

**PERTUMBUHAN DAN POTENSI GAMMA-AMINOBUTYRIC ACID (GABA)
ISOLAT BAKTERI ASAM LAKTAT HASIL ISOLASI PANGAN FERMENTASI
BERBASIS IKAN CAKALANG (*INASUA*) DARI MALUKU**

Adde Lolita Octavia Putri¹, Endang Kusdiyantini¹ dan Sri Pujiyanto¹

¹Laboratorium Bioteknologi, Departemen Biologi, Fakultas Sains dan

Matematika Universitas Diponegoro Jl. Prof. H. Soedarto, SH

Tembalang, Semarang, Indonesia

e-mail: Ade.lolita98@gmail.com

ABSTRAK

GABA merupakan asam amino non-protein yang didistribusikan secara luas pada tanaman, hewan dan mikroorganisme. GABA dapat meningkatkan konsentrasi plasma, hormon pertumbuhan dan sintesis protein di dalam otak. Beberapa studi telah menunjukkan bahwa BAL dapat mengurangi kondisi patologis akibat stres oksidatif, yang mengindikasikan bahwa BAL memiliki aktivitas antioksidan. Salah satu metabolit yang dihasilkan BAL adalah GABA. Tujuan penelitian ini adalah mengetahui kemampuan produksi *Gamma-Aminobutyric Acid* (GABA) dan pertumbuhan isolat INS-A2 dan INS-A4 hasil isolasi dari *inasua*. Pertumbuhan bakteri dilakukan selama 60 jam 37°C. Produksi GABA dapat diketahui secara kualitatif dengan metode Kromatografi Lapis Tipis (KLT) menggunakan lempeng KLT alumunium (Silica gel F254, Merck, Mumbai India). Inokulum BAL dibuat dengan 2 perlakuan yaitu dengan penambahan MSG 2% dan tanpa MSG dalam MRSB disentrifugasi pada kecepatan 6.000 rpm selama 20 menit pada suhu 4°C, supernatan dispotkan atau diteteskan pada lempeng KLT. KLT dilakukan menggunakan larutan pengembang (eluen) yang terdiri dari campuran n- butanol:asam asetat:akuades dengan perbandingan 5:3:2. Senyawa GABA yang dihasilkan oleh isolat BAL dapat dilihat dari nilai *Retention factor* (Rf) yang sama dengan standar GABA yang digunakan yaitu Rf isolat INS-A2 dan INS-A4 = 0,62, Rf MSG = 0,23 sedangkan standar GABA (Pregabalin) 0,62. Konsentrasi GABA tertinggi dimiliki oleh isolat INS-A2 sebesar 20,005 mg/ml.

Kata kunci : *inasua*, KLT, GABA, Bakteri Asam Laktat

ABSTRACT

GABA is a non-protein amino acid that is widely distributed in plants, animals and microorganisms. GABA can increase plasma concentration, growth hormone and protein synthesis in the brain. Several studies have shown that LAB can reduce pathological conditions due to oxidative stress, which indicates that LAB has antioxidant activity. One of the metabolites produced by BAL is GABA. The purpose of this study was to determine the production capacity of Gamma-Aminobutyric Acid (GABA) and the growth of INS-A2 and INS-A4 isolates from inasua. Bacterial growth is carried out for 60 hours 37°C. GABA production can be known qualitatively by Thin Layer Chromatography (TLC) method using aluminum TLC plates (Silica gel F254, Merck, Mumbai India). BAL inoculum was made with 2 treatments, namely with the addition of 2% MSG and without MSG in MRSB centrifuged at a speed of 6.000 rpm for 20 minutes at 4°C, the supernatant was dispensed or dripped on the TLC plate. TLC is carried out using a solution of the developer (eluent) consisting of a mixture of n-butanol: acetic acid: distilled water with a ratio of 5: 3: 2. GABA compounds produced by BAL isolates can be seen from the value of Retention factor (Rf) which is the same as the GABA standard used, namely Rf isolates INS-A2 and INS-A4 = 0.62, MSG Rf = 0.23 while GABA (Pregabalin) standards 0.62. The highest GABA concentration was obtained by INS-A2 isolates of 20,005 mg / ml.

Keyword: *inasua*, TLC, GABA, Lactic Acid Bacteria

1. Pendahuluan

Produk fermentasi secara tradisional telah dimiliki oleh masing- masing daerah, salah satunya berupa olahan produk ikan fermentasi tradisional yaitu inasua. Inasua adalah ikan yang diasinkan secara basah berasal dari Pulau Teon, Nila, dan Serua (TNS) di Maluku Tengah. Pembuatan *inasua* dengan cara fermentasi tertutup menggunakan tambahan garam sebagai bahan pengawet. Pembuatan inasua berbahan dasar ikan laut seperti ikan kakatua, cakalang, kerong- kerong, bobara, ekor kuning dll (Nendissa, 2001). Bakteri asam laktat erat kaitannya dengan proses fermentasi pangan dan saat ini telah berkembang dalam industri pangan fermentasi. Bakteri asam laktat dapat di isolasi dari makanan fermentasi salah satunya inasua. Bakteri asam laktat merupakan kelompok bakteri yang paling banyak dimanfaatkan dalam bidang industri karena mempunyai

keunggulan jika dibanding kelompok lainnya. Peran utama bakteri asam laktat dalam fermentasi adalah menghasilkan asam pada pangan yang difermentasi. Asam tersebut dapat menghambat pertumbuhan bakteri-bakteri penyebab penyakit (bakteri patogen) dan bakteri pembusuk makanan (Smid dan Gorris, 2007). Pertumbuhan mikroba merupakan pertambahan jumlah atau volume serta ukuran sel. Dalam pertumbuhannya, mikroba terutama bakteri dan khamir berkembang biak dengan membelah dari satu sel menjadi dua sel. Pertumbuhan sel bakteri biasanya mengikuti suatu pola pertumbuhan tertentu berupa kurva pertumbuhan sigmoid. Kurva pertumbuhan bakteri dapat dipisahkan menjadi 4 fase utama, yaitu: fase lag (fase lambat), fase eksponensial (fase cepat), fase stasioner (fase statis), dan fase penurunan populasi (decliner) (Handayani *et al.*, 2016). Beberapa studi telah menunjukkan bahwa BAL dapat mengurangi kondisi patologis akibat stres oksidatif yang mengindikasikan bahwa BAL memiliki aktivitas antioksidan. Salah satu metabolit yang dihasilkan BAL yang dapat berperan sebagai antioksidan adalah GABA. Fungsi sebagai antioksidan ditunjukkan oleh galur *Lactobacillus plantarum* DM5 dalam kemampuannya menghasilkan *Gamma- Aminobutyric Acid* (Das and Goyal, 2004).

Gamma-Aminobutyric Acid (GABA) adalah asam amino non-protein yang didistribusikan secara luas di alam dan dihasilkan secara ireversibel melalui α -dekarboksilasi asam L-glutamat dalam suatu reaksi yang dikatalisasi oleh enzim glutamat dekarboksilase (GAD). *Glutamic Acid Decarboxylase* (GAD) adalah enzim yang mengkatalisis dekarboksilasi glutamat menjadi GABA dan CO₂. GAD dan GABA dapat ditemukan secara luas pada semua organisme, mulai dari organisme terkecil seperti bakteri hingga organisme yang lebih tinggi. GABA dikenal sebagai penghambat neurotransmitter dalam sistem syaraf pusat mamalia (Ueno *et al.*, 2000). Tingkat GABA yang abnormal dapat menimbulkan gangguan tidur, gangguan makan, gangguan kejang termasuk epilepsi (Carole, 2004). Keberadaan gen GDH yang bertanggungjawab untuk memproduksi asam glutamat yang menjadi kelebihan BAL dari mikroba lainnya (Sano, 2009). GABA dapat diproduksi dari Bakteri Asam Laktat seperti *Lactobacillus brevis*, *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus delbrueckii* dilaporkan memiliki aktivitas enzim *glutamate decarboxylase* dan kemampuan menghasilkan GABA dalam konsentrasi 10-350 mmol/L tergantung konsentrasi monosodium glutamat dalam medium fermentasi (Li and Cao, 2010). BAL dapat menghasilkan GABA karena aktivitas enzim GAD yang dimilikinya (Cotter and Hill, 2003).

Kromatografi Lapis Tipis (KLT) merupakan metode analisa yang cukup sederhana karena dapat menentukan jumlah komponen yang ada pada suatu bahan, bahkan dapat mengidentifikasi komponen – komponen tersebut (Soebagio,2002). Prinsip kerja KLT memisahkan sampel berdasarkan perbedaan kepolaran antara sampel dengan pelarut yang digunakan. Teknik ini biasanya menggunakan fase diam dalam bentuk plat silica dan fase geraknya disesuaikan dengan jenis sampel yang ingin dipisahkan. Larutan atau campuran larutan yang digunakan dinamakan eluen. Semakin dekat kepolaran antara sampel dengan eluen maka sampel akan semakin terbawa oleh fase geraknya tersebut (Sohibul, 2010).

Identifikasi GABA dapat dilakukan dengan cara Kromatografi Lapis Tipis (KLT), spektrofotometer UV-VIS dan *High Performance Liquid Chromatography* (HPLC). Mengingat pertumbuhan BAL dan fungsi penting GABA, maka penelitian ini akan menguji pertumbuhan, potensi GABA dan mengetahui karakter isolat BAL hasil isolasi dari makanan fermentasi berbasis ikan cakalang (inasua) yang berasal dari Maluku. Penelitian ini menggunakan metode Kromatografi Lapis Tipis (KLT).

2. Metodologi

2.1 Peremajaan isolat BAL

Bakteri asam laktat diperoleh dari koleksi Laboratorium Bioteknologi, Universitas Diponegoro. Peremajaan isolat dilakukan dengan cara menanam isolat yang telah dipreservasi dalam lemari es kedalam medium MRS agar dengan metode streak kuadran lalu diinkubasi pada suhu 37°C selama 48 jam. Streak kuadran bertujuan untuk memurnikan kembali isolat yang telah lama disimpan, untuk menghindari terjadinya kontaminasi oleh mikroorganisme yang tidak diinginkan. Isolat BAL yang telah diperoleh selanjutnya dilakukan karakterisasi secara biokimia yang meliputi uji pewarnaan Gram, katalase, fermentasi, motilitas dan pembentukan asam. Uji tersebut mengindikasikan ciri-ciri dari Bakteri asam laktat pada umumnya.

2.2 Pembuatan Kurva Pertumbuhan BAL

a. Pembuatan starter

Pembuatan starter untuk kurva pertumbuhan sebagai berikut; isolat INS-A2 dan INS-A4 diinokulasikan dengan jarum ose bulat, sebanyak 1 ose ke dalam media MRSB dalam volume 25 ml. Setelah itu diinkubasi pada *rotary shaker* selama ± 24 jam, kecepatan 150 rpm pada suhu 37°C sampai jumlah sel 10^7 CFU/ml yang diukur dengan densitas optic

(OD) sampai nilai 1 pada panjang gelombang 600 nm (Velmuragan *et al.*, 2009).

b. Kurva Pertumbuhan isolat BAL

Setelah jumlah sel mencapai 10^7 CFU/ml kemudian diambil sebanyak 5% (v/v) starter dipindahkan ke 100 ml medium MRSB dengan penambahan MSG 2% dan tanpa MSG 2%, setelah itu diinkubasi pada *rotary shaker* selama 60 jam kecepatan 150 rpm pada suhu 37°C. Setiap 6 jam sekali dilakukan pengambilan sampel untuk diamati pertumbuhan sel. Kurva pertumbuhan dibuat dengan menghitung jumlah sel dengan metode spektrofotometri. Kultur bakteri pada medium pertumbuhan diambil 4 ml setiap 6 jam sekali inkubasi 60 jam, Setelah itu diukur absorbansi menggunakan spektrofotometri dengan panjang gelombang 600 nm. Selanjutnya dibuat grafik untuk pengukuran pertumbuhan bakteri.

2.3 Kurva Produksi Senyawa GABA

Kultur bakteri pada medium pertumbuhan masing-masing diambil 4 ml setiap 6 jam sekali pada inkubasi selama 60 jam, pemisahan antara supernatan dan selnya menggunakan sentrifugasi dengan kecepatan 6.000 rpm suhu 4°C selama 20 menit (Handayani *et al.*, 2014). Supernatan yang telah diperoleh selanjutnya diukur dengan spektrofotometer pada panjang gelombang 425 nm. Hasil nilai absorbansi yang diperoleh akan dihitung untuk pengukuran konsentrasi GABAnya.

2.4 Kurva Standar Konsentrasi GABA

Pembuatan kurva baku menggunakan larutan pregabalin 150 mg, 225 mg, 300 mg, 375 mg dan 459 mg dilarutkan dalam 20 ml aquades, sehingga didapatkan konsentrasi 7,5 mg/ml, 11,25 mg/ml, 15 mg/ml, 18,75 mg/ml, 22,5 mg/ml selanjutnya diukur menggunakan spektrofotometri dengan panjang gelombang 425 nm. Nilai absorbansi yang diperoleh digunakan untuk membuat kurva standar sehingga didapatkan persamaan R^2 . Hasil $Y = ax + b$ digunakan untuk mendapatkan nilai konsentrasi GABA.

2.5 Identifikasi produksi GABA dengan Metode KLT

Identifikasi produksi GABA oleh kultur BAL dilakukan dengan metode Kromatografi Lapis Tipis (KLT) dengan menggunakan larutan MSG 2% sebagai penanda. Kultur bakteri dalam medium MRSB hasil fermentasi dipindahkan ke masing-masing tabung sentrifugasi sebanyak 2ml. Sentrifugasi dilakukan pada kecepatan 6.000

rpm dengan suhu 4°C selama 20 menit. Supernatan yang dihasilkan dipindah ke dalam tube baru.

Konsentrasi larutan MSG dibuat dengan cara mengencerkan sebanyak 2 g MSG ke dalam 100 ml akuades untuk didapatkan konsentrasi 2% MSG. Sebanyak 4 µl konsentrasi MSG dispotkan atau diteteskan pada lempeng TLC menggunakan pipet kapiler, larutan pregabalin 75 mg sebagai kontrol positif, supernatan isolat INS-A2 MSG 2%, INS-A2 non MSG, supernatan INS-A4 MSG dan non MSG 2% secara berurutan diteteskan pada lempeng TLC. Running TLC selama 30 menit. TLC dilakukan menggunakan larutan pengembang (eluen) yang terdiri dari campuran n- butanol: asam asetat: akuades dengan perbandingan 5:3:2 (Qiu *et al*, 2010). Setelah selesai, lempeng TLC disemprot menggunakan larutan ninhydrin 0,5% (w/v) dan kemudian dikering anginkan. Senyawa GABA yang dihasilkan oleh isolat BAL dapat dilihat dari nilai Retention factor (Rf) yang sama dengan larutan pregabalin sebagai larutan standar GABA yang digunakan (Ganguli 2011). Nilai Rf standar GABA yaitu 0,61 (Yogeswara *et al.*,2018).

Menurut Rosang dan Billy (2016), perhitungannya adalah sebagai berikut:

$$R_f = \frac{\text{Jarak antara titik awal dan pusat spot yang dihasilkan}}{\text{Jarak antara titik awal dengan jarak yang ditempuh pengembang}}$$

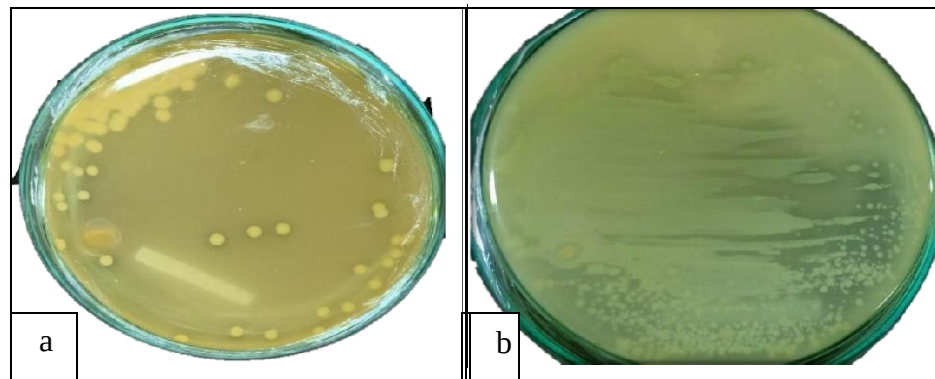
3. Hasil

3.1 Isolat BAL dari Inasua

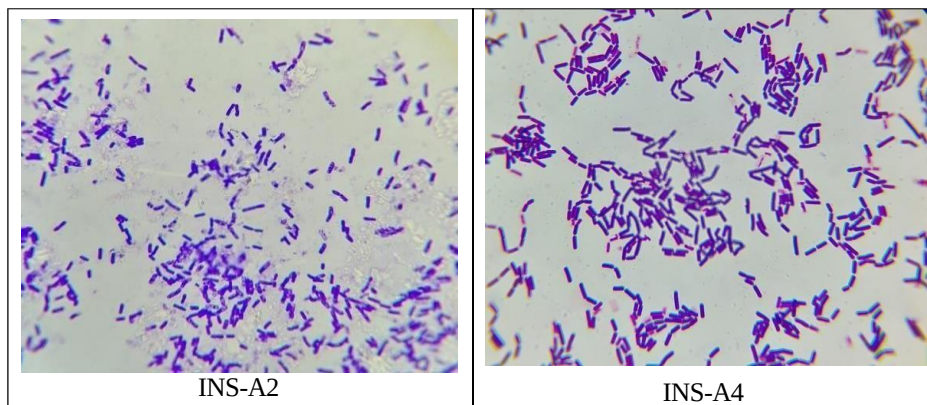
Isolat BAL yang ditemukan dari hasil isolasi inasua dari penelitian yang telah dilakukan sebelumnya oleh (Putri dan Kusdiyantini, 2018) didapatkan 2 isolat yaitu INS-A2 dan INS-A4 yang selanjutnya dilakukan karakterisasi lebih lanjut. Isolat BAL yang berhasil diisolasi menggunakan media MRSA + CaCO₃ dilihat berdasarkan zona bening disekitar koloninya. BAL adalah bakteri yang mampu menghasilkan asam laktat pada media pertumbuhannya. BAL yang didapatkan dari hasil isolasi yaitu 2 isolat kemudian dilakukan uji pewarnaan Gram, katalase, motilitas dan tipe fermentasi dari isolat INS-A2 dan INS-A4.

Identifikasi dilakukan terhadap isolat yang diperoleh dengan berpedoman pada *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*, BAL memiliki karakteristik Gram positif, non spora, katalase negatif, dan non motil (Holt *et al.*, 1994 dalam Laily,2013).

Hasil karakterisasi isolat INS-A2 dan INS-A4 disajikan pada Tabel 4.1.



Gambar 3.1 Isolat BAL a) INS-A2 b) INS-A4 secara makroskopis



makroskopis

Gambar 3.2 Isolat BAL secara Mikroskopis Tabel 3.1 Karakteristik Isolat BAL

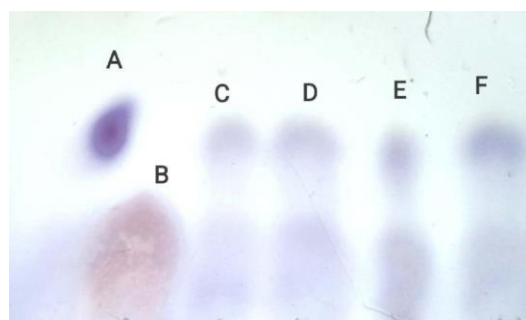
Pengamatan	Isolat	
	INS-A2	INS-A4
Pewarnaan Gram	(+)	(+)
Bentuk Sel	Batang	Batang
Motilitas	(-)	(-)
Katalase	(-)	(-)
Tipe Fermentasi	HM	HM

HM = homofermentatif

3.2 Identifikasi GABA dengan Metode KLT

Kultur BAL dalam medium produksi hasil fermentasi 60 jam dipindahkan ke dalam botol sentrifugasi. Sentrifugasi bertujuan untuk memisahkan sel-sel bakteri agar diperoleh ekstrak berupa supernatan. Senyawa GABA dapat ditentukan secara kualitatif dengan metode KLT menggunakan lempeng KLT alumunium (Merck). Sebanyak 4-5 tetes supernatan dispotkan atau diteteskan pada lempeng KLT menggunakan pipet kapiler dan dikeringanginkan. Setelah spotting, lempeng KLT direndam larutan eluen (larutan pengembang) n- butanol : asam asetat : air dengan perbandingan 5:3:2 kemudian disemprot dengan larutan ninhydrin 0,5% (w/v-etanol) sebagai reagen pewarna, akan terbentuk spot berwarna ungu. Fase gerak yang digunakan dalam penelitian ini sesuai dengan penelitian Qiu and Cao (2009) dengan perbandingan n butanol, asam asetat glasial dan air (5:3:2) dan ditambahkan nihidrin.

Spot warna ungu menunjukkan adanya senyawa kimia yang terseparasi oleh fase gerak eluen dan terwarnai oleh larutan pewarna. Spot nomer 1 menunjukkan pregabalin dengan konsentrasi 75 mg, spot nomor 2 menunjukkan larutan MSG, spot nomor 3-4 menunjukkan isolat INS-A2 non MSG dan INS-A2 MSG, spot 5-6 menunjukkan isolat INS-A4 MSG dan non MSG. Menurut Kook and Cho (2013) spot dari GABA dan MSG dapat secara mudah dikonfirmasi dengan larutan standar GABA karena GABA dan MSG terdeteksi dengan titik (spot) warna ungu ketika disemprot dengan larutan ninhydrin. Nilai R_f pregabalin yang dihasilkan setelah diukur yaitu ($R_f=0,62$), MSG ($R_f= 0,25$), sedangkan isolat INS-A2 MSG dan non MSG serta INS-A4 MSG dan non MSG dihasilkan ($R_f = 0,62$). Nilai R_f isolat sama dengan nilai R_f pregabalin yang membuktikan bahwa semua isolat tersebut mampu menghasilkan GABA.



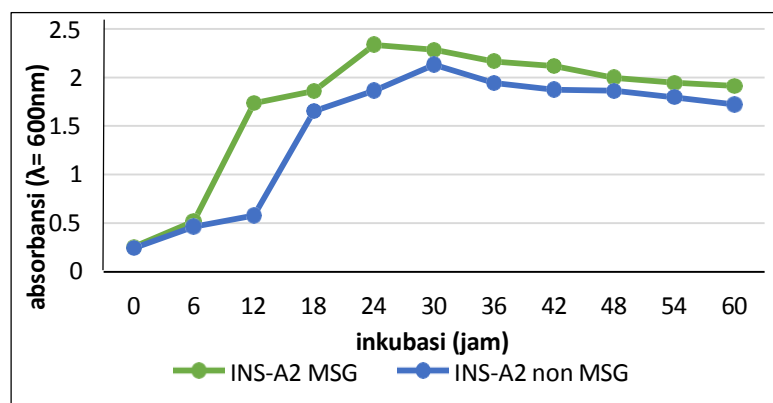
Gambar 3.3 Hasil KLT GABA a) Pregabalin, b) MSG, c) INS-A4 MSG, d) INS-A4 non MSG, e) INS-A2 MSG, f) INS-A2 non MSG

Berdasarkan penelitian yang dilakukan oleh Yogeswara *et al.*, (2018) tentang

identifikasi GABA dari enam isolat BAL (IFK-10, IFK-11, IFK-12, FN-12, FN-14, FN-15) yang berasal dari fermentasi *soy beans* dan ikan menunjukkan identifikasi GABA dengan metode TLC dengan nilai R_f standar GABA yang sama dengan ke enam isolat ($R_f = 0,61$). Eluen yang digunakan dalam identifikasi GABA dengan TLC yaitu butanol: asam asetat: akuades (5:3:2). Beberapa strain atau spesies BAL telah dilaporkan sebagai bakteri penghasil GABA. Hampir semua strain atau spesies bakteri penghasil GABA diisolasi dari makanan fermentasi tradisional seperti Nham (Ratanaburee *et al.*, 2013), keju Italia (Siragusa *et al.*, 2007), dan paocai (Li *et al.*, 2008). Selain itu, Siragusa *et al.* (2007) melaporkan bahwa hanya empat isolat BAL seperti *L. paracasei* PF6, *L. bulgaricus* PR1, *L. lactis* PU1 dan *L. brevis* PM17 diisolasi dari berbagai variasi keju dengan produksi GABA tertinggi dan menunjukkan tingkat GABA tertinggi.

3.3 Pertumbuhan BAL

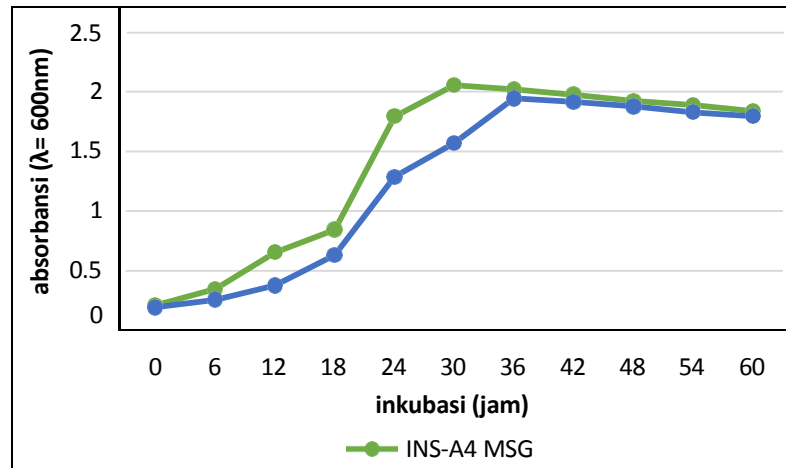
Beberapa faktor lingkungan yang mempengaruhi pertumbuhan asam laktat adalah kadar garam, suhu, pH dan tersedianya karbohidrat sebagai sumber makanan (Pelczar dan Chan, 2005). Pertumbuhan yang ideal bagi bakteri asam laktat perlu dibuat suatu kondisi yang optimal. Isolat di inkubasi selama 60 jam pada suhu 37°C untuk mengetahui kurva pertumbuhan. Pengukuran pertumbuhan BAL isolat INS-A2 dan INS-A4 yang diberi perlakuan dengan penambahan MSG 2% dan tanpa MSG di media MRSB. (Gambar 3.4)



Gambar 3.4. Pertumbuhan isolat BAL INS-A2 MSG dan non MSG pada media MRSB

Gambar 3.4. Fase log isolat INS-A2 MSG dimulai jam ke 0 sampai 12, sedangkan INS-A2 non MSG fase log ditunjukkan jam ke 0 hingga jam ke 24. Pertumbuhan BAL

isolat INS-A2 MSG mencapai fase stationer akhir pada penyimpanan 42 jam dengan nilai absorbansi 2.1, sedangkan isolat INS-A2 non MSG pada jam ke 48 absorbansi 1,8. Fase kematian terjadi pada jam ke 48 untuk isolat INS-A2 MSG dan jam ke 54 untuk isolat INS-A2 non MSG.



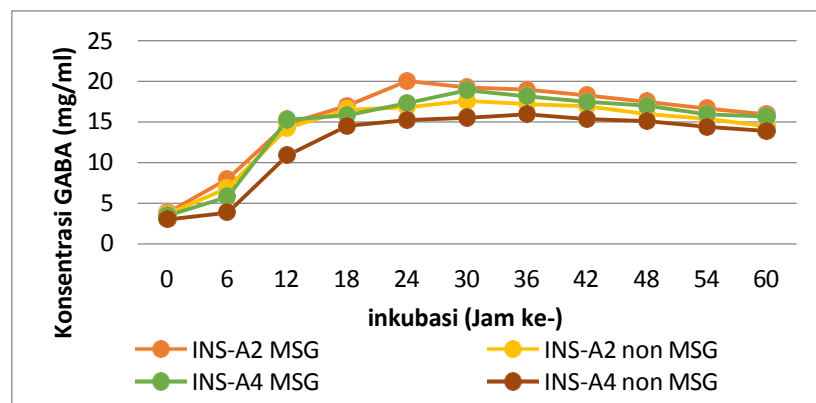
Gambar 3.5 Pertumbuhan isolat BAL INS-A4 MSG dan non MSG pada media MRSB

Gambar 3.5. Fase log isolat INS- A4 MSG dimulai jam ke 0 sampai 24, sedangkan isolat INS-A4 non MSG dimulai jam ke 0 sampai 30. Pertumbuhan BAL isolat INS-A4 MSG dan non MSG mencapai fase stationer pada jam 48. Hal ini sesuai dengan Yuliana (2008) yang menyatakan, mikroba yang dipindahkan ke dalam suatu media akan mengalami fase adaptasi untuk menyesuaikan diri dengan kondisi lingkungan di sekitarnya. Panjang atau pendeknya fase adaptasi sangat ditentukan oleh jumlah sel yang diinokulasikan, kondisi fisiologis dan morfologis yang sesuai serta media kultivasi yang dibutuhkan. Menurut Hidayati (2010) ukuran sel fase stasioner menjadi lebih kecil karena sel tetap membelah meskipun nutrisi habis, fase ini laju pertumbuhan akan menurun karena kekurangan faktor pertumbuhan seperti vitamin dan unsur mineral. Pertumbuhan berhenti juga dapat disebabkan berkurangnya beberapa nutrisi esensial dalam media atau karena terjadinya akumulasi autotoksin dalam media atau kombinasi dari keduanya. Setelah fase logaritmik pertama dapat terjadi akumulasi produk yang tidak diharapkan yang keberadaannya dapat menghambat pertumbuhan sel. Asam organik yang dihasilkan oleh BAL seperti asam laktat, asam asetat, atau asam piruvat mengakibatkan akumulasi produk akhir asam dan turunnya pH yang

menyebabkan penghambatan pertumbuhan. Produk-produk yang mungkin dapat menghambat pertumbuhan selain asam laktat, juga dapat berupa karbondioksida, dan komponen-komponen netral lainnya.

3.4 Produksi GABA

Produksi GABA dilakukan menggunakan medium MRSB yang ditambah *Mono Sodium Glutamate* (MSG) sebanyak 2% dan tanpa MSG sebagai substrat untuk produksi GABA oleh isolat bakteri asam laktat. Supernatan yang telah diperoleh diukur dengan spektrofotometer pada panjang gelombang 425 nm. Hasil nilai absorbansi yang diperoleh akan dihitung untuk pengukuran konsentrasi GABANYA. Hasil pengukuran produksi GABA dapat dilihat pada (Gambar 3.6)



Gambar 3.6 Produksi GABA isolat BAL INS-A2 dan INS-A4 pada media MRSB

Hasil diatas menunjukkan bahwa konsentrasi GABA tertinggi dari masing- masing isolat dengan waktu produksi yang berbeda-beda. Isolat INS-A2 MSG dengan nilai 20,005 mg/ml tertinggi pada jam ke 24, isolat INS- A2 non MSG 17,581 mg/ml pada jam 30, INS-A4 MSG 18,879 mg/ml pada jam 30 dan INS-A4 non MSG 15,941

mg/ml pada jam ke 36. Dapat disimpulkan bahwa isolat dengan penambahan MSG 2% dalam media produksi dapat mempercepat pertumbuhan dan produksi GABA yang dihasilkan lebih tinggi dibanding isolat yang ditumbuhkan tanpa MSG 2%. Berdasarkan konsentrasi GABA yang diperoleh dari kedua isolat menunjukkan INS-A2 MSG maupun non MSG memiliki konsentrasi yang lebih tinggi dibanding INS-A4. MSG digunakan sebagai substrat untuk produksi GABA oleh BAL. Glutamat mempunyai prinsip meningkatkan neurotransmitter pada sistem syaraf pusat (Ganguli, 2011). Mikroorganisme

penghasil GABA khususnya BAL mendapat perhatian besar karena potensinya dalam memproduksi GABA untuk memperkaya makanan.

Penelitian tentang GABA konsentrasi tinggi dengan mikroorganisme masih dalam progres. BAL yang diisolasi dari makanan fermentasi seperti kimchi dan makanan laut (*seafood*) dapat memproduksi GABA dengan substrat asam glutamat. *PharmaFood company* (Japan) telah memproduksi GABA dengan penambahan monosodium glutamat menggunakan BAL dari kimchi dan dipasarkan sebagai bahan makanan fungsional. *Lactobacillus brevis* IFO 12005 yang diisolasi dari kimchi untuk Soju jugemi yang dibuat dari beras memproduksi 6,3 mM GABA (Ueno *et al.*, 1997; Yokoyama *et al.*, 2002), 302 mM GABA dengan penambahan fosfat piridoksal sebagai koenzim dari GAD oleh *Lb. paracasei* NFRI7415 dari makanan fermentasi tradisional Jepang Funasushi (Komatsuzaki *et al.*, 2005). Penelitian yang telah dilakukan oleh Lim *et al.* (2017), Produksi GABA dari *L. brevis* HYE1 yang dikulturkan selama 60 jam pada suhu 30°C pada media MRSB 200 ml dengan penambahan 1% MSG dengan interval 12 jam sekali menghasilkan GABA optimal pada jam ke -36 dengan konsentrasi 16,94 mM. GABA merupakan salah satu metabolit sekunder yang dihasilkan oleh bakteri asam laktat dan memiliki aktivitas antioksidan. BAL dapat menghasilkan GABA karena aktivitas enzim GAD yang dimilikinya (Cotter and Hill, 2003).

4. Kesimpulan

- 5.1 Pertumbuhan isolat BAL INS-A2 dan INS-A4 diberi perlakuan dengan penambahan MSG dan non MSG 2%. Pertumbuhan isolat INS-A2 MSG tertinggi jam ke 24, INS-A2 non MSG tertinggi jam ke 30. Pertumbuhan isolat INS-A4 MSG tertinggi jam ke 30 dan INS-A4 non MSG tertinggi jam ke 36.
- 5.2 Konsentrasi GABA tertinggi dimiliki oleh isolat INS-A2 MSG sebesar 20,005 mg/ml. Isolat INS-A2 non MSG 17,581 mg/ml, INS-A4 MSG 18,879 mg/ml dan INS-A4 non MSG 15,941 mg/ml.
- 5.3 Karakterisasi BALisolat INS-A2 dan INS-A4 memiliki katalase negatif, motilitas negatif, pewarnaan Gram positif, uji tipe fermentasi (homofermentatif) yang sesuai dengan ciri-ciri BAL pada umumnya.

Daftar Pustaka

- Abe Y, Umemura S, Sugimoto K, Hirawa N, Kato Y, Yokoyama T, Iwai J and Ishii M. 1995. Effect of green tea rich in γ -aminobutyric acid on blood pressure on Dahl salt-sensitive rats. *Am. J. Hypertens.* 8: 74-79.
- Anju P, Moothedath I, and Shree ABR. 2014. *Gamma-aminobutyric acid* accumulation in medicinal plants. *Anc Sci Life.* 34(2): 68-72.
- Bae MO. 2008. Effect of Kimchi lactic acid bacteria with high GABA producing capacity on liver function of rats administered with ethanol. *Master thesis*, Chonbuk National Univ. Jeonju, Korea.
- Chen, H. and Hoover, D.G. 2003. *Bacteriocins and their food application*. Comprehensive Reviews in food science and food safety.
- Cho YR, Chang JY, Chang HC. 2007. Production of *gammaaminobutyric acid* (GABA) by *Lactobacillus buchneri* Isolated from kimchi and ITS neuroprotective effect on neuronal cells. *J Microbiol Biotechnol.* 17: 104- 109.
- Cotter PD, Hill C. 2003. Surviving the acid text: responses of grampositive bacteria to low pH. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 67: 429– 453.
- Das D, Goyal A. 2015. Antioxidant activity and *gamma-aminobutyric acid* (GABA) producing ability of probiotic *Lactobacillus plantarum* DM5 isolated from Marcha of Sikkim. *LWT - Food Sci Technol.* 61: 263-268.
- Dhakal R, Vivek KB, and Kwang HB. 2012. Production of GABA (*γ -Aminobutyric Acid*) by Microorganisms: A Review. *Brazilian Journal of Microbiology.* 1230-1241.
- Djide MN dan Wahyudin E. 2008. Isolasi bakteri asam laktat dari air susu ibu, dan potensinya dalam penurunan kadar kolesterol secara in vitro. *Majalah farmasi dan Farmakologi.* 12 (3): 73-78
- Elvira I, Wahyuni S dan Asyik N. 2016. Karakterisasi sifat biokimia isolat bakteri asam laktat yang dihasilkan dari proses fermentasi Wikau Maombo. *J. Sains dan Teknologi Pangan.* 1 (2): 121-124.
- Ganguli A. 2011. *Evaluation of γ -Aminobutyric acid production by indigenously isolated lactic acid bacteria*. Departemen of Biotechnology and Environmental Sciences, Thapar University Patiala, India.
- Guerra NP, Bernadez PF, Mendez J, Cachaldora P, Castro LP. 2006. Production of four potentially probiotic lactic acid bacteria and their evaluation as feed additives for weaned piglets. *Anim Feed Sci Technol.* 134: 89- 107.

- Handayani R, Sulistiani dan Setianingrum N. 2016. Identifikasi produksi GABA dari kultur Bakteri asam laktat (BAL) dengan Metode TLC. *Pros Sem Nas Masy Biodiv Indon.* 2 (2): 209-213
- Hayakawa K, Kimura M, Kasaha K, Matsumoto K, Sansawa H and Yamori Y. 2004. Effect of γ -aminobutyric acid enriched dairy product on the blood pressure of spontaneously hypertensive and normotensive Wistar-Kyoto rats. *Br. J. Nutr.* 92: 411-417.
- Hidayati D. 2010. Pola pertumbuhan bakteri asam laktat selama fermentasi susu kedelai. *Jurnal Teknologi Hasil Pertanian.* 3 (2): 72-76.
- Holt JG, Krieg NR, Sneath PH, Stanley JT, & Williams ST. 1994. *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology. Ninth Edition.* Williams and Wilkins : New York.
- Holzappel WH. and Wood BJB. 1995. Lactic Acid Bacteria in Contemporary Perspective. *in The Genera of Lactic Acid Bacteria.* Blackie Academic & Professional, London.
- Komatsuzaki N, Shima J, Kawamoto S, Momose H, Timura T. 2005. Production of γ -aminobutyric acid (GABA) by *Lactobacillus paracasei* Isolated from traditional fermented foods. *Food Microbiol.* 22: 497-504.
- Kono I and Himeno K. 2000. Changes in γ -aminobutyric acid content during beni-koji making. *Biosci Biotechnol Biochem.* 64: 617-619.
- Kook MC and Cho SC. 2013. Production of GABA (*gamma amino butyric acid*) by lactic acid bacteria. *Korean J. Food Sci. An.* 33 (3): 377-389
- Laily IN, Utami R, Widowati E. 2013. Isolasi dan karakterisasi bakteri asam laktat penghasil riboflavin dari produk fermentasi sawi asin. *Jurnal Teknologi Pangan.* 2 (4). 179-184
- Lestyo W. 2011. *Kromatografi Lapis Tipis.* Jember: PT. Taman Kampus Presindo.
- Leverentz B, Conway WS, Kurtzman CP, and Mary JC 2006. Biocontrol of the food-borne pathogens *Listeria monocytogenes* and *Salmonella enterica* serovar poona on fresh-cut apples with naturally occurring bacterial and yeast antagonists. *Applied and environmental Microbiology.* 72 (2) :1135-1140.
- Li H, Qiu T, Gao D, Cao Y. 2010. Medium optimization for Production of *Gamma-Aminobutyric Acid* by *Lactobacillus brevis* NCL912. *Amino Acids.* 38: 1439–1445.

- Li H, Gao D, Cao Y, Xu H. 2008. A high γ -aminobutyric acid producing *Lactobacillus brevis* isolated from Chinese traditional paocai. *Ann. Microbiol.* 58 (4): 649-653.
- Lim HS, Cha.I, Roh.S.W, Shin H and Myung JS. 2017. Enhanced production of *gamma-aminobutyric acid* by optimizing culture conditions of *Lactobacillus brevis* HYE1 isolated from Kimchi, a Korean fermented food. *J. Microbiol. Bioechnol.* 27 (3): 450-459.
- Luscher B, and Keller CA. 2004. Regulation of GABA A receptor trafficking, channel activity, and functional plasticity of inhibitory synapses. *Pharmacology and Therapeutics.* 102 (3): 195-221.
- Machmud D. 2001. Teknik penyimpanan dan pemeliharaan mikroba. *Buletin AgroBio* 4 (1): 24-32.
- Madigan MT, Martinko JM, Stahl DA, Clark DP. 2012. *Biology of Microorganism.* 13th ed. San Francisco: Pearson.
- Munazil, 2008. *Kimia Analitik II.* Yogyakarta. Universitas Yogyakarta.
- Nakamura T, Matsubaysahi T, Kamachi K, Hasegawa T, Ando Y, and Omori M. 2000. γ -aminobutyric acid (GABA)- rich chlorella depresses the elevation of blood pressure in spontaneously hypertensive rats (SHR). *J. Agr. Chem. Soc. Jpn.* 74: 907-909.
- Nasution FS, 2012. Identifikasi dan Karakterisasi Bakteri Asam Laktat Pada Kotoran Ayam Boiler Sebagai Agensi Probiotik. *Skripsi.* Universitas Negeri Medan.
- Nara S, Ijong F, Suwetja IK, and Onibala H. 2013. Inasua, a fermented salted fish product from central Moluccas. *Aquat Sci Manag.* 1 (2): 160-164.
- Nendissa JS. 2001. Pemanfaatan kultur *Pediococcus acidilactici* F11 penghasil bakteriosin untuk memperbaiki kualitas inasua (ikan asin) gurame (*Osphoremus gouramy Lacepede*). *thesis.* Yogyakarta: Universitas Gajah Mada
- Nendissa JS. 2013. Pengaruh penambahan *Pediococcus acidilactici* F11 sebagai kultur starter terhadap kualitas ikan asin (*ina sua*) bae (*Lutjanus malabaricus*). *Ekosains.* 2 (1): 39-46.
- Noonpakdee W, Jumriangrit P, Wittayakom K, Zendo J. 2009. Two-peptide bacteriocin from *Lactobacillus plantarum* PMU 33 strain isolated from som-fak, a Thai low salt fermented fish product. *Asia Pasific Journal of Molecular.*
- Pelczar MJ dan Chan ECS. 2005. "*Dasar-dasar Mikrobiologi I*". UI Press, Jakarta.

- Putri A, Kusdiyantini E. 2018. Isolasi dan identifikasi bakteri asam laktat dari pangan fermentasi berbasis ikan (nasua) yang diperjualbelikan di Maluku-Indonesia. *Jurnal Biologi Tropika*. 1 (2): 6-12.
- Qiu T, Li H, and Cao Y. 2010. Pre-Staining Thin Layer Chromatography method for amino acid detection. *African Journal of Biotechnology*. 9 (50): 8679-8681.
- Raharjo S. 2012. Isolasi dan identifikasi bakteri asam laktat (BAL) dari usus halus itik Mojosari (*Anas platyrhynchos*). *Skripsi*, Jurusan Biologi Universitas Islam negeri Maulana Malik Ibrahim Malang.
- Rahayu E. 2001. Potensi bakteri asam laktat di bidang industri pangan. *Prosiding Seminar Ilmiah Tahunan Perhimpunan Mikrobiologi Indonesia*.
- Rahayu WP, Ma'oen S, Suliantari, Fardiaz S. 1992. *Teknologi Fermentasi Produk Perikanan*. Bogor: PAU Pangan dan Gizi.
- Ratanaburee A, Kantachote D, Charernjiratrakul W and Sukhoom A. 2013. Enhancement of γ -aminobutyric acid (GABA) in Nham (Thai fermented pork sausage) using starter cultures of *Lactobacillus namurensis* NH and *Pediococcus pentosaceus* HN8. *International Journal of Food Microbiology*. 167: 170-176.
- Roberts MR. 2007. Does GABA act as a signal in plants? Hints from molecular studies. *Plant Signa. Behav.* 2: 408–409.
- Rosang CI dan Wagey BT. 2016. Penentuan kandungan pigmen klorofil pada lamun jenis *Halophila ovalis* di perairan Malalayang. *Jurnal pesisir dan laut tropis*. 1(1):15-19.
- Rongzhen Z, Taowei Z, Zhiming R, Hongmei S, Meijuan X, Xian z, Xu Z, and Shangtian Y. 2014. Efficient one- step preparation of γ -aminobutyric acid from glucose without an exogenous cofactor by the designed *Corynebacterium glutamicum*. *Green Chem.* 16: 4190-4197.
- Sano C. 2009. History of glutamate production. *Am. J. Clin. Nutr.* 90: 728S–732S.
- Santoso E. 2008. Bakteri asam laktat (BAL) pada cumi-cumi kering asin dan aktivitas penghambatan bakteri patogen dan bakteri pembusuk. *Jurnal Agroteksos*. 18 (1): 46-53
- Siragusa S, Angelis MD, Cagno RD, Rizzello CG, Coda R. and Gobbetti M. 2007. Synthesis of γ -Aminobutyric acid by lactic acid bacteria isolated from a variety of Italian cheeses. *Applied and Environmental Microbiology*. 7283-7290.

- Smid EJ and Gorris LG. 2007. *Natural antimicrobials for food preservation*. In: M. S. Rahman (Ed.). Handbook of Food Preservation. 2nd ed. CRC Press, New York.
- Surono, Ingrid S. 2004. *Probiotik, Susu Fermentasi dan Kesehatan*. PT. Tri Cipta Karya: Jakarta.
- Suryani Y dan Oktavia B. 2010. Biologi dan pengembangan profesi pendidik biologi, Isolasi dan karakterisasi bakteri asam laktat dari limbah kotoran ayam sebagai agensi probiotik dan enzim kolestrol Reduktase, *Prosiding 3 Juli 2010*.
- Soebagio. 2002. *Kimia Analitik II*. JICA. Malang.
- Ueno Y, Hayakawa K, Takahashi S, Oda K. 1997. Purification and characterization of glutamate decarboxylase from *Lactobacillus brevis* IFO 12005. *Biosci Biotechnol Biochem*. 61: 1168-1171.
- Utama CS, Zuprizal, Hanim C, Wihandoyo. 2018. Isolasi dan identifikasi bakteri asam laktat selulolitik yang berasal dari jus kubis terfermentasi. *Jurnal aplikasi teknologi pangan*. 7 (1): 1-6
- Waluyo L. 2008. *Teknik Metode Dasar Dalam Mikrobiologi*. UMM Press, pp. 222-258.
- Wibowo MS. 2012. Pertumbuhan dan Kontrol Bakteri. *Jurnal Pertumbuhan Bakteri*.
- Willey MJ, Sherwood LM, Woolverton CJ. 2008. *Microbiology 7th Edition*. Mc. Graw Hill. New York.
- Yanti DIW, Faiza AD. 2013. Karakterisasi bakteri asam laktat yang di isolasi selama fermentasi Bekasang. *JPHPI*. 16 (2)
- Yogeswara AIB, Kusumawati IGA, Sumadewi NLU, Rahayu ES and Indrati R. 2018. Isolation and identification of lactic acid bacteria from Indonesian fermented foods as γ -aminobutyric acid producing bacteria. *International Food Research Journal*. 25 (4): 1753-1757.
- Yokoyama S, Hiramatsu J, Hayakawa K. 2002. Production of γ -aminobutyric acid by *Streptococcus salivarius* subsp. *Thermophiles* Y2 under submerged fermentation. *Amino Acids*. 34: 473-478.
- Yousef AE and Carolyn C. 2003. *Food Microbiology: A Laboratory Manual*. Wiley-Interscience, John Wiley and Sons, Inc. Ohio State University. USA. 223-224.
- Yuliana N. 2008. Kinetika pertumbuhan bakteri asam laktat Isolat T5 yang berasal dari Tempoyak. *Jurnal Teknologi Industri dan Hasil Pertanian*. 13 (2).
- Yulinery T, Petria IY, Novik N. 2009. Penggunaan antimikroba dari isolat *Lactobacillus* terseleksi sebagai bahan pengawet alami untuk menghambat pertumbuhan *Vibrio*

Sp. dan *Staphylococcus aureus* pada fillet Ikan Kakap. *Jurnal Berk. Penel. Hayati* : 15: 85-92.