

PRODUKSI ASAM GAMMA AMINO BUTIRAT (GABA) LACTOBACILLUS PLANTARUM PH715 PADA SUSU TERFERMENTASI

Production of gamma aminobutyric acid (Gaba) Lactobacillus plantarum PH715 in fermented milk

Ni Wayan Nursini*, Ida Bagus Agung Yogeswara

Program Studi Gizi, Fakultas Kesehatan, Sains dan Teknologi, Universitas Dhyana Pura, Bali, Indonesia

*Email korespondensi: nursini@undhirabali.ac.id

Submitted: November 26th 2022

Revised: May 25th 2023

Accepted: June 4th 2023

How to cite: 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.

ABSTRACT

Fermentation has a great potential to increase gamma aminobutyric acid (GABA) content, one of which is fermented milk. In particular, fermentation by lactic acid bacteria can produce GABA in its most natural and suitable form. The purpose of this study was to examine the potential of *Lactobacillus plantarum* PH715 to produce GABA as a starter for fermented milk. Temperature and incubation time are factors that affect the production of GABA in fermented milk. The pH measurement with pH meter, population with scatter method, GABA content produced was analysed quantitatively using UPLC. Based on the observation, *L. plantarum* PH715 is a gram-positive bacteria, bacil-shaped, purple in colour, catalase negative and does not produce gas. The pH value at the fermentation time of 48 hours with a temperature of 37°C and 43°C has met the pH requirements as fermented milk, which are 4.21 and 4.25. The population of *L. plantarum* PH715 at incubation times of 0, 12, 24, 36 and 48 hours at temperatures of 37°C and 43°C met the probiotic requirements. The highest GABA content of fermented milk by *L. plantarum* PH715 was at an incubation temperature of 37°C for 48 hours with the addition of 2% MSG at 2.09mg/mL.

Keywords: Gaba, *Lactobacillus plantarum*, Fermented Milk

ABSTRAK

Fermentasi memiliki potensi besar untuk meningkatkan kandungan GABA (*gamma amino butyric acid*) salah satunya adalah susu fermentasi. Secara khusus, fermentasi oleh bakteri asam laktat dapat menghasilkan GABA dalam bentuknya yang paling alami dan sesuai. Tujuan dari penelitian ini adalah untuk melihat potensi *L. plantarum* PH715 penghasil GABA sebagai starter susu fermentasi. Suhu dan waktu inkubasi merupakan salah satu faktor yang memengaruhi produksi GABA pada susu fermentasi. Pengukuran pH dengan pH meter, populasi dengan metode sebar, kadar GABA yang dihasilkan dianalisis secara kuantitatif menggunakan UPLC. Berdasarkan hasil pengamatan *L. plantarum* PH715 merupakan bakteri gram positif, berbentuk *bacil*, berwarna ungu, katalase negatif dan tidak menghasilkan gas. Nilai pH pada waktu fermentasi 48 jam dengan suhu 37°C dan 43°C sudah memenuhi syarat pH sebagai susu fermentasi yaitu 4,21 dan 4,25. Populasi *L. plantarum* PH715 pada waktu inkubasi 0, 12, 24, 36 dan 48 jam pada suhu 37°C dan 43°C sudah memenuhi syarat probiotik. Kadar GABA susu terfermentasi oleh *L. plantarum* PH715 tertinggi adalah pada suhu inkubasi 37°C selama 48 jam dengan penambahan 2% MSG sebesar 2,09 mg/mL.

PENDAHULUAN

Asam γ -aminobutirat (GABA) adalah asam amino non-protein yang diproduksi melalui reaksi *irreversible* α - dekarboksilasi dari asam amino L - glutamat yang dikatalisis oleh enzim asam glutamat dekarboksilase (Li et al., 2010; Yalçinkaya et al., 2019; Zhuang et al., 2018). GABA memiliki struktur umum $H_2N(CH_2)-CO_2H$ (Anju et al., 2014). GABA merupakan neurotransmitter, inhibitor utama pada sistem saraf pusat dan berperan dalam mengatur proses fisiologi (tekanan darah dan detak jantung), psikologi, meningkatkan konsentrasi plasma, hormon pertumbuhan dan sintesis protein di dalam otak (Cho et al., 2007; Villegas et al., 2016; Watanabe et al., 2015). Konsumsi makanan yang diperkaya GABA dapat menghambat proliferasi sel kanker (Park & Oh, 2007), meningkatkan daya ingat serta kemampuan belajar (Miura et al., 2006). Kekurangan GABA dapat menyebabkan beberapa penyakit seperti Huntington, Parkinson, Alzheimer, skizofrenia, dan depresi (Diana et al., 2014).

Penelitian terbaru berfokus pada cara-cara alami memproduksi GABA sebagai senyawa bioaktif untuk digunakan di industri farmasi dan makanan. Secara khusus, fermentasi oleh bakteri asam laktat dapat menghasilkan GABA dalam bentuknya yang paling alami dan sesuai (Xu et al., 2017). Bakteri asam laktat menghasil-

kan GABA selama fermentasi sebagai mekanisme pertahanan untuk mempertahankan kelangsungan hidup dalam kondisi asam, salah satunya adalah susu terfermentasi. Bakteri asam laktat menggunakan piridoksal 5'-fosfat (PLP) sebagai kofaktor untuk mengatalisis α -dekarboksilasi asam glutamat atau garamnya dalam media (Shi & Li, 2011; Xu et al., 2017). Kemampuan memproduksi GABA dari strain BAL yang berbeda dapat bervariasi dan bergantung pada parameter fermentasi atau aditif yang berbeda, termasuk pH, suhu, waktu fermentasi, penambahan PLP, dan komposisi media (Song & Yu, 2018).

Berbagai bakteri penghasil GABA telah diisolasi dari kimci, daun teh, ikan fermentasi, keju, dan yoghurt (Cho et al., 2007; Komatsuzaki et al., 2005; Lu et al., 2008; Park et al., 2014; Santos-Espinosa et al., 2020). Penelitian terbaru melaporkan BAL dapat menyintesis GABA pada GABA dalam konsentrasi yang tinggi pada keju artisanal Meksiko (Gonzalez-Gonzalez et al., 2019). *Lactobacillus rhamnosus* YS9 memiliki batas konsentrasi MSG sebesar 200 mM, suhu inkubasi 43°C, 200 μ M PLP dan pH medium 4,4 mampu menghasilkan 1,87 mM GABA (Lin, 2013). Hal ini berbeda dengan *Lactobacillus rhamnosus* GG yang dipergunakan dalam fermentasi kacang adzuki yang menggunakan 2,27% MSG, 1,44% galaktosa, 0,20% PLP pada suhu

inkubasi 37°C pada pH medium 4,4 mampu menghasilkan 1,12 mg/mL GABA (Song & Yu, 2018). Mengingat pentingnya peranan berbagai aspek kesehatan, yang didapatkan dari bahan alami seperti pada makanan dan minuman terfermentasi. Berdasarkan uraian di atas, maka perlu dilakukan penelitian lebih lanjut dengan tujuan melihat potensi *Lactobacillus plantarum* PH715 penghasil GABA yang merupakan isolat lokal yang diisolasi dari *pickle* (acar) rebung sebagai starter susu fermentasi.

METODE

Penelitian ini berlangsung selama periode September–November 2021. Penelitian ini meliputi penyiapan kultur starter, pembuatan starter susu terfermentasi, pembuatan susu terfermentasi, pengukuran pH (pH meter), analisis populasi bakteri asam laktat pada susu terfermentasi (metode sebar), penentuan kadar GABA (UPLC).

Bahan kimia yang digunakan dalam penelitian ini adalah media MRS broth (Oxoid), MRS agar (Oxoid), Natrium Clorida (Merck), Mono Sodium Glutamat (MSG), standar GABA (γ -Amino butyric acid, Sigma), HCl 6 N, standar AABA 2,5 mM (*alpha amino butyric acid*), Accq. Tag Fluor Borrate Buffer, Reagent 2A (f 6 aminoquinolyl-N-hidroksisucinimidil karbamat (AQC), akuades, alkohol 70% (Brataco kimia), dan spiritus. Alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah tabung reaksi (*iwaki-pyrex*), erlenmeyer (*iwaki-pyrex*), gelas beker

(*iwaki-pyrex*), gelas ukur (*iwaki-pyrex*), magnetic stirer, stirer bar (*iwaki BS-38*), cawan petri (*iwaki-pyrex*), kaca objek, cover glass, tabung eppendorf 1,5 ml, timbangan (*Shimadzu AUX 220*), otoklaf (*Tomy*), laminar air flow cabinet (*ESCO*), inkubator (*Memmert*), mikroskop (*Olympus*), jarum ose, pipetman (*Gilson*) ukuran 1000 μ l, 200 μ l, 20 μ l tips biru, kuning, kristal (*porex bio product*), sentrifugasi (*Hitachi*), vortex (*Labinco*), kulkas (*Toshiba*), freezer -20 °C, UPLC (Waters), detector (Waters), coloum (Waters), lampu bunsen, selop tangan, masker, dan kertas tisu.

Penyiapan Kultur Starter

Strain *Lactobacillus plantarum* PH715 yang sudah tumbuh dalam media MRS broth dihomogenkan dengan divortex, kemudian dipisahkan antara supernatan dan massa sel dengan sentrifugasi berkecepatan 7000 rpm selama 5 menit. Massa sel yang diperoleh selanjutnya dilarutkan dengan 5 mL susu (Anggraini et al., 2019).

Pembuatan Starter Susu Terfermentasi

Susu skim cair (Diamond) dipasteurisasi pada suhu 80°C selama 30 menit, kemudian didinginkan sampai suhu mencapai 45°C, ditambahkan inokulum 2% v/v (kultur aktif *Lactobacillus plantarum* PH715) dan diinkubasi selama 48 jam pada suhu 37°C hingga mencapai pH 4-4,5, starter siap digunakan.

Pengukuran pH susu terfermentasi menggunakan pH meter digital (Martini instruments Mi-105). Sampel ditimbang

sebanyak 10gram kemudian dimasukkan ke dalam gelas piala dan ditambahkan 10 mL aquades lalu diukur pHnya. Sebelum mengukur larutan, pH meter dikalibrasi dengan menggunakan buffer pH 4 dan 7 (Sudarmadji et al., 1997).

Pembuatan Susu Terfermentasi

Susu skim cair dipasteurisasikan pada suhu 80°C selama 30 menit, lalu didinginkan hingga mencapai suhu 45 °C. Setelah dingin, ditambahkan starter *Lactobacillus plantarum* PH715 (penambahan starter pada pembuatan susu fermentasi sebanyak 5% b/v). Susu yang telah ditambahkan starter diinkubasi dalam inkubator pada suhu 37°C dan 43°C selama 0, 12, 24, 36, dan 48 jam (pH 4-4,5). Selanjutnya dilakukan pengukuran pH. Metode pengujiannya sama dengan pengujian pH pada starter susu terfermentasi.

Produksi GABA Susu Terfermentasi

Susu terfermentasi yang sudah mencapai waktu inkubasi dihentikan fermentasinya dengan merendam susu terfermentasi pada *waterbath* suhu 75°C selama 15 menit (Santos-Espinosa et al., 2020). Produksi GABA susu terfermentasi diawali dengan penyiapan supernatan. Sebanyak 1 ml susu terfermentasi disentrifugasi pada 13.000 rpm selama 10 menit pada suhu 4°C, kemudian supernatan diambil dan diuji secara kuantitatif dengan UPLC (Seo et al., 2013).

Analisis secara kuantitatif dengan *Ultra Performance Liquid Chromatography* (UPLC) (Waters) (Sheliya&Shah, 2013;

Szkudzin´ska et al., 2017). Kultur yang sudah tumbuh pada media MRS Broth dihomogenkan dengan vortex, kemudian dipipet sebanyak 1 ml dan dimasukkan ke dalam tabung sentrifugasi, selanjutnya disentrifugasi pada 10000 rpm selama 15 menit pada suhu 4°C. Selanjutnya supernatan dipipet dan dipindahkan pada tabung sentrifugasi yang baru. Supernatan ini siap dipreparasi untuk UPLC.

Preparasi sampel diawali dengan ditimbang 0,1-1,0 g sampel ke dalam vial *head space* 20 mL (Waters No. 186000384C), ditambahkan 5 mL HCl 6 N, lalu vial ditutup. Sampel dipanaskan di dalam oven pada suhu 110°C selama 22 jam, kemudian diangkat dan didinginkan, dipindahkan larutan sampel ke dalam labu ukur 50 mL, selanjutnya dibilas vial *head space* dan diencerkan dengan akuabides sampai tanda batas, lalu dihomogenkan. Larutan sampel disaring dengan kertas saring tak berabu grade 42, disaring kembali dengan syringe filter GHP/RC 0,2 µm (Millipore-USA). Sampel yang sudah disaring dipipet 500 µL ke dalam tube 2 mL, ditambahkan 40 µL internal standar AABA 2,5 mM (*alpha amino butyric acid*) dan 460 µL akuabides, vortex. Selanjutnya, proses derivatisasi larutan sampel.

Proses derivatisasi dilakukan dengan dipipet masing-masing 10 µL larutan standar atau sampel yang telah ditambahkan internal standar AABA ke dalam *insert vial*, tambahkan 70 µL Accq. Tag Fluor Borrate Buffer (Waters), vortex, kemudian ditambahkan 20 µL

Reagent 2A (f 6 aminoquinolyl-N-hydroxysuccinimidyl carbamate (AQC) (Waters), vortex, dipanaskan pada *heating block* dengan suhu 60°C selama tepat 10 menit, kemudian diangkat, didinginkan sampai suhu ruang, lalu diinjeksikan larutan ke sistem UPLC (Waters). Kondisi kromatografi adalah kolom : AccQ.Tag Ultra C18 1,7 μ m (2,1 x 100 mm) (Waters), fase gerak : A : Accq.Tag Ultra Eluent A 100%, B : Accq.Tag Ultra Eluent B : akuabides 90 : 1, C : Akuabides, D : Accq.Tag Ultra Eluent B 100% dengan laju alir : 0,5 mL/menit, sistem pompa : Gradien, volume injeksi : 1 μ L, suhu kolom : 49 °C dan detektor : PDA 260 nm (WATERS).

Analisis Statistik

Analisis data diperoleh dari hasil pengulangan tiga kali yang disajikan dalam bentuk $\text{mean} \pm \text{standar deviasi}$. Data diuji statistik *One-Way* ANOVA dengan menggunakan software SPSS 16. Level signifikan yang ditetapkan sebesar $\alpha = 0,05$.

HASIL

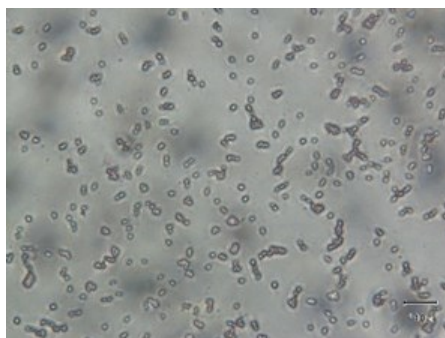
Lactobacillus plantarum PH715 dan Pertumbuhannya

Lactobacillus plantarum PH715 merupakan strain yang diisolasi dari

pickle rebung yang merupakan koleksi dari *Udayana University Culture Collection* (UNCC) yang berpotensi menghasilkan GABA. Uji konfirmasi ini dilakukan dengan empat cara yaitu uji pewarnaan Gram yang bertujuan untuk mengetahui isolat bakteri yang digunakan tergolong dalam bakteri Gram positif atau Gram negatif, pengamatan morfologi sel bakteri dengan mikroskop untuk mengetahui bentuk dari bakteri, uji katalase untuk mengetahui apakah bakteri tersebut dapat menghasilkan enzim katalase atau tidak. Morfologi *L. plantarum* PH715 dapat dilihat pada Gambar 1.

Produksi GABA Susu Terfermentasi

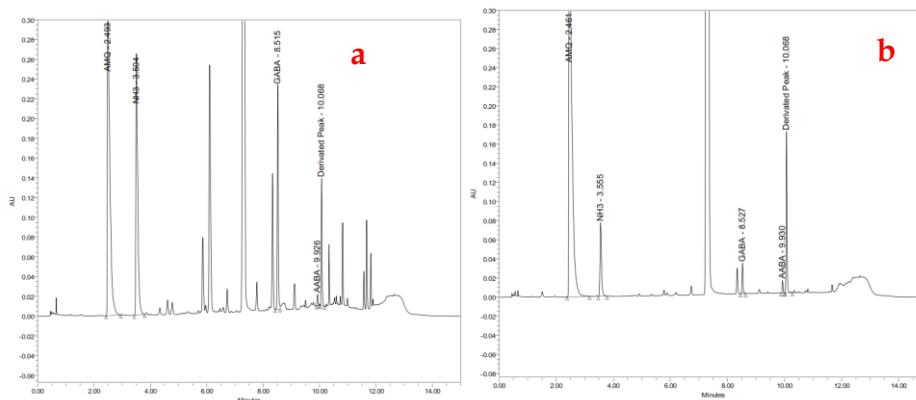
Pembuatan susu fermentasi diawali dengan pembuatan starter, berdasarkan perhitungan didapatkan nilai pH dan populasi dari starter yaitu 4,15 dan $4,5 \times 10^9$ cfu/ml. Berdasarkan hasil uji yang dilakukan maka didapatkan data nilai pH, populasi dan kadar GABA (Tabel 1). Waktu munculnya GABA pada media MRS dengan 2% MSG dan pada susu fermentasi dan nama puncak serta luas area dapat dilihat pada Gambar 2.



Gambar 1. Morfologi *L. plantarum* PH715 (P1000x)

Tabel 1.
Nilai pH, populasi dan kadar GABA susu terfermentasi *L. plantarum* PH715 yang diinkubasi pada suhu dan waktu yang berbeda

Waktu (jam)	Suhu					
	37°C			43°C		
	pH	Populasi (cfu/mL)	Kadar GABA (mg/mL)	pH	Populasi (cfu/mL)	Kadar GABA (mg/mL)
0	6,57	2,1x10 ²	0	6,57	2,1x10 ²	0
12	6,20	1,22x10 ⁵	0	6,18	2,15x10 ⁵	0
24	5,37	1,25x10 ⁸	0	5,18	2,11x10 ⁸	0
36	4,72	1,33x10 ⁹	0	4,76	1,92x10 ⁹	0
48	4,12	1,04x10 ⁹	2,92	4,25	1,13x10 ⁹	0,06



Gambar 2. Waktu munculnya GABA pada media MRS dengan 2% MSG (a) dan pada susu terfermentasi *L. plantarum* PH715 (b)

DISKUSI

Berdasarkan hasil pengamatan *L. plantarum* PH715 merupakan bakteri gram positif, berbentuk basil, berwarna ungu, katalase negatif, dan tidak menghasilkan gas. Hal ini sesuai dengan pernyataan Salminen et al. (2004) bahwa bakteri asam laktat adalah bakteri Gram positif, non motil, katalase negatif, dan memproduksi asam laktat dari glukosa. Diskusi memaknai hasil yang ditemukan dalam penelitian dan membandingkannya dengan teori/konsep/temuan dari hasil penelitian lain menggunakan acuan primer.

Nilai pH susu terfermentasi yang dihasilkan berdasarkan perlakuan ini berkisar dari 4,21-6,57 (Tabel 1). Hal ini menunjukkan bahwa waktu suhu fermentasi memengaruhi aktivitas fermentasi sehingga perlu waktu yang tepat untuk mendapatkan nilai pH yang sesuai dengan syarat sebagai susu fermentasi, sesuai pernyataan Askar dan Sugiarto (2005); SNI Yoghurt (2009) menyatakan bahwa pH produk susu terfermentasi seharusnya berkisar antara pH 3,68 sampai pH 4,2. Jadi berdasarkan nilai pH waktu fermentasi 48 jam pada suhu 37°C dan 43°C sudah memenuhi

syarat pH sebagai susu fermentasi yaitu 4,21 dan 4,25.

Hasil ini menunjukkan bahwa aktivitas fermentasi mungkin terkait dengan kapasitas untuk menghasilkan GABA, telah dilaporkan bahwa enzim GAD (*glutamic acid decarboxylase*) bekerja secara optimal pada biokonversi asam glutamat ke GABA pada pH 4,4 (Huang et al., 2016). Hal ini sejalan dengan penggunaan *Lactococcus* spp dalam pembuatan susu fermentasi penghasil GABA yang berada pada kisaran pH 4-6 pada suhu 37°C (Espinosa et al., 2020). Suhu optimum produksi GABA adalah 36°C (Harnentis et al., 2019), pH dan jumlah prekursor (glutamat), sumber karbon, sumber nitrogen, dan aditif media kultur lainnya merupakan faktor yang memengaruhi produksi GABA oleh mikroorganismenya, serta pH optimum untuk aktivitas dekarboksilase glutamat sangat tergantung spesies (Diana et al., 2014).

Berdasarkan hasil penelitian populasi *L. plantarum* PH715 pada waktu inkubasi 24, 36, dan 48 jam pada suhu 37°C dan 43°C sudah memenuhi syarat probiotik. Populasi *L. plantarum* PH715 pada media MRS adalah 10⁸cfu/ml dan pada starter dan susu terfermentasi adalah 10⁹cfu/ml. Populasi ini telah memenuhi syarat sebagai probiotik, dimana syarat minimal total BAL sebanyak 10⁶ cfu/mL (Kailasapathy et al., 2000) dan untuk syarat total BAL pada susu terfermentasi yaitu 1,0 × 10⁸ cfu/mL (Tamime & Robinson, 2002).

Lactobacillus merupakan genus yang paling sering dilaporkan sebagai

penghasil GABA dan strain ini telah diisolasi dari susu, keju, susu fermentasi, *pickle*, *the*, dan minuman nabati, dan kehadiran GAD telah diidentifikasi (Di Cagno et al., 2010; Franciosi et al., 2015; Lin, 2013; Nejati et al., 2013; Santos-Espinosa et al., 2020; Siragusa et al., 2007; Song & Yu, 2018). Susu fermentasi yang dibuat pada penelitian ini dengan menggunakan susu skim dan *Lactobacillus rhamnosus* tanpa ada penambahan MSG ataupun PLP dalam pembuatan susu terfermentasi sebagai prekursor GABA. Namun Schmidt et al., (2017) menyatakan bahwa PLP terdapat pada susu dalam konsentrasi rendah (3 µM) dan PLP merupakan kofaktor enzimatik yang dimiliki oleh bakteri digunakan untuk meningkatkan efisiensi atau aktivitas enzim GAD sehingga mendukung produksi GABA (Li et al., 2016). GABA tertinggi dihasilkan oleh *Lactobacillus plantarum* PH715 yaitu 2,09 mg/mL. GABA yang dihasilkan ini memang tergolong rendah dibandingkan strain *Lactobacillus plantarum* lainnya.

Berbagai penelitian telah dilakukan dalam rangka mengevaluasi produksi GABA di berbagai substrat, seperti media kultur, sayuran minuman, produk daging, makanan laut, dan terutama produk susu (Di Cagno et al., 2010; Ratanaburee et al., 2013; Shan et al., 2015; Taoka et al., 2019). Semua laporan studi ini menyatakan produksi GABA yang alami tergantung terutama pada konsentrasi glutamat di matriks makanan dan strain BAL yang digunakan serta kondisi fermentasi.

Sebagai contoh, yoghurt ditambahkan dengan *Lactobacillus plantarum* NDC75017 memengaruhi produksi GABA yang mencapai 3145,6 mg/kg (Shan et al., 2015). Dalam penelitian lain, *Lactobacillus brevis* 877G menghasilkan 1,95 g/L GABA dalam susu skim. Jika menggunakan campuran *Lactobacillus brevis* 877G dan *Lactobacillus sakei* 795 (1:1) lebih meningkatkan produksi GABA menjadi 2,32 g/L (Seo et al., 2013). Hal ini berbeda dengan *Lactobacillus rhamnosus* GG yang dipergunakan dalam fermentasi kacang adzuki mampu menghasilkan 1,12 mg/mL GABA (Song & Yu, 2018). Pada penelitian ini produksi GABA yang dihasilkan masih tergolong rendah, hal ini disebabkan oleh kondisi pertumbuhan optimal mereka (Minervini et al., 2009) atau ekspresi enzim GAD dari strain (Li et al., 2013). Selain itu, beberapa strain mungkin ada kekurangan dalam sistem transportasi glutamat-GABA menuju bagian dalam dan luar sel (Feehily & Karatzas, 2013) atau asimilasi glutamat di jalur metabolisme lain, yang akan membatasi produksi GABA (Fernández & Zúñiga, 2006).

Aktivitas biokatalitik enzim meningkat dengan meningkatnya suhu dan menurun dengan cepat setelah optimum. Karena denaturasi protein, suhu optimum biasanya tidak lebih tinggi dari 40°C (Berg et al., 2002). Selain suhu optimum untuk aktivitas GABA, mikroorganisme memiliki suhu pertumbuhan optimum. Butuh waktu bagi mikroorganisme untuk terbiasa dengan lingkungan baru mereka dan

memulai fermentasi. Produksi GABA umumnya meningkat dengan waktu fermentasi, tetapi waktu fermentasi yang lebih tinggi menyebabkan hilangnya biomassa. Hal ini umumnya disebabkan oleh menipisnya komponen yang diperlukan dari media atau karena efek penghambatan konsentrasi GABA yang tinggi atau metabolit lainnya (Sattley & Madigan, 2015).

SIMPULAN

Berdasarkan hasil penelitian dapat disimpulkan bahwa *Lactobacillus plantarum* PH715 dapat dijadikan starter susu terfermentasi yang mampu menghasilkan GABA. *Lactobacillus plantarum* PH715 mampu menghasilkan GABA sebesar 2,09 mg/mL pada suhu inkubasi 37°C selama 48 jam dan 0,06 mg/mL pada suhu 43°C selama 48 jam. Produksi GABA masih tergolong rendah, sehingga dilakukan riset lebih lanjut terkait penambahan prekursor GABA untuk meningkatkan produksi GABA.

UCAPAN TERIMA KASIH

Terimakasih kepada LPPM Universitas Dhyana Pura, yang telah mendanai penelitian ini melalui Hibah Internal Perguruan Tinggi tahun 2021 dengan Kontrak No. 037/UNDHIRA/LPPM/Lit/2021 dan UPT Lab. Biosains dan Bioteknologi Universitas Udayana yang sudah memberikan tempat untuk melaksanakan penelitian.

DAFTAR RUJUKAN

Anggraini, L., Marlida, Y., Wizna, W.,

- Jamsari, J., & Mirzah, M. (2019). Optimization of nutrient medium for *Pediococcus acidilactici* DS15 to produce GABA. *Journal of World's Poultry Research*, 9(3), 139-146.
- Anju, P., Moothedath, I., & Shree, A. B. R. (2014). Gamma amino butyric acid accumulation in medicinal plants without stress. *Ancient Science of Life*, 34(2), 68-72.
- Askar, S. & Sugiarto. (2005). Uji kimiawi dan organoleptik sebagai uji mutu yoghurt. *Prosiding Temu Teknis Nasional Tenaga Fungsional Pertanian*, 118-113.
- Badan Standar Nasional. 2009. Yoghurt. SNI 2981:2009.
- Berg, J. M., Tymoczko, J. L. & Stryer, L. (2002). Biochemistry. 5th Edition. New York: W. H. Freeman Publishing.
- Cho, Y. R., Chang, J. Y., & Chang, H. C. (2007). Production of γ -aminobutyric acid (GABA) by *Lactobacillus buchneri* isolated from kimchi and its neuroprotective effect on neuronal cells. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 17(1), 104-109.
- Di Cagno, R., Mazzacane, F., Rizzello, C. G., De Angelis, M., Giuliani, G., Meloni, M., De Servi, B., & Gobbetti, M. (2010). Synthesis of γ -aminobutyric acid (GABA) by *Lactobacillus plantarum* DSM19463: Functional grape must beverage and dermatological applications. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 86(2), 731-741.
- Diana, M., Quílez, J., & Rafecas, M. (2014). Gamma-aminobutyric acid as a bioactive compound in foods: A review. *Journal of Functional Foods*, 10, 407-420.
- Feehily, C. & Karatzas, K. A. G. (2013). Role of glutamate metabolism in bacterial responses towards acid and other stresses. *Journal of Applied Microbiology*, 114(1), 11-24.
- Fernández, M. & Zúñiga, M. (2006). Amino acid catabolic pathways of lactic acid bacteria. *Critical Reviews in Microbiology*, 32(3), 155-183.
- Franciosi, E., Carafa, I., Nardin, T., Schiavon, S., Poznanski, E., Cavazza, A., Larcher, R., & Tuohy, K. M. (2015). Biodiversity and γ -aminobutyric acid production by lactic acid bacteria isolated from traditional alpine raw cow's milk cheeses. *BioMed Research International*, 2015.
- Gonzalez-Gonzalez, C. R., Machado, J., Correia, S., McCartney, A. L., Stephen Elmore, J., & Jauregi, P. (2019). Highly proteolytic bacteria from semi-ripened Chiapas cheese elicit angiotensin-I converting enzyme inhibition and antioxidant activity. *Lwt*, 111, 449-456.
- Harnentis, H., Nurmiati, N., Marlida, Y., Adzitey, F., & Huda, N. (2019). Aminobutyric acid production by selected lactic acid bacteria isolate of an Indonesian indigenous fermented buffalo milk (dadih) origin. *Veterinary World*, 12(8), 1352-1357.
- Huang, Y., Su, L., & Wu, J. (2016). Pyridoxine supplementation improves the activity of recombinant glutamate decarboxylase and the enzymatic production of gamma-aminobutyric acid. *PLoS ONE*, 11(7), 1-18.
- Kailasapathy, K., Sultana, K., & Godward, G. (2000). Probiotic Bacteria: Improved Delivery by Bioencapsulation Probiotica. *J. Dairy Technology*, 9, 2-7.
- Komatsuzaki, N., Shima, J., Kawamoto, S., & Momose, H. (2005).

- Production of γ -aminobutyric acid (GABA) by *Lactobacillus paracasei* isolated from traditional fermented foods. *Food Microbiology*, 22(6), 497–504.
- Li, H., Li, W., Liu, X., & Cao, Y. (2013). GadA gene locus in *Lactobacillus brevis* NCL912 and its expression during fed-batch fermentation. *FEMS Microbiology Letters*, 349(2), 108–116.
- Li, H., Qiu, T., Huang, G., & Cao, Y. (2010). Production of gamma-aminobutyric acid by *Lactobacillus brevis* NCL912 using fed-batch fermentation. *Microbial Cell Factories*, 9:85, 1–7.
- Li, W., Wei, M., Wu, J., Rui, X., & Dong, M. (2016). Novel fermented chickpea milk with enhanced level of γ -aminobutyric acid and neuroprotective effect on PC12 cells. *PeerJ*, 2016(4), 1–20.
- Lin, Q. (2013). Submerged fermentation of *Lactobacillus rhamnosus* YS9 for γ -aminobutyric acid (GABA) production. *Brazilian Journal of Microbiology*, 44(1), 183–187.
- Lu, X., Chen, Z., Gu, Z., & Han, Y. (2008). Isolation of γ -aminobutyric acid-producing bacteria and optimization of fermentative medium. *Biochemical Engineering Journal*, 41(1), 48–52.
- Minervini, F., Bilancia, M. T., Siragusa, S., Gobbetti, M., & Caponio, F. (2009). Fermented goats' milk produced with selected multiple starters as a potentially functional food. *Food Microbiology*, 26(6), 559–564.
- Miura, D., Ito, Y., Mizukuchi, A., Kise, M., Aoto, H., & Yagasaki, K. (2006). Hypocholesterolemic action of pre-germinated brown rice in hepatoma-bearing rats. *Life Sciences*, 79(3), 259–264.
- Nejati, F., Rizzello, C. G., Di Cagno, R., Sheikh-Zeinoddin, M., Diviccaro, A., Minervini, F., & Gobbetti, M. (2013). Manufacture of a functional fermented milk enriched of Angiotensin-I Converting Enzyme (ACE)-inhibitory peptides and γ -amino butyric acid (GABA). *LWT - Food Science and Technology*, 51(1), 183–189.
- Park, K. B. & Oh, S. H. (2007). Production of yogurt with enhanced levels of gamma-aminobutyric acid and valuable nutrients using lactic acid bacteria and germinated soybean extract. *Bioresource Technology*, 98(8), 1675–1679.
- Park, S. Y., Lee, J. W., & Lim, S. D. (2014). The probiotic characteristics and GABA production of *Lactobacillus plantarum* K154 isolated from kimchi. *Food Science and Biotechnology*, 23(6), 1951–1957.
- Ratanaburee, A., Kantachote, D., Charernjiratrakul, W., & Sukhoom, A. (2013). Selection of γ -aminobutyric acid-producing lactic acid bacteria and their potential as probiotics for use as starter cultures in Thai fermented sausages (Nham). *International Journal of Food Science and Technology*, 48(7), 1371–1382.
- Salminen, S., Wright, A. V. & Ouwehand, A. (eds). (2004). *Lactic Acid Bacteria "Microbiological and Functional Aspect" Third Edition, Revision and Expanded*. Boca Raton: CRC Press..
- Santos-Espinosa, A., Beltrán-Barrientos, L. M., Reyes-Díaz, R., Mazorra-Manzano, M. Á., Hernández-Mendoza, A., González-Aguilar, G. A., Sáyago-Ayerdi, S. G., Vallejo-Córdoba, B., & González-Córdova, A. F. (2020). Gamma-aminobutyric acid (GABA) production in milk fermented by specific wild lactic acid bacteria strains isolated from

- artisanal Mexican cheeses. *Annals of Microbiology*, 70:12, 1-11.
- Sattley, W. M. & Madigan, M. T. & (2015). Microbiology. In: eLS. Chichester: John Wiley & Sons, Ltd.
- Schmidt, A., Schreiner, M. G., & Mayer, H. K. (2017). Rapid determination of the various native forms of vitamin B6 and B2 in cow's milk using ultra-high performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography A*, 1500, 89-95.
- Seo, M.-J., Lee, J.-Y., Nam, Y.-D., Lee, S.-Y., Park, S.-L., Yi, S.-H., Lee, M.-H., Roh, S. W., Choi, H.-J., & Lim, S.-I. (2013). Production of γ -Aminobutyric Acid by *Lactobacillus brevis* 340G Isolated from Kimchi and Its Application to Skim Milk. *Food Engineering Progress*, 17(4), 418-423.
- Shan, Y., Man, C. X., Han, X., Li, L., Guo, Y., Deng, Y., Li, T., Zhang, L. W., & Jiang, Y. J. (2015). Evaluation of improved γ -aminobutyric acid production in yogurt using *Lactobacillus plantarum* NDC75017. *Journal of Dairy Science*, 98(4), 2138-2149.
- Sheliya, K.G & K.V. Shah, (2013). Ultra Performance Liquid Chromatography (UPLC): a Modern Chromatography Technique. *Pharma Science Monitor*, 4(3), 78-99
- Shi, F., & Li, Y. (2011). Synthesis of γ -aminobutyric acid by expressing *Lactobacillus brevis*-derived glutamate decarboxylase in the *Corynebacterium glutamicum* strain ATCC 13032. *Biotechnology Letters*, 33(12), 2469-2474.
- Siragusa, S., De Angelis, M., Di Cagno, R., Rizzello, C. G., Coda, R., & Gobbetti, M. (2007). Synthesis of γ -aminobutyric acid by lactic acid bacteria isolated from a variety of Italian cheeses. *Applied and Environmental Microbiology*, 73(22), 7283-7290.
- Song, H. Y. & Yu, R. C. (2018). Optimization of culture conditions for gamma-aminobutyric acid production in fermented adzuki bean milk. *Journal of Food and Drug Analysis*, 26(1), 74-81.
- Sudarmadji et al. 1997. Prosedur Analisis untuk Bahan Pangan dan Pertanian. Yogyakarta: Liberty.
- Szkudzin'ska, K., Smutniak, I., Rubaj, J., Korol, W., & Bielecka, G. (2017). Method validation for determination of amino acids in feed by UPLC. *Accred Qual Assur*, 22, 247-252.
- Tamime, A. Y. & Robinson, K. R. (2002). *Yogurt Science and Technology*. USA: CRC Press.
- Taoka, Y., Nakamura, M., Nagai, S., Nagasaka, N., Tanaka, R., & Uchida, K. (2019). Production of anserine-rich fish sauce from giant masu salmon, *Oncorhynchus masou masou* and γ -aminobutyric acid (GABA)-enrichment by *Lactobacillus plantarum* strain N10. *Fermentation*, 5(2), 45.
- Villegas, J. M., Brown, L., de Giori, G. S., & Hebert, E. M. (2016). Optimization of batch culture conditions for GABA production by *Lactobacillus brevis* CRL 1942, isolated from quinoa sourdough. *LWT - Food Science and Technology*, 67, 22-26.
- Watanabe, N., Endo, Y., Fujimoto, K., & Aoki, H. (2015). Tempeh-like fermented soybean (GABA-tempeh) has an effective influence on lipid metabolism in rats. *Journal of Oleo Science*, 55(8), 391-396.
- Xu, N., Wei, L., & Liu, J. (2017). Biotechnological advances and perspectives of gamma-

- aminobutyric acid production. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 33(3), 64.
- Yalçınkaya, S., Kılıç, G. B., & Çakmakçı, A. G. K. (2019). The Importance of Gamma Aminobutyric Acid Produced by Lactic Acid Bacteria. *Turkish Journal of Agriculture - Food Science and Technology*, 7(8), 1094–1099.
- Zhuang, K., Jiang, Y., Feng, X., Li, L., Dang, F., Zhang, W., & Man, C. (2018). Transcriptomic response to GABA-producing *Lactobacillus plantarum* CGMCC 1.2437T induced by L-MSG. *PLoS ONE*, 13(6), 1–18.