

VIRUS PENYEBAB PENYAKIT SUSU (*MILKY DISEASE*) PADA ULAT API PEMAKAN DAUN KELAPA SAWIT *Setothosea asigna* van Eecke (LEPIDOPTERA : LIMACODIDAE) DI INDONESIA

S. Prawirosukarto, J.C. Veyrunes¹, M. Bergoin² dan A. Djamin

ABSTRAK

Penyakit susu (milky disease) pada ulat api pemakan daun kelapa sawit (UPDKS) (*Lepidoptera* : *Limacodidae*) di Indonesia telah dilaporkan sejak 1950 tetapi belum diketahui dengan pasti penyebabnya. Pada 1982, disebutkan bahwa penyebab penyakit tersebut adalah suatu asosiasi antara Reovirus Cytoplasmic Polyhedrosis dan virus Nudaurellia- β grup. Walaupun demikian, dari hasil pengamatan yang lebih baru terhadap *S. asigna* yang mati dengan gejala milky disease telah ditemukan adanya suatu asosiasi antara Multiple Nucleopolyhedrovirus (MNPV) dan virus Nudaurellia- β grup. Gejala luar pada *S. asigna* yang sakit akibat kedua tipe asosiasi virus tersebut mirip, dan sulit sekali dibedakan. Walaupun belum dilakukan analisis terhadap sifat-sifat dari MNPV tersebut, tetapi hal ini merupakan suatu yang baru dan belum pernah dilaporkan sebelumnya. Diharapkan MNPV ini dapat dikembangkan sebagai sarana pengendalian hayati terhadap UPDKS *S. asigna* pada perkebunan kelapa sawit di Indonesia, paling tidak sebagai pelengkap virus Nudaurellia- β grup yang telah digunakan lebih dahulu.

Kata kunci : *Lepidoptera*, *Limacodidae*, *Setothosea asigna* baculovirus, virus Nudaurellia- β grup

PENDAHULUAN

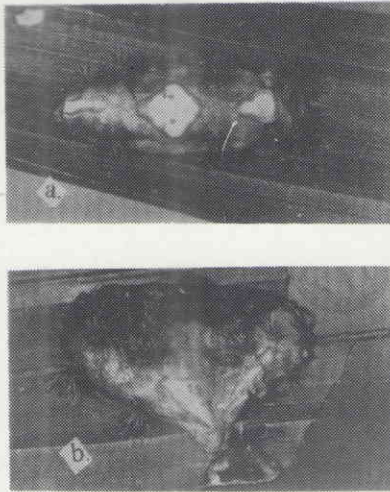
Sejak 1950 telah dilaporkan adanya penyakit susu (*milky disease*) pada ulat api pemakan daun kelapa sawit (UPDKS) (*Lepidoptera* : *Limacodidae*) di Indonesia, tetapi belum diketahui penyebabnya (5). Pada *Setothosea asigna* van Eecke, gejala penyakit susu biasanya dijumpai pada akhir stadia ulat, yakni pada instar 7-9 (Gambar 1). Pada 1982, dilaporkan bahwa penyakit susu di Sumatera Utara, Indonesia, disebabkan

oleh suatu asosiasi antara Reovirus Cytoplasmic Polyhedrosis (Gambar 2.) (3, 6, 8).

Pemurnian dan pengamatan yang dilakukan pada awal 1996 di INRA- CNRS Comparative Pathology Laboratory, St. Christol Research Station, Perancis, terhadap larva *S. asigna* yang mati dengan gejala penyakit susu, ternyata didapatkan hasil yang berbeda. Pada contoh ulat tersebut dijumpai adanya campuran antara Multiple nucleopolyhedrovirus (MNPV) dalam jumlah banyak dan sedikit virion dari virus Nudaurellia- β grup. Dalam tulisan ini akan disampaikan hasil pengamatan tersebut, untuk melengkapi informasi tentang penyebab penyakit susu pada *S. asigna*.

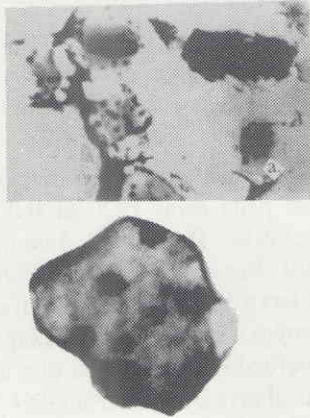
1) Peneliti INRA-CNRS Comparative Pathology Laboratory, St. Christol Research Station, France.

2) Peneliti INRA-CNRS Comparative Pathology Laboratory, University of Montpellier II, Science and Technics of the Languedoc, Pl. E. Bataillon



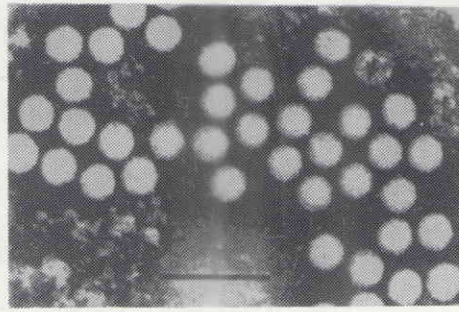
Gambar 1. Larva *S. asigna* yang mati dengan gejala penyakit susu : a. Ulat mati tetapi kulit belum pecah, b. Kulit ulat mati mulai pecah dan keluar cairan berwarna keputihan. Sumber : Desmier de Chenon, 1988

Figure 1. Dead *S. asigna* larva showing milky disease symptoms : a. Dead larva with intact cuticle, b. Rupture cuticle with oozing whitish hemolymph. Source : Desmier de Chenon, 1988



Gambar 2. Reovirus Cytoplasmicpolyhedrosis dengan TEM : a. Polyhedra utuh (perb. 23.000 X), b. Irisan tipis polyhedra (perb. 92.000 X). Sumber : Desmier de Chenon, 1988

Figure 2. Cytoplasmic Polyhedrosis Reovirus, using TEM : a. Intact polyhedra (23.000 X), b. Thin section polyhedra (92.000 X). Source : Desmier de Chenon, 1988



Gambar 3. Partikel virus *Nudaurelia-β* grup dari *S. asigna* dengan TEM (bar = 100 nm).

Figure 3. The virions of *Nudaurelia-β* group virus from *S. asigna* using TEM (bar = 100 nm).

BAHAN DAN METODE

UPDKS *S. asigna* instar 7-9 yang mati dengan gejala penyakit susu dikumpulkan dari Blok 105, Afdeling V, Kebun Mayang, PT. Perkebunan Nusantara IV, pada tanaman kelapa sawit tahun tanam 1991. Selanjutnya ulat tersebut dimasukkan ke dalam botol plastik yang berisi larutan buffer Tris-HCl 0,05 M pH 7,2 ditutup rapat, kemudian disimpan di dalam kotak pembeku pada suhu 20°C, sebelum dikirim ke Perancis.

Contoh ulat digiling halus dalam larutan buffer Tris-HCl 0,05 M pH 7,2 dengan perbandingan 1 g ulat untuk 10 ml buffer. Gilingan ulat tersebut kemudian disaring dengan menggunakan kain kelambu atau kain perban dan langsung diamati di bawah mikroskop optik. selanjutnya diamati juga dengan menggunakan *Transmission electron microscope* (TEM), setelah pengecatan negatif dengan asam phosphotungstik 1%.

Purifikasi polihedra dilakukan dengan sentrifugasi larutan ulat tersebut selama 3 menit pada kecepatan 3400 rpm. Endapan yang terbentuk kemudian dilarutkan kembali dengan air destilasi secukupnya dan disentrifugasi lagi. Hal ini dilakukan sebanyak 4

kali. endapan yang terakhir, dilarutkan dengan 4 ml air destilasi dan dimasukkan ke dalam tabung sentrifugasi yang berisi suatu gradian densitas Renografin 20-76%. Selanjutnya disentrifugasi selama 1 jam dengan putaran 20.000 rpm (dengan rotor SW 28.1 Beckman). Lapisan-lapisan yang terbentuk dalam tabung sentrifugasi diambil dan dikumpulkan secara terpisah, kemudian diamati dengan mikroskop optik untuk mengetahui lapisan yang mengandung polihedra. Selanjutnya untuk menghilangkan bekas Renografin, larutan polihedra diencerkan dengan buffer Tris-HCl 0,05 M pH 7,2 dan disentrifugasi selama 5 menit dengan putaran 3000 rpm. Endapan yang terbentuk diencerkan lagi dan disentrifugasi. Demikian seterusnya dilakukan berulang 3-4 kali. Endapan terakhir dilarutkan dengan sedikit buffer Tris-HCl tersebut.

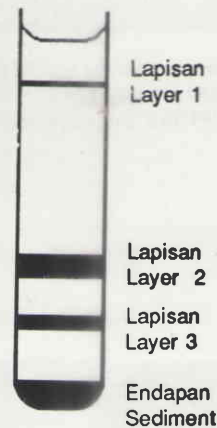
Pengamatan bentuk polihedra dilakukan dengan menggunakan *scanning electron microscope* (SEM). Selanjutnya untuk mengamati virion yang berada di dalam polihedra tersebut, dilakukan pelarutan polihedra dengan menggunakan buffer T (sodium thioglycolate 0,3 M-NaOH, pH 11,3) selama 8 menit. Kemudian virion yang ada setelah dicat negatif dengan asam fosphotungstik 1 % diamati dengan TEM.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Pengamatan dengan mikroskop optik pada pembesaran 80 kali terhadap ulat, menunjukkan banyak sekali polihedra, dan bercampur dengan kristal asam urik. Sedangkan pengamatan dengan TEM pada pembesaran 10.000 kali menunjukkan adanya beberapa virion MPNV dan virus *Nudaurelia-β* grup.

Setelah sentrifugasi larutan ulat pada gradian densitas Renografin 20-76 %, tam-

pak adanya 3 lapisan berwarna keputihan dan endapan pada tabung sentrifugasi (Gambar 4.). Hasil pengamatan dengan mikroskop optik diketahui bahwa lapisan 1 mengandung serat-serat kecil, lapisan 2 berisi polihedra dan lapisan 3 berisi butiran-butiran dengan diameter 1-2 m, diduga spora dari bakteri sedangkan pada endapan banyak dijumpai kristal asam urik.

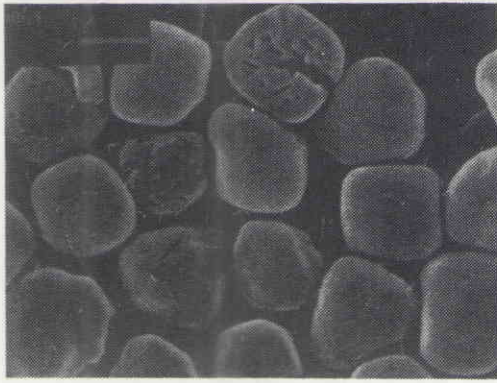


Gambar 4. Gradian dengan densitas Renografin 20-76% setelah sentrifugasi, beberapa lapisan berwarna keputihan.

Figure 4. Renografin 20-76% density gradient after centrifuged, showing several whitish layers.

Pengamatan polihedra dengan SEM (Gambar 5. menunjukkan adanya banyak polihedra dengan ukuran bervariasi antara 1,5 - 2,4 m.

Pengamatan virion dengan TEM, setelah pelarutan polihedra dengan buffer T (Gambar 6.), menunjukkan bahwa di dalam polihedra dijumpai bungkus-bungkus (envelop) yang mengandung beberapa virion yang berbentuk batang berukuran panjang sekitar 300 nm dan diameter sekitar 66 nm. Hal ini merupakan karakteristik dari MPNV.



Gambar 5. Hasil pengamatan MNPV pada UPDKS *S. asigna* dengan SEM.

Figure 5. MNPV in *S. asigna*, as observed by SEM.



Gambar 6. Hasil pengamatan virion MNPV pada *S. asigna* dengan TEM (perb. 15.000 X).

Figure 6. MNPV virions in *S. asigna* observed by TEM (15.000 X).

Pengamatan terakhir terhadap UPDKS *S. asigna* yang mati dengan gejala penyakit susu, di INRA-CNRS Comparative Pathology Laboratory Perancis, menunjukkan hasil yang berbeda dengan hasil pengamatan yang telah dilaporkan terdahulu. Kami menyimpulkan bahwa penyakit susu pada UPDKS *S. asigna* disebabkan oleh suatu asosiasi antara MNPV dan virus *Nudaurelia-β* grup. Dilaporkan sebelumnya bahwa penyebabnya adalah suatu asosiasi antara *Reovirus Cytoplasmic Polyhedrosis* dan virus *Nudaurelia-β* grup.

Menurut Entwistle dan Murphy *et al.* (4,7) gejala penyakit susu (ulat yang sakit atau mati mengandung dan mengeluarkan cairan berwarna keputihan seperti susu), adalah merupakan gejala khas infeksi polihe-drosis virus, baik nuclear maupun cytoplasmic. Keduanya juga menginfeksi ulat inangnya dengan cara yang hampir sama, yakni masuk ke dalam usus ulat bersama dengan makanan, kemudian pH yang tinggi dalam usus ulat akan menyebabkan polihe-dra terurai dan virion yang bebas akan menginfeksi sel-sel pada jaringan epithelium dari usus tengah. Virus berkembang dalam inti (*nuclear polyhedrosis*) atau dalam plasma sel (*cytoplasmic polyhedrosis*). Akhirnya akan menghasilkan berjuta-juta poli-hedra dengan beberapa virion di dalam tiap-tiap polihedra. Polihedra tersebut akan memenuhi sel, rongga usus, dan akhirnya keluar dari anus atau tubuh ulat mati, berupa larutan berwarna keputihan seperti susu.

Menurut Sipayung *et al.* gejala yang ditimbulkan oleh infeksi tunggal virus *Nudaurelia-β* grup pada *S. asigna* adalah ulat berhenti makan, keluar cairan kecoklatan dari anusnya, warna ulat menjadi kecoklatan dimulai dari bagian perut, kemudian ulat mati dan mengeluarkan cairan berwarna kecoklatan (8).

Selain itu diketahui bahwa jumlah polihedra yang ditemukan jauh lebih banyak dibandingkan partikel virus *Nudaurelia-β* grup. Berdasarkan hal tersebut, dapat dikatakan bahwa penyebab utama penyakit susu pada *S. asigna* kemungkinan *Reovirus Cytoplasmic polyhedrosis* atau MNPV. Gejala luar yang timbul pada ulat yang sakit akibat infeksi masing-masing virus tersebut adalah sangat mirip dan sulit dibedakan antara satu dengan lainnya.

Walaupun telah disebutkan adanya infeksi NPV pada 11 spesies dari Limacodidae (1) tetapi adanya infeksi alami MNPV pada *S. asigna* belum pernah dilaporkan sebelumnya. Hal ini merupakan sesuatu yang menarik untuk diteliti lebih lanjut, khususnya tentang sifat-sifat dari MNPV tersebut, serta pola asosiasinya dengan virus *Nudaurelia-β* grup. Perlu juga diketahui apakah MNPV tersebut merupakan jenis baru atau sama dengan jenis yang menimbulkan penyakit pada inang lain. Sampai dengan sekarang diketahui bahwa virus dari famili Baculoviridae merupakan virus yang khusus menyebabkan penyakit pada Arthropoda, aman terhadap manusia dan binatang lainnya dan mudah dikembangkan (1). Dengan demikian, besar kemungkinannya untuk dapat dikembangkan menjadi suatu sarana pengendali hayati yang baik terhadap UPDKS *S. asigna*. Setidaknya, dapat menjadi pelengkap dari virus *Nudaurelia-β* grup yang telah digunakan lebih dahulu. MNPV memberikan hasil pengendalian yang baik mengingat MNPV pada *S. asigna* hanya menimbulkan kematian pada akhir stadia ulat (instar 7-9).

KESIMPULAN

Selain asosiasi antara *Reovirus Cytoplasmic Polyhedrosis* dan virus *Nudaurelia-*

β grup, telah ditemukan juga campuran antara MNPV dan virus *Nudaurelia-β* grup sebagai penyebab penyakit susu UPDKS *S. asigna* pada perkebunan kelapa sawit di Indonesia.

Penelitian terhadap MNPV tersebut perlu dilanjutkan, terutama analisis tentang sifat-sifatnya untuk dapat menyusun suatu metode pemanfaatannya sebagai sarana pengendalian hayati UPDKS *S. asigna*, di samping virus *Nudaurelia-β* grup yang telah digunakan lebih dahulu.

DAFTAR PUSTAKA REFERENCES

1. ADAMS, J.R. and J.T. McCLINTOCK. 1991. Baculoviridae, nuclear polyhedrosis viruses of insect. In Atlas of invertebrate viruses (J.R. Adams and J.R. Bonani Eds.). CRC Press, Inc., Boca Raton Ann Arbor Boston London, p : 87 - 204.
2. DESMIER de CHENON, R. 1988. Technical assistance activities in crop protection at the Marihat Oil Palm Research Center (September 1987 - September 1988). Marihat Research Center, P. Siantar Sumatera Utara. 61 p.
3. DESMIER de CHENON, R.D. MARIAU, P. MONSARRAT, G. FEDIERE and A. SIPAYUNG. 1988. Research into entomopathogenic agents of viral origin in leaf-eating Lepidoptera of the oil palm and coconut. Oleagineux, Vol. 43 (3) : 107 - 117.
4. ENTWISTLE, P.F. 1987. Virus diseases of Limacodidae. In Slug and nettle caterpillars, The biology, taxonomy, and control of the Limacodiade of economic importance on palms in South-east Asia (M.J.W. Cock, H.C.J. Godfray, J.D. Holloway Eds.). C.A.B. International, 1987. p: 213-221.
5. KALSHOVEN, L.G.E. 1981. The Pests of Crops In Indonesia. Revised by van der Laan. Ichtiar Baru-Van Hope, Jakarta. 701 p.
6. MARIAU, D. and R. DESMIER de CHENON. 1990. Importance of the role of entomopathogenic viruses in oil palm leaf-eating Lepidoptera species. Prospects for developing biological control methods. Oleagineux, 45 (11) : 487 -491.

7. MURPHY, F.A., C.M. FAUQUET, D.H.L. BISHOP, S.A. GHABRIAL, A.W. JARVIS, G.P. MARTELLI, M.A. MAYO and M.D. SUMMERS. 1995. Virus Taxonomy, Sixth report of the ICTP. Springer-Verlag Wien, New York. 586 p.
8. SIPAYUNG A., R. DESMIER de CHENON and SUDHARTO PS. 1989. Recent work with viruses in the biological control of leaf-eating caterpillars in North Sumatra Indonesia. Proc. PORIM Int. Palm Oil Dev. Conf. 5-9 September 1989. p: 285-293.

The causative of milky disease of oil palm leaf-eating caterpillar, *Setothosea asigna* van Eecke (Lepidoptera : Limacodidae) in Indonesia

S. Prawirosukarto, J.C. Veyrunes¹, M. Bergoin² and A. Djamin

Abstract

The viral milky disease of the limacodid oil palm leaf-eating caterpillar in Indonesia has been reported since 1950, but the real causative agent has not been known. It was reported in 1982 that the causative agent was an association between Cytoplasmic Polyhedrosis Reovirus and Nudaurelia- β group virus. Nevertheless, recent observation on dead *S. asigna* larvae with milky disease symptoms confirmed the presence of an association between Multiple Nucleopolyhedrosis virus (MNPV) and Nudaurelia- β group virus. The external symptoms of the infected *S. asigna* by these mixed viruses are quite similar, so that they are very difficult to differentiate. Although further analysis of the MNPV has not been done, this finding is new and has not been reported before. It is hoped that the MNPV can be developed to be one of the biocontrol agents against *S. asigna* in oil palm plantations in Indonesia, minimally as a supplement to Nudaurelia- β group virus which has been utilized before.

Key words : Lepidoptera, Limacodidae, *Setothosea asigna*, baculovirus, Nudaurelia- β group virus

Introduction

The presence of the viral milky disease of oil palm leaf-eating caterpillar (OPLEC) in Indonesia has been reported since 1950, but the causative agent has not been known (5). In *S. asigna*, the symptoms of milky disease appear in older larvae, i.e. in instar 7-9 (Fig. 1). It was reported in 1982, that the disease in North Sumatra was caused by the

association between Cytoplasmic Polyhedrosis Reovirus and Nudaurelia- β group virus (3, 6, 8).

Purification and observation on dead *S. asigna* larvae showing milky disease symptoms conducted at INRA-CNRS Comparative Pathology, St. Christol Research Station, France, produced different result. The sample contained a mixture of Multiple Nucleopolyhedrovirus (MNPV) in large quantity and some virions of Nudaurelia- β group virus.

This paper reports the result of that study to add further information on the causative agent of milky disease of *S. asigna*.

1) INRA-CNRS Comparative Pathology Laboratory, St. Christol Research Station, France.

2) INRA-CNRS Comparative Pathology Laboratory, University of Montpellier II, Science and Technics of the Languedoc, Pl. E. Bataillon

Materials and methods

Dead *S. asigna* larvae, instar 7-9, showing milky disease symptoms were collected from Block 15, Division 5, Mayang plantation, PTPN IV, planting year 1991. The sample was put in plastic vials containing Tris-HCl 0.05 M, pH 7.2 buffer solution, tightly covered, and kept at 20 °C freezer, before shipment to France.

At the comparative Pathology Laboratory, the sample was grounded in Tris-HCl 0.05 M, pH 7.2 buffer solution (1 g larvae in 10 ml buffer). After filtering with sterilized bandage cloth, it was negatively stained with 1% phosphotungstic acid and observed under optical microscope and Transmission Electron Microscope (TEM). To purify the polyhedra, the sample was centrifuged for 3 min at 3400 rpm. The process was repeated for four times, each time the sediment was washed with sufficient amount of distilled water. The sediment after the last centrifugation, was dissolved in 4 ml distilled water and put into centrifuge tube containing a Renografin 20 - 76% stain density gradient. It was then centrifuged for 1 hour at 20,000 rpm (with SW 28.1 Beckman rotor). The layers formed in the centrifuge tube were separately collected, then observed under optical microscope to find the layer that contained the polyhedra. To remove the Renografin stain, polyhedra solution was diluted with Tris-HCl 0.05 M, 7.2 pH and centrifuged for 5 min at 3000 rpm. The process was repeated for 3-4 times. The last sediment was diluted with a small quantity of the Tris-HCl buffer.

The polyhedras were observed using scanning electron microscope (SEM). The virions inside the polyhedra were observed by solving the polyhedra with T buffer (sodium thioglycolate 0.3 M-NaOH, pH 11.3) for 4 min. Then the virions were observed by

TEM, after being negatively stained with 1% phosphotungstic acid.

Results and discussions

Large quantity of polyhedra, mixed with uric acid crystals were observed in the larval solution using optical microscope with 80 X magnification. Observation with TEM with 10,000 X magnification revealed the presence of some MPNV virions and *Nudaurelia-β* group virus.

After the larval solution was centrifuged with 20-76% Renografin density gradient stain, three whitish layers and sediment were formed in the centrifuge tube (Fig. 4). Observation by optical microscope showed that layer 1 contained fine fibers, layer 2 contained polyhedra, layer 3 contained 1-2 m diameter particles, and the sediment contained uric acid crystals.

Observing the polyhedras with SEM (Fig. 5) revealed the presence of many polyhedras measuring 1.5 - 2.5 m. Observing the virions with TEM after the polyhedras were mixed with the T buffer (Fig. 6) revealed that there was envelope in the polyhedra containing several rod-shaped virions, measuring 300 m with 66 m diameter. It is the characteristic of MNPV.

The final observation on dead *S. asigna* showing milky disease at the INRA-CNRS Comparative Pathology Laboratory produced different result from what was reported earlier. We conclude that the milky disease on *S. asigna* is caused by an association between MNPV and *Nudaurelia-β* group virus.

According to Entwistle and Murphy *et al.* (4, 7) the symptoms of milky disease (the infected or dead larva contained and produced whitish milky hemolymph) is the typical symptom of polyhedrosis virus infection,

either NVP or CPV. Both viruses infect their host in almost similar manner, e.i. they enter the gut together with food. The high pH in the gut breaks the polyhedra and the released virions will infect the midgut epithelial cells. The virus develops in the nucleus (nuclear polyhedrosis) or in the cytoplasm (cytoplasmic polyhedrosis). Eventually million polyhedras will develop wherein each polyhedra contains several virions. The polyhedras will fill the cells, the gut cavity and finally will leave through the anus or through the dead body of the larva as a whitish milky solution.

According to Sipayung *et al.* the symptoms of single *Nudaurelia-β* group virus infection on *S. asigna* : the caterpillar stops feeding, brownish liquid oozes from the anus, the body turns brownish starting from the abdomen. Then the larva dies and discharges brownish liquid. Besides, more polyhedras than the virus particles of *Nudaurelia-β* group were found (8).

Based on these findings, it can be concluded that the primary causative agent of the milky disease in *S. asigna* is probably Cytoplasmic Polyhedrosis Reovirus or Multiple NPV. The external symptoms exhibited by the infected larvae by these viruses were almost similar and they were difficult to differentiate. Although it has been reported that there are 11 limacodid species infected by NPV (1), but natural infection by MNPV on *S. asigna* has never been reported before.

This finding warrants further studies, particularly on the characteristics of MNPV and its pattern of association with *Nuadurelia-β* group virus. It is also important to know whether MNPV is a new causative agent or it is similar to others that infect other hosts. Hitherto, it is known the baculovirus is very specific infecting Arthropoda only, safe to human and other Vertebrata, non-polluting, and easy to culture (1). Thus, it is very probable to develop MNPV as a good biocontrol agent for *S. asigna*. Minimally it can be used as a supplement to *Nuadurelia-β* group virus which previously has been used. MNPV produces good results, considering the fact that MNPV infects only *S. asigna* at later instar (instar 7-9).

Conclusions

Based on the above mentioned finding, it can be concluded that beside the association between Cytoplasmic Polyhedrosis Reovirus and *Nuadurelia-β* group virus another association between MNPV and *Nuadurelia-β* group virus has been discovered as the causative agent of milky disease of *S. asigna* in oil palm plantations in Indonesia. MNPV should be further investigated, particularly its characteristics, so that it can be utilized as a supplement to the use of *Nuadurelia-β* group virus in *S. asigna* control.

ooOoo