

NICHE Journal of Tropical Biology

Available online: <https://ejournal2.undip.ac.id/index.php/niche>

Deteksi Gamma-Aminobutyric Acid (GABA) pada bakteri asam laktat hasil isolasi produk fermentasi petis ikan dari Rembang

Detection of Gamma-Aminobutyric Acid (GABA) in lactic acid bacteria from the isolation of Rembang's fermented fish paste

Agni Rizqy Berliyanti^a, Agung Suprihadi^a, dan Endang Kusdiyantini^{a,*}

^aDepartemen Biologi Fakultas Sains dan Matematika, Universitas Diponegoro, Semarang
Jl. Prof. H. Soedarto, SH., Tembalang Semarang 50275 Indonesia

ABSTRACT

Fish paste is a traditional fermented product made from fish broth that is cooked until thick. Paste is included in the type of cooking spices and food ingredients in the form of pasta, elastic and brown or black. Fish paste is included in traditional fermented foods. Food fermentation process is closely related to the presence of Lactic Acid Bacteria (LAB). Lactic Acid Bacteria (LAB) is known to produce antioxidant compounds namely Gamma-Aminobutyric Acid (GABA). Gamma-Aminobutyric Acid (GABA) is a non-protein amino acid which is produced by decarboxylation of glutamate by the enzyme glutamate decarboxylase and is widely distributed in nature among microorganisms, plants, and animals. The purpose of this study was to obtain LAB isolates that produce GABA. Isolation was carried out by the streak method of fish paste samples which had been stratified diluted and planted on MRSA + 1% CaCO₃ media, incubated at 37°C for 48 hours. The pure isolates obtained were macroscopic and microscopic characterization of colonies and cells. LAB growth on MRSB media was carried out for 60 hours at 37°C, then identified the production of GABA qualitatively by Thin Layer Chromatography (TLC) using aluminum TLC plates (Silica gel F254, Merck, Mumbai India). Developer solution (eluent) consisting of a mixture of n-butanol: acetic acid: distilled water in a ratio of 5: 3: 2. The results of isolation obtained 2 isolates of Lactic Acid Bacteria which were coded PTS-A2 and PTA-A3. Both LAB isolates that produce GABA compounds can be seen from the value of Retention factor (Rf) in TLC, namely Rf PTS-A2 and PTS-A3 isolates = 0.65, Rf MSG = 0.45 while the GABA (Pregabalin) standard is 0.65.

Keywords: fish paste, isolation, LAB, GABA, TLC.

ABSTRAK

Petis ikan merupakan produk fermentasi tradisional yang terbuat dari kaldu ikan yang dimasak hingga pekat. Petis termasuk dalam jenis bumbu masak dan bahan campuran makanan berbentuk pasta, elastis dan berwarna coklat atau hitam. Petis ikan termasuk dalam makanan fermentasi tradisional. Proses fermentasi pangan erat kaitannya dengan adanya Bakteri Asam Laktat (BAL). Bakteri Asam Laktat (BAL) diketahui dapat menghasilkan senyawa antioksidan yaitu *Gamma-Aminobutyric Acid* (GABA). *Gamma-Aminobutyric Acid* (GABA) adalah asam amino non-protein yang diproduksi melalui dekarboksilasi glutamat oleh enzim *glutamate decarboxylase* dan tersebar luas di alam diantara mikroorganisme, tumbuhan dan hewan. Tujuan penelitian ini untuk mendapatkan isolat BAL yang menghasilkan GABA. Isolasi dilakukan dengan metode streak dari sampel petis ikan yang telah diencerkan bertingkat dan ditanam pada media MRSA + 1% CaCO₃, diinkubasi pada suhu 37°C selama 48 jam. Isolat murni yang diperoleh dilakukan karakterisasi makroskopik dan mikroskopik pada koloni dan sel. Pertumbuhan BAL pada media MRSB dilakukan selama 60 jam pada suhu 37°C, kemudian diidentifikasi produksi GABA secara kualitatif dengan metode Kromatografi Lapis Tipis (KLT) menggunakan lempeng KLT aluminium (Silica gel F254, Merck, Mumbai India). Larutan pengembang (eluen) yang terdiri dari campuran n-butanol: asam asetat: akuades dengan perbandingan 5:3:2. Hasil isolasi diperoleh 2 isolat Bakteri Asam Laktat yang diberi kode PTS-A2 dan PTA-A3. Kedua isolat BAL yang menghasilkan senyawa GABA dapat dilihat dari nilai *Retention factor* (Rf) pada KLT yaitu Rf isolat PTS-A2 dan PTS-A3 = 0,65, Rf MSG = 0,45 sedangkan standar GABA (Pregabalin) 0,65.

Keywords: petis ikan, isolasi, BAL, GABA, KLT.

*Penulis korespondensi: kusdiyantini@yahoo.com

Diterima September 2019, Disetujui Oktober 2019

Disarankan menyitasi artikel ini sebagai: Natalia et al, *NICHE J Trop Bio* (2020) 3(2) x-x

I. PENDAHULUAN

Indonesia merupakan negara yang memiliki sumber daya alam yang berpotensi dalam perekonomian melalui sektor kelautan dan perikanan. Salah satunya yaitu terdapatnya olahan dari limbah cair pemindangan ikan dengan proses fermentasi yang disebut petis ikan. Menurut Morita *et al.*, dalam Agustina *et al.*, (2011), limbah cair pengolahan perikanan mengandung berbagai jenis protein yang bergizi tinggi namun belum dapat dimanfaatkan secara optimal. Limbah yang dihasilkan berupa air industri perikanan mengandung protein 13,22%, lemak 2,10%, abu 2,60%, serpihan daging dan komponen lainnya yang hilang selama pemasakan. Limbah yang dihasilkan dari industri ini sering kali di buat petis.

Petis merupakan produk olahan yang termasuk dalam kelompok saus yang menyerupai bubur kental, liat dan elastis, berwarna hitam atau cokelat tergantung pada jenis bahan yang digunakan serta merupakan produk pangan yang mempunyai tekstur setengah padat (*Intermediate Moistured Food*) (Astawan, 2004 dalam Danitasari, 2010). Petis ikan merupakan salah satu makanan tradisional yang banyak terdapat di daerah Rembang. Petis ikan tersebut termasuk bahan pangan perangsang yang memberi rasa dan aroma pada makanan atau bahan pangan yang digunakan karena rasanya yang khas dan merupakan salah satu produk hasil proses fermentasi. Proses fermentasi pangan erat kaitannya dengan adanya bakteri asam laktat. Peran utama bakteri asam laktat dalam fermentasi adalah menghasilkan asam pada pangan yang difermentasi (Smid dan Gorris, 2007).

Bakteri Asam laktat (BAL) yaitu kelompok bakteri gram positif, katalase negatif yang dapat memproduksi asam laktat dengan cara memfermentasi karbohidrat, selnya berbentuk kokus, tersusun berpasangan atau berbentuk rantai, tidak bergerak, tidak berspora, anaerob fakultatif, bersifat non motil dan mesofil (Ray, 2004). Bakteri Asam Laktat (BAL) merupakan kelompok bakteri yang paling banyak dimanfaatkan dalam bidang industri, karena mempunyai beberapa keunggulan jika dibandingkan kelompok lainnya (Handayani, 2016). BAL juga diketahui dapat menghasilkan senyawa antioksidan. Fungsi sebagai antioksidan ditunjukkan oleh galur *Lactobacillus plantarum* DM5, dalam kemampuannya menghasilkan γ -aminobutyric acid (GABA) (Das and Goyal, 2004).

GABA adalah asam amino non-protein yang diproduksi melalui dekarboksilasi glutamat oleh enzim *glutamate decarboxylase* dan terdistribusi secara luas di alam diantara mikroorganisme, tumbuhan dan hewan (Ueno, 2000). GABA berperan sebagai neurotransmitter penghambat utama dalam sistem syaraf pusat mamalia. GABA meningkatkan konsentrasi plasma, hormon pertumbuhan, dan sistesis protein di dalam otak (Cho *et al.*, 2007). Konsumsi makanan yang diperkaya GABA dapat menghambat proliferasi sel kanker (Park dan Oh, 2007) dan meningkatkan daya ingat serta kemampuan belajar (Miura *et al.*, 2006). Identifikasi GABA dapat dilakukan dengan cara Kromatografi Lapis Tipis (KLT), spektrofotometer UV-VIS dan *High Performance Liquid Chromatography* (HPLC).

Penelitian terhadap produk petis ikan ini sangat jarang dilakukan sehingga penelitian terhadap aspek mikrobiologis dari produk tersebut menjadi sangat penting dilakukan. Oleh karena itu, penelitian ini bertujuan untuk mengetahui deteksi senyawa GABA pada BAL hasil isolasi produk fermentasi petis ikan dari Rembang dengan menggunakan metode Kromatografi Lapis Tipis (KLT).

II. MATERI DAN METODE

Isolasi

Isolasi petis ikan dilakukan dengan mengambil secara aseptik sebanyak satu gram petis ikan yang berbentuk pasta dan dimasukkan ke dalam wadah steril lalu ditambahkan aquades 9 mL (pengenceran 10^{-1}), kemudian dibuat seri pengenceran untuk 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} . Perhitungan total bakteri dengan metode *spreat* pada media MRSA di cawan petri, lalu diinkubasi pada suhu 37°C selama 48 jam. Koloni yang tumbuh diambil menggunakan jarum ose dan ditanam kembali di cawan petri untuk dimurnikan dengan metode *streak*. Pemurnian dilakukan pada media MRSA + CaCO_3 1%, dan diinkubasi kembali pada suhu 37°C selama 24 jam. Pemurnian ini dilakukan sampai terbentuk koloni yang tumbuh terpisah atau tunggal dari bakteri tersebut. Setiap isolat bakteri asam laktat diberi kode isolat untuk penamaan.

Karakterisasi Isolat BAL

Karakterisasi dilakukan dengan cara makroskopis dan mikroskopis, serta uji biokimia. Karakteristik makroskopis dengan mengamati morfologi koloni meliputi bentuk, warna, tepi, serta elevasi koloni bakteri. Karakteristik

mikroskopis dengan serangkaian metode pewarnaan Gram sel bakteri lalu diamati dibawah mikroskop cahaya dengan perbesaran 1000x.

Uji biokimia dilakukan dengan uji katalase, uji motilitas, dan uji tipe fermentasi. Uji katalase dengan isolat dari agar miring diambil satu ose, kemudian dioleskan pada gelas benda yang telah diberi alkohol. Gelas benda ditetesi dengan larutan H_2O_2 3%. Diamati terbentuknya gelembung gas pada preparat. Jika terdapat gelembung gas berarti uji katalase tersebut positif. Uji motilitas dengan cara isolat dari agar miring ditusukkan dalam media *Nutrient Broth* yang mengandung agar 0,5 % (semi solid) kemudian diinkubasi selama 48 jam pada suhu 30°C dan diamati. Uji motilitas positif jika pertumbuhan koloni menyebar luas pada agar. Uji tipe fermentasi dengan satu koloni isolat bakteri ditumbuhkan pada media *MRS broth* dalam tabung reaksi yang diberi tabung durham. Biakan diinkubasi selama 48 jam pada suhu 37°C. Bakteri yang menampung gas dalam tabung durham dinyatakan sebagai heterofermentatif, sedangkan yang tidak menampung gas dinyatakan homofermentatif.

Pembuatan Kurva Pertumbuhan BAL

Pembuatan kurva baku pertumbuhan BAL dilakukan untuk mengetahui jumlah sel bakteri yang ditunjukkan oleh nilai absorbansi pada λ 600 nm dan waktu inkubasi. Pembuatan starter dengan cara isolat BAL (stok) diaktivasi dengan cara mengambil dua ose dan dimasukkan ke dalam 100 mL medium MRSB dan diinkubasi pada *rotary shaker* kecepatan 150 rpm selama 24 jam pada suhu 37°C. Setelah jumlah sel mencapai 10^7 CFU/ml kemudian diambil 5% starter dan dipindahkan ke dalam 100 ml medium MRSB tanpa penambahan MSG 1%, selanjutnya diinkubasi pada *rotary shaker* kecepatan 150 rpm pada suhu 37°C selama 60 jam. Setiap enam jam sekali di ambil empat ml kemudian diukur absorbansinya menggunakan spektrofotometri dengan panjang gelombang 600 nm. Kurva pertumbuhan dibuat dengan cara menghubungkan antara waktu pertumbuhan sebagai sumbu x, dan nilai absorbansi sebagai sumbu y.

Pembuatan Produksi GABA

Pembuatan produksi GABA dilakukan dengan mengambil masing- masing empat ml sampel pada medium MRSB + MSG 1% dan medium MRSB non MSG 1% setiap enam jam sekali pada medium pertumbuhan yang diinkubasi dalam *rotary shaker* selama 60 jam, kemudian masing – masing ditempatkan pada tabung sentrifugasi (tabung *ependorf*) dan dilakukan pemisahan antara supernatan dan selnya dengan sentrifugasi pada kecepatan 6.000 rpm, suhu 4°C selama 15 menit (Handayani *et al.*, 2014). Penambahan Monosodium Glutamat (MSG) digunakan sebagai substrat untuk produksi GABA oleh bakteri asam laktat (Handayani *et al.*, 2014). Selanjutnya supernatan yang diperoleh diukur menggunakan spektrofotometer dengan λ 425 nm untuk mengetahui nilai absorbansinya. Hasil nilai absorbansi yang diperoleh digunakan untuk mengukur konsentrasi GABA.

Deteksi Produksi GABA

Deteksi produksi GABA oleh kultur BAL dilakukan dengan metode Kromatografi Lapis Tipis atau *Thin Layer Chromatography* (TLC). Lempeng TLC yang berukuran 5x2,5 cm diberi garis menggunakan pensil sebagai penanda awal. Garis dari tepi lempeng TLC berjarak satu cm. Garis penanda awal diberi tanda titik sebanyak lima titik dengan jarak satu cm menggunakan pensil untuk tempat *spotting* sampel. Setiap titik diberi tanda berupa angka satu hingga lima.

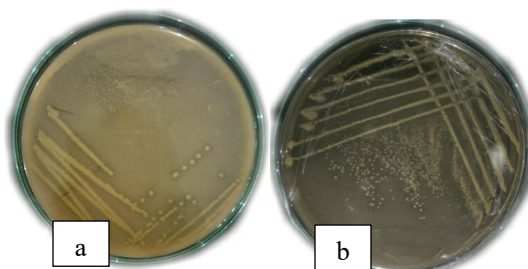
Konsentrasi larutan MSG dibuat dengan cara mengencerkan sebanyak 0,10 g MSG ke dalam 10 mL aquades untuk didapatkan konsentrasi 1% MSG. Sebanyak empat μ l seri konsentrasi MSG dispotkan atau ditetaskan pada lempeng TLC aluminium menggunakan pipet kapiler, larutan standar GABA (pregabalin 75mg), supernatan isolat, supernatan kontrol secara berurutan ditetaskan pada lempeng TLC. “*Running*” TLC selama 15 menit. TLC dilakukan menggunakan larutan pengembang (*eluen*) yang terdiri dari campuran n-butanol : asam asetat : aquades dengan perbandingan 5:3:2. Fase gerak yang digunakan dalam metode TLC yaitu n-butanol, asam asetat glasial dan air dengan perbandingan 5:3:2 (Qiu *et al.*, 2010).

Lempeng TLC yang telah disemprot menggunakan larutan ninhydrin 0,5% (w/v), kemudian dipanaskan dalam oven hingga 110°C selama \pm 10 menit. GABA standar akan terdeteksi dengan ninhydrin sebagai bercak/spot merah setelah plat dikeringkan pada suhu 60°C setelah penyemprotan dengan reagen ninhydrin (Kook & Cho, 2013 dalam Indrowati *et al.*, 2015). Senyawa GABA yang dihasilkan oleh isolat BAL dapat dilihat dari nilai *Retention factor* (Rf) yang sama dengan standar GABA yang digunakan (Ganguli, 2011).

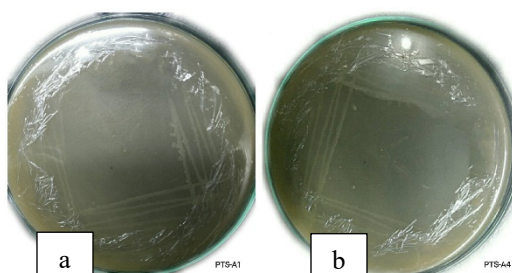
III. HASIL

Isolasi Petis Ikan

Isolasi pangan fermentasi petis ikan dilakukan dengan mengencerkan sampel dari 10^{-1} sampai 10^{-4} yang dituang pada media MRSA + CaCO_3 1% dan diinkubasi selama 48 jam suhu 37°C . Koloni yang tumbuh diambil menggunakan jarum ose dan ditanam kembali dicawan untuk dimurnikan dengan metode *streak*. Pemurnian dilakukan sampai terbentuk koloni yang tumbuh terpisah atau tunggal dari bakteri tersebut. Hasil dari tahap isolasi dan pemurnian didapatkan empat isolat, dua diantaranya terlihat jelas terbentuk zona bening disekeliling koloni (Gambar 1) dan dua yang lainnya tidak jelas terbentuk zona bening (Gambar 2).



Gambar 1. Morfologi Koloni Isolat (a)PTS-A2 ; (b) PTS-A3



Gambar 2. Morfologi Koloni Isolat (C) PTS-A1 ; (D) PTS-A4

Karakterisasi BAL dari Petis Ikan

Karakterisasi isolat BAL dilakukan dengan pengamatan morfologi koloni dan selnya. Ciri morfologi koloni bakteri yang diamati pada isolat bakteri meliputi warna, bentuk, tepi dan elevasi, serta untuk mengetahui morfologi selnya dilakukan pewarnaan Gram. Hasil karakterisasi ditunjukkan pada Tabel 1. Kedua isolat tersebut (PTS-A2 dan PTS-A3) merupakan Bakteri Asam Laktat karena memiliki ciri bentuk sel batang atau bulat, gram positif, dengan uji biokimia katalase negatif, uji motilitas negatif atau non motil dan uji tipe fermentasi homofermentasi.

Pertumbuhan Isolat BAL

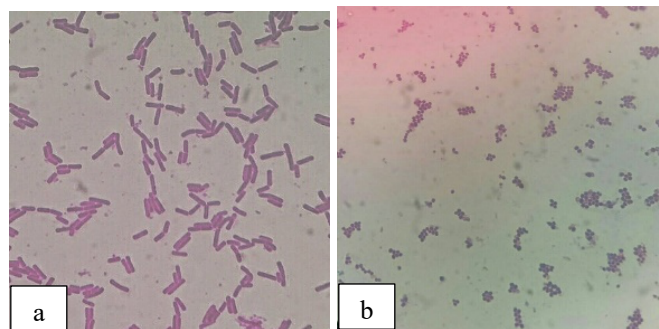
Pembuatan kurva pertumbuhan bertujuan untuk mengetahui laju pertumbuhan BAL yang diukur dengan spektrofotometri λ 600 nm dengan melihat nilai absorbansinya.

Gambar 4. merupakan kurva pertumbuhan BAL dari isolat PTS-A2 dan PTS-A3, dimana dapat diketahui terjadinya fase pertumbuhan, dari fase lag, fase log, fase stationer dan fase kematian. Fase lag pada PTS-A2 terjadi pada jam ke-0 sampai jam ke-6, sedangkan pada PTS-A3 terjadi pada jam ke-0 sampai jam ke-12. Fase log PTS-A2 terjadi pada jam ke-6 sampai jam ke-18, sedangkan pada PTS-A3 terjadi pada jam ke-12 sampai jam ke-30. Fase stationer pada PTS-A2 terjadi pada jam ke-18 sampai jam ke-42 dan PTS-A3 terjadi pada jam ke-30 sampai jam ke-42. BAL akan memasuki fase kematian yang dilihat dari penurunan laju pertumbuhan pada kurva pertumbuhan yang dapat dilihat pada PTS-A2 mulai jam ke-48 sampai jam ke-60, begitu juga pada PTS-A3 mulai penurunan pada jam ke-48 sampai jam ke-60.

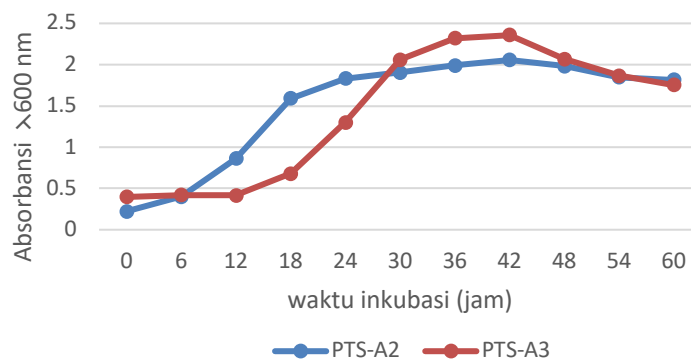
Tabel 1. Karakterisasi Isolat

Karakteristik		Kode Isolat	
		PTS-A2	PTS-A3
Ciri Morfologi Koloni	Warna	krem	Putih
	Bentuk	bulat	bulat
	Tepi	rata	rata
	Elevasi	cembung	cembung
Ciri Morfologi Sel	Bentuk Sel	batang	bulat
	Pewarnaan Gram	positif	positif
Uji Biokimia	Katalase	(-)	(-)
	Motilitas	(-)	(-)
	Tipe Fermentasi	HM	HM

Keterangan : HM = homofermentatif ; (-) = menunjukkan uji negatif ; (+) = menunjukkan uji positif (Putri, et al., 2014).



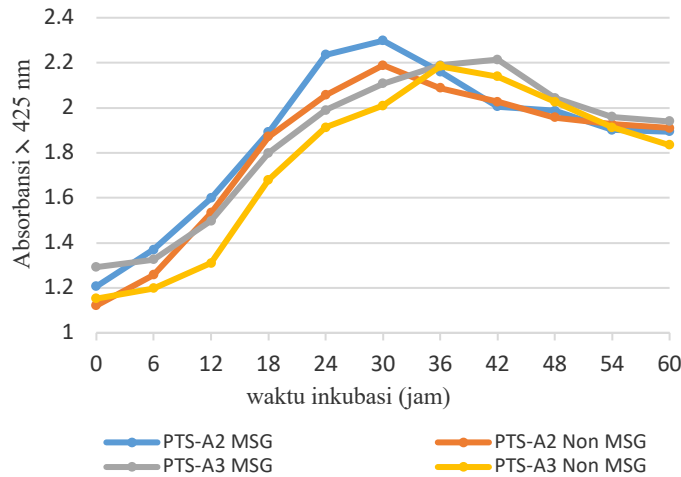
Gambar 3. Morfologi sel isolat BAL (a) PTS-A2 ; (b) PTS-A3 perbesaran 1000x



Gambar 4. Pertumbuhan isolat BAL selama inokulasi 60 jam

Produksi GABA

Produksi GABA dilakukan menggunakan medium fermentasi MRS cair yang ditambah Mono Sodium Glutamate (MSG) sebanyak 1% dan tanpa penambahan MSG. Kondisi kultur optimal sangat diperlukan dalam produksi GABA. GABA diukur dengan spektrofotometer pada λ 425 nm. Produksi GABA dapat dilihat pada (Gambar 5).

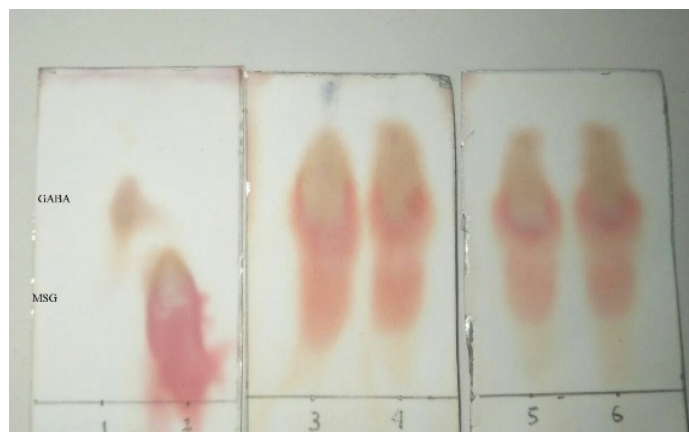


Gambar 5. Produksi GABA isolat BAL

Produksi GABA tertinggi pada PTS-A2 yang ditambah MSG 1% dan PTS-A2 non MSG 1% di tunjukkan pada jam ke-30 dengan masing – masing nilai absorbansi 2,298 dan 2,189, sedangkan produksi GABA tertinggi pada PTS-A3 yang ditambah MSG 1% ditunjukkan pada jam ke-42 dengan nilai absorbansi 2,214 dan pada PTS-A2 non MSG ditunjukkan pada jam ke-36 dengan nilai absorbansi 2,184.

Deteksi GABA dengan Metode KLT

Hasil deteksi senyawa GABA dapat ditentukan secara kualitatif dengan metode KLT menggunakan lempeng KLT aluminium yang direndam pada larutan eluen n-butanol : asam asetat : aquades dengan perbandingan 5:3:2 dan di *running* selama 15 menit, kemudian disemprot dengan ninhydrin 0,5%, dan panaskan dalam oven suhu 60°C hingga terbentuk spot warna merah yang ditunjukkan pada Gambar 6.



Gambar 6. Deteksi GABA dengan metode KLT

IV. PEMBAHASAN

Isolasi Petis Ikan

Isolasi dilakukan dengan melihat terpisahnya koloni dan terdapat zona bening pada sekitar koloni. Ke empat isolat yang di dapat, Isolat PTS-A2 dan PTS-A3 terdapat adanya ciri tersebut. Hal ini sesuai dengan Pramono (2008), menyatakan bahwa pada tahap isolasi dan pemurnian BAL dipilih berdasarkan koloni yang menghasilkan zona jernih pada media MRSA yang ditambah CaCO_3 1%. Kalsium karbonat berfungsi sebagai *buffer* sekaligus seleksi awal pada bakteri penghasil asam laktat. BAL merupakan bakteri yang mampu menghasilkan asam laktat pada media pertumbuhannya, sesuai dengan pendapat Seelly *et al.*, (2001), asam laktat akan menyebabkan zona jernih disekeliling koloni karena melarutkan kalsium karbonat, sehingga dapat digunakan sebagai penanda awal koloni bakteri asam laktat, sehingga dua isolat yang terlihat jelas terbentuk zona bening disekeliling koloni merupakan isolat dari BAL.

Karakterisasi BAL dari Petis Ikan

Karakterisasi dilakukan dengan mengamati isolat secara makroskopik dan mikroskopik serta dilakukan uji biokimia. Pengamatan makroskopik dengan mengamati morfologi koloninya meliputi bentuk, warna, tepi, dan elevasi. Pengamatan mikroskopik dengan mengamati bentuk selnya dengan pewarnaan Gram. Pewarnaan Gram bertujuan untuk melihat morfologi koloni secara mikroskopis dan untuk membedakan golongan bakteri Gram negatif dan golongan bakteri Gram positif. Isolat PTS-A2 dan PTS-A3 yang diamati dengan perbesaran 1000x menunjukkan Gram positif berwarna ungu. Hal ini sesuai dengan pernyataan Yousef and Carolyn (2003) bahwa bakteri asam laktat merupakan Gram positif berbentuk bulat atau batang, tidak membentuk spora, mampu memfermentasi karbohidrat, bersifat katalase negatif dan merupakan kelompok mikroaerofilik.

Karakterisasi selanjutnya dengan uji biokimia yang meliputi, uji katalase, uji motilitas, dan uji tipe fermentasi. Uji katalase bertujuan untuk mengetahui adanya enzim katalase pada bakteri, dimana enzim ini berperan dalam memecah hidrogen peroksida menjadi air dan oksigen. Uji pada isolat bakteri PTS-A2 dan PTS-A3, menunjukkan hasil uji katalase negatif dengan ditunjukkan tidak adanya gelembung – gelembung gas yang berisi oksigen. Hal ini sesuai pendapat Yanti dan Faiza (2013) yang menyatakan bahwa bakteri asam laktat termasuk bakteri dengan katalase negatif.

Uji motilitas dilakukan untuk melihat pertumbuhan bakteri tersebut menyebar (motil) atau hanya tumbuh disekitar area tusukan (non motil). Hal ini sesuai pendapat (Waluyo, 2008), bahwa pengujian motilitas dilakukan untuk melihat bakteri yang memiliki flagella, yang ditandai dengan melebarnya bakteri pada bagian atas permukaan medium. Uji motilitas pada isolat bakteri PTS-A2 dan PTS-A3 menunjukkan bahwa kedua isolat tersebut non motil, karena hanya tumbuh pada area tusukan dari ose tajam pada media *Nutrient Broth* (NB) semi padat.

Uji tipe fermentasi bertujuan untuk menggolongkan BAL termasuk ke dalam kelompok homofermentatif atau kelompok heterofermentatif dengan pengamatan melihat terbentuk atau tidaknya gelembung udara pada tabung durham. Uji tipe fermentasi yang dilakukan pada isolat bakteri asam laktat PTS-A2 dan PTS-A3 dengan melihat ada atau tidaknya gelembung pada tabung durham, menunjukkan bahwa kedua isolat tersebut dapat digolongkan pada kelompok homofermentatif, karena tidak terlihatnya gelembung pada tabung durham saat dilakukan pengamatan.

Pertumbuhan Isolat BAL

Pertumbuhan mikroba merupakan pertumbuhan jumlah atau volume serta ukuran sel. Pertumbuhan sel bakteri biasanya mengikuti suatu pola pertumbuhan tertentu berupa kurva pertumbuhan sigmoid. Pembuatan kurva pertumbuhan bertujuan untuk mengetahui laju pertumbuhan BAL yang diukur dengan spektrofotometri λ 600 nm dengan melihat nilai absorbansinya. Laju pertumbuhan BAL dibagi menjadi fase lag, fase log, fase stationer dan fase kematian. Kurva pertumbuhan yang dibuat dari kedua isolat (PTS-A2 dan PTS-A3) mengalami fase- fase yang dapat dilihat dari perubahan kurva pada jam (waktu inkubasi).

Produksi GABA

Produksi GABA dilakukan menggunakan medium fermentasi MRS cair yang ditambah Mono Sodium Glutamate (MSG) sebanyak 1% dan tanpa penambahan MSG. Penambahan MSG pada isolat digunakan sebagai substrat untuk produksi GABA oleh bakteri asam laktat. Hal ini sesuai dengan Handayani *et al.*, (2016), menyatakan bahwa Monosodium glutamat digunakan sebagai substrat untuk produksi GABA oleh bakteri asam laktat. Monosodium glutamat adalah garam sodium dari asam glutamat. Glutamat adalah asam amino yang terbentuk secara alami yang ditemukan pada banyak makanan, khususnya makanan berprotein tinggi seperti produk susu, daging, ikan dan pada

beberapa sayuran. Menurut Li et al., (2010) penambahan glutamat ke medium menghasilkan peningkatan biomassa. Pertumbuhan sel dan biomassa menurun dengan meningkatnya konsentrasi glutamat pada tingkat yang diberikan (0,25, 0,5, 0,75 dan 1,0 M), sehingga konsentrasi glutamat yang sangat tinggi berbahaya bagi pertumbuhan strain. GABA diukur dengan spektrofotometer pada λ 425 nm. Produksi GABA di jam tertinggi akan digunakan untuk deteksi adanya GABA pada petis ikan.

Deteksi GABA dengan Metode KLT

GABA adalah asam amino non-protein yang diproduksi melalui dekarboksilasi glutamat oleh enzim *glutamate decarboxylase* dan terdistribusi secara luas di alam diantara mikroorganisme, tumbuhan dan hewan (Ueno 2000). Hasil deteksi senyawa GABA dapat ditentukan secara kualitatif dengan metode KLT menggunakan lempeng KLT aluminium yang direndam pada larutan eluen n-butanol : asam asetat : aquades dengan perbandingan 5:3:2 dan di *running* selama 15 menit, kemudian disemprot dengan ninhydrin 0,5%, dan panaskan dalam oven suhu 60°C hingga terbentuk spot warna merah. Spot warna merah yang menunjukkan adanya senyawa kimia yang terseparasi oleh fase gerak eluen dan terwarnai oleh larutan pewarna ninhydrin. Nilai Rf yang telah diukur pada masing-masing yaitu, pregabalin (Rf = 0,65) , MSG 1% (Rf = 0,45), sedangkan supernatan dari isolat PTS-A2 MSG dan non MSG, serta PTS-A3 MSG dan non MSG (Rf = 0,65). Nilai Rf isolat sama dengan nilai Rf pregabalin yang membuktikan bahwa semua isolat tersebut mampu menghasilkan GABA.

UCAPAN TERIMA KASIH

Penulis mengucapkan terima kasih kepada pihak- pihak yang membantu dalam penyampaian saran dan kritik pada penulisan artikel.

DAFTAR PUSTAKA

- Agustina, A.M., Abdul, B., dan Niswani, S. (2011). Food Marine Flavour dari Hasil Samping Pengolahan Ikan Pindang. [*Program Kreativitas Mahasiswa*]. Institut Pertanian Bogor. Bogor.
- Cho, Y.R., Chang, J.Y., and Chang, H.C. (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.
- Danitasari, dan Siti Mirza. (2010). Karakterisasi Petis Ikan dari Limbah Cair Hasil Perebusan Ikan Tongkol (*Euthynnus affinus*). *Skripsi*. Bogor : Departemen Teknologi Hasil Perairan Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan.
- Das, D., Goyal A. (2004). 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.
- Ganguli, A. (2011). Evaluation of λ -Aminobutyric Acid Production by Indigenously Isolated Lactid Acid Bacteria. Departemen of Biotechnology and Environmental Sciences, Thapar University Patiala, India.
- Handayani, Rini., Sulistiani., dan Ninu Setianingrum. (2016). Identifikasi Produksi GABA dari Kultur Bakteri Asam Laktat (BAL) dengan Metode TLC. *Pros Sem Nas Masy Biodiv Indon*. Vol.2 No.2: 208-213.
- Kook, M.C and Cho, S.C. (2013). Production of GABA (gamma amino butyric acid) by Lactid Acid Bacteria. *Korean J.Food Sci. An*. Vol 33 (3): 377-389.
- Li, H., Qiu T., Gao D, and Cao Y. (2010). Medium Optimization for Production of GammaAminobutyric Acid by *Lactobacillus brevis* NCL912. *Amino Acids* 38: 1439–1445.
- Miura, D., Ito, Y., Mizukuchi, A., Kise, M., Aoto, H., and Yagasaki, K. (2006). Hypercholesterolemic Action of Pre-Germinated Brown Rice in Hepatoma-Bearing Rats. *Life Sci* 79: 259-264.
- Park, K.B, and Oh, S.H. (2007). Production of Yogurt with Enhanced Level of Gamma-Aminobutyric Acid and Valuable Nutrients Using Lactic Acid Bacteria and Germinated Soybean Extract. *Bioresour Technol* 98: 1675-1679.
- Pramono, B. Yoyok, Endang S. Rahayu, Suparmo, dan Tyas Utami. (2008). Isolasi dan Identifikasi Bakteri Asam Laktat pada Fermentasi Petis Daging Tradisional. *J. Indon. Trop. Anim. Agric*. Vol. 3(4).
- Qiu, T., Li, H., and Cao, Y. (2010). Pre-Staining Thin Layer Chromatography Method for Amino Acid Detection. *Afr J Biotechnol*, 9, 8679-8681.

- Ray, B. (2004). *Fundamental Food Microbiology, Third Edition*. CRC Press LLC Boca Raton, Florida.
- Seely, H.W., P.W. Vanden Mark and J.J. Lee. 2001. *Microbes in Action. A Laboratory Manual of Microbiology*. 4 edition. W.H. Freeman and Comp. New York p. 265-266.
- Smid, E.J. and Gorris. L.G. (2007). *Natural antimicrobials for food preservation*. In: M. S. Rahman (Ed.). *Handbook of Food Preservation*. 2nd ed. CRC Press, New York.
- Ueno, H. (2000). Enzymatic and structural aspects on glutamate decarboxylase. *J. Mol. Catal. B Enzym.* 10, 67-69.
- Waluyo, L. (2008). *Teknik Metode Dasar Dalam Mikrobiologi*. UMM Press, pp. 222-258.
- Yanti, D.I.W., Faiza A.D. (2013). Karakterisasi Bakteri Asam Laktat yang di Isolasi Selama Fermentasi Bekasang. *JPHPI*. Vol 16 No. 2.