

PEMURNIAN DAN DETEKSI SEROLOGI PATCHOULI MOTTLE VIRUS PADA TANAMAN NILAM

PURIFICATION AND SEROLOGICAL DETECTION OF PATCHOULI MOTTLE VIRUS ON PATCHOULI PLANTS

Sedyo Hartono, Siti Subandiyah

Jurusan Hama dan Penyakit, Fakultas Pertanian, Uninersitas Gadjah Mada, Yogyakarta.

Email: sedyo_h@yahoo.com

Aminatun Munawarti, Retno Mastuti, dan Serafinah Indriani

Jurusan Biologi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam,
Universitas Brawijaya, Malang.

ABSTRACT

Patchouli mottle virus (PatMoV) is the most severe disease pathogen and causes substantial losses in many patchouli-producing regions in Indonesia. Serological detection tool for the disease was developed in this research. Virus isolation was conducted on *Chenopodium amaraticolor* resulted on the homogenous local lesions 6 days after inoculation. Virus purification was obtained from 200g inoculated leaves resulted on 2 ml virus solution with the concentration of 1 mg/ml. Polyclonal antibodies were produced on rabbits. Harvested antiserum was used for further virus detection by Indirect-Enzyme linked Immunosorbent assay (I-ELISA) and dot-immunobanding assay (DIBA) techniques. The antibodies were positively reacted with purified viruses, infected field collection of patchouli, and inoculated *C. amaranticolor*. On the other hand un-inoculated *C. amaranticolor* samples and healthy patchouli generated from tissue cultures gave negative reaction with the antibodies. This is the first report of cheap practical antibody production for PatMoV detection in Indonesia.

Key words: Patchouli, polyclonal antibody, Patchouli mottle virus, ELISA, DIBA.

INTISARI

Patchouli mottle virus (PatMoV) merupakan patogen penyebab penyakit yang sangat penting dan menyebabkan kerugian hasil di sentra produksi nilam di Indonesia. Perangkat deteksi serologi untuk mendeteksi virus di dalam jaringan tanaman sakit telah dikembangkan dalam penelitian ini. Isolasi virus yang dilakukan dengan cara inokulasi buatan pada *Chenopodium amaraticolor* menghasilkan bercak lokal yang homogen 6 hari setelah inokulasi. Purifikasi virus dari 200g daun yang telah diinokulasi menghasilkan 2 ml cairan virus dengan konsentrasi 1 mg/ml. Produksi antibodi poliklonal dilakukan dengan menyuntikkan virus murni pada seekor kelinci percobaan. Antiserum yang dihasilkan dari darah kelinci langsung digunakan untuk penelitian deteksi virus dengan teknik Indirect-Enzyme linked immunosorbent assay (I-ELISA) dan Dot-immunobanding assay (DIBA). Hasil penelitian menunjukkan bahwa antibodi bereaksi positif dengan virus murni,

tanaman nilam terinfeksi dari lapangan, dan *C. amaranticolor* yang telah diinokulasi buatan. Sedangkan sampel *C. amaranticolor* sehat dan nilam hasil kultur jaringan memberikan reaksi negatif terhadap antibodi. Hasil penelitian ini merupakan produksi antibodi murah yang pertama untuk deteksi PatMoV di Indonesia.

Kata kunci: Patchouli, antibodi poliklonal, *Patchouli mottle virus*, ELISA, DIBA.

PENGANTAR

Nilam (*Pogostemon* sp.) merupakan tanaman penting penghasil minyak atsiri yang disebut minyak nilam (patchouli oil). Minyak nilam dihasilkan dari proses penyulingan daun dan rantingnya. Hampir 90% kebutuhan minyak nilam dunia dipasok dari Indonesia, karena mutunya dinilai yang paling baik. Ekspor minyak nilam Indonesia dari tahun ke tahun terus mengalami peningkatan hampir 6% per tahun sesuai dengan meningkatnya permintaan minyak nilam di pasaran internasional. Volume ekspor ini juga tidak lepas dari usaha perluasan areal pertanaman di berbagai daerah di Indonesia. Minyak nilam berfungsi sebagai bahan fiksatif dan pewangi dalam industri parfum, sabun dan kosmetika. Selain itu minyak nilam juga berfungsi sebagai bahan baku obat-obatan bagi manusia dan pestisida. (Tjiptadi, 1985; Rukmana, 2004).

Di Indonesia tanaman nilam dibudidayakan di berbagai daerah antara lain: Nangroe Aceh Darussalam, Sumatera Barat, Sumatera Utara, Bengkulu, Jawa Barat, Jawa Tengah dan Jawa Timur. Namun demikian banyak persoalan dalam budidaya nilam yang belum diteliti, sehingga bisa menjadi hambatan dalam pengembangannya.

Gangguan oleh penyakit tumbuhan merupakan salah satu kendala penting dalam usaha pengembangan dan peningkatan produksi nilam. Meskipun permasalahan tersebut di lapangan sudah ada sejak lama dan menimbulkan kerugian yang berarti,

namun sampai sekarang penelitian dan publikasi mengenai penyakit nilam masih sangat terbatas. Beberapa penyakit nilam yang pernah dilaporkan adalah penyakit busuk akar nilam yang disebabkan oleh jamur *Phytophthora* sp. (Mansur dan Tasma, 1987). Penyakit ini biasanya muncul pada tanah-tanah yang tergenang air atau permukaan air tanahnya terlalu dangkal. Nur Aeny (1985) dalam suatu penelitian lapang di Sukabumi, Jawa Barat, menemukan beberapa penyakit nilam anatara lain: penyakit lodoh yang disebabkan oleh jamur *Rhizoctonia* sp. dan penyakit busuk batang yang disebabkan jamur *Sclerotium* sp. . Yuliani (1991) juga melaporkan bahwa dari hasil inventarisasi penyakit nilam di daerah Banyumas, Jawa Tengah, ditemukan penyakit bercak daun yang disebabkan oleh jamur *Curvularia* sp. dan bercak tepi daun *Pestalotia* sp.. Asman *et al.* (1993) melaporkan adanya penyakit layu bakteri yang disebabkan oleh *Ralstonia solanacearum* dan penyakit budok yang belum diketahui penyebabnya pada nilam di Sumatera Barat. Patogen penyebab penyakit budok selanjutnya oleh Kusnanta (2005) diidentifikasi sebagai jamur karat palsu (*Synchytrium* sp.).

Selain itu pada tanaman nilam di Indonesia juga dilaporkan adanya penyakit yang disebabkan oleh virus kuning nilam (Sumardiyono *et al.*, 1993). Kajian sifat-

sifat virus termasuk pengujian secara serologi dan mikroskop elektron menunjukkan adanya kemiripan dengan Patchouly mottle potyvirus (PatMoV) yang pernah dilaporkan di Jepang (Natsuaki *et al.*, 1989; 1994). Tanaman nilam yang terinfeksi virus ini akan terlihat warna kuning atau klorosis setempat-setempat pada daun, daun berubah bentuk (malformasi), daun sempit, dan pada serangan yang parah akan menyebabkan tanaman menjadi kerdil. Infeksi virus bersifat sistemik dan sulit dalam pengendaliannya. Sampai saat ini satu-satunya cara perbanyakan tanaman nilam adalah melalui stek batang, sehingga cara ini akan cepat menyebarkan virus dari satu areal pertanaman ke tempat lain dan melestarikan virus dari musim ke musim (Hull, 2002). Oleh karena itu ketersediaan perangkat deteksi yang cepat, akurat, dan murah untuk mengetahui infeksi virus sejak dini sangat diperlukan. Penelitian ini bertujuan untuk melakukan pemurnian virus, memproduksi antibodi poliklonal spesifik dan deteksi serologi terhadap PatMoV.

BAHAN DAN METODE

Bahan Tanaman. Tanaman nilam sakit bergejala mottle kuning dan klorosis diperoleh dari sentra pertanaman nilam di Banjarnegara, Jawa Tengah. Tanaman nilam sehat diperoleh dari hasil kultur jaringan yang dilakukan sebelumnya di Jurusan Biologi, Unibraw, Malang. Tanaman indikator *Chenopodium amaranticolor* sakit merupakan hasil inokulasi buatan dengan PatMoV isolat Banjarnegara.

Isolasi dan Perbanyakan Virus. Virus diisolasi dari tanaman sakit yang bergejala kuning mottle menurut prosedur yang pernah

dilakukan sebelumnya (Hartono, 1992). Satu gram sampel tanaman sakit ditumbuk sampai halus dengan menambahkan Na-sulfit dan 9 ml bufer fosfat 0,05 M pH 7,0. Cairan ekstrak kemudian disaring dengan kain kassa untuk mendapatkan cairan virus (sap). Sap virus diinokulasikan ke tanaman indikator *C. amaranticolor* dengan menambahkan serbuk karborundum 600 mesh pada cairan sap. Gejala bercak lokal yang muncul kurang lebih 1 – 2 minggu setelah inokulasi kemudian diambil bercak yang ukuran dan bentuknya saragam. Bercak lokal terpilih diinokulasikan lagi ke tanaman perbanyakan virus (*C. amaranticolor*) sebagai bahan untuk pemurnian virus.

Pemurnian Virus. Pemurnian virus dilakukan menurut metode yang digunakan oleh Thomas *et al.* (1997). Daun *C. amaranticolor* hasil perbanyakan virus (100-200 g) ditumbuk dengan menambahkan Nitrogen cair sampai mendapatkan bubuk daun. Ke dalam bubuk daun ditambahkan bufer ekstraksi (BE; 0,5 M borate pH 6,8 dan 0,2% 2-mercaptoethanol. Campuran diperas dengan 4 lapis kain kasa, dan filtrat kemudian dijernihkan dengan disentrifugasi pada 10.000 \times g selama 10 menit. Triton X-100 ditambahkan hingga tercapai konsentrasi akhir 2,5% (vol/vol) dan campuran diaduk dengan stirer selama 1-1,5 jam. Campuran selanjutnya disentrifugasi pada 125.000 \times g selama 2 jam di atas gradien sukrosa 10-30% dalam BE. Zona virus diambil dan diencerkan dengan 0,05 M bufer borate dan dikonsentrasikan dengan ultrasentrifugasi pada 118.000 \times g selama 1 jam. Hasil pelet diresuspensi dengan 2 ml 0,05 M bufer borate pH 6,8 atau 0,05 M bufer sodium fosfat pH 7,0. Sediaan virus murni diukur dengan spektrofometer-UV.

Produksi Antibodi Poliklonal Pada Kelinci.

Antibodi poliklonal yang spesifik terhadap PatMV diproduksi dengan cara mengimunisasi kelinci dengan virus murni total 40 μg dengan interval waktu 2 minggu setiap penyuntikan. Virus dicampur dengan Freund's complete adjuvant volume 1:1 pada imunisasi pertama, dan Freund's incomplete adjuvant pada imunisasi berikutnya lewat paha (intramuscular). Booster dilakukan pada imunisasi ke-4 secara intravenous lewat tepi telinga. Antiserum dicek satu minggu setelah imunisasi terakhir dengan cara mengambil darah dari vena di tepi telinga kelinci. Setelah dipisahkan dari sel-sel darah merah, antiserum langsung digunakan untuk melakukan kajian deteksi virus pada berbagai sampel nilam.

Deteksi serologi dengan teknik ELISA.

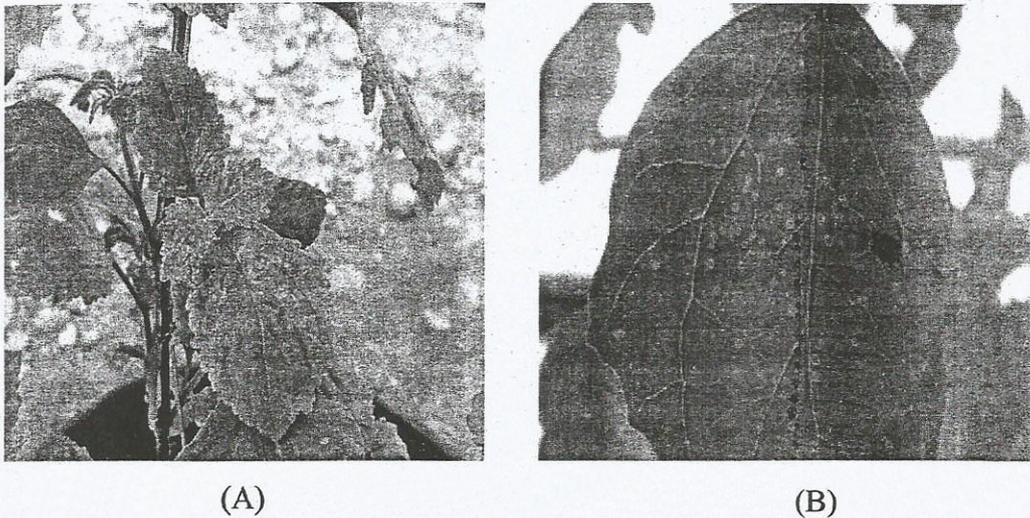
Uji ELISA yang dilakukan untuk deteksi PatMoV adalah menggunakan metode ELISA tidak langsung (Indirect-ELISA) seperti yang dilakukan oleh Koenig (1981) dengan modifikasi. Pengujian dilakukan pada polystyrene microtitre plate. Plate diinkubasikan berturut-turut dengan: (1) 100 μl antigen dalam bufer pelapis (0,05 M buffer sodium carbonate, pH 9,6) selama 2 jam 37°C; (2) 100 μl antiserum PatMoV selama 18 jam 6 °C; (3) 100 μl konjugate enzim selama 4 jam 37°C; dan (4) 150 μl substrat yang berupa 1 mg/ml *p*-nitrophenil phosphate dalam 10% diethanolamine pH 9,8 dan diinkubasikan selama 1,5 jam suhu 25°C. Setiap tahap uji dilakukan tiga kali pencucian masing-masing selama 3 menit. Larutan pencuci adalah 0,02 M phosphate-buffered saline (PBS) yang mengandung 0,05% Tween-20 (PBS-T). Nilai Absorbansi diukur pada panjang gelombang 405 nm menggunakan ELISA-reader.

Deteksi serologi dengan teknik DIBA.

Metode DIBA sebenarnya merupakan modifikasi dari teknik ELISA. Teknik DIBA untuk pengujian antigenisitas virus yang digunakan dalam penelitian ini adalah seperti yang dilaporkan oleh Hibi dan Saito (1985). Antigen (virus murni maupun ekstrak tanaman) ditetaskan (*dotted*) di atas kertas *nitrocellulose membrane* (NCM, ukuran pori 0,45 μm) menggunakan pipet mikro. NCM yang telah ditetesi larutan sampel direndam dalam larutan *blocking* (1% Bovine Serum Albumin, BSA) sambil digojog pelan-pelan selama 30 menit. NCM kemudian direndam dalam larutan antiserum PatMoV (pengenceran 100 kali) selama 30-60 menit. NCM dicuci tiga kali dengan bufer pencuci (PBS-T). NCM direndam dalam larutan *conjugate* dengan pengenceran 3000 kali. Setelah dicuci dengan larutan PBS-T, NCM direndam dalam larutan substrat yang terdiri dari *Fast Red TR-Salt* (Sigma) dan *naphthol AS-MX* (Sigma) dengan komposisi dan cara penyiapan seperti dilaporkan oleh Bantari dan Goodwin (1985). Sampel uji yang bereaksi positif akan menunjukkan warna merah di atas kertas NCM, sedangkan yang negatif tidak menunjukkan reaksi warna.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Isolasi dan Perbanyakan Virus. Hasil isolasi virus dari tanaman nilam sakit yang bergejala kuning mottle (Gambar 1A) setelah diinokulasikan ke tanaman indikator *C. amaranticolor* diperoleh gejala bercak lokal yang muncul kurang lebih 6 hari setelah inokulasi (Gambar 1B). Sebagian besar bentuk bercak lokal dan waktu munculnya gejala adalah seragam sehingga dapat diasumsikan bahwa virus penyebab penyakit-



Gambar 1. (A) Gejala klorosis mottle pada tanaman nilam yang terinfeksi secara alami oleh PatMoV; (B) Bercak lokal pada *Chenopodium amaranticolor* hasil isolasi dari tanaman nilam sakit

nilam yang digunakan dalam penelitian ini tidak tercampur dengan virus lain. Konfirmasi dengan teknik *polymerase-chain reaction* (PCR) menggunakan primer untuk *Potyvirus* juga menunjukkan hasil yang sama (*data tidak dipublikasi*). Bercak yang ukuran dan bentuknya saragam kemudian dipilih dan diperbanyak dengan cara menginokulasikan ke tanaman *C. amaranticolor*. Dari 200 tanaman *C. amaranticolor* yang diinokulasi dengan PatMoV diperoleh daun terinfeksi seberat 200 g, berat optimum untuk bahan pemurnian virus.

Pemurnian Virus sebagai Antigen. Pemurnian dari 200 g daun *C. amaranticolor* sakit dihasilkan 2 ml virus murni dengan konsentrasi 1mg/ml hasil pengukuran dengan spektrofotometer panjang gelombang 278 nm = 1,4 (H'' 1 mg/ml). Ini menunjukkan bahwa prosedur pemurnian yang dilakukan dalam penelitian-

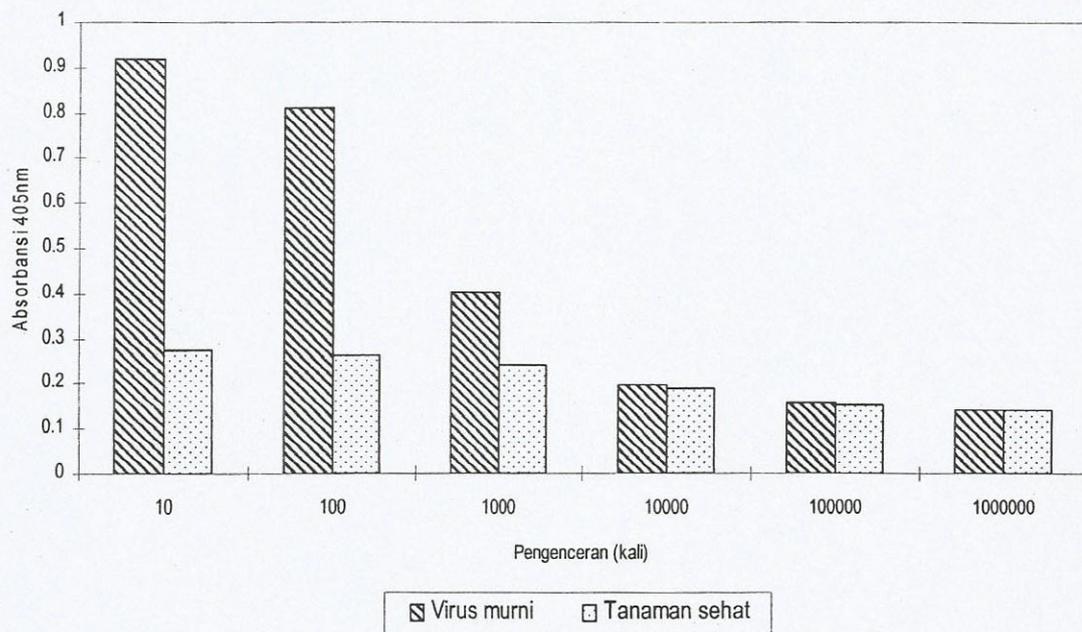
ini adalah sangat sesuai untuk pemurnian PatMoV karena memberikan kuantitas maupun kualitas hasil yang sangat baik. Sediaan virus murni inilah yang selanjutnya digunakan sebagai antigen untuk mengimbas pembentukan antibodi pada kelinci percobaan.

Produksi Antibodi Poliklonal Pada Kelinci.

Imunisasi dari satu ekor kelinci percobaan menghasilkan kurang lebih 15 ml antiserum kasar (*crude antisera*). Sebelum digunakan untuk melakukan kajian deteksi serologi virus pada berbagai sampel nilam, dilakukan pengukuran titer antiserum dengan teknik ELISA. Hasil pengujian titer antiserum dengan menggunakan teknik I-ELISA terhadap PatMoV murni (10 ig/ml) dan ekstrak tanaman *C. amaranticolor* sehat disajikan pada gambar 2. Gambar 2 menunjukkan bahwa antiserum PatMoV pada pengenceran antiserum 1000 kali masih mampu mendeteksi virus dan masih mampu membedakan antara virus dan ekstrak tanaman

sehat. Sedangkan pada pengenceran 10.000 kali, antiserum sudah tidak mampu lagi membedakan antara virus dan tanaman sehat dengan ditunjukkannya nilai absorbansi yang hampir sama. Sehingga dapat dikatakan bahwa antiserum yang dihasilkan pada penelitian ini mempunyai titer 10^{-3} (1/1000). Oleh karena itu pada uji I-ELISA selanjutnya digunakan antiserum dengan pengenceran 1000 kali. Hasil ini sangat menguntungkan karena antiserum dapat digunakan secara efisien dengan tidak mengurangi sensitivitas hasil uji.

Deteksi secara serologi virus nilam dengan teknik ELISA. Untuk mengetahui reaktivitas dan spesifisitas dari antiserum PatMoV, uji serologi dengan teknik I-ELISA dilakukan untuk mendeteksi keberadaan virus di dalam ekstrak tanaman sakit. Hasil reaktivitas antiserum terhadap berbagai sampel uji disajikan pada tabel 1. Tabel 1 menunjukkan bahwa sampel yang berupa virus murni PatMoV, ekstrak tanaman nilam sakit, dan ekstrak *C. amaranticolor* sakit bereaksi positif (+) dengan antiserum PatMoV. Sedangkan sampel yang berupa ekstrak *C. amaranticolor* sehat, ekstrak nilam sehat hasil



Gambar 2. Nilai absorbansi dari pengujian I-ELISA dengan antiserum yang diencerkan secara seri.

kultur jaringan, dan bufer ekstraksi menunjukkan reaksi negatif (-) terhadap antiserum PatMoV. Hasil ini menunjukkan bahwa antiserum PatMoV yang diproduksi dari kelinci dalam penelitian ini mempunyai spesifisitas yang tinggi sehingga dapat digunakan sebagai alat deteksi virus nilam yang relatif murah, mudah, sensitif, dan akurat. Hasil produksi antibodi poliklonal terhadap PatMoV ini juga merupakan yang pertama kali dilakukan di Indonesia. Sebelumnya antibodi yang digunakan untuk melakukan deteksi virus pada nilam umumnya merupakan produksi dari luar Indonesia yang harganya sangat mahal.

Deteksi secara serologi virus nilam dengan teknik DIBA. Untuk menguji sensitivitas antiserum PatMoV, antiserum digunakan dalam deteksi virus nilam dengan teknik DIBA. Hasil deteksi virus dengan DIBA menunjukkan bahwa antiserum

PatMoV bereaksi positif (warna merah jelas) dengan sampel yang berupa ekstrak nilam sakit (Gambar 3: 1-2) dan ekstrak *Chenopodium* sakit (Gambar 3: 3-4). Sedangkan reaksi antiserum terhadap sampel yang berupa ekstrak nilam sehat (Gambar 3: 5) dan bufer ekstraksi (Gambar 3: 5) adalah negatif. Hasil ini sama dengan pengujian dengan teknik ELISA, hanya bedanya ELISA lebih sensitif karena pengenceran antiserum yang digunakan 1000 kali, sedangkan DIBA 100 kali. Namun demikian DIBA juga mempunyai kelebihan antara lain (1) pengujian sangat mudah dilakukan dan tidak memerlukan peralatan yang khusus; (2) kertas NCM yang telah ditetesi dengan ekstrak tanaman uji dapat dikirimkan lewat pos ke laboratorium lain untuk diproses selanjutnya, apabila suatu laboratorium tidak mempunyai bahan-bahan pereaksinya.

Tabel 1. Reaktivitas antiserum PatMoV dalam uji I-ELISA terhadap berbagai sampel

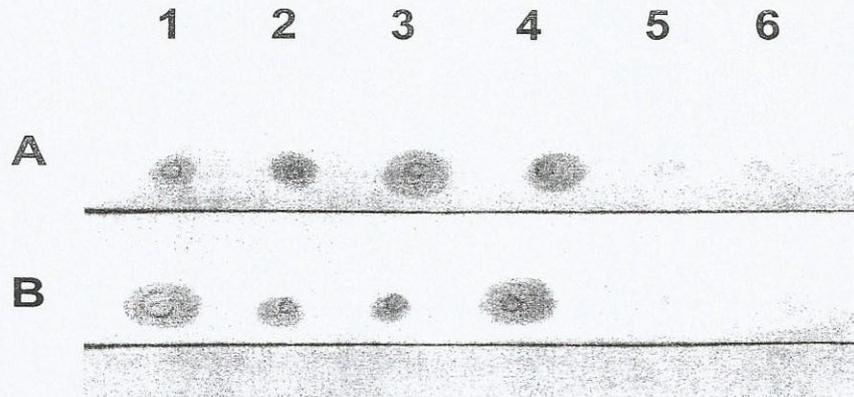
No.	Sampe Uji	Nilai Absorbansi $A_{405\text{ nm}}$	Reaksi ELISA ^c
1.	Virus murni (PatMoV) ^a	0.361	+
2.	Ekstrak nilam sakit	0.396	+
3.	Ekstrak nilam sehat	0.101	-
4.	Ekstrak <i>Chenopodium</i> sakit	0.326	+
5.	Ekstrak <i>Chenopodium</i> sehat ^b	0.106	-
6.	Bufer ekstraksi	0.052	-

Keterangan:

^a = sampel kontrol positif (+)

^b = sampel kontrol negatif (-)

^c = sampel dianggap positif apabila nilai absorbansi 405 nm mencapai tiga kali dari nilai kontrol negatif



Gambar 3. Pengujian sampel nilam dengan teknik DIBA menggunakan anti-PatMoV. 1-2: ekstrak tanaman nilam sakit; 3-4: ekstrak tanaman *Chenopodium* sakit; 5: ekstrak nilam sehat; dan 6: buffer ekstraksi. A dan B merupakan ulangan

KESIMPULAN

1. Purifikasi PatMoV yang dilakukan dalam penelitian ini menghasilkan virus murni dengan kuantitas dan kualitas tinggi (konsentrasi 1 mg/ml).
2. Antiserum PatMoV mempunyai titer 10^3 diukur dengan ELISA.
3. Deteksi serologi dengan teknik I-ELISA dan DIBA menggunakan antiserum PatMoV mampu membedakan tanaman sakit dan sehat dengan sensitivitas yang tinggi.

UNGKAPAN TERIMAKASIH

Penelitian ini dilakukan atas biaya Hibah Penelitian Kerjasama Perguruan Tinggi (PEKERTI) DIKTI tahun 2004-2005.

DAFTAR PUSTAKA

- Asman, A., Natsir, N., Nurawan, A., & Sitepu, D. 1993. Penelitian Penyakit Nilam. *Prosiding Kong. Nas. PFI XII*. Yogyakarta 6-8 September. p 903-911.
- Banttari, E.E. & P.H. Goodwin. 1985. Detection of Potato Virus S, X, and Y by Enzyme-linked Immunosorbent assay on Nitrocellulose Membrane (Dot-ELISA). *Plant Diseases* 69:202-205.
- Hibi, T. & Y. Saito. 1985. A Dot-Immunobinding Assay for the Detection of Tobacco mosaic virus in Infected Tissues. *J. Gen. Virol.* 66:1191-1194.
- Hartono, S. 1992. Sifat-sifat virus penyebab penyakit mosaik kuning pada nilam Aceh (*Pogostemon cablin*). Tesis. Fakultas Pertanian UGM. Yogyakarta. (Tidak dipublikasikan).

- Hull, R. 2002. *Mathew's Plant Virology*. Academic Press. San Diego, California, USA.
- Koenig, R. 1981. Indirect ELISA methoda for the broad specificity detection of plant viruses. *J. Gen. Virol.* 55:53-62.
- Kusnanta, A. 2005. Identifikasi dan Pengendalian Penyakit Karat Palsu pada Tanaman Nilam (*Pogostemon cablin*) dengan Fungisida. Tesis-S2. Sekolah Pasca Sarjana, Universitas Gadjah Mada. Yogyakarta. 36 p. (*tidak diterbitkan*)
- Mansur, M. & Tasma, I.M. 1987. Plasma nutfah tanaman nilam. *Dalam*. Penelitian tanaman rempah dan obat. Edisi Khusus III(1):59-63. Balai Penelitian Rempah dan Obat. Bogor.
- Natsuaki, K.T., Tomaru, K., Cheng, C.S., & Tanaka, K. 1989. Two viruses isolated from patchouli plants. NODAI Res. Inst. Tokyo University of Agriculture. Tokyo. Japan.
- Natsuaki, K.T., Tomaru, K., Ushiku, Y., Sugimura, Y., Natsuaki, T., Okuda, S. & Teranaka, M. 1994. Characterization of two viruses isolated from patchouli in Japan. *Plant Diseases* 78:1094-1097.
- Nur Aeny, T. 1985. Inventarisasi penyakit nilam (*Pogostemon cablin* Benth.) di perkebunan Cireundeu, Kec. Nagrak, Kab. Sukabumi, Jawa Barat. 38 p.
- Rukmana, R. 2004. Nilam: Prospek Agribisnis dan Teknik Budidaya. Penerbit Kanisius. Yogyakarta.
- Sumardiyono, Y.B., Sri Sulandari, & Sedyo Hartono. 1993. Penyakit mosaik pada nilam (*Pogostemon cablin*). *Prosiding Kong. Nas. PFI XII*. Yogyakarta 6-8 September. p 912-916.
- Thomas, J.E., Geering, A.D.W., Gambley, C.F., Kessling, A.F., & White, M. 1997. Purification, properties, and diagnosis of banana bract mosaic potyvirus and its distinction from abaca mosaic potyvirus. *Phytopathology* 87:698-705.
- Tjiptadi, G.H.B. 1985. Pengembangan usaha minyak atsiri. Balai Pengembangan Khemurgi dan Aneka Industri. BBPPIHP. Bogor.
- Yuliani, A. 1991. Inventarisasi penyakit-penyakit tanaman nilam di daerah tingkat II Banyumas, Jawa Tengah. Tesis. Fakultas Pertanian UGM. Yogyakarta. (*Tidak dipublikasikan*).