

II. TINJAUAN PUSTAKA

A. Biologi Bekicot (*A. fulica*)

Bekicot mengeluarkan zat seperti lendir untuk memudahkan mereka bergerak secara lebih halus dan aman dari berbagai bentuk permukaan (terutama permukaan kasar dan tajam) (Hoffman dkk., 2014). Bekicot adalah hewan nokturnal serta memiliki 2 pasang tentakel pada kepalanya (sepasang tentakel atas yang memiliki mata dan sepasang tentakel bawah yang memiliki organ penciuman) (Nurhadi dan Ferbi, 2018). Bekicot adalah hewan herbivora (utamanya *folivore* dan *frugivore*) yang memakan hampir semua bagian tanaman, yaitu daun, kulit kayu, biji, batang, kacang bunga, hingga lumut ganggang dan jamur jamur (Hoffman dkk., 2014). Klasifikasi bekicot (*Achatina fulica*) sebagai berikut (Animal Diversity Web, 2014 dan Integrated Taxonomic Information System, 2017):

Kingdom	: Animalia
Subkingdom	: Bilateria
Infrakingdom	: Protostomia
Superphylum	: Lophozoa
Phylum	: Mollusca
Class	: Gastropoda (oleh Cuvier tahun 1797)
Order	: Stylommatophora
Suborder	: Sigmurethra
Infraorder	: Holopodopes
Family	: Achatinidae
Genus	: <i>Achatina</i>
Species	: <i>Achatina fulica</i> (Ferussac, 1821)

Hewan ini dalam bahasa Inggris disebut *Giant snail* sedangkan di daerah Jawa Barat disebut keong racun dan di beberapa daerah lain disebut tutut/siput (tergantung daerahnya) (Pitojo, 2006). *Giant African land snail* awalnya memiliki

habitat alami di Afrika dengan iklim tropis bersuhu hangat (20-30 °C) dan kelembaban tinggi (bisa mencapai 90 %) sepanjang tahun. Hewan ini sudah beradaptasi sehingga mampu hidup di daerah beriklim sedang. Spesies ini menyukai daerah rendah hingga menengah dengan suhu 9-29 °C. *A. fulica* mampu bertahan hidup dalam kondisi suhu kurang ideal (misalnya 2 °C) dengan cara hibernasi dan suhu hingga 30 °C dengan aestivasi. *A. fulica* dapat ditemukan di daerah pertanian, pesisir, lahan basah, hutan, perkotaan, zona riparian, dan sebagainya (spesies ini cenderung mudah menginvasi suatu daerah) (Hoffman dkk., 2014).

Giant African land snail mudah dibedakan dengan bekicot lain karena ukurannya yang cenderung besar. Morfologi bekicot (*A. fulica*) adalah tubuh tertutup cangkang sebagai eksoskeleton (Nurhadi dan Ferbi, 2018). Bekicot dewasa dapat mencapai tinggi hingga 8 inchi (20 cm), panjang 4 inchi (10 cm), berat 32 gram, cangkang berbentuk kerucut (Hoffman dkk., 2014). Cangkang berguna sebagai tempat berlindung dan beristirahat dengan rerata ukuran 7-13 cm (Pitojo, 2006). Cangkang bekicot terdiri dari 3 lapisan (dari luar ke dalam), yaitu periostracum (dari bahan tanduk/conchiolin), lapisan prismatic (dari *calcite* dan *aragonit*), dan lapisan mutiara (dari CaCO_3), jernih dan mengkilap (Nurhadi dan Ferbi, 2018).

Cangkang bekicot keras, berbentuk kerucut, bewarna kuning kecoklatan dengan garis-garis memanjang coklat tua ataupun coklat kehitaman. Bekicot berdaging lunak dengan warna coklat kehitaman dan terdapat antena pada kepalanya (Pitojo, 2006). Warna hewan ini bisa berbeda-beda bergantung pada

lingkungannya, sebagian spesies ini bewarna coklat, gelap, bergaris-garis gelap pada lingkaran cangkangnya, hingga coklat kemerahan dengan tanda vertikal kuning pucat (Hoffman dkk., 2014). Morfologi hewan ini dapat dilihat pada Gambar 1.



Gambar 1. Morfologi cangkang bekicot (Sumber: Nurhadi dan Ferbi, 2018); Keterangan: (a) Tentakel; (b) Cangkang

Achatina fulica bersifat *hermaphrodite* dengan fertilisasi silang. Ovum dan sperma diproduksi oleh ovotestis (dalam satu tubuh). Ovotestis ini dapat menghasilkan sperma dan ovum tetapi tidak dapat autofertilisasi. Ovotestis mempunyai saluran/*ductushemaphroditic* dan lanjutannya *spermaiduct* dengan 2 cabang menjadi *oviduct*/saluran telur dan *vas defferent*/saluran sperma. Saluran ini masing-masing akan berakhir pada vagina dan penis (Nurhadi dan Ferbi, 2018).

B. Parameter dan Kandungan Lendir Bekicot

Lendir bekicot yang diisolasi dengan elektrik shok pada tegangan listrik 5-10 volt, selama 30-60 detik sangat kental dengan volume hasil 1,5-4 ml setiap ekornya. Warna lendir sedikit keruh. Lendir cenderung putih pucat hingga kuning kecoklatan (Berniyanti dan Suwarno, 2007). Beberapa parameter lendir bekicot menurut penelitian Sudjono dkk. (2012) disajikan pada Tabel 1.

Tabel 1. Parameter identifikasi sampel lendir bekicot 100% (*Achatina fulica*)

Parameter	Keadaan Lendir bekicot
pH	8,53
Bentuk	Kental
Warna	Kuning Jernih
Bau	Khas
Homogenitas	Homogen

(Sumber: Sudjono dkk., 2012)

Lendir asli hasil koleksi atau pengumpulan dari permukaan tubuh bekicot berupa cairan kental dengan viskositas yang berbeda setiap pengkoleksian. Lendir dapat sedikit keruh dan bewarna agak kuning hingga coklat tergantung pada cara dan jumlah koleksinya. Lendir memiliki 99 % kelembaban, 4 mg/cm³ protein (achasin, *mytimacin*-AF, dsb), dan 0,7-1,4 mg/cm³ karbohidrat (Iguchi dkk., 1982).

Kandungan lendir bekicot terdiri dari campuran proteoglikan, glikosaminoglikan, enzim glikoprotein, *hyaluronic acid*, peptida antimikrobia, *copper peptides*, dan ion metal. *Snail mucus* secara prinsip mengandung allantoin, kolagen, elastin, dan asam glikolat (*glycolic acid*). Allantoin atau 5-Ureidohydantoin adalah turunan dari *uric acid* yang ditransformasikan oleh enzim uricase. Kandungan ini menyebabkan *desquamating action* sehingga pada akhirnya akan menyebabkan proliferasi sel dan penyembuhan luka (Cilian dan Filippo, 2018).

C. *Artemia salina* dan *Brine Shrimp* Lethality Test

Brine shrimp (genus *Artemia*) adalah salah satu dari beberapa *crustacea* kecil dari ordo Anostraca (kelas Branchiopoda) yang hidup di perairan asin

hingga sangat asin di dunia (Genetic Science Learning Center, 2014). *Artemia* termasuk udang tingkat rendah dan berhabitat di perairan asin. *Artemia* memiliki keunggulan karena dapat tumbuh dengan baik pada suhu 25-30 °C, pH netral hingga agak basa, dan cenderung tahan terhadap berbagai perubahan lingkungan (kandungan ion maupun kadar oksigen terlarut (Mudjiman, 1989). Udang air asin (*A. salina*) digunakan di laboratorium untuk menguji toksisitas bahan kimia (Wilson, 2018). Klasifikasi udang air asin (Mudjiman, 1989), sebagai berikut:

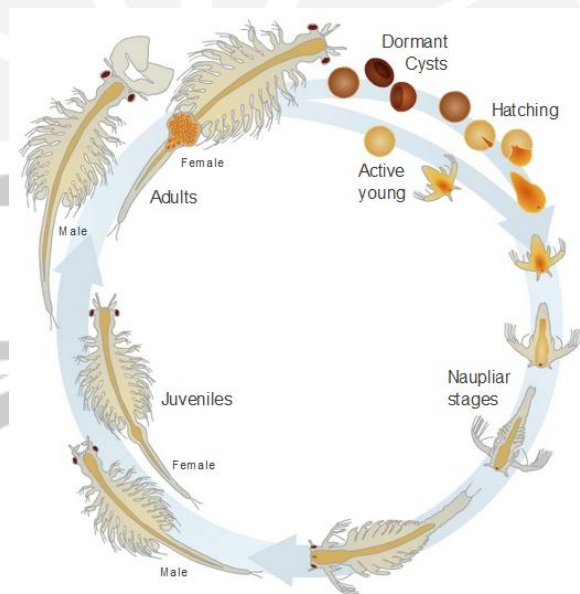
Kerajaan : Animalia
 Filum : Arthropoda
 Kelas : Crustacea
 Bangsa : Anostraca
 Suku : Artemiidae
 Marga : Artemia
 Jenis : *Artemia salina*

Telur udang ini akan menetas selama 48 jam dalam air laut untuk menyediakan sejumlah larva (nauplius) yang cukup digunakan untuk eksperimen (McLaughlin dkk., 1998). Kondisi ideal bagi udang air asin ini untuk hidup adalah perairan dengan kadar garam 100-150 permil (*Artemia* akan melahirkan larva). *A. salina* akan memproduksi siste/kista dorman apabila kadar garam ≥ 150 permil dan kadar oksigen rendah (lingkungan buruk bagi *A. salina*) (Mudjiman, 1989).

Siste (kista dorman) terlindungi dengan cangkang tebal dan kuat, mampu menetas dalam waktu 24-36 jam pada suhu 25 °C dan pada kadar garam rendah serta pH sekitar 8 (Mudjiman, 1989). Larva udang air asin yang baru menetas disebut nauplius (Genetic Science Learning Center, 2014). Nauplius sepanjang perkembangan hidupnya mengalami banyak perubahan bentuk (hingga 15 kali perubahan dari instar 1-15). Daur hidup keseluruhan dari *artemia* intinya adalah

telur (siste/kista dorman), nauplius, dan *A. salina* dewasa (proses keseluruhan normalnya mencapai 1-3 minggu) (Mudjiman, 1989). Daur hidup *A. salina* (Genetic Science Learning Center, 2014) dapat dilihat pada Gambar 2.

Betina dewasa akan melahirkan nauplius berenang bebas ke dalam air, tetapi saat suhu turun dan makanan langka maka betina akan menelurkan kista dorman. Udang air asin ini dapat mencapai kedewasaan hanya dalam 8 hari ketika air hangat, makanan berlimpah, dan kadar oksigen tinggi (kondisi tidak ideal membutuhkan waktu hingga 6 minggu). Untuk mencapai fase dewasanya udang ini memerlukan 15 hingga 17 tahap perubahan yang bergantung dari kondisi lingkungan hidupnya (Genetic Science Learning Center, 2014).



Gambar 2. Daur hidup larva udang air asin (Sumber: Genetic Science Learning Center, 2014)

Keterangan: a. Siste *dormant*; b. Siste menetas; c. Larva atau nauplii (tunggal)/nauplius (jamak); d. Fase *Juvenile*; e. Udang dewasa (*adult*)

Bentuk nauplius dari *A. salina* terdiri dari antena kecil, antena besar, mandibula, dan mata. *A. salina* dewasa memiliki panjang 1 cm dengan berat 10 mg yang bagian tubuhnya terdiri dari mata nauplius, antenula, antena, mata majemuk, mandibula, labrum, kaki torakopoda (11 pasang), kantong telur, ekor, dan furka. Alur reproduksi *A. salina* dewasa setiap 4-5 hari sekali (berlimpah/tinggi tingkat reproduksinya) dan dapat hidup hingga 6 bulan (Mudjiman, 1989).

Artemia salina berguna sebagai hewan uji dikarenakan kesamaan dengan mamalia. Kesamaan itu antara lain DNA-dependant RNA polimerase pada *Artemia* menunjukkan kesamaan dengan tipe mamalia (Solis dkk., 1993). *A. salina* diketahui mempunyai korelasi dengan *screening* senyawa potensial antikanker. Hal ini didukung dengan kemiripan struktur RNA polimerase II pada *A. salina* dengan RNA polimerasi II pada sel HeLa (Aqiila dkk., 2017).

Penapisan senyawa aktif dengan *A. salina* sebagai media uji (*general bioassay test tool*) didukung dengan fakta bahwa *A. salina* memiliki *ouabaine sensitive* Na^+ dan K^+ dependent ATPase. Hal ini menyebabkan senyawa maupun ekstrak aktif dapat terdeteksi dalam sistem tubuhnya (Solis dkk., 1993). *Ouabaine* (salah satu contoh *cardiac glycosides*) akan memiliki ikatan kuat dengan protein sehingga mampu menghambat aktivitas enzim dan pada akhirnya menghambat kerja pompa ion Na^+ maupun K^+ (Vasic dkk., 2008)

Brine Shrimp Lethality Test (BSLT) adalah salah satu uji *in vivo lethality* menggunakan organisme hewan sederhana yang berguna untuk deteksi dan pengawasan senyawa bioaktif bahan alam. Keuntungan uji toksisitas

menggunakan udang air asin ini adalah cepat (24 jam), tidak mahal, sampel yang digunakan sedikit (sekitar 2-20 mg), sederhana (tidak perlu dilakukan secara aseptis), dan tidak diperlukan peralatan khusus (McLaughlin dkk., 1998). Berdasarkan uji senyawa aktif menggunakan media *brine* dapat ditentukan nilai LC_{50} . Aktivitas toksisitas yang didapat menggambarkan manifestasi senyawa aktif dalam ekstrak (mungkin saja belum diketahui) yang menyebabkan toksisitas pada larva. Tujuan uji *bioassay* menggunakan *brine shrimp* berguna untuk *screening* sampel (pendugaan toksisitas kandungannya) secara cepat, dapat dipercaya, mudah, murah, dan tepat untuk menggambarkan uji *bioassay* secara menyeluruh (Meyer dkk., 1982).

Bahan yang digunakan dalam uji BSLT dapat berupa ekstrak kasar, fraksi-fraksi, ataupun senyawa murni hasil isolasi. Bahan diuji pada konsentrasi awal 10, 100, dan 1000 ppm (atau mcg/ml) dalam vial-vial berisi 5 ml air laut dan 10 larva udang *Artemia salina* dengan tiga kali pengulangan (triplo). Larva udang yang mati dihitung setelah 24 jam. Data jumlah yang diperoleh kemudian dihitung nilai LC_{50} dengan analisis probit menggunakan program komputer pada tingkat kepercayaan 95 % (McLaughlin dkk., 1998).

$LC_{50} < 1000 \mu\text{g/ml}$ dapat dikatakan toksik sedangkan $LC_{50} > 1000 \mu\text{g/ml}$ dapat dikatakan tidak toksik (Meyer dkk., 1982). Komponen senyawa dalam ekstrak penting diketahui dalam pengujian BSLT untuk menguji kemampuan senyawa dalam mematikan udang (toksik) (Wijayanti dkk., 2010). *Artemia* menjadi salah satu alternatif uji *bioassay* karena memiliki korelasi yang baik

dengan hewan uji lain, selain itu akan mengurangi penggunaan hewan uji (misalnya: tikus, mencit, kelinci, dsb) (Hamidi dkk., 2014).

Uji BSLT tidak spesifik untuk uji senyawa antitumor ataupun aksi fisiologi tertentu. Uji BSLT berdasarkan penelitian terdahulu yang sudah dilakukan selalu menunjukkan hasil yang signifikan terhadap kemampuan sitotoksik suatu senyawa. Uji BSLT dapat digunakan untuk menentukan aktivitas sitotoksik suatu senyawa dalam sampel sebelum dilakukan pengujian lanjutan dengan sel kanker secara langsung. Uji pendahuluan BSLT akan mendeteksi potensi aktivitas sitotoksik sampel sehingga lebih menghemat biaya dan waktu penelitian untuk pengujian spesifik selanjutnya (Meyer dkk., 1982).

BSLT juga sudah rutin digunakan di laboratorium di seluruh dunia untuk penapisan ekstrak tanaman dengan potensi khasiat obat (misalnya: antimikrobia, antiparasit, antikanker, dan sebagainya), biokonversi berbagai fraksi senyawa aktif, dan untuk deteksi efek sitotoksik. Alasan utama penggunaan krustasea anostracan air asin ini secara luas adalah tersedianya siste dormant komersial (Mayorga dkk., 2010).

Hal terpenting dalam uji ini adalah kelarutan bahan dalam larutan uji. Kompleksitas kimia senyawa sampel dalam bentuk apapun (ekstrak mentah, isolat murni, maupun fraksi konsentrasi) harus mempertimbangkan bioavailabilitas konstituen aktifnya (kelarutan dan keberadaan senyawa agar terpapar pada hewan uji). BSLT juga dapat menunjukkan hasil yang berbeda dikarenakan variasi alami komponen bioaktif dalam sampel dan kondisi penyimpanan sampel (Mayorga dkk., 2010).

D. Senyawa Bioaktif

Senyawa bioaktif adalah zat fisiologis aktif yang mengakibatkan fungsi tertentu pada makhluk hidup. Beberapa contoh zat ini antara lain: karotenoid, *phycoyanins*, polifenol, asam lemak, protein, polisakarida, lipid, vitamin, enzim, sterol, dan sebagainya (Yanuhar, 2016). Komponen bioaktif dapat menyebabkan efek fisiologis positif maupun negatif bagi kesehatan, berupa senyawa non gizi dalam jumlah kecil (metabolit sekunder), misalnya untuk mencegah hingga mengurangi terjadinya penyakit degeneratif (Widyaningsih dkk., 2017).

Alkaloid dapat berfungsi sebagai agen antibakteri dengan mekanismenya yaitu mengganggu komponen penyusun peptidoglikan sel bakteri yang menyebabkan kematian sel bakteri, maupun sebagai interkelator DNA dan menghambat enzim topoisomerase sel bakteri (Ningsih dkk., 2016). Alkaloid juga mampu berfungsi efektif sebagai antikanker dengan mekanisme kerjanya mengikat tubulin dan menghambat pembentukan komponen mikrotubulin pada kumparan mitosis sehingga menghentikan *metaphase*. Contoh senyawa alkaloid yang sudah terbukti antineoplastik adalah *vincristine* (efektif dalam pengobatan leukemia akut pada anak-anak) maupun *vinblastin* (digunakan secara klinis dalam pengobatan *Hodgkin's disease* dan kariokarsinoma (Puspitasari dkk., 2015).

Tanin juga termasuk senyawa yang berfungsi sebagai antimikrobia. Tanin termasuk senyawa lipofilik sehingga mudah terikat pada dinding sel dan mengakibatkan kerusakan dinding sel. Tanin bekerja dengan cara mengendapkan protein membran sel sehingga rusak dan pertumbuhan jamur terhambat (Ningsih dkk., 2016). Mekanisme tanin sebagai antimikroba ini diduga dapat menimbulkan

efek toksik pada tingkat sel sehingga keberadaan senyawa ini dalam sampel perlu diketahui dengan pasti. Umumnya senyawa metabolit sekunder pada kadar tertentu bersifat toksik pada manusia dan mampu menyebabkan gangguan metabolisme tubuh, misalnya senyawa aktif menjadi inhibitor enzim sehingga replikasi DNA terganggu (Puspa dkk., 2017).

Saponin terdiri dari gugus glikosil (gugus polar) dan gugus steroid-triterpenoid (gugus nonpolar) sehingga senyawa bersifat aktif permukaan saat dikocok dengan air (saponin dapat membentuk misel dan busa) (Puspitasari dkk., 2013). Saponin termasuk senyawa yang dapat berfungsi sebagai agen antibakteri. Mekanisme kerja saponin sebagai antibakteri (bakterisida) dikarenakan zat aktif permukaan saponin yang mirip prinsip detergen. Saponin mampu menurunkan tegangan permukaan dinding sel bakteri hingga mampu menyebabkan kebocoran dinding sel, merusak permeabilitas membran, mengganggu kelangsungan hidup bakteri, berdifusi pada membran luar dan dinding sel yang rentan kemudian mengikat membran sitoplasma, mengganggu kestabilan sel, sitoplasma bocor, kematian sel (Ningsih dkk., 2016).

Inisiasi kanker juga dapat dihambat oleh senyawa flavonoid dengan cara menghambat proliferasi melalui inhibisi proses oksidatif. Mekanisme penghambatan ini diperantarai penurunan enzim COX (*Xantin Oksidase Siklooksigenase*) dan LOX (*Lipooksigenase*) yang berguna dalam proses prooksidasi sehingga pada akhirnya siklus sel tertunda (Puspitasari dkk., 2015). Menurut Ren dkk. (2013), sebagian besar flavonoid terbukti mampu menghambat

proliferasi sel kanker pada manusia namun bersifat tidak toksik pada sel normal manusia.

Aktivitas antikanker flavonoid lainnya adalah melalui induksi apoptosis, yang mana flavonoid akan menghambat ekspresi enzim topoisomerase 1 dan 2 (topoisomerase berguna dalam katalisis pemutaran dan relaksasi DNA). Inhibitor enzim topoisomerase akan menstabilkan kembali kompleks topoisomerase dan menyebabkan DNA terpotong serta rusak. Kerusakan DNA ini menyebabkan terekspresikannya protein proapoptosis (contohnya Bax dan Bak) yang menyebabkan penurunan ekspresi protein antiapoptosis (contonya Bcl-2 dan Bcl-XL). Aktivitas ini pada akhirnya akan menghambat pertumbuhan sel kanker (Puspitasari dkk., 2015).

Flavonoid adalah senyawa polifenol yang memiliki efek kemoprevensi dan kemoterapi kanker (berdasarkan data penelitian laboratorium, penyelidikan epidemiologi, serta uji klinis pada manusia). Flavonoid memiliki banyak mekanisme aksi, antara lain menginaktivasi karsinogen, antiproliferasi, penangkapan siklus sel, induksi apoptosis dan diferensiasi, penghambatan angiogenesis, berfungsi sebagai antioksidan, dan pembalikan/memodulasi resistensi multiobat. Mekanisme aksi flavonoid dapat bersifat tunggal saja ataupun kombinasi beberapa mekanisme. Flavonoid dapat menjadi agen antikanker yang menjanjikan berdasarkan pengujian *in vitro*, *in vivo*, hingga uji klinis fase II dengan berbagai mekanisme aksinya (Ren dkk., 2003).

Flavonoid juga terkandung dalam *hemolymph* yang diambil dari *Achatina maginata*. Kadar total flavonoid diujikan dengan metode *aluminium chloride*

colorimetric dengan standar pembanding senyawa katekin. *Hemolymph Achatina maginata* sebesar $15,20 \pm 0,59$ mg/g catechin equivalent (Lawal dkk., 2015).

E. Hipotesis

1. Lendir bekicot (*A. fulica*) memiliki beberapa kandungan bioaktif, yaitu: alkaloid, flavonoid, saponin, dan tanin.
2. Kadar senyawa flavonoid dalam lendir bekicot secara kuantitatif 5 %.
3. Lendir bekicot (*A. fulica*) melalui uji BSLT diketahui memiliki kemampuan aktivitas sitotoksik yang tinggi ditunjukkan dengan nilai $LC_{50} < 1000$ ppm.