

Potensi Efek Antibakteri Tinta Cumi (*Loligo Sp.*) dan Sotong (*Sepia Sp.*)

Andi Gunawan¹, Dewi Selvina Rosdiana²

¹Program Studi Magister Ilmu Biomedik Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia

²Departemen Farmakologi dan Terapeutik Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia

Penulis korespondensi: Andi Gunawan
Program Studi Magister Ilmu Biomedik
Fakultas Kedokteran Universitas
Indonesia
E-mail: gun.leo98@gmail.com

ABSTRAK

Infeksi bakteri merupakan salah satu penyebab kematian tertinggi di dunia, namun seringkali tatalaksana antibiotik tidak sesuai kaidah rasional sehingga dapat menyebabkan resistensi antibiotik. Tinta cumi dan sotong telah dimanfaatkan sejak dulu dalam berbagai pengobatan dan keperluan sehari-hari. Salah satunya adalah penggunaan tinta cumi yang dapat memperpanjang penyimpanan produk makanan di Jepang sehingga diyakini memiliki efek antiseptik. Hal ini diharapkan menjadi salah satu solusi untuk menangani resistensi antibiotik. Berdasarkan penelitian, tinta cumi dan sotong mengandung beberapa senyawa metabolit sekunder seperti fenol, flavonoid, tannin, steroid, terpenoid, alkaloid, glikosid, dan saponin. Senyawa alkaloid memiliki kemampuan antibakteri dengan cara mengganggu komponen peptidoglikan dan menghambat enzim topoisomerase yang memiliki peran penting pada proses replikasi, transkripsi dan rekombinasi DNA. Gugus fungsi hidroksi fenolik (OH, karboksil (COOH) dan grup amina (NH) dari melanin tinta cumi dapat mengikat kation divalent pada membran luar bakteri yang menyebabkan komponen lipopolisakarida terlepas dan mengalami kebocoran yang berujung kematian sel bakteri. Dari beberapa penelitian *in vitro* didapatkan bahwa tinta cumi dan sotong yang diekstrak dengan pelarut hexana memiliki daya hambat yang lebih tinggi dibandingkan dengan tinta murni cumi dan sotong. Ekstrak tinta cumi dan sotong mampu menghambat pertumbuhan bakteri Gram positif dan Gram negatif dengan kekuatan daya hambat sedang hingga kuat. Diperlukan data pre klinik lebih lanjut untuk menilai efikasi dan keamanan tinta cumi dan sotong sebagai antibakteri.

Kata kunci: *Loligo sp.*, *Sepia sp.*, Tinta, Antibakteri

PENDAHULUAN

Infeksi merupakan salah satu penyebab kematian terbanyak di dunia dan penyebab terbanyak infeksi adalah bakteri. Sehingga penatalaksanaan yang tepat adalah dengan memberikan terapi antibiotik.¹ Namun, pemberian antibiotik ini seringkali tidak sesuai kaidah, yaitu tidak tepat terhadap dosis, diagnostik dan jenis bakteri, sehingga dapat menyebabkan resistensi antibiotik yang disebut *multidrugs resistance* (MDR). Keadaan MDR ini terjadi ketika suatu bakteri resisten terhadap 3 jenis antibiotik. Bakteri yang menjadi resisten terhadap antibiotik dapat terjadi pada bakteri Gram positif maupun Gram negatif.²

Tinta cumi-cumi atau sotong diproduksi dan diregulasi oleh glutamat, nitrit oxida, dan jalur signal cGMP yang ada terbentuk dalam kantong tinta. Setiap satu kantong tinta sotong mengandung sekitar 1 gram melanin dan 15% dari total berat 1 kantong tinta sotong merupakan melanin, selain melanin kandungan lainnya adalah protein sekitar 5-8% dari berat 1 kantong tinta sotong. Melanin merupakan pigmen alami yang terdapat dalam organisme hidup, termasuk hewan, tumbuhan, jamur, dan bakteri yang memiliki berbagai fungsi. Melanin dibentuk oleh asam amino, tetapi bukan merupakan suatu protein. Melanin merupakan kompleks bio-polymer yang terbagi dalam dua bentuk yaitu eumelanin dan pheomelanin.³ Selain melanin, tinta sefalopoda ini juga mengandung protein, lipid, glikosaminoglikan, dan berbagai logam (copper, cadmium).⁴ Selain itu juga mengandung berbagai jenis enzim yaitu tyrosinase, peroksidase, dan *dopachrome rearranging enzyme*.³

Tinta cumi-cumi dan sotong telah dimanfaatkan sejak dahulu di berbagai negara baik di Benua Asia maupun Eropa tidak hanya sebagai makanan tetapi juga sebagai pengobatan tradisional. Dalam sejarah Eropa tepatnya di Yunani dan Romawi kuno tinta sotong telah dimanfaatkan sebagai bahan pengobatan. Pada masa Romawi kuno tinta sotong digunakan dalam pengobatan kebotakan dan di Yunani digunakan sebagai pengobatan penyakit ginjal (batu ginjal) dan gonore. Selain di Eropa, di Asia, terutama China telah memanfaatkan tinta sotong untuk berbagai pengobatan tradisional pada saat masa pemerintahan Dinasti Ming yang telah dibukukan dalam *Compendium of Materia Medica* oleh Shizen Li, dan saat itu pertama kali tinta sotong digunakan untuk mengobati nyeri karena penyakit jantung. Di Jepang, masyarakat percaya tinta cumi/sotong memiliki efek antiseptik sehingga digunakan secara tradisional untuk memperpanjang masa penyimpanan produk makanan seperti "ika shiokara".⁵

Dari beberapa bukti empiris di zaman dahulu menjadi dasar dalam berbagai penelitian dan riset mengenai khasiat dari tinta cumi dan sotong. Penelitian secara *in vitro* didapatkan bahwa ekstrak tinta cumi memiliki efek menghambat pertumbuhan bakteri *Streptococcus mutans* dibandingkan kontrol negatif, walaupun efeknya lebih kecil dibandingkan kontrol positif Siprofloxasin.⁶ Pada penelitian lain didapatkan aktivitas antimikroba dari ekstrak etanol tinta cumi pada bakteri *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*, *Salmonella sp.* dan *Escherichia coli*. Selain itu, ekstrak etanol tinta

cumi juga memiliki aktivitas antioksidan yang diukur dengan metode inhibisi 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) assay and Ferric Reducing Antioxidant Power (FRAP) assay.⁷ Selain itu tinta cumi dapat melindungi sistem hemopoietik dari kerusakan atau efek samping kemoterapi dan dapat digunakan sebagai bahan pembuatan obat *cell-protective* pada pengobatan klinis tumor.⁸

Indonesia memiliki potensi kekayaan laut yang sangat melimpah dan merupakan negara kepulauan sehingga dijuluki sebagai negara maritim. Beberapa potensi kekayaan laut Indonesia mencakup sumber daya ikan, tumbuhan laut, mineral dan pertambangan, transportasi dan perhubungan, dan wisata bahari.⁹

Berdasarkan data KKP mengenai capaian kinerja kelautan dan perikanan 2011-2018, disebutkan bahwa pada tahun 2018, produksi perikanan mencapai 23.95 juta ton dan jumlah capaian produksi perikanan yang semakin meningkat. Seiring dengan peningkatan jumlah produksi perikanan, tingkat konsumsi ikan dalam negeri juga semakin meningkat. Pada tahun 2018, produksi ikan menurut jenis ikan paling banyak yaitu jenis Siro, Ikan Selar Kuning, Ikan Selar Bentong, ikan Tembang, dan di peringkat kelima yaitu cumi-cumi sebesar 340,373 ton.¹⁰

Dari uraian diatas didapatkan bahwa tinta cumi memiliki beragam kandungan yang memiliki fungsi yang luas dan telah dimanfaatkan dalam berbagai keperluan sehari-hari. Tinta cumi bukan hanya sebagai makanan, tetapi berbagai pengalaman empiris juga digunakan sebagai bahan pengobatan berbagai penyakit. Salah satu pemanfaatan tinta cumi adalah sebagai antibakteri, sehingga diharapkan dapat menjadi solusi untuk penanganan penyakit infeksi dan resistensi antibiotik pada bakteri. Sebagai negara maritim dengan produksi hasil laut yang melimpah, Indonesia memiliki potensi dalam pengembangan penelitian menggunakan tinta cumi ini sebagai antibiotik.

Sefalopoda merupakan salah satu kelas hewan yang termasuk dalam filum *Mollusca* (hewan lunak) yang hidup dalam lingkungan laut dan memiliki spesies yang cukup sedikit (sekitar 700) dibandingkan dengan spesies lainnya. Kelas Sefalopoda terbagi menjadi dua kelompok besar yaitu *Nauiloidea* dan *Coloidea* yang diantaranya adalah cumi-cumi, sotong, gurita, dan nautilus. Sebagian besar sefalopoda memiliki kantong dan memproduksi tinta, kecuali jenis *nautilus*. Cumi-cumi dan sotong merupakan produk atau komoditas laut yang penting di seluruh dunia, terutama di Asia Tenggara.⁴

Kandungan Tinta Cumi-cumi dan Sotong

Tinta cumi merupakan suatu alat pertahanan tubuh cumi-cumi yang mengandung granul melanin dalam medium viskus tidak berwarna dan memiliki sifat alkaloid. Tinta tersebut akan dikeluarkan dari suatu kantong yang akan berkontraksi apabila cumi-cumi atau sotong mengalami ancaman oleh predator disekitarnya. Sifat alkaloid yang dimiliki oleh tinta cumi tidak disukai oleh beberapa jenis hewan laut terutama ikan.¹¹ Alkaloid merupakan senyawa metabolit yang terbesar, memiliki atom nitrogen dan bersifat basa. Beberapa alkaloid memiliki manfaat dalam pengobatan antimikroba, anti-inflamasi, antidiare, antihipertensi, antidiabetes, dan antimalaria.¹²

Berdasarkan penelitian Youssef et al., komposisi tinta cumi paling banyak mengandung kadar air yaitu (87,9%), dan beberapa kandungan lainnya seperti protein, lemak, abu, dan karbohidrat.¹³

Tinta cumi maupun sotong mengandung melanin, protein, lemak, glikosaminoglikan, dan asam amino esensial yaitu lisin, leusin, arginin, dan fenilalanin.¹¹ Di dalam setiap kantong tinta mengandung sekitar 1 gram melanin, dan 15% diantaranya merupakan melanin dari total volume tinta, sedangkan protein sekitar 5-8%, peneliti lain menyebutkan sekitar 10,88%.^{3,12} Jumlah protein yang tinggi ini terdiri dari protein myofibrillar (80%), protein myoplastik (12-20%), dan protein myostoma (2-3%) yang mengandung kolagen. Lemak juga terkandung dalam tinta cumi sekitar 1-2 %.³

Penelitian Affandi dkk, ditemukan bahwa ekstrak bubuk tinta cumi mengandung beberapa senyawa alkaloid dan asam karboksilat dari hasil uji *Fourier Transform Infrared* (FTIR). Berdasarkan uji LC-MS (*Latex Chromatography-Mass Spectrophotometry*) ditemukan kandungan betain, asam cinnamin, dan kolin dalam jumlah yang besar. Betain dan kolin merupakan senyawa alkaloid sedangkan asam cinnamin adalah asam karboksilat. Betain, cinnamin, dan kolin memiliki beberapa aktivitas biologi seperti antibakteri, antioksidan, antivirus, antifungi, dan lain-lain.¹⁴

Tinta cumi mengandung senyawa metabolit sekunder seperti fenol, flavonoid, tannin, steroid, terpenoid, alkaloid, glikosid, dan

saponin.¹⁵ Komponen utama senyawa fenolik tinta cumi terbanyak adalah pyrogallol pada konsentrasi 76,956 ppm, diikuti oleh catechin (9,474 ppm) kemudian asam gallic (6,420 ppm). Namun, senyawa fenolik lainnya senyawa yang juga ditemukan seperti katekol, 3 OH-tirosol, P-OH benzoat, vanili, kafein, dan kumarin hanya dalam konsentrasi rendah bervariasi antara 3,285 (P-OH benzoat) hingga 0,463 (kumarin). Hasil Identifikasi senyawa fenol ditampilkan pada Tabel 1.¹³

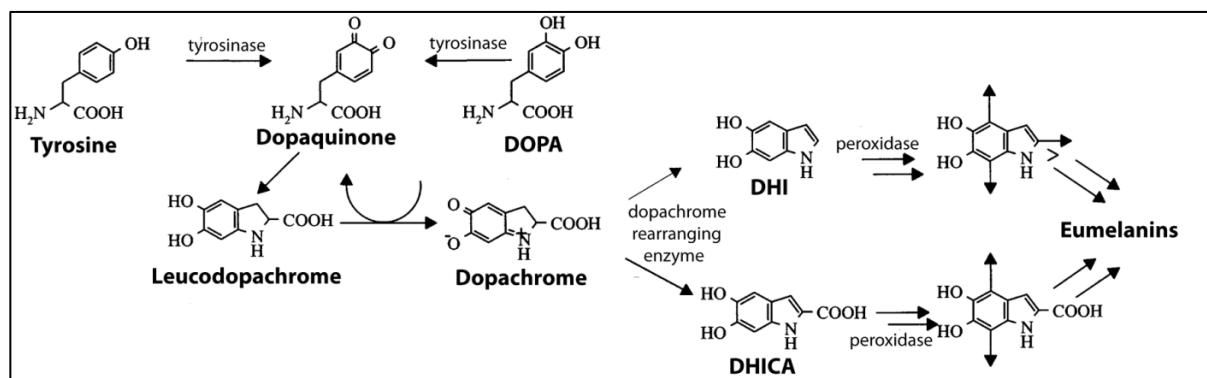
Tabel 1. Kandungan Senyawa Fenolik dalam Tinta Cumii¹³

Komponen	Kadar (ppm)
Catechol	2.251±0.65
3 OH-Tyrosol	2.470e±0.41
Pyrogallol	76.956a±7.55
Gallic acid	6.420c±1.00
Catechin	9.474b±2.30
p-OH benzoic	3.285d±0.55
Vanillic	1.336g±0.33
Caffeine	1.048h±0.24
Coumarin	0.463i±0.41

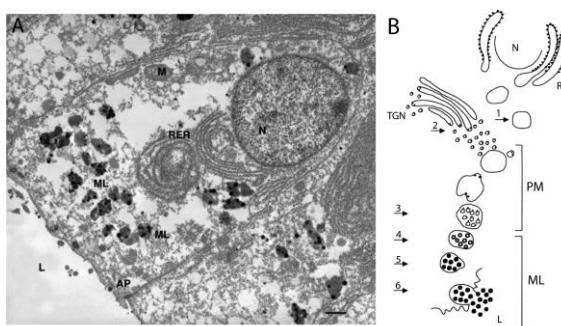
Nilai mean 3 ulangan ± SD, angka pada kolom yang sama diikuti huruf yang sama, tidak berbeda nyata pada tingkat 0,05.

Melanin merupakan kompleks biopolimer yang terbagi dalam dua bentuk, yaitu *eumelanin* dan *pheomelanin* yang dibedakan berdasarkan prekursor molekulernya. Eumelanin merupakan polimer *5,6-dihydroxyindole* (DHI) dan *5,6-dihydroxyindole-2-carboxylic acid* (DHICA) yang merupakan turunan dari tirosin. Pheomelanin dibentuk dari monomer, benzothiazine dan benzothiazole, ketika terdapat prekursornya yaitu sistein dalam kantong tinta cumi. *Eumelanin* berwarna coklat tua (gelap) dan *pheomelanin* berwarna oranye-kemerahan.³

Diagram ringkasan jalur produksi eumelanin di kelenjar tinta Sepia ditunjukkan pada Gambar 1. Substrat, tirosin dan DOPA, diubah menjadi dopakuinon oleh tirosinase. Dopaquinone tidak stabil dan secara non-enzimatik diubah menjadi dopachrome. *Dopachrome Rearranging Enzymes* (DREs) kemudian mengkatalisis penataan ulang dopachrome menjadi DHI atau DHICA. Kemudian, peroksidase khusus untuk kelenjar tinta mengkatalisis polimerisasi monomer DHI dan DHICA menjadi eumelanin.³

Gambar 1. Jalur biokimia melanogenesis (eumelanin) pada Sotong (*Sepia sp.*)³

Melanosom terbentuk dalam dua langkah (Gambar 2). Pada Langkah 1, retikulum endoplasmik kasar membentuk premelanosom yang mengandung peroksidase aktif. Pada Langkah 2, jaringan trans-Golgi menghasilkan vesikel mengandung tirosinase dan DRE. Vesikel ini menyatu dengan premelanosom dan membentuk "coated vesicle" yang menyajikan situs katalitik tirosinase dan DRE ke matriks melanosom (nomor 3). Dengan demikian, tirosinase dan DRE diekspresikan dalam lokus subseluler yang berbeda daripada peroksidase yang terlibat dalam polimerisasi. Melanisasi terjadi di bagian luar yang dilapisi vesikel (nomor 4), sampai melanin benar-benar menutupi permukaannya, sehingga membentuk partikulat melanosom (nomor 5). Akhirnya, melanosom menyatu dengan membran sel di kutub apikal, pecah dan melepaskan isi melanosom, termasuk melanin, ke dalam lumen kantung tinta (nomor 6). Setiap melanosom membuat dan melepaskan hingga 30 butiran melanin, masing-masing ~200 nM. Tidak diketahui berapa banyak melanin yang disekresikan sebelum melanosom pecah dan melepaskan isinya.³

Gambar 2. Proses pembentukan melanosome.³

Kelenjar tinta tampaknya diatur oleh jalur pensinyalan yang melibatkan glutamat, oksida nitrat dan cGMP. Aktivasi ini jalur meningkatkan aktivitas tirosinase dan produksi melanin,

sehingga kemungkinan memainkan peran penting dalam maturasi dan fungsi kelenjar tinta.³

Beberapa bahan kimia yang penting yang terkandung dalam tinta cumi termasuk tirosin, dopamine dan DOPA, dan enzim-enzim seperti tirosinase, peroksidase dan *dopachrome-rearranging enzyme*.³

Kandungan Tinta Cumi dan Sotong sebagai Antibakteri

Kandungan alkaloid dalam tinta cumi berperan penting pada aktivitas antibakteri. Alkaloid mengandung nitrogen sebagai bagian dari sistem siklik dalam strukturnya dan mengandung substituent yang bervariasi seperti fenol, amin, amida, dan metoksi sehingga alkaloid bersifat semipolar dan dapat berperan sebagai senyawa antibakteri.¹⁵ Kandungan alkaloid dapat terdeteksi karena alkaloid secara umum larut dalam pelarut semi-polar dan nonpolar, sedangkan beberapa kelompok pseudoalkaloid dan protoalkaloid larut dalam air sebagai pelarut polar. Hal ini mengindikasikan bahwa cumi-cumi mengandung kelompok pseudoalkaloid dan protoalkaloid.¹⁶

Ekstrak metanol tinta sotong *Sepiella inermis* didapatkan memiliki aksi anti-tuberkulosis pada *Mycobacterium tuberculosis*, dimana tinta sotong ini memiliki kandungan omega-3 asam lemak dan lipid yang dapat menghancurkan membran sel bakteri.¹⁷

Asam lemak tidak jenuh seperti DHA, asam oleat, asam arakidonat, dan kandungan EPA dalam ekstrak menunjukkan aktivitas antimikroba dan ekstrak yang imatur tidak menunjukkan aktivitas.¹⁸

Enzim peroksidase terlibat dalam dekomposisi co-substrat seperti senyawa fenolik dan antioksidan. Isomer peroksidase tertentu menggunakan senyawa fenolik dan H₂O₂ untuk memulai biosintesis metabolit sekunder yang diperlukan untuk pertumbuhan, perkembangan,

dan diferensiasi. Peningkatan aktivitas peroksidase terutama disebabkan oleh peningkatan sintesis enzim dan mungkin berguna untuk adaptasi dalam kondisi yang memerlukan pencegahan peroksidasi lipid membran. Peroksidase juga dapat membunuh mikroorganisme dan menghancurkan bahan kimia yang bersifat racun bagi sel hewan termasuk H_2O_2 , fenol dan alkohol.¹⁸

Mekanisme Antibakteri Pada Tinta Cumi dan Sotong

Mekanisme senyawa antimikroba secara umum adalah dengan menghambat pertumbuhan yang disebut bakteriostatik atau membunuh bakteri yang disebut bakterisidal. Berdasarkan pembentukan zona hambat, melanin dari tinta cumi menghasilkan daya hambat bakteriostatik yang lemah sampai sedang terhadap bakteri gram positif maupun gram negatif. Senyawa bioaktif yang paling berperan dalam menghambat pertumbuhan bakteri adalah alkaloid dan flavonoid karena kandungannya yang tinggi dalam tinta cumi. Semakin tinggi kandungan senyawa bioaktif semakin menimbulkan efek bakterisidal sedangkan kandungan senyawa bioaktif yang lebih rendah hanya akan bekerja sebagai bakteriostatik.¹⁹

Mekanisme antibakteri tinta cumi dan sotong adalah menghambat pertumbuhan bakteri dengan cara mengganggu metabolisme sel. Alkaloid dalam tinta cumi dapat menghambat enzim topoisomerase yang memiliki peran penting pada proses replikasi, transkripsi, dan rekombinasi DNA dengan cara memotong dan menyambungkan untai tunggal atau ganda.¹⁶

Mekanisme antibakteri tinta cumi dan sotong juga dapat dengan menyerang membran sitoplasma, menghilangkan stabilitas proton dan elektron pada komponen sel. Mekanisme antibakteri ini merusak komponen peptidoglikan pada sel bakteri. Komponen peptidoglikan adalah asam amino dan gula yang membentuk dinding sel bakteri. Sehingga kerusakan peptidoglikan menyebabkan lapisan membran sel tidak utuh dan memicu kematian sel.^{16,20}

Dinding sel bakteri bertanggungjawab menjaga integritas lapisan luar sel. Fungsi tersebut diperankan oleh banyak jenis kation termasuk Mg^{2+} , Ca^{2+} , Na^+ , dan K^+ . Ion Mg^{2+} dan ion Ca^{2+} secara khusus berperan penting dalam melindungi kestabilan struktur luar bakteri Gram negatif dengan cara mengikat molekul Lipopolisakarida (LPS) sehingga membentuk

jembanan garam. Membran luar bakteri menghalangi masuknya senyawa yang tidak diperlukan oleh bakteri seperti bakteriosin, enzim, dan senyawa hidrofobik.²¹

Gugus fungsi hidroksi fenolik (OH), karboksil (COOH) dan grup amina (NH) dari melanin tinta cumi dapat mengikat ion Ca^{2+} dan Mg^{2+} pada membran luar bakteri menggantikan divalen dari tempat pengikatannya di molekul lipopolisakarida (LPS). Hal ini menyebabkan lepasnya komponen LPS dari permukaan dan terjadi disorganisasi membran luar yang berujung kebocoran membran dan kematian sel.²²

Hasil Uji Potensi Antibakteri Tinta Cumi-cumi dan Sotong

Dalam penelitian Fitrial dkk., dilakukan perbandingan aktivitas antibakteri antara tinta murni dibandingkan ekstrak melanin dari tinta cumi-cumi (*Loligo sp.*) dan sotong (*Sepia sp.*). Pada penelitian tersebut menggunakan konsentrasi tinta murni cumi-cumi dan sotong dengan masing-masing konsentrasi 0,013; 0,017; 0,020 g/mL. Untuk konsentrasi ekstrak melanin tinta sotong 0,002; 0,006; 0,010 g/mL dan konsentrasi ekstrak melanin tinta cumi-cumi 0,013; 0,017; 0,020 g/mL. Pengujian aktivitas melanin dilakukan dengan metode kontak langsung antara tinta murni atau ekstrak melanin dengan bakteri uji *Escherichia coli* dalam media cair *nutrient broth* (NB). Jumlah bakteri kemudian dihitung dengan metode hitung cawan (*Total Plate Count*, TPC). Jumlah koloni dinyatakan dalam bentuk persentase dengan rumus: $100 - (Nt \times 100 / No)$. Nt adalah jumlah bakteri CFU/mL setelah perlakuan dan No adalah jumlah bakteri CFU/mL sebelum perlakuan. Hasil penelitian didapatkan bahwa tinta murni cumi-cumi dan sotong dengan berbagai konsentrasi tidak menunjukkan daya hambat terhadap bakteri *E. coli*. Sedangkan pada pemberian ekstrak melanin tinta cumi, ketiga konsentrasi memiliki daya hambat sebesar 97,56%; 99,76%; 99,87% secara berurutan sesuai dengan meningkatnya konsentrasi. Untuk ekstrak melanin dari tinta sotong, pada konsentrasi 0,002; 0,006; 0,010 g/mL (dengan konsentrasi lebih rendah dari tinta cumi) menunjukkan daya hambat secara berurutan 0%, 30,23%, 99,99% (Tabel 2). Hal tersebut menunjukkan bakteri *E. coli* lebih sensitif terhadap ekstrak melanin tinta sotong. Hasil penelitian ini menunjukkan aktivitas antibakteri ekstrak melanin tinta sotong lebih tinggi dibandingkan ekstrak melanin tinta cumi.²¹

Tabel 2. Perbandingan daya hambat tinta *Sepia sp.* dan *Loligo sp.* terhadap *E. Coli*.²¹

Sumber	Konsentrasi (g/mL)	% Penghambatan Relatif
Sepia sp.	0,013	-
	0,017	-
	0,020	-
	0,002	-
Melanin	0,006	30,23
	0,010	99,99
	0,013	-
Loligo sp.	0,017	-
	0,020	-
	0,013	97,56
	0,017	99,76
Melanin	0,020	99,87

Pada penelitian lain (Utami *et al*) yang menggunakan ekstrak n-Hexana tinta cumi (*Loligo sp.*) terhadap aktivitas antibakteri terhadap bakteri *E. coli*. Ekstrak n-Hexana kering tinta cumi dibuat dengan melarutkan tinta cumi menggunakan pelarut n-Hexana dengan perbandingan 1:3, menggunakan metode maserasi selama 3x24 jam, dan dikeringkan menggunakan *rotary evaporator* pada suhu 40°C. Ekstrak kering dibuat dalam beberapa konsentrasi yaitu 32%, 16%, 8%, dan 4% dalam bentuk dilusi menggunakan *Dimethyl sulphonyde* (DMSO) 2%. Suspensi bakteri *E. coli* sebanyak 1 ml dicampur dengan *Nutrient Agar* sebanyak 15 ml, kemudian dimasukkan ke dalam cawan petri. Penelitian ini menggunakan kontrol positif (Amoxicillin 4%) dan kontrol negatif (n-hexana dan DMSO 2%). Perhitungan daya hambat dilakukan dengan cara mengukur diameter area inhibisi (halo) yang terbentuk di sekitar *paper disc* yang mengandung ekstrak n-hexana tinta cumi. Hasil uji aktivitas antibakteri didapatkan diameter zona hambat pada metode *paper disc* secara berurutan pada konsentrasi 4%, 8%, 16%, dan 32% adalah 6,3 mm (*intermediat*), 7,8 mm (*intermediat*), 14,5 mm (*susceptible*), dan 10,83 mm (*intermediat*). Pada kontrol negatif (n-hexana dan DMSO 2%) tidak terdapat zona hambat dan pada kontrol positif (Amoxicillin 4%) zona hambat terbentuk 10 mm (Tabel 3). Sehingga didapatkan aktivitas antibakteri ekstrak n-hexana tinta cumi optimal pada konsentrasi 16% dalam menghambat pertumbuhan *E.coli*.¹⁵

Studi Islamy *et al*, menggunakan ekstrak tinta sotong (*Sepia sp.*) terhadap bakteri *Aeromonas hydrophila* untuk melihat aktivitas antibakterinya. Ekstrak tinta kering dibuat dengan cara merendam tinta dengan pelarut methanol (1:3 berat/volume) selama semalam dan disaring

menggunakan kertas filter *Whatman* No.1 kemudian dievaporasi agar menjadi kering. Aktivitas antibakteri diukur dengan menentukan kadar hambat minimum (MIC/*Minimum Inhibitory Concentration*) dengan metode dilusi *Micro Broth* pada konsentrasi 1 ppm, 100 ppm, 150 ppm, 200 ppm, 250 ppm, 300 ppm, dan larutan standar Mc Farland. Pengukuran MIC menggunakan *Spectrophotometer* untuk melihat absorbansi pada masing-masing tabung konsentrasi. Hasil uji MIC menunjukkan bahwa konsentrasi 250 ppm adalah konsentrasi minimum untuk menghambat pertumbuhan bakteri *A. hydrophila*. Kemudian dilanjutkan uji *Disc diffusion assay* dengan konsentrasi 250 ppm, 300 ppm, dan 350 ppm, dan didapatkan hasil diameter zona hambat sebesar 19±0,9 mm, 22±1,4 mm, dan 27±1,6 mm secara berurutan. Pada kontrol positif (*Oxytetracycline*), diameter zona hambat sebesar 31±1,2 mm dan pada kontrol negatif sebesar 5±1,2 mm (Tabel 4).²³

Tabel 3. Daya hambat ekstrak n-hexana tinta cumi (*Loligo sp.*) terhadap *E.coli*.¹⁵

Konsentrasi (%)	Diameter zona hambat (mm)
4	6,3
8	7,83
16	14,5
32	10,83
N-Hexana [kontrol (-)]	-
DMSO 2% [kontrol (-)]	-
Amoxicillin 4% [kontrol (+)]	10

Tabel 4. Daya hambat ekstrak metanol tinta *Sepia sp.* terhadap *Aeromonas hydrophila*.²³

Dosis (ppm)	Zona Hambat (mm)
250	19±0,9
300	22±1,4
350	27±1,6
Kontrol Positif	31±1,2
Kontrol Negatif	5±1,2

Studi Girija *et al*, menggunakan ekstrak tinta cumi india (*Loligo duvauceli*) untuk melihat antibakteri terhadap *E. coli* dan *Klebsiela pneumoniae* yang bersifat *extended spectrum beta lactamases* (ESBL).²⁴ Sampel penelitian berupa tinta cumi (*Loligo duvauceli*) yang diekstrak menggunakan beberapa jenis pelarut yaitu hexana, petroleum eter, kloroform, butanol, etil asetat, aseton, methanol dan etanol. Setiap ekstrak kemudian dimasukkan kedalam *nutrient broth* steril masing-masing 5 mg. Strain *Escherichia coli* (ATCC 25922) dan *Klebsiela pneumoniae* (ATCC 10031) dimasukkan sebagai kontrol. DMSO digunakan sebagai kontrol negatif dan *Ciprofloxacin* (30µg) digunakan sebagai kontrol positif. Uji antibakteri dilakukan dengan

metode Sumur Difusi Agar (*Agar Well Diffusion*). Sebanyak 100 µl inoculum dari masing-masing mikroba disebarluaskan ke dalam *Mueller Hinton Agar* menggunakan L-rod untuk mendapatkan hasil pertumbuhan yang konfluen. Cawan yang telah terisi *Mueller Hinton Agar* dan mengandung bakteri dibiarkan kering dan kemudian dibuat sumur sebesar 8 mm untuk setiap uji. Sebanyak 10 mg masing-masing ekstrak tinta cumi kemudian dilarutkan dalam DMSO. Kemudian masing-masing larutan ekstrak sebanyak 50 µl tersebut dimasukkan kedalam sumur agar yang telah dibuat dan diinkubasi selama 24 jam pada suhu 37°C. Hasil uji antibakteri masing-masing ekstrak ditampilkan pada tabel 5 sebagai berikut.²⁴

Tabel 5. Hasil uji antibakteri masing-masing pelarut ekstrak tinta *L. duvaucelii* (mm).²⁴

Patogen	A	Et	B	H	E	M	CHL	EthAc
<i>E. coli</i> (ATCC 25922)	11	12	15	20	11	12	12	-
<i>K. pneumoniae</i> (ATCC 10031)	12	10	10	23	11	11	12	11
<i>E. coli</i> (ESBL Strain)	-	-	12	18	12	11	12	-
<i>K. pneumoniae</i> (ESBL Strain)	11	12	14	22	10	12	14	12

Ket : A : Aseton; Et : Eter; B : Butana; H : Hexana; E : Etanol; M : Metanol; Chl : Kloroform; EthAc : Etil Asetat. Aktivitas diameter zona hambat (mm): tinggi (>15), sedang (10-14), rendah (5-9), tidak ada (<4).

Hasil uji antibakteri menunjukkan ekstrak Hexana tinta cumi memiliki aktivitas daya hambat yang tinggi terhadap *E. coli* Strain ESBL (18 mm) dan *K. pneumoniae* strain ESBL (22 mm). Demikian pula pada patogen kontrol juga memiliki aktivitas yang tinggi pada *E. coli* ATCC 25922 sebesar 20 mm dan pada *K. pneumoniae* ATCC 10031 sebesar 23 mm. Pada ekstrak tinta cumi butana, etanol, methanol, dan kloroform memiliki daya hambat yang sedang pada semua bakteri patogen. Sedangkan pada ekstrak tinta cumi aseton, eter, dan etil asetat memiliki aktivitas sedang pada *K. pneumoniae* strain ESBL, namun tidak memiliki aktivitas daya hambat pada *E. coli* Strain ESBL.²⁴

Studi Mangindaan *et al* juga melakukan penelitian uji antibakteri tinta cumi (*Loligo sp.*) terhadap bakteri Gram positif yaitu *Streptococcus mutans*. Penelitian ini menggunakan desain *post-test only group design* dengan rancangan *true experimental*. Metode pengujian aktivitas antibakteri dilakukan dengan modifikasi *Kirby-Bauer* dengan kertas saring. Bakteri *Streptococcus mutans* dimasukkan kedalam media agar kemudian diinkubasi selama 24 jam pada suhu 37°C. Koloni bakteri yang terbentuk kemudian diambil menggunakan ose steril dan

dimasukkan kedalam *Brain Heart Infusion Broth* (BHIB) sampai kekeruhannya sama dengan larutan Mc Farland. Kertas saring yang telah dicelupkan kedalam ekstrak tinta cumi kemudian diletakkan diatas MHA yang sudah dikultur bakteri *Streptococcus mutans*. Dengan cara yang sama, kertas saring dicelupkan kedalam antibiotik *Ciprofloxacin* (kontrol positif) dan akuades (kontrol negatif). Kemudian diinkubasi selama 24 jam pada suhu 37°C dan dilakukan pengulangan sebanyak 5 kali. Hasil peneltian didapatkan diameter zona hambat berturut-turut 9,50 mm; 10,10 mm; 9,70 mm; 11,45 mm; dan 11,75 mm. Pada kontrol positif didapatkan berturut-turut 30,60 mm; 28,70 mm; 31,15 mm; 28,75 mm; 30,55 mm; dan pada kontrol negatif tidak terbentuk zona hambat (Tabel 6). Studi ini menyimpulkan bahwa ekstrak tinta cumi (*Loligo sp.*) mampu menghambat pertumbuhan bakteri *Streptococcus mutans* dengan rerata zona hambat sebesar 10,50 mm (sedang) dengan rerata kontrol positif 29,95 mm.⁶

Tabel 6. Daya hambat ekstrak tinta cumi (*Loligo sp.*) terhadap *Streptococcus mutans*.⁶

Pengulangan	Diameter Zona Hambat		
	Ekstrak Tinta Cumi	Kontrol Positif	Kontrol Negatif
1	9,50	30,60	0
2	10,10	28,70	0
3	9,70	31,15	0
4	11,45	28,75	0
5	11,75	30,55	0
Rerata	10,50	29,95	0

Studi lainnya oleh Nithya *et al* melakukan uji daya hambat tinta sotong (*Sepia pharaonis*) pada berbagai jenis bakteri. Sampel tinta sotong dilarutkan kedalam 4 jenis pelarut yaitu Aseton, Kloroform, Butanol, dan Hexana, lalu diekstrak menggunakan kertas saring Whatmann No.1, kemudian dikeringkan. Uji aktivitas antibakteri menggunakan sampel ekstrak kering tinta sotong dan tinta murni dengan metode difusi sumur agar. Uji aktivitasnya menggunakan bakteri Gram (-) yaitu *Escherichia coli*, *Citrobacter sp.*, *Klebsiella pneumoniae* dan bakteri Gram (+) yaitu *Staphylococcus epidermidis* dan *Pseudomonas aeruginosa*. Medium yang digunakan untuk pertumbuhan bakteri adalah Trypton Soya Agar yang telah diinokulasikan suspensi bakteri. Kemudian dibuat sumur berukuran 6 mm. Ekstrak kering tinta sotong dimasukkan sebanyak 0,7 mg dalam 50 µl pelarut pada masing-masing sumur.²⁴ Sedangkan tinta murni sotong dilarutkan dalam

hexana dan dietil eter dengan perbandingan 100:0; 80:20; 60:40; 40:60; dan 20:80.²⁵

Hasil daya hambat ekstrak kering tinta sotong dengan pelarut kloroform didapatkan aktivitas yang maksimal (10 mm) pada *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus epidermidis*, dan *Escherichia coli*. Daya hambat ekstrak kering tinta sotong dengan pelarut hexana menunjukkan hasil yang sama dengan pelarut kloroform. Sedangkan sampel tinta murni sotong tidak memiliki daya hambat yang signifikan terhadap berbagai jenis patogen (Tabel 7 dan 8).²⁵

Tabel 8. Aktivitas antibakteri pada tinta murni *Sepia paraohnis*.²⁵

Patogen	Hexana: Dietil Eter					Metanol: Dietil Eter				
	100:0	80:20	60:40	40:60	Zona Hambat (mm)	20:80	100:0	80:20	60:40	40:60
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	-	-	-	-	-	6,5	-	-	-	-
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	0,5	1,5	2,0	3,0	3,5	5,0	-	-	-	-
<i>Escherichia coli</i>	1,0	1,0	1,0	1,5	3,0	3,5	1,5	2,0	2,5	-

Penelitian oleh Nadarajah *et al* menggunakan ekstrak etanol tinta cumi (*Loligo vulgaris*) untuk menguji aktivitas daya hambat terhadap berbagai bakteri diantaranya *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*, dan *Staphylococcus aureus*. Aktivitas antibakteri diukur dengan metode difusi sumur agar. Ekstrak etanol tinta cumi dibagi menjadi beberapa konsentrasi yaitu 20, 50, 100, dan 200 µg/ml. Empat sumur sebesar 5 mm dibuat dalam agar dengan bantuan *cork broker* steril, kemudian ekstrak etanol tinta cumi dimasukkan dalam sumur untuk setiap konsentrasi. Medium agar yang mengandung bakteri dengan sumur yang telah terisi ekstrak tinta cumi diinkubasi pada 37°C selama 24 jam. Hasil uji aktivitas antibakteri tinta cumi *L. vulgaris* pada konsentrasi 200 µg/ml menunjukkan aktivitas yang tinggi terhadap *Escherichia coli* (28mm), *Klebsiella pneumoniae* (22 mm), *P. aeruginosa* (21 mm), dan *S. aureus* (24 mm). Hasil uji aktivitas tersebut dapat dilihat pada Tabel 9.²⁶

Tabel 9. Daya hambat tinta *Loligo vulgaris* terhadap beberapa patogen.²⁶

Patogen	Zona inhibisi (mm)/Konsentrasi (µg/ml)			
	20	50	100	200
<i>Escherichia coli</i>	14	19	22	28
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	13	15	17	28
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	11	13	16	21
<i>Staphylococcus aureus</i>	12	15	18	24

Dari beberapa penelitian diatas, menunjukkan adanya daya hambat ekstrak tinta cumi dan sotong terhadap berbagai bakteri Gram positif dan Gram negatif. Beberapa bakteri

Tabel 7. Aktivitas antibakteri ekstrak tinta kasar *Sepia paraohnis* dengan berbagai pelarut terhadap beberapa patogen.²⁵

Patogen	Zona Hambat (mm)			
	Aseton	Kloroform	Hexana	Butanol
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	8	10	10	7,4
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	5,2	10	9,3	2,5
<i>Escherichia coli</i>	8	10	10	6,5
<i>Citrobacter sp.</i>	4,5	3,5	7	3,2
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	2,5	5	6,5	5,4

Gram negatif yang digunakan yaitu *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Aeromonas hydrophila* dan *Citrobacter sp*, sedangkan bakteri Gram positif yang digunakan yaitu *Streptococcus mutans*, *Staphylococcus aureus*, dan *Staphylococcus epidermidis*.

KESIMPULAN

Tinta cumi dan sotong mengandung senyawa alkaloid yang memiliki efek antibakteri dengan cara mengganggu komponen peptidoglikan sel bakteri. Berdasarkan studi *in vitro*, tinta cumi dan sotong yang diekstrak dengan pelarut hexana memiliki daya hambat bakteri yang lebih tinggi dibandingkan dengan tinta murni cumi dan sotong. Ekstrak tinta cumi dan sotong mampu menghambat pertumbuhan bakteri Gram positif dan Gram negatif dengan kekuatan daya hambat sedang hingga kuat. Diperlukan penelitian lebih lanjut menggunakan hewan coba (uji preklinik) mengenai ekstrak tinta cumi (*Loligo sp.*) dan sotong (*Sepia sp.*) untuk membuktikan efikasi dan keamanannya sebagai antibakteri.

DAFTAR PUSTAKA

- Yanti M. Prevalensi Multipledrug Resistance Organism (MDRO) Pada Pasien Pasca Operasi di ICU RSUP DR Wahidin Sudirohusodo pada Bulan Januari-September 2017. Fak Kedokt Univ Hasanuddin. 2017;(September).

2. Satari MH. Multidrugs Resistance (MDR) Bakteri terhadap Antibiotik. FKG Univ Padjajaran. 2013;
3. Derby CD. Cephalopod ink: Production, chemistry, functions and applications. Mar Drugs. 2014;12(5):2700–30.
4. Hossain MP, Rabeta MS, Husnul Azan T. Medicinal and therapeutic properties of cephalopod ink: A short review. Food Res. 2019;3(3):188–98.
5. Rajasekharan Nair J, Pillai D, Joseph SM, Gomathi P, Senan P V, Sherief PM. Cephalopod research and bioactive substances. Indian J Mar Sci. 2011;40(1):13–27.
6. Mangindaan RJ, Mintjelungan CN, Pangemanan DHC. Uji Daya Hambat Ekstrak Tinta Cumi-cumi (*Loligo sp*) terhadap Pertumbuhan Bakteri *Streptococcus mutans*. J e-Biomedik. 2019;7(2):5–9.
7. Fatimah Zaharah MY, Rabeta MS. Antioxidant and antimicrobial activities of squid ink powder. Food Res. 2018;2(1):82–8.
8. Zhong JP, Wang G, Shang JH, Pan JQ, Li K, Huang Y, et al. Protective effects of squid ink extract towards hemopoietic injuries induced by cyclophosphamide. Mar Drugs. 2009;7(1):9–18.
9. Sukamto. Pengelolaan Potensi Laut Indonesia (Studi Terhadap Eksplorasi Potensi Hasil Laut Indonesia). Mail J Ekon Islam [Internet]. 2017;9(1):35–62. Available from: <http://yudharta.ac.id/jurnal/index.php/malia>
10. KKP. Kelautan dan Perikanan dalam Angka Tahun 2018. Pusat Data, Statistik dan Informasi Kementerian Kelautan dan Perikanan. 2018. 2–384 p.
11. Agusandi, Supriadi A, Lestari SD. Pengaruh penambahan tinta cumi-cumi. Fishtech. 2013;2(1):22–37.
12. Wulandari DA. Peranan Cumi-Cumi Bagi Kesehatan. Oseana. 2018;43(3):52–60.
13. Riyad Y, Rizk A, Mohammed N. Active components of squid ink and food applications. Egypt J Food Sci. 2020;0(0):0–0.
14. Idris Affandi R, Fadjar M, Wilujeng Ekawati A. Active Compounds on Squid (*Loligo sp.*) Ink Extract Powder as Immunostimulant Candidate to Against Shrimp Disease. Res J Life Sci. 2019;6(3):150–61.
15. Utami DR, Irwan I, Agustina S, Karina S, Afriani S. Antibacterial activity of Escherichia coli from Squid Ink (*Loligo sp.*) n-Hexane Extracts. IOP Conf Ser Earth Environ Sci. 2021;869(1).
16. Sari RC, Wijayanti I, Agustini TW. The Effectiveness of Melanin from Squid Ink (*Loligo sp.*) as Antibacterial Agent Against Escherichia coli and Listeria monocytogenes. IOP Conf Ser Earth Environ Sci. 2019;246(1).
17. Besednova NN, Zaporozhets TS, Kovalev NN, Makarenkova ID, Yakovlev YM. Cephalopods: The Potential for Their Use in Medicine. Russ J Mar Biol. 2017;43(2):101–10.
18. Jeyasanta I, Patterson J. Bioactive Properties of Ink Gland Extract from Squid *Loligo duvauceli*. Ecologia. 2019;10(1):91919.
19. Arum YSS. Isolasi dan Uji Daya Antimikroba Ekstrak Daun Kersen (*Muntingia calabura*). J MIPA Unnes. 2013;35(2):115048.
20. Fitrial Y, Khotimah IK, L. Antibacterial Activity of Melanin from Cuttlefish and Squid Ink. 2017;20:266–74.
21. Sahalan AZ, Abdul AH, Lian HH, Mohamed MK. Divalent Cations (Mg²⁺, Ca²⁺) Protect Bacterial Outer Membrane Damage by Polymyxin B. Sains Malaysiana. 2013;42(3):301–6.
22. Islamy RA. Antibacterial Activity of Cuttlefish *Sepia* sp. (Cephalopoda,) Ink Extract Against *Aeromonas hydrophila*. Maj Obat Tradis. 2019;24(3):184.
23. Girija Smiline AS, Vijayshree Priyadarshini J, Pandi Suba K, Hariprasad P, Raguraman R. Antibacterial effect of squid ink on ESBL producing strains of *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae*. Indian J Mar Sci. 2012;41(4):338–43.
24. Nithya M, Ambikapathy V, Panneerselvam A. Effect of pharaoh's cuttlefish ink against bacterial pathogens. Pelagia Res Libr Asian J Plant Sci Res [Internet]. 2011;1(4):49–55. Available from: www.pelagiaresearchlibrary.com
25. Nadarajah SK, Radha V, Mani J. Therapeutic Significance of *Loligo vulgaris* (Lamarck, 1798) Ink Extract: A Biomedical Approach. Pharmacognosy Res. 2017;9(December):105–9.