

## AKTIVITAS ANTIBAKTERI DARI MELANIN TINTA SOTONG DAN CUMI-CUMI

Yusphiana Fitrial\*, Iin Khusnul Khotimah

Program Studi Teknologi Hasil Perikanan, Fakultas Perikanan dan Kelautan, Universitas Lambung Mangkurat. Jl. A.Yani Km 36 Kotak Pos 6 Banjarbaru 70714, Kalimantan Selatan  
Telepon/Fax: 0511-4772124

\*Korespondensi: [yusphiana@gmail.com](mailto:yusphiana@gmail.com)

Diterima: 30 Mei 2017/ Disetujui: 6 Agustus 2017

**Cara sitasi:** Fitrial Y, Khotimah IK. 2017. Aktivitas antibakteri dari melanin tinta sotong dan cumi-cumi. *Jurnal Pengolahan Hasil Perikanan Indonesia*. 20(2): 266-274.

### Abstrak

Kelas Cephalopoda (seperti cumi-cumi dan sotong) memiliki tinta sebagai pertahanan dirinya. Penelitian ini bertujuan untuk membandingkan aktivitas antibakteri melanin dari tinta sotong (*Sepia* sp.) dengan tinta cumi-cumi (*Loligo* sp.) terhadap *Escherichia coli*. Ekstraksi dan pemurnian terhadap tinta sotong dan cumi-cumi dilakukan untuk mendapatkan melanin dengan menggunakan HCl 0,5 M secara mekanik. Melanin yang diperoleh diuji aktivitasnya terhadap *E. coli* dengan metode kontak langsung antara melanin dan *E. coli* di dalam *nutrient broth*. Total mikroba dihitung dengan metode hitungan cawan. Tinta yang berasal dari *Sepia* sp. ataupun *Loligo* sp. juga diuji aktivitasnya. Hasil penelitian menunjukkan bahwa melanin dari tinta sotong dan cumi-cumi memiliki aktivitas penghambatan pada konsentrasi 10 mg/mL dan 20 mg/mL, secara berturut-turut mencapai 99,99% terhadap *E. coli*. Tinta dari kedua jenis Cephalopoda tersebut pada konsentrasi yang sama dengan melanin, tidak menunjukkan adanya aktivitas penghambatan terhadap *E. coli*. Melanin dari *Sepia* sp. memiliki aktivitas antibakteri terhadap *E. coli* lebih tinggi dibandingkan melanin dari *Loligo* sp.

Kata kunci: aktivitas antibakteri, *E. coli*, *Loligo* sp., melanin, tinta, *Sepia* sp.

### *Antibacterial Activity of Melanin from Cuttlefish and Squid Ink*

#### Abstract

Class Cephalopods (such as squid and cuttlefish) have ink as are notable for their defences. This study aims to compare the antibacterial activity of melanin from cuttlefish ink (*Sepia* sp.) with squid ink (*Loligo* sp.) against *E. coli*. Extraction and purification studies were carried out on *Sepia* and *Loligo* melanin using a hydrochloric acid 0,5M treatment under mechanical. The melanins were obtained and further evaluated their activity by direct contact methods between melanin and *E. coli* in nutrient broth. Total microbes was counted by total plate count. Both inks also was tested their activity against *E. coli*. The results showed that melanin from cuttlefish and squid inks had inhibitory activity at concentrations of 10 mg/ml and 20 mg/ml, respectively reaching 99.99% against *E. coli*. The inks of both Cephalopods at the same concentration as melanin, did not show any inhibitory activity against *E. coli*. The melanin of *Sepia* sp. have a higher antibacterial activity than the melanin of *Loligo* sp.

Keywords: antibacterial activity, cuttlefish, *E. coli*, *Loligo* sp., melanin, *Sepia* sp.

### PENDAHULUAN

Kelas Cephalopoda seperti sotong (*Sepia* sp.) dan cumi-cumi (*Loligo* sp.) merupakan komoditi hasil tangkapan perikanan laut yang pemanfaatannya masih sangat terbatas, sementara untuk sotong hanya dikonsumsi dalam bentuk segar.

Tinta cumi-cumi ataupun sotong di daerah Kalimantan Selatan yang menjadi daerah pengambilan sampel biasanya dibuang atau tidak dimanfaatkan sebagai bagian dari olahan cumi-cumi.

Tinta cumi-cumi maupun tinta sotong mengandung melanin, protein, lemak dan

glikosaminoglikan. Tinta cumi-cumi dapat berperan sebagai obat pelindung sel pada pengobatan kanker dengan cara kemoterapi, melalui peningkatan jumlah sel leukosit dan sel nucleat sumsum tulang, yang jumlahnya menurun akibat penggunaan obat pembunuh sel tumor tersebut. Melanin dari tinta cumi-cumi mempunyai aktivitas anti-tumor dengan menghambat aktivitas plasmin untuk meningkatkan thromboxan dan meningkatkan sistem imun untuk membunuh sel kanker (Zhong *et al.* 2009). Melanin juga berperan sebagai antioksidan (Lei *et al.* 2007<sup>a</sup>), anti-radiasi (Lei *et al.* 2007<sup>b</sup>), dan anti-rotavirus (Rajaganapathi *et al.* 2007).

Hasil penelitian menyebutkan bahwa tinta sotong dan atau cumi-cumi memiliki aktivitas antibakteri (Nair *et al.* 2011). Aktivitas melanin sendiri sebagai antibakteri belum banyak diungkap. Beberapa peneliti telah melakukan pengujian aktivitas antibakteri hanya terhadap ekstrak dari tinta sotong dan atau cumi-cumi. Nithya *et al.* (2011) meneliti aktivitas antibakteri ekstrak heksan tinta sotong (*Sepia pharaonis*) yang dipurifikasi dengan dietil eter. Hasil penelitian ini menunjukkan ekstrak tersebut memiliki aktivitas penghambatan terhadap *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus epidermidis*, *Klebsiella pneumoniae* dan *E. coli*. Yuvaraj *et al.* (2015) membuktikan bahwa tinta cumi-cumi (*Loligo duvauceli*) tidak memiliki aktivitas penghambatan terhadap *E. coli*. Hasil penelitian tersebut, dilakukan pengujian aktivitas antibakteri dengan melakukan pendekatan terhadap kemampuan komponen tinta yaitu melanin dalam mengkelat logam. Hasil penelitian Chen *et al.* (2009) menunjukkan bahwa melanin dari tinta cumi-cumi (*Ommastrephes bartrami*) memiliki kemampuan menyerap Cd(II) dan Pb(II) oleh gugus fungsi yang terdapat di molekul melanin. Gugus fungsi tersebut adalah fenolik hidroksil (OH), karboksil (COOH) dan amina (NH). Kemampuan melanin menyerap ion logam inilah yang akan diamati melalui pengujian aktivitasnya terhadap pertumbuhan sel bakteri terutama bakteri Gram negatif seperti *E. coli*. Bakteri Gram negatif pada membran terluar selnya mengandung ion Mg<sup>2+</sup> dan Ca<sup>2+</sup>

yang berperan penting dalam melindungi kestabilan struktur luar sel.

*E. coli* merupakan bakteri Gram negatif, bersifat patogen bagi manusia dan umumnya bukan merupakan bakteri indigenous pada ikan (Arias 2009). Adanya *E. coli* pada daging ikan akibat kontaminasi selama pemanenan, pengolahan ataupun penyimpanan. Meskipun demikian beberapa ahli menggolongkannya sebagai salah satu bakteri yang menyebabkan pembusukan pada bahan pangan (Dave dan Ghaly 2011). Penelitian terkait aktivitas antibakteri melanin dari tinta sotong dan cumi-cumi terhadap *E. coli* penting dilakukan untuk mendapatkan informasi tentang potensi melanin jika akan dikembangkan sebagai pengawet alami untuk produk perikanan.

## BAHAN DAN METODE

### Bahan dan Alat

Bahan yang digunakan adalah (tinta) cumi-cumi dan sotong yang diperoleh dari Pelabuhan Perikanan Muara Kintap Kabupaten Tanah Laut, Kalimantan Selatan. Bahan lain yang digunakan antara lain HCl 0,5M (Merck), aseton (Merck), akuades, Nutrient Broth (NB) (Merck), Nutrient Agar (NA) (Merck), EMBA (Merck), *Syringe filter sterile*-EO (Sartorius Minisart pore size 0,20 µm), Microbact TM GNB12A/B/E, 24E Identification Kits (oxid) dan alkohol 70%.

Alat yang digunakan pada penelitian ini adalah *refrigerated centrifuge* (Labogene Scanspeed 1580R), *Freeze dryer* (Model Christ alpha 2-4 LD Plus), autoklaf (Pressure Steam Sterilizer Electric Model No.25X-2), *laminar flow* (Biobase), inkubator (Mettler), *colony counter* (Quebec), *incubator shaker* (Wisd), spektrofotometer (Genesys 10uv) dan peralatan gelas lainnya.

### Metode Penelitian

Tahapan penelitian yang dilakukan meliputi isolasi *E. coli* dari daging ikan busuk, ekstraksi dan purifikasi melanin dari tinta sotong dan cumi-cumi. Analisis rendemen dilakukan terhadap ekstrak kasar tinta dan pengujian aktivitas melanin dilakukan terhadap pertumbuhan bakteri uji yaitu *E. coli* serta uji kebocoran sel bakteri uji.

### Isolasi *E. coli* dari daging ikan yang busuk

Daging ikan busuk dilarutkan dalam larutan garam fisiologis 0,85% dengan perbandingan 1: 10. Larutan daging sebanyak 1 mL di tumbuhkan dalam media EMB (*Eosin Methylene Blue*) Agar, kemudian diinkubasi selama 24 jam pada suhu 37 °C. Media EMBA merupakan media selektif dan diferensiasi. Eosin akan membedakan antara dua koliform utama, yaitu *E. coli* (koloni kecil dan hijau metalik) dan *Enterobacter aerogenes* (koloni berukuran besar, berwarna merah jambu). *Methylene Blue* secara selektif menghambat Gram positif, sehingga yang dapat tumbuh di media tersebut hanya Gram negatif.

### Ekstraksi dan purifikasi melanin dari tinta cumi-cumi

Ekstraksi dan purifikasi melanin pada tinta cumi-cumi dan sotong dilakukan menurut metode Magarelli *et al.* (2010). Tahapan ekstraksi dan purifikasi dilakukan dalam media asam. Preparasi tinta dilakukan dengan mengambil habis tinta dari kantong tinta segar. Tinta sebanyak 50 g ditambahkan 100 mL HCl 0,5M dalam kondisi kedap cahaya. Larutan diaduk dengan menggunakan *magnetic stirrer* selama 30 menit, selanjutnya disimpan selama 24 jam pada suhu 10 °C. Endapan dipisahkan dari supernatan dengan menggunakan sentrifius (10.000 rpm pada suhu 5 °C selama 15 menit). Endapan (padatan) dicuci atau disuspensikan kembali dengan larutan HCl 0,5M sebanyak 3 kali, dilanjutkan dengan akuades, aseton dan terakhir dengan akuades. Tahap selanjutnya dilakukan liofilisasi selama kurang lebih 24 jam untuk memisahkan pelarut hingga diperoleh melanin kering dan di simpan dalam *freezer* sebelum dilakukan pengujian lebih lanjut. Perlakuan tinta (kontrol), tinta diambil dari kantong tinta, lalu dilakukan liofilisasi dengan *freeze dryer* seperti sampel melanin.

### Pengujian aktivitas melanin terhadap bakteri uji

Pengujian aktivitas melanin dilakukan dengan metode kontak langsung antara melanin dengan bakteri uji dalam media cair nutrient broth (NB) (modifikasi dari Murhadi

(2002)). Pengujian dilakukan dengan membuat seri pengujian di dalam tabung kecil berisi 2,970 mL NB steril ditambah 0,030 mL suspensi bakteri uji sehingga total larutan dalam tabung uji 3,000 mL. Melanin (dalam bentuk serbuk) ditambahkan ke dalam tabung uji sehingga konsentrasi melanin dalam tabung 0,000; 0,002; 0,006; 0,010 g/mL. Pembuatan seri tabung uji ke-1 (konsentrasi melanin 0,000 g/mL), digunakan 2,970 mL NB steril + 0,000 g melanin. Tabung seri ke-2 (konsentrasi melanin 0,002 g/mL), dibuat dengan cara menambahkan 2,964 mL NB steril + 0,006 g melanin, dan seterusnya.

Bakteri uji yang telah disegarkan kemudian disiapkan dan diinkubasi 24 jam ( $10^8$ - $10^9$  CFU/mL) pada 37 °C, lalu diencerkan 10 kali. Tabung uji tersebut diinokulasikan dengan 0,030 mL suspensi bakteri uji, dikocok dengan alat vortex selama 1-2 menit, kemudian diinkubasi pada *incubator shaker* suhu 37 °C selama 24 jam. Perhitungan jumlah bakteri dilakukan dengan metode hitungan cawan (TPC, *Total Plate Count*).

Persentase penghambatan bakteri ditentukan dengan modifikasi metode Cappaso *et al.* (1995) yang dinyatakan:  $100 - (Nt \times 100/No)$ , Nt adalah jumlah bakteri CFU/mL dalam perlakuan penambahan melanin, sedangkan No adalah jumlah bakteri CFU/mL dalam kontrol (inokulum awal).

### Pengujian aktivitas melanin terhadap pertumbuhan *E. coli*

Pengujian penghambatan melanin terhadap pertumbuhan *E. coli* dilakukan dengan cara yang sama dengan pengujian aktivitas melanin di atas, yaitu dengan konsentrasi 0,010 g/mL (yaitu konsentrasi melanin dimana persen penghambatan relatifnya terhadap jumlah mikroba awal mendekati 100%). Pengamatan dilakukan per tiga jam selama 24 jam.

### Pengujian kebocoran sel bakteri uji

Pengujian ini untuk melihat akibat dari aktivitas melanin tinta sotong terhadap mikroba uji mengacu pada Bunduki *et al.* (1995). Analisis kebocoran sel dilakukan dengan menggunakan Spektrofotometer *Double Beam* pada panjang gelombang 280

dan 260 nm. Panjang gelombang 280 nm digunakan untuk mengukur kadar nitrogen dari protein sel, sedangkan panjang gelombang 260 nm untuk mengukur kadar nitrogen asam nukleat sel.

Kultur murni sebanyak 10 mL disentrifus pada 10.000 rpm selama 10 menit. Filtrat dibuang lalu ditambahkan 5 mL larutan garam fisiologis (0,85% NaCl) dalam endapan sel pada tabung reaksi, kemudian divorteks agar sel homogen dalam larutan fisiologis. Selanjutnya ditambahkan melanin dengan konsentrasi 0; 0,005; 0,010; 0,015; 0,020 g/mL dan dibiarkan pada suhu kamar selama 24 jam. Suspensi kemudian disentrifus pada 10.000 rpm selama 10 menit dan supernatan disaring dengan kertas saring (*Syringe filter sterile* 0,20  $\mu\text{m}$ ) untuk memisahkan selnya. Analisis dilakukan dengan mengamati OD (*Optical Density*) dari supernatan bebas sel.

## HASIL DAN PEMBAHASAN

### Isolasi *E. coli*

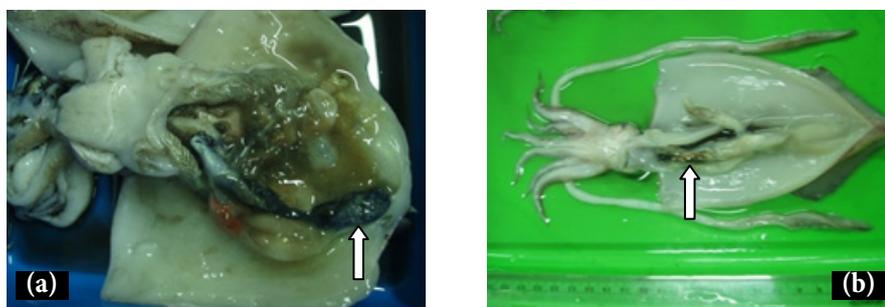
Koloni yang diduga *E. coli* yaitu yang berwarna hijau metalik diuji sifat biokimianya dengan menggunakan *microbact identification kits* (oxid). Hasil pengujian dengan *microbact kit* menunjukkan lisin (+), ornitin (+),  $\text{H}_2\text{S}$  (-), glukosa (+), manitol (+), xilosa (+), ONPG (+), Indol (+), urease (-), V-P (-), citrate (-), dan TDA (-). Hasil identifikasi menunjukkan *Escherichia coli* (96,39%).

### Rendemen Tinta dari *Sepia* sp. dan *Loligo* sp.

*Sepia* sp. memiliki kantong tinta yang panjang dan besar, sementara kantong

tinta *Loligo* sp. berukuran kecil sehingga tinta yang dihasilkan juga lebih sedikit (Gambar 1). Tinta yang terdapat dalam kantong sangat ditentukan oleh kondisi terakhir sebelum ditangkap, jika sebelum ditangkap sudah banyak tinta yang dikeluarkan maka hanya sedikit yang tersisa di kantong. Analisis rendemen dari tinta berdasarkan perbandingan berat kantong (berisi tinta) terhadap berat badan per ekor yang dihasilkan oleh kedua sampel. Berat utuh *Loligo* sp. yaitu  $116,6 \pm 40,36$  g dan berat kantong tinta  $0,6 \pm 0,1$  g, sedangkan *Sepia* sp. memiliki berat utuh  $173,0 \pm 19,6$  g dan berat kantong tinta  $4,0 \pm 1,4$  g. Hasil analisis rendemen terlihat bahwa jenis *Sepia* memiliki rendemen tinta yang lebih besar (2,3%) dibandingkan tinta dari jenis *Loligo* (0,5%).

Nair *et al.* (2011) menyatakan bahwa tinta *Sepia* terdiri atas granula melanin dalam media yang kental tidak berwarna. Pigmen melanin diolah dalam sel mature kelenjar tinta, terutama pada bagian dasar kantong tinta yang terus-menerus memproduksi tinta. Akhir proses pematangan, sel-sel kelenjar tinta menyimpannya dalam kantong tinta yang berperan sebagai penampung. Setiap kantong tinta *Sepia* mengandung ~ 1 g melanin (Derby 2014), dan banyaknya melanin ~ 15% dari berat basah total tinta (Wang *et al.* 2014). Melanin *Sepia* terbentuk oleh banyak kelompok agregat. Agregat-agregat ini terbentuk juga oleh butiran bola kecil dengan distribusi ukuran yang berbeda. Diameter butiran kecil berkisar 100-200 nm (Mboniyiriyuze *et al.* 2015). Ukuran butiran bola melanin pada cumi-cumi, berkisar antara



Gambar 1 Jenis chepalopoda dan kantong tinta yang digunakan pada penelitian ini. (a) jenis sotong (*Sepia* sp.), kantong tinta dari jenis *Sepia* sp., (b) jenis cumi-cumi (*Loligo* sp.), kantong tinta dari jenis *Loligo* sp.

50–150 nm (Chen *et al.* 2009). Berdasarkan hasil pengamatan, tinta *Loligo sp.* memiliki tekstur yang halus, sedangkan tinta *Sepia sp.* memiliki tekstur yang kasar.

### Aktivitas Melanin Tinta *Sepia sp.* dan *Loligo sp.*

Pengaruh tinta dan melanin dari *Sepia sp.* dan *Loligo sp.* pada beberapa konsentrasi terhadap pertumbuhan *E. coli* dapat dilihat pada Tabel 1. Konsentrasi melanin semakin tinggi menghasillkan aktivitas penghambatan terhadap *E. coli* juga semakin besar. Melanin *Sepia sp.* pada konsentrasi 0,002 g/mL terlihat tidak ada aktivitas penghambatan, sementara pada konsentrasi yang lebih tinggi yaitu 0,006 g/mL terlihat jumlah koloni setelah inkubasi 24 jam tidak berbeda dengan jumlah awal (sebelum inkubasi). Hal ini menunjukkan pada konsentrasi 0,006 g/mL sudah terjadi penghambatan terhadap pertumbuhan sel bakteri, hingga 24 jam inkubasi tidak terjadi peningkatan yang berarti pada jumlah sel bakteri.

Konsentrasi yang lebih tinggi yaitu 0,010 g/mL, melanin mampu membunuh bakteri sehingga setelah inkubasi 24 jam hanya ada 1 sel yang hidup (penghambatan mencapai 99,99%). Melanin dari *Sepia sp.* memiliki aktivitas penghambatan yang lebih besar dibandingkan dengan melanin dari *Loligo sp.* Pada konsentrasi yang lebih rendah (1/2 dari konsentrasi melanin *Loligo sp.*), melanin dari *Sepia sp.* mampu menghambat hampir 100%. Tabel 1 menunjukkan *E. coli* lebih sensitif terhadap melanin dari *Sepia sp.* dibandingkan dengan dari *Loligo sp.*

Tinta *Sepia sp.* dengan konsentrasi yang lebih tinggi dibandingkan dengan melaninnya tidak memiliki aktivitas penghambatan, sementara tinta *Loligo sp.* pada konsentrasi yang sama dengan melanin tidak memiliki aktivitas penghambatan terhadap *E. coli*. Hal ini disebabkan karena yang terkandung di dalam tinta tidak hanya melanin, melainkan ada komponen lain misalnya protein, lemak dan glikosaminoglikan yang diduga tidak memiliki aktivitas penghambatan terhadap *E. coli*, akan tetapi sebaliknya dapat meningkatkan pertumbuhan *E. coli*.

Tabel 1 Pertumbuhan *E. coli* pada media NB yang mengandung tinta dan melanin

Sumber	Konsentrasi (g/mL)	Jumlah <i>E. coli</i> (CFU/mL)		% Penghambatan relatif terhadap jumlah mikroba awal [100-(Ntx100/No)]	Log Penghambatan	
		Inkubasi 0 jam (No)	Inkubasi 24 jam (Nt)			
<i>Sepia sp.</i>	0	8,6 x 10 <sup>5</sup>	1,6 x 10 <sup>10</sup>	-	-4,27	
	Tinta	0,013	8,6 x 10 <sup>5</sup>	6,2 x 10 <sup>9</sup>	-	-3,86
		0,017	8,6 x 10 <sup>5</sup>	5,6 x 10 <sup>9</sup>	-	-3,81
		0,020	8,6 x 10 <sup>5</sup>	4,4 x 10 <sup>9</sup>	-	-3,71
	Melanin	0,002	8,6 x 10 <sup>5</sup>	1,2 x 10 <sup>10</sup>	-	-5,14
		0,006	8,6 x 10 <sup>5</sup>	6,0 x 10 <sup>5</sup>	30,23	0,16
		0,010	8,6 x 10 <sup>5</sup>	1,0 x 10 <sup>0</sup>	99,99	5,93
<i>Loligo sp.</i>	0	8,6 x 10 <sup>5</sup>	3,1 x 10 <sup>10</sup>	-	-4,56	
	Tinta	0,013	8,6 x 10 <sup>5</sup>	8,6 x 10 <sup>9</sup>	-	-4,00
		0,017	8,6 x 10 <sup>5</sup>	2,3 x 10 <sup>9</sup>	-	-3,43
		0,020	8,6 x 10 <sup>5</sup>	1,0 x 10 <sup>9</sup>	-	-3,06
	Melanin	0,013	8,6 x 10 <sup>5</sup>	2,1 x 10 <sup>4</sup>	97,56	1,61
		0,017	8,6 x 10 <sup>5</sup>	2,1 x 10 <sup>3</sup>	99,76	2,61
		0,020	8,6 x 10 <sup>5</sup>	1,4 x 10 <sup>2</sup>	99,87	3,79

Keterangan: (-) nilai negatif artinya tidak ada penghambatan dan terjadi peningkatan

### Aktivitas Melanin *Sepia* sp. terhadap Pertumbuhan *E. coli*

Aktivitas melanin dari *Sepia* terhadap pertumbuhan *E. coli* dapat dilihat pada Gambar 2. Pertumbuhan *E. coli* yang diberi perlakuan melanin dari *Sepia* sp. sebanyak 10 mg/mL terlihat jumlah koloninya yang hidup mengalami penurunan lebih dari 1 log<sub>10</sub> setelah 6 jam inkubasi dan penurunan tersebut terus berlanjut hingga 2 log<sub>10</sub> setelah 21 jam inkubasi. Akibat aktivitas melanin, terjadi perpanjangan fase adaptasi dan menyebabkan terjadinya penurunan jumlah koloni yang hidup, setelah 24 jam inkubasi, tidak ada lagi koloni yang hidup (Gambar 2). Hal ini menunjukkan bahwa selain memperpanjang fase adaptasi, melanin juga mempercepat fase kematian pada sel bakteri.

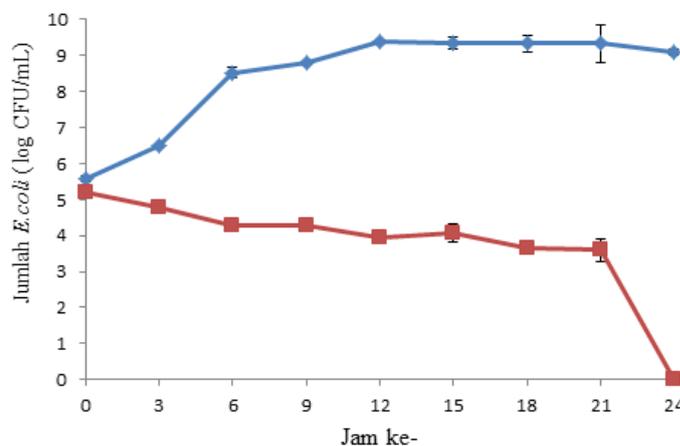
Pertumbuhan *E. coli* tanpa perlakuan melanin terjadi peningkatan jumlah koloni yang hidup lebih dari 4 log<sub>10</sub> (dari 10<sup>5</sup> menjadi 10<sup>9</sup>). Pertumbuhan pada 3 jam pertama memasuki fase adaptasi dan pertumbuhan awal yang dilanjutkan dengan fase logaritmik setelah 6 jam inkubasi. Setelah 6 jam terjadi peningkatan jumlah koloni yang cepat hingga 2 log<sub>10</sub>, dan terus meningkat hingga jam ke-12 walaupun hanya sedikit terjadi penambahan populasi (kurang dari 1 log<sub>10</sub>). Pertumbuhan memasuki fase stasioner setelah jam ke-12 hingga jam ke-24.

Vasantharaja *et al.* (2014) melaporkan bahwa ekstrak metanol tinta *Sepiella inermis* dengan menggunakan GC-MS menunjukkan adanya campuran dari struktur oligomer

yang merupakan gabungan antara dihidroksi indol-2-asam karboksilat dan dihidroksiindol. Ekstrak metanol ini memiliki aktivitas penghambatan terutama terhadap bakteri Gram negatif misalnya *Proteus vulgaris*, *Pseudomonas aeruginosa* dan *E. coli*. Neifar *et al.* (2009) melaporkan bahwa dihidroksiindol dan asam dikarboksilat dari *Sepia officinalis* memiliki aktivitas penghambatan terhadap mikroba.

Melanin merupakan tirosinase yang telah diidentifikasi terdapat di dalam tinta cumi-cumi (Derby 2014). Tinta cumi-cumi terdiri atas suspensi granula eumelanin di dalam media yang viscous dan tidak berwarna. Eumelanin bersifat heterogen, umumnya polimer yang tidak larut yang berkembang melalui oksidasi enzimatik dari asam amino tirosin. Produksi eumelanin di dalam sel pigmen terjadi di dalam organel khusus yang disebut melanosome. Eumelanin tersusun dari unit 5,6-dihidroksiindol (DHI) sekitar 20% dan unit 5,6-dihidroksiindol-2-asam karboksilat (DHICA) (Magarelli *et al.* 2010). Eumelanin alami dilaporkan merupakan molekul pigmen yang dapat mengadsorpsi logam pada konsentrasi tinggi. Kemampuan berikatan eumelanin dengan sisi dari logam merupakan parameter penting untuk memahami kompleks logam-melanin (Lei *et al.* 2008; Chen *et al.* 2009).

Dinding sel bakteri mengandung banyak jenis kation termasuk Mg<sup>2+</sup>, Ca<sup>2+</sup>, Na<sup>+</sup>, dan K<sup>+</sup>. Ion-ion ini bertanggung jawab atas berbagai aktivitas bakteri, termasuk kerja enzim,



Gambar 2 Kurva pertumbuhan *E. coli* yang diinkubasi dengan melanin *Sepia* sp. ◆ = kontrol (tanpa melanin), ■ = ditambah melanin.

Tabel 2 Nilai OD dari supernatan bebas sel *E. coli* yang diinkubasi dengan melanin dari *Sepia* sp.

Konsentrasi melanin (g/ml)	OD pada 260 nm	OD pada 280 nm
0	0,015	0,018
0,005	0,212	0,234
0,010	0,277	0,307
0,015	0,314	0,384
0,020	0,398	0,464

pengaturan metabolik dan menjaga integritas lapisan luar.  $Mg^{2+}$  dan ion  $Ca^{2+}$  khususnya, berperan penting dalam melindungi kestabilan struktur luar (Ferrero *et al.* 2007; Peshenko *et al.* 2007). Lapisan paling luar dari membran luar pada bakteri Gram negatif adalah lipopolisakarida (LPS), secara individu, molekul ini bermuatan negatif. Kation divalen membantu menstabilkan dan menjaga integritas membran luar dengan mengikat molekul LPS yang berdekatan. Kation *divalent* ini berfungsi sebagai jembatan garam berikatan dengan molekul lipid yang bermuatan negatif (Raetz *et al.* 2007). Membran luar pada sel bakteri berfungsi sebagai penghalang masuknya senyawa-senyawa yang tidak diperlukan sel (seperti bakteriosin, enzim dan senyawa hidrofobik). Jika kation tersebut dapat diadsorpsi oleh gugus fungsi melanin, maka sistem metabolisme sel bakteri akan terganggu, akibatnya pertumbuhan sel bakteri juga terganggu.

Sahalan *et al.* (2013) menjelaskan ion  $Ca^{2+}$  dan  $Mg^{2+}$  berperan melindungi membran terluar pada sel bakteri terhadap Polymyxin B yang berinteraksi dengan kation divalent, dengan mengganti kation dari tempat pengikatannya di molekul lipopolisakarida (LPS). Hal ini menyebabkan disorganisasi komponen membran luar bakteri Gram negatif, akibat lepasnya komponen LPS dari permukaan bakteri yang menyebabkan kebocoran membran dan akhirnya menyebabkan kematian sel.  $Ca^{2+}$  telah terbukti lebih efektif dalam melindungi sel bakteri dibandingkan  $Mg^{2+}$ .

Pengikatan gugus fungsi dari melanin yaitu gugus hidroksil fenolik (OH), karboksil (COOH) dan grup amina (NH)

(Chen *et al.* 2009) terhadap ion  $Ca^{2+}$  dan  $Mg^{2+}$  pada membran luar mengakibatkan kebocoran pada membran bakteri Gram negatif dalam hal ini diwakili oleh *E. coli*. Kebocoran yang disebabkan oleh melanin terhadap sel *E. coli* dapat dilihat dari dihasilkannya supernatan bebas sel isi sel bakteri setelah diinkubasi selama 24 jam dengan melanin tinta *Sepia* sp. (Tabel 2). Tabel 2 menunjukkan hubungan antara konsentrasi melanin dengan supernatan bebas sel dari sel *E. coli*. Analisis kebocoran sel dilakukan dengan menggunakan Spektrofotometer *Double Beam* pada panjang gelombang 280 dan 260 nm. Panjang gelombang 280 nm digunakan untuk mengukur kadar nitrogen dari protein sel, sedangkan panjang gelombang 260 nm untuk mengukur kadar nitrogen asam nukleat sel. Semakin tinggi nilai OD baik pada panjang gelombang 260 nm maupun 280 nm menunjukkan semakin besarnya kebocoran sel akibat melanin. Semakin tinggi konsentrasi melanin, semakin besar tingkat kebocoran sel.

Hasil pengamatan terhadap spektrum Infra Red (IR) menggunakan FTIR spektrofotometer dari melanin tinta *Sepia* sp. dan *Loligo* sp. (data tidak dipublikasikan) menunjukkan kedua melanin memiliki pola spektrum yang sama, mengandung gugus fenolik, amina dan karboksil. Intensitas dari masing-masing gugus aktif tersebut yang berbeda diantara keduanya. Gugus fenolik, amina dan karboksil dari melanin *Sepia* sp. memiliki intensitas yang lebih tinggi dibandingkan dengan melanin dari *Loligo* sp. Intensitas ini menunjukkan konsentrasi dari gugus aktif tersebut di dalam melanin. Hal inilah yang diduga mengakibatkan perbedaan aktivitas kedua melanin tersebut terhadap *E. coli*.

## KESIMPULAN

Melanin dari tinta sotong (*Sepia* sp.) dan cumi-cumi (*Loligo* sp) memiliki aktivitas penghambatan terhadap *E. coli*. Aktivitas penghambatan terhadap *E. coli* dari melanin tinta sotong lebih tinggi dibandingkan melanin dari cumi-cumi. Tinta sotong dan cumi-cumi pada konsentrasi 0,013-0,020 g/mL tidak memiliki aktivitas penghambatan terhadap *E. coli*.

## UCAPAN TERIMA KASIH

Ucapan terima kasih disampaikan kepada Direktorat Riset dan Pengabdian Masyarakat Direktorat Jenderal Penguatan Riset dan Pengembangan, Kementerian Riset, Teknologi dan Pendidikan Tinggi atas bantuan dana penelitian melalui hibah Fundamental (sesuai dengan Surat Perjanjian Penugasan Pelaksanaan Program Penelitian Nomor: 024/SP2H/LT/DRPM/II/2016 tanggal 17 Februari 2016).

## DAFTAR PUSTAKA

- Arias C. 2009. Chilled and Frozen Raw Fish. Di dalam: Fernandes R (editor) Microbiology Handbook Fish and Seafood. United Kingdom (UK): Leatherhead Food International Ltd.
- Bunduki MMC, KJ Flanders and CW Donnelly. 1995. Metabolic and structural sites of damage in heat and sanitizer-injured population of *Listeria monocytogenes*. *Journal Food Protect.* 58: 410-415.
- Cappaso R, Evidente A, Schivo L, Orru G, Marcialis MA, Cristinzio G. 1995. Antibacterial polyphenols from olive oil mill waste waters. *Journal of Applied Bacteriology.* 79: 393-398.
- Chen S, Xue C, Wang J, Feng H, Wang Y, Ma Q, Wang D. 2009. Adsorption of Pb(II) and Cd(II) by squid *Ommastrephes bartrami* melanin. *Bioinorganic Chemistry and Applications.* 1-7
- Dave D, Ghaly AE. 2011. Meat spoilage mechanisms and preservation techniques: a critical review. *American Journal of Agricultural and Biological Sciences.* 6(4): 486-510.
- Derby CD. 2014. Cephalopod ink: production, chemistry, functions and applications. *Marine drugs.* 12: 2700-2730.
- Ferrero MA, Martínez-Blanco H, Lopez-Velasco FF, Ezquerro-Sáenz C, Navasa N, Lozano S & Rodríguez-Aparicio LB. 2007. Purification and characterization of GlcNAc-6-P 2-epimerase from *Escherichia coli* K92. *Acta Biochimica Polonica.* 54(2): 387-399.
- Lei M, Wang JF, Pang L, Wang YM, Chen SG, Xue CH. 2007a. Effects of *Sepia* on the metabolization of blood lipid and antioxidant ability in hyperlipidemia rats. *The Chinese Journal of Marine Drugs.* 3: 30-33.
- Lei M, Wang JF, Wang YM, Pang L, Wang Y, Xu W, Xue CH. 2007b. Study of the radio-protective effect of cuttlefish ink on hemopoietic injury. *Asia Pacific Journal of Clinical Nutrition.* 16: 239-243.
- Lei M, Xue CH, Wang YM, Li ZJ, Xue Y, Wang JF. 2008. Effect of squid ink melanin-Fe on iron deficiency anemia remission. *Journal of Food Science.* 73(8): 207-11.
- Mbonyiriyivuze A, Nuru ZY, Diop Ngom B, Mwakikunga B, Simon Mokhotjwa Dhlamini SM, Park E, Maaza M. 2015. Morphological and chemical composition characterization of commercial *Sepia* melanin. *American Journal of Nanomaterials.* 3(1): 22-27.
- Murhadi. 2002. Isolasi dan Karakterisasi Komponen Antibakteri dari Biji Atung (*Parinarium glaberrimum* Hassk). [disertasi]. Bogor (ID): Institut Pertanian Bogor.
- Nair JR, Pillai D, Joseph SM, Gomathi P, Senan PV, and Sherief PM. 2011. Cephalopod research and bioactive substances. *Indian Journal of Geo-Marine Sciences.* 40(1): 13-27.
- Neifar A, Rebah FB, Gargouri AF, Abdelmouleh A. 2009. Physicochemical characterization of *Sepia officinalis* ink and the effects of storage conditions on the coagulation process. *Journal of the Marine Biological Association of the UK.* 89(04): 803-807.
- Nithya M, Ambikapathy V, Panneerselvam A. 2011. Effect of pharaoh's cuttlefish ink

- against bacterial pathogens. *Asian Journal of Plant Science and Research*. 1 (4):49-55
- Peshenko IV & Dizhoor AM. 2007. Activation and inhibition of photoreceptor guanylyl cyclase by guanylyl cyclase activating protein 1 (GCAP-1): The functional role of  $Mg^{2+}/Ca^{2+}$  exchange in EF-hand domains. *The Journal of Biological Chemistry*. 82(30): 21645-21652.
- Raetz C R, Reynolds CM, Trent MS & Bishop RE. 2007. Lipid: A modification systems in gram-negative bacteria. *Annual Reviews Biochemistry*. 76: 295-329.
- Rajaganapathi J, Thyagarajam SP, Edward JK. 2007. Study on cephalopod's ink for anti-retroviral activity. *Indian Journal of Experimental Biology*. 38: 519-520.
- Sahalan AZ, Aziz AHA, Lian H & Ghani MKA. 2013. Divalent cations ( $Mg^{2+}$ ,  $Ca^{2+}$ ) protect bacterial outer membrane damage by Polymyxin B. *Sains Malaysiana*. 42(3): 301-306.
- Vasantharaja D, Ravitchandirane V and Anandan V. 2014. Anti-microbial activity and spectro-chemical investigation of ink extracts of *Sepiella inermis* (Van Hasselt 1835). *Notulae Scientia Biologicae*. 6(3):273-275
- Wang FR, Xie ZG, Ye XQ, Deng SG, Hu YQ, Guo X, Chen SG. 2014. Effectiveness of treatment of iron deficiency anemia in rats with squid ink melanin-Fe. *Food Funct*. 5: 123-128.
- Yuvaraj D, Suvasini B, Chellathai T, Fouziya R, Ivo Romauld S and Chandran M. 2015. Anti-bacterial studies on the different body parts of *Loligo duvauceli*. *Journal of Chemical and Pharmaceutical Research*. 7(6):406-408.
- Zhong JP, Wang G, Shang JH, Pan JQ, Li K, Huang Y, Liu HZ. 2009. Protective effects of squid ink extract towards hemopoietic injuries induced by cyclophosphamine. *Marine Drugs*. 7: 9-18.