

KETAHANAN BEBERAPA SOMAKLON NILAM TERHADAP PENYAKIT LAYU BAKTERI

Sri Yuni Hartati, Deliah Seswita, Hobir, dan Nuri Karyani

Balai Penelitian Tanaman Obat dan Aromatik

Jln. Tentara Pelajar No: 3, Bogor (16111)

ABSTRAK

Penyakit layu yang disebabkan oleh bakteri *Ralstonia solanacearum* merupakan salah satu penyakit yang penting pada tanaman nilam (*Pogostemon cablin* Benth.). Semua klon nilam yang dibudidayakan di Indonesia rentan terhadap penyakit tersebut. Oleh karena itu usaha perbaikan varietas merupakan pilihan yang tepat untuk mendapatkan varietas unggul yang juga tahan penyakit layu. Nilam Aceh yang umum dibudidayakan petani tidak berbunga, sehingga diperbanyak secara vegetatif dengan setek batang. Oleh karena itu keragaman genetik nilam sangat sempit. Untuk meningkatkan keragaman genetik nilam, telah dilakukan melalui variasi somaklonal dan 10 somaklon diantaranya mempunyai mutu dan kualitas minyak yang tinggi. Tujuan penelitian ini adalah menguji tingkat ketahanan ke 10 somaklon tersebut dengan 2 klon pembanding (Cirateun dan Sidikalang) terhadap penyakit layu. Bibit nilam ditanam pada media steril campuran tanah, pasir, dan pupuk kandang (1:1:1) dalam kantong plastik hitam (polybag). Bibit yang berumur 1 bulan diinokulasi dengan 2 tetes suspensi bakteri *R. solanacearum* (konsentrasi 10^7 sel/ml). Inokulasi dilakukan pada pangkal batang dengan metode tusuk jarum. Bibit yang telah diinokulasi diinkubasikan di rumah kaca. Pengamatan dilakukan terhadap masa inkubasi, gejala layu, dan intensitas serangan penyakit. Hasil penelitian menunjukkan ke 10 somaklon yang diuji mempunyai tingkat ketahanan yang bervariasi (Intensitas serangan penyakit berkisar antara 50-100 %). Meskipun semua somaklon yang diuji tidak ada yang benar-benar tahan terhadap penyakit layu, namun somaklon nomor 55 mempunyai tingkat ketahanan yang lebih tinggi dibandingkan dengan somaklon lainnya dan 2 klon pembandingnya (Cirateun dan Sidikalang).

Kata kunci : *Pogostemon cablin* Benth, *Ralstonia solanacearum*, ketahanan, variasi somaklonal

PENDAHULUAN

Layu bakteri merupakan salah satu penyakit penting pada tanaman nilam disamping penyakit yang disebabkan oleh nematoda dan penyakit Budog yang penyebabnya belum diketahui dengan pasti. Penyakit tersebut dapat menyebabkan kematian tanaman nilam relatif sangat cepat dan dapat menurunkan produksi cukup tinggi yaitu sampai (60-95)%, sehingga penyakit tersebut sering menimbulkan kerugian yang sangat fatal (Asman *et al.*, 1998). Penyakit layu pertamakali dilaporkan ada di daerah Aceh. Penyakit tersebut bersifat endemik dan cepat menular. Pada saat ini penyakit telah tersebar ke seluruh daerah sentra produksi nilam di Aceh, Sumatra Barat, dan di Propinsi-propinsi lainnya di Indonesia (Asman *et al.*, 1998; Sitepu dan Asman, 1989).

Penyebab penyakit layu pada tanaman nilam adalah bakteri *Ralstonia solanacearum*. (Sitepu dan Asman, 1989; Radhakrishnan *et al.*, 1997; Asman *et al.*, 1998). *Ralstonia solanacearum* mempunyai daerah sebaran dan kisaran inang yang sangat luas. Selain pada tanaman nilam, bakteri tersebut juga menyerang lebih dari 200 species tanaman, seperti abaca, cabe, comprea, cumin, jahe, jute, kacang tanah, kapas, kentang, pisang, terung tomat, dan beberapa jenis gulma

(Haywards, 1985; Mahmud, 1985; dan Persley, 1985b).

Ralstonia solanacearum juga mempunyai kemampuan yang luar biasa untuk bertahan hidup di dalam tanah serta mempunyai variabilitas genetik yang luas, sehingga di alam diketemukan adanya beberapa strain atau ras (Buddenhagen, 1985 dan Haywards, 1985 dan Persley, 1985). Oleh Nasrun *et al.* (2004b), *R. solanacearum* penyebab penyakit layu pada tanaman nilam digolongkan ke dalam ras I dan biovar III.

Berbagai usaha untuk mengendalikan penyakit layu telah dilakukan, namun sampai saat ini belum ada cara yang efektif dan memuaskan. Menanam varietas yang tahan yang dikombinasi dengan pengendalian secara kultur teknik merupakan salah satu cara yang dapat menekan penyakit layu (Haywards, 1985). Berhubung semua varietas nilam yang ada di Indonesia rentan terhadap penyakit tersebut, oleh karena itu usaha perbaikan varietas tanaman merupakan langkah awal untuk mendapatkan varietas-varietas baru yang unggul dan tahan terhadap penyakit layu.

Tanaman nilam tidak menghasilkan bunga, sehingga perbanyakannya dilakukan secara vegetatif yaitu dengan setek. Oleh karena itu keragaman genetik nilam sangat sempit. Perbaikan varietas secara konvensional untuk mendapatkan genotipe-genotipe baru melalui persilangan seksual tidak mungkin dilakukan (Mariska *et al.*, 1996 dan Nuryani, 2002). Akibatnya usaha untuk meningkatkan produksi dan mutu minyak nilam sangat ditentukan oleh varietas, teknik budidaya, dan cara pengolahannya (Hobir *et al.*, 2002).

Peningkatan keragaman genetik nilam melalui teknik somaklonal telah menghasilkan somaklon yang bervariasi. Seleksi dari 23 somaklon yang dihasilkan 10 diantaranya mempunyai sifat-sifat agronomis yang lebih baik, yaitu mempunyai produksi terna dan kadar minyak atsiri yang lebih tinggi serta tahan terhadap nematoda (Hobir *et al.*, 2002).

Tujuan dari penelitian ini adalah untuk menguji tingkat ketahanan ke 10 somaklon nilam tersebut terhadap *R. solanacearum* penyebab penyakit layu bakteri. Dari ke 10 somaklon klon nilam yang diuji tersebut diharapkan ada beberapa yang lebih tahan dari pada varietas-varietas nilam yang ada sebelumnya.

BAHAN DAN METODE

Pengujian ketahanan somaklon nilam terhadap penyakit layu bakteri telah dilaksanakan pada tahun 2004 di Instalasi Penelitian Cimanggu, Balai Penelitian Tanaman Rempah dan Obat (Balitro), Bogor.

Bibit tanaman nilam

Somaklon nilam yang akan diuji ketahanannya terhadap bakteri *R. solanacearum* merupakan hasil stek pucuk satu ruas dari tanaman nilam Aceh klon Tapak Tuan. Tanaman nilam yang akan diuji tersebut merupakan hasil variasi somaklonal yang telah dilakukan oleh Mariska *et al.* (1996), yaitu terdiri atas somaklon dengan nomor 1b, 5a, 7a, 12a, 15a, 25, 42, 54, 55, dan 75. Pada penelitian ini juga diuji dua varietas nilam Aceh sebagai pembanding yaitu

Cirateun (belum pernah diuji ketahanannya) dan Sidikalang yang pada penelitian sebelumnya menunjukkan relatif lebih tahan terhadap penyakit layu bakteri (Nasrun *et al.*, 2004a).

Stek somaklon nilam ditanam pada media tanam di dalam kantong plastik hitam (polybag) yang berukuran (20 x 15) cm. Media tanam yang digunakan adalah tanah steril yang dicampur dengan pasir dan pupuk dengan perbandingan (tanah: pasir: pupuk= 2:1:1). Bibit somaklon nilam yang tumbuhnya bagus dan seragam dipilih untuk diinokulasi dengan bakteri *R. solanacearum*. Percobaan dilakukan dengan menggunakan Rancangan Acak Lengkap. Tiap somaklon nilam yang diuji terdiri atas 10 tanaman. Inokulasi dilakukan dua kali sebagai ulangan.

Persiapan inokulum bakteri *Ralstonia solanacearum*

Bakteri *R. solanacearum* yang digunakan pada penelitian ini diisolasi dari tanaman nilam yang terinfeksi yang diketemukan di Instalasi Penelitian Cimanggu, Balitro, Bogor. Inokulum bakteri dipersiapkan dan dipelihara di Laboratorium Kelompok Peneliti Penyakit. Bakteri tersebut ditumbuhkan pada media Succrosa Peptone Agar (SPA) yang ditambah dengan antibiotik (Polymixin B sulfat 1%, Crystal violet 1%, Tetra Zolium Chloride (TZC) 1%, Fennicillin 0.1%, dan Chloramphenicol 1%). Kemudian bakteri diperbanyak pada media SPA biasa dalam cawan Petri. Bakteri yang telah berumur 2 hari disuspensikan dengan air steril dan diukur kerapatan selnya dengan spektrofotometer pada panjang gelombang 650 nm, sehingga diperoleh suspensi bakteri dengan nilai Optical Density (OD=0.01) yang mengandung bakteri sekitar 10^7 sel /ml. Suspensi bakteri tersebut selanjutnya digunakan sebagai inokulum.

Inokulasi bakteri pada tanaman nilam

Inokulasi bakteri dilaksanakan pada bibit somaklon yang berumur kurang lebih satu bulan. Tanaman diinokulasi dengan cara menginjeksikan suspensi bakteri (inokulum) dengan bantuan jarum pada bagian pangkal batang tanaman. Pangkal batang yang akan diinokulasi terlebih dahulu disemprot dengan alkohol 70%. Selanjutnya diolesi dengan vaselin untuk menahan tetesan inokulum agar tidak jatuh. Dengan menggunakan pipet steril, pada bagian pangkal batang yang telah diolesi dengan vaselin diberi 2 tetes suspensi bakteri pada tempat yang berbeda. Selanjutnya pada masing-masing tetesan inokulum bakteri ditusuk dengan jarum steril untuk membantu agar suspensi bakteri masuk ke dalam jaringan tanaman.

Pengamatan gejala penyakit layu

Tanaman yang telah diinokulasi dengan *R. solanacearum* diinkubasikan dibawah naungan di Instalasi Penelitian Cimanggu, Balitro, Bogor. Pengamatan dilakukan setiap hari untuk melihat masa inkubasi penyakit layu pada tanaman nilam yang telah diinokulasi. Semua somaklon nilam yang diuji ketahanannya diamati pertumbuhannya dan gejala penyakitnya diberi nilai skor seminggu sekali. Skor dinilai berdasarkan gejala layu yang ada dengan kriteria seperti yang tertera pada Tabel 1.

Tabel 1. Nilai skore dan kriteria gejala layu pada bibit nilam yang diinokulasi dengan *R. Solanacearum*

Nilai Skor	Kriteria gejala penyakit layu
0	Tdk ada gejala (tanaman sehat)
1	1-2 daun layu
2	3-4 daun layu
3	> 4 daun layu
4	Semua daun layu, tanaman belum mati
5	Tanaman mati

Tingkat ketahanan tanaman ditentukan berdasarkan besarnya intensitas serangan penyakit yang dihitung dari nilai skore dengan rumus sebagai berikut:

$$I = \frac{\sum (n_i \times v_i)}{Z \times N} \times 100 \%$$

Keterangan:

- I = Intensitas serangan
 n_i = Jumlah tanaman atau bagian tanaman contoh dengan skala kerusakan v_i
 v_i = Nilai skala kerusakan contoh ke i
 N = Jumlah tanaman atau bagian tanaman contoh yang diamati
 Z = Nilai skala kerusakan tertinggi

HASIL DAN PEMBAHASAN

Pada penelitian pendahuluan menunjukkan bahwa cara ir. okulasi dengan menyiramkan inokulum bakteri sebanyak 20 ml (10⁷ sel/ ml) pada tanah disekitar perakaran bibit nilam, kurang efektif dalam menimbulkan gejala layu (tanaman yang diinokulasi tidak menunjukkan gejala yang khas). Oleh karena itu pada penelitian ini inokulasi dilakukan dengan menggunakan metode tusuk jarum ("needle pucture"), yaitu cara inokulasi dengan memasukkan inokulum bakteri ke bagian pangkal batang tanaman dengan bantuan jarum (untuk membantu memasukkan inokulum ke jaringan tanaman). Cara ini lebih efektif dan dapat menimbulkan gejala layu yang khas.

Gejala penyakit layu

Gejala layu yang timbul pada tanaman nilam yang diinokulasi dengan *R. solanacearum* adalah khas dan mirip dengan gejala penyakit yang biasa ditemukan di lapangan. Gejala layu dimulai pada daun secara tidak beraturan. Kadang-kadang pada satu individu tanaman yang sakit terdapat beberapa daun/ cabang yang layu dan ada daun/ cabang lain yang masih sehat. Selanjutnya semua daun, cabang, dan seluruh bagian tanaman menjadi layu dan akhirnya tanaman mati.

Gejala layu pada tanaman tersebut disebabkan oleh masa bakteri yang menginfeksi dan berkembang di dalam jaringan pembuluh batang (Sinha, 1985).

Bakteri tersebut selain menyumbat jaringan pembuluh juga memproduksi polysaccharida, menghasilkan senyawa-senyawa tertentu, dan enzim yang dapat merusak dinding sel, serta mengurangi tekanan air dalam jaringan pembuluh. Dampak dari tersumbatnya jaringan pembuluh tersebut menyebabkan translokasi air dan makanan dari bawah ke atas menjadi terhambat, sehingga menyebabkan tanaman layu dan akhirnya mati.

Apabila batang tanaman yang terinfeksi dipotong secara melintang dan dimasukkan ke dalam air jernih, maka akan terlihat adanya aliran masa bakteri yang seperti benang-benang halus berwarna putih yang biasa disebut eksudat. Hal ini yang membedakan dengan gejala layu yang disebabkan oleh penyebab lain. Pada batang tanaman yang dibelah membujur sering terlihat adanya garis garis berwarna kecoklatan yang merupakan kerusakan pada pembuluh kayu. Apabila potongan batang tanaman tersebut dibuat sayatan tipis penampang melintangnya dan diamati dibawah mikroskop, maka akan terlihat masa bakteri yang menyumbat jaringan pembuluh tanaman.

Hasil reisolasi bakteri dari tanaman nilam yang menunjukkan gejala penyakit layu bakteri setelah diinokulasi dengan *R. solanacearum* diperoleh koloni bakteri yang mempunyai sifat-sifat yang khas (Lelliot dan stead, 1987). Dengan demikian dapat dipastikan bahwa penyebabnya adalah *R. solanacearum*.

Awal munculnya gejala layu (Periode Inkubasi)

Gejala layu mulai terlihat kurang lebih setelah 8 hari setelah inokulasi (HSI), yaitu bervariasi antara (8.83-15.8) HSI. Sementara gejala layu muncul paling lambat pada somaklon nomor 55, yaitu 15.8 HSI (Tabel 2). Hal ini mengindikasikan bahwa somaklon nomor 55 relatif lebih tahan dibanding dengan somaklon lain yang diuji dan 2 klon pembandingnya (Cirateun dan Sidikalang).

Teknik inokulasi dengan memasukkan inokulum patogen langsung ke dalam pembuluh kayu mengakibatkan hilangnya faktor hambatan fisik yang memungkinkan tanaman dapat melawan infeksi patogen melalui akar. Dengan demikian teknik ini mengakibatkan keragaman genetik yang menentukan hambatan infeksi tidak muncul.

Ada tidaknya pelukaan pada organ tanaman juga mempengaruhi proses infeksi bakteri patogen. Luka yang terjadi pada waktu dilakukan inokulasi dengan cara menusukkan jarum pada batang tanaman menyebabkan inokulum bakteri lebih cepat masuk ke dalam jaringan tanaman. Umumnya bakteri masuk ke dalam jaringan tanaman melalui dua cara yaitu secara pasif dan aktif. Secara pasif yaitu melalui pelukaan dan lubang alami seperti stomata. Sedang secara aktif melalui tekanan mekanik dan reaksi enzimatik.

Perbedaan periode inkubasi dapat pula disebabkan oleh perbedaan tingkat ketahanan masing-masing klon atau individu tanaman (Agrios, 1988; Sequeira dalam Velupillai, 1985). Hal ini kemungkinan juga terjadi pada somaklon nilam yang diuji. Pada penelitian ini faktor luar dan faktor dalam, kecuali tingkat ketahanan tanaman telah diusahakan relatif seragam. Oleh karena itu perbedaan periode inkubasi penyakit layu yang terjadi pada somaklon nilam yang diuji

kemungkinan disebabkan karena perbedaan tingkat ketahanan dari masing-masing somaklonnya.

Tabel 2. Masa inkubasi somaklon nilam yang diinokulasi dengan *R. solanacearum*.

Somaklon/klon/varietas nilam	Periode inkubasi (HSI)
1 b	11,06
5 a	12,10
7 a	13,36
12 a	8,83
15 a	9,10
25	13,60
42	13,70
54	15,00
55	15,80
75	12,70
CIRATEUN	12,80
SIDIKALANG	13,83

Keterangan:

HSI = Hari Setelah Inokulasi

Intensitas serangan penyakit

Tabel 3 menunjukkan bahwa Intensitas serangan penyakit pada tanaman yang diuji berkisar antara (50-100)%. Sementara somaklon nomor 55 mempunyai intensitas serangan penyakit yang paling rendah yaitu 50%. Angka ini berbeda nyata (pada uji Duncan 5 %) dengan pada somaklon lainnya, klon Cirateun, dan Sidikalang yang pada penelitian sebelumnya klon ini dikategorikan relatif agak tahan terhadap penyakit layu (Nasrun, 2004a).

Pada somaklon 55 gejala penyakit muncul paling lambat dan intensitas serangan penyakit paling rendah. Oleh karena itu somaklon 55 dikategorikan paling tahan dibandingkan dengan kesembilan somaklon lainnya dan terhadap dua klon pembandingnya (Cirateun dan Sidikalang). Walaupun Intensitas serangan somaklon 55 paling rendah, namun nilai Intensitas serangannya relatif masih tinggi (50%). Menurut Persley *et al.* (1985a), penggunaan varietas tahan dapat mengurangi serangan *R. solanacearum*, namun belum bisa mengendalikan penyakit layu secara sempurna.

Somaklon 1b, 5a, 7a, 12a, 25, 42, 54, 75, dan klon Cirateun mempunyai intensitas serangan yang kurang lebih sama dengan klon Sidikalang (tidak berbeda nyata pada uji Duncan 5%). Oleh karena itu ke 8 somaklon dan klon Cirateun tersebut dikategorikan sama ketahanannya dengan varietas Sidikalang. Sedangkan somaklon 15a mempunyai intensitas serangan yang paling tinggi dibanding dengan somaklon lainnya dan klon Cirateun dan Sidikalang (berbeda nyata pada uji Duncan 5%). Oleh karena itu somaklon 15a dikategorikan paling rentan.

Tabel 3. Intensitas serangan penyakit layu pada somaklon nilam yang diinokulasi dengan *R. solanacearum* (28 Hari Setelah Inokulasi).

Somaklon/ klon/ varietas nilam	Intensitas serangan penyakit (%)
1 b	70,00 ab
5 a	70,00 ab
7 a	66,00 ab
12 a	86,67 ab
15 a	92,00 a
25	66,67 ab
42	68,67 ab
54	58,00 ab
55	50,00 b
75	66,67 ab
CIRATEUN	53,33 ab
SIDIKALANG	74,00 ab

Keterangan : Angka angka yang diikuti oleh huruf yang sama menunjukkan tidak berbeda nyata pada uji DMRT pada taraf 5 %.

Ke 10 somaklon nilam yang diuji pada penelitian ini awalnya merupakan hasil setek pucuk satu ruas dari klon Tapak Tuan yang oleh Nasrun *et al.* (2004a) klon tersebut dikategorikan relatif lebih rentan dibandingkan dengan klon Sidikalang. Hasil penelitian ini menunjukkan bahwa dari ke 10 somaklon Tapak Tuan yang diuji tersebut ada 1 somaklon yang lebih tahan (nomor 55), 8 somaklon (nomor 1b, 5a, 7a, 12a, 25, 42, 54, 75) yang sama ketahanannya, dan 1 somaklon (15a) yang ketahanannya lebih rendah dibandingkan dengan klon Sidikalang. Hal ini menunjukkan bahwa usaha peningkatan variasi genetik melalui variasi somaklonal memberikan harapan untuk mendapatkan varian varian nilam baru yang mungkin lebih tahan terhadap penyakit layu. Namun seleksi ketahanan melalui cara tersebut belum berhasil mendapatkan tanaman yang benar benar tahan atau toleran. Oleh karena itu cara tersebut masih perlu dikembangkan untuk mendapatkan varian-varian nilam yang lebih banyak sehingga memperbesar kemungkinan untuk memperoleh somaklon nilam yang lebih tahan terhadap penyakit layu bakteri.

Pada penelitian ini klon Sidikalang yang digunakan sebagai pembanding mempunyai intensitas serangan yang cukup tinggi dibandingkan pada pengujian sebelumnya yang dilakukan oleh Nasrun *et al.* (2004a). Perbedaan respon dari klon Sidikalang tersebut mungkin disebabkan karena perbedaan tingkat patogenisitas, umur isolat, dan konsentrasi dari bakteri *R. solanacearum* yang digunakan sebagai inokulum pada kedua penelitian tersebut. Hal ini juga kemungkinan disebabkan karena perbedaan kondisi lingkungan seperti suhu dan kelembaban tanah, intensitas cahaya, dan curah hujan pada saat kedua penelitian tersebut dilakukan. Menurut Haywards (1985) dan Sequiera *dalam* Velupillai (1985) faktor-faktor lingkungan dapat merubah sifat ketahanan tanaman terhadap penyakit layu yang disebabkan oleh *R. Solanacearum*. Suhu udara mempunyai

peranan yang sangat penting dalam perkembangan penyakit layu. Bakteri *R. solanacearum* merupakan patogen yang akan menjadi sangat aktif pada suhu optimum. Sementara intensitas cahaya yang rendah akan mengurangi ketahanan tanaman terhadap penyakit layu (Agrios, 1998; Haywards, 1985; Velupillai, 1985). Kelembaban tanah juga berperan dalam penyebaran bakteri di dalam tanah dan kecepatan proses infeksi. Kelembaban tanah yang tinggi dan tanah yang selalu lembab akan memberikan kondisi yang sangat baik bagi perkembangan penyakit layu yang disebabkan oleh *R. solanacearum* (Abdullah dalam Haywards, 1985; Akiew, 1985; Iqbal dan Kumar, 1985; Persley, 1985). Namun keadaan tanah yang kering dan panas akan menghambat perkembangan bakteri *R. solanacearum* (Akiew, 1985; French, 1985 dan Sequeira dalam Haywards, 1985).

KESIMPULAN

Ke 10 somaklon nilam Tapak Tuan yang diuji pada penelitian ini mempunyai tingkat ketahanan yang bervariasi terhadap *R. solanacearum*. Somaklon nomor 55 menunjukkan lebih tahan dibandingkan dengan somaklon lainnya juga terhadap dua klon pembandingnya (Cirateun dan Sidikalang).

DAFTAR PUSTAKA

- Agrios, G. N. 1988. Plant Pathology. Third Edition. Academic Press, INC, 803.
- Akiew, E. B. 1985. Influence of soil moisture and temperature on the persistence of *Pseudomonas solanacearum*. Bacterial Wilt Disease in Asia and The South Pasific. Proceeding of an International Workshop held at PCARRD, Los Banos, Philippines 8-10 October, 77-79.
- Asman, A., M. A. Adhi, dan D. Sitepu. 1998. Penyakit layu, budog dan penyakit lainnya serta strategi pengendaliannya. Monograf Nilam. Balai Penelitian Tanaman Rempah dan Obat (Balitro), Bogor. 5: 84-88.
- Buddenhagen, I. W. 1985. Bacterial wilt revisited. Bacterial Wilt Disease in Asia and The South Pasific. Proceeding of an International Workshop held at PCARRD, Los Banos, Philippines 8-10 October, 126-143.
- French, E. R. 1985. Interaction between strains of *Pseudomonas solanacearum*, its hosts and the environment. Bacterial Wilt Disease in Asia and The South Pasific. Proceeding of an International Workshop held at PCARRD, Los Banos, Philippines 8-10 October, 99-104.
- Hayward, A. C. 1985. Bacterial wilt caused by *Pseudomonas solanacearum* in Asia and Australia : an overview. Bacterial Wilt Disease in Asia and The South Pasific. Proceeding of an International Workshop held at PCARRD, Los Banos, Philippines 8-10 October 1985, 15-24.
- Hobir, D. Seswita, dan R. Jiwanti. 2001. Pengujian resistensi beberapa klon nilam. Laporan Teknis Balai Penelitian Tanaman Rempah dan Obat (Balitro), Bogor.

- Hobir, 2002. Pengujian adaptabilitas klon-klon nilam hasil variasi somaklonal. Laporan Teknis Penelitian. Badan Penelitian dan Pengembangan Pertanian. Balai Penelitian Tanaman Rempah dan obat, 1-6.
- Lelliott, R. A. and D. E. Stead, 1987. Methods for the diagnosis of bacterial diseases of plants. Methods in Plant Pathology. Vol: 2. Published on behalf of the British Society for Plant Pathology by Blackwell Scientific Publications. Oxford London Edinburgh Boston Palo Alto Melbourne, 216.
- Mahmud, M. 1985. Bacterial wilt in Indonesia. Bacterial Wilt Disease in Asia and The South Pasific. Proceeding of an International Workshop held at PCARRD, Los Banos, Philippines 8-10 October 1985, 15-24.
- Mariska, I., Hobir, E. Gati, dan D. Seswita. 1996. Peningkatan keragaman genetik tanaman nilam melalui kultur kalus dan iradiasi. Risalah Pertemuan Ilmiah Aplikasi Isotop dan Radiasi. Badan Tenaga Atom Nasional. Pusat Aplikasi Isotop dan Radiasi. Jakarta, 9-10 Januari 1996, 65-69.
- Nasrun, Y. Nuryani, Hobir dan Refiany. 2004a. Seleksi ketahanan varian nilam terhadap penyakit layu bakteri. Prosiding Seminar. Ekpose Teknologi Gambir Kayumanis dan Atsiri. Pusat Penelitian dan Pengembangan Perkebunan, 115-120.
- Nasrun, Christanti, T. Arwianto dan I. Mariska. 2004b. Identifikasi bakteri patogen penyakit layu nilam. Prosiding Seminar. Ekpose Teknologi Gambir Kayumanis dan Atsiri. Pusat Penelitian dan Pengembangan Perkebunan, 100-108.
- Nuryani, Y. 2002. Evaluasi daya hasil nilam hasil fusi protoplas. Laporan Teknis Penelitian. Balitro, 26-30.
- Persley, G. J., P. Batugal, D. Gapasin, P. Vander Zaag. 1985a. Summary of discussion and recommendations. Bacterial Wilt Disease in Asia and The South Pasific. Proceeding of an International Workshop held at PCARRD, Los Banos, Philippines 8-10 October 1985, 7-13.
- Persley, G. J. 1985b. Ecology of *Pseudomonas solanacearum*, the causal agent of bacterial wilt. Bacterial Wilt Disease in Asia and The South Pasific. Proceeding of an International Workshop held at PCARRD, Los Banos, Philippines 8-10 October 1985, 71-76.
- Radhakrishnan, S. K., Mathew and J. Mathew. 1997. Influence of shade intensities and varietal reactions of patchouli (*Pogostemon patchouli*) to bacterial wilt incited by *Ralstonia (Pseudomonas) solanacearum* E. F. Smith. Bacterial Wilt Newsletter. Publication of the Australian Centre for International Agricultural Research.
- Sequeira, L. 1979. Development of resistance to bacterial wilt derived from *Solanum phureja* on the development in control of potato bacterial

- diseases. Report of a planing conference. Lima,, Peru. International Potato Centre. 55-62. *dalam* Velupillai, M. 1985. Bacterial wilt in Sri Lanka. Bacterial Wilt Disease in Asia and The South Pasific. Proceeding of an International Workshop held at PCARRD, Los Banos, Philippines 8-10 October 1985, 57- 64.
- Sinha, S. K. 1985. Bacterial wilt in India. Bacterial Wilt Disease in Asia and The South Pasific. Proceeding of an International Workshop held at PCARRD, Los Banos, Philippines 8-10 October 1985, 28-29.
- Sitepu, D. dan A. Asman. 1989. Laporan penelitian penyakit nilam di Daerah Istimewa Aceh. Kerjasama PT Pupuk Iskandarmuda (Persero) dan Balittro, Bogor, 20.
- Velupillai, M. 1985. Bacterial wilt in Sri Lanka. Bacterial Wilt Disease in Asia and The South Pasific. Proceeding of an International Workshop held at PCARRD, Los Banos, Philippines 8-10 October 1985, 57- 64.