

Detection of gamma-aminobutyric acid (GABA) in lactic acid bacterial isolates from Chao Pangkep fermentation products

Ririn Irfayanti Zaenab^{1*}, Ade Irma¹, Miladiarsi²

¹ Program Studi Sains Biomedis, Fakultas Teknologi Kesehatan, Universitas Megarezky, Manggala, Makassar, 90234, Indonesia

² Program Studi Proteksi Tanaman, Fakultas Pertanian, Universitas Lambung Mangkurat, Jl. Jend. A. Yani Km. 35,5, Banjarbaru, Kalimantan Selatan, 70714, Indonesia.

*Correspondence: ririnirfayantizaenab@gmail.com

ABSTRACT

Background: Lactic Acid Bacteria (LAB), classified as Generally Recognized as Safe (GRAS) microorganisms, produce functional compounds such as Gamma-Aminobutyric Acid (GABA), a non-protein amino acid acting as the principal inhibitory neurotransmitter in the central nervous system and possessing antioxidant activity. Chao, a traditional fermented fish product from Pangkep, South Sulawesi, is a promising yet underexplored source of GABA-producing LAB. **Objective:** This study aimed to identify the ability of LAB isolated from Chao Pangkep to produce GABA as an antioxidant compound. **Methods:** LAB isolates C2 and C10 were rejuvenated, screened for hemolytic activity, cultivated in de Man Rogosa Sharpe Broth (MRSB) with and without 1% Monosodium Glutamate (MSG), extracted with ethyl acetate, and detected by Thin Layer Chromatography (TLC) using Pregabalin as the reference standard. Antioxidant activity was assessed by the 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) assay based on IC₅₀ values. **Results:** Retention factor (R_f) values were 0.82 (C2 without MSG), 0.84 (C2 with MSG), 0.80 and 0.64 (C10 without MSG), and 0.86 and 0.68 (C10 with MSG), all close to the standard R_f of 0.88. IC₅₀ values were 940.11, 1124.97, 884.73, and 939.17 ppm for C2 without MSG, C2 with MSG, C10 without MSG, and C10 with MSG, respectively, with coefficients of determination (R²) ranging 0.9916–0.9960. **Conclusion:** LAB isolates C2 and C10 from Chao Pangkep produced GABA, though their antioxidant activity was low, as IC₅₀ values far exceeded the weak-activity threshold. These findings offer a preliminary basis for optimizing GABA production by LAB from local fermented products toward developing functional probiotics or supplements.

Keywords: Chao, Lactic Acid Bacteria, Gamma-Aminobutyric Acid, Antioxidant

Received: 21 Juli 2025 | Revised: 18 Agustus 2025 | Accepted: 18 Agustus 2025 | Published: 20 Agustus 2025

Cite this article: Zaenab, R. I., Irma, A., & Miladiarsi (2025). Detection of gamma-aminobutyric acid (GABA) in lactic acid bacterial isolates from Chao Pangkep fermentation products. *Journal of Biomedical Sciences and Health*, 2(2), 61–72. <https://doi.org/10.34310/jbsh.v2.i2.236>

Deteksi asam gamma-aminobutirat (GABA) pada isolat bakteri asam laktat dari produk fermentasi Chao Pangkep

ABSTRAK

Latar Belakang: Bakteri Asam Laktat (BAL) tergolong mikroorganisme Generally Recognized as Safe (GRAS) yang berperan menghasilkan senyawa fungsional, termasuk Gamma-Aminobutyric Acid (GABA), asam amino non-protein yang berfungsi sebagai neurotransmitter inhibitorik utama pada sistem saraf pusat sekaligus memiliki aktivitas antioksidan. Chao, produk fermentasi ikan khas Pangkep, Sulawesi Selatan, berpotensi menjadi sumber BAL penghasil GABA yang belum banyak dieksplorasi. **Tujuan:** Penelitian ini bertujuan mengidentifikasi kemampuan BAL dari Chao Pangkep dalam menghasilkan GABA sebagai senyawa antioksidan. **Metode:** Isolat BAL C2 dan C10 diremajakan, diuji aktivitas hemolitiknya, diproduksi pada media MRSB dengan dan tanpa penambahan Monosodium Glutamat (MSG) 1%, diekstraksi menggunakan etil asetat, lalu dideteksi menggunakan Thin Layer Chromatography (TLC) dengan standar Pregabalin. Aktivitas antioksidan diukur menggunakan metode 2,2-difenil-1-pikrilhidrazil (DPPH) berdasarkan nilai IC₅₀. **Hasil:** Nilai Retention factor (Rf) isolat C2 tanpa MSG 0,82, C2 MSG 1% 0,84, C10 tanpa MSG 0,80 dan 0,64, serta C10 MSG 1% 0,86 dan 0,68, mendekati nilai Rf standar 0,88. Nilai IC₅₀ tercatat 940,11 ppm (C2 tanpa MSG), 1124,97 ppm (C2 MSG 1%), 884,73 ppm (C10 tanpa MSG), dan 939,17 ppm (C10 MSG 1%), dengan koefisien determinasi (R²) berkisar 0,9916–0,9960. **Kesimpulan:** Isolat BAL C2 dan C10 dari Chao Pangkep terbukti menghasilkan GABA, namun aktivitas antioksidannya tergolong rendah karena nilai IC₅₀ jauh melampaui ambang kategori lemah. Temuan ini menjadi dasar optimalisasi produksi GABA oleh BAL asal fermentasi lokal untuk pengembangan probiotik atau suplemen fungsional.

Kata kunci: Chao; Bakteri Asam Laktat; Gamma-Aminobutyric Acid; Antioksidan

1. PENDAHULUAN

Indonesia memiliki keanekaragaman pangan fermentasi yang tersebar di berbagai wilayah, salah satunya adalah Chao, makanan fermentasi ikan khas Pangkep, Sulawesi Selatan (Priadi et al., 2020; Darmawan et al., 2021).

Chao diproduksi melalui fermentasi ikan berukuran kecil, seperti teri atau belanak, yang dicampur garam pada konsentrasi tertentu dan dibiarkan mengalami fermentasi spontan selama beberapa hari hingga menghasilkan aroma serta cita rasa khas (Darmawan et al., 2021). Proses ini memungkinkan mikroorganisme indigenous, terutama bakteri asam laktat, tumbuh dominan dan mengubah komponen protein serta karbohidrat ikan menjadi senyawa-senyawa yang lebih sederhana. Matti et al. (2019) berhasil mengisolasi *Lactobacillus plantarum* dan *Pediococcus acidilactici* dari produk Chao dan mengonfirmasi keduanya memiliki aktivitas proteolitik, namun penelitian tersebut belum menelusuri kapasitas isolat dalam

memproduksi senyawa fungsional seperti GABA.

Bakteri asam laktat memiliki peran ganda dalam pangan fermentasi tradisional. Selain bekerja sebagai agen fermentasi yang menekan pertumbuhan mikroba pembusuk lewat produksi asam organik, BAL juga berpotensi menghasilkan metabolit sekunder bernilai fungsional, termasuk GABA, melalui aktivitas enzim glutamat dekarboksilase. Potensi ganda inilah yang mendasari penelusuran kemampuan isolat BAL asal Chao Pangkep dalam menghasilkan GABA sekaligus mengevaluasi aktivitas antioksidannya.

Proses fermentasi sangat bergantung pada aktivitas bakteri asam laktat (BAL), kelompok mikroorganisme yang diakui aman atau disebut generally recognized as safe (GRAS) dan berperan penting dalam menghasilkan asam serta senyawa fungsional lainnya (Susalam et al., 2022; Siska, 2023). BAL diketahui memiliki potensi sebagai penghasil antioksidan alami (Rahayu et al., 2023).

Antioksidan merupakan senyawa krusial yang dapat menetralkan radikal bebas, sehingga mampu mencegah penyakit degenerative seperti kardiovaskular dan karsinogenesis (Pratiwi et al., 2023). Salah satu senyawa antioksidan penting yang dapat diproduksi oleh BAL adalah Gamma-aminobutyric acid (GABA). GABA merupakan asam amino non-protein yang berfungsi sebagai penghambat neurotransmitter utama dalam sistem saraf pusat. Senyawa ini berperan penting dalam berbagai proses fisiologis dan psikologis, termasuk pengaturan tekanan darah, efek antidepresan, antidiabetes, hingga peningkatan sistem imun (Nursini & Yogeswara, 2023; Sahab et al., 2020). GABA dalam tubuh bahkan telah dikaitkan dengan penyakit neurodegenerative seperti Parkinson dan Alzheimer (Nursini & Yogeswara, 2023).

Pangan fermentasi di Indonesia telah banyak dilakukan, Sebagian besar fokus pada kemampuannya sebagai agen antimikroba. Penelitian terdahulu yang dilakukan oleh (Berliyantia et al., 2020) mengenai deteksi GABA merupakan bakteri asam laktat hasil isolasi dari petis ikan. Dan menyatakan bahwa fungsi sebagai antioksidan ditunjukkan oleh galur *Lactobacillus plantarum* dalam kemampuannya menghasilkan GABA. Selain itu, (Matti et al., 2019) melaporkan bahwa bakteri *Lactobacillus plantarum* dan *Pediococcus acidilactici* berhasil diisolasi dari produk fermentasi Chao, namun tidak dilakukan penelitian mengenai kemampuan BAL dalam menghasilkan GABA sebagai antioksidan dari isolat yang diperoleh.

Mengingat pentingnya peranan GABA pada berbagai aspek kesehatan termasuk sebagai antioksidan sehingga perlu dilakukan penelitian deteksi GABA pada isolate BAL dari produk fermentasi lokal khas daerah Pangkep.

2. METODE

Penelitian ini merupakan studi kuantitatif dengan metode eksperimen eksploratif yang bertujuan mengidentifikasi Gamma-aminobutyric acid (GABA) sebagai senyawa antioksidan dari isolat bakteri asam laktat hasil fermentasi produk Chao asal Pangkep. Proses penelitian dilakukan di laboratorium mikrobiologi dan biokimia pada fasilitas perguruan tinggi.

Isolat diperoleh melalui teknik purposive sampling berdasarkan karakteristik morfologi dan biokimia. Instrumen yang digunakan meliputi Thin Layer Chromatography (TLC), spektrofotometer, inkubator, sentrifus, autoklaf, dan perlengkapan laboratorium lainnya. Bahan yang digunakan antara lain isolat BAL, media MRS, DPPH, Monosodium Glutamat (MSG), larutan standar GABA, eluen (n-butanol, asam asetat, aquadest), metanol, ninhydrin, dan etil asetat.

2.1 Peremajaan Isolat

Merujuk pada metode yang dilakukan Asnita & Meryandini (2023), peremajaan isolat bakteri asam laktat dilakukan dengan menumbuhkan kembali biakan murni pada media MRSA (de Man Rogosa Sharpe Agar). Biakan diambil menggunakan ose steril, kemudian digoreskan pada permukaan media dalam cawan petri menggunakan teknik streak kuadran untuk memperoleh koloni terpisah. Cawan petri kemudian diinkubasi pada suhu 37°C selama 48 jam dalam kondisi anaerob. Koloni yang tumbuh digunakan untuk tahap analisis atau pengujian selanjutnya.

2.2 Analisis Hemolitik

Aktivitas hemolitik dari bakteri asam laktat dianalisis dengan menempatkan isolat pada media agar darah yang ditambahkan 5% (w/v) darah domba dan diinkubasi pada suhu 37 °C selama 48 jam (Amenu & Bacha, 2023). Proses seleksi dilakukan dengan mempertimbangkan patogenisitas dari isolat bakteri yang terlihat dari terbentuknya zona hemolitik (Irma et al., 2018).

2.3 Kurva Pertumbuhan Bakteri Asam Laktat

Isolat bakteri asam laktat diaktivasi dengan mengambil 2 ose dan dimasukkan ke dalam medium MRSB 100 mL dan diinkubasi pada shaker dengan kecepatan 150 rpm selama 24 jam pada suhu 37°C. Kemudian diambil 5% starter setelah mencapai 10⁷ CFU/mL dan dipindahkan ke dalam 100 mL medium MRSB tanpa penambahan MSG 1% dan selanjutnya diinkubasi pada shaker dengan kecepatan 150 rpm suhu 37°C selama 36 jam. Enam jam sekali diambil 4 mL dan diukur absorbansinya menggunakan spektrofotometri dengan panjang gelombang 600 nm (Berliyantia et al., 2020).

2.4 Produksi Gamma-Aminobutyric acid (GABA)

Pembuatan GABA dilakukan dengan mengambil isolat BAL yang telah diaktivasi berumur 24 jam pada suhu 37°C sebanyak 5% ke dalam medium MRSB + MSG % dan medium MRSB non MSG 100 ml dan diinkubasi pada suhu 37°C selama 7 jam hingga 30 jam pada suhu 30°C dalam inkubator. Penambahan monosodium glutamat (MSG) digunakan sebagai substrat produksi GABA oleh bakteri asam laktat (Berliyantia et al., 2020). Kemudian supernatant yang dihasilkan dilanjutkan ke tahapan ekstraksi.

2.5 Ekstraksi Gamma-Aminobutyric acid (GABA)

Tahap awal ekstraksi yaitu melakukan sentrifuge terhadap kultur bakteri asam laktat (BAL). Sentrifugasi dilakukan dengan kecepatan 6000 rpm selama 15 menit untuk memisahkan bagian pellet dengan supernatant. Bagian supernatant yang telah diperoleh ditambahkan pelarut etil asetat dengan perbandingan 1:1 (v/v). Tujuan penggunaan pelarut etil asetat dikarenakan bersifat polar sehingga dapat melarutkan senyawa metabolit. Hasil dari perbandingan campuran tersebut dimasukkan ke dalam corong pemisah kemudian dikocok selama 15 menit hingga terbentuk dua lapisan. Lapisan atas merupakan pelarut organik sedangkan bagian bawah adalah media dan endapan (biomassa sel). Setelah itu, bagian pelarut organik dipisahkan menggunakan rotary vacuum evaporator pada suhu $\pm 40^\circ\text{C}$. Ekstrak yang diperoleh diuapkan pada suhu ruang agar sisa eluen dapat hilang (Irma et al., 2018).

2.6 Deteksi Gamma-Aminobutyric Acid (GABA) Metode Thin Layer Chromatography (TLC)

Deteksi produksi GABA oleh BAL dilakukan dengan metode kromatografi lapis tipis (KLT). Lempeng KLT berukuran 8 x 7 cm diberi tanda sebagai penanda pertama. Garis dipasang satu cm dari tepi lempeng KLT. Garis tanda pertama ditandai dengan lima tanda pada jarak satu cm dengan pensil untuk mewarnai sampel kemudian diaktivasi di oven selama 30 menit.

Larutan standar GABA (Pregabalin 75 mg) dan supernatant hasil ekstraksi isolat secara

berurutan ditotolkan pada lempeng TLC aluminium menggunakan pipet kapiler. Pregabalin dipilih sebagai larutan standar karena merupakan analog GABA yang tersedia secara komersial dalam bentuk murni, meskipun penggunaan analog ini alih-alih GABA murni tetap menjadi keterbatasan metodologis yang dipertimbangkan dalam interpretasi hasil. Lempeng TLC kemudian didiamkan selama 15 menit dalam chamber berisi eluen. Proses elusi dilakukan menggunakan larutan pengembang (eluen) yang terdiri atas campuran n-butanol, asam asetat, dan akuades dengan perbandingan 5:3:2.

GABA standar akan terdeteksi setelah penyemprotan ninhydrin sebagai bercak atau spot merah setelah plat dikeringkan menggunakan hairdryer. Senyawa GABA yang dihasilkan oleh isolat BAL dapat dilihat dari nilai Retention factor (Rf) yang sama dengan standar GABA yang digunakan (Berliyantia et al., 2020). Rumus perhitungan nilai Retention factor (Pribadhi et al., 2021).

$$Rf = a / b$$

Keterangan: a = Jarak yang ditempuh senyawa atau substansi b = Jarak yang ditempuh pelarut

Lempeng TLC juga dapat diamati menggunakan sinar UV dengan Panjang gelombang 254 nm dan 366 nm. Hasil TLC dari ekstrak bakteri yang memiliki senyawa metabolit bisa memancarkan cahaya saat dilihat di bawah sinar UV 254 dan 366 nm (Irma et al., 2018).

2.7 Uji Antioksidan Metode 2,2-difenil-1-pikrihidrazil (DPPH)

Uji antioksidan diawali dengan pembuatan larutan DPPH 0,4 mM dari 0,015 g serbuk DPPH yang dilarutkan dalam 100 mL metanol menggunakan labu ukur. Selanjutnya, larutan sampel 1000 ppm dibuat dengan melarutkan 0,01 g sampel dalam 10 mL metanol di dalam tabung reaksi. Larutan stok 1000 ppm ini kemudian diencerkan menjadi larutan kerja 250 ppm sebagai dasar pembuatan deret konsentrasi. Untuk penentuan aktivitas antioksidan (IC₅₀), larutan kerja 250 ppm dipipet sebanyak 0,2; 0,4; 0,8; 1,6; dan 3,2 mL,

kemudian dicukupkan hingga 5 mL dengan metanol untuk memperoleh deret konsentrasi 10, 20, 40, 80, dan 160 ppm. Masing-masing larutan deret konsentrasi ini ditambahkan 1 mL larutan DPPH 0,4 mM, lalu volume total dicukupkan hingga 5 mL dengan metanol. Sebagai kontrol, 1 mL larutan DPPH 0,4 mM dicukupkan hingga 5 mL dengan metanol tanpa penambahan sampel.

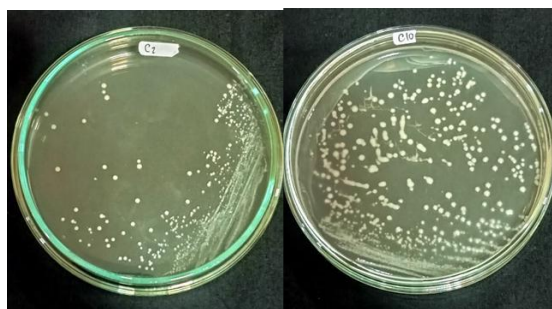
Semua larutan diinkubasi pada suhu ruang selama 30 menit dalam ruang gelap, kemudian absorbansinya diukur pada panjang gelombang 515-517 nm. Hasil serapan kemudian diukur dalam persentase resistensi dengan rumus sebagai berikut:

$$\%Hambatan = (A \text{ Blanko} - A \text{ Sampel}) / A \text{ Blanko} \times 100\%$$

Selanjutnya, dari hasil persentase resistansi masing-masing solusi, dibuat kurva persamaan linier sehingga diperoleh nilai IC50 masing-masing solusi. Uji antioksidan DPPH dilakukan dengan mencampurkan sampel dan larutan DPPH ke dalam botol kaca berwarna gelap dan diletakkan pada suhu ruangan selama 2 jam (Suteja et al., 2022).

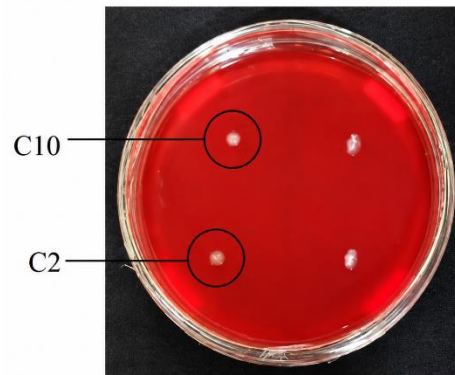
Data diperoleh melalui uji laboratorium, mencakup deteksi GABA menggunakan kromatografi lapis tipis dan pengukuran aktivitas antioksidan dengan metode DPPH. Analisis dilakukan secara deskriptif dan kuantitatif sederhana. Keberadaan GABA ditentukan berdasarkan nilai Rf dan intensitas noda terhadap standar, sedangkan aktivitas antioksidan dievaluasi melalui persentase penghambatan radikal bebas. Hasil disajikan dalam bentuk tabel dan grafik.

3. HASIL



Gambar 1. Hasil peremajaan isolat BAL C2 dan C10

Stok isolat bakteri asam laktat yang diperoleh dari produk fermentasi Chao khas daerah Pangkep diremajakan pada media de Man Rogosa Sharpe Agar (MRSA). Isolat bakteri asam laktat C2 dan C10 dianalisis aktivitas hemolitiknya pada media agar darah yang ditambahkan 5% darah domba.



Gambar 2. Hasil analisis hemolitik isolate BAL C2 dan C10

Produksi senyawa Gamma-Aminobutyric acid (GABA) dilakukan pada media de Man Rogosa Sharpe Broth (MRSB) dengan penambahan Monosodium Glutamat (MSG) 1% dan media MRSB tanpa penambahan MSG.



Gambar 3. Media produksi GABA isolate C2 dan C10

Senyawa Gamma-aminobutyric acid (GABA) dideteksi menggunakan metode Thin Layer Chromatography (TLC) dengan menghitung nilai Retention factor (Rf) setelah

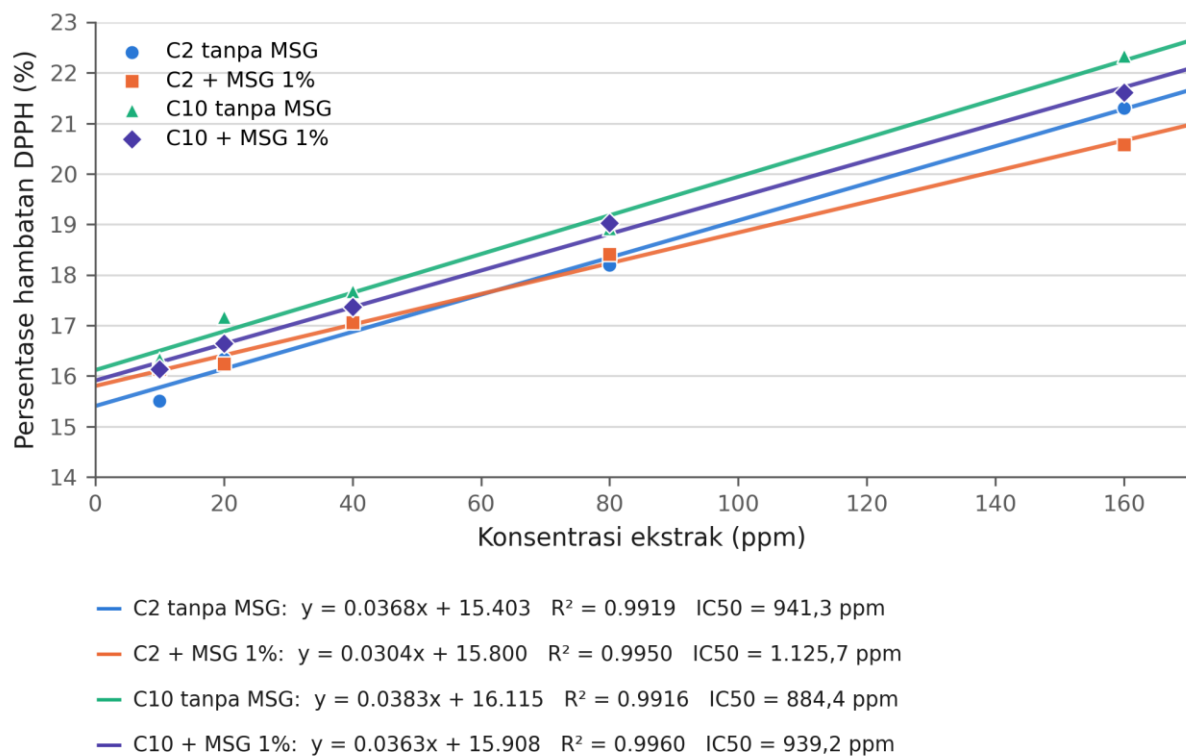
pengamatan di bawah sinar UV pada panjang gelombang 254 nm dan 366 nm.

Tabel 1. Hasil perhitungan nilai Rf

No	Kode Sampel	Nilai Rf
1	Larutan Standar	0,88
2	C2 non MSG	0,82

3	C2 MSG 1%	0,84
4	C10 non MSG	0,8; 0,64
5	C10 MSG 1%	0,86; 0,68

Senyawa Gamma-aminobutyric acid (GABA) sebagai Antioksidan dideteksi menggunakan metode 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) berdasarkan nilai IC50 yang diperoleh dari kurva persamaan linear.



Gambar 4. Kurva regresi linear persentase hambatan DPPH terhadap konsentrasi ekstrak isolat C2 dan C10 (dengan dan tanpa penambahan MSG 1%), lengkap dengan persamaan garis, koefisien determinasi (R^2), dan nilai IC50 masing-masing seri.

Tabel 2. Nilai IC50 isolat C2 dan C10

No	Kode Sampel	Berat	Konsentrasi (ppm)	Absorbansi	% ppm antioksidan	Nilai IC50 Sampel
1	Blanko			0,967		
2	C2 Non MSG	0,0107	10	0,817	15,51	940,11
		0,0107	20	0,809	16,34	
		0,0107	40	0,802	17,06	
		0,0107	80	0,791	18,20	
		0,0107	160	0,761	21,30	
3	C2 MSG 1%	0,0112	10	0,811	16,13	1124,97

		0,0112	20	0,81	16,24	
		0,0112	40	0,802	17,06	
		0,0112	80	0,789	18,41	
		0,0112	160	0,768	20,58	
4	C10 Non MSG	0,0102	10	0,809	16,34	884,73
		0,0102	20	0,801	17,17	
		0,0102	40	0,796	17,68	
		0,0102	80	0,784	18,92	
		0,0102	160	0,751	22,34	
5	C10 MSG 1%	0,0102	10	0,811	16,13	939,17
		0,0102	20	0,806	16,65	
		0,0102	40	0,799	17,37	
		0,0102	80	0,783	19,03	
		0,0102	160	0,758	21,61	

4. PEMBAHASAN

Isolat bakteri asam laktat ini awalnya diperoleh dari produk fermentasi khas daerah yaitu Chao asal Pangkep yang dipilih berdasarkan karakteristik morfologi dan biokimia yang relevan. Isolat yang digunakan merupakan stok isolat laboratorium Mikrobiologi Sains Biomedis Universitas Megarezky. Peremajaan isolat dilakukan dengan tujuan mengembalikan viabilitas dan aktivitas metabolisme sel-sel bakteri yang mungkin menurun setelah penyimpanan jangka panjang. Proses peremajaan dilakukan menggunakan teknik inokulasi streak kuadran dengan tujuan mendapatkan koloni terpisah (Handayani, 2016). Inokulum digoreskan pada permukaan media de Man Rogosa Sharpe Agar (MRSA) di dalam cawan petri. Pemilihan media MRSA didasarkan pada formulasi spesifiknya yang optimal untuk mendukung pertumbuhan bakteri asam laktat.

Setelah proses inokulasi, cawan petri yang berisi isolat (C2 dan C10) diinkubasi pada suhu 37°C selama 48 jam dalam kondisi anaerob. Setelah periode inkubasi, pertumbuhan koloni bakteri asam laktat yang murni dan terpisah dapat diamati pada

permukaan media MRSA. Gambar 1 menunjukkan hasil peremajaan isolat bakteri asam laktat C2 dan C10 pada media MRSA. Koloni yang tumbuh dengan karakteristik morfologi yang sesuai dan menunjukkan kemurnian yang baik digunakan untuk tahapan pengujian selanjutnya.

Isolat bakteri asam laktat (BAL) C2 dan C10 kemudian dianalisis aktivitas hemolitiknya. Pengujian ini dilakukan untuk mengevaluasi potensi kedua isolat tersebut. Isolat C2 dan C10 ditanam pada media agar darah yang mengandung 5% (b/v) darah domba. Media yang berisi isolat diinkubasi pada suhu 37 °C selama 48 jam, kondisi yang optimal untuk pertumbuhan BAL dan ekspresi aktivitas hemolitik.

Media agar darah yang berisi isolat berumur 48 jam setelah diinkubasi, diamati secara visual untuk mengidentifikasi zona di sekitar koloni. Hemolisis dinilai berdasarkan kerusakan sel darah merah di sekeliling koloni dan dikategorikan sebagai alfa-hemolisis yang ditandai zona kehijauan di sekitar koloni, beta-hemolisis yang ditunjukkan dengan zona bening transparan di sekitar koloni, dan gamma-hemolisis (non-hemolitik), di mana

tidak ada perubahan warna atau lisis di sekitar koloni, mengindikasikan tidak adanya aktivitas hemolitik (Lee et al., 2023).

Hasil pengujian kedua isolat, C2 dan C10, menunjukkan aktivitas gamma-hemolitik (non-hemolitik). Artinya, isolat C2 dan C10 tidak menyebabkan lisis sel darah merah pada media agar darah domba. Gambar 2 memperlihatkan hasil pengujian hemolitik isolat C2 dan C10 yang tidak membentuk zona lisis di sekitar koloni, mengindikasikan bahwa kedua isolat BAL tersebut tidak memiliki sifat hemolitik. Temuan ini sejalan dengan hasil Bai et al. (2025) yang melaporkan *Lactiplantibacillus plantarum* tidak menunjukkan aktivitas hemolitik, serta didukung oleh Suryani & Gaffar (2024) yang menyatakan bahwa isolat bakteri asam laktat non-hemolitik berpotensi sebagai kandidat probiotik karena tidak memiliki aktivitas hemolitik. Sifat non-hemolitik ini menjadi prasyarat keamanan yang penting sebelum isolat C2 dan C10 dilanjutkan ke tahapan pengujian berikutnya.

Kurva pertumbuhan bakteri asam laktat dibuat selama 36 jam dengan mengambil 4 mL setiap 6 jam sekali dan diukur absorbansinya. Usia inokulum yang ideal dalam mencapai laju pertumbuhan spesifik yang tinggi berada pada jam ke 7 suhu inkubasi 37°C. Periode ini merepresentasikan fase eksponensial di mana aktivitas metabolisme dan proliferasi sel bakteri berada pada puncaknya. Sedangkan fase stasioner ditunjukkan pada durasi inkubasi yang lebih panjang yaitu jam ke 30. Hal ini sesuai dengan penelitian (Handayani, 2016). Pertumbuhan BAL dalam medium MRSB dapat dimonitor secara visual melalui peningkatan kekeruhan medium, yang mengindikasikan akumulasi biomassa sel. Biakan yang telah melalui proses aktivasi dan pra-kultur dengan baik, serta menunjukkan kekeruhan yang sesuai, menandakan kesiapan untuk tahapan berikutnya, yaitu proses produksi GABA.

Proses produksi senyawa Gamma-Aminobutyric acid (GABA) dimulai dengan inokulasi BAL yang berumur 7 jam pada suhu 37°C. Sebanyak 5% inokulum ditambahkan ke dalam dua jenis medium de Man Rogosa Sharpe Broth (MRSB), masing-masing sebanyak 100 mL: satu set medium MRSB yang diperkaya dengan 1% Monosodium

Glutamat (MSG) dan satu set medium MRSB tanpa penambahan MSG sebagai kontrol. Penambahan MSG ke dalam medium berfungsi sebagai substrat utama yang akan dikonversi menjadi GABA oleh aktivitas enzim glutamat dekarboksilase yang diproduksi oleh bakteri asam laktat (Berliyantia et al., 2020). Medium MRSB tanpa MSG digunakan untuk memverifikasi bahwa produksi GABA memang spesifik memerlukan ketersediaan substrat MSG.

Inkubasi dilakukan secara bertahap: awalnya pada suhu 37°C selama 7 jam, diikuti dengan inkubasi pada suhu 30°C selama 30 jam dalam inkubator. Inkubasi 7 jam bertujuan untuk produksi biomassa sel sesuai kurva pertumbuhan, sedangkan inkubasi 30 jam ditujukan untuk induksi produksi senyawa metabolit sekunder seperti GABA. Setelah periode inkubasi selesai, hasil produksi GABA pada media MRSB, baik dengan maupun tanpa MSG, dapat diamati pada Gambar 3. Supernatan yang mengandung GABA akan dipisahkan dan dilanjutkan ke tahapan ekstraksi untuk isolasi dan kuantifikasi GABA.

Setelah proses produksi GABA selesai, tahapan selanjutnya adalah ekstraksi untuk mengisolasi senyawa GABA dari media produksi. Proses ini dimulai dengan sentrifugasi kultur bakteri asam laktat (BAL) yang telah diinkubasi. Sentrifugasi untuk memisahkan sel-sel bakteri (pelet) dari supernatan yang mengandung senyawa metabolit, termasuk GABA. Bagian supernatan yang telah terpisah kemudian ditambahkan pelarut etil asetat. Penggunaan etil asetat sebagai pelarut dipilih karena sifatnya yang polar, sehingga efektif dalam melarutkan senyawa-senyawa metabolit yang juga bersifat polar, seperti GABA (Irma et al., 2018). Campuran supernatan dan etil asetat dimasukkan ke dalam corong pemisah dan dikocok bertujuan untuk memastikan kontak yang optimal antara supernatan dan pelarut sehingga senyawa GABA dapat berpindah ke fase etil asetat. Setelah dikocok, campuran akan membentuk dua lapisan: lapisan atas yang merupakan pelarut organik (etil asetat yang mengandung GABA) dan lapisan bawah yang berisi sisa media serta endapan biomassa sel.

Lapisan pelarut organik yang mengandung GABA kemudian dipisahkan dan dipekatkan menggunakan rotary vacuum

evaporator menggunakan suhu 40 °C. Proses pemekatan ini bertujuan untuk menguapkan sebagian besar etil asetat, sehingga konsentrasi GABA dalam ekstrak meningkat. Terakhir, ekstrak yang telah dipekatkan selanjutnya diuapkan pada suhu ruang untuk menghilangkan sisa-sisa pelarut etil asetat yang mungkin masih tersisa. Hasil ekstrak kasar GABA yang diperoleh ini kemudian dianalisis menggunakan metode Thin Layer Chromatography (TLC).

Deteksi keberadaan Gamma-Aminobutyric acid (GABA) dalam ekstrak kasar isolat bakteri asam laktat (BAL) dilakukan menggunakan metode Thin Layer Chromatography (TLC). TLC dipilih karena merupakan metode yang efektif untuk pemisahan dan identifikasi senyawa berdasarkan perbedaan kepolarannya. Penotolan sampel pada lempeng TLC aluminium dilakukan secara berurutan menggunakan pipet kapiler. Sampel yang ditotolkan meliputi: larutan standar GABA (pregabalin 75mg), supernatan hasil ekstraksi isolat C10 dengan MSG 1%, C10 tanpa MSG, C2 dengan MSG 1%, dan C2 tanpa MSG. Elusi KLT dilakukan selama 15 menit menggunakan eluen (n-butanol, asam asetat, dan akuades), eluen ini dirancang untuk memberikan pemisahan yang optimal bagi senyawa-senyawa polar seperti GABA.

Berdasarkan hasil pengamatan di bawah sinar UV panjang gelombang 254 nm dan 366 nm, nilai Rf yang diperoleh setelah dimasukkan ke dalam rumus perhitungan ditunjukkan pada Tabel 1. Nilai Rf masing-masing sampel mendekati nilai Rf larutan standar (Pregabalin 75 mg) yaitu 0,88, namun nilai Rf sampel yang mengandung MSG 1% lebih mendekati nilai Rf larutan standar dibandingkan sampel tanpa MSG. Hal ini disebabkan penambahan glutamat ke dalam medium meningkatkan biomassa sel, sejalan dengan pernyataan Berliyantia et al. (2020) bahwa MSG berfungsi sebagai substrat utama yang diubah menjadi GABA oleh enzim glutamat dekarboksilase yang dihasilkan BAL. Pribadhi et al. (2021) turut mendukung temuan ini dengan menyatakan bahwa penambahan glutamat dalam media dapat meningkatkan biomassa mikroba. Glutamat merupakan substrat bagi pembentukan GABA, sehingga peningkatan ketersediaan substrat ini mendorong aktivitas

enzim glutamat dekarboksilase (GAD) dan pada akhirnya meningkatkan produksi GABA.

Selain itu, spot lain yang ditunjukkan pada sampel C10 MSG 1% nilai Rf-nya adalah 0,68 dan C10 non MSG nilai Rf-nya 0,64. Nilai Rf ini menghampiri nilai standar GABA yang diketahui yaitu 0,61 dalam penelitian (Pribadhi et al., 2021) dan 0,65 dalam penelitian (Berliyantia et al., 2020). Namun, spot yang kedua ini juga lebih tinggi nilai Rf -nya yang mengandung MSG. Monosodium glutamat adalah garam sodium dari asam glutamat. Glutamat adalah asam amino yang secara alami terdapat dalam berbagai jenis makanan, terutama yang kaya protein seperti produk susu, daging, dan ikan (Handayani, 2016). Nilai Rf pada rentang 0,2 - 0,8 termasuk kedalam ketentuan nilai Rf yang baik (Aulia, 2021). Ekstrak bakteri yang mengandung senyawa metabolit dapat memancarkan cahaya atau menunjukkan spot yang menyerap UV saat dilihat di bawah sinar UV, memberikan konfirmasi tambahan terhadap keberadaan senyawa (Irma et al., 2018). Selain itu, (Indrowati et al., 2015) juga mengungkapkan bahwa detektor sinar UV atau detektor fluoresensi dapat digunakan untuk mendeteksi asam amino, dimana GABA merupakan salah satu jenis asam amino.

Aktivitas antioksidan ekstrak GABA dari isolat bakteri asam laktat (BAL) C2 dan C10 dianalisis menggunakan metode penangkapan radikal bebas 2,2-Difenil-1-pikrilhidrazil (DPPH). Metode ini dipilih karena kemudahannya dan kemampuannya dalam mengukur aktivitas penangkapan radikal secara cepat. Penentuan aktivitas antioksidan metode DPPH ditentukan berdasarkan nilai IC50 (Inhibitory Concentration 50%), yaitu konsentrasi sampel yang dibutuhkan untuk menghambat 50% radikal DPPH. Langkah awal uji antioksidan dilakukan dengan pembuatan deret konsentrasi. Deret konsentrasi yang digunakan yaitu 10, 20, 40, 80, dan 160 ppm. Setiap larutan deret konsentrasi ini ditambahkan 1 mL larutan DPPH 0,4 mM, dan volume total masing-masing larutan dicukupkan hingga 5 mL dengan metanol. Sebagai kontrol, 1 mL larutan DPPH 0,4 mM dicukupkan hingga 5 mL dengan metanol, tanpa penambahan sampel. Kemudian diinkubasi dalam kondisi gelap untuk memastikan reaksi antara DPPH dan senyawa

antioksidan dalam sampel berlangsung optimal dan diukur absorbansinya.

Hasil serapan yang diperoleh dikonversi menjadi persentase resistansi atau persentase inhibisi radikal DPPH menggunakan rumus perhitungan Suteja et al. (2022). Data persentase resistansi pada setiap titik konsentrasi dianalisis menggunakan regresi linear, dengan konsentrasi sampel sebagai variabel x dan persentase hambatan sebagai variabel y, sehingga diperoleh persamaan garis yang merepresentasikan hubungan antara keduanya, sebagaimana disajikan pada Gambar 4. Keempat kombinasi sampel, yaitu C2 tanpa MSG, C2 dengan MSG 1%, C10 tanpa MSG, dan C10 dengan MSG 1%, menghasilkan koefisien determinasi (R^2) berkisar antara 0,9916 hingga 0,9960. Nilai R^2 yang mendekati 1 ini menunjukkan bahwa model regresi linear menjelaskan hubungan antara konsentrasi dan persentase inhibisi dengan sangat baik, sehingga perhitungan IC_{50} melalui interpolasi persamaan garis tersebut dapat diandalkan.

Aktivitas antioksidan dinyatakan melalui nilai IC_{50} , yaitu konsentrasi yang diperlukan untuk meredam 50% radikal bebas DPPH. Data pada Tabel 2 menunjukkan bahwa semakin tinggi konsentrasi sampel, semakin tinggi pula persentase penghambatan terhadap radikal bebas, sejalan dengan pernyataan Kuntari et al. (2017) bahwa peningkatan persentase hambatan berbanding lurus dengan kandungan metabolit sekunder yang berperan sebagai antioksidan. Yati et al. (2018) menegaskan bahwa semakin kecil nilai IC_{50} , semakin baik pula aktivitas antioksidan suatu senyawa. Noer et al. (2017) mengklasifikasikan kekuatan aktivitas antioksidan menjadi empat kategori: sangat kuat untuk IC_{50} kurang dari 50 ppm, kuat untuk 50–100 ppm, sedang untuk 100–150 ppm, dan lemah untuk 150–200 ppm. Nilai IC_{50} pada penelitian ini tercatat 940,11 ppm untuk C2 tanpa MSG, 1124,97 ppm untuk C2 MSG 1%, 884,73 ppm untuk C10 tanpa MSG, dan 939,17 ppm untuk C10 MSG 1%, dengan koefisien determinasi (R^2) berkisar 0,9916–0,9960 yang menunjukkan kesesuaian model regresi linear yang tinggi. Keempat nilai tersebut berada jauh di atas ambang kategori lemah menurut klasifikasi Noer et al. (2017), sehingga aktivitas antioksidan ekstrak GABA dari isolat C2 dan C10 pada kondisi penelitian

ini tergolong rendah dan belum memenuhi kriteria antioksidan fungsional yang kompetitif.

Studi ini memiliki beberapa keterbatasan metodologis yang perlu diperhatikan pada penelitian selanjutnya. Pertama, deteksi GABA hanya dilakukan melalui satu metode analisis, yaitu Thin Layer Chromatography, sehingga konfirmasi keberadaan GABA akan lebih meyakinkan apabila didukung metode beresolusi tinggi seperti High Performance Liquid Chromatography (HPLC) atau spektrometri massa. Kedua, penggunaan Pregabalin sebagai larutan standar merupakan pendekatan praktis mengingat ketersediaannya di pasaran, namun karena Pregabalin adalah analog struktural GABA dan bukan GABA murni, perbandingan nilai R_f terhadap standar ini berpotensi menimbulkan bias interpretasi yang perlu dikonfirmasi menggunakan standar GABA murni pada penelitian mendatang. Ketiga, aktivitas antioksidan yang relatif rendah pada seluruh sampel kemungkinan disebabkan oleh ekstrak kasar yang belum murni, mengandung campuran senyawa lain di luar GABA yang tidak berkontribusi terhadap aktivitas penangkapan radikal bebas, sehingga tahap pemurnian lanjutan diperlukan untuk mengisolasi fraksi aktif secara spesifik.

5. KESIMPULAN

Bakteri asam laktat (BAL) ditemukan pada produk fermentasi Chao asal Pangkep. Isolat BAL C2 dan C10 dari Chao, makanan khas daerah Pangkep, terdeteksi mengandung senyawa GABA berdasarkan metode KLT. Nilai R_f yang diperoleh dari isolat C2 dan C10 dengan penambahan MSG 1% yaitu 0,84 dan 0,86, lebih mendekati nilai R_f larutan standar yaitu 0,88 dibandingkan tanpa penambahan MSG. Isolat C2 dan C10, baik dengan maupun tanpa penambahan MSG, memiliki nilai IC_{50} >200 ppm dengan koefisien determinasi (R^2) 0,9916–0,9960, yang menandakan aktivitas antioksidannya tergolong rendah dan berada jauh di atas ambang kategori lemah. Riset lanjutan dapat diarahkan pada penambahan prekursor produksi GABA, sementara aktivitas antioksidan berpotensi ditingkatkan dengan menyesuaikan konsentrasi garam dan lama fermentasi pada produk Chao, mengingat kedua faktor ini memengaruhi pertumbuhan BAL sekaligus aktivitas antioksidan yang dihasilkannya.

DAFTAR PUSTAKA

- Amenu, D., & Bacha, K. (2023). Probiotic potential and safety analysis of lactic acid bacteria isolated from Ethiopian traditional fermented foods and beverages. *Annals of Microbiology*, 73(1). <https://doi.org/10.1186/s13213-023-01740-9>
- Aulia, A..S.N. (2021). Seleksi Bakteri Asam Laktat Penghasil GABA (Gamma-Aminobutyric acid) dari Susu Kuda Bima.
- Asnita, D., & Meryandini, A. (2023). Bakteri Asam Laktat Kandidat Probiotik dari Susu Kuda Bima Lactic Acid Bacteria from Bima Horse ' s Milk as a Probiotic Candidates. *Sumberdaya HAYATI*, 9(2), 49–54.
<https://journal.ipb.ac.id/index.php/sumberdayahayati>
- Bai, X., Shi, P., & Chu, W.(2025). Probiotic attributes, antioxidant and neuromodulatory effects of GABA-Producing *Lactiplantibacillus plantarum* SY1 and optimization of GABA production. *BMC Microbiology*, 25(1). <https://doi.org/10.1186/s12866-025-04070-9>
- Berliyantia, A. R., Suprihadia, A., & Kusdiyantini, E. (2020). Deteksi Gamma-Aminobutyric Acid (GABA) pada bakteri asam laktat hasil isolasi produk fermentasi petis ikan dari Rembang. *NICHE Journal of Tropical Biology*, 3(2), 59–67.
<https://ejournal2.undip.ac.id/index.php/niche/article/download/9565/4889>
- Darmawan, D., Usdayana Attahmid, N., & Reta, R. (2021). Modifikasi Chao Belut Sawah (*Monopterus albus*) sebagai Pangan Fungsional. *Lutjanus*, 26(1), 38–44.
<https://doi.org/10.51978/jlpp.v26i1.417>
- HANDAYANI, R. (2016). Identifikasi produksi GABA dari kultur Bakteri Asam Laktat (BAL) dengan metode TLC. 2(iii), 208–213.
<https://doi.org/10.13057/psnmbi/m020215>
- Indrowati, M., Astuti, P., Pratiwi, R., & Rumiati. (2015). Deteksi Gamma Amino Butric Acid (GABA) pada Daun *Artocarpus altilis*. *Prosiding Seminar Nasional Pendidikan Sains*, November, 595–600.
- Irma, A., Meryandini, A., & Rupaedah, B. (2018). Biofungicide producing bacteria: An in vitro inhibitor of *Ganoderma boninense*. *HAYATI Journal of Biosciences*, 25(4), 151–159.
<https://doi.org/10.4308/hjb.25.4.151>
- Kuntari, Z., Sumpono, S., & Nurhamidah, N. (2017). AKTIVITAS ANTIOKSIDAN METABOLIT SEKUNDER BAKTERI ENDOFIT AKAR TANAMAN *Moringa oleifera* L (Kelor). *Alotrop*, 1(2), 80–84.
<https://doi.org/10.33369/atp.v1i2.3483>
- Lee, J., Kim, S., & Kang, C. H. (2023). Screening and Probiotic Properties of Lactic Acid Bacteria with Potential Immunostimulatory Activity Isolated from Kimchi. *Fermentation*, 9(1). <https://doi.org/10.3390/fermentation9010004>
- Matti, A., Utami, T., Hidayat, C., & S. Rahayu, E. (2019). Isolation, Screening, and Identification of Proteolytic Lactic Acid Bacteria from Indigenous Chao Product. *Journal of Aquatic Food Product Technology*, 28(7), 781–793.
<https://doi.org/10.1080/10498850.2019.1639872>
- Noer, S., Pratiwi, R. D., & Gresinta, E. (2017). Uji Aktivitas Antioksidan dan Uji Antibakteri *Fusobacterium nucleatum* dari Ekstrak Etanol Daun *Ruta angustifolia*. *Prosiding Seminar Nasional 2017 Fakultas Pertanian UMI*, 272–277.
- Nursini, N. W., & Yogeswara, I. B. A. (2023). Production of gamma aminobutyric acid (Gaba) *Lactobacillus plantarum* PH715 in fermented milk. *ARGIPA (Arsip Gizi Dan Pangan)*, 8(1), 69–80.
<https://doi.org/10.22236/argipa.v8i1.8369>
- Pratiwi, A. ., Yusran, Islawati, & Artati. (2023). Analisis Kadar Antioksidan pada Ekstrak Daun Binahong Hijau *Anredera cordifolia* (Ten.) Steenis. *Bioma : Jurnal Biologi Makassar*, 8(August 2022), 66–

74.
<https://journal.unhas.ac.id/index.php/bio>
ma
- Priadi, G., Setiyoningrum, F., Afiati, F., Irzaldi, R., & Lisdiyanti, P. (2020). Studi in Vitro Bakteri Asam Laktat Kandidat Probiotik Dari Makanan Fermentasi Indonesia. *Jurnal Teknologi Dan Industri Pangan*, 31(1), 21–28.
<https://doi.org/10.6066/jtip.2020.31.1.21>
- Pribadhi, A. N., Kusdiyantini, E., & Ferniah, R. S. (2021). Isolasi Dan Karakterisasi Bakteri Asam Laktat Dari Pangan Fermentasi Cincalok Sebagai Penghasil Gamma-Aminobutyric Acid. *Jurnal Bioteknologi & Biosains Indonesia (JBBI)*, 8(1), 25–32.
<https://doi.org/10.29122/jbbi.v8i1.3906>
- Rahayu, Y. C., Setiawatie, E. M., Rahayu, R. P., & Ramadan, D. E. (2023). Analysis of antioxidant and antibacterial activity of cocoa pod husk extract (*Theobroma cacao* L.). *Dental Journal*, 56(4), 220–225.
<https://doi.org/10.20473/J.DJMKG.V56.14.P220-225>
- Sahab, N. R. M., Subroto, E., Balia, R. L., & Utama, G. L. (2020). γ -Aminobutyric acid found in fermented foods and beverages: current trends. *Heliyon*, 6(11), e05526.
<https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2020.e05526>
- Siska, S. M. T. (2023). JUMLAH BAKTERI ASAM LAKTAT (BAL) PADA SAUERKRAUT DARI KUBIS UNGU (*Brasica oleracea* var. capitata L.f. rubra) DENGAN KONSENTRASI GARAM YANG BERBEDA. *Biocelebes*, 17(1), 38–45.
<https://doi.org/10.22487/bioceb.v17i1.16328>
- Suryani, E. M., & Gaffar, A. (2024). Isolasi Dan Karakterisasi Bakteri Asam Laktat Dari Susu Kuda Bima (*Equus* sp.) Yang Berpotensi Sebagai Probiotik. *Jurnal Ilmiah Biosaintropis (Bioscience-Tropic)*, 9(2), 102–108.
<https://doi.org/10.33474/e-jbst.v9i2.561>
- Susalam, M. K., Marlida, Y., Harnentis, H., & ... (2022). Isolasi Dan Identifikasi Bakteri Asam Laktat Asal Ikan Fermentasi Budu Sumatra Barat Terhadap Sifat-Sifat Probiotik. *Prosiding Seminar Teknologi Dan Agribisnis Peternakan IX*, 2018, 592–600.
<http://jnp.fapet.unsoed.ac.id/index.php/psv/article/view/1654%0Ahttp://jnp.fapet.unsoed.ac.id/index.php/psv/article/download/1654/708>
- Suteja, I. I., Wijanarka, W., & Kusdiyantini, E. (2022). Uji dan Identifikasi Aktivitas Antioksidan Isolat BAL CIN-2 Hasil Isolasi Cincalok. *Jurnal Penelitian Saintek*, 27(1), 49–60.
<https://doi.org/10.21831/jps.v1i1.44187>
- Yati, S. J., Sumpono, S., & Candra, I. N. (2018). POTENSI AKTIVITAS ANTIOKSIDAN METABOLIT SEKUNDER DARI BAKTERI ENDOFIT PADA DAUN *Moringa oleifera* L. *Alotrop*, 2(1), 82–87.
<https://doi.org/10.33369/atp.v2i1.4744>