases, is important to understand the effectiveness of biocontrol agent Trichoderma harzianum. The purpose of this research was to comprehend the inhibition mechanism of T. harzianum against F. subglutinans and its effectiveness. The research methods include (1) in vitro application of T. harzianum with Green Fluorescent Protein [GFP] using dual culture method, and (2) in planta application by inoculating T. harzianum with GFP four days before F. subglutinans inoculation, inoculating T. harzianum and F. subglutinans at the same time, and inoculating of T. harzianum four days after F. subglutinans inoculation. The results of this research showed that Trichoderma harzianum is effective to inhibit the growth of F. subglutinans in planta. The mechanism of T.harzianum to inhibit the growth of F.subglutinans is by nutrient competition.

Keywords: Damping off, Fusarium subglutinans, Pinus merkusii, Trichoderma harzianum

ABSTRAK

Salah satu penyebab kematian tanaman Pinus di persemaian adalah penyakit rebah semai. Penyakit rebah semai disebabkan oleh patogen tular tanah yaitu jamur *Fusarium subglutinans*. Untuk mendapatkan metode yang efektif dalam mengendalikan penyakit rebah semai, perlu diketahui efektivitas agen pengendali hayati yaitu *Trichoderma harzianum*. Tujuan dari penelitian ini adalah untuk mengetahui respon ketahanan semai tusam terhadap infeksi *F. Subglutinans* dan mekanisme penghambatan *T.harzianum* terhadap perkembangan *F.subglutinans*. Metode yang digunakan dalam penelitian ini adalah (1) uji *in vitro* *T. harzianum* yang mengekspresikan *Green Fluorescent Protein* [GFP] dengan menggunakan metode *dual culture*, dan (2) uji *in planta* dengan inokulasi *T. harzianum* GFP empat hari sebelum inokulasi *F. subglutinans*, inokulasi *T. harzianum* dan *F. subglutinans* bersamaan, dan inokulasi *T. harzianum* empat hari setelah inokulasi *F. subglutinans*. Hasil penelitian menunjukkan *Trichoderma harzianum* efektif untuk menghambat perkembangan *F. subglutinans in planta*. Mekanisme penghambatan *T.harzianum* terhadap *F.subglutinans* adalah dengan cara kompetisi nutrisi.

Kata kunci: Fusarium subglutinans, Pinus merkusii, rebah semai, Trichoderma harzianum

Tanggal diterima: 20 Mei 2014; Direvisi: 12 Juli 2014; Disetujui terbit: 15 September 2014

I. PENDAHULUAN

Pinus merkusii atau selanjutnya disebut tusam merupakan jenis tanaman yang banyak dimanfaatkan dalam pengembangan Hutan Tanaman Industri (HTI) terutama di Sumatera dan Jawa. Kualitas semai yang baik adalah hal yang mendasari keberhasilan penanaman tusam. Salah satu penyebab kegagalan penyediaan semai tusam yang baik adalah penyakit rebah semai. Penyakit rebah semai menyebabkan kematian semai dalam waktu yang singkat, batang semai yang terserang akan membusuk sehingga roboh dan mati. Rebah semai dapat disebabkan oleh beberapa jamur patogen antara lain *Phytophthora*, *Pythium*, *Rhizoctonia*, dan *Fusarium*. Jamur *Fusarium* spp. merupakan patogen paling umum yang menyebabkan terjadinya rebah semai pada semai tusam (Widyastuti, 1996).

Untuk mengurangi kerugian akibat penyakit rebah semai, dilakukan penerapan konsep pengendalian penyakit tanaman terpadu (*integrated disease management*) (Besri, 1998). Konsep pengendalian penyakit terpadu antara lain dengan teknik pengendalian secara budidaya, penggunaan varietas tahan, dan penggunaan bahan

kimia. Pencegahan penyakit rebah semai yang disebabkan oleh patogen *in situ* dapat dilakukan antara lain dengan cara pemilihan benih yang baik, sterilisasi media, dan pemeliharaan semai yang baik (Cram, 2004). Penanggulangan penyakit yang telah banyak dilakukan adalah dengan pemberian fungisida. Selain pemberian fungisida, dikembangkan pula alternatif pencegahan penyakit dengan pemanfaatan pengendali hayati. Salah satu jamur yang efektif sebagai pengendali hayati adalah *T. harzianum* (Hjeljord dan Trosno, 1998). *Trichoderma harzianum* selain diharapkan efektif sebagai pengendali hayati juga digunakan untuk mengetahui interaksi dan mekanisme penghambatannya terhadap *F. subglutinans*. Tidak hanya pada tanaman kehutanan, peran *Trichoderma harzianum* sebagai pengendali hayati juga telah terbukti untuk mengatasi patogen pada tanaman tembakau (Gveroska dan J. Ziberoski, 2012).

Tujuan dilakukannya penelitian ini adalah untuk mengetahui respon ketahanan semai tusam terhadap infeksi *F. Subglutinans* dan mekanisme penghambatan perkembangan *F. subglutinans* oleh *T. harzianum*.

II. METODE PENELITIAN

A. Bahan Penelitian

Pada penelitian ini digunakan semai tusam (*P. merkusii*) mulai umur satu hari yaitu pada awal semai berkecambah. Mikroorganisme yang digunakan pada penelitian ini adalah (1) *F. subglutinans* diisolasi dari tusam yang menunjukkan gejala rebah semai, (2) *T. harzianum* GFP (*Green Fluorescent Protein*), yaitu *T. harzianum* yang telah mengalami rekayasa genetik berupa insersi gen perbendar dan (3) *T. harzianum wildtype* (spesies alami *T. harzianum* yang tidak mengalami rekayasa genetik). *Trichoderma harzianum* GFP dan *T. harzianum wildtype* adalah koleksi Dr. Agus Purwantara (Balai Penelitian Bioteknologi Perkebunan Indonesia-Bogor). Isolat murni diperbanyak dengan menumbuhkan *T. harzianum* GFP pada cawan Petri dengan diameter 9 cm. Media yang digunakan adalah *Potato Dextrose Agar* (PDA).

B. Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian dilakukan di: (1) Laboratorium Perlindungan dan Kesehatan Hutan, Fakultas Kehutanan, Universitas

Gajah Mada, (2) Laboratorium Struktur dan Anatomi Kayu, Jurusan Teknologi Hasil Hutan, Fakultas Kehutanan, Universitas Gajah Mada, dan (3) Laboratorium Penelitian dan Pengujian Terpadu, Universitas Gajah Mada.

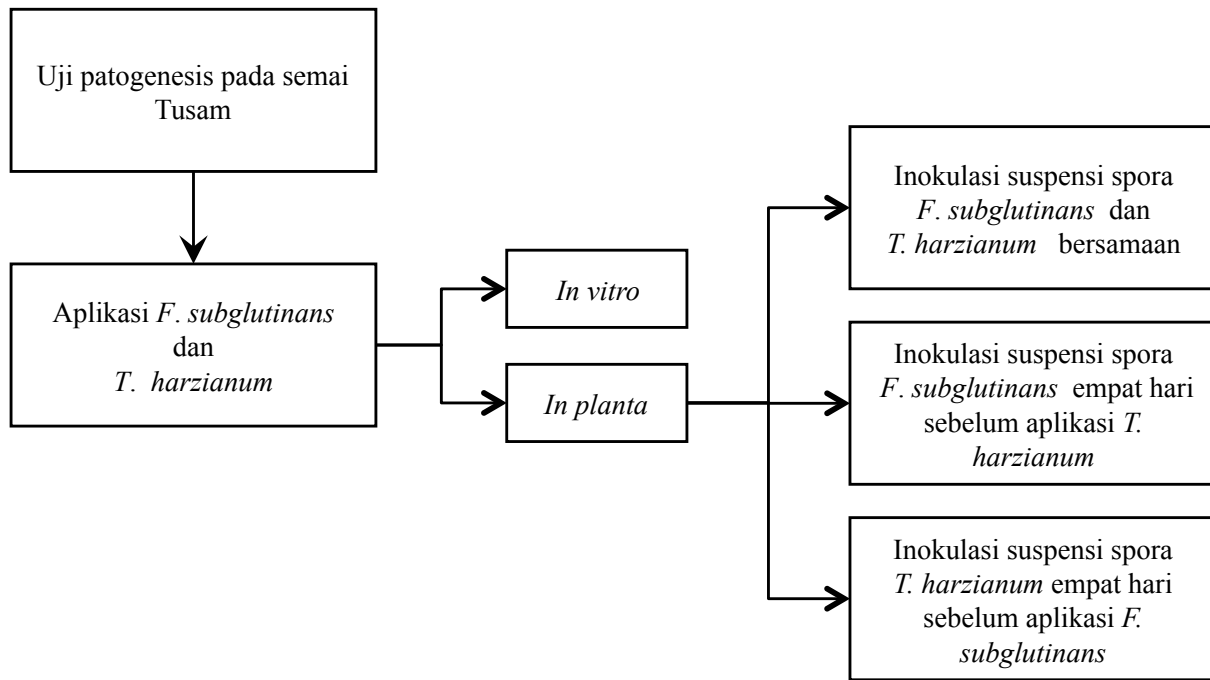
Penelitian dilakukan pada bulan Desember 2008 sampai dengan Februari 2010.

C. Metode Penelitian

Prosedur penelitian dijelaskan dalam diagram alur penelitian pada Gambar 1.

D. Uji Ketahanan Hidup Semai Tusam

Tingkat ketahanan hidup semai tusam diukur dengan perhitungan persentase semai tusam hidup. Persentase semai tusam hidup dihitung dengan inokulasi *F. subglutinans* terhadap semai tusam sesuai perlakuan yang telah ditentukan, yaitu dengan aplikasi *T. harzianum* baik GFP maupun jenis *wildtype*-nya, serta tanpa aplikasi GFP. *Trichoderma harzianum wildtype* digunakan untuk mengetahui efektifitasnya dalam menghambat *F. Subglutinans* di dalam tanah dibandingkan dengan *T. harzianum* GFP yang telah mengalami rekayasa genetik.



Gambar 1. Diagram alur kegiatan penelitian

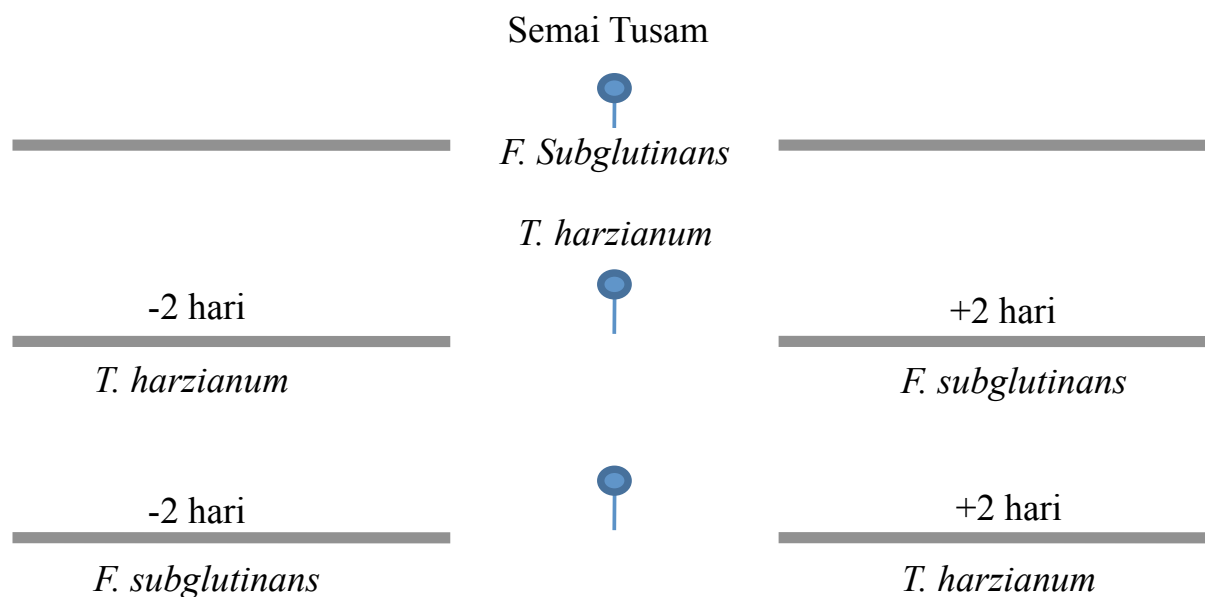
Setiap penanaman disertai dengan kontrol. Untuk melakukan uji tingkat ketahanan hidup semai tusam diterapkan perlakuan sebagai berikut (Gambar 2):

1. Semai tusam dengan inokulasi *F. subglutinans*
2. Kontrol berupa semai tusam
3. Semai tusam dengan aplikasi *F. subglutinans* dan *T. harzianum* GFP dan *T. harzianum* wildtype dengan 3 perlakuan, masing-masing:
 - a. Aplikasi *T. harzianum* GFP atau wildtype empat hari sebelum aplikasi *F. subglutinans*. (dua hari sebelum penanaman semai tusam)
 - b. Aplikasi *F. subglutinans* empat hari sebelum aplikasi *T. harzianum* GFP

atau *wildtype* (dua hari sebelum aplikasi penanaman semai tusam)

- c. Aplikasi *F. subglutinans* dan *T. harzianum* GFP atau *wildtype* bersamaan

Masing-masing perlakuan diterapkan dengan menanam satu pot (diameter 10cm) berisi 15 semai yang akan mendapat perlakuan inokulasi patogen dan aplikasi pengendali hayati, serta satu pot berisi 15 semai yang digunakan sebagai kontrol. Untuk dapat menyebabkan penyakit rebah semai diperlukan suspensi spora *F. subglutinans* sebesar 4.8×10^6 spora/mL untuk model infeksi pada 10 batang semai (Zad dan Koshnevice, 2001).



Gambar 2. Ilustrasi perlakuan uji ketahanan hidup semai tusam

Berdasarkan pustaka dan uji pendahuluan maka, pada penelitian ini digunakan rata-rata kerapatan suspensi spora *F. subglutinans* sebesar $2,53 \times 10^8$ spora/mL untuk inokulasi. Sebagai pengendali hayati diinokulasikan *T. harzianum* dengan kerapatan spora $1-5 \times 10^5$ spora/mL (McLean *et al.*, 2001). Pada penelitian ini dilakukan aplikasi *T. harzianum* GFP dengan kerapatan suspensi spora rata-rata sebesar $1,96 \times 10^8$ spora/mL, sedangkan aplikasi dengan *T. harzianum* wildtype menggunakan suspensi spora dengan kerapatan rata-rata $1,81 \times 10^8$ spora/mL.

Berdasarkan hasil inokulasi pada tiga pola penanaman tersebut, dilakukan

pengamatan pada hari pertama semai mengalami rebah hingga hari terakhir semai rebah seluruhnya. Berdasarkan uji pendahuluan yang telah dilakukan, pada hari ke-15 semua semai mengalami kematian.

E. Uji Daya Hambat *Trichoderma harzianum* In Vitro

Uji daya hambat pengendali hayati secara *in vitro* dilakukan dengan metode *dual culture* (Abaysinghe, 2007; Coskuntuna dan Ozer, 2008; Ghildival dan Pandev, 2008) Uji *dual culture* untuk pengamatan mikroskopis dan untuk perhitungan persentase daya hambat dilakukan dengan cara yang berbeda.

Penghitungan persentase daya hambat dilakukan dengan melakukan pengamatan

dan perhitungan luas koloni *F. subglutinans* satu hari setelah penanaman *T. harzianum*. Untuk dapat menghitung persentase daya hambat dilakukan penanaman metode *dual culture* tanpa menggunakan gelas benda dan satu cawan Petri *F. subglutinans* sebagai kontrol. Ilustrasi metode dapat dilihat pada Gambar 3. Efektivitas penghambatan dapat dihitung dengan mengetahui ukuran penutupan luasan jamur *F. subglutinans* pada cawan Petri dengan mengikuti persamaan

(Ghildival dan Pandev, 2008). Rata-rata luas koloni dihitung setiap hari dimulai pada hari keenam setelah penanaman *F. subglutinans* atau hari ketiga setelah penanaman *T. harzianum*:

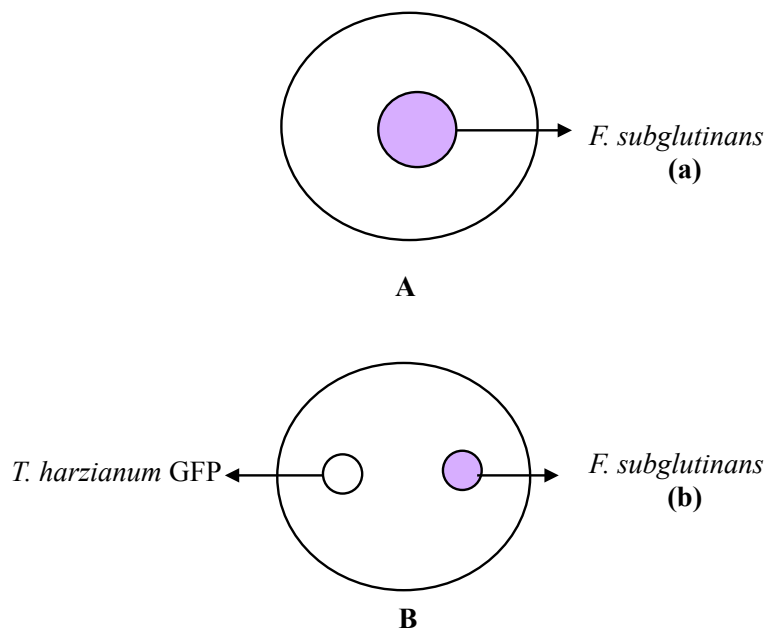
$$C = \frac{a-b}{a} \times 100\%$$

Keterangan :

a : Rata-rata luas kontrol (koloni *F. subglutinans*)

b : Rata-rata luas koloni *F. subglutinans* dengan *T. harzianum*

C : Daya hambat *T. Harzianum*

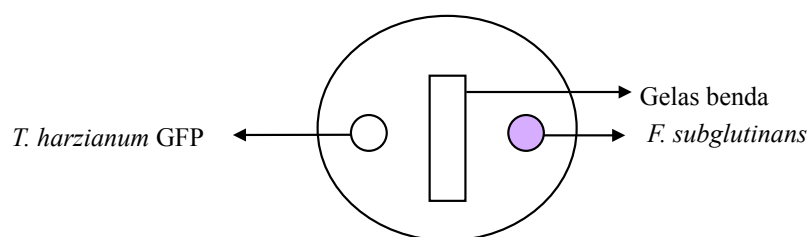


Gambar 3. Ilustrasi metode uji penentuan persen daya hambat *Trichoderma harzianum* GFP terhadap *Fusarium subglutinans*. (A) *F. subglutinans* control (B) *Dual culture T. harzianum* GFP dengan *F. subglutinans*

Pada penanaman dengan metode *dual culture* untuk kepentingan pengamatan mikroskopis, *F. subglutinans* dan *T. harzianum* GFP ditanam dalam satu cawan Petri dengan posisi yang saling berhadapan.

Penanaman ini dilakukan pada cawan Petri (diameter 9 cm), dengan media PDA dan gelas benda di tengahnya yang akan digunakan untuk pengamatan mikroskopis. Berdasarkan uji pendahuluan, *F.*

subglutinans tumbuh lebih lambat sehingga penanaman *T. harzianum* GFP (Gambar 4).
ditumbuhkan tiga hari lebih awal sebelum



Gambar 4. Ilustrasi metode uji daya hambat *in vitro* menggunakan metode *dual culture*

Pada metode dengan penambahan gelas benda di tengah cawan Petri dilakukan prosedur sterilisasi menggunakan *autoclave*. Gelas benda lebih dulu dimasukkan ke dalam cawan Petri, kemudian cawan Petri beserta gelas benda disterilisasi dengan menggunakan *autoclave*. Pada saat siap digunakan, cawan Petri yang telah dilengkapi dengan gelas benda dituangi PDA sebagai media pertumbuhan jamur.

III. HASIL DAN PEMBAHASAN

A. Uji Pengendalian Hayati dengan *Trichoderma harzianum*

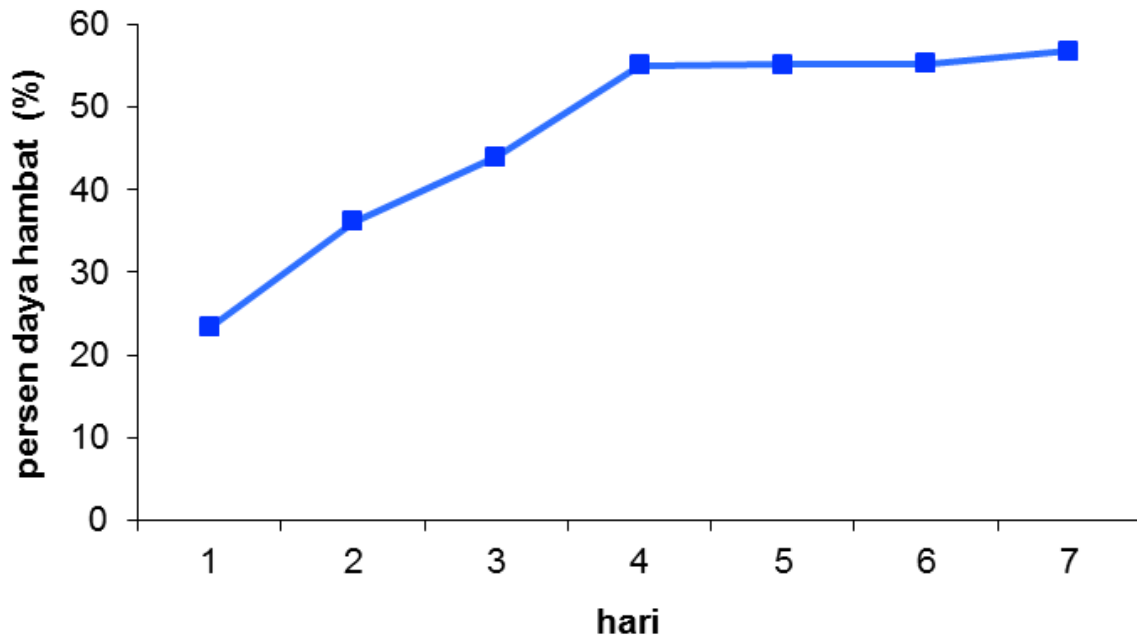
Interaksi antagonis yang dilakukan oleh jamur *Trichoderma* spp. sebagai pengendali hayati bertujuan untuk menghambat pertumbuhan jamur lain. Mekanisme antagonistik yang dilakukan oleh *Trichoderma* sp. yaitu antibiosis, mikoparasitisme, dan kompetisi untuk

memperebutkan nutrisi (Hjeljord dan Trosno, 1998). Berdasarkan perhitungan besar penutupan luas pertumbuhan jamur patogen oleh *T. harzianum*, dilakukan perhitungan persen daya hambat seperti di sajikan pada Gambar 5. Perhitungan persen daya hambat dimulai sejak pertama kali miselia jamur tampak menyatu yaitu pada hari keenam setelah jamur *F. subglutinans* ditanam di dalam cawan Petri. Hari pertama yang disajikan dalam grafik adalah hari pertama jamur bertemu atau saling menyentuh.

Daya hambat *T. harzianum* terhadap *F. subglutinans* meningkat dengan pertambahannya penutupan luasan jamur patogen oleh *T. harzianum*. Sejak hari pertama kedua hifa jamur bertemu, persen penutupan cawan Petri oleh *T. harzianum* semakin meningkat. Hari keempat setelah hifa saling menyentuh persen penghambatan

cenderung konstan hal ini dapat disebabkan pada saat itu *T. harzianum* telah mulai

tampak memenuhi cawan Petri.



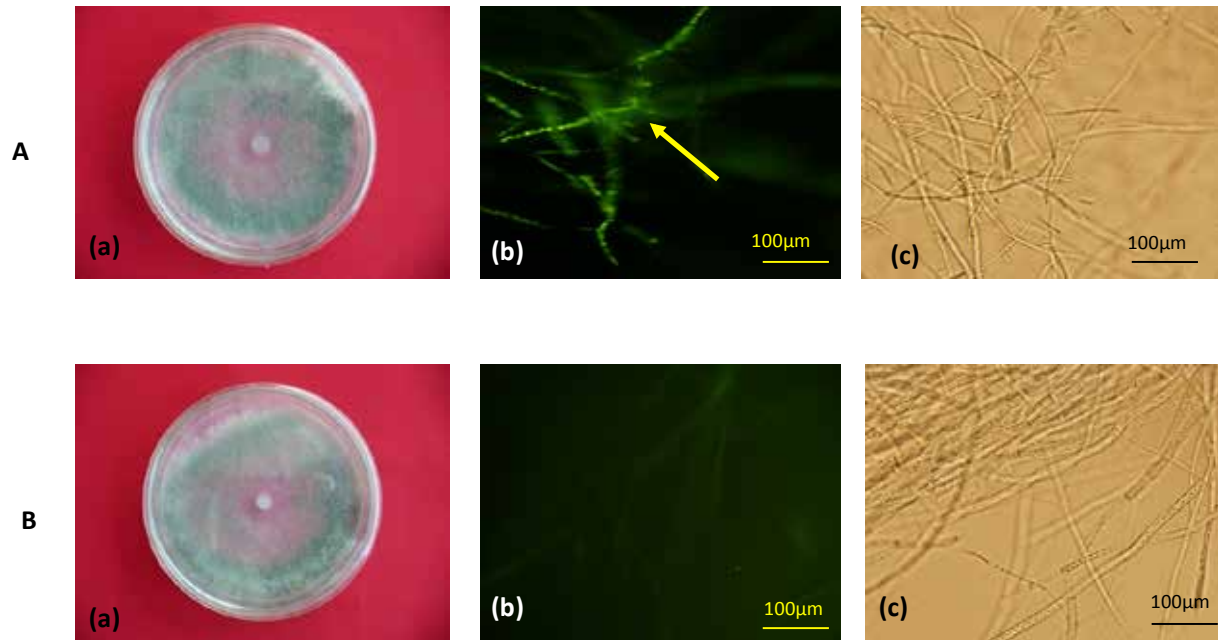
Gambar 5. Daya hambat *Trichoderma harzianum* terhadap *Fusarium subglutinans*.

Perbedaan kenampakan makroskopis dan mikroskopis antara *T. harzianum* GFP dan *T. harzianum* *wildtype* dapat dilihat pada Gambar 6. Biakan murni *T. harzianum* GFP memiliki warna hijau hingga kekuningan pada media PDA (*Potato Dextrose Agar*) hal tersebut tidak berbeda dengan kenampakan yang ditunjukkan oleh *T. harzianum* *wildtype*. Secara mikroskopis *T. harzianum* GFP akan menunjukkan perbedaan warna jika dibandingkan dengan jenis *wildtype* yaitu hifanya akan tampak berpendar jika dilihat di bawah mikroskop fluoresen.

Biakan murni *T. harzianum* *wildtype* memiliki warna yang sama dengan *T. harzianum* GFP yaitu hijau hingga kekuningan, sedangkan secara mikroskopis hifanya tidak berpendar meskipun dilihat dengan mikroskop fluoresen. Kelebihan mikroorganisme dengan GFP telah banyak dimanfaatkan sebagai alat bantu penelitian terutama sebagai reporter spesies terhadap kasus patogenisitas pada tanaman (Chiu *et al.*, 1996). Sifat spesies GFP yang mampu berpendar di bawah mikroskop fluoresen juga telah digunakan pada penelitian monitoring

pertumbuhan dan aktifitas jamur patogen di dalam tanah (Bae dan Knudsen, 2000). Penelitian ini juga sejalan dengan penelitian

Kowsari, 2014 yang menggunakan GFP pada *Trichoderma harzianum* untuk mengetahui aktivitas biocontrol tersebut.

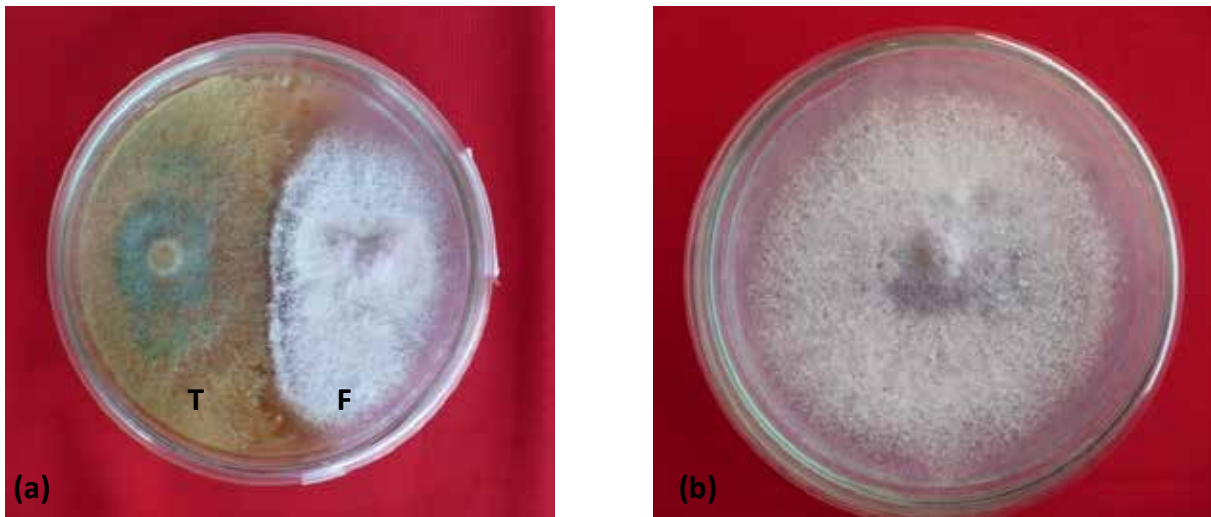


Gambar 6. (A) *Trichoderma harzianum* GFP. (B) *T. harzianum* wildtype.

Uji daya hambat *T. harzianum* terhadap *F. subglutinans* dilakukan dengan uji *dual culture*. Uji *dual culture* juga dimaksudkan untuk mengetahui kemampuan *T. harzianum* sebagai pengendali hayati. Perlakuan *dual culture* dengan menanam kedua jenis jamur tersebut di dalam satu petri dengan posisi saling berlawanan, dapat dilihat pada Gambar 7a. Secara makroskopis akan terlihat perbedaan warna yang mencolok. Jamur *T. harzianum* akan lebih cepat memenuhi cawan Petri dan memiliki warna kuning kehijauan. Jamur *F. subglutinans*

meskipun ditanam lebih awal akan tumbuh lebih lambat dan berwarna ungu.

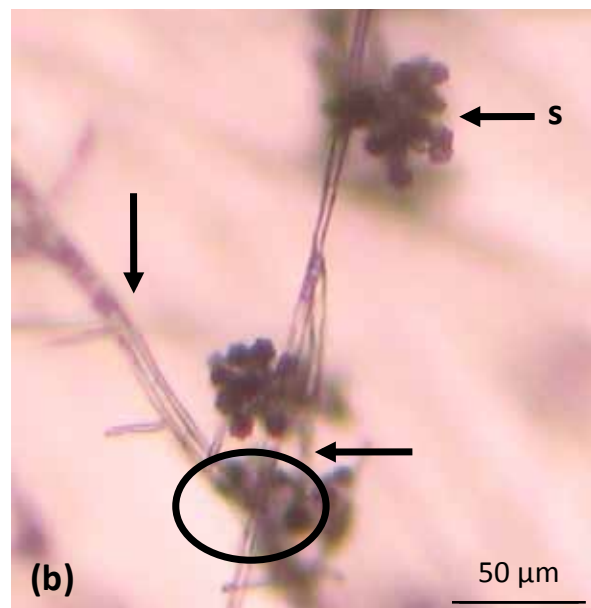
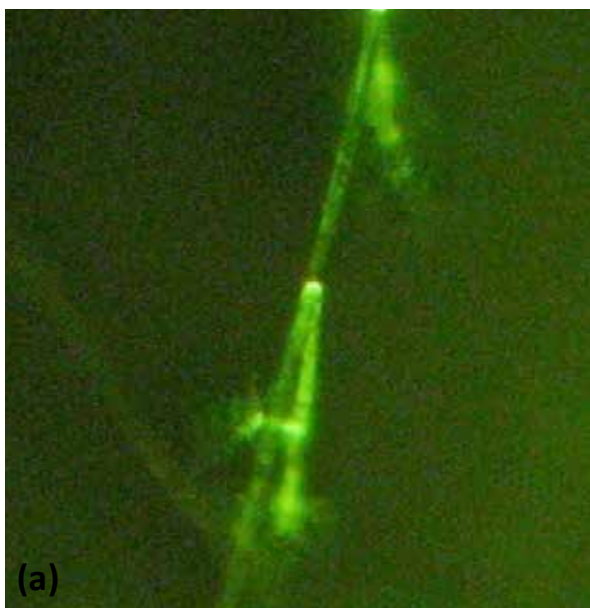
Berdasarkan pengamatan mikroskopis tidak tampak adanya pola pelilitan yang dilakukan hifa *T. harzianum* terhadap hifa *F. subglutinans*. Pada Gambar 8 dapat dilihat bahwa kedua hifa hanya tampak tumbuh berdampingan dan saling menempel. Diduga pola penghambatan menggunakan mekanisme kompetisi nutrisi. Pertumbuhan *F. subglutinans* terhambat karena kecepatan tumbuhnya lebih lambat dibandingkan dengan jamur *T. harzianum*.



Gambar 7. **Gambar 7. (a) Uji dual culture *Trichoderma harzianum* GFP terhadap *Fusarium subglutinans* 12 hari pada media PDA. *T. harzianum* (T), *F. subglutinans* (F) (b) biakan murni *F. subglutinans* sebagai kontrol berusia 12 hari dalam media PDA.**

Selain kompetisi nutrisi, mekanisme mikoparasit oleh *T. harzianum* adalah dengan menghasilkan senyawa racun (*mycotoxin*). *Trichoderma harzianum* telah diketahui menghasilkan trichorzins dan harzianins (Vey *et al.*, 2001). Kedua jenis senyawa

tersebut merupakan senyawa metabolit sekunder yang diduga menghambat pertumbuhan jamur patogen karena bersifat antibiosis (Hajieghrari *et al.*, 2008; Vey *et al.*, 2001)



Gambar 8. **Interaksi *Trichoderma harzianum* GFP dengan *Fusarium subglutinans* pada media PDA. (a) Pengamatan dengan mikroskop fluoresen. Hifa *T. harzianum* GFP yang berpendar (anak panah). (b) Pengamatan dengan mikroskop cahaya. Hifa *F. Subglutinans* (anak Panah). Penempelan hifa *F. subglutians* dan *T. harzianum* GFP (lingkaran). Spora (anak panah s).**

Pemanfaatan *T. harzianum* GFP sebagai pengendali hayati sangat berguna untuk mempelajari mekanisme penghambatan perkembangan *F. subglutinans* pada semai tusam. Keistimewaan *T. harzianum* GFP mempermudah pengamatan proses pengendalian hayati. Dengan memanfaatkan *T. harzianum* tidak lagi diperlukan proses fiksasi jaringan tetapi cukup dengan pengamatan menggunakan mikroskop.

B. Ketahanan Hidup Semai Tusam

Setelah dilakukan uji *in planta* yaitu inokulasi patogen *F. subglutinans* pada semai tusam diketahui bahwa terjadi respon yang berbeda antara masing-masing perlakuan. Grafik persentase semai tusam hidup dengan aplikasi *T. harzianum* GFP serta *T. harzianum* wildtype disajikan pada Gambar 9.

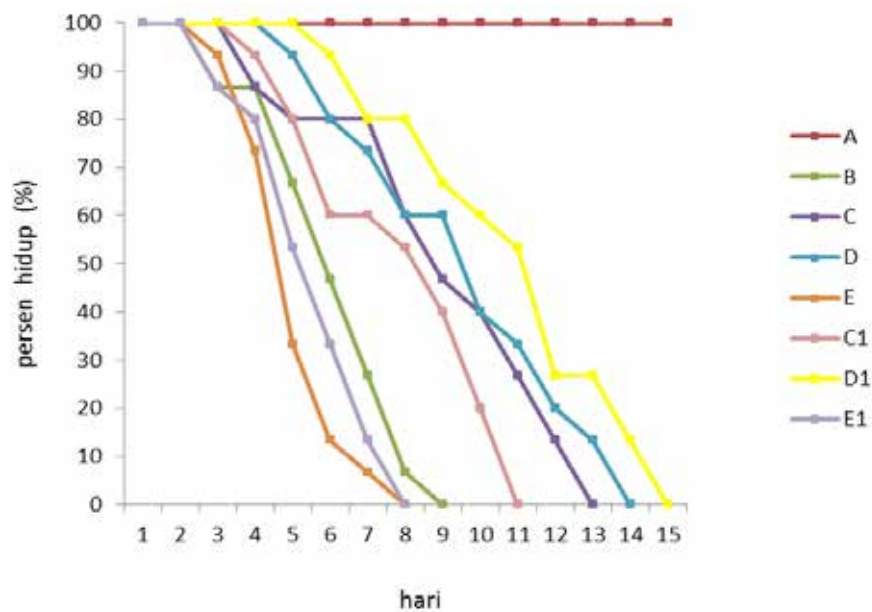
Pada perlakuan penanaman semai tusam dengan aplikasi *F. subglutinans* dan *T. harzianum* GFP sebagai pengendali hayati diketahui perlakuan yang paling tinggi persentasenya adalah dengan aplikasi *T. harzianum* GFP empat hari sebelum aplikasi *F. subglutinans*. Pada perlakuan tersebut, *T. harzianum* GFP diaplikasikan terlebih dulu yaitu dua hari sebelum penanaman semai tusam dan patogen *F.*

subglutinans diinokulasikan dua hari setelah penanaman semai tusam. Perlakuan seperti ini memungkinkan spora *T. harzianum* GFP menyebar lebih dulu di tanah dan jaringan semai sehingga menghambat perkembangan patogen *F. subglutinans*. Persentase hidup terendah terjadi pada perlakuan penanaman Tusam dengan aplikasi patogen *F. subglutinans* empat hari sebelum aplikasi *T. harzianum*, hal ini disebabkan hifa *F. subglutinans* telah masuk dan menyebar ke dalam jaringan semai, sehingga lebih cepat merusak jaringan sebelum kehadiran pengendali hayati.

Pada perlakuan penanaman semai dengan aplikasi *T. harzianum* wildtype dihasilkan persen hidup tertinggi terdapat pada perlakuan dengan aplikasi *T. harzianum* wildtype lebih dua hari sebelum penanaman semai tusam. Persentase hidup terendah terdapat pada pola penanaman dengan aplikasi *F. subglutinans* dua hari sebelum penanaman semai tusam. Berdasarkan gambar dapat dilihat bahwa baik aplikasi *T. harzianum* GFP maupun wildtype, efektifitas penghambatan lebih baik pada aplikasi biokontrol sebelum penanaman semai.

Pada penelitian ini dapat dibuktikan bahwa efektifitas *T. harzianum* menjadi lebih baik jika aplikasi penyebaran inokulasi pada tanah dilakukan sebelum penanaman semai tusam. Kematian seluruh semai pada akhir percobaan disebabkan karena

F. subglutinans bersifat sangat patogenik terhadap semai tusam, dan semai tusam masih terlalu muda sehingga respon ketahanan yang dihasilkan belum optimal dan tidak mampu menghambat laju infeksi patogen.



Gambar 9. **Persentase hidup semai tusam (*Pinus merkusii*) dengan aplikasi *Fusarium subglutinans*, *Trichoderma harzianum* GFP dan *T. harzianum* wildtype. Semua semai mati pada hari ke 15.**

- A : kontrol
- B : aplikasi *F. subglutinans*
- C : aplikasi *F. subglutinans* dan *T. harzianum* GFP bersamaan.
- D : aplikasi *T. harzianum* GFP empat hari sebelum aplikasi *F. Subglutinans* (dua hari sebelum penanaman semai tusam).
- E : aplikasi *F. subglutinans* empat hari sebelum aplikasi *T. harzianum* GFP (dua hari sebelum penanaman semai tusam).
- C1 : aplikasi *F. subglutinans* dan *T. harzianum* wildtype bersamaan
- D1 : aplikasi *T. harzianum* wildtype empat hari sebelum aplikasi *F. Subglutinans* (dua hari sebelum penanaman semai tusam).
- E1 : aplikasi *F. subglutinans* empat hari sebelum aplikasi *T. harzianum* wildtype (dua hari sebelum penanaman semai tusam).

IV. KESIMPULAN

Pada penelitian ini *T.harzianum* terbukti efektif untuk menghambat perkembangan *F.subglutinans* in planta. Mekanisme penghambatan *T.harzianum* terhadap *F.subglutinans* adalah dengan cara kompetisi nutrisi.

UCAPAN TERIMAKASIH

Penelitian ini dilakukan dengan menggunakan dana Hibah bersaing XVII tahun 2010. Terimakasih disampaikan kepada teman-teman Laboratorium Perlindungan dan Kesehatan Hutan, Fakultas Kehutanan Universitas Gadjah Mada atas segala partisipasi dan bantuan dalam melakukan penelitian ini.

DAFTAR PUSAKA

- Abaysinghe S. 2007. Biological Control of *Fusarium solani* f. sp. *phaseoli* the Causal Agent of Root Rot of Bean Using *Bacillus subtilis* CA32 and *Trichoderma harzianum* RU 01. *Ruhuna Journal of Science* 2: 82-88.
- Bae Y.S. dan G.R. Knudsen 2000. Cotransformation of *Trichoderma harzianum* with 3-Glucuronidase and Green Fluorescent Protein Genes Provides a Useful Tool for Monitoring Fungal Growth and Activity in Natural Soils. *Applied and Environmental Microbiology* 66: 810-815.
- Besri M. 1998. *Integrated Disease Management in Protected Vegetables Crops in Marocco: Problems and Management Strategies*. Cahiers Options Mediterranee. Ciheam, Maroko, pp 457-465.
- Chiu W., Y. Niwa., W Zeng., T. Hirano., H. Kobayashi, dan J. Sheen. 1996. Engineered GFP as a Vital Reporter in Plants. *Current Biology* 6: 325-330.
- Coskuntuna A. dan N. Ozer. 2008. Biological Control of Onion Basal Root Disease Using *Trichoderma harzianum* and Induction of Antifungal Compounds in Onion Set Following Seed Treatment. *Crop Protection* 27: 330-336.
- Cram M.M. 2004. *Damping off*. USDA Forest service, Athens.
- Ghildival A. dan A. Pandev. 2008. Isolation of Cold Tolerant Antifungal Strains of *Trichoderma* sp. from Glacial Sites of Indian Himalayan Region. *Research Journal of Microbiology* 3: 559-564.
- Gveroska Biljana dan J.Ziberoski.2012. *Trichoderma harzianum* as a Biocontrol Agent Against Alternata on Tobacco. *Applied Technologies and Innovation* 2: 67-76.
- Hajieghrari B., M. Torabi-Giglou., M.R. Mohammadi., dan M. Davari. 2008. Biological Potential of Some Iranian *Trichoderma* Isolates in the Control of Soil Borne Plant Pathogenic Fungi. *African Journal of Biotechnology* 7: 967-972.
- Hjeljord L. dan A. Trosno. 1998. *Trichoderma* and *Gliocladium* in Biological Control : an Overview. Dalam: G.E. Harman dan C.P. Kubicek. (eds) *Trichoderma and gliocladium* Taylor & Francis Ltd, London.
- Kowsari, Majegan dan M. Matatebi.2014. Construction of New GFP-Target Fusant for *Trichoderma harzianum* with Enhanced Biocontrol Activity. *Journal of Plant Protection Research* 54:123-131.
- McLean K.L., J. Hunt., dan A. Stewart. 2001. Compatibility of the Biocontrol Agent *Trichoderma harzianum* C52 with Selected Fungicides. *New Zealand Plant Protection* 54: 84-88.
- Seema,M dan N.S. Devaki. 2012. In Vitro Evaluation of Biological Control Agents Against *Rhizoctona solani*. *Journal of Agricultural Technology* 8:233-240.
- Vey A., R.E. Hoagland., dan T.M. Butt. 2001. Toxic Metabolites of Fungal Biocontrol Agents. In: Butt T.M., C. Jackson. and N. Magan. (eds) *Fungi as Biocontrol Agents Progress, Problem and Potenti*. CABI publishing, Wallingford.
- Widyastuti S.M. 1996. Penghambatan Penyakit *Damping off* (rebah semai) pada Semai Pinus dengan Ekstrak Biji Nyiri (*Xylocarpus granatum*). *Jurnal Perlindungan Tanaman Indonesia* 2, 1: 32-35
- Zad S. dan M. Koshnevice. 2001. Damping-off in Conifer Seedling Nurseries in Noshahr and Kelardasht. *Meded Rijksuniv Biological Journal* 66: 91-93.