

# Aktivitas Pelarutan Fosfat oleh Aktinomisetes yang Diisolasi dari Waigeo, Kepulauan Raja Ampat, Papua Barat

## Phosphate solubilizing activities of Actinomycetes isolated from Waigeo, Raja Ampat islands, West Papua

SRI WIDAWATI\*, ARIF NURKANTO, I MADE SUDIANA

Bidang Mikrobiologi, Pusat Penelitian Biologi, Lembaga Ilmu Pengetahuan Indonesia (LIPI), Cibinong-Bogor 16911.

Diterima: 14 Februari 2008. Disetujui: 28 Maret 2008.

### ABSTRACT

Actinomycetes is a major microbial group observed in soil, and contributes to nutrient cycling. This study is intended to verify physiological characters and phosphate solubilizing ability of Actinomycetes isolated from soil of Raja Ampat, West Papua. Most of isolates (RCW16-9, RCW16-8, W5-6, RCW25-1, RCW26-5, W28-4, W3-1, W3-7, W17-7, and W10-1) belonged to *Streptomyces* genera. The isolates produce clear zone in Pivovskaya after 3 days incubation. The liquid growth of this isolate rapidly utilizes glucose, and after 24 days of incubation almost 95% glucose was consumed. Decrease of pH from 6.1 to 4.3 may stimulate dissolution of calcium phosphate, and about 21 mg/L-P was observed in bulk solution. An increase of phosphomonoesterase activity during incubation is concomitant with the release of orthophosphate into bulk solution. Acidity of cultures increased may stimulate solubilization of calcium phosphate. Most strains produce phosphomonoesterase enzyme, indicating that actinomycetes are important soil microbes responsible for mediation and stimulation of both inorganic and organic phosphate dissolution. Physiological and biomass growth character of phosphate solubilizing actinomycetes could be important taxonomic indicator for identifying and grouping soil actinomycetes.

© 2008 Jurusan Biologi FMIPA UNS Surakarta

**Key words:** Actinomycetes, phosphate solubilizer, phosphomonoesterase, glucose.

### PENDAHULUAN

Sebagian besar mikrobia tanah berpotensi sebagai *bio-fertilizer*, terutama mikrobia yang hidup pada daerah perakaran (*rhizosphere*). Salah satu di antaranya adalah mikrobia pelarut fosfat (aktinomisetes). Mikrobia tersebut telah terbukti mempunyai kemampuan untuk meningkatkan pertumbuhan dan produksi tanaman (Chang *et al.*, 1986; Widawati *et al.*, 2002, 2005, 2006). Mekanisme peningkatan ini tidak diketahui secara pasti, tetapi diduga melibatkan proses yang kompleks termasuk disolusi senyawa polipeptida, oksidasi, dan reduksi.

Proses solubilisasi dan insolubilisasi unsur hara makro dan mikro di dalam tanah banyak dipengaruhi oleh pH dan status mikrobia tanah yang pada akhirnya berpengaruh terhadap ketersediaan unsur hara tersebut bagi tanaman. Ketersediaan fosfat di dalam tanah pada umumnya terbatas, karena sebagian besar fosfat difiksasi oleh Fe dan Al menjadi Fe-fosfat dan Al-fosfat terutama pada tanah mineral masam (pH < 5). Pada pH yang tinggi (pH > 7) fosfat akan terikat menjadi Ca-fosfat. Ca-fosfat yang sulit larut dapat tersedia bagi tanaman melalui proses pelarutan dan pembentukan senyawa organik oleh mikrobia tanah

(Cunningham dan Kuyack, 1992). Ketersediaan mikronutrien Mn dan Fe untuk pertumbuhan tanaman dan pengaruhnya terhadap penyakit tanaman juga dipengaruhi oleh aktivitas mikrobia tanah. *Pseudomonas* yang hidup pada daerah perakaran mampu melakukan penambatan Fe<sup>3+</sup> menggunakan *siderophore* membentuk Fe-kelat, sehingga Fe<sup>3+</sup> tidak tersedia bagi mikrobia penyebab penyakit (Baker *et al.*, 1986), tetapi tersedia bagi tanaman baik dalam bentuk Fe<sup>3+</sup> maupun Fe<sup>2+</sup>. Aktinomisetes merupakan kelompok mikrobia yang paling banyak dijumpai dalam tanah, tetapi rentang distribusi populasinya sangat tinggi. Peran aktinomisetes dalam stimulasi dan mediasi biotransformasi senyawa fosfat yang tidak tersedia menjadi senyawa yang lebih tersedia bagi tanaman belum banyak dilaporkan. Telah diketahui bahwa aktinomisetes memiliki kemampuan memproduksi senyawa antibiotik dan beberapa jenis aktinomisetes telah digunakan sebagai agen biokontrol. Berdasarkan informasi tersebut, aktinomisetes sangat mungkin dapat digunakan sebagai mikrobia pendukung usaha pertanian berbasis hayati.

Eksplorasi aktinomisetes di kepulauan Raja Ampat merupakan kegiatan *ex situ* konservasi mikrobia tropika dari kawasan yang belum banyak mengalami gangguan kegiatan manusia. Tujuan penelitian ini adalah untuk mengkaji kemampuan aktinomisetes sebagai pelarut fosfat serta mempelajari mekanisme metabolisme yang menstimulasi terjadinya pelarutan fosfat. Pemahaman tentang hal-hal di atas penting untuk lebih mengoptimalkan peran aktinomisetes dalam mendukung konsep pertanian berbasis penggunaan mikrobia lokal (*indigenous*).

#### ▼ Alamat korespondensi:

Jl. Raya Jakarta-Bogor Km 46, Cibinong-Bogor 16911  
Tel. & Fax.: +62-0218765062  
e-mail: widadomon@yahoo.com.

## BAHAN DAN METODE

### Pengambilan sampel

Sampel yang digunakan dalam penelitian ini berasal dari tanah, serasah daun, sedimen, pasir laut, rumput laut koral, dan air laut. Untuk sampel tanah dan pasir diambil sebanyak 500 g, dikering-anginkan kemudian disaring menggunakan saringan dengan diameter lubang 1000  $\mu\text{m}$ . Sampel serasah diambil sebanyak 100-500 g. Tanah dan serasah diambil dari alas hutan dan bagian perakaran tumbuhan. Sampel air yang diambil sebanyak 100 mL, sedang koral dan batuan serta sampel rumput laut diambil dari dasar laut dan pantai. Pengambilan sampel dilakukan secara acak sesuai dengan tipe ekosistem.

### Pengolahan sampel di laboratorium

Pengisolasian mikrobia dilakukan dengan beberapa metode pendekatan antara lain adalah metode *rehidration centrifugation* (RC) dan *sodium dodecyl sulfonate* (SDS).

**Metode *rehidration centrifugation* (RC).** Sampel tanah dan serasah dikeringanginkan selama 7 hari pada suhu ruangan. Sampel yang sudah kering digerus dengan mortar porselin lalu diayak dengan saringan  $\varnothing$  1000  $\mu\text{m}$ . Sampel diambil untuk kemudian dilakukan analisis. Metode analisis menggunakan teknik RC. Sebanyak 0,5 g sampel tanah atau serasah disuspensikan dalam 50 mL 10 mM bufer fosfat yang mengandung 10% ekstrak tanah, diaduk dan didiamkan 90 menit pada suhu kamar. Suspensi diambil sebanyak 8 mL dan disentrifugasi selama 20 menit dengan kecepatan 3000 rpm. Sampel hasil sentrifugasi (supernatan) didiamkan tegak selama 30 menit. Supernatan diambil sebanyak 1 mL dan dilakukan pengenceran dengan seri dari  $10^{-1}$  -  $10^{-4}$ . Masing-masing hasil pengenceran diambil sebanyak 0,2 mL dan ditanam pada media *humic acid vitamin agar* (HVA), lalu diinkubasi pada suhu kamar selama 1-2 minggu. Koloni aktinomisetes yang tumbuh dipindahkan ke media *yeast starch agar* (YSA) untuk mendapat isolat murni. Media HVA yang digunakan dibuat dengan komposisi per liter: 40 g *humic acid*, 0,02 g  $\text{CaCO}_3$ , 0,01 g  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 1,71 g KCl, 0,05 g  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 0,5 g  $\text{NaHPO}_4$ , agar 18 g, dan *vitamin solution* 5 mL. Komposisi vitamin terdiri dari thiamin HCl 0,5 mg, riboflavin 0,5 mg, *nicotinic acid* 0,5 mg, *piridoxin* HCl 0,5 mg, myo inositol 0,5 mg, *Ca-panthotemat* 0,5 mg, *P-aminobenzoic acid* 0,5 mg, biotin 0,25 mg, dan akuades 100 mL. Kecuali akuades, bahan-bahan di atas adalah *pure analysis* (pa)

**Metode *sodium dodecyl sulfonate* (SDS).** Sampel tanah sebanyak 1 g disuspensikan dalam 10 mL akuades steril, lalu dihomogenkan dengan vortex selama 15 menit. Sampel dibiarkan dalam tabung selama 1 menit, lalu diambil sebanyak 1 mL menggunakan mikropipet pada bagian tengah suspensi (di atas endapan tanah di dasar tabung). Suspensi yang telah diambil sebanyak 1 mL diinokulasikan dalam 9 mL media SDS-YE (larutan bufer fosfat pH 7 dengan penambahan 6% ekstrak yeast dan 0,05% *sodium dodecyl sulfida* yang sudah disterilkan) lalu diinkubasi dalam *water bath* selama 20 menit pada suhu 40°C. Tahap berikutnya sampel diencerkan kembali menggunakan akuades steril. Penanaman dilakukan dalam media HVA agar pada tingkat pengenceran  $10^{-3}$  sampai  $10^{-5}$  dengan menginokulasikan 0,2 mL sampel ke media dan ditebarkan (*spread*), lalu diinkubasi selama 14-21 hari pada suhu ruangan (28°C). Koloni yang tumbuh dari masing-masing cawan petri dihitung. Koloni yang dihitung dari setiap cawan petri harus lebih dari 10 koloni (Lee dan Hwan, 2002), sehingga diperoleh total jumlah koloni per gram sampel tanah.

**Identifikasi dan preservasi.** Isolat yang sudah tumbuh pada media YSA diidentifikasi melalui pengamatan makroskopik dan mikroskopik. Pada isolat murni yang telah tumbuh dilakukan pengamatan berupa bentuk dan warna koloni, pigmen yang dihasilkan, bentuk spora, letak spora dan bentuk rantai spora. Identifikasi berdasarkan metode Miyadoh (1997) dan Holt *et al.* (1994). Identifikasi beberapa isolat juga dilakukan secara molekuler melalui pendekatan 16S rDNA. Analisis molekuler yang dilakukan berupa ekstraksi DNA, PCR menggunakan primer 9F dan 1510R, purifikasi DNA dan sekuensing menggunakan *DNA analyzer*. Isolat yang sudah teridentifikasi dipreservasi menggunakan pendinginan -80°C dan kultur kerja pada media YSA.

**Uji potensi isolat pelarut fosfat.** Aktivitas aktinomisetes pelarut fosfat ditentukan berdasarkan pembentukan zona bening pada media Pikovskaya (Rao, 1994). Media yang digunakan adalah Pikovskaya dengan komposisi 10 g/L glukosa, 5 g/L  $\text{Ca}_3\text{PO}_4$ , 0,5 g/L  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , 0,2 g/L KCl, 0,1 g/L  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 0,01 g/L  $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ , 0,5 g/L yeast ekstrak, dan 0,01 g/L  $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  pada pH 7,0. Pengukuran yang dilakukan berupa rasio zona bening (*holozone*) dengan membandingkan diameter zona bening dan diameter koloni setelah inkubasi selama 2 minggu pada temperatur ruangan.

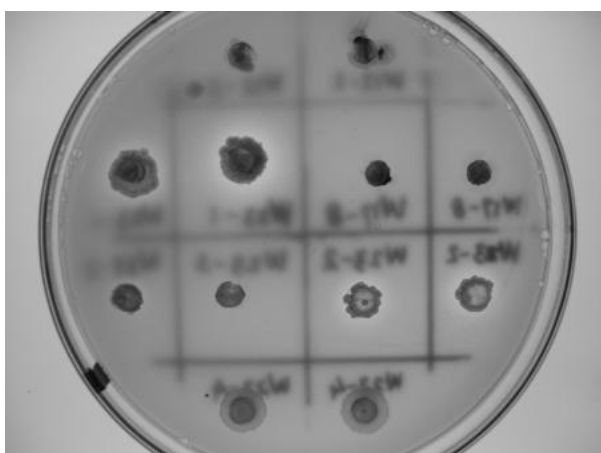
**Uji aktivitas pelarutan fosfat.** Biakan yang mempunyai ratio zona bening per luas koloni lebih dari tiga, yaitu: RCW16-9, RCW16-8, W5-6, RCW-25-1, RCW26-5, W28-4, W3-1, W3-7, W17-7, dan W10-1, ditumbuhkan pada media Pikovskaya cair. Aktivitas pelarutan fosfat ditentukan dengan mengukur kadar fosfat bebas (ortofosfat) dengan metode *ascorbic acids*, jumlah senyawa karbon (glukosa) yang terabsorpsi ke dalam sel dilakukan dengan cara sentrifugasi kultur pada kecepatan 10.000 rpm selama 15 menit, pada suhu 4°C, supernatan yang terbentuk selanjutnya disaring dengan filter steril dengan diameter 0,45  $\mu\text{m}$ , kemudian sample diinjeksi pada TOCvSCN 500.

**Pengukuran fosfat bebas.** Reagen yang digunakan dalam analisis fosfat bebas adalah:  $\text{H}_2\text{SO}_4$  5N = 14 mL  $\text{H}_2\text{SO}_4$  diencerkan menjadi 100 mL dengan akuades (larutan A), 0,324 g  $(\text{K}(\text{Sb} \text{ O}) \text{ C}_4 \text{ H}_4 \text{ O}_6 \cdot 1/2 \text{ H}_2\text{O})$  dilarutkan dalam akuades, sehingga volumenya menjadi 100 mL (larutan B), 4 g  $(\text{NH}_4)_2\text{Mo}_7\text{O}_{24}$  dilarutkan dalam akuades, sehingga volumenya menjadi 100 mL (larutan C), 1,76 g Asam askorbat dilarutkan dalam akuades, sehingga volumenya menjadi 100 mL (larutan D). Reagen tersebut dicampurkan dengan mengambil 10 mL larutan A + 1 mL larutan B + 3 mL larutan C + 6 mL larutan D, lalu dikocok hingga homogen. Selanjutnya 5 g sampel disentrifus selama 10 menit, kemudian ke dalam 3 mL supernatan hasil sentrifugasi ditambahkan 0,5 mL campuran reagen (A+B+C+D) dan diinkubasi selama 15-30 menit. Fosfat bebas diukur menggunakan spektrofotometer pada panjang gelombang 880 nm. Untuk standarisasi digunakan  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  yang dibuat berdasarkan ppm yang diinginkan.

**Pengukuran pH dan Aktivitas PME-ase.** Asiditas kultur dan supernatan diukur secara langsung dengan menggunakan pH meter. Pengukuran aktivitas PME-ase dilakukan dengan cara: sampel sebanyak 5 mL disentrifus selama 10 menit, kemudian diambil 1 mL supernatan dan ke dalamnya ditambahkan 1 mL PNPP lalu diinkubasi selama 2 jam pada suhu 38°C (dilakukan pada *waterbath*). Setelah inkubasi, ke dalam supernatan tersebut ditambahkan 1 mL  $\text{CaCl}_2$  dan 4 mL NaOH, lalu disentrifuse selama 10 menit dan diukur PME-ase dengan spektrofotometer pada panjang gelombang 400 nm dengan akuades sebagai kontrol.

## HASIL DAN PEMBAHASAN

Sebanyak 139 isolat aktinomisetes diisolasi dari pulau Waigeo, kepulauan Raja Ampat, Papua Barat. Lebih dari 50% isolat yang diuji mampu melakukan pelarutan Ca-fosfat seperti diindikasikan oleh terbentuknya zona bening di sekitar koloni yang sedang tumbuh (Gambar 1.), lalu 10 isolat (RCW16-9, RCW-8, W5-6, RCW-25-1, RCW 26-5, W 28-4, W3-1, W3-7, W17-7, dan W10-1) yang mempunyai kemampuan melarutkan Ca-fosfat dengan perbandingan zona bening dengan luas koloni lebih dari dua dipilih untuk dilakukan uji fisiologi, meliputi pertumbuhan biomassa, profil penggunaan glukosa, perubahan pH, solubilisasi Ca-fosfat, dan aktivitas enzim phosphomono-sterase.



**Gambar 1.** Aktinomisetes tanah yang mampu melarutkan kalsium fosfat.

### Absorpsi senyawa karbon

Senyawa organik (glukosa) digunakan sangat cepat oleh aktinomisetes. Tiga isolat (W28-4, W-37 dan RCW 16-9) menggunakan glukosa paling cepat dibandingkan isolat yang lain (Gambar 2.). Lebih dari 50% glukosa yang terdapat di dalam media digunakan dalam 72 jam. Setelah 14 hari inkubasi, lebih dari 90% senyawa karbon di dalam media telah terabsorpsi oleh aktinomisetes, sehingga yang tertinggal di dalam media sangat rendah, yaitu berkisar antara 198-911 mg/L. Glukosa sebagai satu-satunya sumber karbon dapat digunakan dengan mudah oleh aktinomisetes. Ke-10 biakan yang diuji merupakan genus *Streptomyces*. Genus ini mampu menggunakan beberapa sumber karbon yang lain seperti laktosa, maltosa, selubiose, dan dekstrosa (Kurtboke, 2001). Transformasi senyawa karbon menghasilkan beberapa asam organik seperti sitrat, malat, dan glukonat (Tilaki *et al.*, 2005). Terbentuknya asam organik inilah yang mungkin menyebabkan terjadinya penurunan pH dan berpengaruh terhadap aktivitas metabolisme sel.

### Profil pH

Absorpsi glukosa dan kemungkinan biokonversi senyawa tersebut menjadi asam-asam organik menyebabkan penurunan pH dari sekitar 6,0 menjadi sekitar 4,2 (Gambar 3.). Penurunan pH merupakan salah satu penyebab terjadinya pelarutan Ca-fosfat menjadi ortofosfat. Kemasaman tanah juga berpengaruh kepada proses biotransformasi elemen makro dan mikro seperti Mn, Zn, Cu dan Mo. Pelarutan elemen-elemen tersebut berpengaruh terhadap patogenitas mikrobia patogen dan ketahanan tanaman terhadap penyakit (Altomare *et al.*, 1999).

### Pelarutan kalsium fosfat

Pelarutan kalsium dari Ca-fosfat menghasilkan ortofosfat, konsentrasi tertinggi ortofosfat di dalam media dicapai setelah 14 hari inkubasi. Konsentrasi tertinggi sekitar 21,1 mg/L pada isolat RCW 16-6 (Gambar 4.). Mekanisme pelarutan fosfat sangat kompleks yang melibatkan perubahan pH akibat sintesis senyawa organik yang dilepaskan ke dalam media, reaksi oksidasi reduksi, organik ligand kompetitor (Cunningham dan Kuiack, 1992). Pelarutan fosfat yang terjadi oleh aktinomisetes kemungkinan melalui penurunan pH (Gambar 3.), dengan nilai koefisien korelasi antara peningkatan pelarutan fosfat dengan penurunan pH sekitar (-)0,85-(-)0,97. Disolusi ortofosfat oleh aktinomisetes sekitar 21 mg-P/L lebih tinggi dibandingkan dengan fungi *Trichoderma harzianum* yang hanya sekitar 17 mg-P/L (Altomare *et al.*, 1999). Hal ini menunjukkan bahwa strain aktinomisetes tersebut cukup baik digunakan sebagai agen *bio-fertilizer*. Penggabungan fungi dan bakteri efektif memacu solubilisasi kalsium fosfat (Duffy *et al.*, 1996).

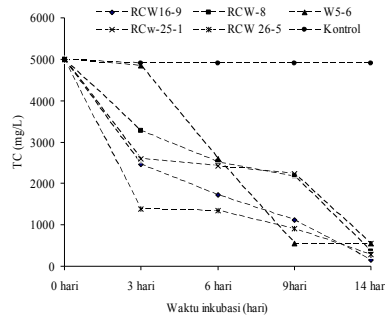
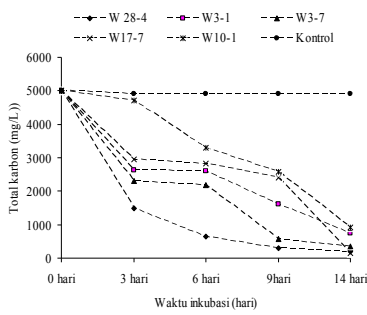
### Aktivitas enzim fosfomonoesterase

Enzim fosfatase merupakan kompleks enzim yang terpenting di dalam tanah yang berfungsi melarutkan fosfat organik menjadi fosfat yang tersedia bagi tanaman. Fosfomonoesterase merupakan salah satu enzim fosfatase yang dihasilkan oleh mikrobia tanah untuk melepaskan satu ikatan ester pada fosfat organik. Aktivitas enzim PME meningkat selama inkubasi. Aktivitas tertinggi adalah pada RCW16-6 dan RCW16-8, dan aktivitas terendah pada W 10-1 (Gambar 5.). Strain RCW16-6 dan RCW16-8 dapat memecah ikatan ester dari fosfat inorganik dan juga memecah ikatan ester pada senyawa organik fosfat yang dominan pada material tumbuhan seperti fitin, inositol dan nukleosida. Aktivitas konversi glukosa menjadi biomassa yang dikenal sebagai "*yield coefficient*" berbeda pada masing-masing strain. Isolat RCW-26-5 dan RCW-8 menghasilkan biomassa terbesar, sedangkan strain W3-1 menghasilkan biomassa paling rendah (Tabel 1).

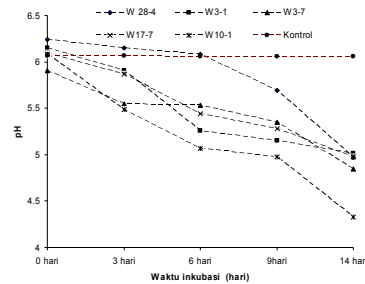
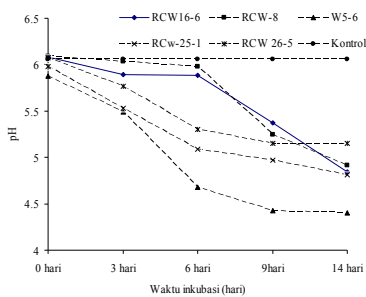
**Tabel 1.** Pertumbuhan biomassa sel aktinomisetes selama inkubasi.

Kode isolat	Spesies teridentifikasi	0 hari		14 hari	
		BB (g/L)	BK (g/L)	BB (g/L)	BK (g/L)
RCW16-9	<i>Streptomyces</i> sp1	8,29	1,70	149,80	100,78
RCW16-8	<i>Streptomyces</i> sp2	8,29	1,24	37,40	29,79
W5-6	<i>Streptomyces</i> sp3	8,10	1,51	67,14	53,08
RCW25-1	<i>Thermomonospora</i> sp	15,20	2,54	39,40	20,65
RCW 26-5	<i>Streptomyces</i> sp4	4,70	0,61	67,40	33,38
W 28-4	<i>Streptomyces</i> sp5	14,27	2,52	86,60	49,79
W3-1	<i>Streptosporangium</i> sp	8,86	2,29	67,00	28,26
W3-7	<i>Streptomyces</i> sp6	6,01	0,86	74,20	37,80
W17-7	<i>Streptomyces carpinensis</i>	6,96	0,69	96,40	48,14
W10-1	<i>Streptomyces olivochromogenes</i>	7,14	1,43	66,60	28,02

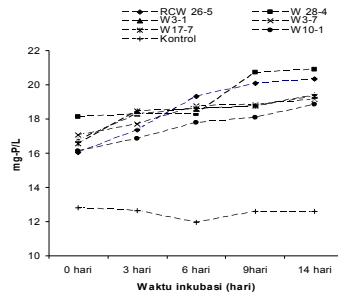
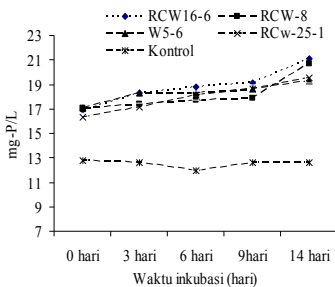
Pertumbuhan biomassa sel akan mempengaruhi kemampuan isolat untuk tumbuh pada ekosistem campuran dan untuk mereduksi mikrobia lain, terutama mikrobia patogen. Kemampuan absorpsi substrat dan pertumbuhan biomassa menentukan keberhasilan mikrobia untuk beradaptasi dan tumbuh dan berkompetisi dengan mikrobia lain. Isolat RCW26-5 dan RCW16-8 akan mampu tumbuh dan berkembang menggunakan fosfat inorganik (kalsium fosfat), dan fosfat organik dari material tanaman dan hewan. Rasio absorpsi glukosa dengan sintesis biomassa menunjukkan perbedaan fisiologi dari masing-masing strain, yang berguna membantu penggolongan strain untuk keperluan identifikasi dan kajian taksonomi serta ekologi.



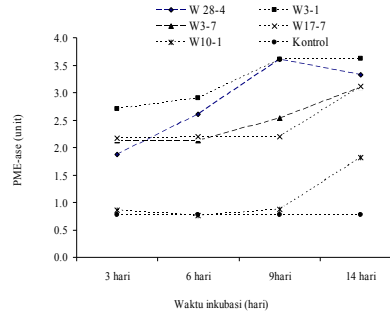
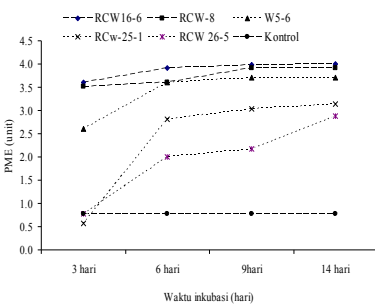
Gambar 2. Absorpsi glukosa oleh aktinomisetes.



Gambar 3. Profil pH selama waktu inkubasi.



Gambar 4. Profil ortofosfat di dalam media



Gambar 5. Aktivitas enzim fosfomonoesterase pada bulk solution selama inkubasi pembentukan biomassa.

## KESIMPULAN

Aktinomisetes tanah dari pulau Waigeo mampu melarutkan kalsium fosfat serta memiliki kemampuan mensintesis enzim fosfomonoesterase. Semua aktinomisetes yang diuji mampu menggunakan glukosa. Glukosa kemudian diubah menjadi biomassa sel dan senyawa organik yang lebih lanjut menurunkan pH kultur karena aktivitas disolusi kalsium fosfat menjadi ortofosfat. Karakteristik fisiologi dari aktinomisetes di atas dapat digunakan sebagai penciri penggolongan aktinomisetes untuk kajian taksonomi.

## DAFTAR PUSTAKA

Altomare C., W.A. Norvell, T. Bjorkman, and G.E. Harman. 1999. Solubilization of phosphates and micronutrient by the plant-growth-promoting and biocontrol fungus *Trichoderma harzianum* Rifai 1295-22. *Applied and Environmental Microbiology* 65 (7): 2926-2933.

Baker, R., Y. Elad, and B. Sneh. 1986. Physical, biological and host factors in iron competition in soils. In: Swinburne, T.R. (ed.), *Iron Siderophores, and Plant Diseases*. New York: Plenum Publishing Corp.

Chang, Y.-C., R. Baker, O. Kleifeld, and I. Chet. 1986. Increased growth of plants in the presence of the biological control agent *Trichoderma harzianum*. *Plant Diseases* 70:145-148.

Cunningham, J. E., and C. Kuyack. 1992. Production of citric and oxalic acids and solubilization of calcium phosphate by *Penicillium bilaii*. *Applied Environmental Microbiology* 58: 1451-1458.

Duffy, B.K., A. Simon, and D. M. Weller. 1996. Combination of *Trichoderma koningii* with fluorescent pseudomonads for control of take-all on wheat. *Phytopathology* 86:188-194.

Holt, J.G., N.R. Krieg, P.H.A. Sneath, J.T. Staley and S.T. Williams. 1994. *Bergey's Determinative Bacteriology*. 9th ed. Baltimore: Lippincott Williams & A. Welfers Kluwer Co.

Kurtboke, I. 2001. *Selective Isolation of Rare Actinomycetes*. Brisbane: State of Queensland.

Lee, Y.J. and B.K. Hwan. 2002. Diversity of anti-fungal actinomycetes in various vegetative soils of Korea. *Journal of Microbiology* 48: 407-417.

Miyadoh, S. 1997. *Atlas of Actinomycetes*. Tokyo: Asakura Publishing Co Ltd.

Rao, N.S.S. 1994. *Mikroba Tanah dan Pertumbuhan Tanaman*. Jakarta: UI Press

Tilaki, V.B.R., N. Ranganayaki, K.K. Pal, R. De, A.K. Saxena, C.S. Nautiyal, S. Mittal, A.K. Tripathi, and B.N. Johri. 2005. Diversity of plant growth and soil health supporting bacteria. *Current Science* 89 (1): 140.

Widawati, S., Suliasih and Syaifudin. 2002. The application of compost plus on the growth of *Orthosiphon aristatus*. *Jurnal Biology Indonesia* 3 (3): 245-253

Widawati, S dan Suliasih. 2005. The application of soil microbes from Wamena Biological Garden (WBiG) as biofertilizer on purple eggplant (*Solanum melongena* L.). *Gakuryoku* 9 (3): 20-124.

Widawati, S. dan Suliasih. 2006. Augmentasi bakteri pelarut fosfat (BPF) potensial sebagai pemacu pertumbuhan caysin (*Brassica caventis* Ocd.) di tanah marginal. *Biodiversitas* 7(1):10-14.