



DETECTION OF GAMMA-AMINOBUTYRIC ACID (GABA) IN LACTID ACID BACTERIAL ISOLATES FROM CHAO PANGKEP FERMENTATION PRODUCTS

DETEKSI GAMMA-AMINOBUTYRIC ACID (GABA) PADA ISOLAT BAKTERI ASAM LAKTAT DARI PRODUK FERMENTASI CHAO PANGKEP

Ririn Irfayanti Zaenab¹, Ade Irma², Miladiarsi³

^{1,2}Biomedical Science Program, Institute of Health Science of Megarezky, Manggala, Makassar, 90234, Indonesia

³Plant Protection, Faculty of Agriculture, Lambung Mangkurat University, Jl.Gen.Achmad Yani Km. 35.5 Banjarbaru, South Kalimantan

ARTICLE INFO	ABSTRACT
<p>Article History: Received : 21 Juli 2025 Revise : 18 Agustus 2025 Accepted : 18 Agustus 2025</p> <p>*Corresponding authors: Ririn Irfayanti Zaenab Biomedical sciences, Megarezky University, Manggala, Makassar, 90234, Indonesia Email: ririnirfayantizaenab@gmail.com</p>	<p>Bakteri Asam Laktat (BAL) adalah kelompok mikroorganisme General Recognized as Safe (GRAS) yang berperan penting dalam menghasilkan senyawa fungsional, termasuk Gamma-aminobutyric acid (GABA). GABA merupakan asam amino non-protein yang memiliki fungsi sebagai penghambat neurotransmitter utama dalam sistem saraf pusat juga berperan sebagai antioksidan. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui kemampuan BAL dari produk fermentasi Chao khas daerah Pangkep dalam menghasilkan senyawa GABA sebagai antioksidan menggunakan metode Thin Layer Chromatography (TLC). Berdasarkan penelitian yang dilakukan diperoleh nilai Retention factor (Rf) isolat BAL C2 tanpa MSG yaitu 0,82, C2 MSG 1% 0,84, C10 tanpa MSG 0,8 dan 0,64, C10 MSG 1% 0,86 dan 0,68. Dengan aktivitas antioksidan berdasarkan nilai IC50 C2 tanpa MSG 940,11 ppm, C2 MSG 1% 1124,97 ppm, C10 tanpa MSG 884,73 ppm, dan C10 MSG 1% 939,17 ppm. Nilai Rf isolat C2 dan C10 dengan penambahan MSG 1% lebih menghampiri nilai Rf larutan standar yaitu 0,88 dan aktivitas antioksidan isolat C2 dan C10 tergolong sangat lemah dikarenakan nilai IC50 nya >200 ppm. Ini dapat menjadi dasar optimalisasi produksi GABA oleh BAL dari produk fermentasi lokal seperti Chao untuk pengembangan probiotik atau suplemen fungsional yang bermanfaat untuk kesehatan.</p> <p>Kata kunci: Chao, Bakteri Asam Laktat, Gamma-Aminobutyric Acid, Antioksidan</p> <p>Lactic Acid Bacteria (LAB) are a group of microorganisms generally recognized as safe (GRAS) that play a vital role in producing functional compounds, including Gamma-aminobutyric acid (GABA). GABA is a non-protein amino acid that functions as a major inhibitory neurotransmitter in the central nervous system and also acts as an antioxidant. This study aimed to determine the ability of LAB from a local fermented product, Pangkep Chao, to produce GABA as an antioxidant using Thin Layer Chromatography (TLC). Based on the research, the retention factor (Rf) values for LAB isolates were as follows: C2 without MSG was 0.82, C2 with 1% MSG was 0.84, C10 without MSG was 0.8 and 0.64, and C10 with 1% MSG was 0.86 and 0.68. The antioxidant activity, based on the IC50 value, was 940.11 ppm for C2 without MSG, 1124.97 ppm for C2 with 1% MSG, 884.73 ppm for C10 without MSG, and 939.17 ppm for C10 with 1% MSG. The Rf values of the C2 and C10 isolates with 1% MSG were closer to the standard solution's Rf value of 0.88, but the antioxidant activity of the C2 and C10 isolates was considered very weak because their IC50 values >200 ppm. This research can serve as a basis for optimizing GABA production by LAB from local fermented products like Chao for the development of beneficial probiotics or functional supplements.</p> <p>Keywords: Chao, Lactic Acid Bacteria, Gamma-Aminobutyric Acid, Antioxidant</p>



PENDAHULUAN

Indonesia memiliki keanekaragaman pangan fermentasi yang tersebar di berbagai wilayah, salah satunya adalah Chao makanan fermentasi ikan dari Pangkep, Sulawesi Selatan (Priadi et al., 2020; Darmawan et al., 2021). Proses fermentasi sangat bergantung pada aktivitas bakteri asam laktat (BAL) kelompok mikroorganisme yang diakui aman atau disebut *general 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.

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.

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. 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).

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).

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.

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 dipekatkan menggunakan rotary vacuum evaporator pada suhu ±40 °C. Ekstrak yang diperoleh diuapkan pada suhu ruang agar sisa eluen dapat hilang (Irma et al., 2018).

6. Deteksi Gamma-Aminobutyric acid (GABA) Metode Thin Layer Chromatography (TLC)

Deteksi produksi GABA oleh BAL dilakukan dengan metode kromatografi lapis tipis (KLT). Lempong 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 dalam oven selama 30 menit.

Larutan standar GABA (Pregabalin 75 mg) dan supernatant hasil ekstraksi isolat secara berurutan dispotkan pada lempeng TLC alumunium menggunakan pipet kapiler. Kemudian lempeng TLC didiamkan selama 15 menit dalam chamber berisi eluen. TLC dilakukan menggunakan larutan pengembang (eluen) yang terdiri dari campuran n-butanol: asam asetat: aquades 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).

$$Rf = \frac{a}{b}$$

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).

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

Uji antioksidan diawali dengan pembuatan larutan DPPH 0,4 mM dari 0,015 gr serbuk DPPH yang dilarutkan dalam 100 mL metanol menggunakan labu ukur. Selanjutnya, larutan sampel 1000 ppm dibuat dengan melarutkan 0,01 gr sampel dalam 10 mL metanol di tabung reaksi. Untuk penentuan aktivitas antioksidan (IC₅₀), ekstrak sampel 1000 ppm dipipet sebanyak 0,2; 0,4; 0,8; 1,6; dan 3,2 mL untuk membuat 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. 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:

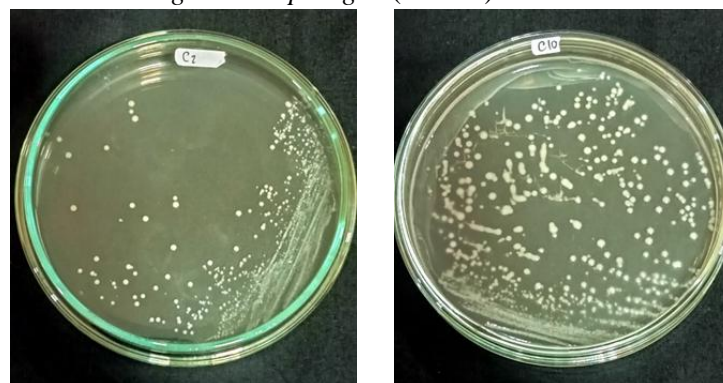
$$\% \text{Hambatan} = \frac{A \text{ Blanko} - A \text{ Sampel}}{A \text{ Blanko}} \times 100\%$$

Selanjutnya, dari hasil persentase resistensi 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 R_f dan intensitas noda terhadap standar, sedangkan aktivitas antioksidan dievaluasi melalui persentase penghambatan radikal bebas. Hasil disajikan dalam bentuk tabel dan grafik.

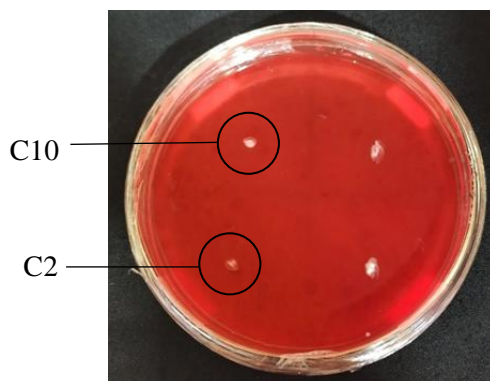
HASIL

Stok isolat bakteri asam laktat yang diperoleh dari produk fermentasi Chao khas daerah Pangkep diremajakan pada media *de Man Rogosa Sharpe Agar* (MRSA).



Gambar 1. Hasil peremajaan isolat BAL C2 dan C10

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.



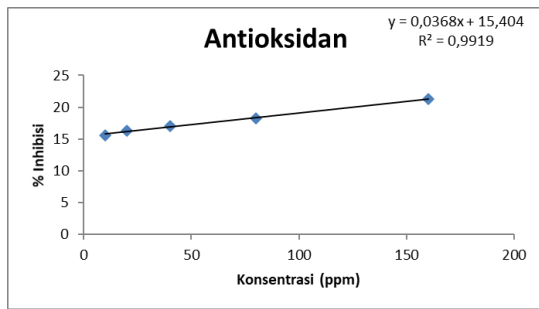
Gambar 3. Media produksi GABA isolate C2 dan C10

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.

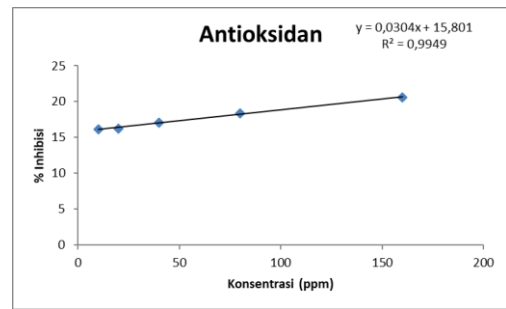
Tabel 1. Hasil perhitungan nilai Rf

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

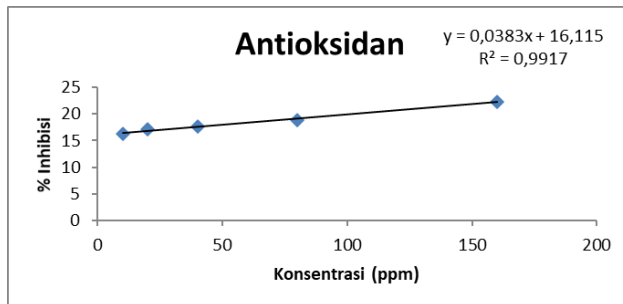
Senyawa *Gamma-aminobutyric acid* (GABA) sebagai Antioksidan dideteksi menggunakan metode *2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl* (DPPH) berdasarkan nilai IC_{50} yang diperoleh dari kurva persamaan linear.



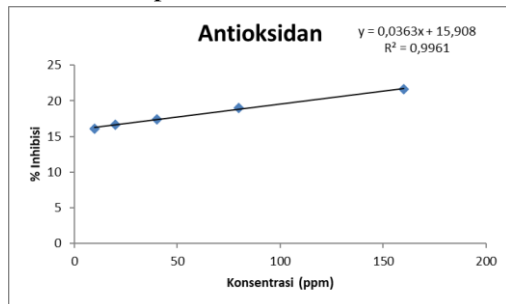
Gambar 4. Kurva persamaan linear antara konsentrasi sampel dan persentasi resistensi C2 non MSG



Gambar 5. Kurva persamaan linear antara konsentrasi sampel dan persentasi resistensi C2 MSG



Gambar 6. Kurva persamaan linear antara konsentrasi sampel dan persentasi resistensi C10 non MSG



Gambar 7. Kurva persamaan linear antara konsentrasi sampel dan persentasi resistensi C10 MSG

Tabel 2. Nilai IC₅₀ isolat C2 dan C10

No	Kode Sampel	Berat Sampel	Konsentrasi (ppm)	Absorbansi	ppm antioksidan	Nilai IC ₅₀
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		0,0102	10	0,811	16,13	939,17



	0,0102	20	0,806	16,65
C10 MSG	0,0102	40	0,799	17,37
1%	0,0102	80	0,783	19,03
	0,0102	160	0,758	21,61

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 untuk 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 untuk 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 berisis 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 yaitu C2 dan C10 menunjukkan aktivitas gamma hemolitik (non-hemolitik). Ini berarti bahwa isolat C2 dan C10 tidak menyebabkan lisis sel darah merah pada media agar darah domba. Gambar 2 menunjukkan hasil pengujian hemolitik isolat C2 dan C10 yang tidak membentuk zona lisis di sekitar koloni. Hasil ini mengindikasikan bahwa kedua isolat BAL tersebut tidak memiliki sifat hemolitik. Ini sesuai dengan penelitian yang dilakukan (Bai et al., 2025) *Lactobacillus plantarum* tidak menunjukkan aktivitas hemolitik dan didukung dengan pernyataan (Suryani & Gaffar, 2024) bahwa BAL non hemolisis adalah *Bacillus spp* dan yang berpotensi sebagai probiotik tidak mempunyai aktivitas hemolitik. Sehingga ini menjadi dasar penting untuk melanjutkan ke tahapan 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 kuva pertumbuhan, sedangkan inkubasi 30 jam 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 setelah dimasukkan ke dalam rumus perhitungan nilai Rf diperoleh nilai Rf-nya sebagaimana ditunjukkan pada tabel 4. 1. Nilai Rf masing-masing sampel menghampiri nilai Rf larutan standar (Pregabalin 75 mg) yaitu

0,88, namun nilai Rf sampel yang mengandung MSG 1% lebih mendekati nilai Rf larutan standar. Hal ini dikarenakan penambahan glutamat ke medium menghasilkan peningkatan biomassa sesuai dengan pernyataan (Berliyantia et al., 2020) bahwa MSG difungsikan sebagai substrat utama untuk diubah menjadi GABA oleh enzim *glutamate decarboxylase* yang dihasilkan BAL. Didukung oleh penelitian (Pribadhi et al., 2021) yang menyatakan bahwa penambahan glutamat dalam media dapat meningkatkan biomassa dari mikroba. Glutamat merupakan substat dari GABA, aktivitas enzim GAD dapat meningkat dan mengikat substrat sehingga produksi GABA meningkat.

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 IC_{50} (*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 diukur dalam persentase resistansi atau persentase inhibisi radikal DPPH menggunakan rumus perhitungan Suteja et al (2022). Data persentase resistansi pada masing-masing konsentrasi dibuat analisis regresi dengan nilai x konsentrasi sampel dan nilai y persentase hambatan sampel sehingga didapatkan persamaan linier yang merepresentasikan hubungan antara konsentrasi sampel dan persentase resistansi yang dapat dilihat pada gambar 4, gambar 5, gambar 6, dan gambar 7. Masing-masing sampel diperoleh nilai R^2 (koefisien determinasi) mendekati 1, ini menunjukkan bahwa model regresi linear sangat baik dalam menjelaskan hubungan antara konsentrasi dan persentase inhibisi sehingga perhitungan IC_{50} akan lebih akurat.

Aktivitas antioksidan dinyatakan oleh nilai IC_{50} yaitu konsentrasi yang dapat mengurangi 50% radikal bebas dari DPPH. Aktivitas antioksidan berdasarkan tabel 2 menunjukkan bahwa semakin tinggi konsentrasi sampel semakin tinggi pula persentase penghambatan dalam menghambat radikal bebas, hal ini sesuai dengan pernyataan yang dikemukakan (Kuntari et al., 2017) yang berarti jumlah kandungan metabolit sekunder yang berperan sebagai antioksidan semakin tinggi pula. Menurut (Yati et al., 2018) semakin kecil nilai IC_{50} aktivitas antioksidan semakin baik. Senyawa memiliki aktivitas antioksidan sangat kuat jika nilai IC_{50} kurang dari 50 ppm, kuat 50 - 100 ppm, sedang 100 - 150 ppm, dan lemah nilai IC_{50} 150 – 200 ppm

(Noer et al., 2017). Nilai IC_{50} sampel C2 non MSG yaitu 940,11 ppm, C2 MSG1% 1124,97 ppm, C10 non MSG 884,73 ppm, dan C10 MSG 1% 939,17 ppm. Masing-masing ekstrak sampel diperoleh secara interpolasi, keempatnya termasuk dalam golongan antioksidan yang sangat lemah karena memiliki nilai $IC_{50} > 200$ ppm.

Studi ini memiliki beberapa keterbatasan salah satunya yaitu hanya melakukan satu metode dalam deteksi GABA yang mungkin deteksi keberadaan GABA bisa dikonfirmasi ulang dengan menggunakan metode analisis yang memiliki resolusi tinggi seperti *High Performance Liquid Chromatography* (HPLC). Dan aktivitas antioksidan yang lemah kemungkinan disebabkan karena senyawa aktif yang terekstrak bukanlah senyawa murni antioksidan dengan dugaan mengandung senyawa lain yang bertindak bukan sebagai antioksidan.

KESIMPULAN

Bakteri asam laktat (BAL) ditemukan pada produk fermentasi Chao asal Pangkep. Isolat BAL C2 dan C10 dari Chao makanan khas daerah Pangkep terdeteksi senyawa GABA dengan menggunakan metode KLT. Nilai R_f yang diperoleh dari isolat C2 dan C10 dengan penambahan MSG 1% yaitu 0,84 dan 0,86 lebih menghampiri nilai R_f larutan standar yaitu 0,88. Isolat C2 dan C10 baik penambahan MSG maupun tanpa penambahan MSG memiliki nilai $IC_{50} > 200$ ppm yang menandakan aktivitas antioksidannya tergolong sangat lemah. Untuk riset lebih lanjut bisa dilakukan penambahan prekursor produksi GABA selain itu, untuk aktivitas antioksidan bisa disesuaikan dengan konsentrasi garam dan lama fermentasi pada produk fermentasi Chao, hal ini mempengaruhi BAL yang juga berdampak terhadap aktivitas antioksidan.

REFERENSI

- 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., & Kusdiyantinia, 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., Dewi, R., & Gresinta, E. (2017). *Fusobacterium nucleatum* DARI EKSTRAK ETANOL DAUN *Ruta angustifolia*. 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/bioma>
- 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.I4.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. *Biocelbes*, 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., Sains, F., Diponegoro, U., Soedarto, J. P., & Tembalang-semarang, S. H. (n.d.). *Uji dan identifi kasi aktivitas antioksidan isolat BAL CIN-2 hasil isolasi cincalok Test and identifi cation of antioxidant activity of isolates LAB CIN-2 isolated from cincalok*. 27(1), 49–60.
- 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>