

## ELIMINASI PINEAPPLE MEALYBUG WILT-ASSOCIATED-VIRUS (PMWaV) DARI TANAMAN NANAS DENGAN *HOT WATER TREATMENT*

Mimi Sutrawati<sup>1</sup>, Gede Suastika<sup>2</sup>, dan Sobir<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Jurusan Perlindungan Tanaman, Fakultas Pertanian, Universitas Bengkulu

<sup>2</sup>Departemen Proteksi Tanaman, Fakultas Pertanian, IPB

<sup>3</sup>Departemen Agronomi & Hortikultura, Fakultas Pertanian IPB

mimi\_hpt37@yahoo.com

### ABSTRACT

[ELIMINATION OF *Pineapple Mealybug Wilt-associated Virus* (PMWaV) FROM PINEAPPLE PLANT BY HOT WATER TREATMENT]. Mealybug wilt of pineapple (MWP) is a devastating disease found in all the major pineapple growing regions. Closterovirus particles can be detected in both MWP symptomatic and asymptomatic pineapple. Rogue of symptomatic plants is the simplest method of controlling MWP disease, but this method is less effective as PMWaV might remain at asymptomatic plants. Use of pesticide to control mealybug and ants is not efficient and high cost. The research was conducted to develop elimination method for PMWaV-free plant by hot water treatment. PMWaV infected plant parts (leave, stem, crown) were exposed to two hot water treatments, consisting of 35 °C for 24 hour as pre-treatment and immediately followed by hot water treatment either 56 °C for 60 minute or 58 °C for 40 minute in a water bath. The infected plant without hot water treatment served as the positive control, and healthy plant without hot water treatment as the negative control. PMWaV infection could be eliminated from propagative material through hot water treatment 58 °C 40 minute in a water bath without decrease propagative material viability.

Keyword: *Pineapple mealybug wilt-associated virus*, heat treatment.

### ABSTRAK

Layu kutu putih merupakan penyakit yang sangat merusak dan telah menjadi masalah serius dalam budidaya nanas di seluruh dunia. Penyakit layu nanas berasosiasi dengan infeksi *Pineapple mealybug wilt-associated virus* (PMWaV) yang ditularkan oleh vektor kutu putih dengan bantuan semut. Partikel PMWaV terdeteksi pada tanaman yang menunjukkan gejala maupun tanaman sakit tanpa gejala layu. Peniadaan tanaman yang bergejala dari lapang merupakan cara sederhana untuk pengendalian penyakit layu nanas, namun cara ini masih menyisakan tanaman sakit yang tidak bergejala. Penggunaan pestisida untuk pengendalian kutu putih dan semut ternyata juga tidak efisien dan membutuhkan biaya yang tinggi. Penelitian ini bertujuan untuk mengembangkan metode perbanyakan bibit nanas bebas PMWaV dengan perlakuan air panas. Tanaman terinfeksi PMWaV (daun, batang, mahkota) direndam dalam air panas 35 °C selama 24 jam sebagai pra-perlakuan. Selanjutnya bahan tanaman tersebut diberi perlakuan air panas 56 °C selama 60 menit atau 58 °C selama 40 menit dalam penangas air. Tanaman terinfeksi PMWaV tanpa perlakuan air panas sebagai kontrol positif, sedangkan tanaman sehat tanpa perlakuan air panas sebagai kontrol negatif. Penelitian ini menunjukkan infeksi PMWaV dapat dieliminasi dari bahan tanaman sakit dengan perlakuan air panas 58 °C selama 40 menit di dalam penangas air tanpa mengurangi viabilitas bahan tanaman tersebut.

Kata kunci: *Pineapple mealybug wilt-associated virus*, perlakuan air panas.

## PENDAHULUAN

Nanas (*Ananas comosus* L. (Merrill)) cv. *Smooth Cayenne* merupakan tanaman buah tropika yang banyak dibudidayakan di Indonesia. Produksi nanas Indonesia pada tahun 2000 sebesar 399,299 ton dan meningkat menjadi 1,427,781 ton pada tahun 2003 (Deptan, 2008). Volume ekspor nanas kaleng Indonesia mencapai 11 % dari total ekspor dunia dan menempati urutan ketiga setelah Thailand dan Filipina (CABI, 2005). Saat ini ekspor nanas Subang sudah menembus pasar Korea Selatan. Potensi pengembangan produksi nanas Indonesia dapat lebih ditingkatkan jika faktor-faktor pembatas produksi nanas dapat diminimalkan.

Di antara berbagai faktor pembatas tersebut, serangan penyakit layu telah menjadi masalah serius dalam budi-daya nanas di seluruh dunia. Penyakit layu nanas yang berasosiasi dengan infeksi *Pineapple mealybug wilt-associated virus* (PMWaV) (Tryono, 2006; Sether and Hu, 2002a) dilaporkan menyebabkan banyak kerugian pada industri nanas dunia seperti di Hawaii mencapai 35 % (Sether and Hu 2002b) atau di Kuba mencapai 40 % (Borroto *et al.*, 2007). Di Indonesia, penyakit ini telah menyebar ke sentra-sentra produksi nanas nasional. Kejadian penyakit layu di beberapa pertanaman nanas di Blitar sudah mencapai 90 %, Subang 60-70 %, Simalungun 50-60 %, dan Bogor 50 % (Hutahayan, 2006). Rata-rata bobot buah dari tanaman bergejala layu 35 % lebih rendah daripada bobot buah tanaman bebas virus dan 30 % lebih rendah dari pada tanaman terinfeksi PMWaV-1 (Sether and Hu, 2002b).

Di lapangan, virus ini dengan efektif dapat ditularkan oleh dua spesies kutu putih, *Dysmicoccus brevipes* Cockerell dan *D. neobrevipes* Cockerell (Hemiptera: *Pseudococcidae*) (Sether *et al.*, 1998). Pengendalian penyakit layu dengan eradikasi tanaman sakit di lapang ternyata tidak menjamin lahan tersebut terbebas dari sumber inokulum karena tidak semua tanaman terinfeksi PMWaV menunjukkan gejala. Pengendalian populasi kutu putih dan semut juga kurang berhasil. Simbiosis semut dengan kutu putih (Rohrbach *et al.*, 1988; Beardsley, 1996) dan tempat hidup (*nice*) kutu putih di bagian yang tertutup dari tanaman nanas (di ketiak daun dan pangkal batang di bawah tanah) (Beardsley, 1996) menyebabkan parasit atau predator alami (maupun yang diinnundasi) tidak dapat bekerja optimal dan tetap menyisakan populasi kutu putih yang potensial menyebarkan PMWaV. Alternatif cara pengendalian penyakit layu yang memberi harapan serta perlu dikaji

adalah penggunaan bibit bebas virus. Penggunaan bibit bebas PMWaV akan menekan jumlah sumber inokulum PMWaV di lahan sehingga peluang penyebarannya menjadi kecil meskipun ada serangga vektor. Perkembangan penyakit layu pada 3 bulan pertama pertumbuhan tanaman nanas dapat menyebabkan penurunan bobot buah sampai 55 % (Sether and Hu, 2002b). Dengan demikian, penggunaan bibit bebas PMWaV diharapkan dapat mencegah terjadinya penyakit layu pada fase awal pertumbuhan tanaman nanas sehingga dapat mengurangi resiko kehilangan hasil akibat penyakit layu.

Perbanyakan dengan stek (*sectioning*) merupakan teknik bibit nanas yang dapat ditempuh untuk mengatasi kebutuhan bibit nanas secara massal (Bartholomew *et al.*, 2003; PKBT, 2008). Teknik *sectioning* dalam sistem perbanyakan nanas merupakan cara baru yang belum umum digunakan. Cara perbanyakan tanaman ini apabila dikombinasikan dengan metode eliminasi PMWaV akan dapat digunakan untuk produksi massal bibit nanas bebas virus. Pada penelitian ini eliminasi PMWaV dilakukan dari jaringan tanaman dengan perlakuan air panas pada stek.

Hasil penelitian ini diharapkan dapat menyediakan metode eliminasi PMWaV dari jaringan tanaman nanas untuk memproduksi bibit bebas PMWaV guna menekan kejadian penyakit layu nanas di lapang dan meningkatkan produksi nanas di Indonesia.

## METODE PENELITIAN

### *Penyiapan Bahan Tanaman*

Bahan tanaman diambil dari tanaman nanas induk yang menunjukkan gejala penyakit layu (diverifikasi dengan TBIA) dan tanaman sehat sebagai kontrol negatif dari Kebun Percobaan PKBT Tajur II. Bahan stek yang digunakan adalah daun, batang, dan *crown*.

### *Eliminasi PMWaV dengan Hot Water Treatment*

Sebagai *pre-treatment*, seluruh bahan stek direndam dalam air panas dengan suhu 35 °C selama 24 jam dan selanjutnya bahan stek tersebut (daun, batang, dan *crown*) dipisahkan dan diberi perlakuan panas dengan susunan faktorial. Perlakuan panas terdiri atas empat taraf, yaitu perlakuan air panas 56 °C selama 60 menit pada tanaman sakit; perlakuan air panas 58 °C selama 40 menit pada tanaman sakit; tanpa perlakuan air panas pada tanaman sakit

## ELIMINASI PINEAPPLE MEALYBUG WILT

(kontrol positif); serta tanpa perlakuan pemanasan pada tanaman sehat (kontrol negatif). Setiap kombinasi perlakuan dialokasikan secara acak pada satuan-satuan percobaan yang terdiri atas 10 stek berdasarkan rancangan acak lengkap dengan tiga ulangan.

### Penanaman Stek

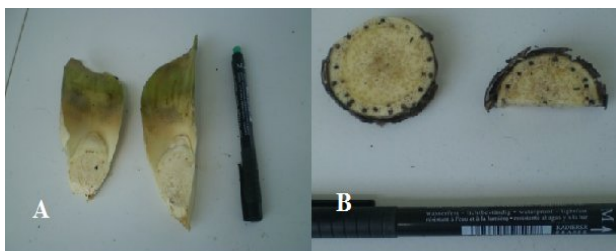
Bahan stek daun diperoleh dengan cara pemotongan bagian dasar daun sampai mengenai jaringan meristem kulit batang dengan tunas lateral (Gambar 1A), sedangkan stek batang didapatkan dengan cara memotong batang secara longitudinal menjadi 2 bagian potongan (Gambar 1B). *Crown* digunakan utuh, tanpa pemotongan karena *crown* masih sangat muda.

Semua bahan stek direndam dalam larutan fungisida dan bakterisida. Kemudian bahan stek ditanam pada media semai sekam bakar dengan jarak tanam 5 cm. Selama 2 minggu pertama penyemaian, meja semai disungkup plastik bening untuk mengurangi laju penguapan sehingga stek tidak cepat mengering.

Bibit stek yang telah berumur 7 minggu dipindah tanam ke dalam polibag berisi sekam bakar dan kompos (1:1). Bibit dipelihara sampai 4 minggu, dan dilakukan pengamatan jumlah daun yang tumbuh dan tinggi tanaman. Kemudian daun dipanen untuk deteksi PMWaV dengan TBIA. Data daya tumbuh stek dan persentase infeksi PMWaV dianalisis dengan Proc ANOVA program SAS versi 9.0. dan rata-ratanya diuji dengan *Duncan's Multiple Range Test* (DMRT) pada  $\alpha = 5\%$ .

### Verifikasi Infeksi PMWaV dengan Tissue Blot Immunoassay (TBIA)

PMWaV pada tanaman dideteksi secara serologi dengan TBIA berdasarkan metode Hu *et al.* (1997). Daun dipotong melintang pada bagian dasar daun dengan potongan yang rata. Potongan ini kemudian di-blot pada 0.45  $\mu\text{m}$  Nitro ME nitrocellulose membrane (Amersham Pharmacia Biotec, USA)



Gambar 1. Stek daun (A) dan stek batang (B) tanaman nanas

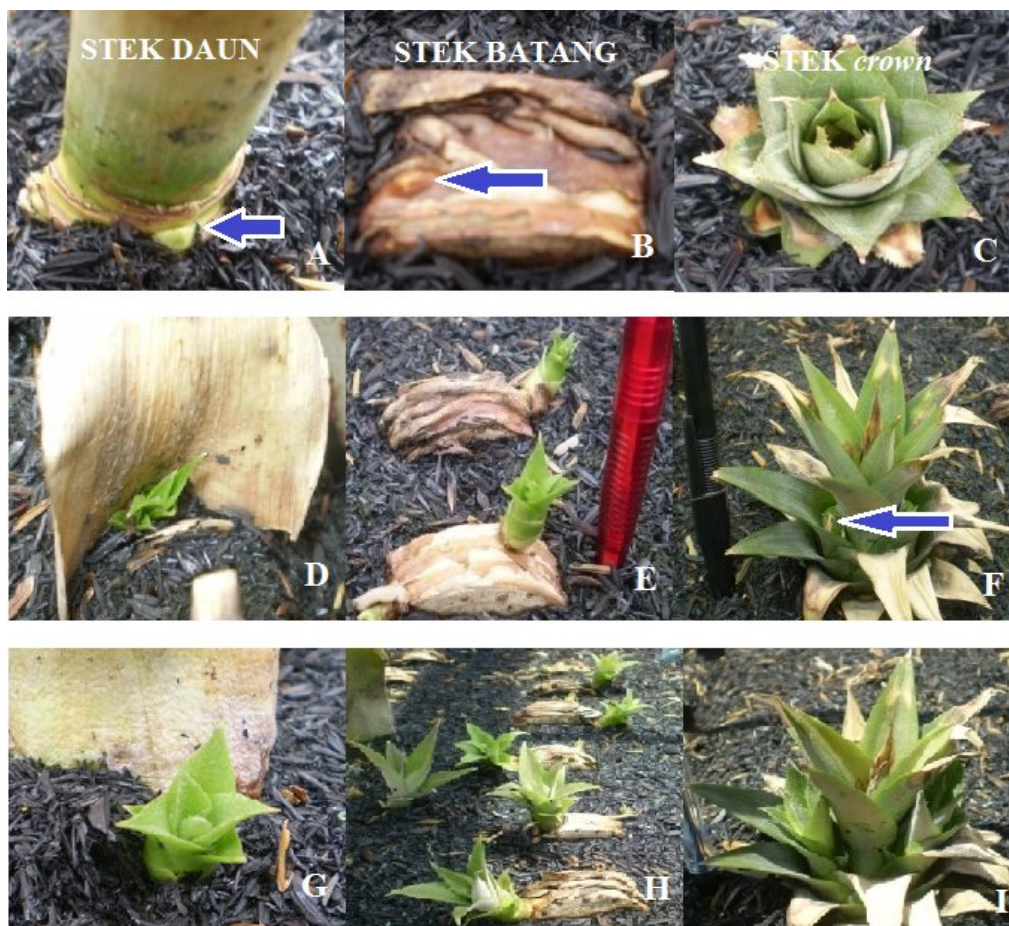
selama 60 detik. Pola jaringan pembuluh daun menempel dan meninggalkan jejak pada membran. Membran dapat disimpan kering di antara lipatan kertas saring pada suhu ruang sampai siap dianalisis.

Membran yang telah di-blot ditempatkan dalam wadah plastik dan di-blocking dengan 2 % (wt/vol) susu skim yang dilarutkan dalam larutan penyangga *phosphate buffer saline* (PBS) (8 g sodium chloride; 1.15 g sodium phosphate dibasic; 0.2 g potasium phosphate monobasic; 0.2 g potasium chloride; 1000 mL aquades; pH 7.4) digoyang 50 rpm dengan *rotary shaker* selama 30 menit pada suhu ruang. Kemudian membran diinkubasikan dalam wadah plastik atau kantung plastik segel dengan anti-bodi monoklonal PMWaV (Agdia Inc., USA) dengan pengenceran 1:10 dalam PBS digoyang 50 rpm dengan *rotary shaker* pada suhu ruang selama 1-2 jam, atau diinkubasi pada suhu 4 °C selama satu malam. Kemudian membran dicuci dengan PBST (PBS + 0.05 % Tween 20) digoyang 125 rpm selama 10 menit pada suhu ruang, pencucian diulang sebanyak 5 kali. Setelah pencucian, membran kemudian diinkubasikan dengan *conjugate alkaline phosphatase* (Sigma Chemical Co. St. Louise, USA) pada pengenceran 1:1000 dalam PBS selama 2-3 jam sambil digoyang 50 rpm pada suhu ruang. Membran kemudian dicuci seperti di atas, diwarnai dengan substrat *5-bromo-4-chloro-3-Indolyl Phosphate/Nitro Blue Tetrazolium* (BCIP/NBT) (Sigma Chemical Co., USA) menggunakan satu tablet BCIP/NBT yang dilarutkan dalam 10 mL larutan penyangga *Alkaline Phosphatase* (AP). Pewarnaan dilakukan pada suhu ruang sampai terjadi perubahan warna pada membran. Reaksi pewarnaan dihentikan dengan mencuci membran dengan air mengalir kemudian dikeringanginkan.

## HASIL DAN PEMBAHASAN

### Pengaruh Hot Water Treatment terhadap Daya Tumbuh Stek

Tunas stek daun dan stek batang mulai terlihat sejak 2 mss, namun belum terlihat tunas dari *crown* (Gambar 2 A,B,C). Daun mulai terbentuk pada 4 mss namun belum terbuka sempurna (Gambar 2 D,E,F). Daun dari tunas stek sudah terbuka sempurna pada 5 mss (Gambar 2 G, H, I). Berdasarkan pengamatan selama pesemaian, tidak ada perbedaan warna maupun bentuk tunas pada stek dari tanaman sakit maupun tanaman sehat, baik yang diberi perlakuan panas maupun tanpa perlakuan panas. Hal ini menunjukkan bahwa infeksi PMWaV tidak



Gambar 2. Stek daun (A), stek batang (B), dan stek *crown* (C) berumur 2 minggu setelah semai (mss); stek daun (D), stek batang (E), *crown* (F) berumur 4 mss; stek daun (G), stek batang (H), *crown* (I) berumur 5 mss.

menimbulkan gejala pada bibit/anakan di pesemai-an. Namun demikian, bibit atau anakan yang terlihat sehat tanpa gejala layu belum tentu bebas infeksi PMWaV.

Persentase daya tumbuh stek diperoleh dengan cara menghitung jumlah stek yang tumbuh pada 7 mss dibandingkan dengan jumlah total stek yang ditanam. Daya tumbuh stek pada 7 mss ditampilkan dalam Tabel 1. *Hot water treatment* 56°C selama 60 menit menyebabkan penurunan daya tumbuh stek daun dan batang, sedangkan *hot water treatment* 58°C 40 menit tidak mengurangi viabilitas stek. Dari penelitian ini diketahui bahwa *hot water treatment* dengan waktu aplikasi yang lebih panjang meng-hambat daya tumbuh stek, sedangkan *hot water treatment* dengan suhu lebih tinggi namun diaplikasikan dalam waktu yang singkat tidak mempengaruhi daya tumbuh dan vigor stek.

Bibit berumur 7 minggu dipindah tanam ke dalam media kompos dan sekam bakar di dalam polibag. Secara umum bibit stek menunjukkan pertumbuhan

dan vigor tanaman yang sangat baik setelah dipindah tanam ke dalam pot individu dengan media sekam bakar dan kompos. Pertumbuhan tajuk tanaman yang baik didukung oleh pertumbuhan perakaran yang baik. Ketersediaan nutrisi dari pupuk kompos dalam media tanam mendukung pertumbuhan akar dan tajuk bibit. Bibit berumur 2 mst dan 3 mst ditampilkan pada Gambar 3.



Gambar 3 Bibit nanas berumur 2 mst (A) dan 3 mst (B)

## ELIMINASI PINEAPPLE MEALYBUG WILT

Tabel 1 Rata-rata persentase daya tumbuh stek nanas berumur 7 minggu setelah semai (mss)

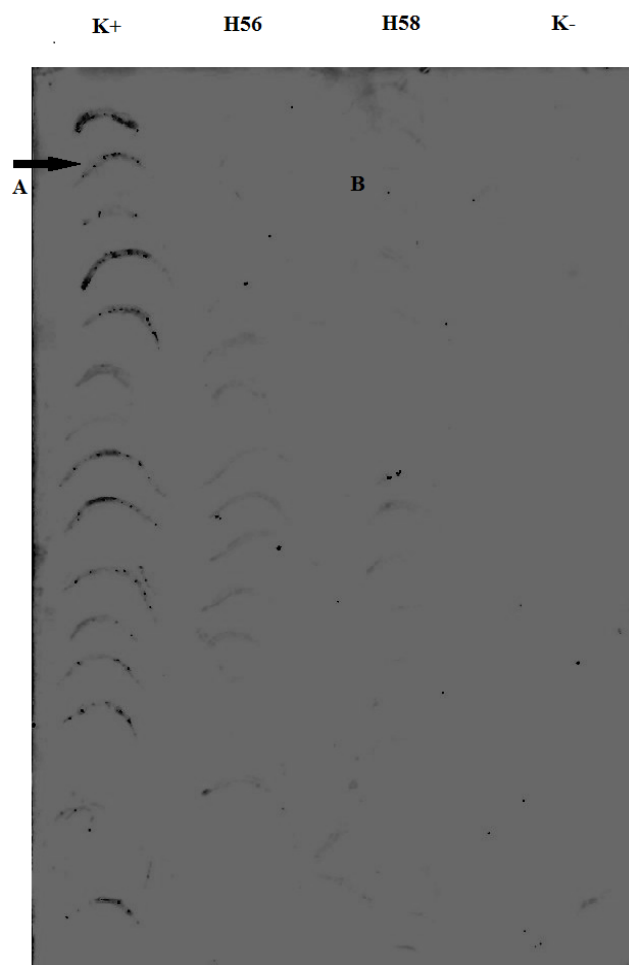
<i>Hot Water Treatment</i>	Jenis stek	Daya tumbuh stek (%) <sup>†</sup>
Suhu 56 °C selama 60 menit	Daun	50.20 c
	Batang	51.51 c
	Crown	100.00 a
Suhu 58 °C selama 40 menit	Daun	78.21 abc
	Batang	60.83 bc
	Crown	86.00 ab
Tanaman sakit tanpa perlakuan (kontrol positif)	Daun	86.03 ab
	Batang	81.10 ab
	Crown	100.00 a
Tanaman sehat tanpa perlakuan (kontrol negatif)	Daun	100.00 a
	Batang	100.00 a
	Crown	100.00 a

<sup>†</sup> Rata-rata sekolom yang diikuti huruf samaberarti beda tidak nyata pada uji DMRT ( $\alpha = 5\%$ )

### *Pengaruh Hot water treatment terhadap Infektifitas PMWaV*

Bibit dari stek tanaman sehat maupun tanaman sakit terlihat sehat dan tidak menunjukkan gejala penyakit layu sampai akhir pengamatan (4 minggu setelah tanam). Namun hasil deteksi PMWaV pada bibit dengan menggunakan anti-bodi monoklonal terhadap PMWaV-1 dan PMWaV-2 menunjukkan bahwa sebagian bibit positif terinfeksi PMWaV-1, PMWaV-2, maupun infeksi ganda PMWaV-1 dan PMWaV-2.

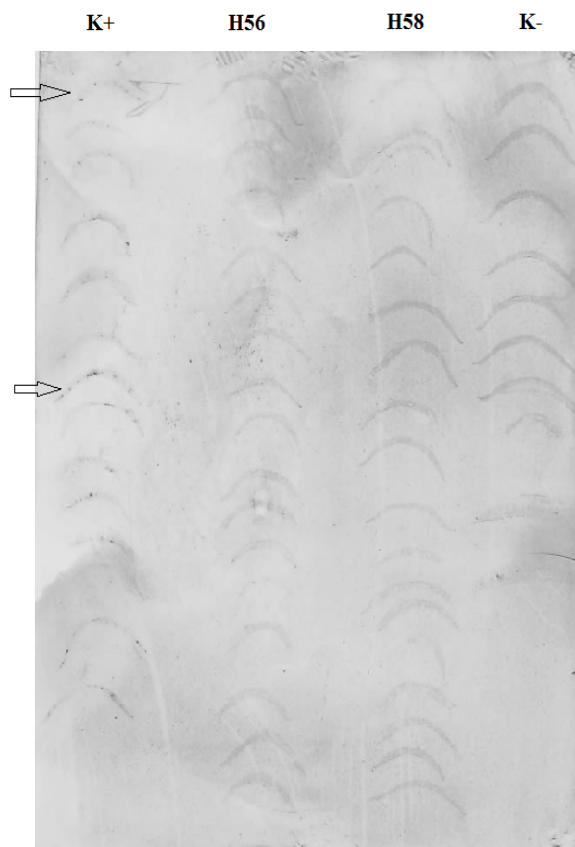
Antibodi monoklonal spesifik PMWaV-1 dan PMWaV-2 yang digunakan dalam pengujian TBIA menunjukkan reaksi kuat terhadap antigen PMWaV, dan tidak terdapat reaksi terhadap tanaman sehat pada blot membran. Reaksi BCIP/NBT terhadap konjugate-antigen PMWaV ditunjukkan dengan warna ungu (ditunjuk dengan tanda panah) yang terlihat jelas pada jaringan pembuluh daun tanaman yang terinfeksi PMWaV (Gambar 4 dan 5). Hasil pengujian ini menunjukkan bahwa distribusi PMWaV pada jaringan tanaman terbatas pada jaringan pembuluh. Hasil ini mendukung laporan sebelumnya oleh Hu *et al.* (1997), Sether *et al.* (1998), dan Tryono (2006) bahwa antigen PMWaV terdeteksi hanya berada pada jaringan pembuluh pada daun muda, daun berumur sedang, juga pada akar, tetapi tidak pada daun tua.



Gambar 4 Membran hasil deteksi PMWaV-1 dengan metode TBIA. Daun stek kontrol positif (K+), daun stek kontrol negatif (K-), daun stek tanaman sakit dengan *hot water treatment* 56 °C (H56), daun dari stek tanaman sakit dengan *hot water treatment* 58 °C (H58). Sinyal berwarna ungu (ditunjuk oleh tanda panah) pada jaringan pembuluh menunjukkan bahwa sampel daun positif terinfeksi PMWaV-1.

Sinyal berupa titik berwarna ungu menunjukkan bahwa sampel daun positif terinfeksi oleh PMWaV-1 (Gambar 4) atau PMWaV-2 (Gambar 5). Sinyal ungu terlihat pada sepanjang jaringan pembuluh daun nanas pada perlakuan kontrol positif (K+), dan beberapa titik pembuluh pada sampel daun nanas dari stek yang diberi perlakuan air panas 56 °C selama 40 menit, serta sampel daun nanas dari stek yang diberi perlakuan air panas 58 °C selama 60 menit (Gambar 4). Sinyal titik ungu terlihat lebih jelas jika dilakukan pengamatan dengan bantuan kaca pembesar.

Stek terinfeksi PMWaV dihitung berdasarkan jumlah stek terinfeksi dibagi jumlah stek yang diberi perlakuan. Persentase stek terinfeksi PMWaV-1, PMWaV-2 dan infeksi ganda kedua virus ditam-



Gambar 5. Membran hasil deteksi PMWaV-2 dengan metode TBIA. Daun stek kontrol positif (K+), daun stek kontrol negatif (K-), daun stek tanaman sakit dengan *hot water treatment* 56 °C (H56), daun dari stek tanaman sakit dengan *hot water treatment* 58 °C (H58). Sinyal berwarna ungu (ditunjuk oleh tanda panah) pada jaringan pembuluh menunjukkan bahwa sampel daun positif terinfeksi PMWaV-2.

pilkan pada Tabel 2. Berdasarkan persentase infeksi PMWaV-1 dan PMWaV-2 pada stek dari tanaman sakit diketahui bahwa *hot water treatment* 58 °C selama 40 menit pada tanaman sakit mampu menekan infeksi PMWaV-2. Sebaliknya, *hot water treatment* 56 °C selama 60 menit pada tanaman sakit berpengaruh tidak nyata terhadap infeksi PMWaV-1 maupun PMWaV-2.

Tabel 2 Persentase stek terinfeksi PMWaV setelah mendapat *hot water treatment*

<i>hot water treatment</i>	Persentase stek terinfeksi PMWaV <sup>†</sup>		
	PMWaV-1	PMWaV-2	PMWaV-1 & PMWaV-2
Suhu 56 °C selama 60 menit	32.00a	20.00ab	10.00ab
Suhu 58 °C selama 40 menit	21.00ab	0.00b	0.00b
Kontrol positif	44.33a	66.77a	18.33a
Kontrol negatif	0.00d	0.00b	0.00b

<sup>†</sup> Rata-rata sekolom yang diikuti huruf samaberarti beda tidak nyata pada uji DMRT ( $\alpha = 5\%$ )

Eliminasi patogen dari bahan tanaman dengan *hot water treatment* dapat dilakukan jika toleransi patogen terhadap panas lebih rendah dibandingkan toleransi bahan tanaman. Jika kedua syarat tersebut dapat terpenuhi, maka akan diperoleh interval suhu perlakuan panas yang dapat mengeliminasi patogen tanpa mengurangi viabilitas bahan tanaman. Interval suhu yang dapat mengeliminasi patogen tanpa mengurangi viabilitas bahan tanaman tersebut disebut "*treatment window*" (Forsberg, 2001). Dalam penelitian ini, perlakuan air panas 58 °C selama 40 menit memenuhi persyaratan dalam "*treatment window*" karena perlakuan tersebut mampu menekan infeksi PMWaV-2 pada stek tanpa mengurangi viabilitas stek tersebut.

Perlakuan panas berpengaruh terhadap transportasi virus di dalam tanaman, baik transportasi antar sel (*cell-to-cell movement*) maupun transportasi jarak jauh antar jaringan (Hadidi *et al.*, 1998). Transportasi virus di dalam tanaman dimediasi oleh protein yang dikode oleh virus tersebut yang disebut *movement protein* atau *transport protein*. Perlakuan air panas dapat menyebabkan gangguan fungsi *movement protein* virus sehingga menghambat transportasi virus di dalam jaringan tanaman. Selain itu, perlakuan panas di atas 37 °C diketahui menghambat multiplikasi banyak jenis virus (Hadidi *et al.*, 1998), bahkan suhu 32 °C dapat menghambat multiplikasi *Plum pox virus* (Glasa *et al.*, 2003). Gangguan dalam multiplikasi dan translokasi virus diduga menyebabkan terhambatnya infeksi dan penyebaran PMWaV pada stek yang telah diberi perlakuan air panas 58 °C selama 40 menit.

## KESIMPULAN DAN SARAN

*Hot water treatment* 56°C selama 60 menit menyebabkan penurunan daya tumbuh stek daun dan batang, namun tidak mampu menekan infeksi PMWaV-1 maupun PMWaV-2. Sedangkan *hot water treatment* 58 °C selama 40 menit mampu menekan infeksi PMWaV-2 dengan tidak mengurangi viabilitas

## ELIMINASI PINEAPPLE MEALYBUG WILT

stek. Gangguan dalam multiplikasi dan translokasi virus diduga menyebabkan terhambatnya infeksi dan distri-busi PMWaV pada stek yang telah diberi *hot water treatment* 58 °C selama 40 menit.

### SANWACANA

Penulis mengucapkan terimakasih atas kerjasama penelitian dengan Pusat Kajian Buah Tropika (PKBT) LPPM IPB, atas izin penggunaan Laboratorium PKBT dan Rumah Kasa Kebun Percobaan Tajur II serta dukungan dana penelitian.

### DAFTAR PUSTAKA

- Bartholomew, D.P., R.E. Paul, and K.G. Rohrbach. 2003. Pineapple: Botany, Production, and Uses. CAB international.
- Beardsley, J.W. 1996. The pineapple mealybug complex: taxonomy, distribution and host relationship. *Acta Hort.* 334: 383-386.
- Borroto F.E.G, A.J.A. Torres, and M. Laimer. 2007. RT-PCR detection and protein-protein interaction of viral component of *pineapple mealybug wilt-associated virus-2* in Cuba. *Plant Pathology.* 89: 435-439.
- [CABI] Centre in Agricultural and Biological Institute. 2005. Plant protection compendium. CAB International. Wallingford, United Kingdom.
- Deptan. 2008. Profil Nenas di Kabupaten Subang. <http://www.deptan.go.id> [23 Maret 2007].
- Forsberg, G. 2001. Heat sanitation of cereal seeds with a new, efficient, cheap and environmentally friendly method. In: A.J. Biddle (ed). Seed Treatment, Challenges and Opportunities. Proceedings from Symposium No. 76 of the British Crop Protection Council BCPC, Farnham. pp. 69-72.
- Glasa, M., G. Labonne, and J.B. Quiot. 2003. Effect of temperature on plum pox virus infection [abstract]. *Acta Virol* 47(1): 49-52. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi> [13 April 2007].
- Hadidi, A., R.K. Khetarpal, and H. Koganezawa. 1998. *Plant Virus Diseases Control.* USA-APS.
- Hutahayan, A.J. 2006. Peranan strain dan Pineapple Mealybug Wilt-associated Virus dan kutu putih (*Dysmicoccus* spp.) dalam menginduksi gejala layu pada tanaman nanas. Thesis. Sekolah Pascasarjana IPB. Bogor.
- Hu, J.S., D.M. Sether, X.P. Liu, and M. Wang. 1997. Use of tissue blotting immunoassay to examine the distribution of pineapple closterovirus in Hawaii. *Phytopathology* 88: 1150-1154
- [PKBT] Pusat Kajian Buah Tropika. 2008. Perbanyakan Massal Bibit Nenas dengan Stek Daun. Pusat Kajian Buah Tropika, LPPM. Institut Pertanian Bogor.
- Rohrbach, K.G., J.W. Beardsley, T.L. German, N.J. Reimer, and W.G. Sanford. 1988. Mealybug wilt, mealybug, and ants of pineapple. *Plant Disease* 72: 558-565.
- Sether, D.M, A.V. Karasev, C. Okumura, C. Arakawa, F. Zee, M.M. Kislán, J.L. Busto, and J.S. Hu. 2001. Differentiation, distribution, and elimination of two different pineapple mealybug wilt-associated viruses found in pineapple. *Plant Disease* 85: 856-864.
- Sether, D.M. and J.S. Hu. 2002a. Closterovirus Infection and Mealybug Exposure are Necessary for the Development of Mealybug Wilt of Pineapple Disease. *Phytopathology* 92: 928-935.
- Sether, D.M. and J.S. Hu. 2002b. Yield impact and spread of pineapple mealybug wilt-associated virus-2 and mealybug wilt of pineapple in Hawaii. *Plant Diseases* 86: 867-874.
- Sether, D.M., D.E. Ullman, and J.S. Hu. 1998. Transmission of pineapple mealybug wilt-associated virus by two species of mealybug (*Dysmicoccus* Spp.). *Phytopathology* 88: 1224-1230.
- Tryono, R. 2006. Deteksi dan identifikasi Pineapple Mealybug Wilt-associated Virus penyebab penyakit layu pada tanaman nanas di Indonesia. Tesis. Sekolah Pascasarjana IPB. Bogor.