



JURNAL

PENGOLAHAN HASIL PERIKANAN INDONESIA

Jl. Lingkar Akademik Kampus IPB Dramaga Bogor 16680 Telp. (0251) 8622915
Fax. (0251) 8622916, E-mail buletin_thpipb@yahoo.com

Nomor : 141/EAP/JPHPI/2017
Lampiran : 1 berkas
Hal : Permohonan perbaikan naskah

Bogor, 5 Juni 2017

Kepada
Yth.
Dr. Yuspihana Fitriana, S.Pi, M.Si
Di Tempat

Dengan hormat,

Bersama ini Kami dari tim Jurnal Pengolahan Hasil Perikanan Indonesia menyampaikan artikel dengan judul **POTENSI ANTIBAKTERI DARI MELANIN TINTA SOTONG DAN CUMI-CUMI TERHADAP E.coli SEBAGAI MODEL BAKTERI GRAM NEGATI** untuk diperbaiki sesuai format (terlampir). Kami berharap hasil perbaikan dari Ibu dapat dikirim kembali paling lambat tanggal 9 Juni 2017, agar naskah Ibu dapat kami proses ke tahap *review*.

Demikian kami sampaikan, atas perhatian dan kerja samanya kami ucapkan terima kasih.

Pemimpin Redaksi
Jurnal Pengolahan Hasil Perikanan Indonesia

Dr. Ir. Nurjanah, MS.
NIP. 19591031986012002

Lampiran:

Point yang harus diperbaiki

- Perhatikan SPOK dan EYD pada setiap kalimat
- Perhatikan format penulisan (spasi dll)
- Pustaka 10 tahun terakhir
- Spasi 2,0

(153) WhatsApp x Manual Repositori Dosen Up x naskah jurnal - yusphiana@ x Gmail - naskah jurnal x Gmail - Permohonan perba x +

mail.google.com/mail/u/0/?tab=rm&ogbl#search/JPHPI/FMfcgxmTpLhftMDLsQjtfZXwsNgzjTMS

Google Chrome isn't your default browser [Set as default](#)

Gmail JPHPI

Tulis

Kotak Masuk 7.850

Berbintang

Ditunda

Penting

Terkirim

Draf 74

Semua Email

Kategori

Selengkapnya

Label +

Jurnal Pengolahan <jurnalpengolahan@yahoo.com> kepada saya 31 Mei 2017, 14.43

Kepada
Yth Dr. Yusphiana F, SPi, MSi
di Tempat

Bersama dengan ini kami lampirkan surat keterangan bahwa naskah dengan judul **POTENSI ANTIBAKTERI DARI MELANIN TINTA SOTONG DAN CUMI-CUMI TERHADAP *E.coli* SEBAGAI MODEL BAKTERI GRAM NEGATIF** yang ditulis **Yusphiana Fitriani dan Iin Khusnul Khotimah** telah diterima oleh Dewan Editor JPHPI dengan nomor naskah 074 dan sedang proses pengecekan oleh dewan editor.

demikian yang dapat kami sampaikan, atas perhatian dan kerjasama yang baik kami haturkan terima kasih

Hormat kami,

Rizsa Mustika Pertiwi

Type here to search

Address

27°C

22:06
26/07/2024



JURNAL

PENGOLAHAN HASIL PERIKANAN INDONESIA

Departemen Teknologi Hasil Perairan, Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan, Institut Pertanian Bogor
Jl. Lingkar Kampus IPB Dramaga Bogor 16680 Telp. (0251) 8622915, E-mail: buletin_thpipb@yahoo.com

Surat Keterangan No. 008/U/JPHPI/2017

Saya yang bertandatangan di bawah ini selaku Ketua Redaksi Jurnal Pengolahan Hasil Perikanan Indonesia menerangkan bahwa artikel berjudul **POTENSI ANTIBAKTERI DARI MELANIN TINTA SOTONG DAN CUMI-CUMI TERHADAP *E.coli* SEBAGAI MODEL BAKTERI GRAM NEGATIF** yang ditulis Yuspihana Fitriani dan Iin Khusnul Khotimah telah diterima oleh Dewan Editor JPHPI.

Demikian surat ini dibuat dengan sebenar-benarnya untuk dipergunakan sebagaimana mestinya.

Bogor, 31 Mei 2017
Pemimpin Redaksi
Jurnal Pengolahan Hasil Perikanan Indonesia

Prof. Dr. Ir. Nurjanah, MS.
NIP. 195910131986012002



JURNAL

PENGOLAHAN HASIL PERIKANAN INDONESIA

Jl. Lingkar Akademik Kampus IPB Dramaga Bogor 16680 Telp. (0251) 8622915
Fax. (0251) 8622916, E-mail buletin_thpipb@yahoo.com

Nomor : 174/EAP/JPHPI/2017
Lampiran : 1 berkas
Hal : Permohonan perbaikan naskah

Bogor, 28 Juli 2017

Kepada
Yth.
Dr. Yuspihana Fitriana, S.Pi, M.Si
Di Tempat

Dengan hormat,

Bersama ini Kami dari tim Jurnal Pengolahan Hasil Perikanan Indonesia menyampaikan artikel dengan judul **POTENSI ANTIBAKTERI DARI MELANIN TINTA SOTONG DAN CUMI-CUMI TERHADAP E.coli SEBAGAI MODEL BAKTERI GRAM NEGATI** untuk diperbaiki sesuai format (terlampir). Kami berharap hasil perbaikan dari Ibu dapat dikirim kembali paling lambat tanggal 3 Agustus 2017, agar naskah Ibu dapat kami proses ke tahap selanjutnya.

Demikian kami sampaikan, atas perhatian dan kerja samanya kami ucapkan terima kasih.

Pemimpin Redaksi
Jurnal Pengolahan Hasil Perikanan Indonesia

Dr. Ir. Nurjanah, MS.
NIP. 19591031986012002



Yuspihana Fitriah <yuspihana@gmail.com>

Hasil evaluasi naskah

5 pesan

Jurnal Pengolahan <jurnalpengolahan@yahoo.com>
Balas Ke: Jurnal Pengolahan <jurnalpengolahan@yahoo.com>
Kepada: Yuspihana Fitriah <yuspihana@gmail.com>

13 Juli 2017 pukul 15.55

Kepada
Yth.
Dr. Yuspihana Fitriah, S.Pi, M.Si
Di Tempat

Dengan hormat,
Bersama ini Kami dari tim Jurnal Pengolahan Hasil Perikanan Indonesia menyampaikan artikel dengan judul **POTENSI ANTIBAKTERI DARI MELANIN TINTA SOTONG DAN CUMI-CUMI TERHADAP E.coli SEBAGAI MODEL BAKTERI GRAM NEGATI** untuk diperbaiki sesuai format (terlampir). Kami berharap hasil perbaikan dari Ibu dapat dikirim kembali paling lambat tanggal 18 Juli 2017, agar naskah Ibu dapat kami proses ke tahap selanjutnya.

demikian yang dapat kami sampaikan, atas perhatian dan kerjasama yang baik kami haturkan terima kasih




Hormat kami,

Rizsa Mustika Pertiwi

JURNAL PENGOLAHAN HASIL PERIKANAN INDONESIA

Dep. Teknologi Hasil Perairan, FPIK
Jln. Lingkar Akademik Kampus IPB
Dramaga Bogor 16680
Telp. 0251 8622915 faks. 0251 8622916
e-mail: buletin_thpipb@yahoo.com

3 lampiran

-  **164 Surat hasil evaluasi naskah yuspihana.doc**
52K
-  **KRITERIA PENILAIAN NASKAH ILMIAH yuspihana.doc**
45K
-  **Yuspihana tahap 3.docx**
243K

Jurnal Pengolahan <jurnalpengolahan@yahoo.com>
Balas Ke: Jurnal Pengolahan <jurnalpengolahan@yahoo.com>
Kepada: Yuspihana Fitriah <yuspihana@gmail.com>

25 Juli 2017 pukul 16.07

Assalamualaikum Ibu,
Bersama dengan ini kami ingin mengingatkan kembali naskah Ibu untuk segera dikirim ke Jurnal agar dapat kami proses ke tahap selanjutnya

demikian yang dapat kami sampaikan, atas perhatian dan kerjasama yang baik kami haturkan terima kasih

Hormat kami,

Rizsa Mustika Pertiwi

JURNAL PENGOLAHAN HASIL PERIKANAN INDONESIA

Dep. Teknologi Hasil Perairan, FPIK

Jln. Lingkar Akademik Kampus IPB

Dramaga Bogor 16680

Telp. 0251 8622915 faks. 0251 8622916

e-mail: buletin_thpipb@yahoo.com

[Kutipan teks disembunyikan]

Yuspihana Fitriah <yuspihana@gmail.com>

26 Juli 2017 pukul 01.12

Kepada: Jurnal Pengolahan <jurnalpengolahan@yahoo.com>

Kepada Yth.

Redaktur Jurnal Pengolahan Hasil Perikanan Indonesia
di Bogor

Bersama ini saya kirimkan hasil perbaikan naskah (terlampir). Sebelumnya saya meminta maaf atas keterlambatan ini karena ada data yang kami tambahkan dengan mempertimbangkan hasil koreksi dari reviewer. Kami juga memohon bantuan redaksi jika terjadi masalah "spasi" pada naskah ini yang disebabkan karena perbedaan program word yang kami digunakan.

Demikian yang bisa kami sampaikan, atas perhatiannya diucapkan terima kasih

Ttd

Yuspihana F

[Kutipan teks disembunyikan]



Yuspihana tahap 3 (1)revisi penulis.docx

191K

Jurnal Pengolahan <jurnalpengolahan@yahoo.com>

31 Juli 2017 pukul 10.24

Balas Ke: Jurnal Pengolahan <jurnalpengolahan@yahoo.com>

Kepada: Yuspihana Fitriah <yuspihana@gmail.com>

Kepada

Yth.

Dr. Yuspihana Fitriah, S.Pi, M.Si

Di Tempat

Dengan hormat,

Bersama ini Kami dari tim Jurnal Pengolahan Hasil Perikanan Indonesia menyampaikan artikel dengan judul **POTENSI ANTIBAKTERI DARI MELANIN TINTA SOTONG DAN CUMI-CUMI TERHADAP E.coli SEBAGAI MODEL BAKTERI GRAM NEGATI** untuk diperbaiki sesuai format (terlampir). Kami berharap hasil perbaikan dari Ibu dapat dikirim kembali paling lambat tanggal 3 Agustus 2017, agar naskah Ibu dapat kami proses ke tahap selanjutnya.

demikian yang dapat kami sampaikan, atas perhatian dan kerjasama yang baik kami haturkan terima kasih

Hormat kami,

Rizsa Mustika Pertiwi

JURNAL PENGOLAHAN HASIL PERIKANAN INDONESIA

Dep. Teknologi Hasil Perairan, FPIK

Jln. Lingkar Akademik Kampus IPB

Dramaga Bogor 16680

Telp. 0251 8622915 faks. 0251 8622916

e-mail: buletin_thpipb@yahoo.com

[Kutipan teks disembunyikan]

2 lampiran



Yuspihana tahap 6.docx

191K



174 Surat permohonan perbaikan naskah yuspihana.doc

52K

Yuspihana Fitriani <yuspihana@gmail.com>

4 Agustus 2017 pukul 14.57

Kepada: Jurnal Pengolahan <jurnalpengolahan@yahoo.com>

Kepada Yth.

Redaktur **JURNAL PENGOLAHAN HASIL PERIKANAN INDONESIA**

Dep. Teknologi Hasil Perairan, FPIK

Bersama ini saya lampirkan naskah hasil perbaikan. Terima kasih atas perhatian dan kerjasamanya.

TTD

Yuspihana F

[Kutipan teks disembunyikan]



Yuspihana tahap 6 (1)-revisi penulis.docx

195K



Yuspihana Fitriah <yuspihana@gmail.com>

Hasil evaluasi naskah

Yuspihana Fitriah <yuspihana@gmail.com>

4 Agustus 2017 pukul 14.57

Kepada: Jurnal Pengolahan <jurnalpengolahan@yahoo.com>

Kepada Yth.

Redaktur **JURNAL PENGOLAHAN HASIL PERIKANAN INDONESIA**

Dep. Teknologi Hasil Perairan, FPIK

Bersama ini saya lampirkan naskah hasil perbaikan. Terima kasih atas perhatian dan kerjasamanya.

TTD

Yuspihana F

[Kutipan teks disembunyikan]

**Yuspihana tahap 6 (1)-revisi penulis.docx**

195K



Yuspihana Fitriah <yuspihana@gmail.com>

Hasil Perbaikan

1 pesan

Yuspihana Fitriah <yuspihana@gmail.com>
Kepada: Jurnal THP <jphpi@apps.ipb.ac.id>
Cc: Yuspihana Fitriah <yuspihana@gmail.com>

12 Juni 2017 pukul 10.32

Kepada Yth.
Redaktur Jurnal PHPI

Bersama ini saya kirimkan hasil perbaikan dari naskah dengan judul **POTENSI ANTIBAKTERI DARI MELANIN TINTA SOTONG DAN CUMI-CUMI TERHADAP E.coli SEBAGAI MODEL BAKTERI GRAM NEGATIF.**

Sebelumnya saya minta maaf atas keterlambatan ini.



Yuspihana tahap 2-perbaikan.docx
260K



Yuspihana Fitriah <yuspihana@gmail.com>

naskah jurnal

2 pesan

Yuspihana Fitriah <yuspihana@gmail.com>
Kepada: jphpi@apps.ipb.ac.id
Cc: buletin_thpipb@yahoo.com

30 Mei 2017 pukul 12.23

Kepada Yth.
Redaktur Jurnal PHPI

Bersama ini saya kirimkan naskah jurnal dengan judul "Potensi antibakteri dari melanin tinta sotong dan cumi-cumi terhadap *E.coli* sebagai model bakteri gram negatif", untuk dapat diterbitkan pada Jurnal PHPI. Demikian yang dapat kami sampaikan, atas perhatian dan kerjasamanya diucapkan terima kasih .

Ttd
Dr. Yuspihana F, SPi, MSi**Naskah jurnal antimikroba-tinta cumi dan sotong-Yuspihana.docx**
242K

Jurnal Pengolahan <jurnalpengolahan@yahoo.com>
Balas Ke: Jurnal Pengolahan <jurnalpengolahan@yahoo.com>
Kepada: Yuspihana Fitriah <yuspihana@gmail.com>

31 Mei 2017 pukul 14.43

Kepada
Yth Dr. Yuspihana F, SPi, MSi
di Tempat

Bersama dengan ini kami lampirkan surat keterangan bahwa naskah dengan judul **POTENSI ANTIBAKTERI DARI MELANIN TINTA SOTONG DAN CUMI-CUMI TERHADAP *E.coli* SEBAGAI MODEL BAKTERI GRAM NEGATIF** yang ditulis **Yuspihana Fitriah dan Iin Khusnul Khotimah** telah diterima oleh Dewan Editor JPHPI dengan nomor naskah 074 dan sedang proses pengecekan oleh dewan editor.

demikian yang dapat kami sampaikan, atas perhatian dan kerjasama yang baik kami haturkan terima kasih

Hormat kami,

Rizsa Mustika Pertiwi

JURNAL PENGOLAHAN HASIL PERIKANAN INDONESIA

Dep. Teknologi Hasil Perairan, FPIK

Jln. Lingkar Akademik Kampus IPB

Dramaga Bogor 16680

Telp. 0251 8622915 faks. 0251 8622916

e-mail: buletin_thpipb@yahoo.com

[Kutipan teks disembunyikan]

 **008 yuspihana.doc**
58K



Yuspihana Fitriah <yuspihana@gmail.com>

Permohonan perbaikan naskah

Yuspihana Fitriah <yuspihana@gmail.com>
Kepada: Jurnal THP <jphpi@apps.ipb.ac.id>

12 Juni 2017 pukul 10.19

Kepada Yth.
Redaktur Jurnal PHPI

Bersama ini saya kirimkan hasil perbaikan dari naskah dengan judul **POTENSI ANTIBAKTERI DARI MELANIN TINTA SOTONG DAN CUMI-CUMI TERHADAP E.coli SEBAGAI MODEL BAKTERI GRAM NEGATIF.**

Sebelumnya saya minta maaf atas keterlambatan ini.

ttd
Yuspihana F

[Kutipan teks disembunyikan]



Yuspihana tahap 2-perbaikan.docx
260K

**POTENSI ANTIBAKTERI DARI MELANIN
TINTA SOTONG DAN CUMI-CUMI TERHADAP *E.coli* SEBAGAI
MODEL BAKTERI GRAM NEGATIF**
*Antibacterial Potency of melanin from cuttlefish and squid ink on E.coli as Gram Negative
Bacteria Model*

Yusphiana Fitriah*, dan Iin Khusnul Khotimah

Program Studi Teknologi Hasil Perikanan, Fakultas Perikanan dan Kelautan UNLAM

Jl. A.Yani Km 36 Kotak Pos 6 Banjarbaru 70714, Kalimantan Selatan

Telepon/Fax : 0511-4772124

*Korespondensi : yusphiana@gmail.com

Abstrak

Lingkungan laut terdiri atas banyak organisme yang diketahui memiliki senyawa bioaktif sebagai alat pertahanan diri atau untuk melindungi telur dan embrionya. Kelas Cephalopoda seperti misalnya cumi-cumi dan sotong terkenal karena pertahanan dirinya dengan cara mengeluarkan tinta. 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 0,5M secara mekanik. Selanjutnya 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. Sebagai pembanding, Tinta yang berasal dari *Sepia* sp. ataupun *Loligo* sp. juga diuji aktivitasnya terhadap *E. coli* sebagai pembanding. Hasil penelitian menunjukkan kedua melanin memiliki aktivitas menghambat pertumbuhan *E. coli*. Melanin dari *Sepia* sp pada konsentrasi 10 mg/ml dapat menghambat pertumbuhan *E. coli* mencapai 99,99% penghambatan relatif terhadap jumlah mikroba awal, sedangkan melanin dari *Loligo* sp pada 20 mg/ml. Tinta dari kedua jenis Cephalopoda tersebut pada konsentrasi yang sama dengan melanin, tidak menunjukkan adanya aktivitas penghambatan terhadap *E. coli*. Dapat disimpulkan bahwa melanin dari *Sepia* sp memiliki aktivitas antibakteri terhadap *E. coli* lebih tinggi dibandingkan melanin dari *Loligo* sp.

Kata kunci: aktivitas antibakteri, cumi-cumi, *E. coli*, melanin, sotong, tinta.

Abstract

Marine environment comprises of many organism which are known to possess bioactive compound as a common means of self-defense or for the protection of eggs and embryos. Cephalopods are notable for their defences, such as jetting escape movements, changes in colouration, toxic venom and inking. 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 result showed both melanin have antibacterial activity against *E. coli*. Melanin of *Sepia* sp could inhibit the growth of *E. coli* in 99.9% inhibition relative to the initial microbial count at a concentration of 10 mg/ml, while the melanin of *Loligo* sp at 20 mg/ml. The inks of both Cephalopods at the same concentration as melanin, did not show any inhibitory activity against *E. coli*. It can be concluded that the melanin of *Sepia* sp have a higher antibacterial activity than the melanin of *Loligo* sp.

Key words : antibacterial activity, cuttlefish, *E. coli*, melanin, squid.

Formatted: Font: (Default) Times New Roman

Formatted: Font: Bold

Formatted: Font: 11 pt

Formatted: Indent: First line: 1,27 cm

Formatted: Font: 11 pt

Formatted: Font: 11 pt

Formatted: Font: 11 pt

Formatted: Font: 11 pt

Formatted: Font: 11 pt

Formatted: Font: 11 pt

Formatted: Font: 11 pt

Formatted: Font: 11 pt

Formatted: Font: 11 pt

Formatted: Font: 11 pt

Formatted: Font: 10 pt

Formatted: Font: Bold

Formatted: Font: 10 pt

Formatted: Font: 9 pt

Formatted: Font: 10 pt

Formatted: Font: 10 pt, Indonesian

PENDAHULUAN

Kelas Cephalopoda seperti sotong (*Sepia sp.*) dan cumi-cumi (*Loligo sp.*) merupakan komoditi hasil tangkapan perikanan laut yang pemanfaatannya masih sangat terbatas. Sebagian besar hasil tangkapan cumi-cumi ini hanya diolah menjadi cumi-cumi asin, sementara untuk sotong hanya dikonsumsi dalam bentuk segar. Tintanya, cumi-cumi dan sotong- di daerah Kalimantan Selatan dibuang atau tidak dimanfaatkan sebagai bagian dari olahan cumi-cumi.

Beberapa hasil penelitian menjelaskan bahwa baik 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. Selain itu, 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).

Selain itu, melanin dari tinta cumi-cumi mempunyai aktivitas anti-tumor dengan menghambat aktivitas plasmin untuk meningkatkan thromboxan dan meningkatkan sistem imun untuk membunuh sel kanker (Takaya dan Uchiswa 1994). Melanin juga dapat berperan sebagai anti-tumor (Sasaki *et al.* 1997), antioksidan (Lei *et al.* 2007), anti-radiasi (Lei *et al.* 2007), anti-rotavirus (Rajaganapathi *et al.* 2007) dan antibakteri (Sadok *et al.* 2004).

Adanya efek sitotoksik dari melanin tinta cumi-cumi, diduga akan berpengaruh pula terhadap pertumbuhan mikroba seperti *E.coli*. *E. coli* merupakan bakteri gram negatif, bersifat patogen bagi manusia dan umumnya bukan merupakan bakteri indigenus 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).

Berdasarkan hal tersebut maka pada penelitian ini dilakukan isolasi dan purifikasi terhadap melanin pada tinta cumi-cumi dan sotong yang selanjutnya diuji aktivitasnya terhadap pertumbuhan *E.coli*. Informasi ini sangat penting untuk penelitian selanjutnya jika tinta cumi-cumi atau sotong akan dijadikan sebagai bahan pengawet alami pada produk hasil 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

Commented [i-1]: Gunakan spasi 2

Commented [i-2]: Gunakan kalimat SPOK dan EYD

Commented [i-3]: Pustaka 10 tahun terakhir

Commented [i-4]: Bukan subjek

Formatted: Highlight

Formatted: Indonesian

yang digunakan antara lain HCl 0,5M (Merck), aseton (Merck), akuades, *Nutrient Broth* (NB)(Merck), *Nutrient Agar* (NA) (Merck), EMBA (Merck), *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, *laminar flow*, inkubator, *coloni counter*, *incubator shaker*, dan peralatan gelas lainnya.

Commented [1-5]: Cantumkan spek alat.

Metode Penelitian

Tahapan penelitian yang dilakukan meliputi isolasi *E.coli* dari daging ikan yang busuk, analisis rendemen tinta, isolasi dan purifikasi melanin dari tinta, dan pengujian aktivitas melanin terhadap pertumbuhan bakteri uji yaitu *E.coli*.

Isolasi *E.coli* dari daging ikan yang busuk

Daging ikan yang busuk dilarutkan dalam larutan garam fisiologis 0,85% dengan perbandingan 1: 10. Sebanyak 1 ml larutan daging tersebut di tumbuhkan dalam media EMB (*Eosin Methylene Blue*) Agar. 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 *Enterbacter aerogenes* (koloni berukuran besar, berwarna merah jambu). Methylene Blue secara selektif menghambat gram positif, sehingga yang dapat tumbuh di media tersebut hanya gram negatif.

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 (+), H₂S(-), glukosa (+), manitol (+), xilosa (+), ONPG (+), Indol(+), urease (-), V-P (-), citrate (-), dan TDA (-). Hasil identifikasi menunjukkan *Escherichia coli* (96,39%).

Isolasi dan purifikasi melanin dari tinta cumi-cumi.

Isolasi dan purifikasi melanin pada tinta cumi-cumi dan sotong dilakuan menurut metode Magarelli *et al.* (2010). Tahapan ekstraksi dan purifikasi dilakukan dalam media asam. Tinta diambil habis dari kantong tinta segar, sebanyak 50 g ditambahkan 100 ml HCl 0,5M dalam kondisi kedap cahaya. Larutan diaduk dengan menggunakan *magnetic stirrer* selama 30 menit, selanjutnya di simpan selama 24 jam pada suhu 10°C. Endapan dipisahkan dari supernatan dengan menggunakan sentrifus (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. Selanjutnya dilakukan

liofilisasi selama kurang lebih 24 jam untuk memisahkan pelarut. Diperoleh melanin kering dan di simpan dalam *freezer* sebelum dilakukan pengujian lebih lanjut.

Pada perlakuan tinta (kontrol), tinta diambil dari kantong tinta, dilakukan liofilisasi dengan freezedryer seperti sampel melanin.

Pengujian aktivitas melanin terhadap mikroba uji

Pengujian aktivitas melanin dilakukan dengan metode kontak langsung antara melanin dengan bakteri uji dalam media cair *nutrient broth* (NB). Dibuat seri pengujian di dalam tabung kecil berisi NB. Bakteri uji dipersiapkan yang telah disegarkan dan diinkubasi 24 jam (10^6 - 10^7 CFU/ ml) pada 37°C, lalu diencerkan 10 kali. Ke dalam masing-masing tabung uji tersebut diinokulasikan dengan 30 µL suspensi bakteri uji, dikocok dengan alat vortex selama 1-2 menit, kemudian diinkubasi pada inkubator shaker suhu 37°C selama 24 jam. Perhitungan jumlah bakteri dilakukan dengan metode hitungan cawan (TPC, *Total Plate Count*).

Prosentase penghambatan bakteri ditentukan dengan modifikasi metode Cappaso *et al.*(1995) yang dinyatakan : $100 - (Nt \times 100/No)$, dimana 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 akan tetapi pengamatan dilakukan per tiga jam selama 24 jam.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Analisis 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). Selain ukuran kantong, banyaknya 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 dapat dilihat pada Tabel 1. Berdasarkan hasil analisis rendemen terlihat bahwa jenis *Sepia* memiliki rendemen tinta yang lebih besar (2,3%) dibandingkan tinta dari jenis *Loligo* (0,5%).

Commented [i-6]: Perhatikan pada seluruh isi naskah

Formatted: Indonesian

Menurut Nair *et al.*(2011) tinta Sepia terdiri atas granula melanin dalam media yang kental tak berwarna. Pigmen melanin diolah dalam sel *mature* kelenjar tinta, terutama pada bagian dasar kantong tinta yang memproduksi tinta terus-menerus. Pada akhir proses pematangan, sel-sel kelenjar tinta menyimpannya dalam kantong tinta yang berperan sebagai penampung. Setiap kantong tinta Sepia mengandung ~ 1 g melanin (Proto *et al.* 1981), 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 100-200nm (Mboniryivuze *et al.*2015)

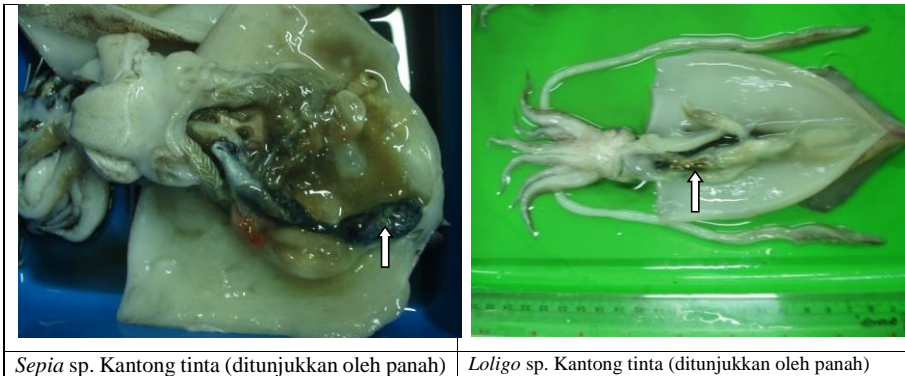
Berdasarkan hasil pengamatan, tinta *Loligo* sp memiliki tekstur yang halus, sedangkan tinta *Sepia* sp memiliki tekstur yang kasar.

Tabel 1. Analisis rendemen tinta cumi-cumi dan sotong

	<i>Loligo</i> sp		<i>Sepia</i> sp	
	Berat utuh per ekor (g)	Berat kantong tinta (g)	Berat utuh per ekor (g)	Berat kantong tinta (g)
Rata-rata	116,6±40,36	0,6±0,1	173,0±19,6	4,0±1,4
Rendemen tinta terhadap berat utuh (% , b/b)	0,5		2,3	

Formatted: Highlight

Formatted: Centered



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.

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 2. Berdasarkan Tabel 2 terlihat semakin tinggi konsentrasi melanin aktivitas penghambatannya juga semakin besar. Melanin *Sepia* 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 mengakibatkan sel bakteri beradaptasi terhadap melanin, hingga 24 jam inkubasi tidak terjadi peningkatan yang berarti pada jumlah sel bakteri. Pada konsentrasi tersebut hanya memperpanjang fase adaptasi tetapi tidak menyebabkan kematian pada sel bakteri.

Pada konsentrasi yang lebih tinggi yaitu 0,010 g/ml, melanin mampu membunuh bakteri sehingga setelah inkubasi 24 hanya ada 1 sel yang hidup (penghambatan mencapai 99,99%). Pada Tabel 2 terlihat *E.coli* lebih sensitif terhadap melanin dari *Sepia* sp dibandingkan dengan dari *Loligo* sp.

Tabel 2. 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>					
Tinta	0	8,6x10 ⁵	1,6 x 10 ¹⁰	-	-4,27
	0,013	8,6x10 ⁵	6,2 x 10 ⁹	-	-3,86
	0,017	8,6x10 ⁵	5,6 x 10 ⁹	-	-3,81
	0,020	8,6x10 ⁵	4,4 x 10 ⁹	-	-3,71
Melanin	0,002	8,6x10 ⁵	1,2x10 ¹⁰	-	-5,14
	0,006	8,6x10 ⁵	6,0x10 ⁵	30,23	0,16
	0,010	8,6x10 ⁵	1x10 ⁰	99,99	5,93
<i>Loligo sp</i>					
Tinta	0	8,6x10 ⁵	3,1 x 10 ¹⁰	-	-4,56
	0,013	8,6x10 ⁵	8,6 x 10 ⁹	-	-4,00
	0,017	8,6x10 ⁵	2,3 x 10 ⁹	-	-3,43
	0,020	8,6x10 ⁵	1,0 x 10 ⁹	-	-3,06
Melanin	0,013	8,6x10 ⁵	2,1x10 ⁴	97,56	1,61
	0,017	8,6x10 ⁵	2,1x10 ³	99,76	2,61
	0,020	8,6x10 ⁵	1,4x10 ²	99,87	3,79

Keterangan : (-) nilainya negatif

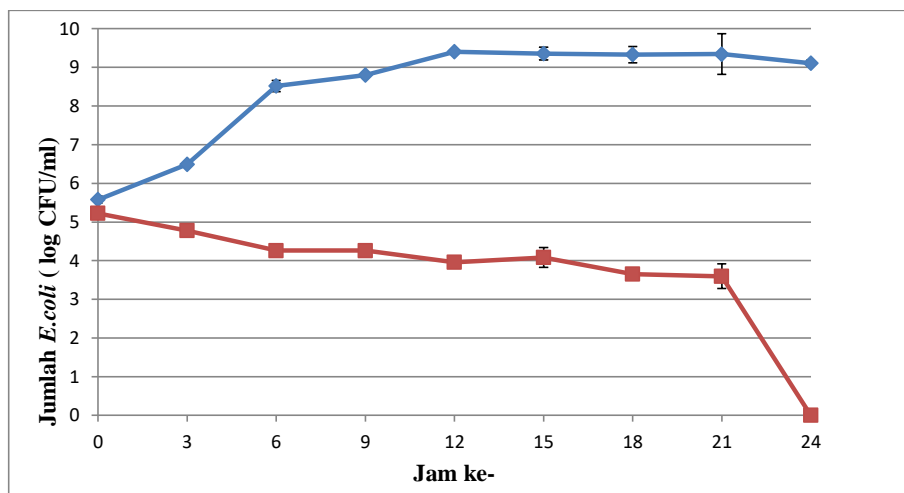
Pada tinta, baik *Sepia* maupun *Loligo* pada konsentrasi yang sama dengan melanin tidak memiliki aktivitas penghambatan terhadap *E.coli*. Hal ini disebabkan karena tinta tidak hanya terdiri atas melanin, melainkan ada komponen lain seperti protein, lemak dan glikosaminoglikan yang diduga tidak memiliki aktivitas penghambatan terhadap *E.coli*.

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

Aktivitas melanin dari *sepia* terhadap pertumbuhan *E.coli* dapat dilihat pada Gambar 2. Pada Gambar 2, pertumbuhan *E.coli* yang diberi perlakuan melanin dari *Sepia sp* sebesar 10 mg/ml terlihat jumlah koloninya yang hidup mengalami penurunan lebih dari 1 log₁₀ setelah 6 jam inkubasi dan penurunan tersebut terus berlanjut hingga 2 log₁₀ 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. Hal ini menunjukkan bahwa selain memperpanjang fase adaptasi, melanin juga mempercepat fase kematian pada sel bakteri.

Sebaliknya, pada pertumbuhan *E.coli* tanpa perlakuan melanin terjadi peningkatan jumlah koloni yang hidup lebih dari 4 log₁₀ (dari 10⁵ menjadi 10⁹). 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 log₁₀, dan terus meningkat hingga jam ke-12 walaupun hanya sedikit terjadi penambahan populasi (kurang dari 1 log₁₀). Pertumbuhan memasuki fase stasioner setelah jam ke-12 hingga jam ke-24.



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

Melanin, merupakan tirosinase yang telah diidentifikasi terdapat di dalam tinta cumi-cumi (Fiore *et al.* 2004). 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).

Pengikatan ion logam oleh melanin adalah pada gugus hidroksil fenolik (OH), karboksil (COOH) dan grup amina (NH) dari melanin (Chen *et al.* 2009). Meskipun demikian, kemampuan mengikat dari masing-masing gugus fungsi tersebut berbeda-beda terhadap logam. Hasil penelitian Chen *et al.* (2009) menunjukkan gugus hidroksil fenolik dan amina dari melanin *Ommastrephes bartrami* (jenis cumi-cumi) memiliki kemampuan mengikat lebih besar terhadap Cd(II) dibandingkan gugus karboksil. Sebaliknya, gugus karboksil dari melanin tersebut lebih besar kemampuannya mengikat Pb(II) dibandingkan gugus hidroksil fenolik dan amina. Diduga, komposisi masing-masing gugus aktif penyusun melanin antara melanin dari *Sepia* sp berbeda dengan melanin dari *Loligo* sp. Hal ini mengakibatkan melanin keduanya memiliki aktivitas yang berbeda terhadap *E.coli*.

Penelitian Vasantharaja *et al.* (2014) terhadap ekstrak metanol tinta *Sepiella inermis* dg 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 seperti *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.

Pada sel bakteri, logam seperti Ca^{++} dan Mg^{++} berperan penting pada membran luar sel bakteri gram negatif. Membran luar sel bakteri terdiri atas lapisan lipopolisakarida (LPS) yang terikat satu sama lain dengan Ca^{++} dan Mg^{++} . Menurut Voss (1967) kation divalent ini berfungsi sebagai jembatan garam yang mengikat makromolekul pada permukaan dinding sel bakteri gram negatif. 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. Voss (1967) menambahkan agen pengkelat dan kation organik bertindak bersama untuk menyebabkannya kerusakan pada dinding sel bakteri gram-negatif yang tidak mematikan dengan cara menghancurkan jembatan garam dan dengan formasi garam dengan polimer anionik (seperti lipoprotein, lipopolisakarida) pada permukaan sel. Kerusakan pada penyusun dinding sel menyebabkan dinding sel lebih permeabel terhadap senyawa lain, yang kemudian mampu menembus ke bagian dalam sel. Berpenetrasinya senyawa antimikroba mengakibatkan disorganisasi pada membran sitoplasma dan mengakibatkan kematian pada organism tersebut.

Pada penelitiannya, Sahalan *et al.* (2013) menjelaskan ion Ca^{++} dan Mg^{++} berperan melindungi membran terluar pada sel bakteri terhadap Polymyxin B yang berinteraksi dengan

kation divalent, dengan mengganti kation dari tempat pengikatannya di lipopolisakarida (LPS) molekul. 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^{++} telah terbukti lebih efektif dalam melindungi sel bakteri dibandingkan Mg^{++} .

KESIMPULAN

Kesimpulan yang dapat diambil dari penelitian ini adalah:

1. Melanin dari tinta sotong (*Sepia* sp) memiliki aktivitas penghambatan terhadap *E.coli* yang lebih tinggi dibandingkan melanin dari cumi-cumi (*Loligo* sp).
2. Pada konsentrasi yang sama dengan melanin, tinta yang berasal dari sotong maupun cumi-cumi, tidak memiliki aktivitas penghambatan terhadap *E.coli*.

UCAPAN TERIMA KASIH

Ucapan terima kasih disampaikan kepada DIKTI atas bantuan dana penelitian melalui hibah Fundamental tahun anggaran 2016/2017.

DAFTAR PUSTAKA

- Arias C. 2009. Chilled and Frozen Raw Fish. Di dalam: Fernandes R (editor) Microbiology Handbook Fish and Seafood. United Kingdom: Leatherhead Food International Ltd.
- Cappaso R, Evidente A, Schivo L, Orru G, Marcialis MA, Cristinzio G. 1995. Antibacterial polyphenols from olive oil mill waste waters. *J. Appl. Bacteriol.* 79 :393-398.
- Chen S, Xue C, Wang J, Feng H, Wang Y, Ma Q, and Wang D. 2009. Adsorption of Pb(II) and Cd(II) by Squid *Ommastrephes bartrami* Melanin. *Bioinorganic Chemistry and Applications*: 7
- Dave D and Ghaly AE. 2011. Meat spoilage mechanisms and preservation techniques: a critical review. *American Journal of Agricultural and Biological Sciences* 6(4):486-510
- Fiore G, Poli A, Cosmo AD, d'Ischia M and Palumbo A. 2004. Dopamine in the ink defence system of *Sepia officinalis*: biosynthesis, vesicular compartmentation in mature ink gland cells, nitric oxide (NO)/cGMP-induced depletion and fate in secreted ink1. *Biochem. J.* 378: 785–791.
- Lei M, Wang JF, Pang L, Wang YM, Chen SG, Xue CH. 2007. Effects of sepia on the metabolism of blood lipid and antioxidant ability in hyperlipidemia rats. *Chin. J. Mar. Drugs* 3: 30-33.

Commented [i-7]: Tidak berpoint

Formatted: Indent: Left: 0,48 cm, No bullets or numbering

Commented [i-8]: Jurnal yang digunakan 10 tahun terakhir, kecuali metode diperbolehkan lebih

Commented [i-9]: Nama jurnal ditulis lengkap

- Lei M, Wang JF, Wang YM, Pang L, Wang Y, Xu W, Xue CH. 2007. Study of the radio-protective effect of cuttlefish ink on hemopoietic injury. *Asia Pac. J. Clin. Nutr.* 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. *J Food Sci.* 73(8): 207-11.
- Margarelli M, Passamonti P and Renieri C. 2010. Purification, characterization and analysis of sepia melanin from commercial sepia ink (*Sepia officinalis*). *Revista CES Medicina Veterinaria y Zootecnia*, 5(2) :18-28.
- Mbonyiryivuze 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 : Sekolah Pasca Sarjana, IPB.
- Nair JR, Pillai D, Joseph SM, Gomathi P, Senan PV, and Sherief PM. 2011. Cephalopod research and bioactive substances. *Indian J. Geo-Marine Sciences* 40(1): 13-27.
- Neifar A, Rebah FB, Gargouri AF and 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.
- Okuzumi M and Fujii T. 2000. Nutritional and Functional Properties of Squid and Cuttlefish. National Cooperative Association of Squid Processors. Jepang.
- Prota G, Ortonne JP, Voulot C, Khatchadourian C, Mardi G, Palumbo A. 1981. Occurrence and properties of tyrosinase in the ejected ink of cephalopods. *Comp. Biochem. Physiol. B* 68 :415-419.
- Rajaganapathi J, Thyagarajam SP, Edward JK. 2000. Study on cephalopod's ink for anti-retroviral activity. *Indian J. Exp. Biol.* 38: 519-520.
- Sadok S, Abdelmouleh A and Abed AE. 2004. Combined effect of sepia soaking and temperature on the shelf life of peeled shrimp *Penaeus kerathurus*. *Food Chemistry* 88: 115-122
- Sahalan AZ, Aziz AHA, Lian H & Ghani MKA. 2013. Divalent Cations (Mg²⁺, Ca²⁺) Protect Bacterial Outer Membrane Damage by Polymyxin B. *Sains Malaysiana* 42(3): 301-306.
- Sasaki J, Ishita K, Takaya Y, Uchiswa H, Matsue H. 1997. Antitumor activity of squid ink. *J. Nutr.Sci. Vitaminol.* 43:455-461.
- Takaya Y, Uchiswa H. 1994. An investigation of the antitumor peptodoglycan fraction from squid ink. *Biol. Pharm. Bull.* 17 :846-851.

- Vasantharaja D, Ravitchandirane V and Anandan V. 2014. Anti-microbial activity and spectro-chemical investigation of ink extracts of *Sepiella inermis* (Van Hasselt 1835). *Not Sci Biol.* 6(3):273-275
- Voss, J.G. 1967. Effects of Organic Cations on the Gram-negative Cell Wall and Their Bactericidal Activity with Ethylenediaminetetra-acetate and Surface Active Agents . *J. gen. Microbiol.* 48: 391-400
- 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.
- Zhong JP, Wang G, Shang JH, Pan JQ, Li K, Huang Y and Liu HZ. 2009. Protective Effects of Squid Ink Extract Towards Hemopoietic Injuries Induced by Cyclophosphamine. *Mar. Drugs* 7 : 9-18

POTENSI ANTIBAKTERI DARI MELANIN TINTA SOTONG DAN CUMI-CUMI TERHADAP *E.coli* SEBAGAI MODEL BAKTERI GRAM NEGATIF

Antibacterial Potency of melanin from cuttlefish and squid ink on E.coli as Gram Negative Bacteria Model

Yusphiana Fitriah*, dan Iin Khusnul Khotimah

Program Studi Teknologi Hasil Perikanan, Fakultas Perikanan dan Kelautan UNLAM

Jl. A.Yani Km 36 Kotak Pos 6 Banjarbaru 70714, Kalimantan Selatan

Telepon/Fax : 0511-4772124

*Korespondensi : yusphiana@gmail.com

Abstrak

Lingkungan laut terdiri atas banyak organisme yang diketahui memiliki senyawa bioaktif sebagai alat pertahanan diri atau untuk melindungi telur dan embrionya. Kelas Cephalopoda seperti cumi-cumi dan sotong terkenal karena pertahanan dirinya dengan cara mengeluarkan tinta. Penelitian ini bertujuan untuk membandingkan aktivitas antibakteri melanin dari tinta sotong (*Sepia* sp.) dengan tinta cumi-cumi (*Loligo* sp.) terhadap *E. coli*. Ekstraksi dan pemurnian terhadap tinta sotong dan cumi-cumi dilakukan untuk mendapatkan melanin dengan menggunakan HCl 0,5M secara mekanik. Selanjutnya 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 terhadap *E. coli*. Hasil penelitian menunjukkan kedua melanin memiliki aktivitas menghambat pertumbuhan *E. coli*. Melanin dari *Sepia* sp. pada konsentrasi 10 mg/ml dapat menghambat pertumbuhan *E. coli* mencapai 99,99% penghambatan relatif terhadap jumlah mikroba awal, sedangkan melanin dari *Loligo* sp. pada 20 mg/ml. Tinta dari kedua jenis Cephalopoda tersebut pada konsentrasi yang sama dengan melanin, tidak menunjukkan adanya aktivitas penghambatan terhadap *E. coli*. Dapat disimpulkan bahwa melanin dari *Sepia* sp. memiliki aktivitas antibakteri terhadap *E. coli* lebih tinggi dibandingkan melanin dari *Loligo* sp.

Kata kunci: aktivitas antibakteri, cumi-cumi, *E. coli*, melanin, sotong, tinta.

Abstract

Marine environment comprises of many organism which are known to possess bioactive compound as a common means of self-defense or for the protection of eggs and embryos. Cephalopods are notable for their defences, such as jetting escape movements, changes in colouration, toxic venom and inking. 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 result showed both melanin have antibacterial activity against *E. coli*. Melanin of *Sepia* sp could inhibit the growth of *E. coli* in 99.9% inhibition relative to the initial microbial count at a concentration of 10 mg/ml, while the melanin of *Loligo* sp at 20 mg/ml. The inks of both Cephalopods at the same concentration as melanin, did not show any inhibitory activity against *E. coli*. It can be concluded that the melanin of *Sepia* sp have a higher antibacterial activity than the melanin of *Loligo* sp.

Key words: antibacterial activity, cuttlefish, *E. coli*, melanin, squid.

Formatted: Font: (Default) Times New Roman

Formatted: Font: (Default) Times New Roman

Formatted: Font: Bold

Formatted: Font: 11 pt

Formatted: Indent: First line: 1,27 cm

Formatted: Font: 11 pt

Formatted: Font: 11 pt

Formatted: Font: 11 pt

Formatted: Font: 11 pt

Formatted: Font: 11 pt

Formatted: Font: 11 pt

Formatted: Font: 11 pt

Formatted: Font: 11 pt

Formatted: Font: 11 pt

Formatted: Font: 10 pt

Formatted: Font: 10 pt

Formatted: Font: Bold

Formatted: Font: 10 pt

Formatted: Font: 10 pt

Formatted: Font: 10 pt, Not Bold

Formatted: Font: 10 pt

PENDAHULUAN

Kelas Cephalopoda seperti sotong (*Sepia sp.*) dan cumi-cumi (*Loligo sp.*) merupakan komoditi hasil tangkapan perikanan laut yang pemanfaatannya masih sangat terbatas. Sebagian besar hasil tangkapan cumi-cumi ini hanya diolah menjadi cumi-cumi asin, sementara untuk sotong hanya dikonsumsi dalam bentuk segar. Tintanya, cumi-cumi dan sotong di daerah Kalimantan Selatan dibuang atau tidak dimanfaatkan sebagai bagian dari olahan cumi-cumi.

Beberapa hasil penelitian menjelaskan bahwa baik 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. Selain itu, 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).

Selain itu, melanin dari tinta cumi-cumi mempunyai aktivitas anti-tumor dengan menghambat aktivitas plasmin untuk meningkatkan thromboxan dan meningkatkan sistem imun untuk membunuh sel kanker (Takaya dan Uehiswa 1994). Melanin juga dapat berperan sebagai anti-tumor (Sasaki *et al.* 1997), antioksidan (Lei *et al.* 2007), anti-radiasi (Lei *et al.* 2007), antirotavirus (Rajaganapathi *et al.* 2007) dan antibakteri (Sadok-Nair *et al.* 2011).

Adanya efek sitotoksik dari melanin tinta cumi-cumi, diduga akan berpengaruh pula terhadap pertumbuhan mikroba seperti *E.coli*. *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). Berdasarkan hal tersebut maka pada penelitian ini dilakukan isolasi dan purifikasi terhadap melanin pada tinta cumi-cumi dan sotong yang selanjutnya diuji aktivitasnya terhadap pertumbuhan *E.coli*. Informasi ini sangat penting untuk penelitian selanjutnya jika tinta cumi-cumi atau sotong akan dijadikan sebagai bahan pengawet alami pada produk hasil perikanan.

BAHAN DAN METODE

Bahan dan Alat

Formatted: Font: 10 pt, Indonesian

Commented [i-1]: Gunakan spasi 2

Formatted: Space After: 0 pt, Line spacing: Double

Commented [i-2]: Gunakan kalimat SPOK dan EYD

Commented [i-3]: Pustaka 10 tahun terakhir

Commented [i-4]: Bukan subjek

Formatted: Highlight

Formatted: Indent: First line: 0 cm

Formatted: Space Before: 12 pt, After: 0 pt, Line spacing: Double

Formatted: Space After: 0 pt, Line spacing: Double

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), *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~~ inkubator (Memmert), *colony counter* (Quebec), *incubator shaker* (Wisd), dan peralatan gelas lainnya.

Formatted: Font: Italic

Commented [i-5]: Cantumkan spek alat.

Formatted: Font: Not Italic

Metode Penelitian

Tahapan penelitian yang dilakukan meliputi isolasi *E.coli* dari daging ikan yang busuk, analisis rendemen tinta, isolasi dan purifikasi melanin dari tinta, dan pengujian aktivitas melanin terhadap pertumbuhan bakteri uji yaitu *E.coli*.

Isolasi *E.coli* dari daging ikan yang busuk

Daging ikan yang busuk dilarutkan dalam larutan garam fisiologis 0,85% dengan perbandingan 1: 10. Sebanyak 1 ml larutan daging tersebut di tumbuhkan dalam media EMB (*Eosin Methylene Blue*) Agar. 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 *Enterbacter aerogenes* (koloni berukuran besar, berwarna merah jambu). Methylene Blue secara selektif menghambat gram positif, sehingga yang dapat tumbuh di media tersebut hanya gram negatif.

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 (+), H₂S(-), glukosa (+), manitol (+), xilosa (+), ONPG (+), Indol(+), urease (-), V-P (-), citrate (-), dan TDA (-). Hasil identifikasi menunjukkan *Escherichia coli* (96,39%).

Isolasi dan purifikasi melanin dari tinta cumi-cumi.

Isolasi dan purifikasi melanin pada tinta cumi-cumi dan sotong dilakukan menurut metode Magarelli *et al.* (2010). Tahapan ekstraksi dan purifikasi dilakukan dalam media asam. Tinta diambil habis dari kantong tinta segar, sebanyak 50 g ditambahkan 100 ml HCl 0,5M dalam kondisi kedap cahaya. Larutan diaduk dengan menggunakan *magnetic stirrer* selama 30 menit, selanjutnya di simpan selama 24 jam pada suhu 10°C. Endapan dipisahkan dari

supernatan dengan menggunakan sentrifus (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. Selanjutnya dilakukan liofilisasi selama kurang lebih 24 jam untuk memisahkan pelarut. Diperoleh melanin kering dan di simpan dalam *freezer* sebelum dilakukan pengujian lebih lanjut.

Pada perlakuan tinta (kontrol), tinta diambil dari kantong tinta, dilakukan liofilisasi dengan freezedryer seperti sampel melanin.

Pengujian aktivitas melanin terhadap mikroba uji

Pengujian aktivitas melanin dilakukan dengan metode kontak langsung antara melanin dengan bakteri uji dalam media cair *nutrient broth* (NB)(modifikasi Murhadi (2002)). Dibuat seri pengujian di dalam tabung kecil berisi NB. Bakteri uji dipersiapkan yang telah disegarkan dan diinkubasi 24 jam (10^6 - 10^7 CFU/ ml) pada 37°C, lalu diencerkan 10 kali. Ke dalam masing-masing tabung uji tersebut diinokulasikan dengan 30 µL suspensi bakteri uji, dikocok dengan alat vortex selama 1-2 menit, kemudian diinkubasi pada inkubator shaker suhu 37°C selama 24 jam. Perhitungan jumlah bakteri dilakukan dengan metode hitungan cawan (TPC, *Total Plate Count*).

Prosentase penghambatan bakteri ditentukan dengan modifikasi metode Cappaso *et al.*(1995) yang dinyatakan : $100 - (Nt \times 100/No)$, dimana 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 akan tetapi pengamatan dilakukan per tiga jam selama 24 jam.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Analisis 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). Selain ukuran kantong, banyaknya 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

Commented [i-6]: Perhatikan pada seluruh isi naskah

Formatted: Indonesian

kantong (berisi tinta) terhadap berat badan per ekor yang dihasilkan oleh kedua sampel dapat dilihat pada Tabel 1. Berdasarkan hasil analisis rendemen terlihat bahwa jenis *Sepia* memiliki rendemen tinta yang lebih besar (2,3%) dibandingkan tinta dari jenis *Loligo* (0,5%).

Menurut Nair *et al.* (2011) tinta *Sepia* terdiri atas granula melanin dalam media yang kental tak berwarna. Pigmen melanin diolah dalam sel *mature* kelenjar tinta, terutama pada bagian dasar kantong tinta yang terus- menerus memproduksi tinta ~~terus- menerus~~. Pada akhir proses pematangan, sel-sel kelenjar tinta menyimpannya dalam kantong tinta yang berperan sebagai penampung. Setiap kantung tinta *Sepia* mengandung ~ 1 g melanin (Prata *et al.* 1981 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 100-200nm (Mboniryivuze *et al.* 2015). Pada cumi-cumi, ukuran butiran bola melanin berkisar antara 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.

Tabel 1. Analisis rendemen tinta cumi-cumi dan sotong

	<i>Loligo</i> sp		<i>Sepia</i> sp	
	Berat utuh per ekor (g)	Berat kantong tinta (g)	Berat utuh per ekor (g)	Berat kantong tinta (g)
Rata-rata	116,6±40,36	0,6±0,1	173,0±19,6	4,0±1,4
Rendemen tinta terhadap berat utuh (% , b/b)	0,5		2,3	

Formatted: Highlight

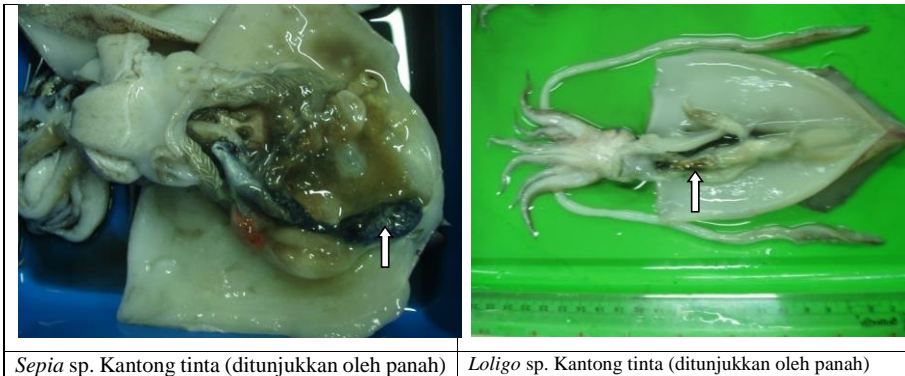
Formatted: Highlight

Formatted: Font: Italic

Formatted Table

Formatted Table

Formatted: Centered, Space After: 0 pt, Line spacing: single



Gambar 1. Jenis chepalopodadan 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.

Aktivitas Melanin Tinta *Sepiasp* dan *Loligosp*

Pengaruh tinta dan melanin dari *Sepia* sp dan *Loligosp* pada beberapa konsentrasi terhadap pertumbuhan *E.coli* dapat dilihat pada Tabel 2. Berdasarkan Tabel 2 terlihat semakin tinggi konsentrasi melanin aktivitas penghambatannya juga semakin besar. Melanin *Sepia* 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 mengakibatkan sel bakteri beradaptasi terhadap melanin, hingga 24 jam inkubasi tidak terjadi peningkatan yang berarti pada jumlah sel bakteri. Pada konsentrasi tersebut hanya memperpanjang fase adaptasi tetapi tidak menyebabkan kematian pada sel bakteri.

Pada konsentrasi yang lebih tinggi yaitu 0,010 g/ml, melanin mampu membunuh bakteri sehingga setelah inkubasi 24 hanya ada 1 sel yang hidup (penghambatan mencapai 99,99%). Pada Tabel 2 terlihat *E.coli* lebih sensitif terhadap melanin dari *Sepia* sp dibandingkan dengan dari *Loligo* sp.

Tabel 2. 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>					
Tinta	0	8,6x10 ⁵	1,6 x 10 ¹⁰	-	-4,27
	0,013	8,6x10 ⁵	6,2 x 10 ⁹	-	-3,86
	0,017	8,6x10 ⁵	5,6 x 10 ⁹	-	-3,81
	0,020	8,6x10 ⁵	4,4 x 10 ⁹	-	-3,71
Melanin	0,002	8,6x10 ⁵	1,2x10 ¹⁰	-	-5,14
	0,006	8,6x10 ⁵	6,0x10 ⁵	30,23	0,16
	0,010	8,6x10 ⁵	1x10 ⁰	99,99	5,93
<i>Loligo sp</i>					
Tinta	0	8,6x10 ⁵	3,1 x 10 ¹⁰	-	-4,56
	0,013	8,6x10 ⁵	8,6 x 10 ⁹	-	-4,00
	0,017	8,6x10 ⁵	2,3 x 10 ⁹	-	-3,43
	0,020	8,6x10 ⁵	1,0 x 10 ⁹	-	-3,06
Melanin	0,013	8,6x10 ⁵	2,1x10 ⁴	97,56	1,61
	0,017	8,6x10 ⁵	2,1x10 ³	99,76	2,61
	0,020	8,6x10 ⁵	1,4x10 ²	99,87	3,79

Keterangan : (-) nilainya negatif

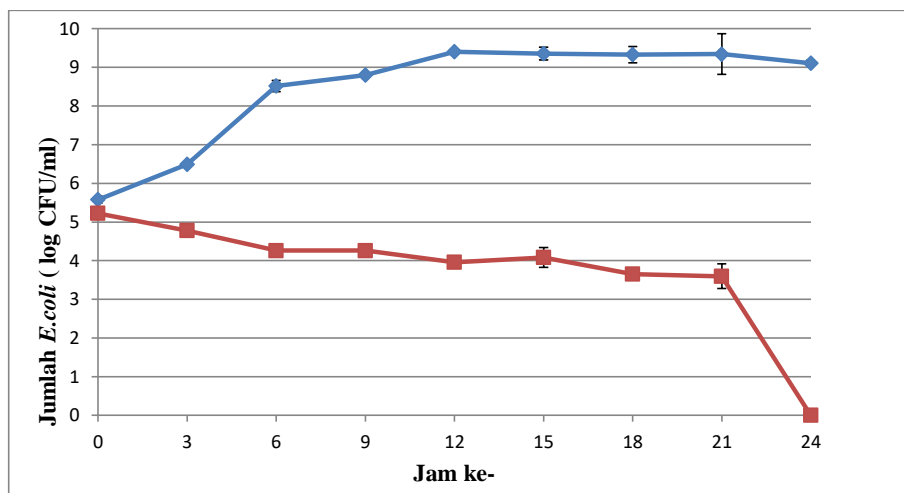
Pada tinta, baik *Sepia* maupun *Loligo* pada konsentrasi yang sama dengan melanin tidak memiliki aktivitas penghambatan terhadap *E.coli*. Hal ini disebabkan karena tinta tidak hanya terdiri atas melanin, melainkan ada komponen lain seperti protein, lemak dan glikosaminoglikan yang diduga tidak memiliki aktivitas penghambatan terhadap *E.coli*.

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

Aktivitas melanin dari *sepia* terhadap pertumbuhan *E.coli* dapat dilihat pada Gambar 2. Pada Gambar 2, pertumbuhan *E.coli* yang diberi perlakuan melanin dari *Sepia sp* sebesar 10 mg/ml terlihat jumlah koloninya yang hidup mengalami penurunan lebih dari 1 log₁₀ setelah 6 jam inkubasi dan penurunan tersebut terus berlanjut hingga 2 log₁₀ 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. Hal ini menunjukkan bahwa selain memperpanjang fase adaptasi, melanin juga mempercepat fase kematian pada sel bakteri.

Sebaliknya, pada pertumbuhan *E.coli* tanpa perlakuan melanin terjadi peningkatan jumlah koloni yang hidup lebih dari 4 log₁₀ (dari 10⁵ menjadi 10⁹). 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 log₁₀, dan terus meningkat hingga jam ke-12 walaupun hanya sedikit terjadi pertambahan populasi (kurang dari 1 log₁₀). Pertumbuhan memasuki fase stasioner setelah jam ke-12 hingga jam ke-24.



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

Melanin, merupakan tirosinase yang telah diidentifikasi terdapat di dalam tinta cumi-cumi (Fiore *et al*/Derby, 2004/2014). Tinta cumi-cumi terdiri atas suspensi granula eumelanin didalam media yang *viscous* dan tidak berwarna. Eumelanin bersifat heterogen, umumnya polimer yang tidak larut yang berkembang melalui oksidasi enzimatis 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 Mg²⁺, Ca²⁺, Na⁺, dan K⁺. Ion-ion ini bertanggung jawab atas berbagai aktivitas bakteri, termasuk kerja enzim, pengatauran metabolik dan menjaga integritas lapisan luar. Mg²⁺ dan ion Ca²⁺ khususnya, memainkan peran 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, yang mengikat molekul LPS pada permukaan dinding sel bakteri gram 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.

Pada penelitiannya, Sahalan *et al.* (2013) menjelaskan ion Ca²⁺ dan Mg²⁺ berperan melindungi membran terluar pada sel bakteri terhadap Polymyxin B yang berinteraksi dengan kation divalent, dengan mengganti kation dari tempat pengikatannya di lipopolisakarida (LPS) molekul. 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⁺⁺ telah terbukti lebih efektif dalam melindungi sel bakteri dibandingkan Mg⁺⁺.

Pengikatan ion logam oleh melanin adalah pada gugus hidroksil fenolik (OH), karboksil (COOH) dan grup amina (NH) dari melanin (Chen *et al.* 2009). Meskipun demikian, kemampuan mengikat dari masing-masing gugus fungsi tersebut berbeda-beda terhadap logam. Hasil penelitian Chen *et al.* (2009) menunjukkan gugus hidroksil fenolik dan amina dari melanin *Ommastrephes bartrami* (jenis cumi-cumi) memiliki kemampuan mengikat lebih besar terhadap Cd(II) dibandingkan gugus karboksil. Sebaliknya, gugus karboksil dari melanin tersebut lebih besar kemampuannya mengikat Pb(II) dibandingkan gugus hidroksil fenolik dan amina. Diduga, komposisi masing-masing gugus aktif penyusun melanin antara melanin dari *Sepia* sp berbeda dengan melanin dari *Loligo* sp. Hal ini mengakibatkan melanin keduanya memiliki aktivitas yang berbeda terhadap *E.coli*.

Penelitian Vasantharaja *et al.* (2014) terhadap ekstrak metanol tinta *Sepiella inermis* dg menggunakan GC-MS menunjukkan adanya campuran dari struktur oligomer yang

Formatted: Superscript

Formatted: Indent: First line: 0,95 cm

Formatted: Superscript

Formatted: Superscript

Formatted: Superscript

Formatted: Superscript

Formatted: Superscript

Formatted: Superscript

Formatted: Indent: First line: 0,95 cm, Adjust space between Latin and Asian text, Adjust space between Asian text and numbers

merupakan gabungan antara dihidroksi indol-2-asam karboksilat dan dihidroksiindol. Ekstrak metanol ini memiliki aktivitas penghambatan terutama terhadap bakteri gram negatif seperti *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.

~~Pada sel bakteri, logam seperti Ca^{++} dan Mg^{++} berperan penting pada membran luar sel bakteri gram negatif. Membran luar sel bakteri terdiri atas lapisan lipopolisakarida (LPS) yang terikat satu sama lain dengan Ca^{++} dan Mg^{++} . Menurut Voss (1967) kation divalent ini berfungsi sebagai jembatan garam yang mengikat makromolekul pada permukaan dinding sel bakteri gram negatif. 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.~~

~~Voss (1967) menambahkan agen pengkelat dan kation organik bertindak bersama untuk menyebabkannya kerusakan pada dinding sel bakteri gram negatif yang tidak mematikan dengan cara menghancurkan jembatan garam dan dengan formasi garam dengan polimer anionik (seperti lipoprotein, lipopolisakarida) pada permukaan sel. Kerusakan pada penyusun dinding sel menyebabkan dinding sel lebih permeabel terhadap senyawa lain, yang kemudian mampu menembus ke bagian dalam sel. Berpenetrasinya senyawa antimikroba mengakibatkan disorganisasi pada membran sitoplasma dan mengakibatkan kematian pada organism tersebut. Pada penelitiannya, Sahalan *et al.* (2013) menjelaskan ion Ca^{++} dan Mg^{++} berperan melindungi membran terluar pada sel bakteri terhadap Polymyxin B yang berinteraksi dengan kation divalent, dengan mengganti kation dari tempat pengikatannya di lipopolisakarida (LPS) molekul. 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^{++} telah terbukti lebih efektif dalam melindungi sel bakteri dibandingkan Mg^{++} .~~

KESIMPULAN

Kesimpulan yang dapat diambil dari penelitian ini adalah:

1. Melanin dari tinta sotong (*Sepiasp*) memiliki aktivitas penghambatan terhadap *E.coli* yang lebih tinggi dibandingkan melanin dari cumi-cumi (*Loligo sp*).

Formatted: Indent: First line: 0 cm

Commented [i-7]: Tidak berpoint

Formatted: Indent: Left: 0,48 cm, No bullets or numbering

2- Pada konsentrasi yang sama dengan melanin, tinta yang berasal dari sotong maupun cumi-cumi, tidak memiliki aktivitas penghambatan terhadap *E.coli*.

UCAPAN TERIMA KASIH

Ucapan terima kasih disampaikan kepada DIKTI atas bantuan dana penelitian melalui hibah Fundamental tahun anggaran 2016/2017.

DAFTAR PUSTAKA

Arias C. 2009. Chilled and Frozen Raw Fish. Di dalam: Fernandes R (editor) Microbiology Handbook Fish and Seafood. United Kingdom: Leatherhead Food International Ltd.

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, and Wang D. 2009. Adsorption of Pb(II) and Cd(II) by Squid Ommastrephes bartrami Melanin. *Bioinorganic Chemistry and Applications*: 2009:1-7

Dave D and 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.](#)

[Fiore G, Poli A, Cosmo AD, d'Ischia M and Palumbo A. 2004. Dopamine in the ink defence system of *Sepia officinalis*: biosynthesis, vesicular compartmentation in mature ink gland cells, nitric oxide \(NO\)/cGMP induced depletion and fate in secreted ink I. *Biochem. J.* 378: 785-791.](#)

Lei M, Wang JF, Pang L, Wang YM, Chen SG, Xue CH. 2007. 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. 2007. Study of the radio-protective effect of cuttlefish ink on hemopoietic injury. *Asia Pacific Journal of Clinical Nutrition*, 16: 239-243.](#)

Commented [i-8]: Jurnal yang digunakan 10 tahun terakhir, kecuali metode diperbolehkan lebih

Commented [i-9]: Nama jurnal ditulis lengkap

Formatted: Justified

Formatted: Font: Font color: Red

Formatted: Font: Font color: Red

Formatted: Font: Font color: Red

Formatted: Font: Font color: Red

Formatted: Font: Font color: Red

Formatted: Font: Font color: Red

Formatted: Font: Font color: Red

Formatted: Font: Font color: Red

Formatted: Font: Font color: Red

Formatted: Font: Font color: Red

Formatted: Font: Font color: Red

Formatted: Font: Font color: Red

Formatted: Font: Font color: Red

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.

Margarelli M, Passamonti P and Renieri C. 2010. Purification, characterization and analysis of sepia melanin from commercial sepia ink (*Sepia officinalis*). *Revista CES Medicina Veterinaria y Zootecnia*, 5(2) :18-28.

Mbonyirivuze 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 : Sekolah Pasca Sarjana, IPB.

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 and 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.

[Okuzumi M and Fujii T. 2000. Nutritional and Functional Properties of Squid and Cuttlefish. National Cooperative Association of Squid Processors. Jepang-Peshenko IV & Dizhoor AM. 2007. Activation and inhibition of photoreceptor guanylyl cyclase by guanylyl cyclase activating protein 1 \(GCAP-1\): The functional role of Mg²⁺/Ca²⁺ exchange in EF-hand domains. *The Journal of Biological Chemistry* 82\(30\): 21645-21652.](#)

Formatted: Indent: Left: 0 cm, First line: 0 cm, Space After: 10 pt, Line spacing: Multiple 1,15 li, Adjust space between Latin and Asian text, Adjust space between Asian text and numbers

[Raetz C R, Reynolds CM, Trent MS & Bishop RE. 2007. Lipid: A modification systems in gram-negative bacteria. *Annual Reviews Biochemistry* 76: 295-329.](#)

Formatted: Indent: Left: 0 cm, Hanging: 0,95 cm

Formatted: Indent: Left: 0 cm, First line: 0 cm

Formatted: Indent: Left: 0 cm, Hanging: 0,95 cm

[Prota G, Ortonne JP, Voulot C, Khatchadourian C, Mardi G, Palumbo A. 1981. Occurrence and properties of tyrosinase in the ejected ink of cephalopods. *Comp. Biochem. Physiol.* B68 :415-419.](#)

Formatted: Indent: Left: 0 cm, First line: 0 cm

Formatted: Font: Font color: Red

Rajaganapathi J, Thyagarajam SP, Edward JK. 2007. Study on cephalopod's ink for anti-retroviral activity. *Indian J. Exp. Biol.*38: 519-520.

[Sadok S, Abdelmouleh A and Abed AE. 2004. Combined effect of sepia soaking and temperature on the shelf life of peeled shrimp *Penaeus kerathurus*. *Food Chemistry* 88: 115-122](#)

Sahalan AZ, Aziz AHA, Lian H & Ghani MKA. 2013. Divalent Cations (Mg²⁺, Ca²⁺) Protect Bacterial Outer Membrane Damage by Polymyxin B. *Sains Malaysiana* 42(3): 301-306.

~~Sasaki J, Ishita K, Takaya Y, Uchiswa H, Matsue H. 1997. Antitumor activity of squid ink. *J. Nutr. Sci. Vitaminol.* 43:455-461.~~

Formatted: Font: Font color: Red

~~Takaya Y, Uchiswa H. 1994. An investigation of the antitumor peptidoglycan fraction from squid ink. *Biol. Pharm. Bull.* 17:846-851.~~

Formatted: Font: Font color: Red

Vasantharaja D, Ravitchandirane V and Anandan V. 2014. Anti-microbial activity and spectro-chemical investigation of ink extracts of *Sepiella inermis* (Van Hasselt 1835). *Not Sci Biol.* 6(3):273-275

~~Voss, J.G. 1967. Effects of Organic Cations on the Gram-negative Cell Wall and Their Bactericidal Activity with Ethylenediaminetetra-acetate and Surface Active Agents. *J. gen. Microbiol.* 48: 391-400~~

Formatted: Font: Font color: Red

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.

Zhong JP, Wang G, Shang JH, Pan JQ, Li K, Huang Y and Liu HZ. 2009. Protective Effects of Squid Ink Extract Towards Hemopoietic Injuries Induced by Cyclophosphamide. *Mar. Drugs* 7 : 9-18

**POTENSI AKTIVITAS ANTIBAKTERI DARI MELANIN
TINTA SOTONG DAN CUMI-CUMI TERHADAP *E.coli* SEBAGAI
MODEL BAKTERI GRAM NEGATIF**

Antibacterial activity of melanin from cuttlefish and squid ink

Yuspihana Fitriah*, Iin Khusnul Khotimah

Program Studi Teknologi Hasil Perikanan, Fakultas Perikanan dan Kelautan UNLAM

Jl. A.Yani Km 36 Kotak Pos 6 Banjarbaru 70714, Kalimantan Selatan

Telepon/Fax: 0511-4772124

*Korespondensi: yuspihana@gmail.com

Abstrak

Lingkungan laut terdiri atas banyak organisme yang diketahui memiliki senyawa bioaktif sebagai alat pertahanan diri atau untuk melindungi telur dan embrionya. Kelas Cephalopoda (seperti cumi-cumi dan sotong) terkenal karena pertahanan dirinya, seperti gerakan pelarian, perubahan warna, mengeluarkan racun dan tinta. 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 0,5M secara mekanik. Melanin yang diperoleh diuji aktivitasnya terhadap *E.coli* dengan metode kontak langsung antara melanin dan *E.coli* 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, cumi-cumi, *E.coli*, melanin, sotong, tinta.

Abstract

Marine environment comprises of many organism which are known to possess bioactive compound as a common means of self-defense or for the protection of eggs and embryos. Class Cephalopods (such as squid and cuttlefish) are notable for their defences, such as jetting escape movements, changes in colouration, toxic venom and inking. 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*, melanin, squid.

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.

Beberapa hasil penelitian menjelaskan bahwa baik 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^a), anti-radasi (Lei *et al.* 2007^b), dan anti-rotavirus (Rajaganapathi *et al.* 2007).

Beberapa 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*. Berdasarkan 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^{2+} dan Ca^{2+} 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 μ m), *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), *coloni*

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 yang 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 yang busuk dilarutkan dalam larutan garam fisiologis 0,85% dengan perbandingan 1: 10.Larutan daging sebanyak 1 mL di tumbuhkan dalammedia EMB (*Eosin Methylene Blue*) Agar, kemudiandiinkubasi 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 *Enterbacter aerogenes* (koloni berukuran besar, berwarna merah jambu). *Methylene Blue* secara selektif menghambat gram positif,sehingga yang dapat tumbuh dimedia tersebut hanya gram negatif.

Koloni yang diduga *E.coli*yaitu yang berwarna hijau metalik diuji sifat biokimianya dengan menggunakan *microbact identification kits* (oxid). Hasil pengujian dengan microbact kit menunjukkanlisin (+), ornitin (+), H₂S(-), glukosa (+), manitol (+), xilosa (+), ONPG (+), Indol(+), urease (-), V-P (-), citrate (-), dan TDA (-). Hasil identifikasi menunjukkan *Escherichia coli* (96,39%).

Ekstraksi dan purifikasi melanin dari tinta cumi-cumi

Ekstraksi dan purifikasi melanin pada tinta cumi-cumi dan sotong dilakuan menurut metode Magarelli *et al.* (2010).Tahapan ekstraksi dan purifikasi dilakukan dalam media asam.Tinta diambil habis dari kantong tinta segar, sebanyak 50 g ditambahkan 100 mL HCl

0,5M dalam kondisi kedap cahaya. Larutan diaduk dengan menggunakan *magnetic stirrer* selama 30 menit, selanjutnya di simpan selama 24 jam pada suhu 10°C. Endapan dipisahkan dari supernatan dengan menggunakan sentrifus (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, 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. Ke dalam tabung uji ditambahkan melanin (dalam bentuk serbuk) sehingga konsentrasi melanin dalam tabung 0,000, 0,002, 0,006, 0,010 g/mL. Sebagai contoh, untuk membuat 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 dipersiapkan yang telah disegarkan 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 relatif nya terhadap jumlah mikroba awal mendekati 100%). Pengamatan dilakukan per tiga jam selama 24 jam.

Pengujian kebocoran sel bakteri uji

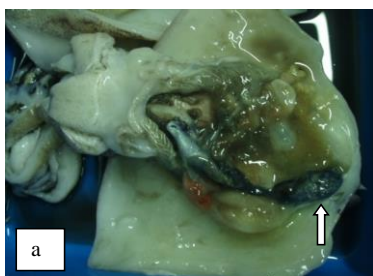
Pengujian ini untuk melihat mekanisme kerja penghambatan dari melanin tinta sotong terhadap mikroba uji mengacu pada Bunduki *et al.* (1995). Analisis kebocoran sel dilakukan dengan menggunakan *Spektrofotometer Double Beam* pada panjang gelombang 280 dan 260 nm. Panjang gelombang 280 nm digunakan untuk mengukur kadar nitrogen dari protein sel, sedangkan panjang gelombang 260 nm untuk mengukur kadar nitrogen asam nukleat sel.

Sebanyak 10 mL kultur murni 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 0,0005, 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 supernatant disaring dengan kertas saring (Syringe filter sterile 0,20µm) untuk memisahkan selnya. Analisis dilakukan dengan mengamati OD (*Optical Density*) dari cairan supernatan.

HASIL DAN PEMBAHASAN

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 dapat dilihat pada Tabel 1. Berdasarkan hasil analisis rendemen terlihat bahwa jenis *Sepia* memiliki rendemen tinta yang lebih besar (2,3%) dibandingkan tinta dari jenis *Loligo* (0,5%).



Sepia sp. Kantong tinta (ditunjukkan oleh panah)



Loligo sp. Kantong tinta (ditunjukkan oleh panah)

Gambar 1 Jenis chepalopodadan 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.

Tabel 1 Perbandingan berat kantong tinta cumi-cumi dan sotong

	<i>Loligo</i> sp		<i>Sepia</i> sp	
	Berat utuh per ekor (g)	Berat kantong tinta (g)	Berat utuh per ekor (g)	Berat kantong tinta (g)
Rata-rata	116,6±40,36	0,6±0,1	173,0±19,6	4,0±1,4

Nair *et al.*(2011) menyatakan bahwa tinta sepia terdiri atas granula melanin dalam media yang kental 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 100-200nm (Mboniyiriyuze *et al.*2015). Ukuran butiran bola melanin pada cumi-cumi, berkisar antara 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 2. Berdasarkan Tabel 2 terlihat semakin tinggi konsentrasi melanin 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 mengakibatkan sel bakteri beradaptasi terhadap melanin, hingga 24 jam inkubasi tidak terjadi peningkatan yang berarti pada jumlah sel bakteri. Konsentrasi tersebut hanya memperpanjang fase adaptasi tetapi tidak menyebabkan kematian pada sel bakteri.

Formatted: Font: Italic

Konsentrasi yang lebih tinggi yaitu 0,010 g/mL, melanin mampu membunuh bakteri sehingga setelah inkubasi 24 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 2 menunjukkan *E.coli* lebih sensitif terhadap melanin dari *Sepia* sp. dibandingkan dengan dari *Loligo* sp.

Tabel 2 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</i> sp					
Tinta	0	8,6x10 ⁵	1,6 x 10 ¹⁰	-	-4,27
	0,013	8,6x10 ⁵	6,2 x 10 ⁹	-	-3,86
	0,017	8,6x10 ⁵	5,6 x 10 ⁹	-	-3,81
	0,020	8,6x10 ⁵	4,4 x 10 ⁹	-	-3,71
Melanin	0,002	8,6x10 ⁵	1,2x10 ¹⁰	-	-5,14
	0,006	8,6x10 ⁵	6,0x10 ⁵	30,23	0,16
	0,010	8,6x10 ⁵	1x10 ⁰	99,99	5,93
<i>Loligo</i> sp					
Tinta	0	8,6x10 ⁵	3,1 x 10 ¹⁰	-	-4,56
	0,013	8,6x10 ⁵	8,6 x 10 ⁹	-	-4,00
	0,017	8,6x10 ⁵	2,3 x 10 ⁹	-	-3,43
	0,020	8,6x10 ⁵	1,0 x 10 ⁹	-	-3,06
Melanin	0,013	8,6x10 ⁵	2,1x10 ⁴	97,56	1,61
	0,017	8,6x10 ⁵	2,1x10 ³	99,76	2,61
	0,020	8,6x10 ⁵	1,4x10 ²	99,87	3,79

Keterangan : (-) nilainya negatif artinya tidak ada penghambatan sebaliknya malah terjadi peningkatan

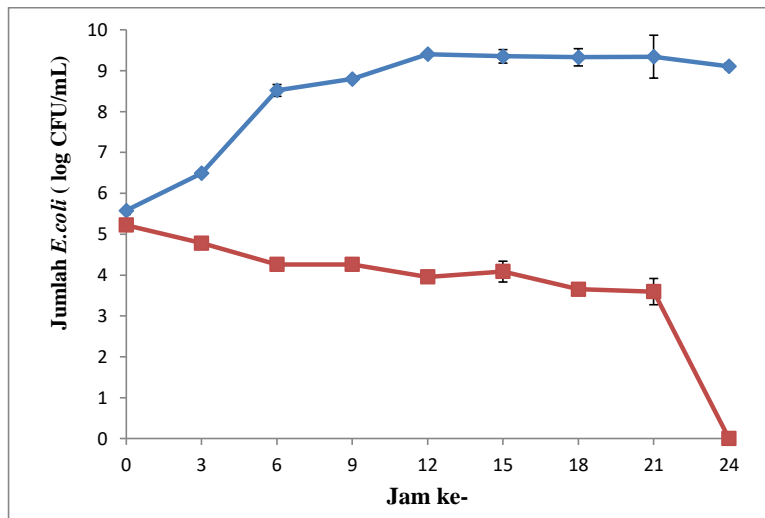
Tinta *Sepia* sp dengan konsentrasi yang lebih tinggi dibandingkan dengan melaninnya tidak memiliki aktivitas penghambatan, sementara tinta *Loligo* sp pada konsentrasi yang sama dengan melanin tidak memiliki aktivitas penghambatan terhadap *E.coli*. Hal ini disebabkan karena yang terkandung di dalam tinta tidak hanya melanin, melainkan ada komponen lain

seperti protein, lemak dan glikosaminoglikan yang diduga tidak memiliki aktivitas penghambatan terhadap *E.coli*, akan tetapi sebaliknya dapat meningkatkan pertumbuhan *E.coli*.

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

Aktivitas melanin dari sepia terhadap pertumbuhan *E.coli* dapat dilihat pada Gambar 2. Gambar 2 menunjukkan pertumbuhan *E.coli* yang diberi perlakuan melanin dari *Sepia* sp. sebesar 10 mg/mL terlihat jumlah koloninya yang hidup mengalami penurunan lebih dari 1 log₁₀ setelah 6 jam inkubasi dan penurunan tersebut terus berlanjut hingga 2 log₁₀ 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. 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 log₁₀ (dari 10⁵ menjadi 10⁹). 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 log₁₀, dan terus meningkat hingga jam ke-12 walaupun hanya sedikit terjadi penambahan populasi (kurang dari 1 log₁₀). Pertumbuhan memasuki fase stasioner setelah jam ke-12 hingga jam ke-24.



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

Penelitian Vasantharaja *et al.* (2014) terhadap 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 seperti *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^{2+} , Ca^{2+} , Na^+ , dan K^+ . Ion-ion ini bertanggung jawab atas berbagai aktivitas bakteri, termasuk kerja enzim, 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 mengakibatkan kebocoran pada membran bakteri Gram negatif dalam hal ini diwakili oleh *E.coli*. Mekanisme kebocoran yang disebabkan oleh melanin terhadap sel *E.coli* dapat dilihat pada Tabel 3. Tabel 3 menunjukkan hubungan antara konsentrasi melanin dengan tingkat kebocoran sel *E.coli* yang diinkubasi selama 24 jam dengan melanin tinta *Sepia* sp. Peristiwa kebocoran sel *E.coli* akibat melanin diwakili oleh melanin dari *Sepia* sp. 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.

Tabel 3 Nilai OD dari 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

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 dimana sama-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 diduga yang 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, and Wang D. 2009. Adsorption of Pb(II) and Cd(II) by Squid *Ommastrephes bartrami* Melanin. *Bioinorganic Chemistry and Applications*. 1-7
- Dave D and 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 metabolism 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.
- Margarelli M, Passamonti P and Renieri C. 2010. Purification, characterization and analysis of sepia melanin from commercial sepia ink (*Sepia officinalis*). *Revista CES Medicina Veterinaria y Zootecnia*. 5(2): 18-28.
- Mbonyirivuze 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 and 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 and 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 Mg²⁺/Ca²⁺ 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 (Mg²⁺, Ca²⁺) 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 spectrochemical 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. Antibacterial 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, PanJQ, LiK, Huang Y and Liu HZ. 2009. Protective Effects of Squid Ink Extract Towards Hemopoietic Injuries Induced by Cyclophosphamine. *Marine Drugs*. 7: 9-18.

POTENSI AKTIVITAS ANTIBAKTERI DARI MELANIN TINTA SOTONG DAN CUMI-CUMI TERHADAP *E. coli* SEBAGAI MODEL BAKTERI GRAM NEGATIF

Yusphiana Fitriah*, Iin Khusnul Khotimah

Program Studi Teknologi Hasil Perikanan, Fakultas Perikanan dan Kelautan UNLAM

Jl. A. Yani Km 36 Kotak Pos 6 Banjarbaru 70714, Kalimantan Selatan

Telepon/Fax: 0511-4772124

*Korespondensi: yusphiana@gmail.com

Abstrak

Lingkungan laut terdiri atas banyak organisme yang diketahui memiliki senyawa bioaktif sebagai alat pertahanan diri atau untuk melindungi telur dan embrionya. Kelas Cephalopoda (seperti cumi-cumi dan sotong) terkenal karena pertahanan dirinya, seperti gerakan pelarian, perubahan warna, mengeluarkan racun dan tinta. 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 0,5M 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*. ~~Dapat disimpulkan bahwa~~ Melanin dari *Sepia* sp memiliki aktivitas antibakteri terhadap *E. coli* lebih tinggi dibandingkan melanin dari *Loligo* sp.

Kata kunci: aktivitas antibakteri, cumi-cumi, *E. coli*, melanin, sotong, tinta.

Antibacterial Activity Potency of melanin from cuttlefish and squid ink against E. coli as Gram Negative Bacteria Model

Abstract

Marine environment comprises of many organism which are known to possess bioactive compound as a common means of self-defense or for the protection of eggs and embryos. Class Cephalopods (such as squid and cuttlefish) are notable for their defences, such as jetting escape movements, changes in colouration, toxic venom and inking. 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*. ~~It can be concluded that th~~ The melanin of *Sepia* sp have a higher antibacterial activity than the melanin of *Loligo* sp.

Keywords: antibacterial activity, cuttlefish, *E. coli*, melanin, squid.

PENDAHULUAN

Kelas Cephalopoda seperti sotong (*Sepia* sp.) dan cumi-cumi (*Loligo* sp.) merupakan komoditi hasil tangkapan perikanan laut yang pemanfaatannya masih sangat terbatas.

Sebagian besar hasil tangkapan cumi-cumi ini hanya diolah menjadi cumi-cumi asin, 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.

Beberapa hasil penelitian menjelaskan bahwa baik 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^a), anti-radiasi (Lei *et al.* 2007^b), anti-rotavirus (Rajaganapathi *et al.* 2007) dan antibakteri (Nair *et al.* 2011).

Efek sitotoksik dari melanin tinta cumi-cumi, diduga akan berpengaruh pula terhadap pertumbuhan mikroba seperti *E. coli*. *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).

Oleh karena itu dilakukan penelitian terkait aktivitas antibakteri melanin dari tinta sotong dan cumi-cumi terhadap *E. coli* sehingga nantinya dapat berpotensi untuk dikembangkan menjadi pengawet alami produk perikanan.

Commented [A1]: Tambahkan literatur terkait potensi antibakteri dari melamin/tinta cumi2, sejauh apa penelitian yang sudah ada dan seperti apa hasilnya. Untuk mendukung latar belakang dan tujuan penelitian

Formatted: Indonesian

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), *coloni 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 yang busuk, ekstraksi dan purifikasi melanin dari tinta sotong dan cumi-cumi ~~analisis rendemen tinta sotong dan cumi-cumi, isolasi 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 yang 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 *Enterbacter aerogenes* (koloni berukuran besar, berwarna merah jambu). *Methylene Blue* secara selektif menghambat gram positif, sehingga yang dapat tumbuh di media tersebut hanya gram negatif.

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 (+), H₂S (-), glukosa (+), manitol (+), xilosa (+), ONPG (+), Indol (+), urease (-), V-P (-), citrate (-), dan TDA (-). Hasil identifikasi menunjukkan *Escherichia coli* (96,39%).

Commented [A2]: Pernyataan ini dituliskan dalam hasil dan pembahasan

Ekstraksi Isolasi dan purifikasi melanin dari tinta cumi-cumi

Ekstraksi Isolasi dan purifikasi melanin pada tinta cumi-cumi dan sotong dilakukan menurut metode Magarelli *et al.* (2010). Tahapan ekstraksi dan purifikasi dilakukan dalam media asam. Tinta diambil habis dari kantong tinta segar, sebanyak 50 g ditambahkan 100 mL HCl 0,5M dalam kondisi kedap cahaya. Larutan diaduk dengan menggunakan *magnetic stirrer* selama 30 menit, selanjutnya di simpan selama 24 jam pada suhu 10°C. Endapan dipisahkan dari supernatan dengan menggunakan sentrifus (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, dilakukan liofilisasi dengan *freeze dryer* seperti sampel melanin.

Pengujian aktivitas melanin terhadap bakteri mikroba 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 di dalam tabung kecil berisi NB. Bakteri uji dipersiapkan yang telah disegarkan dan diinkubasi 24 jam (10^6 - 10^7 CFU/ mL) pada 37°C, lalu diencerkan 10 kali. Tabung uji tersebut diinokulasikan dengan 30 µL 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: $100 - (N_t \times 100/N_o)$, N_t adalah jumlah bakteri CFU/mL dalam perlakuan penambahan melanin, sedangkan N_o 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 dengan konsentrasi.....? akan tetapi pengamatan dilakukan per tiga jam selama 24 jam.

Pengujian kebocoran sel bakteri uji

Pengujian ini untuk melihat mekanisme kerja penghambatan dari 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.

Sebanyak 10 mL kultur murni 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.

Commented [A3]: Berikan penjelasan perlakuan yang diberikan untuk konsentrasi melanin dan tinta yang diberikan.

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 supernatant disaring dengan kertas saring (Syringe filter sterile 0,20 µm) untuk memisahkan selnya. Analisis dilakukan dengan mengamati OD (*Optical Density*) dari cairan supernatan.

HASIL DAN PEMBAHASAN

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

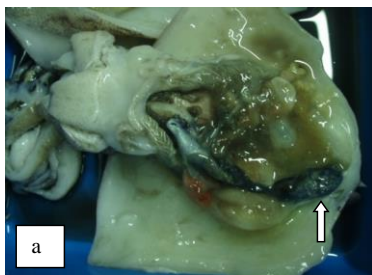
Sepia sp. memiliki kantong tinta yang panjang dan besar, sementara kantong tinta *Loligo* sp. berukuran kecil sehingga tinta yang dihasilkan juga lebih sedikit (Gambar 1). Tinta yang terdapat dalam kantong sangat ditentukan oleh kondisi terakhir sebelum ditangkap, jika sebelum ditangkap sudah banyak 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 dapat dilihat pada Tabel 1. Berdasarkan hasil analisis rendemen terlihat bahwa jenis *Sepia* memiliki rendemen tinta yang lebih besar (2,3%) dibandingkan tinta dari jenis *Loligo* (0,5%).

Tabel 1 Perbandingan berat kantong tinta cumi-cumi dan sotong

	<i>Loligo</i> sp		<i>Sepia</i> sp	
	Berat utuh per ekor (g)	Berat kantong tinta (g)	Berat utuh per ekor (g)	Berat kantong tinta (g)
<u>Rata-rata</u>	<u>116,6±40,36</u>	<u>0,6±0,1</u>	<u>173,0±19,6</u>	<u>4,0±1,4</u>

Nair *et al.* (2011) menyatakan bahwa tinta sepia terdiri atas granula melanin dalam media yang kental tak 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 (Mbonyiryivuze *et al.* 2015). Ukuran butiran bola melanin pada cumi-cumi, berkisar antara 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.



Sepia sp. Kandung tinta (ditunjukkan oleh panah)



Loligo sp. Kandung tinta (ditunjukkan oleh panah)

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.

Commented [A4]: Pindahkan ke atas sebelum tabel 1

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 2. Berdasarkan Tabel 2 terlihat semakin tinggi konsentrasi melanin 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 mengakibatkan sel bakteri beradaptasi

Formatted: Font: Italic

terhadap melanin, hingga 24 jam inkubasi tidak terjadi peningkatan yang berarti pada jumlah sel bakteri. Konsentrasi tersebut hanya memperpanjang fase adaptasi tetapi tidak menyebabkan kematian pada sel bakteri.

Konsentrasi yang lebih tinggi yaitu 0,010 g/mL, melanin mampu membunuh bakteri sehingga setelah inkubasi 24 hanya ada 1 sel yang hidup (penghambatan mencapai 99,99%).

Tabel 2 menunjukkan *E. coli* lebih sensitif terhadap melanin dari *Sepia* sp. dibandingkan dengan dari *Loligo* sp.

Commented [A5]: Mengapa konsentrasi antara sepia dan loligo berbeda. Kalau berbeda apakah bisa dibandingkan?

Tabel 2 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</i> sp					
Tinta	0	8,6x10 ⁵	1,6 x 10 ¹⁰	-	-4,27
	0,013	8,6x10 ⁵	6,2 x 10 ⁹	-	-3,86
	0,017	8,6x10 ⁵	5,6 x 10 ⁹	-	-3,81
	0,020	8,6x10 ⁵	4,4 x 10 ⁹	-	-3,71
Melanin	0,002	8,6x10 ⁵	1,2x10 ¹⁰	-	-5,14
	0,006	8,6x10 ⁵	6,0x10 ⁵	30,23	0,16
	0,010	8,6x10 ⁵	1x10 ⁰	99,99	5,93
<i>Loligo</i> sp					
Tinta	0	8,6x10 ⁵	3,1 x 10 ¹⁰	-	-4,56
	0,013	8,6x10 ⁵	8,6 x 10 ⁹	-	-4,00
	0,017	8,6x10 ⁵	2,3 x 10 ⁹	-	-3,43
	0,020	8,6x10 ⁵	1,0 x 10 ⁹	-	-3,06
Melanin	0,013	8,6x10 ⁵	2,1x10 ⁴	97,56	1,61
	0,017	8,6x10 ⁵	2,1x10 ³	99,76	2,61
	0,020	8,6x10 ⁵	1,4x10 ²	99,87	3,79

Keterangan : (-) nilainya negatif

Commented [A6]: Artinya tidak ada penghambatan malah sebaliknya yang terjadi peningkatan

Tinta *Sepia* sp₂ maupun *Loligo* sp₂ pada konsentrasi yang sama dengan melanin tidak memiliki aktivitas penghambatan terhadap *E. coli*. Hal ini disebabkan karena tinta tidak hanya terdiri atas melanin, melainkan ada komponen lain seperti protein, lemak dan

Commented [A7]: Sepia saja tidak loligo

glikosaminoglikan yang diduga tidak memiliki aktivitas penghambatan terhadap *E. coli*, akan tetapi sebaliknya dapat meningkatkan pertumbuhan *E. coli*.

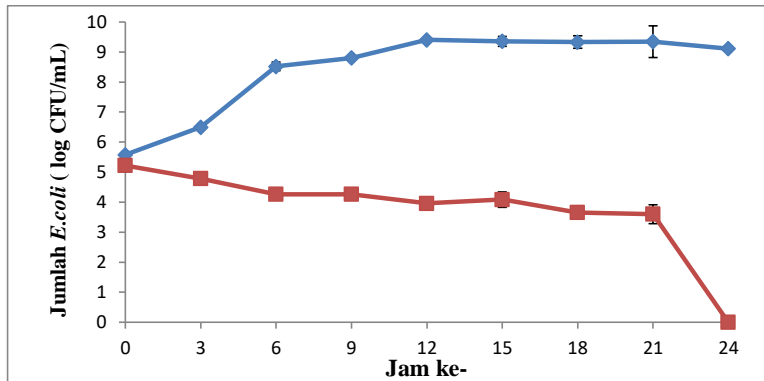
Formatted: Indonesian

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

Aktivitas melanin dari sepia terhadap pertumbuhan *E. coli* dapat dilihat pada Gambar 2. Gambar 2 menunjukkan pertumbuhan *E. coli* yang diberi perlakuan melanin dari *Sepia* sp. sebesar 10 mg/mL terlihat jumlah koloninya yang hidup mengalami penurunan lebih dari 1 log₁₀ setelah 6 jam inkubasi dan penurunan tersebut terus berlanjut hingga 2 log₁₀ 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. 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 log₁₀ (dari 10⁵ menjadi 10⁹). 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 log₁₀, dan terus meningkat hingga jam ke-12 walaupun hanya sedikit terjadi penambahan populasi (kurang dari 1 log₁₀). Pertumbuhan memasuki fase stasioner setelah jam ke-12 hingga jam ke-24.

Commented [A8]: Sepertinya tidak ada fase adaptasi, langsung memasuki fase log



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

Penelitian Vasantharaja *et al.* (2014) terhadap 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 seperti *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 enzimatis 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^{2+} , Ca^{2+} , Na^+ , dan K^+ . Ion-ion ini bertanggung jawab atas berbagai aktivitas bakteri, termasuk kerja enzim, 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 lipopolisakarida (LPS) molekul. 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 mengakibatkan kebocoran pada membran bakteri Gram negatif dalam hal ini diwakili oleh *E. coli*. Mekanisme kebocoran yang disebabkan oleh melanin terhadap sel *E. coli* dapat dilihat pada Tabel 3. Tabel 3 menunjukkan hubungan antara konsentrasi melanin dengan

tingkat kebocoran sel *E.coli* yang diinkubasi selama 24 jam dengan melanin tinta *Sepia* sp. Peristiwa kebocoran sel *E.coli* akibat melanin diwakili oleh melanin dari *Sepia* sp. 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.

Tabel 3 Nilai OD dari 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

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 dimana sama-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 diduga yang mengakibatkan perbedaan aktivitas kedua melanin tersebut terhadap *E. coli*.

KESIMPULAN

Melanin dari tinta sotong (*Sepia* sp.) memiliki aktivitas penghambatan terhadap *E. coli* yang lebih tinggi dibandingkan melanin dari cumi-cumi (*Loligo* sp.). ~~Konsentrasi yang~~

~~sama dengan melanin, Tinta yang berasal dari sotong dan maupun~~ cumi-cumi pada konsentrasi 0,013 – 1,020 g/mL, tidak memiliki aktivitas penghambatan terhadap *E. coli*.

UCAPAN TERIMA KASIH

Ucapan terima kasih disampaikan kepada DIKTI atas bantuan dana penelitian melalui hibah Fundamental tahun anggaran 2016/2017.

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, and Wang D. 2009. Adsorption of Pb(II) and Cd(II) by Squid *Ommastrephes bartrami* Melanin. *Bioinorganic Chemistry and Applications.* 1-7
- Dave D and 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.

- Margarelli M, Passamonti P and Renieri C. 2010. Purification, characterization and analysis of sepia melanin from commercial sepia ink (*Sepia officinalis*). *Revista CES Medicina Veterinaria y Zootecnia*. 5(2):18-28.
- Mbonyiryivuze 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 and 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.
- Peshenko IV & Dizhoor AM. 2007. Activation and inhibition of photoreceptor guanylyl cyclase by guanylyl cyclase activating protein 1 (GCAP-1): The functional role of Mg²⁺/Ca²⁺ exchange in EF-hand domains. *The Journal of Biological Chemistry*. 282(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 (Mg²⁺, Ca²⁺) 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.
- Zhong JP, Wang G, Shang JH, PanJQ, Li K, Huang Y and Liu HZ. 2009. Protective Effects of Squid Ink Extract Towards Hemopoietic Injuries Induced by Cyclophosphamide. *Marine Drugs*. 7: 9-18.