



# **GABA ASAM AMINO ANTI STRES**

**Yetti Marlida  
Lili Anggraini**



# GABA ASAM AMINO ANTI STRES

**Penulis** : Yetti Marlida  
Lili Anggraini

**Desain Sampul** : Syamsul Hidayat

**Tata Letak** : Syamsul Hidayat  
Ikhsanul Anwar

**ISBN** : 978-623-6234-62-4

**Ukuran Buku** : 15,5 x 23 cm

**Tahun Terbit** : 2022

**Cetakan** : Pertama

**Anggota** : *Asosiasi Penerbit Perguruan Tinggi Indonesia (APPTI)*

**Dicetak dan diterbitkan oleh :**

*Andalas University Press*

*Jl. Situjuh No. 1, Padang 25129*

*Telp/Faks. : 0751-27066*

*email : cebitunand@gmail.com*

**Hak Cipta Pada Penulis © 2022**

**Hak Cipta dilindungi Undang-Undang.**

*Dilarang mengutip atau memperbanyak sebahagian atau seluruh isi buku tanpa izin tertulis dari penerbit.*

## KATA PENGANTAR

Buku dengan judul *Gaba Sebagai asam amino anti stres* ditulis merujuk kepada beberapa jurnal International, hasil penelitian penulis sendiri yang di danai oleh Dirjen pendidikan Tinggi (Dikti) melalui Program Hibah Fundamental tahun 2017 – 2019 dan Hibah penelitian PMDSU tahun 2016-2019 yang telah menanmatkan satu orang Doktor bernama Dr. Lili Anggraini, SPT.

Peran Gamma amino butyric Acid (Gaba) sebagai anti stres terurama anti heat stres karena lingkungan pemeliharaan eksternal seperti suhu lingkungan dan kepadatan kandang yang melebihi kapasitas sesungguhnya. Gaba sebetulnya dapat diproduksi oleh tubuh ternak sendiri pada bahagian sel otak, namun jumlah yang diproduksi kadangkala terbatas, sehingga perlu di tambahkan dari luar seperti melalui air minum atau pakan. Pada saat ini berbagai mikroba dapat dieksploitasi dalam memproduksi asam amino ini, dimana asam amino ini mempunyai prekursor asam amino glutamat yang juga dapat di produksi oleh mikroba seperti bakteri asam laktat.

Pada buku ini akan di khususkan produksi Gaba dari bakteri asam laktat yang diisolasi dari produk pangan fermentasi secara alami di Sumatera Barat seperti *dadih* (susu kerbau fermentasi), *tempoyak* (durian fermentasi) dan *budu* (ikan fermentasi). Bagaimana cara mengisolasi, memilih, isolat yang tepat, memproduksi dengan memodifikasi medium, dan lingkungan eksternal, scale up produksi dan aplikasi pada ayan broiler dalam mengatasi stres akibat kelebihan kapasitas kandang yaitu 12 ekor/M<sup>2</sup> dimana secara normal hanya mampu 8 ekor/M<sup>2</sup>.

Terima kasih banyak dari penulis kepada teman-teman sejawat, mahasiswa S1 Prodi Ilmu Peternakan, mahasiswa S2 dan S3 Program Pascasarjana Universitas Andalas yang telah ikut mengerjakan penelitian tentang GABA, Dirjen perguruan Tinggi (Dikti) melalui Hibah Fundamental dan Program PMDSU, yang telah memperkaya ilmu pengetahuan penulis dalam menyelesaikan buku ini.

Padang, Desember 2021

Penulis,



(Prof. Dr. Ir. Yetti Marlida,MS)



# DAFTAR ISI

KATA PENGANTAR	iii
DAFTAR ISI	v
DAFTAR TABEL	ix
DAFTAR GAMBAR	xi
I. Pendahuluan	1
II. Sumber Isolasi Mikroba Penghasil GABA	5
2.1 Produk Pangan Fermentasi	5
2.1.1 Dadih (Susu Kerbau Fermentasi)	6
2.1.2 Budu (Ikan Fermentasi)	7
2.1.3 Tempoyak (Durian Fermentasi)	9
2.2 Potensi Bakteri Asam Laktat (BAL) Penghasil GABA	11
2.3 Isolasi, Karakterisasi dan Identifikasi BAL	15
2.3.1 Isolasi dan Karakterisasi Bakteri	15
2.3.2 Identifikasi Bakteri	17
2.3.3 Gen 16S-rRNA	17
2.3.4 Sekuensing	18
2.3.5 Polymerase Chain Reaction (PCR)	19
III. Sumber Isolasi Mikroba Penghasil GABA	23
3.1 Faktor-faktor yang Mempengaruhi Produksi GABA	23
3.1.1 pH Awal Inkubasi	24
3.1.2 Suhu Inkubasi	25
3.1.3 Lama Inkubasi	26
3.1.4 Sumber Karbon	26
3.1.5 Sumber Nitrogen	27
3.1.6 Konsentrasi Glutamat	28
3.1.7 Konsentrasi Inokulum	28
3.2 Biosintesis Gamma Amino Butyric Acid (GABA)	31

3.3 Pemurnian Asam Amino	36
IV. Penyebab Stres pada Ternak	39
4.1 Kepadatan Kandang Broiler	40
4.2 Pengaruh Cekaman Panas terhadap Broiler	42
4.2.1 Aktivitas Hormonal	42
4.2.2 Aktivitas Organ Penyerapan	45
4.2.3 Performa Ternak	45
4.2.4 Organ	47
4.2.5 Sifat Fisik Daging Ayam	50
V. Peran GABA dalam Mengatasi Stres	55
5.1 Stres pada Broiler	59
5.1.1 Konsumsi Ransum	60
5.1.2 Pertambahan Bobot Badan	62
5.1.3 Konsumsi Ransum	64
5.1.4 Bobot Akhir	65
5.1.5 Konsumsi Air Minum	67
5.1.6 pH Daging	68
5.1.7 Bursa Fabricius	70
5.1.8 Organ Dalam	72
5.1.9 Suhu Rektal	74
5.1.10 Mortalitas	75
5.2 Aplikasi GABA pada Ayam Petelur	76
5.2.1 Produksi Telur dan Performa	77
5.2.2 Kualitas Telur	78
5.2.3 Profil Darah dan Haptoglobin	78
5.3 Aplikasi GABA dalam Peningkatan Kesehatan Manusia	79
5.3.1 Efek Neuroprotektif	80
5.3.2 Pencegahan Gangguan Neurologis	81
5.3.3 Efek Anti-Hipertensi	83
5.3.4 Efek Anti-Diabetes	85

5.3.5 Anti-Kanker	87
5.3.6 Anti-Oksidan	89
5.3.7 Efek Anti Peradangan	90
5.3.8 Anti Mikroba	91
5.3.9 Efek Anti-Alergi	92
5.3.10 Efek Hepatoproteksi	93
5.3.11 Renoprotektif	94
5.3.12 Efek Perlindungan Usus	96
VI. Daftar Pustaka	97



## **DAFTAR TABEL**

1	Beberapa BAL yang diisolasi dari produk pangan fermentasi	10
2	Kemampuan BAL penghasil GABA	14
3	Optimasi produksi GABA oleh BAL	29



## DAFTAR GAMBAR

1	Dadiah ( <i>sumber: google image</i> )	6
2	Budu ( <i>sumber Foto pribadi</i> )	8
3	Asam durian ( <i>sumber: dokumentasi pribadi</i> )	9
4	Manfaat BAL ( <i>sumber: Paneri, et al., 2013</i> )	12
5	Bagan alir isolasi BAL penghasil GABA asal pangan fermentasi Sumatera Barat ( <i>Anggraini, 2020</i> )	16
6	Bagan alir isolasi BAL penghasil GABA asal pangan fermentasi Sumatera Barat ( <i>Anggraini, 2020</i> )	20
7	Susunan nukleotida isolat DS15 hasil sekuensing gen 16s rRNA	21
8	Sintesis GABA dari L-Glutamat ( <i>sumber: Radhika et al., 2012</i> )	32
9	Jalur Metabolik GABA ( <i>GABA shunt pathway</i> ) ( <i>sumber: Mahendarn and Jayarahman, 2019</i> )	32
10	<i>GABA shunt reactions</i> bertanggungjawab untuk sintesis, konservasi dan metabolisme GABA. GABA-T, GABA $\alpha$ -oxoglutarate transaminase; GAD (glutamic acid decarboxylase); SSADH, succinic semialdehyde dehydrogenase ( <i>Sumber; Olsen and Timothy, 1999</i> )	35
11	.Bagan alir proses produksi GABA ( <i>Anggraini, 2020</i> )	36
12	Jalur aktivasi hipotalamus-hipofisa-adrenal korteks pada keadaan menderita cekaman panas dan dampak utama yang ditimbulkannya serta jalur ekskresi, metabolise, dan ekskresi hormon kortisol ( <i>Sumber; Most and Palme, 2002; Boonstra, 2005</i> )	43
13	Pengaruh suhu lingkungan tinggi terhadap aktivitas hormonal tubuh ayam. ( <i>Sumber: Guyton, 1976</i> )	44
14	Pengaruh suhu lingkungan terhadap aktivitas metabolisme tubuh ayam. ( <i>Sumber: Fuller and Rendon, 1977</i> )	47

15	Bursa fabricius pada ayam	49
16	Target terapi untuk aktivitas neuroprotektif Gaba.	81
17	Tindakan pencegahan Gaba pada gangguan neurologis.	82
18	Target terapi Gaba untuk aktivitas anti-diabetes	86
19	Aktivitas modulasi Gaba untuk promosi antioksidan	89
20	Target terapi untuk aktivitas anti-inflamasi Gaba	91
21	Target terapi untuk aktivitas anti-alergi Gaba	93
22	Mekanisme aksi Gaba untuk Hepatoproteksi	94
23	Makanisme aksi Gaba untuk Renoprotektif	95

# BAB I

## PENDAHULUAN

Isolasi merupakan proses yang dapat dilakukan untuk mendapatkan berbagai jenis mikroorganisme dari habitat aslinya. Sumatera Barat memiliki berbagai *food biodiversity* hasil fermentasi seperti *dadih*, *ikan budu*, *asam durian* dan *tapai singkong* yang dapat dijadikan sumber mikroorganisme. Bakteri asam laktat (BAL) merupakan salah satu mikroba yang terdapat pada pangan fermentasi yang dapat dieksplorasi manfaat dan kemampuannya. Gamma aminobutyric acid (GABA) adalah jenis metabolit sekunder yang dihasilkan oleh mikroba dan memiliki fungsi sebagai asam amino neurotransmitter. GABA dapat meredakan efek stres sehingga mempertahankan performans dan kesehatan ternak. Penggunaan GABA dapat menggantikan pemberian *feed additive* seperti AGP pada ternak sehingga menghasilkan produk peternakan yang aman bagi konsumen (*food safety*) dan ramah lingkungan (*eco-friendly*).

Mikroorganisme hasil isolasi perlu diidentifikasi untuk mengetahui jenis serta strainnya sehingga karakteristik dari mikroorganisme tersebut dapat diketahui guna pemanfaatan kemampuannya. Mikroorganisme dapat dikelompokkan berdasarkan kesamaan dalam gen yang dimiliki yang mencerminkan hubungan evolusi mereka (Woese, 1987). Pendekatan identifikasi untuk eksplorasi keanekaragaman mikroba dari sampel lingkungan yang kompleks didasarkan pada kloning dan sekuensing gen penyandi 16 ribosomal RNA (Hugenholtz, *et al.*, 1998). Perkembangan teknik PCR (*Polymerase Chain Reaction*) memungkinkan untuk mengidentifikasi mikroorganisme yang, memperkuat gen 16S rRNA diisolasi dari koloni primer universal yang diarahkan pada daerah di kedua ujung gen, dan kemudian mengurutkan produk PCR (O'Sullivan, *et al.*, 2000).

Bakteri asam laktat (BAL) adalah salah satu jenis mikroba yang dapat diisolasi dari pangan fermentasi Sumatera Barat. *Generally Recognized as Safe* (GRAS) telah merekomendasikan BAL sebagai jenis mikroba yang aman dan *non-pathogen*. BAL diketahui digunakan dalam berbagai sektor seperti kedokteran, kimia, serta industri pangan dan pakan. Isolasi BAL dari pangan fermentasi Sumatera Barat telah banyak dilakukan, seperti jenis *Lactobacillus sp.* (Marlida, *et al.*, 2016) dan *Streptococcus sp.* pada dadih (Surono, 2015), *Lactobacillus*

*plantarum* dan *Pediococcus acidilactici* pada asam durian (Yuliana, 2011), *Lactobacillus acidophilus* pada tapai singkong (Surono, 2003), *Bacillus sphaericus*, *Bacillus polymyxa* dan *Micrococcus lactic* pada ikan budu (Yusra, *et al.*, 2014). BAL hasil isolasi ini hanya digunakan sebagai kultur starter, probiotik, agen antimikrobal, penghasil bakteriosin, dan menghasilkan enzim. Padahal BAL memiliki potensi lain sebagai penghasil asam amino yang dapat dijadikan *feed additif* anti stres yaitu  $\gamma$ -amino butyric acid (GABA).

GABA merupakan asam amino nonprotein yang dikenal dengan peranannya sebagai inhibitor neurotransmitter yang penting dalam otak. Secara alami, terdapat pada hewan dan tanaman (Dhakal, *et al.*, 2012) namun dengan jumlah yang sedikit. Konsentrasi tertinggi terdapat pada bagian otak yang terlibat dalam kontrol perilaku (Morteza, *et al.*, 2008). Sifat GABA sebagai inhibitor ini dikarenakan GABA yang dilepaskan oleh neuron mengaktifkan saluran ion GABA-A dan reseptor GABA-B dalam membrane plasma. Aktifasi saluran dan reseptor ini umumnya menghasilkan penurunan rangsangan neuron (Jin, *et al.*, 2011). Sehingga GABA sebagai inhibitor akan menghambat reaksi-reaksi dan tanggapan neurologis yang tidak menguntungkan. Rendahnya level GABA atau terjadinya penurunan fungsi GABA di otak dikaitkan dengan beberapa gangguan kejiwaan dan kekacauan pada sistem saraf, termasuk depresi, insomnia dan epilepsi (Thome Research, Inc. 2007) pada manusia. Pada ternak GABA dapat mencegah terjadi stress akibat panas (Dai, *et al.*, 2011; Dai, *et al.*, 2012), meningkatkan pertambahan bobot badan, dan efisiensi pencernaan nutrisi (Wen, *et al.*, 2009).

Penelitian terhadap GABA yang dihasilkan oleh BAL telah dilakukan beberapa peneliti di dunia. BAL penghasil GABA yang telah ditemukan umumnya diisolasi dari produk fermentasi seperti kimchi di Korea (Lee, *et al.*, 2010), keju dari Italia (Siragusa, *et al.*, 2007), fermentasi ikan di Jepang (Komatsuzaki, *et al.*, 2005), *naw mai dong* (rebung bambu) dari Thailand. Namun belum ada ditemukan data untuk jenis BAL yang berasal dari *biodiversity* Indonesia, terutama Sumatera Barat yang digunakan dalam menghasilkan GABA. Oleh karena itu perlu dilakukan eksplorasi kemampuan jenis BAL yang bersumber dari Sumatera Barat dalam menghasilkan GABA.

Terdapat beberapa faktor yang mempengaruhi pertumbuhan dan produksi GABA oleh BAL, seperti faktor nutrisi berupa karbon dan nitrogen, faktor lingkungan, seperti suhu dan pH medium, lama

fermentasi, penggunaan inducer, serta jumlah penggunaan mikroba sendiri. Produksi GABA dapat dilakukan menggunakan fermentasi medium padat dan medium cair, namun produksi GABA menggunakan BAL lebih mudah dilakukan dibandingkan dengan fermentasi padat. Selain karena produksi tinggi dibandingkan fermentasi padat, proses dalam fermentasi cair lebih sederhana, periode relatif pendek sehingga biaya jadi lebih rendah.

Pemeliharaan ternak broiler tidak hanya menyangkut permasalahan genetik dan nutrisi, namun juga manajemen pemeliharaan dengan memperhatikan *animal welfare* atau kesejahteraan hewan. Dalam prinsip *animal welfare*, terdapat *five of freedom* atau lima kebebasan yang harus diperhatikan yang telah dicetuskan di Inggris pada tahun 1992, yaitu i) *freedom from hunger and thirsty* (bebas dari rasa lapar dan haus); ii) *freedom from thermal and physical discomfort* (bebas dari panas dan rasa tidak nyaman secara fisik); iii) *freedom from injury, disease and pain* (bebas dari luka, penyakit dan sakit); iv) *freedom to express most normal pattern of behavior* (bebas mengekspresikan perilaku normal dan alami) dan v) *freedom from fear and distress* (bebas dari rasa takut dan penderitaan). Peraturan perundang-undangan Indonesia telah menjelaskan *animal welfare* dalam UU No. 18/2009 tentang Peternakan dan Kesehatan Hewan, yang mendefinisikan kesejahteraan satwa sebagai segala urusan yang berhubungan dengan keadaan fisik dan mental hewan menurut ukuran perilaku alami hewan yang perlu diterapkan dan ditegakkan untuk melindungi hewan dari perlakuan setiap orang yang tidak layak terhadap hewan yang dimanfaatkan manusia.

Produsen ayam pedaging sering membesarkan ayam dalam kondisi kepadatan tinggi untuk mencapai keuntungan yang lebih tinggi (Ghosh, *et al.*, 2012). Di Indonesia sendiri, praktik *animal welfare* tampaknya juga kurang mendapat perhatian. Banyak fenomena peternak kurang memperhatikan kesejahteraan ternak selama proses pemeliharaan. Dengan harapan keuntungan yang berlimpah, peternak menempatkan ternak dalam suatu kandang dalam jumlah yang seharusnya melebihi kapasitas kandang, terutama untuk peternak broiler. Pemeliharaan broiler pada kandang yang padat tentu akan membuat ketidaknyaman bagi ternak. Kepadatan kandang yang tinggi akan menyebabkan temperatur lingkungan menjadi naik dan juga menyebabkan broiler sulit melepaskan panas tubuh karena berdesakan didalam kandang. Hal ini akan membuat broiler beradaptasi dengan lingkungan seperti mengurangi konsumsi ransum dan memperbanyak konsumsi air

minum. Perilaku adaptasi yang dilakukan oleh broiler ini dapat mengorbankan aspek-aspek tertentu yang nantinya akan menimbulkan gangguan kerja tubuh. Gangguan kerja tubuh yang dapat dialami broiler berupa eksresi hormon stress oleh hipotalamus yang dapat mempengaruhi kinerja organ-organ fisiologis (Arimbi, *et al.*, 2009; Sugito, *et al.*, 2007). Lebih lanjut Most and Palme (2002) menerangkan bahwa cekaman panas akan menstimulasi tubuh untuk mengeluarkan *corticotrophin relasing hormone* (CRH) dan CRH akan menstimulasi pembentukan *adrenocorticotropic hormone* (ACTH) pada hipofisa dan ACTH ini menginduksi pembentukan glukokortikoid (kortikosteron dan kortisol) pada kelenjar adrenal. Pelepasan glukokortikoid menimbulkan berbagai efek terhadap metabolisme normal tubuh, seperti gangguan sistem sekresi hormon, pertahanan (imunitas) tubuh, pertumbuhan, dan aktivitas reproduksi. Gangguan-gangguan ini akan berujung pada terganggunya pertumbuhan dan produksi broiler yang dapat mendatangkan kerugian.

Pemeliharaan broiler untuk daerah tropis, seperti Indonesia hanya berkisar 8-10 ekor/m<sup>2</sup> (Tamalluddin, 2012). Sementara untuk daerah subtropics, seperti di Eropa dan standar kepadatan kandang yang dikeluarkan pada 2017 oleh *European Commission* adalah 0.073 m<sup>2</sup>/ekor atau bisa diestimasi 13-14 ekor/m<sup>2</sup> (Abudobas, 2013). Di Indonesia, para peternak umumnya meningkatkan kapasitas kandang melebihi standar. Untuk kandang dengan kapasitas 5.000 ekor, digunakan untuk pemeliharaan 6.000 ekor. Hal ini menyebabkan broiler akan mengalami stres. Untuk mengatasi hal tersebut, peternak akan menambahkan antibiotik yang terkadang terdapat kandungan hormon pertumbuhan, seperti Neobro, New Maxbio, Masabro atau *feed additive*, seperti Astrevit, Vitachick, Vitakur, dan Supervit. Produk-produk tersebut dapat menimbulkan residu pada produk yang dihasilkan sehingga menimbulkan permasalahan bagi konsumen nantinya. Oleh karena itu perlu dilakukan pemberian GABA sebagai pengganti *feed additif* anti stres yang aman bagi konsumen (*food safety*) dan ramah lingkungan (*eco-friendly*).

Keberhasilan menemukan BAL asal pangan fermentasi Sumatera Barat yang dapat menghasilkan GABA dapat menjadi alternatif pemberian *feed additif* yang aman dan ramah lingkungan. Dalam buku ini dikupas bagaimana mengisolasi, karakterisasi, dan Bakteri Asam Laktat (BAL) Asal Pangan Fermentasi Sumatera Barat Penghasil Gamma Aminobutyric Acid (GABA) dan Aplikasinya dalam menurunkan stres pada ayam broiler, ayam petelur, sapi perah dan manusia.

## **BAB II**

### **SUMBER ISOLASI MIKROBA PENGHASIL GABA**

#### **2.1. Produk Pangan Fermentasi**

Fermentasi diketahui sebagai salah satu bentuk tertua dari pengawetan makanan di dunia. Louis Pasteur, seorang *zymologist* (ahli dalam fermentasi minuman) pertama mendefinisikan fermentasi sebagai respirasi atau pernafasan tanpa udara. Fermentasi pangan sangat beragam tergantung pada bahan mentah yang digunakan. Fermentasi dapat meningkatkan daya simpan daging, ikan, buah-buahan, dan sayur-sayuran yang sangat mudah rusak karena memiliki kandungan kadar air dan nilai gizi yang tinggi, khususnya pada negara-negara dengan iklim tropis (Nuraida, 2015). Melalui proses fermentasi, terciptalah berbagai keanekaragaman makanan atau *food biodiversity*.

Proses fermentasi dapat terjadi secara alami yang disebabkan mikroba yang telah ada pada bahan dan dibiarkan berkembang atau dengan menambahkan kultur murni sehingga menghasilkan produk yang lebih beragam. Melalui proses fermentasi akan terjadi peningkatan kualitas, seperti aroma, rasa, dan tekstur. Proses yang dilakukan untuk menghasilkan produk dalam jumlah besar maka pengembangan kemampuan starter untuk mempercepat fermentasi dan juga penjagaan kebersihan sangat diperlukan. Keju dan yoghurt merupakan contoh produk fermentasi yang sudah sangat dikenal banyak orang di seluruh dunia, dan masih banyak lagi produk-produk fermentasi yang menjadi panganan lokal di setiap negara, seperti *kimchi*, *tempe*, *stinky tofu*, *sour milk*, *koumiss*, dan *paocai*.

Produk makanan hasil fermentasi di Asia dapat dikategorikan menjadi lima kelompok, yaitu 1) produk-produk fermentasi kedelai, 2) produk fermentasi ikan, 3) produk fermentasi sayuran, 4) fermentasi roti atau makanan dari bahan sereal, dan 5) minuman-minuman beralkohol (Rhee, *et al.*, 2011). Keberadaan mikroorganisme pada produk fermentasi telah banyak dipelajari fungsi serta karakteristiknya. Mikroorganisme ini diperoleh dengan teknik isolasi. Isolasi merupakan salah satu upaya pemisahan mikroorganisme dari habitat asalnya dengan tujuan untuk mendapatkan biakan murni atau biakan yang tidak bercampur dengan mikroba lainnya. Biakan murni yang diperoleh nantinya akan dimanfaatkan sesuai dengan kebutuhan

dan kemampuan mikroba.

Indonesia khususnya Sumatera barat memiliki makanan khas yang dihasilkan melalui proses fermentasi yang dapat dijadikan sumber bakteri asam laktat (BAL). Adapun pangan hasil fermentasi lokal Sumatera Barat yang dapat dimanfaatkan antara lain dadih, ikan budu dan asam durian.

### **2.1.1 Dadih (susu kerbau fermentasi)**

Dadih merupakan produk fermentasi susu kerbau dari daerah Sumatera Barat. Produk ini sudah lama dikenal dan disukai oleh masyarakat setempat karena memiliki manfaat baik terhadap kesehatan. Dadih sebagai produk fermentasi merupakan makanan berwarna putih dan hampir menyerupai tahu, bisa dipotong, memiliki bentuk dan karakteristik yang menyerupai yogurt dan kefir, serta mempunyai aroma yang khas. Proses fermentasi melibatkan mikroorganisme salah satunya adalah bakteri asam laktat (BAL). BAL merupakan bakteri penghasil asam laktat dalam metabolisme karbohidrat.



Gambar 1. Dadih (*sumber: google image*)

Secara mikrobiologis, dadih tradisional dari bahan baku susu kerbau mengandung 73,74% bakteri gram positif dan 26,26% bakteri gram negatif. Bakteri gram positif yang paling dominan adalah *Lactobacillus plantarum*. Selain itu, terdapat bakteri lainnya, yaitu *Lactobacillus brevis*, *Streptococcus agalactiae*, dan *Bacillus cereus*. Kelompok gram negatif yang terdapat pada dadih adalah *Escherichia coli* (paling dominan) dan *Klebsiella* (Rijal, 2014). Purwati (2011) telah mengidentifikasi BAL dari dadih berdasarkan pemeriksaan 16rRNA yaitu *Pediococcus pentosaceus*, *Enterococcus faecalis*, dan *Weissella paramesen- teroides*. Adanya perbedaan jenis BAL yang terkandung dalam sampel dadih disebabkan oleh daerah pengambilan sampel yang berbeda.

### 2.1.2 Budu (ikan fermentasi)

Sumatera Barat adalah daerah yang mempunyai sejumlah besar produk pangan fermentasi salah satu diantaranya adalah ikan fermentasi yang disebut *budu*. Ikan fermentasi dilakukan secara tradisional oleh masyarakat pesisir yaitu di daerah Sungai Limau Kab. Padang Pariaman dan Air bangis Kab. Pasaman, Kedua produk *budu* ini mempunyai rasa dan aroma yang khas yang dihasilkan selama fermentasi yang belum diketahui mikroba apa saja yang berperan dalam menghasilkan aroma dan rasa tersebut, dan zat gizi apa saja yang di metabolisme oleh mikroba tersebut belum ada yang melaporkan. Maslami et al 2019, menemukan bakteri asam laktat yang diisolasi dari pangan fermentasi di Sumatera Barat kecuali dari *budu* dan dapat menghasilkan asam glutamat yang dapat memperbaiki kualitas karkas broiler dengan peningkatan warna dan aroma daging broiler. Anggraini et al., 2019 menambahkan bahwa bakteri asam laktat dapat menghasilkan asam gamma amino butirrat (Gaba) yang dapat menurunkan efek stres pada broiler dengan kepadatan kandang yang tinggi. Harnentis et al., 2020<sup>3</sup> melanjutkan penelitian bakteri asam laktat asal pangan fermentasi Sumatera Barat (dadih dan tempoyak) sebagai probiotik yang memberikan hasil bahwa, isolat bakteri asam laktat yang diuji memenuhi syarat sebagai probiotik dengan indikator tahan terhadap pH rendah, cairan empedu dan mampu membunuh bakteri patogen serta mempunyai daya lengket yang tinggi pada usus. Belum banyak penelitian yang melaporkan campuran probiotik (koktail) yang diisolasi dari *budu*.

Produk lain yang dapat diolah menjadi pangan fermentasi adalah produk perikanan. Secara umum, produk olahan fermentasi perikanan dapat berupa ikan utuh (peda), pasta atau saus (terasi), dan cairan (kecap). Pengolahan produk ikan ini dapat meningkatkan daya simpan karena kandungan air pada tubuh ikan mencapai 80% dengan pH netral sehingga akan menjadi media yang baik bagi pertumbuhan bakteri pembusuk. Daging ikan juga mengandung sedikit sekali tenunan pengikat (*tendon*) sehingga mudah dicerna oleh enzim autolisis yang menyebabkan daging menjadi sangat lunak. Kandungan asam lemak tak jenuh yang tinggi menyebabkan proses oksidasi mudah terjadi yang akan membuat bau ikan menjadi tengik (Afrianto and Liviawaty, 1989). Selain itu, pengolahan ikan juga meningkatkan cita rasa produk dan meningkatkan nilai ekonomis dari ikan.

Budu merupakan produk fermentasi ikan yang diproduksi di daerah pesisir Kabupaten Padangpariaman, Kabupaten Agam dan Kabupaten Pasaman. Produk fermentasi ini terbuat dari ikan laut yang berukuran besar dan memiliki daging putih, seperti ikan tenggiri (*Scomberomorus sp*) dan talang-talang (*Chorinemus sp*) (Huda and Rosma, 2006). Ikan budu memiliki aroma fermentasi yang intensif, tidak busuk, tidak anyir, dan bertekstur empuk (Nurmiati and Periadnadi, 2014). Pada produk fermentasi ikan ini, ditemukan bakteri genus *Bacillus* dan *Micrococcus* (*Bacillus sphaericus*, *Bacillus polymyxa*, *Bacillus cereus*, *Bacillus pantothenicus* dan *Micrococcus lactis*) (Yusra, et al., 2014). Beberapa produk olahan ikan seperti saus ikan dan pasta udang di Thailand ditemukan jenis BAL, seperti *Staphylococcus aureus*, *bacillus subtilis*, *Micrococcus varians*, *Listeria spp.*, *Vibrio sp.*, *Aeromonas sp.*, *P. pentosaceus* dan *L. pentosus* (Tanasupawat, 2009).



Gambar 2. Budu (sumber: dokumentasi pribadi)

### 2.1.3 Tempoyak (durian fermentasi)

Tidak hanya produk hewani, Sumatera barat juga memiliki pangan fermentasi yang diolah dari produk nabati, seperti asam durian/ tempoyak. Asam durian adalah jenis bahan pangan terbuat dari daging buah durian matang yang difermentasi dengan aroma yang khas. Fermentasi biasanya berlangsung selama 4-7 hari dan tekstur berubah dari padat menjadi lebih lembek dengan aroma asam. Tingkat keasaman pada asam durian berkisar antara 2,8-3,6% (Amin, *et al.*, 2004; Leisner, *et al.*, 2001). Yuliana, *et al.*, (2011) melaporkan dalam penelitiannya bahwa BAL jenis *Pediococcus acidilactici*, *Lactobacillus sp*, *Weissella paramesenteroide,s* dan *Lactobacillus plantarum* ditemukan dalam tempoyak yang dibuat di Pilipina. Kehadiran BAL pada asam durian dikarenakan buah durian mengandung 15-20% gula (Ketsa and Daengkanit, 1998).



Gambar 3. Asam durian (*sumber: dokumentasi pribadi*)

Tabel 1. Beberapa BAL yang diisolasi dari produk pangan fermentasi

Pangan Fermentasi	Jenis BAL	Penemu
Keju	<i>Lactobacillus plantarum</i> C48, <i>Lactobacillus paracasei</i> PF6, <i>Lactobacillus brevis</i> PM17, <i>Lactococcus lactis</i> sub sp. facto PU, <i>Lactobacillus delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i> PR1, <i>Lactobacillus plantarum</i> DSM194631, <i>Lactococcus lactis</i> PU1	Siragusa, et al., 2007; Coda, et al., 2010; Rizzello, et al., 2008;
Kimchi	<i>Lactobacillus plantarum</i> , <i>Lactobacillus brevis</i> , <i>Lactobacillus brevis</i> BJ20, <i>Lactobacillus buchneri</i> MS, <i>Lactobacillus</i> sp. OPK 2-59, <i>Lactococcus mesenteroides</i>	Lee, et al., 2010; Seok, et al., 2008
Budu	<i>Lactobacillus paracasei</i> NFRI7415 <i>Lactobacillus plantarum</i>	Komatsuzaki, et al., 2005 Vebera et al 2019
Dadiah	<i>Lb. plantarum</i> , <i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i> , <i>Lb. brevis</i> , <i>Leu. Mesenteroides</i> , <i>Lb. rhamnosu</i> <i>Lactobacilus acidilacti</i>	Surono, et al., 2003s; Collodo, et al., 2007; Darmawan, et al., 2006 : Anggraini et al 2019
Tempoyak	<i>Lactobacillus plantarum</i> , <i>Lactobacillus casei</i> Weissella paramesentervides, <i>Pediococcus acidilactici</i> , <i>Enterococcus gallinarum</i> , <i>E. faecalis</i>	Yuliana and Dizon, 2011 Wirawati, 2002 Pato and Ingrid, 2013.

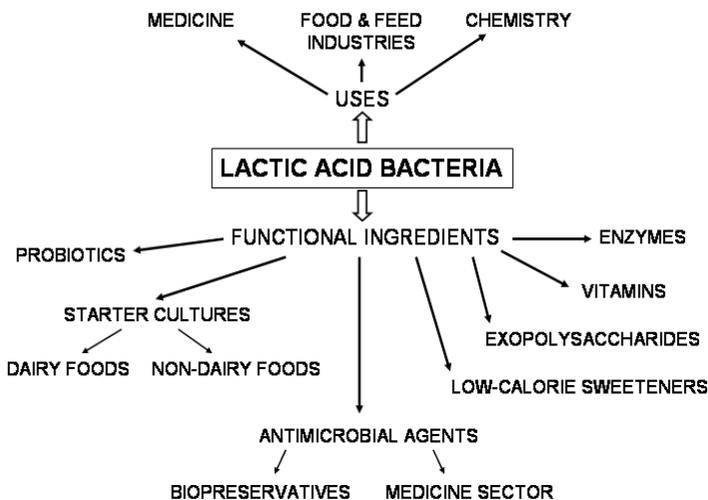
## 2.2 Potensi Bakteri Asam Laktat (BAL) Penghasil GABA

Bakteri asam laktat adalah kelompok bakteri gram positif yang tidak membentuk spora, berbentuk kokus atau basil, dan dapat memfermentasikan karbohidrat untuk menghasilkan asam laktat. Khalid (2011) memaparkan bahwa sebelumnya BAL terdiri atas empat jenis, yaitu *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus*, dan *Streptococcus*, dan taksonomi baru-baru ini telah mengusulkan beberapa kelompok yang terdiri atas *Aerococcus*, *Alloiococcus*, *Carnobacterium*, *Dolosigranulum*, *Enterococcus*, *Globicatella*, *Lactococcus*, *Oenococcus*, *Tetragenococcus*, *Vagococcus*, dan *Weissella* (Khalid, 2011). Masa awal BAL dapat diterima pada awal abad ke-20. Klasifikasi BAL menjadi kelas-kelas yang berbeda pada dasarnya berdasarkan morfologi, bentuk fermentasi glukosa, pertumbuhan pada temperatur yang berbeda, konfigurasi asam laktat yang dihasilkan, kemampuan untuk hidup pada konsentrasi bahan yang tinggi, dan kemampuan untuk hidup pada suasana asam atau basa (Fachrial, 2014). Penelitian terbaru menambahkan karakteristik gen, seperti komposisi asam lemak dan motilitas dalam pengklasifikasian (Khalid, 2011).

Proses pertumbuhan mikroorganisme dapat berlangsung secara aerobik, anaerobik dan anaerobik fakultatif (Leoanggraini dan Bintang, 2011). Lebih lanjut dijelaskan bakteri yang bersifat aerobik atau anaerobik mempunyai suatu enzim yang tergolong flavoprotein. Enzim ini bereaksi dengan oksigen membentuk senyawa beracun yaitu H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> dan radikal bebas. Bakteri yang bersifat aerobik dan bersifat anaerobik tetapi tidak sensitive terhadap oksigen (aerotoleran) menghasilkan enzim superoksida dismutase. Enzim ini akan memecah radikal bebas tersebut, dan enzim katalase yang memecah H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> menjadi senyawa yang tidak beracun. Bakteri yang bersifat anaerobik fakultatif juga mempunyai enzim superoksida dismutase dan enzim peroksida yang mengkatalis reaksi antara H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> dengan senyawa organik menghasilkan senyawa yang tidak beracun. Bakteri yang bersifat anaerobik tidak mempunyai enzim superoksida dismutase maupun katalase, oleh karena itu oksigen merupakan racun bagi bakteri tersebut, karena senyawa yang terbentuk dari reaksi flavoprotein dengan oksigen, yaitu H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> dan O<sub>2</sub> tidak dapat dipecah oleh bakteri tersebut (Leoanggraini dan Bintang, 2011; Fu and Mathews, 1999).

Pertumbuhan optimum BAL terjadi pada pH 5,5-5,8 dan memiliki kebutuhan nutrisi yang kompleks untuk asam amino, peptide, basa

nukleotida, vitamin, mineral asam lemak karbohidrat (Khalid, 2011). Secara fisiologis dan berdasarkan aktivitas metabolismenya, bakteri asam laktat dikelompokkan ke dalam dua grup, yaitu homofermentatif dan heterofermentatif (Zuniga, c 1993). Jenis homofermentatif menghasilkan asam laktat dari fermentasi gula dengan jumlah yang lebih dominan, sedangkan jenis heterofermentatif selain menghasilkan asam laktat juga menghasilkan karbondioksida dan sedikit asam-asam volatile lain, alkohol dan ester (Resa, 2014). Jenis bakteri asam laktat yang tergolong homofermentatif adalah *Lactobacillus pentosus*, *L. plantarum*, *L. sakei*, *L. farciminis*, *L. acidipiscis*, *L. pantheris*, *L. thailandensis*, *Pediococcus pentosaceus*, *P. acidilactici*, *P. siamensis* dan lainnya. Untuk golongan heterofermentative, yaitu *L. vaccinostercus*, *L. fermentum*, *L. brevis*, *L. suebicus*, *Weissella confusa*, *W. thailandensis*, dan *Leuconostoc sp.*, (Tanasupawat, 2009). Adapun beberapa manfaat BAL dapat dilihat pada Gambar 4.



Gambar 4. Manfaat BAL (sumber: Paneri, et al., 2013)

Fungsi utama dari BAL dalam sistem fermentasi adalah untuk mengkonversikarbohidratmenjadibeberapametabolyangdiinginkan seperti alkohol, asam asetat, asam laktat, dan karbondioksida. BAL memiliki banyak manfaat dalam berbagai sektor kehidupan, seperti sebagai pengawet makanan, antimikroba, dan probiotik (Gambar 4).

Selain itu, BAL mampu memproduksi asam amino dan peptida sebagai akibat dari proteolisis; laktat, bakteriosin dan GABA sebagai metabolit sekunder (Stiles, 1994; Nomura, *et al.*, 1998). Tabel 1 menunjukkan beberapa jenis BAL yang diisolasi dari berbagai produk fermentasi.

Bakteri asam laktat merupakan target bagus untuk mempelajari produksi GABA yang telah dilaporkan efektif untuk mengurangi tekanan darah pada hewan percobaan dan manusia. BAL menjadi fokus penelitian dalam beberapa tahun terakhir karena dianggap memiliki aktifitas fisiologis khusus dan dianggap aman (Li, *et al.*, 2010). Selain itu, pemanfaatan mikroorganisme BAL sebagai penghasil GABA sangat potensial dilakukan karena mikroorganisme diketahui tumbuh sangat cepat pada kondisi optimum, kultur, dan kondisi fermentasi yang simpel hingga mudah dilakukan, kualitas dan kuantitasnya tinggi, serta genetik mikroorganisme yang dapat dimanupulasi. Hal ini sangat memungkinkan untuk dilakukan optimasi produksi dari BAL sebagai penghasil GABA. Di bawah ini beberapa penelitian mengenai BAL yang memiliki kemampuan memproduksi GABA (Tabel 2).

Perbedaan kemampuan BAL dalam memproduksi GABA disebabkan adanya perbedaan tiap jenis BAL yang memiliki karakteristik yang tidak sama. Nomura, *et al.*, (1998) mengatakan bahwa beberapa jenis BAL dapat memproduksi GABA, sedangkan sebagian lainnya tidak, sebagai contoh *L. lactis subsp. lactis* merupakan strain BAL yang dapat memproduksi GABA, sedangkan *L. lactis subsp. cemoris* merupakan strain BAL yang tidak dapat menghasilkan GABA. Nomura, *et al.*, (1999) mendapatkan bahwa gen *gadCB* juga ada pada *L. lactis subsp. cemoris* namun tidak mengalami pengaturan ulang melalui *insertion* ataupun *deletion* pada fragmen besar. Namun, penghapusan adenin dan sisipan satu timin terdeteksi di dalam wilayah pengkodean yang mengakibatkan terjadinya mutasi *frame shift*. Karena pergeseran bingkai yang dihasilkan dari penyisipan atau penghapusan satu basis di dalam wilayah pengkodean, protein yang diterjemahkan tidak berfungsi. Daerah di sekitar kedua mutasi ini kemudian diurutkan dalam strain *L. lactis subsp. cemoris* lainnya untuk memastikan bahwa mutasi umum terjadi.

Pada *Enterobacteria*, hanya *Escherichia coli* dan *Shigella spp.* memiliki gen untuk dekarboxilase glutamat. Spesies ini mengandung dua salinan glutamat decarboxylase, dikodekan oleh *gadB* dan *gadA*, yang memetakan ke posisi yang berbeda pada kromosom. Antiporter GABA yang dikodekan oleh *gadC* telah diidentifikasi dalam *E. coli*

dan *Shigella flexneri*. Gen ini terletak di hilir gadB. Ekspresi gen ini diperlukan untuk bertahan hidup pada pH di bawah 3,0. Ini menunjukkan mekanisme gadB dan gadC dapat mencegah bakteri terhadap paparan pH rendah (Small dan Waterman, 1998; Smith, *et al.*, 1992).

Tabel 2. Kemampuan BAL penghasil GABA

Spesies BAL	Produksi GABA	Penemu
<i>Lactobacillus paracasei</i> NFRI 7415	31145,3 mg/l	Komatsuzaki, <i>et al.</i> , 2005
<i>Lactococcus lactis subsp.</i> <i>lactis</i>	7200 mg/l	Lu, <i>et al.</i> , 2009
<i>Lactobacillus paracasei</i> PF6	99,9 mg/kg	Siragusa, <i>et al.</i> , 2007
<i>Lactobacillus brevis</i>	15370 mg/l	Li, <i>et al.</i> , 2008
<i>Lactobacillus brevis</i> NCL912	35662 mg/l	Li, <i>et al.</i> , 2010
<i>Lactobacillus brevis</i> NCL912	103719,1 ml/L	Li, <i>et al.</i> , 2010
<i>Lactobacillus brevis</i>	4599,2 mg/l	Huang, <i>et al.</i> , 2007
<i>Lactobacillus plantarum</i> DSM19463	497,49 ml/L	Cagno, <i>et al.</i> , 2010
<i>Lactobacillus buchneri</i>	66,5 mg/L	Barla, <i>et al.</i> , 2016
<i>Weissella cibaria</i>	76,9 mg/L	Barla, <i>et al.</i> , 2016
<i>Lactococcus lactis subsp.</i> <i>lactis</i> PUI	258,71 mg/kg	Rizzello, <i>et al.</i> , 2008
<i>Pediococcus acidilactici</i> DS15.	835,257 mg/L.	Anggraini 2020

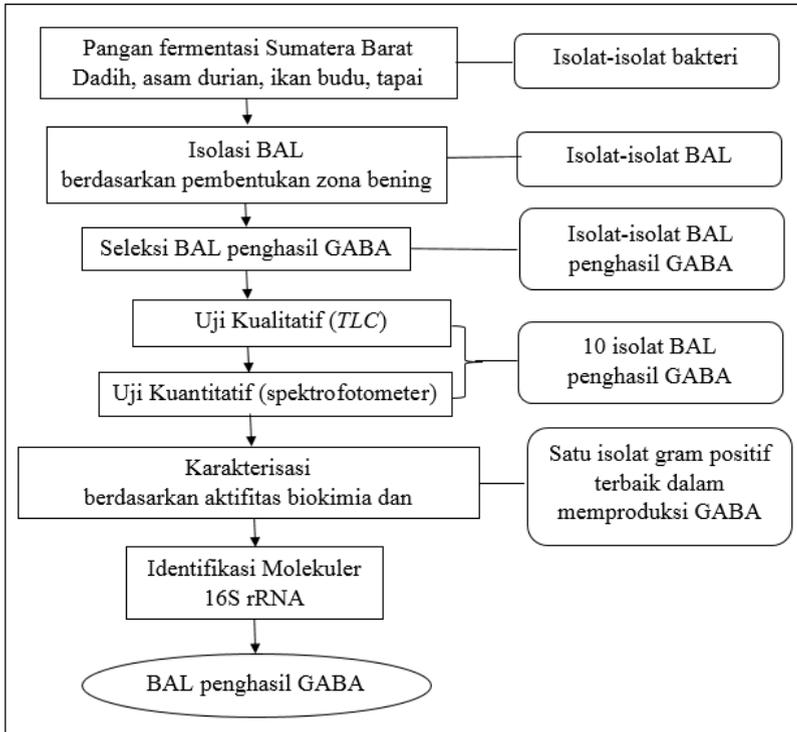
## **2.3 Isolasi, Karakterisasi, dan Identifikasi BAL**

### **2.3.1 Isolasi dan Karakterisasi Bakteri**

Pemanfaatan kemampuan mikroorganisme dalam menghasilkan produk-produk yang bermanfaat bagi manusia kian berkembang seiring dengan perkembangan teknologi. Ekplorasi yang terus dilakukan terhadap mikroorganisme dengan terus mencari keberadaan mikroorganisme dari habitat aslinya. Dalam habitat aslinya, mikroorganisme berada bersama-sama dengan mikroorganisme lainnya. Oleh karena itu, perlu dilakukan pemisahan di laboratorium untuk mendapatkan kultur murni. Teknik isolasi dilakukan untuk memisahkan mikroorganisme sehingga diperoleh koloni tunggal (Sunatmo, 2009b). Mikroorganisme hidup menempati habitat yang sangat beragam, seperti tanah, air atau kayu lapuk (Koppenhöfer, *et al.*, 2012), jaringan yang hidup dan jaringan yang mati atau pada produk fermentasi (Oberman and Libudzisz, 1998). Selain itu, ada juga mikroorganisme yang dapat hidup di habitat yang ekstrim, seperti hidup di kondisi suhu dan salinitas yang sangat tinggi. Habitat atau substrat merupakan lingkungan atau tempat tinggal suatu komunitas mikroorganisme dalam suatu ekosistem (Gambar 4).

Habitat asal mikroba berupa tanah, air, kayu lapuk, atau pangan fermentasi dilarutkan di bawah kondisi aseptik pada agar nutrien atau media serupa untuk menghasilkan koloni tunggal yang dapat diisolasi dan dimurnikan (Koppenhöfer, *et al.*, 2012). Diferensiasi awal bakteri dapat dilakukan berdasarkan morfologi sel, hasil pewarnaan gram dan menggunakan tes biokimia.

Karakterisasi dilakukan terhadap isolat terpilih dari hasil isolasi, yaitu morfologi koloni seperti bentuk koloni, ketinggian, margin, permukaan, pigmentasi, opacity, apakah tumbuh di dalam, di bawah atau, di permukaan media dan laju pertumbuhannya (Eklund and Lankford, 1967; *Society of American Bacteriologists*, 1957). Suspensi sel bakteri kultur segar digunakan untuk pemeriksaan mikroskopis isolat dengan pewarnaan sederhana dan pewarnaan diferensial (pewarnaan gram dan spora) (Claus, 1995).



Gambar 5. Bagan alir isolasi BAL penghasil GABA asal pangan fermentasi Sumatera Barat (Anggraini, 2020)

Metode wet-mount (Claus, 1995) digunakan untuk studi sel vegetatif, spora, sporangia, dan motilitas.

Setelah menentukan bentuk dan ukuran sel serta pewarnaan gram, bakteri dapat dikategorikan dan diidentifikasi sesuai dengan persyaratan pertumbuhannya pada media standar atau khusus yang tercantum dalam Bergey's Manual. Mengikuti manual metode mikrobiologis, berikut tes fisiologis dan biokimia penting dari bakteri yang terisolasi dilakukan, yaitu uji katalase, tes glukosa dalam, uji Voges-Proskauer (VP), tes metil merah, hidrolisis kasein, hidrolisis pati, pemanfaatan sitrat, dan propionat, uji reduksi nitrat, produksi indol, uji oksidase, uji Kligler's Iron Agar (KIA), uji motilitas dengan metode pemasangan basah, uji produksi urease, uji kelarutan kalium hidroksida, dan respon pertumbuhan isolat pada konsentrasi NaCl yang berbeda.

### 2.3.2 Identifikasi Bakteri

Identifikasi genom mikroorganisme penting dilakukan untuk mengetahui jenis bakteri yang tidak diketahui dari hasil isolasi. Metode identifikasi berbasis molekuler yang merupakan metode yang lebih cepat dengan tingkat sensitivitas dan spesifisitas yang tinggi, yaitu dengan analisis sekuensing gen 16S rRNA. Penggunaan sekuens 16S rRNA dipelopori oleh Carl Woese yang juga menemukan klasifikasi tiga domain terbesar makhluk hidup, yaitu bakteri, archaea, dan eukaria. Gen pengkode RNA ribosomal (rRNA) adalah gen yang paling lestari (*conserved*). Daerah yang lestari ini juga yang menyebabkan gen ini dapat digunakan sebagai primer universal yang digunakan dalam *Polymerase Chain Reaction* (PCR) serta dapat ditentukan urutan nukleotidanya melalui sekuensing (Cai, *et al.*, 2003).

### 2.3.3 Gen 16S-rRNA

Identifikasi molekuler memberikan alternatif lain untuk penentuan taksonomi. Analisis urutan gen 16S rRNA dapat memberikan urutan yang unik untuk spesies bakteri (Koppenhöfer, *et al.*, 2012). Analisis gen 16S-rRNA sesuai untuk identifikasi bakteri karena gen ini terdapat pada semua organisme. Gen penyandi 16SrRNA mempunyai daerah berbeda yang terdiri atas sekuens gen yang konservatif dan berguna menentukan taksonomi, filogeni (hubungan evolusi), serta memperkirakan jarak keragaman antar-spesies (*rates of species divergence*) bakteri. Hubungan evolusi antar-organisme dapat ditunjukkan melalui perbandingan sekuens rDNA. Jarak genetik merupakan ukuran perbedaaan genetik serta untuk mengidentifikasi bakteri dari berbagai lingkungan (Lokapirnasari, *et al.*, 2017). Data sekuens untuk spesies *outgroup* diperoleh dari Genbank NCBI Gen ribosom dilindungi karena sangat penting untuk fungsi seluler, tetapi mutasi kecil pada gen akan terakumulasi melalui evolusi bakteri dengan variasi dalam urutan gen yang memberikan dasar untuk menentukan filogeni (Clarridge, 2004).

Urutan gen dari organisme yang telah diisolasi dapat dibandingkan dengan standar dalam Genebank atau database lain sehingga nama taksonomi dapat diketahui. Namun, untuk melacak strain dengan tujuan epidemiologis atau deteksi strain dengan faktor virulensi tertentu, analisis gen 16S rRNA tidak cukup dan teknik lainnya, seperti Pulsed-Field Gel Electrophoresis (PFGE) (Correa dan Yousten, 2001) atau Q-PCR (Monk, *et al.*, 2010) harus digunakan.

Gen pengkode rRNA adalah gen yang mampu mempertahankan kelestariannya selama jutaan tahun keanekaragaman evolusi. Sebagian besar prokariot memiliki tiga jenis rRNA, yaitu 5S, 16S, dan 23S. Penggunaan 5S rRNA juga sudah dipelajari, namun gen ini terlalu kecil untuk digunakan dalam penentuan filogenetik. Gen 16S dan 3S rRNA memiliki ukuran yang cukup untuk dianalisis. Gen 16S rRNA berukuran sekitar 1550 pasang basa dan sekitar 500 basa di bagian ujung sekuens merupakan daerah yang disebut dengan *hypervariable region*. *Hypervariable region* merupakan bagian yang membedakan antar-organisme. Gen 16S rRNA adalah salah satu gen yang telah dikarakterisasi dengan baik sehingga digunakan dalam identifikasi mikroorganisme. Primer yang digunakan dalam amplifikasi sekuens akan mengenali daerah yang lestari dan mengamplifikasi *hypervariable region*. Dengan demikian, akan diperoleh sekuens yang khas pada organisme tersebut. Ribuan sekuens dari berbagai isolat klinis dan dari lingkungan telah terkumpul di satu database, yaitu National Center for Biotechnology Information (NCBI) yang dapat diakses pada [www.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov).

### 2.3.4 Sekuensing

Sekuensing DNA merupakan proses atau teknik pengurutan basa nukleotida pada suatu segmen molekul DNA yang dikenal sebagai sekuens DNA. Sekuen DNA merupakan informasi paling mendasar suatu gen atau genom karena mengandung instruksi yang dibutuhkan untuk pembentukan tubuh makhluk hidup. Pengurutan (sequencing) asam nukleat memungkinkan untuk mengetahui kode genetik dari molekul DNA. Sekuen DNA digunakan untuk menentukan identitas maupun fungsi gen atau fragmen DNA dengan cara membandingkan sekuens-nya dengan sekuens DNA lain yang sudah diketahui (Glick, *et al.*, 2010; Rogers, 2011).

Metode sekuensing yang digunakan saat ini merupakan pengembangan metode Frederick Sanger, *et al.*, Saat ini metode sekuensing telah dikembangkan dengan proses yang lebih singkat serta aman menggunakan pelabelan senyawa berpendar fluoressens (Jamsari, 2007).

Sanger mengembangkan metode baru yang menjadi dasar dari sekuensing DNA saat ini. Teknik ini menggunakan *dideoxy nucleotides* dalam reaksi sintesis DNA. Dengan tidak adanya gugus 3'-hidroksil, *dideoxy nucleotides triphosphate* menghentikan sintesis setelah

dimasukkan ke dalam rantai yang sedang tumbuh. Fragmen berlabel divisualisasikan setelah elektroforesis pada gel akrilamida dengan autoradiografi. Empat reaksi paralel dijalankan dalam empat tabung yang berbeda. Masing-masing tabung berisi sejumlah kecil salah satu dideoxy nucleotides triphosphate dan keempat mengandung deoxy nucleotides triphosphate. DNA beruntai tunggal berlabel di satu ujung digunakan sebagai templat. Dalam setiap tabung, semua ukuran fragmen yang mungkin dihasilkan yang merupakan hasil dari penggabungan acak masing-masing dideoxy nucleotides triphosphate satu per molekul. Autoradiogram dari empat reaksi dapat dibaca untuk menghasilkan urutan DNA linier dari keempat basa. Mesin pengurutan DNA otomatis menggunakan pewarna fluoresens untuk memberi label fragmen DNA dengan warna berbeda yang digunakan untuk setiap reaksi yang dapat dibaca dari campuran keempat reaksi. Urutannya kemudian dicetak. Mesin sekuensing DNA terbaru sangat cepat sehingga genom mikroorganisme tertentu dapat diurutkan secara virtual dalam satu hari dan sebagian besar genom manusia dalam perkiraan dua tahun (Miller, 2001).

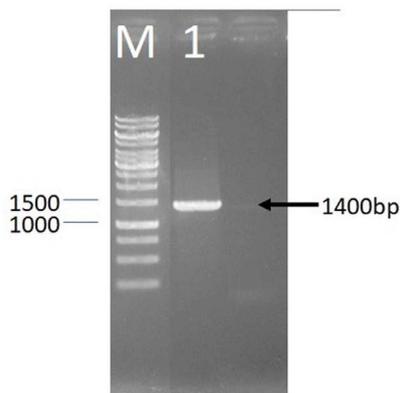
### **2.3.5 Polymerase Chain Reaction (PCR)**

*Polymerase Chain Reacton* (PCR) adalah suatu teknik sintesis dan amplifikasi DNA secara in vitro untuk mengamplifikasi segmen DNA dalam jumlah jutaan kali hanya dalam beberapa jam. Metode ini dikembangkan oleh Kary Mullis pada 1980-an yang didasarkan pada penggunaan kemampuan DNA polimerase untuk mensintesis untai DNA komplementer baru ke untai templat yang ditawarkan. Tahapan dalam proses PCR merupakan tahap yang berulang (siklus) pada setiap siklus terjadi duplikasi jumlah target DNA untai ganda. Tahapan tersebut terdiri atas pra-denaturasi DNA templat, denaturasi DNA templat, penempelan primer pada templat (*annealing*), pemanjangan primer (*extension*), dan pemantapan (*postextension*).

Pemisahan untai ganda DNA templat (*unamplified* DNA) dilakukan dengan denaturasi termal. Suhu tinggi diterapkan pada molekul DNA untai ganda untuk memisahkan untaian satu sama lain. Jenis enzim DNA polimerase mensintesis untaian baru DNA komplementer ke urutan target. Selanjutnya, dilakukan pendinginan hingga mencapai suhu tertentu untuk memberi waktu pada primer menempel (*anneal primers*) pada daerah dari target DNA. Primer berupa potongan pendek DNA untai tunggal yang melengkapi urutan target. Polimerase

mulai mensintesis DNA baru dari ujung primer. Polimerase DNA digunakan untuk memperpanjang primer (*extend primers*) dengan adanya dNTPs (dATP, dCTP, dGTP, dan dTTP) dan buffer yang sesuai. Nukleotida (dNTPs atau deoxynucleotide triphosphate) - unit tunggal dari pangkalan A, T, G, dan C yang pada dasarnya merupakan “blok bangunan” untuk untai DNA baru. Umumnya proses ini dilakukan sebanyak 20–40 siklus. Target DNA yang diinginkan (*short target product*) akan meningkat secara eksponensial setelah siklus keempat dan DNA non-target (*long product*) akan meningkat secara linier, (Newton and Graham, 1994 dan <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/probe/docs/techpcr/>).

Ekstraksi DNA adalah prinsip dasar dalam analisis molekuler dan merupakan salah satu faktor keberhasilan dalam amplifikasi DNA yang digunakan dalam analisis karakter genetik (Mustafa, *et al.*, 2016). PCR dan analisis filogenetik berdasarkan urutan gen 16S rRNA telah digunakan untuk keberhasilan identifikasi isolat dari berbagai produk makanan fermentasi (Malik, *et al.*, 2015). Pendekatan molekuler ini telah memungkinkan spesies *Lactobacillus* diidentifikasi secara baik (Henry, *et al.*). Porsi sekuens rDNA dari tiap organisme yang secara genetik berkorelasi umumnya adalah sama. Dengan demikian, setiap organisme yang memiliki jarak kekerabatan tertentu dapat disejajarkan sehingga lebih mudah untuk menentukan perbedaan dalam sekuens yang menjadi ciri khas organisme tersebut. Adapun salah satu contoh identifikasi BAL menggunakan 16 S RNA yang telah dilakukan Anggraini 2020 dapat dilihat pada Gambar 5 dibawah ini.



Gambar 6. *Agarose gel* (1%) menunjukkan elektroforesis gen 16S rRNA dari isolat DS15 asal dadih. M: *DNA marker* ; 1: produk PCR dari DS15 (Anggraini 2020)

Pengkodean dengan 16S rRNA dapat digunakan sebagai penanda molekular untuk definisi spesies karena molekul ini ada pada setiap organisme dengan fungsi yang identik pada seluruh organisme. Dari hasil sekuensing amplifikasi gen 16S rRNA, didapatkan data nukleotida yang selanjutnya dilakukan *contig*. *Contig* terbentuk dari hasil pensejajaran pembacaan primer reverse dan forward atau sekuens konsensus (*consensus sequence*). Dari hasil *contig*, didapatkan nukleotida yang layak untuk dianalisis sepanjang 1224 nukleotida (Gambar 21). Data urutan basa pengkode digunakan untuk mengkonstruksi pohon filogenetik dan hubungan kekerabatan suatu organisme. Gambar 6. menunjukkan reaksi rantai polimerase dengan dua primer dari isolat DS15.

```

CCTGCCAGAAGCAGGGGATAACACCTGGAACAGATGCTAATACCGTATAACAGAGAAAA
CCGCTGGTTTTCTTTTAAAGATGGCTCTGCTATCACTTCTGGATGGACCCGCGGCATTA
GCTAGTTGGTGAGGTAACGGCTACCAAGGCGATGATGCGTAGCCGACCTGAGAGGGTAAT
CGGCCACATTGGGACTGAGACACGGCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTT
CCACAATGGACGCAAGTCTGATGGAGCAACGCCGCTGAGTGAAGAAGGGTTTCGGCTCGT
AAAGCTCTGTTGTTAAAGAAGAACGTGGGTGAGTAAGTAAGTTCACCCAGTGACGGTATTTA
ACCAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTT
ATCCGGATTATTGGGCGTAAAGCGAGCGCAGGCGGTCTTTAAGTCTAATGTGAAAGCCTT
CGGCTCAACCGAAGAAGTGCATTGGAAACTGGGAGACTTGAGTGCAGAAGAGGACAGTGG
AACTCCATGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGATATATGGAAGAACCAGTGGCGAAGGCGGC
TGTCTGGTCTGTAAGTACGCTGAGGCTCGAAAGCATGGGTAGCGAACAGGATTAGATACCC
TGGTAGTCCATGCCGTAACGATGATTACTAAGTGTGGAGGGTTCCGCCCTTCAAGTGTGCTG
AGCTAACGCATTAAGTAATCCGCCTGGGGAGTACGACCCGCAAGGTTGAAACTCAAAGAATT
GACGGGGGCCCGCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTGGAAGCTACGCGAAGAACCTT
ACCAGTCTTGACATCTTCTGCCAACCTAAGAGATTAGGCGTTCCTTCGGGGACAGAATGA
CAGGTGGTGCATGGTTGTCGTCAGCTCGTGTCTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGC
GCAACCCTTATTACTAGTTGCCAGCATTAGTTGGGCACTCTAGTGAGACTGCCGGTGACAA
ACCGGAGGAAGGTGGGGACGACGTCAAATCATCATGCCCTTATGACCTGGGCTACACAG
TGCTACAATGGATGGTACAACGAGTTGCGAAACCGCGAGGTTTAGCTAATCTCTTAAACCA
TTCTCAGTTCGGACTGTAGGCTGCAACTCGCCTACACGAAGTCGGAATCGCTAG

```

Gambar 7. Susunan nukleotida isolat DS15 hasil sekuensing gen 16s rRNA

Hasil sekuensing DNA atau sekuens konsensus dianalisis menggunakan NCBI BLAST. Menurut Willey, *et al.*, (2009), sekuensing 16S rRNA digunakan untuk melihat kesamaan dari isolat dengan data yang sudah tersedia di *GenBank*. Hal ini adalah salah satu metode

deteksi molekuler yang cukup ideal untuk mengetahui hubungan kekerabatan antara bakteri karena urutan 16S rRNA adalah gen yang ditemukan di semua mikroba dan sangat penting dalam mempertahankan kehidupan. Tingkat kemiripan homolog isolat DS15 (data tidak diperlihatkan). Urutan gen 16S rRNA mengidentifikasi DS15 menjadi bagian dari genus *Pediococcus*, membentuk kluster yang terdefinisi dengan baik dengan *Pediococcus acidilactici*. Keduanya tercover 100% melalui analisis bootstrap.

Hasil BLAST pada situs NCBI memperlihatkan bahwa isolat DS15 memiliki homologi atau kemiripan dengan *Pediococcus acidilactici* DSM 20284 sebesar 99% pada 100% *query coverage*, yang terdapat satu pasang basa yang berbeda, yaitu pada basa ke-340. Pada *Pediococcus acidilactici* DS15 menunjukkan guanin (G) sedangkan pada *Pediococcus acidilactici* DSM 20284 berupa adenin (A) (Gambar 5). Nilai 99% menunjukkan bahwa isolat dapat dianggap sebagai spesies yang sama dengan strain *Pediococcus acidilactici* DSM 20284. Urutan tingkat homologinya tinggi, seperti yang ditunjukkan oleh warna merah dengan skor  $\geq 200$ . Dari hasil homologi ini, dapat disimpulkan bahwa dua sekuen adalah sama dan memiliki hubungan evolusi.

Spesies terdekat berikutnya dengan kesamaan sekuen setidaknya 100% *query coverage* adalah *Pediococcus pentosaceus* strain DSM 20336, *Pediococcus acidilactici* strain NGRI 0510Q, dan *Pediococcus argentini* strain CRL 776 pada kemiripan 98% dengan DS15. *Pediococcus stilesi* FAIR-E 180 menunjukkan 98% kemiripan dengan 99% *query coverage*. Hasil 100% *query coverage* menunjukkan keselarasan yang signifikan yang berarti urutan pencarian dalam penelitian ini identik dengan genus yang diidentifikasi, bahkan pada tingkat spesies

## **BAB III**

### **PRODUKSI GABA**

#### **3.1. Faktor-faktor yang Mempengaruhi Produksi GABA**

Produksi GABA melibatkan proses fermentasi yang memanfaatkan mikroba. Effendi (2012) menjelaskan bahwa fermentasi dapat berhasil jika dilakukan pengaturan terhadap pertumbuhan mikroba, seperti suhu, pH, serta jenis dan komposisi bahan baku yang sesuai untuk pertumbuhan mikroba yang diinginkan. Setiap mikroba memiliki karakteristik yang berbeda sehingga dibutuhkan pengetahuan terhadap faktor-faktor yang mempengaruhi pertumbuhan mikroba untuk dapat menghasilkan produk fermentasi yang diinginkan.

Berbagai macam makanan tradisional hasil fermentasi menggunakan mikroba yang dapat menghasilkan GABA. GABA sangat aman dan ramah lingkungan sehingga memiliki kemungkinan pemberian GABA pada produk kesehatan. Faktor utama dalam optimalisasi produksi GABA yang berasal dari fermentasi mikroba adalah temperature, lama fermentasi, dan pH media (Dhakal, 2012). Kondisi fermentasi yang optimal berdasarkan pada karakteristik biokimia GAD dari mikroba fermentasi. Faktor fermentasi yang berbeda mempengaruhi tingkat produksi GABA oleh mikroorganisme (Tajabadi, *et al.*, 2015). Di antara faktor-faktor inilah yang paling umum dan esensial antara lain waktu inkubasi, pH awal, suhu inkubasi, dan konsentrasi awal inducer asam glutamat.

Bakteri menggunakan beberapa strategi untuk mempertahankan pH sitoplasma netral (pHi) walaupun memiliki lingkungan eksternal yang asam. Salah satu strategi terpenting untuk mempertahankan pHi netral di bawah tekanan asam tergantung pada reaksi antiportil asam amino dekarboksilasi. Dalam reaksi ini, asam amino diangkut ke dalam sel tempat terjadi dekarboksilasi. Sebuah proton dikonsumsi dalam reaksi dan produk tersebut diekspor dari sel melalui antiporter. Efek bersih dari reaksi ini adalah untuk mengecilkan alkalinitas kompartemen sito-plasmik. Kebanyakan *Enterobacteria* mengandung beberapa dekarboksil degradatif dan dalam kondisi optimal enzim bisa mencapai hingga 12% dari total protein seluler dari sel bakteri. Sementara itu, lisin, arginin dan orni-dekarboksilase didistribusikan secara luas di antara spesies prokariotik. Namun untuk dekarboksilase

glutamate, jarang ditemukan. Di antara *Enterobacteria*, hanya *Escherichia coli* dan *Shigella spp.* memiliki gen untuk dekarboksilase glutamat. Sebaliknya, pada sel eukariotik, enzim enkapsulasi dekarboksilat glutamat hampir ditemukan di mana-mana.

Biosintesis GABA oleh mikroorganisme diregulasi oleh beberapa faktor yang akan mempengaruhi proses fermentasi. Faktor-faktor yang mempengaruhi antara lain pH medium, temperatur, lamanya proses fermentasi berlangsung, kandungan nutrisi, seperti sumber karbon dan nitrogen, serta penambahan inducer yang nantinya juga akan mempengaruhi hasil dari produk fermentasi. Proses biokimia pada setiap jenis BAL dalam memproduksi GABA memiliki kondisi optimum yang berbeda. Kondisi optimum fermentasi setiap mikroorganisme bervariasi. Hal ini dikarenakan perbedaan sifat enzim GAD dalam mengkatalis asam glutamate menjadi GABA. Oleh karena itu, karakteristik mikroorganisme, khususnya BAL dalam memproduksi GABA diperlukan dalam mencapai produksi yang tinggi.

### 3.1.1. pH Awal Medium

BAL dapat menghasilkan asam laktat sehingga dapat menurunkan pH medium. Setiap jenis bakteri sangat sensitif terhadap pH medium sehingga mempengaruhi pertumbuhan. pH media berpengaruh terhadap pertumbuhan sel bakteri sehingga mempengaruhi produksi GABA. Produksi GABA meningkat dengan meningkatnya pH hingga mencapai pH optimum dan selanjutnya akan mengalami penurunan. Kebanyakan mikroorganisme penghasil GABA mempunyai pH yang memungkinkan untuk melakukan aktivitas secara maksimal.

Penurunan pH merupakan karakteristik penting yang dibutuhkan oleh strain bakteri untuk mengasamkan lingkungannya dengan cepat. Produksi asam dan penurunan pH yang dalam proses fermentasi diketahui untuk memperpanjang fase lag organisme dan mencegah mikroba patogen tumbuh pada media (Smulders, *et al.*, 1986). GABA disintesis pada medium dengan rantang pH asam. Ali, *et al.*, (2009) menemukan pH optimum produksi GABA adalah pH 5,0 dengan menggunakan bakteri *Leuconostoc NC5*. Pada suhu 6,0, produksi mulai menurun. *Lactobacillus paracasei* NFRI 7415 memiliki pH optimal 5,0 untuk produksi GABA (21.630 ml/L) (Komatsuzaki, *et al.*, 2005). Biase, *et al.*, (1999) menjelaskan bahwa peran utama asam amino dekarboksilase bakteri dianggap sebagai pemelihara pH asam dengan konsumsi ion H<sup>+</sup>.

Tajabadi, *et al.*, (2015) menyatakan pH awal 5-5.5 merupakan pH yang lebih baik untuk produksi GABA dari *L. plantarum*. Nilai pH optimal untuk mempertahankan aktivitas GAD dari BAL (Komatsuzaki, *et al.*, 2008), dan pH tinggi atau rendah dapat menyebabkan hilangnya sebagian aktivitas GAD (Nomura, *et al.*, 1999).

### 3.1.2. Suhu Inkubasi

Suhu merupakan salah satu faktor penting dalam pertumbuhan bakteri asam laktat dan metabolismenya. Berdasarkan suhu pertumbuhan, mikroba dapat dikategorikan menjadi beberapa kelompok. *Psychrophiles*, tumbuh pada suhu dibawah -15-10 °C dan maksimum suhu tumbuh 20oC (Morita, 2001). *Psychrotrophs*, merupakan bakteri yang tumbuh pada suhu rendah, antara 15-20°C (Morita, 2001). *Mesophil* merupakan bakteri yang tumbuh pada suhu sedang, tidak panas dan tidak dingin. Bakteri ini tumbuh pada suhu antara 20-45 °C dengan optimum pada suhu 30-39 °C (Schiraldi and Rosa, 2014). Terakhir kelompok *Thermophile*, menurut Gupta, *et al.*, (2014) terbagi atas: *moderate thermophiles* yang optimum pertumbuhan, 50-60 ° C, *extreme thermophiles* tumbuh optimum pada 60-80°C, dan *hyperthermophiles* optimum pertumbuhan, 80-110°C.

Suhu merupakan faktor abiotik dalam keberhasilan fermentasi. Suhu selama proses fermentasi akan mengalami perubahan, yaitu dari suhu rendah menjadi lebih tinggi kerana reaksi eksotermis dan kemudian mengalami penurunan kembali seperti semula setelah reaksi selesai. Suhu optimum merupakan faktor yang berpengaruh terhadap produksi GABA peningkatan suhu sebelum mencapai suhu optimum akan meningkatkan pertumbuhan bakteri dan produksi GABA.

Penelitian yang dilakukan oleh Ali, *et al.*, (2009) menyatakan bahwa produksi GABA oleh bakteri *Leuconostoc NC5* terbaik berada pada suhu 37°C. Pada suhu 42°C, produksi GABA rendah sama halnya dengan suhu 32°C. Penelitian ini sejalan dengan penelitian yang dilakukan dengan menggunakan *Lactobacillus paracasei* NFRI 7415 oleh Komatsuzaki, *et al.*, (2005). Produksi GABA secara drastis terhambat pada suhu 43 °C. Produksi GABA optimal dilakukan pada suhu 37 °C. Zhang, *et al.*, (2012) dengan *L. brevis* TCCC13007 mendapatkan suhu optimal produksi GABA 30 °C. *L. brevis* CRL 1942 memiliki suhu optimal produksi GABA pada suhu 30 °C, yaitu sebanyak 26.265 ml/L.

### 3.1.3. Lama Inkubasi

Lama waktu waktu fermentasi merupakan faktor penting lainnya yang perlu dipertimbangkan untuk memproduksi GABA, analisis waktu mengikuti pertumbuhan sel, viabilitas sel, pH dan sintesis GABA. Villegas, *et al.*, (2016) melakukan penelitian dengan *L. brevis* CRL 1942 dan mendapatkan bahwa fase pertumbuhan stasioner dicapai setelah 24 jam setelah fermentasi. pH turun menjadi sekitar 5 dalam 24 jam dan kemudian mulai meningkat bersamaan dengan kehadiran GABA dalam medium kultur. Peningkatan nilai pH ini akan terkait dengan penghilangan ion hidrogen dengan proses dekarboksilasi dan pertukaran glutamat ekstraselular untuk substrat yang lebih basa, seperti GABA yang berkontribusi pada alkali lokal lingkungan ekstraselular (Biase and Pennacchiotti, 2012). Tidak ada peningkatan GABA lebih lanjut ditemukan sampai 144 jam. Ini mungkin karena sel memasuki fase eksponensial pH mulai menurun sehingga mengaktifkan enzim GAD yang memiliki aktivitas katalitik optimal pada pH rendah (Hiraga, *et al.*, 2008; Huang, *et al.*, 2007; Lin, 2013).

Komatsuzaki, *et al.*, (2005) mendapatkan produksi optimal GABA ekstraselular 60 mM pada lama inkubasi 144 jam (6 hari) dengan menggunakan *Lactobacillus paracasei* NFRI 7415. Pada penghitungan produksi GABA intraselular, didapat produksi tertinggi pada <82,4 ml/L pada inkubasi <100 jam dan pada inkubasi selama 144 jam dosis GABA intraselular berada pada <41,2 ml/L. Kandungan GABA intraselular sangat rendah dibandingkan dengan GABA ekstraselular dan kandungan intraselular memuncak sebelum kandungan GABA ekstraselular. Higuchi, *et al.*, (1997) menjelaskan lokalisasi GAD dalam sitoplasma pada *Lactobacillus* Higuchi berpendapat bahwa GABA disintesis pada sitoplasma, lalu disekresikan ke medium kultur meskipun belum dapat menerangkan mekanisme molekuler dengan jelas.

### 3.1.4. Sumber Karbon

Karbon merupakan sumber energi utama bagi pertumbuhan bakteri. BAL menghidrolisis gula (pati, selulosa, dan hemiselulosa) menjadi asam laktat. Karbon adalah sumber utama energi yang membentuk komponen penting dalam media BAL untuk pertumbuhan dan fungsionalitas (Donnell, *et al.*, 2011). Setiap strain BAL menunjukkan perbedaan dalam memanfaatkan sumber karbon berbeda yang dapat mempengaruhi pertumbuhan dan fungsinya.

Kebanyakan gula dapat dimanfaatkan sebagai sumber karbon oleh BAL, tetapi glukosa biasanya lebih disukai oleh sejumlah besar strain BAL (Kim, *et al.*, 2009). Cho, *et al.*, (2007) menerangkan bahwa glukosa merupakan sumber karbon paling banyak digunakan oleh BAL. Penggantian glukosa dengan fruktosa, laktosa, maltose, arabinosa, dan galaktosa dapat menurunkan GABA yang dihasilkan. Produksi GABA pada *Lactobacillus buchneri* WPZ001 sangat baik dengan pemberian xilosa sebagai sumber karbon, yaitu mencapai 68.3 g/L (Zhao, *et al.*, 2014).

### 3.1.5 Sumber Nitrogen

Jenis sumber karbon maupun sumber nitrogen yang digunakan dalam medium produksi mempengaruhi laju pertumbuhan sel BAL. Selanjutnya, berpengaruh terhadap metabolisme (Kim dan Ahn, 2000). BAL telah mendapat banyak perhatian karena aktivitas proteolitik yang sangat penting dalam percepatan dan modifikasi enzim dari berbagai produk makanan. Proteolisis adalah proses ketika protein dipecah oleh proteinase dan peptidase menjadi polipeptida, asam amino, dan peptida (Savijoki, *et al.*, 2006; Bintsis, *et al.*, 2018). Proteinase dan peptidase dapat ditemukan sebagai ekstraselular dan disekresikan sebagai enzim bebas di luar sel atau intraselular di dalam sel.

BAL membutuhkan asam amino dan peptida untuk memenuhi kebutuhan nitrogen (Savijoki, *et al.*, 2006). Kebutuhan sumber nitrogen pada setiap media berbeda setiap strain BAL (Von and Axelsson, 2011). Setiap Strain BAL mempunyai kebutuhan berbeda setiap sumber nitrogen. Nitrogen merupakan faktor pertumbuhan esensial atau faktor stimulasi, juga beberapa strain dapat tumbuh tanpanya (Letort and Juillard, 2001; Barrangou, *et al.*, 2001).

Penelitian yang dilakukan oleh Zhao, *et al.*, (2014) dengan menggunakan *Lactobacillus buchneri* WPZ001 menunjukkan perbedaan penggunaan sumber nitrogen organik dan anorganik oleh BAL dalam menghasilkan GABA. Ketika diberikan sumber nitrogen anorganik tunggal seperti, urea, ammonium sulfat, asam sitrat-diamin pertumbuhan *L. buchneri* WPZ001 sangat terhambat dan produksi GABA yang sangat rendah. Ketika diberikan secara tunggal seperti pepton *fish meal*, ekstrak daging, atau pepton secara tunggal, baik pertumbuhan sel atau produksi GABA *L. buchneri* WPZ001 lebih baik.

### 3.1.6 Konsentrasi Glutamat

L-glutamat dalam prosesnya akan dikatalis oleh enzim GAD. GAD melepaskan gugus karboksil dari L-glutamat untuk menghasilkan GABA dan karbondioksida. Pembentukan GABA dibatasi oleh kemampuan BAL dalam memproduksi GABA dan konsentrasi L-glutamat pada matriks. Untuk dapat meningkatkan produksi GABA dalam fermentasi, perlu digunakan BAL dengan enzim GAD tinggi. Enzim GAD pada BAL termasuk enzim intraseluler (Ueno, *et al.*, 1997; Huang, *et al.*, 2007; Komatsuzaki, *et al.*, 2008), dan merupakan salah satu bentuk respons stres asam pada BAL (Sanders, *et al.*, 1998; Small and Waterman 1998). Konsentrasi L-glutamat dapat ditingkatkan dengan menambahkan asam glutamat eksogenus (Nomura, *et al.*, 1998; Park and Oh, 2005; Seok, *et al.*, 2008; Kim, *et al.*, 2009), menambahkan protease untuk menghidrolisis protein dan menghasilkan asam glutamate (Zhang, *et al.*, 2006), menggunakan BAL yang memiliki kemampuan hidrolisis protein sebagai co-kultur untuk proses fermentasi (Inoue, *et al.*, 2003).

Penambahan glutamat pada medium dapat meningkatkan viabilitas sel. Hal ini menunjukkan korelasi antara kemampuan bertahan sel dan produksi GABA. Hal ini dimungkinkan karena alkalisasi medium oleh metabolit yang dihasilkan (Villegas, *et al.*, 2016). Komatsuzaki, *et al.*, (2005) mengatakan bahwa konsentrasi GABA meningkat seiring dengan penambahan glutamate pada medium. Dosis optimal untuk produksi GABA dengan menggunakan *Lactobacillus paracasei* NFRI 7415 adalah 51.500 ml/L. Hasil penelitian Tajabadi, *et al.*, (2015) menggunakan *L. plantarum* Taj-Apis362. Produksi GABA meningkat dengan pemberian glutamat dari 50-400 mM dimana optimasi tercapai pada konsentrasi glutamate 400 mM. Produksi cenderung menurun dengan pemberian lebih besar dari 600 mM.

### 3.1.7 Konsentrasi Inokulum

Inokulum adalah mikroba yang diinokulasikan ke dalam medium fermentasi pada saat kultur mikroba tersebut berada pada tingkat pertumbuhan eksponensial (Rahman, 1989). Konsentrasi inokulum pada fermentasi memberikan pengaruh terhadap hasil fermentasi. Musalbakri, *et al.*, (2005) yang menjelaskan bahwa jumlah stater berpengaruh terhadap peningkatan konsentrasi sel secara bertahap karena meningkatkan pertumbuhan mikroba. Meningkatnya jumlah stater akan mempercepat kerja bakteri untuk merombak glukosa menjadi GABA. Agbogbo, *et al.*, (2007) mengatakan bahwa penambahan

stater dengan konsentrasi yang tinggi juga akan meningkatkan laju fermentasi.

Disisi lain, konsentrasi inokulum juga dapat menurunkan kinerja dari bakteri. Stater yang terlalu banyak dalam substrat akan menimbulkan kompetisi dalam memperoleh makanan sehingga kemampuan mikroorganisme untuk melakukan fermentasi terhadap substrat menjadi berkurang (Rahman, 1992). Hal ini disebabkan oleh telah terjadi persaingan antarbakteri dalam penggunaan nutrisi yang tersedia pada medium. Wizna, *et al.*, (2009) juga menjelaskan bahwa kepadatan stater yang terlalu tinggi membuat stater sulit untuk tumbuh sempurna yang dapat menyebabkan kematian pada mikroba. Penggunaan konsentrasi inokulum yang semakin tinggi pada batas tertentu dapat menjadikan proses fermentasi berjalan dengan tidak efisien (Franca, *et al.*, 2009). Li, *et al.*, (2016) melakukan penelitian dengan menggunakan *L. plantarum* M-6 dalam menghasilkan GABA dan mendapatkan kesimpulan bahwa pemberian awal konsentrasi inokulum hanya sedikit mempengaruhi kemampuan produksi GABA. Produksi GABA terlihat meningkat seiring meningkatnya konsentrasi inokulum hingga 5%, namun melebihi 5% produksi mengalami penurunan berfluktuasi. Beberapa penelitian mengenai faktor yang mempengaruhi produksi GABA oleh BAL dapat dilihat pada tabel berikut (Tabel 3).

Tabel 3. Optimasi produksi GABA oleh BAL

Spesies BAL	Medium	Produksi	Penemu
<i>Lactobacillus paracasei</i> MRSB	MRS broth Waktu: 144 jam Glutamate: 500 mM ,Suhu:37 °C pH:5	6.180 ml//L 16.583 ml/L 16.377 m/L 21.630 ml/L	Komatsu-zaki, <i>et al.</i> , 2005
<i>Leuconostoc</i> NC5	MRSB,Suhu: 37oC Waktu: 168 jam pH: 5 Glutamate: 200 mM	257,5 ml/L 236,9 ml/L 226,6 ml/L 2060 ml/L	Ali, <i>et al.</i> , 2009

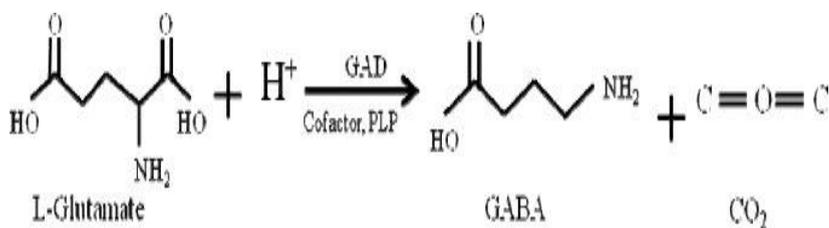
<i>Lactobacillus brevis</i> TCCC13007	10 gr glukosa, 10 gr pepton, 5 gr ekstrak yeast, 0.6 gr MgSO <sub>4</sub> , 0.2 gr MnSO <sub>4</sub> , 2 gr sodium asetat, 10 gr MSG (kemurnian 99%, sigma) Suhu: 30oC pH awal 6.0	6.1 gr/L	Zhang, <i>et al.</i> , 2012
<i>Lactobacillus buchneri</i> WPZ001	MRS, 5 gr/L ekstrak yeast, 3 gr/L sodium asetat, 2 gr/L asam sitrat diamin, 2 gr/L KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> , 0.1 g/L MgSO <sub>4</sub> , 0.04 g/L MnSO <sub>4</sub> , 0.1% Tween-80	75.5 gr/L	Zhao, <i>et al.</i> , 2014
<i>Lactobacillus brevis</i> TCCC13007	10 gr glukosa, 10 gr pepton, 5 gr ekstrak yeast, 0.6 gr MgSO <sub>4</sub> , 0.2 gr MnSO <sub>4</sub> , 2 gr sodium asetat, 10 gr MSG (kemurnian 99%, sigma) Suhu: 30oC pH awal 6.0	6.1 gr/L	Zhang, <i>et al.</i> , 2012
<i>Lactobacillus brevis</i> SIIA11021	g/L: 20 glukosa, 20 ekstrak yeast, 5 soya pepton, 5 ekstrak daging, 5 sodium asetat, 2 K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> , 1 amonium sitrat, 1 Tween 80, 0.2 MgSO <sub>4</sub> , 0.05 MnSO <sub>4</sub> , 20 amonium glutamate, pH 6.0	3.914 ml/L 9.270 ml/L 14.420 ml/L	Lie, <i>et al.</i> , 2014
<i>Lactobacillus brevis</i> CRL 1942	MRS medium Suhu: 30oC Waktu: 48 jam	23.175 ml/L	Villegas, <i>et al.</i> , 2016

<i>Pediococcus acidilactici</i> DS15	suhu 36oC, inkubasi 72 jam, pH: 6, 0,8% MSG sebagai inducer, 11% starter bakteri, 100% limbah air tahu sebagai sumber N dan 15% gula aren :sumber karbon.	835,257 mg/L	Anggraini 2020
--------------------------------------	---	--------------	----------------

### 3.2. Biosintesis Gamma Amino Butyric Acid (GABA)

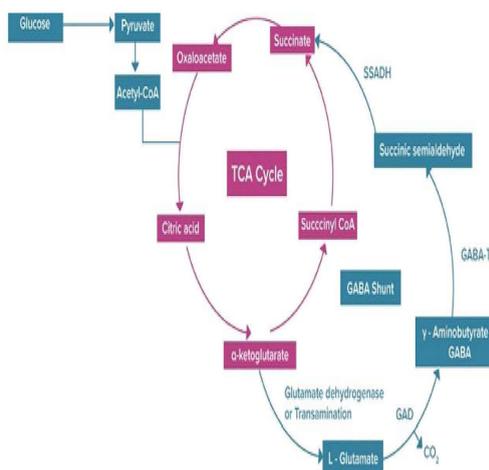
GABA (C<sub>4</sub>H<sub>9</sub>NO<sub>2</sub>) merupakan asam amino yang berperan dalam inhibitor neurotransmitter pada sistem saraf pusat atau *Central Nervous System* (CNS). GABA secara alami juga ditemukan tersebar pada hewan dan tumbuhan, seperti pada teh Gabaron (Yokoyama, 2002). GABA terdiri atas empat karbon dan merupakan asam amino nonprotein yang ditemukan di hampir semua organisme prokariotik dan eukariotik sebagai komponen penting dari kolam asam amino bebas (Bown and Barry, 1997). Ada lebih dari 300 jenis asam amino yang bukan penyusun protein. Asam-asam amino ini ditemukan dalam bentuk bebas dalam tubuh makhluk hidup dan memainkan peranan penting dalam metabolisme (Rizal and Guoyao, 2012). Asam amino berperan dalam nutrisi dan homeostatis tubuh. Selain sebagai *building block protein*, asam amino memiliki fungsi regulasi dalam sel dan nutrisi penting bagi pertumbuhan, perkembangan, dan kesehatan manusia maupun hewan (Wu, 2010). Beberapa asam amino tidak tergabung ke dalam protein merupakan prekursor atau perantara penting dalam metabolisme. Fernstrom (1994) menyatakan ada dua kelompok asam amino, yaitu asam amino aromatik dan asam. Ketika terjadi perubahan konsumsi asam amino dari pakan akan mengubah kadar asam amino ini di otak sehingga mempengaruhi fungsi otak.

Rendahnya level GABA atau terjadinya penurunan fungsi GABA di otak pada manusia dikaitkan dengan beberapa gangguan kejiwaan dan kekacauan pada sistem saraf, termasuk depresi, insomnia, epilepsi, dan alzheimer (Esmaeili and Ghaed, 2010). Kandungan GABA sangat rendah pada korteks temporal, korteks occipital dan serebelum pada pasien dengan penyakit Alzheimer (Seid, *et al.*, 2001).



Gambar 8. Sintesis GABA dari L-Glutamat (*sumber: Radhika et al., 2012*)

$\gamma$ -Aminobutyric acid (GABA) dibentuk melalui dekarboksilasi L-glutamat. Suatu reaksi yang dikatalis oleh enzim yang tergantung pada peridoksal fosfat L-glutamat dekarboksilasi (Murray, *et al.*, 2003) (Gambar 6). Enzim dekarboksilase ini terdapat dalam jaringan sistem saraf pusat, terutama dalam substansia grisia (Murray, *et al.*, 1995). Katabolisme  $\gamma$ -aminobutirat meliputi transaminasi yang dikatalis oleh enzim  $\gamma$ -aminobutirat transaminasi menjadi suksinat semialdehid. Suksinat semialdehid dapat mengalami reduksi menjadi  $\gamma$ -hidroksibutirat, yaitu suatu reaksi yang dikatalisis oleh enzim L-laktat dehidrogenase, atau mengalami oksidasi menjadi zat-antara dalam siklus asam sitrat, yakni suksinat dan kemudian menjadi CO<sub>2</sub> serta H<sub>2</sub>O (Murray, *et al.*, 1995).



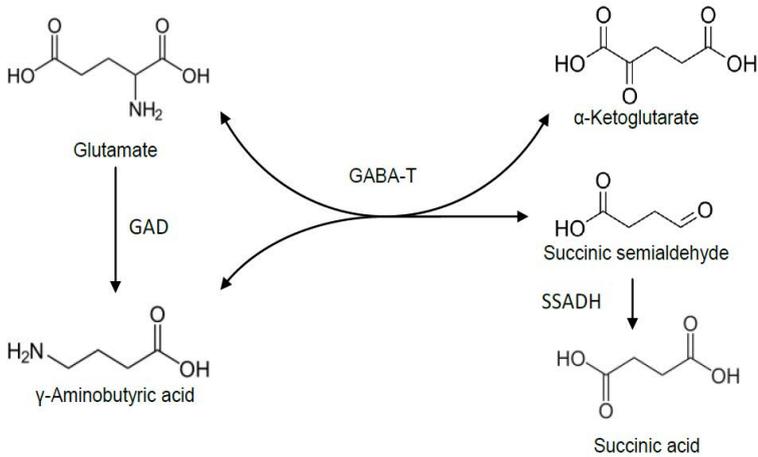
Gambar 9. Jalur Metabolik GABA (*GABA shunt pathway*) (*sumber: Mahendarn and Jayarahman, 2019*)

Pada Gambar 9 Jalur metabolik GABA dikonversi dari alfa-ketoglutarat yang dihasilkan oleh siklus TCA atau siklus asam sitrat menjadi suksinat melalui glutamat, GABA, dan suksinat semialdehid. Ada berbagai jenis enzim yang terlibat dalam *GABA shunt*. Langkah pertama adalah produksi glutamat dari alfa-ketoglutarat melalui reaksi transaminasi dan reaksi dikatalisis oleh glutamat dehidrogenase. Selanjutnya, dekarboksilasi glutamat menjadi GABA yang dikatalisis oleh glutamat dekarboksilase (GAD) dan langkah ini bersifat *irreversible*. Pada langkah ini glutamat dekarboksilase mengkonsumsi proton dan melepaskan CO<sub>2</sub>. Dalam sintesis GABA, GAD enzim penentu dengan kofaktor berupa pyridoxal phosphate (PLP). Enzim ketiga yang terlibat dalam *GABA shunt* adalah GABA transaminase. Pada langkah ini, katabolisme GABA terjadi dan menghasilkan suksinat semialdehida (SSA) menggunakan enzim GABAtransaminase. Langkah selanjutnya adalah konversi suksinat semialdehida menjadi suksinat oleh enzim suksinat semialdehid dehidrogenase dan memasuki siklus TCA (Mahendarn and Jayarahman, 2019; Sarasa, 2019; Roberts and Kuriyama, 1968).

Olsen and Timothy, (1999) juga menyatakan bahwa didalam otak GABA disintesis oleh jalur metabolisme yang dikenal dengan *GABA Shunt*. Langkah terakhir dari jalur ini menghasilkan GABA asam amino non-protein melalui konversi neurotransmitter rangsang dan asam amino L-glutamat oleh glutamic acid decarboxylase (GAD). Enzim ini ada dalam dua isoform dengan sifat pelokalan dan regulasi yang berbeda (Nasreen, *et al.*, 2012). Kedua GAD juga diekspresikan di luar CNS, seperti pada sel  $\beta$  pankreas, testis, dan epitel saluran telur (Watanabe, *et al.*, 2002). Selain melalui GAD, GABA juga disintesis oleh enzim  $\gamma$ -aminobutyric acid transaminase (GABA-T) dari suksinat semialdehida. Namun, fungsi utama GABA-T bukanlah sintesis GABA, tetapi mendegradasi GABA, sebagai antikonvulsan  $\gamma$ -vinyl GABA (vigabatrin), inhibitor ireversibel GABA-T, menyebabkan akumulasi GABA dalam sel glial retina (Neal, *et al.*, 1989). Semialdehida suksinat dapat dioksidasi menjadi asam suksinat dengan suksinat suksinat dehidrogenase (SSADH) dan kemudian memasuki kembali siklus Krebs (Bernard, *et al.*, 1999). Selain itu, inhibitor GABA-T lainnya juga menghasilkan peningkatan yang signifikan dalam GABA di otak *in vivo*. Kehadiran kofaktor pyridoxal-5'-fosfat diperlukan sebagai pembawa untuk menghasilkan suksinat semialdehida. Reaksi balik dari suksinat semialdehida ke GABA juga tidak mungkin terjadi pada tingkat penting *in vivo* karena co-lokalisasi aktivitas tinggi suksinat semialdehida

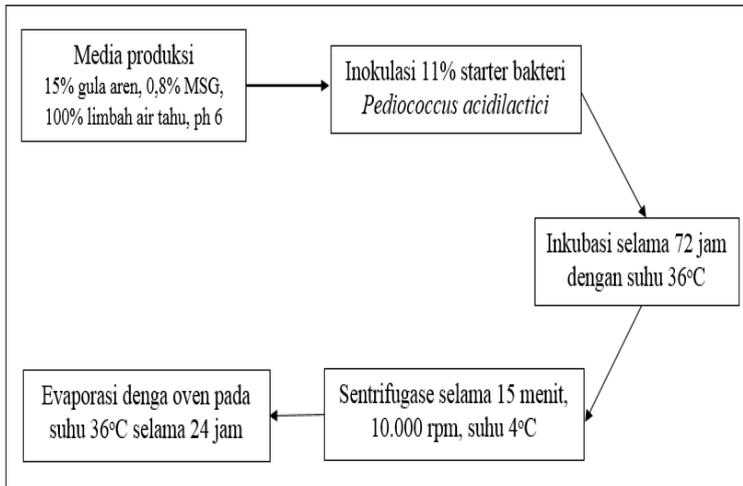
dehidrogenase (SSADH) dan GABA-T (Sherif, 1994). Di otak, GABA-T terutama diekspresikan dalam sel glial dan endotel (Watanabe, *et al.*, 2002). Oleh karena itu, dapat disimpulkan bahwa (dalam CNS) GABA anabolisme dan katabolisme masing-masing terjadi pada neuron dan sel glial.

Selain sebagai senyawa bioaktif yang bermanfaat bagi mamalia, produksi GABA pada mikroba juga merupakan kontribusi terhadap toleransi pH dan produksi ATP untuk dirinya sendiri (Higuchi, *et al.*, 1997; Small and Waterman, 1998). Beberapa strain *Lactobacilli* yang mengkatalisis dekarboksilasi glutamat menghasilkan pelepasan stoikiometri dengan produk akhir berupa GABA dan CO<sub>2</sub>. Penelitian yang dilakukan oleh Small and Waterman (1998) menunjukkan bahwa proses dekarboksilasi ini dapat digabungkan dengan produksi energi sesuai dengan kemungkinan bahwa proses glutamat melibatkan siklus metabolisme motif proton. Beberapa bakteri memperoleh energi dari dekarboksilasi asam organik oleh dekarboksilase yang terdapat pada membran yang bertindak sebagai pompa natrium. Dekarboksilasi glutamat menghasilkan energi yang dibutuhkan untuk sintesis ATP oleh DCCD-sensitif ATPase oleh sebuah siklus metabolisme motif proton (Higuchi, 1997). (i) Pertukaran satu untuk-satu glutamat dan GABA memolarisasi selaput (mengakibatkan kondisi negatif di dalam membran). (ii) Dekarboksilasi glutamate intraseluler mengkonsumsi proton sitoplasmik, menghasilkan DpH melintasi membran (menghasilkan kondisi basa di dalam membran). (iii) Gaya motif proton yang timbul dalam kombinasi langkah-langkah transport dan dekarboksilasi digunakan untuk sintesis ATP oleh ATPase yang sensitif terhadap DCCD. (iv) Difusi CO<sub>2</sub> bebas membuat keseluruhan siklus efektif ireversibel.



Gambar 10. *GABA shunt reactions* bertanggungjawab untuk sintesis, konservasi dan metabolisme GABA. GABA-T, GABA α-oxoglutarate transaminase; GAD (glutamic acid decarboxylase); SSADH, succinic semialdehyde dehydrogenase (*Sumber; Olsen and Timothy, 1999*)

Di luar otak, konsentrasi GABA yang tinggi dapat ditemukan di sel islet  $\beta$  pankreas pada bagian pulau Langerhans. Setiap pulau terdiri atas empat jenis sel endokrin. Jenis sel yang paling banyak pada pankreas manusia adalah sel penghasil insulin (54%) diikuti oleh glukagon yang memproduksi sel alfa (35%) maka sel delta somatostatin memproduksi 11% (Brissova, *et al.*, 2005) dan akhirnya jumlah sel penghasil polipeptida pankreas yang rendah (PP Sel) hadir. GAD hadir pada sel islet  $\beta$  dan delta (Gladkevich and Korf, 2006). Sel  $\beta$  pankreas melepaskan GABA melalui proses vesikuler dan non-vesikular (Braun and Ramracheta, 2010). GABA menyebabkan tindakan penghambatan sekresi glucagon dan somatostatin dengan mengaktifkan saluran GABAA pada sel  $\alpha$  dan  $\delta$ . GABA bekerja pada sel  $\beta$  dalam pertumbuhan sel pengaktifan sel autokrin dan jalur pensinyalan kelangsungan hidup (Soltani and Qiu, 2011). GABA memberikan efek imunomodulator dengan mengurangi proliferasi sel, sitokin inflamasi, dan peningkatan regulasi sel. Oleh karena itu, GABA mungkin memiliki fungsi pelindung untuk sel beta saat diserang oleh sel kekebalan tubuh. Adapun bagan alir Produksi GABA dapat dilihat pada Gambar 11.



Gambar 11. Bagan alir proses produksi GABA (Anggraini, 2020)

### 3.3. Pemurnian Asam Amino

Proses produksi asam amino dapat dilakukan dengan beberapa cara, yaitu sintesis kimia, isolasi dari bahan alami, serta fermentasi dan metode kemo-enzim. Produksi dengan fermentasi menggunakan mikroorganisme merupakan proses yang paling populer dilakukan. Hal ini dikarenakan mikroba dapat tumbuh sangat cepat pada kondisi optimum, kultur dan kondisi fermentasi simpel dan mudah dikendalikan, kualitas, dan kuantitasnya tinggi. Mikroba yang digunakan dalam proses produksi asam amino biasanya merupakan mikroba yang non-patogen, spektrum luas dari sumber karbon yang dapat berasimilasi, pertumbuhan cepat pada sumber karbon dan nitrogen yang murah, kemampuan tinggi untuk memetabolisme sumber karbon, dan resistensi terhadap serangan bakteriofag. Proses fermentasi juga memiliki beberapa tipe, yaitu *batch fermentation*, *fed-batch fermentation*, *continuous fermentation*, dan *enzymatic*.

Diperlukan metode khusus untuk memisahkan asam amino yang dihasilkan dari produk kontaminannya. Terdapat beberapa metode yang dapat dilakukan, antara lain sentrifugasi, kristalisasi, ion exchange, elektrodialisis, ekstraksi pelarut, dan evaporasi (penguapan).

Sentrifugasi merupakan pemisahan substansi berdasarkan berat jenis molekul dengan kecepatan tertentu sehingga substansi dengan berat molekul lebih berat akan berada di dasar, sedangkan substansi

dengan berat molekul yang lebih ringan akan terletak di atas. Medium fermentasi produksi asam amino dengan mikroorganisme dimasukkan dalam botol atau tabung dalam rotor di sentrifugase sehingga terjadi pemisahan partikel dengan perbedaan densitas, bentuk, dan ukuran berupa endapan pada laju berbeda (Bintang, 2010).

Kristalisasi akan sulit dilakukan jika campuran senyawa terlalu banyak. Tidak semua jenis produk asam amino yang diproduksi dapat dikristalkan. Menurut Ibrahim dan Sitorus (2013) bisa atau tidaknya suatu senyawa dimurnikan dengan cara ini maka diuji dengan menguapkan pelarutnya. Jika terbentuk zat padat, senyawa dapat dikristalkan. Namun, jika residu berbentuk cair, kristalisasi tidak dapat dilakukan.

*Ion exchange chromatography* atau pertukaran ion kromatografi dilakukan untuk ekstraksi dan pemurnian asam amino dari fermentasi cair. *Ion exchange* sangat dipengaruhi oleh pH larutan dan kehadiran ion kontaminan. Ada dua jenis resin penukar ion: cation exchange resins (mengikat asam amino bermuatan positif), anion exchange resins (mengikat asam amino bermuatan negatif). Bila suatu protein bermuatan positif pada pH 7, maka protein tersebut akan terikat dalam kolom dengan butir-butir yang mempunyai gugus karboksilat, sedangkan protein bermuatan negatif tidak (Stryer, 2000). Proses pemurnian dengan *Ion exchange* membutuhkan biaya tinggi sehingga langkah ini hanya dilakukan jika cara yang lain tidak berhasil.

Elektrodialisis memiliki prinsip pemisahan berdasarkan pergerakan partikel koloid bermuatan di bawah pengaruh medan listrik (Bintang, 2010). Campuran asam amino dan garam kontaminan yang diperlukan dapat dipisahkan pada pH dengan asam amino memiliki muatan nol bersih. Dalam larutan, protein enzim akan bermuatan yang tergantung pada pH larutan dan titik isolistrik (PI) enzim (Bintang, 2010).

Solvent extraction atau ekstraksi pelarut Solvent extraction atau ekstraksi pelarut memiliki aplikasi terbatas. Ekstraksi pelarut digunakan untuk memisahkan komponen dan menghilangkan pengotor dari suatu campuran (Adam, 1963). Berdasarkan pada kelarutan komponen dalam pelarut, dibutuhkan pemilihan pelarut yang sesuai. Pelarut yang dipilih bergantung pada kelarutan zat yang akan diekstraksi dan kemudahan untuk dipisahkan dari zat terlarut (Vogel, 1989). Ekstraksi pelarut dilakukan dengan mencocok campuran yang akan dipisahkan menggunakan pelarut yang sesuai

dalam corong pisah. Hasil ekstraksi dikeringkan dengan zat padat pengering. Pengering yang dipilih mempertimbangkan pengering tidak berinteraksi kimiawi dengan hasil sintesis (seperti polimerisasi, reaksi kondensasi, auto-oksidasi), menyerap air dengan cepat, memiliki kapasitas pengeringan yang efektif dan ekonomis (Vogel, 1989).

Evaporasi atau penguapan dilakukan untuk mengurangi jumlah air pada produk. Evaporasi dilakukan menggunakan oven vakum yang dilengkapi dengan pemanas, manometer dan diisi dengan zat pengering. Beberapa golongan senyawa dapat digunakan sebagai pengering, yaitu garam ( $\text{CaCl}_2$ ,  $\text{MgSO}_4$ ,  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ ,  $\text{K}_2\text{CO}_3$  dan  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ ), oksida ( $\text{CaO}$ ,  $\text{MgO}$ ,  $\text{BaO}$ ,  $\text{P}_2\text{O}_5$ ,  $\text{Al}_2\text{O}_3$ ), asam atau basa ( $\text{H}_2\text{SO}_4$ ,  $\text{KOH}$ ,  $\text{NaOH}$ ) serta Na, silikagel dan tamis molekuler (molekular sieve) (Ibrahin and Marham, 2012).

## **BAB IV**

### **PENYEBAB STRES PADA TERNAK**

Pemberian pakan dengan nutrisi baik harus diimbangi dengan kondisi lingkungan yang nyaman agar pemanfaatan nutrisi dapat mengoptimalkan produksi. Sebagai negara yang berada dalam iklim tropis, permasalahan yang dihadapi Indonesia adalah tingginya suhu lingkungan. Hal ini diperparah dengan adanya pemanasan global (*global warming*) yang disebabkan oleh perubahan lingkungan yang semakin memburuk. Dalam beberapa tahun terakhir, peningkatan pemanasan global dan gelombang panas dengan frekuensi dan intensitas tinggi mengakibatkan pengurangan substansial produksi ternak dan pendapatan usaha peternakan (McMichael and Keith, 2010; Barnett, *et al.*, 2012). Hasil Penelitian Carroll, *et al.*, (2012) mengataka bahwa statistik terbaru menunjukkan gangguan pada ternak yang disebabkan oleh stres akibat panas dan menyebabkan kerugian ekonomi dari hampir 728 juta dolar di California dan negara-negara lain di Amerika Serikat.

Kondisi lingkungan yang tidak mendukung bagi kenyamanan broiler harus disiasati dengan manajemen perkandangan yang baik. Pengaturan kepadatan kandang juga harus diperhatikan agar broiler tidak mengalami stres panas akibat kepadatan kandang yang melebihi dari standar. Pengaturan kepadatan kandang sangat diperlukan untuk menciptakan lingkungan yang nyaman bagi ternak broiler. Populasi yang terlalu padat mengakibatkan ayam menderita cekaman atau stress. Kepadatan kandang dapat mempengaruhi temperatur lingkungan, tipe kandang, ukuran kandang, dan umur ayam (Suprijatna, 2005). Kepadatan yang tinggi akan menurunkan pertumbuhan, efisiensi pakan serta mortalitas (Beg, *et al.*, 2011; Sirri, 2009).

Melakukan pemeliharaan broiler melebihi jumlah yang dianjurkan tanpa mengetahui dasar-dasarnya akan menyebabkan hal-hal berikut (Rasyaf, 2009).

- Konsumsi ransum jadi berkurang. Pemadatan boiler persatuan luas akan menyebabkan tempat makanan menjadi sempit dan mengurangi kesempatan broiler untuk makan.

- Pertumbuhan terlambat. Broiler yang terlalu berhimpitan menyebabkan panas di dalam kandang dan akumulasi CO<sub>2</sub> meningkat dan menyebabkan efek lanjutan yakni memperlambat pertumbuhan ayam.
- Meningkatkan persentase kematian.
- Menambah kesempatan untuk saling mematuk antarsesama ayam.
- Menambah kebutuhan jumlah udara segar untuk mengusir CO<sub>2</sub> dan udara busuk dari dalam kandang.

Kandang yang terlalu padat dapat menyebabkan stres akibat panas pada broiler yang akan mempengaruhi performan, karkas, serta kualitas daging. Iskandar, dkk. (2009) dalam penelitiannya menggunakan ayam lokal dan mendapatkan bahwa bobot hidup, penambahan berat badan, konsumsi, serta konversi ransum menurun seiring peningkatan kepadatan kandang. Penelitian pada ayam broiler yang dilakukan oleh Guardia, *et al.*, (2011) juga mendapatkan hasil yang sejalan dengan Iskandar, bahwa penambahan bobot badan menurun serta konversi pakan yang meningkat seiring dengan kepadatan yang meningkat.

#### **4.1. Kepadatan Kandang Broiler**

Manajemen pemeliharaan yang baik perlu diterapkan untuk menunjang mutu genetik broiler. Broiler merupakan ternak hasil rekayasa genetik yang memiliki sifat unggul, yakni tumbuh dengan cepat. Oleh karena itu, diperlukan pengaturan dalam sistem pemeliharaan broiler. Kepadatan kandang adalah salah satu faktor penting yang harus diperhatikan. Kandang dengan kepadatan tinggi akan membuat broiler sulit melapaskan panas tubuh. Kondisi berdesakan dalam kandang juga akan mengakibatkan suhu menjadi lebih panas. Suhu lingkungan sangat mempengaruhi kondisi fisiologis dan produktivitas pada hewan.

Hewan umumnya memiliki *comfort* atau *thermoneutrality zone* yang berbeda pada setiap umur, yaitu menurun jika umur bertambah karena terjadinya penurunan *body surface* atau area per unit berat badan. Hewan memiliki batas atas *comfortzone* atau *upper critical temperature* (UCT) dan batas bawah atau *lower critical temperature* (LCT). *Comfort zone* pada ternak ayam di daerah tropik adalah antara 15-25oC menurut El-boushy and Marle (1978), sedangkan menurut

Hoseinni, *et al.*, (2013) berkisar 20-25oC. *Thermoneutrality zone* untuk ayam potong di Indonesia adalah 18 hingga 23oC (Sinurat, 1986). Pada sisi lain Tamalluddin (2012) menyatakan bahwa broiler membutuhkan suhu ideal pada masa finisher berkisar 21o-24oC. Kondisi geografis Indonesia sendiri berada pada daerah tropis yang memiliki suhu lingkungan rata-rata 26,9oC dengan suhu minimum 23oC dan maksimum 33,5oC (BPS, 2010). Suhu lingkungan tinggi dapat memberikan dampak negatif terhadap kondisi fisiologis dan produktivitas ayam (Yousef, 1985). Lebih lanjut, Farrel (1979) menyatakan bahwa ayam kurang toleran terhadap perubahan suhu lingkungan sehingga lebih sulit melakukan adaptasi terhadap perubahan suhu lingkungan, terutama setelah ayam tersebut berumur lebih dari tiga minggu.

Kepadatankandangmerupakan salahsatu faktor penting yang harus diperhatikan. Tingginya kepadatan kandang umumnya dilakukan oleh produsen untuk memperoleh hasil maksimal sehingga mengorbankan kenyamanan broiler dalam bertumbuh. Kepadatan kandang secara universal tidak dapat dipatok sama karena pemeliharaan dilakukan pada lingkungan yang berbeda. Kepadatan kandang yang lebih rendah umumnya digunakan di daerah tropis dibandingkan dengan daerah beriklim sedang karena tekanan panas yang disebabkan oleh suhu lingkungan yang tinggi pada daerah tropis. Pada 2007, komisi di Eropa telah menerbitkan maksimum standar kepadatan kandang untuk broiler 30 kg/m<sup>2</sup> (0.073 m<sup>2</sup>/ekor) atau sekitar 14 ekor/m<sup>2</sup> (Abudobas, *et al.*, 2013), sedangkan di Indonesia kepadatan kandang yang digunakan sekitar 8-10 ekor/m<sup>2</sup> (Tamalludin, 2012). Kepadatan kandang di Indonesia dapat mengalami perbedaan antara satu wilayah dengan wilayah lainnya. Untuk dataran rendah atau pantai, kepadatan yang baik berkisar 8-9 ekor/m<sup>2</sup>, sedangkan untuk dataran tinggi atau daerah pegunungan kepadatannya berkisar 11-12 ekor/m<sup>2</sup> dengan rata-rata 10 ekor/m<sup>2</sup> (Rasyaf, 2009).

Populasi yang terlalu padat mengakibatkan ayam menderita cekaman atau stres. Kepadatan kandang dipengaruhi oleh temperatur lingkungan, tipe kandang, ukuran kandang dan umur ayam (Suprijatna, 2005). Lara and Rostagno (2003) menjelaskan bahwa cekaman panas merupakan hasil dari keseimbangan negatif antara jumlah energi netto yang dilepaskan tubuh ternak ke lingkungan dan jumlah energi panas yang dihasilkan oleh ternak. Suhu lingkungan yang terlalu panas akan membuat broiler lebih banyak minum daripada makan untuk mengurangi beban panas. Hal ini mengakibatkan

sejumlah unsur nutrisi dan keperluan nutrisi utama bagi broiler tidak terpenuhi sehingga keunggulan broiler jadi tidak nampak. Hal ini dapat menyebabkan stres akibat panas pada broiler yang dapat mempengaruhi performans, karkas serta kualitas daging.

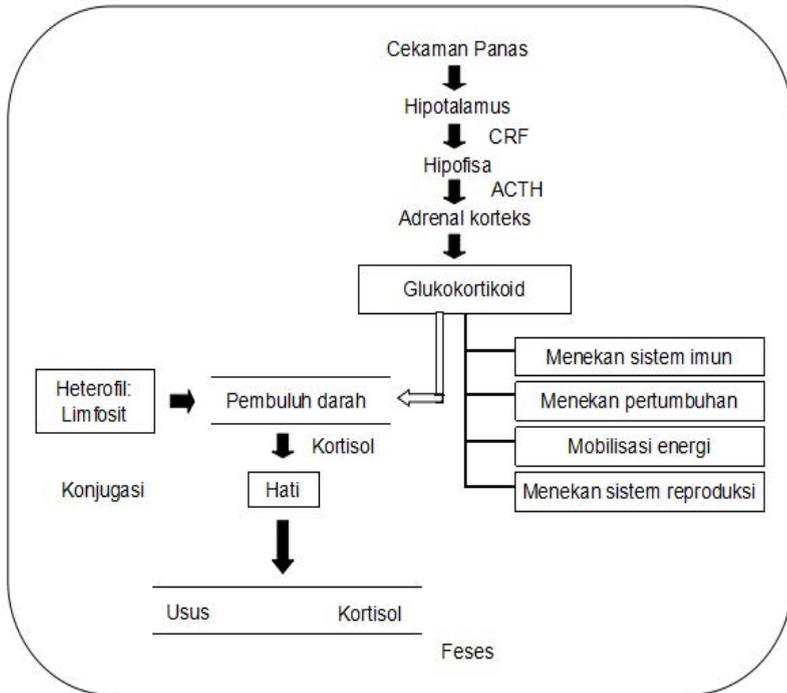
Pelepasan panas dari dalam tubuh ternak unggas dilakukan melalui dua cara, yaitu secara *sensible heat loss* dan *insensible heat loss* (Bird, et al., 2003). *Sensible heat loss* adalah pelepasan panas tubuh melalui proses radiasi, konduksi dan konveksi, sedangkan secara *insensible heat loss* adalah hilangnya panas tubuh melalui proses panting. Pada suhu pemeliharaan 23oC, 75% panas tubuh dibuang secara *sensible*, selebihnya (25%) dikeluarkan secara *insensible*, sebaliknya bila suhu lingkungan meningkat sampai 35oC sebanyak 75% panas tubuh dibuang melalui proses *insensible* dan sisanya sebanyak 25% dibuang secara *sensible*.

Bell and Weaver (2002) menerangkan bahwa meningkatnya kepadatan kandang akan menyebabkan berkurangnya konsumsi ransum, menurunnya pertumbuhan, menurunkan efisiensi pakan, meningkatkan mortalitas, dan meningkatkan kanibalisme. Ketidakseimbangan ini bisa disebabkan oleh variasi dari kombinasi faktor-faktor lingkungan (cahaya matahari, irradiasi thermal, suhu, kelembaban, dan kecepatan angin) dan karakteristik ternak (spesies, tingkat metabolisme, dan mekanisme thermoregulasi).

## **4.2. Pengaruh Cekaman Panas terhadap Broiler**

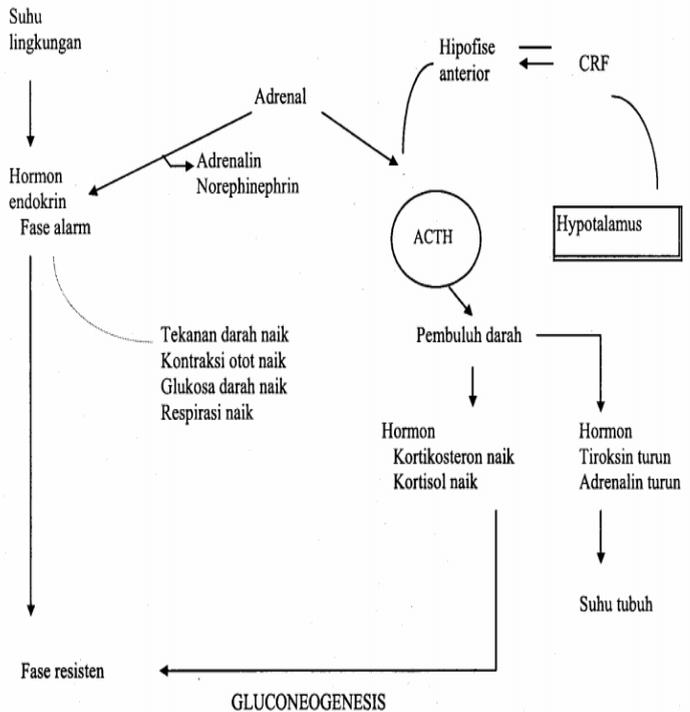
### **4.2.1 Aktivitas Hormonal**

Panas tubuh unggas berasal dari metabolisme dalam tubuh, termasuk panas yang dihasilkan dari hidup pokok, pertumbuhan, dan produksi telur. Produksi panas tubuh dipengaruhi oleh ukuran tubuh, spesies, bangsa, level produksi, jumlah konsumsi pakan, kualitas pakan, serta aktivitas.



Gambar 12. Jalur aktivasi hipotalamus-hipofisa-adrenal korteks pada keadaan menderita cekaman panas dan dampak utama yang ditimbulkannya serta jalur ekskresi, metabolise, dan ekskresi hormon kortisol (*Sumber; Most and Palme, 2002; Boonstra, 2005*)

Ayam yang mengalami cekaman panas menyebabkan peningkatan sekresi hormon stres, seperti glukokortikoid yang terlihat pada Gambar 12 (Gupta and Lalchandama, 2002). Fungsi tiroid terhambat selama stres, yang mengaktifkan sumbu hipotalamus-hipofisis-adrenal (HPA) dengan efek inhibisi konversi perifer tiroksin yang relatif tidak aktif terhadap triiodothyronine aktif secara biologis. Akibatnya, tingkat hormon pelepas kortikotropin (CRH), ACTH, dan glukokortikoid meningkat; hormon perangsang tiroid (TSH) menurun.



Gambar 13. Pengaruh suhu lingkungan tinggi terhadap aktivitas hormonal tubuh ayam. (Sumber: Guyton, 1976)

Ini sejalan dengan penjelasan Most and Palme (2002) bahwa respon utama tubuh terhadap cekaman panas adalah pembentukan *corticotrophin relasing hormone* (CRH) dan CRH akan menstimulasi pembentukan *adrenocorticotrophic hormone* (ACTH) pada hipofisa dan ACTH ini menginduksi pembentukan glukokortikoid (kortikosteron dan kortisol) pada kelenjar adrenal. Pelepasan glukokortikoid menimbulkan berbagai efek terhadap metabolisme normal tubuh, seperti gangguan sistem sekresi hormon, pertahanan (imunitas) tubuh, pertumbuhan, dan aktivitas reproduksi.

Peranan utama kortikosteron dan kortisol terdapat pada peristiwa glukoneogenesis yaitu perombakan (katabolisme) dari non karbohidrat sebagai usaha penyediaan glukosa darah, sehingga terjadi penurunan pertumbuhan. Pengaruh suhu lingkungan tinggi terhadap tubuh ayam dapat dilihat pada Gambar 13.

#### 4.2.2 Aktivitas Organ Penyerapan

Usus adalah organ utama penyerapan nutrisi dan berperan penting dalam pemeliharaan kehidupan. Mukosa usus sebagai lokasi utama penyerapan dan transportasi nutrisi memainkan peran penting dalam pertumbuhan dan perkembangan. Oliver, *et al.*, (2012) menyatakan bahwa cekaman panas dapat menyebabkan peningkatan permeabilitas usus dan kerusakan pada epitel. Status mukosa usus yang sangat baik adalah basis fisiologis untuk serapan hara dan pertumbuhan normal hewan. Cekaman panas dapat menyebabkan serangkaian perubahan patologis berupa rusaknya sel epitel, edema laminal, dan fraktur vili usus pada mukosa duodenum, jejunum dan ileum pada ayam (Chen, *et al.*, 2013). Selain itu, ada bukti yang muncul bahwa luka usus akut akan menyebabkan pelepasan enzim pencernaan ke dalam submukosa dari daerah atas usus halus dan menyebabkan reaksi inflamasi akut (Schmid and Chang, 2014).

Kerentanan mukosa usus terhadap cekaman panas disebabkan oleh konsentrasi *non-protein thiol group* yang tinggi pada mukosa usus. Di bawah cekaman panas, pelepasan kortisol dan katekol dapat menghasilkan sejumlah besar radikal oksigen aktif yang mampu bekerja dengan kelompok thiol untuk menghasilkan denaturasi protein dan inaktivasi enzim sehingga menghancurkan sistem antioksidan enzimatis dan non-enzimatis di dalam tubuh dan bahkan memperburuk stres oksidatif (Yadav and Korde, 2011). Selain itu, oksigen dari radikal bebas juga dapat mengikat asam lemak tak jenuh di membran untuk menginduksi lipidperoksidasi (Li, *et al.*, 2011). Oleh karena itu, fungsi antioksidan pada mukosa usus yang terkena cekaman panas penting untuk memastikan fungsi fisiologis dari saluran usus berjalan normal. Feng, *et al.*, (2012) menunjukkan bahwa suhu tinggi dapat secara signifikan mengurangi aktivitas amilase pada saluran usus broiler. Hal ini disebabkan oleh penurunan alkaline phosphatase secara signifikan (Hu, *et al.*, 2009).

#### 4.2.3 Performa Ternak

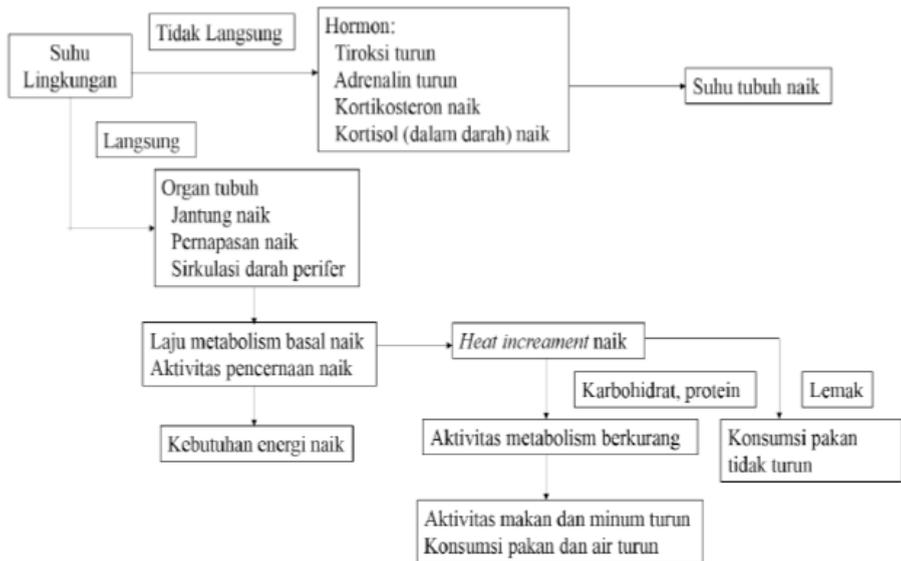
Ayam kurang toleran terhadap perubahan suhu lingkungan sehingga sulit untuk beradaptasi dengan perubahan suhu lingkungan, terutama ketika ayam telah berumur tiga minggu. Suhu lingkungan yang tinggi dapat memberikan dampak negatif pada kondisi fisiologis dan produktivitas ayam.

Pertambahan suhu tubuh akan meningkatkan frekuensi pernapasan serta perubahan tingkah laku pada ternak. Peningkatan frekuensi pernapasan pada ternak unggas atau painting akan terjadi yang disebabkan oleh unggas tidak mempunyai cukup kelenjar keringat untuk membuang panas melalui penguapan. Konsekuensi dari *panting* adalah banyaknya energi yang terbuang. Selain itu, unggas yang mengalami cekaman panas akan mengurangi jumlah konsumsi pakan. Hal ini disebabkan oleh *heat increament* yang dihasilkan sangat mengganggu dan menimbulkan rasa lesu yang pada akhirnya mundurnya nafsu makan unggas. *Heat increament* sebagai akibat pencernaan makanan dan metabolisme zat-zat makanan akan menimbulkan beban panas bagi ayam dan akhirnya aktivitas metabolisme menjadi berkurang. Berkurangnya aktivitas metabolisme karena suhu lingkungan yang tinggi dapat dilihat manifestasinya berupa menurunnya aktivitas makan dan minum (Gunawan dan Sihombing, 2004). Krogh (2000) menyatakan bahwa salah satu faktor yang mempengaruhi konsumsi pakan adalah suhu lingkungan. Suhu ruangan di bawah *thermoneutral* menyebabkan konsumsi pakan pada ayam meningkat, sedangkan suhu ruangan di atas kisaran *thermoneutral* menyebabkan terjadinya penurunan konsumsi pakan. Penurunan konsumsi pakan juga disebabkan oleh meningkatnya konsumsi air minum yang digunakan untuk mempertahankan suhu tubuh terhadap suhu lingkungan yang panas (Gunawan, 2004).

Ayam dapat menggunakan pakan lebih efisien pada kisaran suhu optimum, karena tidak perlu mengeluarkan energi untuk mengatasi suhu lingkungan yang tidak normal. Dagher (1995) menyatakan bahwa suhu lingkungan tinggi merupakan salah satu faktor penghambat produktivitas ayam karena secara langsung hal tersebut mengakibatkan turunnya konsumsi pakan sehingga terjadi defisiensi zat-zat makanan. Suhu lingkungan yang tinggi menekan aktivitas enzim di saluran pencernaan (Gambar 11). Pada suhu lingkungan tinggi, ayam menjaga suhu tubuhnya dengan cara menyeimbangkan produksi panas dengan hilangnya panas, menggunakan bantuan alat-alat fisik, dan mengubah-ubah sifat insulatif bulu.

Cekaman panas merupakan penyebab utama terganggunya proses produksi dan reproduksi ternak. Pada suhu lingkungan tinggi, diperlukan energi yang lebih banyak untuk pengaturan suhu tubuh, sehingga dapat mengurangi penyediaan energi untuk produksi ternak. Pada suhu lingkungan yang tinggi, konsumsi pakan menurun. Hal ini berarti asupan nutrisi ke dalam tubuh berkurang dan akhirnya

akan menurunkan produksi. Hal ini karena kebutuhan hidup pokok lebih dahulu dipenuhi. Beberapa peneliti telah melaporkan bahwa aktivitas enzim dalam penurunan kanal pencernaan untuk unggas dalam tekanan panas. Pengaruh suhu lingkungan terhadap aktivitas metabolisme tubuh ayam dapat dilihat pada Gambar 14.



Gambar 14. Pengaruh suhu lingkungan terhadap aktivitas metabolisme tubuh ayam. (Sumber: Fuller and Rendon, 1977).

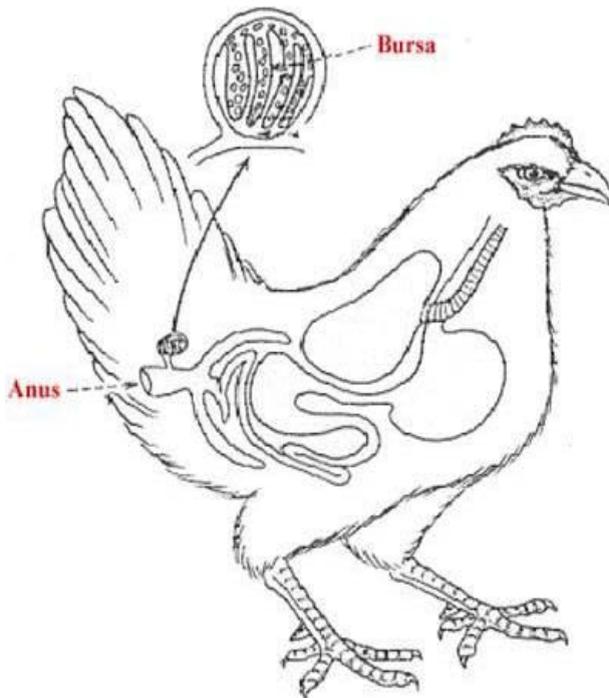
#### 4.2.4 Organ

Bursa fabricius merupakan organ limfoid primer yang menjadi salah satu ciri khas pada unggas yang menghasilkan antibodi. Terbentuk dari pertemuan ektoendodermal sebagai struktur berbentuk bulat, seperti kantong tepat di bagian dorsal kloaka (Tizard, 1987). Perkembangan bursa fabricius sangat baik pada usia muda dan mencapai ukuran maksimum antara umur 4-12 minggu. Bursa fabricius akan mengalami atrofi atau penyusutan volume pada saat unggas dewasa. Umumnya, ayam mengalami regresi bursa dengan cepat setelah 20-24 minggu. Invulusi bursa fabricius dimulai pada umur 14 minggu hingga 5 bulan (Riddle, 1987). Kecepatan tumbuh dan regresi bursa fabricius dipengaruhi oleh tipe, galur, kondisi ayam, dan hormone seks. Sementara itu, kecepatan tumbuh dan besar bursa pada anak ayam berhubungan dengan resistensi terhadap penyakit (Glick, 2000).

Semakin sering bursa fabricius membentuk antibodi maka akan menyebabkan deplesi dan pengecilan folikel limfoid sehingga berat relatif bursa menurun (Tizard, 1987).

Anak ayam yang baru menetas memiliki antibodi yang berasal dari induknya dan akan bertahan hingga beberapa hari setelah menetas. Bursa fabricius terletak di bagian dorsal kloaka (Hassan, *et al.*, 2011) (Gambar 12), terlihat sebagai rangkaian lipatan seperti daun yang disebut dengan plica yang terdiri dari plica besar dan plica kecil. Lipatan-lipatan ini dikelilingi oleh *pseudostratified epithelium*. Folikel limfoid, jaringan ikat, dan pembuluh darah merupakan bagian penyusun dari organ ini. Folikel limfoid terdiri atas korteks dan medulla yang jika diwarnai dengan hematoksilin eosin, bagian korteksnya mengambil warna lebih banyak dari medulla. Korteks terdiri atas sel limfosit, sel plasma, dan makrofag, sedangkan medulla hanya terdiri dari sel limfosit saja. Bursa fabricius mengontrol perkembangan dari sel plasma dan *germinal center* dari limpa dan limfonodus (Aughey and Frye, 2001). Hassan, *et al.*, (2011) menjelaskan bahwa bursa fabricius menghasilkan limfosit B yang disalurkan ke organ limfoid sekunder seperti limpa.

Bursa fabricius sangat rentan terhadap berbagai penyakit yang dapat menurunkan fungsi kekebalan tubuh sehingga bisa terjadi immunosupresi. Immunosupresi dapat disebabkan oleh agen infeksi, keseimbangan makan yang tidak tepat (defisiensi), kurangnya biosekuriti, kegagalan manajemen (stres), atau kombinasinya. Masing-masing penyebab harus ditangani secara serius untuk mencegah konsekuensi penekanan kekebalan terhadap profitabilitas. Selama perkembangan embrionik, limfosit B dan T yang belum sempurna masing-masing hadir di bursa dan timus. Selama minggu ketiga embrionasi, sel B dan T bermigrasi dari bursa dan timus ke sistem limfoid perifer, termasuk limpa dan sumsum tulang. Agregat sel limfoid mulai dijajah pada saat menetas.



Gambar 15. Bursa fabricius pada ayam

Pencegahan imunosupresi dilakukann dengan meningkatkan jumlah limfosit B dengan menambahkan suatu imunomodulator. Menurut Villegas dan Hosokawa (2004), imunomodulator merupakan suatu zat kimia, obat, atau aksi dari suatu sistem imun yang dapat meningkatkan sistem kekebalan tubuh dan mencegah terjadinya infeksi agen asing penyebab peradangan, baik agen infeksius maupun agen noninfeksius. Sebagai imunomodulator, suatu zat atau bahan kimia tertentu tidak langsung bekerja pada agen penyebab suatu peradangan, namun zat ini hanya bekerja merangsang sistem kekebalan untuk menghasilkan antibodi dalam jumlah yang lebih banyak untuk melawan agen penyakit tersebut (Kumala, *et al.*, 2013) Imunomodulator tidak hanya berasal dari obat-obatan berbahan dasar kimia, namun sistem kekebalan juga bisa ditingkatkan dengan menggunakan bahan-bahan yang bersifat alami yang diekstrak dalam bentuk yang lebih modern dengan penambahan zat-zat lainnya yang tidak berbahaya bagi yang mengkonsumsinya.

#### 4.2.5 Sifat Fisik Daging Ayam

Daging ayam merupakan salah satu bahan pangan penyumbang protein hewani yang banyak digemari masyarakat. Penyediaan kebutuhan daging ayam harus melihat kuantitas produksi serta kualitas kesehatan produk. Daging yang sehat adalah daging yang berasal dari hewan yang sehat, disembelih di tempat pemotongan resmi, diperiksa, diangkut dengan kendaraan khusus, dan dijual di tempat yang bersih.

Setelah hewan dipotong, sirkulasi darah terhenti sehingga fungsi darah sebagai pembawa oksigen juga berhenti. Hal ini mengakibatkan berhentinya respirasi dan berlangsung proses glikolisis anaerob. Penanganan daging ayam sangat perlu dilakukan sedini mungkin setelah ayam dipotong untuk mencegah terjadinya penurunan kualitas daging sehingga dapat memperpendek masa simpan, perubahan fisik (warna dan bau), perubahan cita rasa yang berujung pada gangguan kesehatan bagi konsumen. Proses kontraksi menyebabkan jaringan otot menjadi karkas dan kaku sedangkan proses relaksasi menyebabkan jaringan otot menjadi lunak dan empuk. Fase yang dialami jaringan otot hewan setelah dipotong (fase postmortem) adalah i) pre-rigor; ii) rigormortis dan iii) pasca rigormortis (Forrest, *et al.*, 1975).

Suradi, (2006) menjelaskan pada fase prerigor, daging memiliki karakteristik yang lentur dan lunak karena daya ikat air dan jaringan otot masih tinggi. Pada fase rigormortis, jaringan otot menjadi kaku yang disebabkan oleh bersatunya aktin dan miosin membentuk aktomiosin. Fase pasca rigormortis adalah fase pembentukan aroma dan pada fase ini daging menjadi lunak kembali, karena daya ikat air kembali meningkat sehingga daging menjadi empuk.

Rigormortis adalah ketika unggas dipotong dan otot mulai berkontraksi. Terjadinya pengeluaran darah menyebabkan sel otot akan menggunakan dan menghasilkan ATP selama cadangan glikogen masih tersedia. Habisnya suplai menyebabkan penyediaan oksigen ke otak berhenti. Yang terjadi hanya metabolisme anaerobik dan akan menghasilkan asam laktat dalam otot. Konsentrasi ATP dalam otot terus menerus menurun sampai benar-benar habis. Penurunan ATP ini menyebabkan terbentuknya ikatan aktomiosin sehingga otot menjadi kaku. Setelah perkembangan rigor, ATP masih terdapat dalam otot dan dengan menurunnya nilai pH, kerja ATP-ase dihambat, hidrolisis ATP dicegah, dan melepaskan ikatan aktomiosin (Lawrie, 1996).

Selain penanganan pasca-postmortem, perawatan pra-postmortem (sebelum penyembelihan) juga akan mempengaruhi sifat daging ayam. Penanganan pra-postmortem yang mempengaruhi hasil akhir daging antara lain kondisi fisik ternak, stres, dan kesehatannya. Daging ayam mudah mengalami penurunan kualitas sebagai akibat dari adanya perlakuan yang kurang baik pada saat ayam masih hidup, pada saat penanganan atau pada saat penyimpanan yang kurang sempurna (Sams, 2001). Warris (2000) menjelaskan bahwa penanganan sebelum postmortem dapat mempengaruhi kualitas daging ayam karena dapat mempengaruhi keasaman atau perkembangan waktu rigor. Dijelaskan lebih lanjut bahwa daging dada termasuk daging yang *pale, soft* dan *exudative* (PSE). Daging PSE mempunyai glikolisis anaerob yang tinggi selama pemotongan, glikolisis yang tinggi akan mengakibatkan penurunan pH yang cepat.

pH ultimat daging PSE pada umumnya rendah yaitu sekitar 5,2–5,4. Sedangkan pH daging menurut pendapat Van, *et al.*, (2000), yaitu 5,96–6,07. Hasil penelitian Duna, *et al.*, (1993) mendapatkan bahwa rata-rata pH awal otot dada broiler adalah 7,09 kemudian menurun menjadi 5,94 yaitu pada enam jam pasca penyembelihan. Selanjutnya Suradi (2006) melalui penelitiannya mendapatkan pH daging broiler pada 0 jam pemotongan adalah 6,31. Jaringan otot hewan pada saat masih hidup mempunyai pH pada kisaran 7,2 sampai 7,4, dan akan menurun setelah pemotongan (Buckle, *et al.*, 1987; Foegeding, *et al.*, 1996), karena mengalami glikolisis dan dihasilkan asam laktat yang akan mempengaruhi pH (Forrest, *et al.*, 1975; Lawrie, 1996). pada pH akhir yang tinggi dapat menyebabkan daging berwarna gelap dan permukaan daging menjadi sangat kering karena cairan daging terikat secara erat dengan protein (Lawrie, 1996; Foegeding, *et al.*, 1996), sedangkan pH rendah akan menghasilkan warna merah muda yang cerah pada daging disukai konsumen, palatabilitas yang baik dan tahan terhadap kerusakan akibat mikroorganisme. Sedangkan pH tinggi menyebabkan sebaliknya, daging berwarna gelap dan permukaan potongan daging menjadi sangat kering karena cairan daging terikat sehingga erat oleh protein (Buckle, *et al.*, 1987). Pada daging sapi, laktat dapat menstabilkan atau meminimalisir perubahan warna permukaan daging sapi segar dengan mereduksi pigmen warna gelap (Lawrence, *et al.*, 2004)

Proses asidifikasi daging pascamerta akan mengalami kegagalan oleh dua faktor (Gregory and Grandin, 1998). *Pertama*, stres yang dialami ternak sebelum pemotongan akan mengakibatkan habisnya

glikogen otot, sehingga dapat membatasi glikolisis pascamerta dan pembentukan asam laktat. *Kedua*, tidak semua otot mengalami ekstensivitas asidifikasi yang sama.

Selain pH, warna daging merupakan salah satu sifat dari sensoris daging yang utama. Warna daging unggas berbeda tergantung umur, jenis kelamin, bangsa, lingkungan kandang, lingkungan pemotongan, kondisi sebelum pemotongan, kondisi pemotongan dan penyimpanan, lemak intramuskular, kandungan air daging, pakan yang diberikan (Woelfel, *et al.*, 2002), stres (tingkat aktivitas dan tipe otot), oksigen (Soeparno, 2005), dan pH daging (Fletcher, 1999; Qiao, *et al.*, 2001). Faktor lain yang mempengaruhi warna daging adalah mioglobin (Tam, *et al.*, 1998; Soeparno, 2005; Fanatico, *et al.*, 2007), hemoglobin (Chartrin, *et al.*, 2006), dan pigmen heme (Ngoka and Froning, 1982). Soeparno (2011) menjabarkan faktor-faktor yang mempengaruhi warna daging antara lain jumlah myoglobin, status kimia hemoglobin, aktivitas reduksi metmioglobin, pakan ternak khususnya vitamin E, aktivitas bakteri, dan prosesing termasuk *curing* daging.

Mioglobin merupakan protein yang terutama bertanggungjawab atas warna daging, namun secara umum memiliki peranan yang kecil dalam fungsionalis protein daging. Myoglobin merupakan suatu protein globular rantai tunggal dari 153 asam amino, mengandung suatu grup protetik heme (porfirinyang mengandung zat besi) dibagian pusat, dan dikelilingi oleh apoprotein (prosi nonprotein yang disebut dengan cincin heme). Mioglobin mempunyai 8 alfa heliks dan satu pusat hidrofobik dan mempunyai berat moekul 16.700 dalton. Jumlah mioglobim berkisatr 80-90% dari total pigmen otot. Mioglobin merupakan pigmen pembawa oksigen dalam jaringan otot (Stryer, 2000; Ordway and Garry, 2004). Struktur mioglobin mirip dengan struktur hemoglobin, tetapi molekul mioglobin lebih kira-kira  $\frac{1}{4}$  dari molekul hemoglobin.

Konsentrasi mioglobin akan menyebabkan jenis otot merah atau otot putih. Jumlah mioglobin bervariasi tergantung pada umur dalam spesies, spesies, tipe otot, aktivitas otot, jumlah suplai darah, availabilitas oksigen, dan jenis kelamin ternak (Soeparno, dkk. 2001). Ternak jantan mempunyai otot-otot dengan kandungan mioglobin yang lebih tinggi daripada ternak betina atau ternak kartrasi. Pada ayam, jumlah mioglobin terlihat nyata berbeda antara pada daging dada yang berwarna putih terang dan otot paha yang merah gelap. Daging sapi dan *lamb* atau *mutton* mengandung lebih banyak

mioglobin yang lebih banyak dari daging babi, veal (sapi umur 2-14 minggu), ikan dan unggas. Otot yang berwarna gelap, mengandung proporsi serabut-serabut merah yang tinggi dan kaya akan mioglobin (Judge *et al.*, 1989). Kandungan mioglobin otot tipe aktif (lokomotif) umumnya lebih tinggi dibandingkan otot tipe pasif (pendukung).

Kemampuan mioglobin berikatan dengan molekul-molekul termasuk oksigen tergantung pada pada satu kimi Fe di dalam cincin *heme*. Bila Fe dioksidasi (status feri ionic= Fe<sup>+++</sup>) maka tidak dapat berkombinasi dengan molekul lain termasuk oksigen. Bila Fe direduksi (status fero kovalen= Fe<sup>++</sup>) maka dapat berkombinasi dengan air daging atau dengan oksigen. Oksigen molekular bereaksi dengan Fe reduksi dari mioglobin dan menghasilkan warna merah terang daging segar yang diinginkan. Kondisi reduksi dapat terjadi secara alami, karena adanya aktivitas enzim yang menggunakan semua sisa oksigen didalam otot setelah kematian. Oleh karena itu, pigmen daging bagian dalam mempunyai bentuk reduksi, dan hanya bereaksi dengan air daging (Lawrie, 1996).

Bila pH akhir daging tinggi maka aktifitas (bertahan) enzim-enzim sitrokrom akan lebih besar (Lawrie, 1996). Protein-protein urat daging memiliki isoelektri-poin yang tinggi, maka banyak air dalam urat daging masih berasosiasi dengan protein-protein tersebut dan serat-serat akan kuat dibungkus bersama, ini merupakan halangan untuk proses difusi. Hal ini mengakibatkan lapisan oksimioglobin yang merah cerah secara perlahan menjadi sedikit dan terlihat tidak menjadi menyenangkan, warna merah-purple dari myoglobin akan menonjol sedemikian rupa sehingga daging akan terlihat gelap (Lawrie, 2003).



## **BAB V**

### **PERAN GABA DALAM MENGATASI STRESS**

GABA yang diperoleh dari luar tubuh akan mengalami proses penyerapan dalam organ pencernaan. Mekanisme obat dikenal dengan ADME (absorbs, distribusi, metabolisme dan eliminasi/ekskresi) (Gitawati, 2008). Obat yang dikonsumsi akan terlarut dalam lambung dan kontak dengan cairan lambung. Hal ini akan menyebabkan zat bioaktif obat akan terlepas dari zat pembawa atau zat tambahan yang selanjutnya akan diserap dalam usus. Setelah diserap zat bioaktif akan didistribusikan atau dibawa ke hati untuk dimetabolisme. Di dalam hati zat bioaktif akan berikatan dengan reseptornya masing-masing untuk dapat bereaksi dan memberikan efek. Selanjutnya pada proses terakhir akan terjadi eliminasi atau ekskresi pada zat aktif yang tidak dibutuhkan oleh tubuh. Pada GABA, penyerapan dalam usus melibatkan jalur transselular yang dimediasi melalui protein pembawa yang biasa terlibat dalam penyerapan nutrisi (Thwaites, *et al.*, 2000). Studi menggunakan usus tikus menunjukkan bahwa GABA berbagi transporter dengan  $\beta$ -alanin (Nacher, *et al.*, 1994a) yang memiliki karakteristik transportasi yang serupa dengan pembawa imino (Munck, *et al.*, 1994). Selain itu, baclofen (agonis reseptor GABAB) diyakini berbagi transporter usus dengan GABA dan  $\beta$ -alanin (Nacher, *et al.*, 1994b). Penelitian sebelumnya telah mengidentifikasi H<sup>+</sup>/transport asam amino pada membran apikal sel Caco-2 usus manusia yang memiliki spesifisitas substrat yang sama dengan pembawa imino tikus (Munck, *et al.*, 1994; Thwaites, *et al.*, 1995; Thwaites and Stevens, 1999).

Kondisi stres panas biasanya dianggap sebagai dampak dari temperatur lingkungan dan kelembaban. Pada temperatur tinggi, pendinginan evaporatif adalah mekanisme yang paling penting dari kontrol suhu tubuh. Pada unggas, kontrol ini melibatkan kulit dan mekanisme pernapasan-penguapan. Pendinginan suhu tubuh melalui evaporasi atau penguapan dipengaruhi oleh permukaan tubuh dan kepadatan uap air udara atau kelembaban (RH).

Mekanisme pernapasan evaporatif dapat menyebabkan alkalosis pernapasan yang merupakan hasil dari hiperventilasi akibat terengah-engah (*panting*) sehingga dapat mengurangi tingkat pertumbuhan pada ayam. Pada suhu lingkungan yang tinggi, penghilangan panas

dengan evaporatif terhambat oleh kelembaban tinggi. Salah satu faktor yang dipengaruhi oleh temperatur lingkungan dan mempengaruhi konsumsi serta berat badan adalah hormon triiodothyronine (T3). Konsentrasi plasma T3 berbanding terbalik dengan temperatur lingkungan.

GABA membantu mengatur sel saraf dan memiliki efek menenangkan pada kecemasan (Li, *et al.*, 2015). GABA mencegah kecemasan dengan cara menghambat impuls saraf yang terkait dengan kecemasan mulai dari pusat motorik otak (Abdou, *et al.*, 2006). Sebagian besar fungsi GABA adalah tindakan penghambatan di sistem saraf pusat dan paripheral serta dalam pengolahan informasi nociceptive (Dai, *et al.*, 2011). Penelitian yang dilakukan pada hewan menunjukkan bahwa penurunan kadar GABA di otak dikaitkan dengan kecemasan seperti perubahan perilaku, sedangkan peningkatan kadar GABA dapat menurunkan kecemasan. Hipotalamus-hipofisis-hiperaktivitas adrenal dan sensitivitas obat antidepresan yang mengingatkan pada bentuk depresi melankolis dapat disebabkan oleh defisit reseptor GABA (Shen, *et al.*, 2010). Aktivitas dasar syaraf ditentukan oleh aktivitas seimbang dua sistem, sistem *glutamat excitatory* dan sistem GABA inhibitor di CNS. Alat penghambat neurotransmitter GABA memberikan aksinya toksin akibat processing melalui reseptor GABA. Berdasarkan farmakologi, reseptor GABA diklasifikasikan ke dalam saluran ion GABAA dan reseptor GABAB. GABA yang dilepaskan oleh neuron mengaktifkan saluran ion GABA-A dan reseptor GABA-B dalam membrane plasma. Aktifasi saluran dan reseptor umumnya menghasilkan penurunan rangsangan neuron (Jin, *et al.*, 2011).

Reseptor GABA A adalah saluran ion yang dibuka oleh GABA dan muscimol agonis selektif. Antagonis kompetitif bicucullin dan SR-95531 yang mengikat ke situs pengikatan GABA menghasilkan penurunan arus saluran GABA A. Picrotoxin adalah pemblokir non-kompetitif, menghalangi pori-pori saluran GABA A. Barbiturat dan benzodiazepin meningkatkan aktivitas saluran GABA A (Macdonal and Olsen, 1994; Olsen and Sieghart, 2008). Saluran ion GABA-A adalah saluran pentameric chloride dan biasanya mengandung tiga jenis subunit:  $2\alpha$ s,  $2\beta$ s, dan  $\rho$  (Olsen and Sieghart 2009). Ada pengecualian dalam farmakologi saluran GABAA yang mengandung subunit  $\rho$  (1-3). Subunit  $\rho$  (1-3) dapat membentuk saluran hemomerik dan juga heteromorik (Johnston, 2005). Semua neuron memiliki saluran ion GABA-A tetapi subtype yang diekspresikan dalam

perubahan neuron selama perkembangan dan d bervariasi antara daerah otak dan berbagai jenis neuron (Laurie, *et al.*, 1992; Wisden, *et al.*, 1992). Saluran-saluran tersebut berada di sinapsis, saluran ini menghasilkan arus fasik atau di luar sinaps di mana mereka disebut saluran ekstrasinaptik dan menghasilkan arus tonik (Birbir dan Korpi 2007). Saluran GABA A memodulasi obat, biasanya digunakan untuk mengobati gangguan kecemasan, insomnia, epilepsi, perilaku agresif, dan digunakan untuk induksi anestesi. Obat yang menargetkan saluran GABA A digunakan untuk mengobati gangguan seperti sindrom angelas, gangguan kecemasan, autisme, depresi, mania, sindrom premenstrual, skizofrenia dan gangguan tidur. Reseptor GABA B adalah *G-protein-couple* receptor yang terdiri dari dua subunit, GABA-B1 dan GABA-B2 (Marshall, *et al.*, 1999). Reseptor GABA B diaktif oleh GABA dan agonis selektif (baclefon). Ini digabungkan ke mekanisme efektor seperti sistem adenilat siklase, kanal ion  $Ca^{2+}$  dan  $K^{+}$  oleh protein  $G_i/o$  (Bowery, *et al.*, 2002). Reseptor GABA B ada sebagai heterodimer dengan dua subunit transmembran tujuh yang berbeda yang terdiri dari reseptor fungsional.

GABA dilepaskan ke sinapsis dari terminal presinaptik neuron melalui depolarisasi yang tergantung pada  $Ca^{2+}$ . GABA diangkut dari sitosol ke dalam vesikula. Vesikula ini berlabuh pada membran plasma. Ketika terminal presinaptik terdepolarisasi oleh potensi aksi, saluran  $Ca^{2+}$  yang terbuka dan menghasilkan peningkatan kadar  $Ca^{2+}$  intraselular. Masuknya  $Ca^{2+}$  menyebabkan pelepasan GABA yang terdapat pada vesikula dengan membran plasma dan melepaskan GABA ke celah sinaptik (Tanaka, 1996).

Aktivasi limfosit menyebabkan peningkatan jumlah intraselular  $Ca^{2+}$  melalui rangkaian kejadian dari penyimpanan internal, dengan demikian menginduksi sekresi sitokin dan proliferasi sel (Smith and Koretzky, 2009). Telah diketahui dengan baik bahwa limfosit T memiliki beragam saluran  $K^{+}$  dan  $Ca^{2+}$  yang dilepaskan saluran  $Ca^{2+}$  (CRAC) (Panyi and Varga, 2004). Kalsium dilepaskan dari penyimpanan internal memicu aktivasi saluran CRAC yang ada di membran plasma. Kalsium memasuki sel melalui saluran ini dalam proses yang disebut *store-operated  $Ca^{2+}$  release-activated  $Ca^{2+}$  entry* (SOCE) (Oh and Rao, 2008). Peningkatan masuknya kalsium intraselular diyakini terjadi ketika saluran  $K^{+}$   $Ca^{2+}$  terbuka karena saluran  $K^{+}$  menyebabkan hiperpolarisasi membran dan dengan demikian meningkatkan kekuatan penggerak listrik pada  $Ca^{2+}$  memasuki sel (Chandy and Wulff, 2004).

Saluran GABA A yang dibuka oleh GABA akan menyebabkan depolarisasi sel karena konsentrasi Cl<sup>-</sup> intraseluler yang tinggi (Pilas and Durack, 1997) dan dengan demikian menurunkan masuknya kalsium (Tian and Lu, 2004). Oleh karena itu, konsentrasi Ca intraseluler tidak meningkat seiring dengan adanya saluran GABA A yang aktif dan ini mengakibatkan penurunan sekresi sitokin dan proliferasi sel. Oleh karena itu saluran GABA A pada autoreaktif limfosit T mungkin mengatur peradangan dan serangan penyakit T1D. Berbeda dengan sistem saraf pusat dan perifer, GABA dan GABA<sub>A</sub> juga hadir di beberapa jaringan non-neuron seperti pulau pankreas, saluran telur, hati, ginjal, kulit, spermatozoa dan sel darah dimana GABA dapat berpartisipasi dalam berbagai macam penyakit. Proses fisiologis Semua jaringan ini mengandung komponen sistem sinyal GABA (Erdo and Wolff, 1990). GABA reuptake dari sinapsis dimediasi oleh transporter GABA. Membutuhkan ion Na<sup>+</sup> dan ion Cl<sup>-</sup> ekstraseluler dan mampu melakukan pengangkutan dua arah. Pengangkut ini penting dalam kaitannya dengan penyesuaian neurotransmisi GABAergik dan untuk menghindari desensitisasi saluran GABA<sub>A</sub> (Schousbone and Waagepetersen, 2007).

Selain memiliki peran sebagai penghambat neurotransmitter utama dalam sistem saraf, GABA juga bertindak sebagai molekul imunomodulator pada sistem kekebalan tubuh. Dalam peran GABA tersebut terli hat adanya suatu sistem untuk menjaga keseimbangan aktivitas. Aktivasi reseptor sel T, sitokin dan neurotransmitter itu sendiri dapat mengatur ekspresi sistem sinyal neurotransmitter dalam sel T (Levite and Chowers, 2004). GABA menunjukkan aktivitas proliferasi sel anti-inflamasi dan fibroblast yang mempercepat proses penyembuhan luka kulit (Han, *et al.*, 2007) dan meningkatkan tingkat kelangsungan hidup fibroblast dermal saat terkena H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> sebagai agen stres oksidatif (Ito, *et al.*, 2007). Hasil ini menunjukkan bahwa GABA menunjukkan fungsinya dengan menurunkan produksi panas. Zhong, *et al.*, (2002) melakukan penelitian pada broiler dengan memberikan 0,05% GABA pada air serta memberikan *heat stress* 320C selama 1,5 jam perhari selama empat minggu. Hasil penelitian menunjukkan bahwa GABA mempengaruhi performa dan indeks fisiologis broiler tersebut, terjadi penurunan pernapasan yang signifikan, peningkatan eritrosit, penurunan rasio konversi pakan dan meningkatnya pertambahan bobot badan pada broiler tersebut. Glutamin dan GABA dapat menjadi nutrisi potensial yang dapat mencegah stress panas pada broiler sehingga bisa meningkatkan kualitas serta komposisi

kimia daging (Dai, *et al.*, 2011). Stres yang disebabkan oleh panas dapat mengurangi tingkat positif dan nilai rata-rata densitometric (kadar bahan aktif) dari reseptor GABAB dalam immunostaining, menunjukkan keterlambatan perkembangan reseptor GABAB (Wang, *et al.*, 2011; Xie, *et al.*, 2011).

Beberapa penelitian tentang GABA pada ternak juga menunjukkan hasil yang baik dalam mencegah terjadi stress akibat panas pada broiler (Dai, *et al.*, 2011, Dai, *et al.*, 2012), meningkatkan performa ayam petelur (Zhang, *et al.*, 2012a) itik (Zhigang, 2013), mengurangi kerusakan pada usus akibat aktifitas antioksidan (Zhong, *et al.*, 2013), menaikkan pertambahan bobot badan dan efisiensi pencernaan nutrisi pada babi (De-Wen, *et al.*, 2009, Li, *et al.*, 2015). Penelitian yang dilakukan oleh Zhang, *et al.*, (2012) menunjukkan aktifitas enzim amilase, lipase dan tripsin cenderung meningkat dengan pemberian GABA pada pakan.

### **5.1. Stres pada Broiler**

Dalam industri ayam pedaging komersil, salah satu faktor stres yang paling kritis adalah untuk memelihara broiler pada kepadatan kandang yang tinggi. Hal ini sangat berdampak pada kesejahteraan, kesehatan, dan produktivitas (yaitu, kinerja pertumbuhan atau kualitas karkas) ayam pedaging komersial (Simitzis *et al.*, 2012). Di laporkan bahwa peningkatan kepadatan kandang dapat menurunkan berat badan, perolehan dan asupan pakan (Dozier *et al.*, 2006), penurunan kualitas produk (Dozier *et al.*, 2005), masalah kaki yang diinduksi, misalnya, tibialis dyschondroplasia (Sanotra *et al.*, 2001) dan lesi kaki, yaitu kaki dermatitis (Dozier *et al.*, 2005), dan pada kasus yang parah timbul kematian (Imaeda, 2000). Selain itu, kepadatan kandang menyebabkan perubahan perilaku serta peningkatan indikator stres, misalnya rasio heterofil-tolimfosit (H:L) dan kortikosteron (Kuan *et al.*, 1990; Shakeri *et al.*, 2014) dan kerentanan terhadap penyakit, misalnya, penyakit tetelo dan enteritis nekrotik (Mustafa *et al.*, 2010; Tsiouris *et al.*, 2015).

GABA, umumnya dikenal sebagai aditif pakan yang aman, adalah asam amino non-protein empat karbon yang bertindak sebagai neurotransmitter penghambat utama dalam sistem saraf pusat hewan (Kinnersley dan Turano, 2000). Peran utamanya adalah untuk mengurangi rangsangan saraf di seluruh sistem saraf, akibatnya mengurangi intensitas stres (Kuffler dan Edwards, 1958). Selain jaringan saraf, kehadiran reseptor GABA di jaringan non-saraf

termasuk hati, pankreas dan ginjal menunjukkan bahwa GABA mungkin menunjukkan aktivitas di jaringan ini (Tillakaratne et al., 1995). Memang, GABA telah dikenal memiliki antidiabetik, antioksidan, dan kekebalan tubuh, sifat modulasi (Bhat et al., 2010; Kumar dan Goyal, 2008; Soltani dkk., 2011).

Karena aktivitas biologis yang dilaporkan dengan baik, GABA sebagai aditif pakan fungsional telah banyak digunakan dalam industri peternakan untuk meningkatkan kinerja pertumbuhan dan untuk mencegah tanda-tanda yang berhubungan dengan stres pada ternak (Zhang et al., 2012) dan pada ayam pedaging yang stres panas (Dai et al., 2011, 2012). Untuk sementara, disimpulkan bahwa GABA dalam pakan dianggap sebagai strategi nutrisi yang efektif untuk meminimalkan faktor yang diinduksi stres dan/atau untuk meningkatkan fungsi usus ayam.

### **5.1.1. Konsumsi Ransum**

Anggraini menemukan bahwa perlakuan K1 (kepadatan 8 ekor/m<sup>2</sup>) memiliki jumlah konsumsi ransum tertinggi. Konsumsi pakan berada dibawah nilai konsumsi pakan berdasarkan data tabel target performa strain MB 202, yaitu 4.777 gr (PT. Japfa Comfeed Indonesia). Hal ini disebabkan oleh perbedaan kepadatan pada tiap kandang. Pada perlakuan K1 kepadatan berada pada kisaran normal untuk pemeliharaan broiler, sedangkan pada perlakuan K2 dan K3 kepadatan kandang broiler sudah melebihi kepadatan normal. Hal ini sesuai dengan penjelasan Tamalluddin (2012) yang menyatakan bahwa pemeliharaan broiler untuk daerah tropis seperti Indonesia hanya berkisar 8-10 ekor/m<sup>2</sup>, serta Rasyaf (2009) yang menambahkan untuk dataran rendah atau pantai kepadatan yang baik berkisar 8-9 ekor/m<sup>2</sup>, sementara untuk dataran tinggi atau daerah pegunungan kepadatannya berkisar 11-12 ekor/m<sup>2</sup> dengan rata-rata 10 ekor/m<sup>2</sup>.

Penurunan konsumsi ransum seiring dengan terjadinya kenaikan kepadatan kandang, dijelaskan oleh Shanwany (1988), bahwa ketika kepadatan kandang meningkat, maka konsumsi pakan berkurang karena akses fisik ke tempat pakan dan air terhambat. Hal ini juga dijelaskan oleh Rasyaf (2009) bahwa melakukan pemeliharaan broiler melebihi jumlah yang dianjurkan tanpa mengetahui dasar-dasarnya akan menyebabkan konsumsi ransum jadi berkurang. Pemadatan broiler persatuan luas akan menyebabkan tempat makanan menjadi sempit dan mengurangi kesempatan broiler untuk makan. Semakin

tinggi tingkat kepadatan kandang maka akan terjadi kondisi berdesakan sehingga suhu tubuh ayam akan naik. Ayam tidak bisa mengeluarkan panas tubuhnya melalui permukaan kulit karena tidak memiliki kelenjar keringat.

Dalam situasi kepadatan tinggi, aliran udara pada tubuh broiler berkurang mengakibatkan berkurangnya aliran panas tubuh ke udara (Feddes, *et al.*, 2002). Puron, *et al.*, (1995) menjelaskan kepadatan tinggi berkontribusi pada penurunan kinerja, termasuk kualitas udara yang buruk karena pertukaran udara yang tidak memadai, peningkatan amonia, dan berkurangnya akses ke pakan dan air. Efek keseluruhan berupa penurunan tingkat pertumbuhan, efisiensi pakan, kemampuan hidup, dan dalam beberapa kasus, kualitas karkas (Puron, *et al.*, 1995). Suhu tubuh broiler yang tinggi menurut Dagher (1995) menjadi faktor penghambat produksi ayam karena secara langsung dapat mengakibatkan turunnya konsumsi pakan sehingga terjadi defisiensi zat-zat makanan. Hal ini disebabkan suhu tinggi akan merangsang saraf dan sistem hormonal mengeluarkan hormon tiroksin melalui tiroid yang menyebabkan penurunan nafsu makan (Mulyantini, 2011). Ayam yang mengalami cekaman panas menyebabkan peningkatan sekresi hormon stres, glukokortikoid (Gupta and Lalchandama, 2002). Fungsi tiroid terhambat selama stres, yang mengaktifkan sumbu hipotalamus-hipofisis-adrenal (HPA) dengan efek inhibisi konversi perifer tiroksin yang relatif tidak aktif terhadap triiodothyronine aktif secara biologis. Akibatnya, tingkat hormon pelepas kortikotropin (CRH), ACTH, dan glukokortikoid meningkat; hormon perangsang tiroid (TSH) menurun. Mench and Duncan (1998) menjelaskan bahwa selain faktor genetik, produktivitas broiler juga dipengaruhi oleh faktor lingkungan yang mendukung kapasitas genetik ternak karena faktor lingkungan berkaitan dengan kenyamanan. Ketidaknyamanan yang disebabkan lingkungan akan menyebabkan perubahan pada perilaku ternak seperti turunnya konsumsi pakan.

Rataan konsumsi pakan pada pemberian dosis GABA terlihat mengalami peningkatan seiring bertambahnya dosis. Hal ini disebabkan oleh GABA yang berfungsi sebagai anti-stres. Stres pada ayam telah dilaporkan menyebabkan penurunan tingkat reseptor GABA di otak ayam (Fluck, *et al.*, 1997) dan respons ini dalam kelenjar hipofisis mengurangi asupan pakan dan berat badan (Jonaidi, *et al.*, 2002). Dalam mekanismenya, GABA yang dilepaskan oleh neuron mengaktifkan saluran ion GABA-A dan reseptor GABA-B dalam membrane plasma. Aktivasi saluran dan reseptor umumnya menghasilkan penurunan

rangsangan neuron (Jin, *et al.*, 2011) sehingga rangsangan stres yang diterima tidak diteruskan oleh impuls saraf. Sebagai neurotransmitt penghambat, GABA banyak ditemukan di sistem saraf pusat dan jaringan perifer; dapat meningkatkan asupan makanan pada hewan, mengatur endokrin, autoimun, hormonal, dan fisiologi reproduksi, dan meningkatkan fungsi anti-hipoksia, dan anti-HS dalam hewan (Chen, *et al.*, 2001; Jonaidi, *et al.*, 2002; Chen, *et al.*, 2013; Chen, *et al.*, 2014). Park, *et al.*, (2016) mendapatkan adanya peningkatan konsumsi pakan broiler yang diberi GABA dibandingkan yang tidak diberi GABA.

### **5.1.2. Pertambahan Bobot Badan**

Anggraini 2020 melaporkan terlihat bahwa pada kepadatan normal, 8 ekor/m<sup>2</sup> (K1), PBB broiler tidak memiliki perbedaan yang nyata ( $P>0,05$ ) antara yang diberi dan tidak diberi GABA. Pada kepadatan 12 ekor/m<sup>2</sup>, terlihat terjadi peningkatan PBB broiler saat diberi GABA, broiler tanpa pemberian GABA menunjukkan perbedaan yang sangat nyata ( $P<0,01$ ) pada PBB dibandingkan yang diberi GABA. Ketika kepadatan kandang ditingkatkan menjadi 16 ekor/m<sup>2</sup>, terlihat bahwa pemberian GABA 0,005% tidak mempengaruhi PBB. Pengaruh pemberian GABA terhadap PBB pada pemeliharaan 16 ekor/m<sup>2</sup> terlihat pada pemberian 0,01% GABA.

Terjadi penurunan PBB seiring dengan meningkatnya kepadatan kandang. Hal ini disebabkan ketika broiler dipelihara pada kepadatan yang tinggi akan menyebabkan broiler sulit dalam mengeluarkan panas tubuh sehingga akan terjadi stres panas akibat panas yang tidak dikeluarkan. Dijelaskan oleh Feddes, *et al.*, (2002) bahwa dalam situasi kepadatan tinggi, aliran udara pada tubuh broiler berkurang dan mengakibatkan berkurangnya aliran panas tubuh ke udara. Ketika suhu tubuh broiler meningkat, akan terjadi penurunan konsumsi ransum dan pertambahan berat badan yang disebabkan oleh fakta bahwa stres termal mengaktifkan poros hipofisis-adrenal hipotalamus (HPA) yang mengeluarkan hormon adrenal (Khan, *et al.*, 2011; Khan, *et al.*, 2012). Fungsi tiroid terhambat selama stres, yang mengaktifkan sumbu hipotalamus-hipofisis-adrenal (HPA) dengan efek inhibisi konversi perifer tiroksin Akibatnya, tingkat hormon pelepas kortikotropin (CRH), ACTH, dan glukokortikoid meningkat; hormon perangsang tiroid (TSH) menurun. (Most and Palme, 2002).

Hormon adrenal meningkatkan katabolisme lemak tubuh, glikogen, dan protein, akibatnya asupan pakan dan kenaikan berat badan

menurun. Selain itu Park *et al.*, (2016) menambahkan bahwa ketika suhu tubuh ternak meningkat dan tingkat pernapasan juga meningkat memicu penurunan asupan pakan dan peningkatan konsumsi air yang pada akhirnya menghasilkan penurunan tingkat kenaikan berat badan, tingkat reproduksi, kekebalan, dan penurunan produktivitas secara keseluruhan. Hal ini sejalan dengan penjelasan Puroh, *et al.*, (1995) bahwa faktor-faktor lain yang terkait dengan kepadatan tinggi yang dapat berkontribusi pada penurunan kinerja, termasuk kualitas udara yang buruk karena pertukaran udara yang tidak memadai, peningkatan amonia, dan berkurangnya akses ke pakan dan air. Efek keseluruhan berupa penurunan tingkat pertumbuhan, efisiensi pakan, kemampuan hidup serta kualitas karkas.

Penurunan PBB seiring dengan meningkatkan kepadatan ini juga disebabkan terjadi penurunan konsumsi ransum pada broiler (lihat Tabel 10). Fadilah (2007) menyatakan bahwa konsumsi pakan merupakan salah satu yang mempengaruhi besar kecilnya pertambahan bobot badan broiler karena kebutuhan zat nutrisi akan terpenuhi melalui konsumsi sehingga konsumsi pakan memiliki korelasi positif dengan pertambahan bobot badan.

PBB broiler tanpa pemberian GABA pada kepadatan yang berbeda terlihat berbeda sangat nyata ( $P < 0,01$ ). PBB mengalami penurunan seiring meningkatkannya kepadatan kandang. Saat GABA diberikan sebanyak 0,05%, PBB broiler masih mengalami penurunan seiring dengan peningkatan kepadatan kandang. Pemberian 0,01% GABA terlihat dapat mengurangi stres broiler yang dipelihara hingga kepadatan 12 ekor/m<sup>2</sup>, namun pada kepadatan 16 ekor/m<sup>2</sup> terjadi penurunan PBB broiler.

Peningkatan PBB dengan pemberian GABA disebabkan oleh kemampuan GABA menekan stimulasi stres pada saraf. GABA adalah inhibitor neurotransmitter penghambat utama dan agen obat penenang dalam sistem saraf pusat yang menyebabkan penghambatan sistem saraf simpatis dan merangsang sistem parasimpatis untuk memulai mendorong nafsu makan dan pada akhirnya meningkatkan asupan pakan (Jonaidi and Noori, 2012). Terjadi peningkatan PBB seiring dengan penambahan jumlah pemberian GABA. GABA mengatur pusat asupan pakan, mempromosikan sekresi asam lambung, menghambat sekresi kolesistokinin, menekan pusat rasa kenyang di lambung, dan meningkatkan asupan, pemanfaatan, dan penyerapan pakan ternak (Kato, *et al.*, 2001; Zhang, *et al.*, 2012a). Selain itu, telah terungkap

bahwa suplementasi GABA dalam makanan meningkatkan aktivitas dalam saluran pencernaan dari enzim tripsin, amilase, dan lipase (Zhang, *et al.*, 2012). Jonaidi dan Noori (2012) mengemukakan bahwa neuropeptide Y (NPY) yang terlibat sentral dalam stimulasi asupan pakan bergantung pada interaksi dengan sistem GABAergik melalui reseptor GABA A.

### 5.1.3. Konversi Ransum

Pada pemeliharaan dengan kepadatan 12 ekor/m<sup>2</sup> terjadi penurunan konversi pakan seiring dengan peningkatan pemberian GABA, dengan pemberian dosis 0,005% konversi pakan berbeda sangat nyata ( $P < 0,01$ ) dengan pemberian 0,01%. Peningkatan kepadatan kandang menjadi 16 ekor/m<sup>2</sup> (K3), konversi pakan juga menunjukkan penurunan seiring peningkatan pemberian dosis GABA (Anggraini, 2020). Pada rata-rata nilai konversi pakan, terlihat meningkat seiring dengan peningkatan kepadatan kandang. Hal ini karena peningkatan kepadatan akan mempunyai korelasi yang positif dengan peningkatan suhu internal tubuh broiler karena tidak adanya aliran udara dan keterbatasan broiler dalam melepaskan panas. Suhu tubuh ternak yang meningkat akan meningkatkan pernapasan juga meningkat. Peningkatan frekuensi pernapasan pada ternak unggas atau *panting* disebabkan oleh unggas tidak mempunyai cukup kelenjar keringat untuk membuang panas melalui penguapan. Konsekuensi dari *panting* adalah banyaknya energi yang terbuang. Sesuai dengan pernyataan Park, *et al.*, (2016), suhu tubuh ternak yang meningkat akan meningkatkan pernapasan, yang mengarah pada penurunan asupan pakan sehingga terjadi penurunan tingkat kenaikan berat badan, serta penurunan produktivitas secara keseluruhan. Selain itu, keseimbangan elektrolit dalam darah terganggu, menyebabkan ketidakseimbangan hormon dan kondisi gizi buruk yang menyebabkan penurunan berat badan dan penurunan produktivitas (Park, *et al.*, 2016).

Konversi ransum broiler tanpa pemberian GABA mengalami penurunan seiring dengan peningkatan kepadatan kandang ( $P < 0,01$ ). Pada pemberian GABA 0,005% juga terlihat terjadi penurunan konversi ransum seiring peningkatan kepadatan kandang ( $P < 0,01$ ). Pemberian 0,01% GABA menunjukkan perbedaan sangat nyata ( $P < 0,01$ ) antara kepadatan 8 dan 12 ekor/m<sup>2</sup> dengan kepadatan 16 ekor/m<sup>2</sup>. Nilai konversi ransum pada penelitian ini mengalami penurunan seiring dengan peningkatan dosis pemberian GABA.

Konversi ransum pada penelitian ini berada dibawah nilai konversi ransum berdasarkan data tabel target performa strain MB 202, yaitu 1,705 (PT. Japfa Comfeed Indonesia). Sebagaimana yang dijelaskan oleh Kato, *et al.*, (2001) dan Zhang, *et al.*, (2012a) bahwa GABA mengatur pusat asupan pakan, mempromosikan sekresi asam lambung, menghambat sekresi kolesistokinin, menekan pusat rasa kenyang dilambung, dan meningkatkan asupan, pemanfaatan, dan penyerapan pakan ternak. Selain itu, telah terungkap bahwa suplementasi GABA dalam makanan meningkatkan aktivitas dalam saluran pencernaan dari enzim tripsin, amilase, dan lipase (Zhang, *et al.*, 2012).

#### **5.1.4 Bobot Akhir**

Berdasarkan penelitian yang dilakukan Anggraini (2020) terdapat interaksi kedua faktor perlakuan (kepadatan dan dosis GABA), terlihat bahwa pada kepadatan kandang normal, 8 ekor/m<sup>2</sup>, tidak terdapat perbedaan bobot akhir broiler saat diberi ataupun tidak diberi GABA ( $P>0,05$ ). Pada pemeliharaan dengan kepadatan 12 ekor/m<sup>2</sup> terjadi perbedaan yang sangat ( $P<0,01$ ) bobot akhir broiler yang diberi 0,01% GABA dengan yang diberi 0,005% dan tidak diberi. Peningkatan kepadatan kandang menjadi 16 ekor/m<sup>2</sup> menyebabkan penurunan bobot akhir broiler dan tidak adanya perbedaan antara diberi ataupun tidak diberi GABA.

Penurunan bobot akhir pada penelitian ini seiring dengan peningkatan kepadatan disebabkan oleh adanya stres yang disebabkan oleh kepadatan kandang yang tinggi. Diketahui bahwa kepadatan normal dalam pemeliharaan broiler adalah 8-10 ekor/m<sup>2</sup>. Kepadatan yang tinggi akan membuat broiler berada pada kondisi tidak nyaman sehingga terjadi stres karena adanya cekaman. Stres yang dapat ditimbulkan dari kepadatan kandang antara lain adanya persaingan dalam proses konsumsi serta naiknya suhu sekitar.

Ketika suhu tubuh broiler meningkat, akan terjadi penurunan konsumsi ransum dan penambahan berat badan yang disebabkan oleh fakta bahwa stres termal mengaktifkan poros hipofisis-adrenal hipotalamus (HPA) yang mengeluarkan hormon adrenal (Khan, *et al.*, 2011; Khan, *et al.*, 2012). Hormon adrenal meningkatkan katabolisme lemak tubuh, glikogen, dan protein, akibatnya asupan pakan dan kenaikan berat badan menurun. Stres pada ayam telah dilaporkan menyebabkan penurunan tingkat reseptor GABA di otak

ayam (Fluck, *et al.*, 1997) dan respons ini dalam kelenjar hipofisis mengurangi asupan pakan dan berat badan (Jonaidi, *et al.*, 2002). Purno, *et al.*, (1995) juga menambahkan bahwa efek keseluruhan pada ayam broiler yang dipelihara pada kepadatan tinggi adalah dapat dikurangi tingkat pertumbuhan, efisiensi pakan, kemampuan hidup, dan dalam beberapa kasus, kualitas karkas. Hal ini dipicu oleh adanya pelepasan hormone kortikosteron oleh hipotalamus di otak. Peningkatan kortikosteron tersebut dimaksudkan antara lain untuk merangsang terjadinya perombakan (katabolisme) sebagai usaha penyediaan glukosa darah melalui sistem glukoneogenesis sehingga terjadi penurunan pertumbuhan (Yunianto, *et al.*, 1997; Sahin, *et al.*, 2002).

Bobot akhir broiler tanpa pemberian GABA mengalami penurunan seiring dengan peningkatan kepadatan kandang. Pada pemberian GABA 0,005% terlihat terjadi penurunan bobot akhir seiring peningkatan kepadatan kandang. Pemberian 0,01% GABA menunjukkan perbedaan sangat nyata ( $P < 0,01$ ) antara kepadatan 8 dan 12 ekor/m<sup>2</sup> dengan kepadatan 16 ekor/m<sup>2</sup>.

Peningkatan bobot akhir broiler dengan pemberian GABA pada penelitian ini disebabkan oleh meningkatkan konsumsi dan efisiensi ransum sehingga dapat meningkatkan penambahan bobot badan broiler. Sesuai dengan pernyataan Scott, *et al.*, (1982) konsumsi ransum dan PBB erat kaitannya dengan bobot akhir ternak. Dalam mekanismenya, GABA yang dilepaskan oleh neuron mengaktifkan saluran ion GABA-A dan reseptor GABA-B dalam membrane plasma. Aktivasi saluran dan reseptor umumnya menghasilkan penurunan rangsangan neuron (Jin, *et al.*, 2011) sehingga rangsangan stres yang diterima tidak diteruskan oleh impuls saraf. Sebagai neurotransmitter penghambat, dapat meningkatkan asupan makanan pada hewan, mengatur endokrin, autoimun, hormonal, dan fisiologi reproduksi, dan meningkatkan fungsi anti-hipoksia, dan anti-HS dalam hewan (Chen, *et al.*, 2001; Jonaidi, *et al.*, 2002; Chen, *et al.*, 2013; Chen, *et al.*, 2014). Bobot akhir broiler pada penelitian Anggraini (2020) 2502,159-2701,437 gr/ekor. Nilai ini berada dibawah nilai bobot akhir berdasarkan data tabel target performa strain MB 202, yaitu 2,801 gr (PT. Japfa Comfeed Indonesia). Penelitian yang dilakukan Chen, *et al.*, (2016) pada broiler yang diberi srtes panas jugamendapat bobot ayam mengalami penurunan dibandingkan control dan bobot akhir meningkat saat diberikan GABA.

### 5.1.5. Konsumsi Air Minum

Pengaruh pemberian GABA pada masa pemeliharaan dengan kepadatan kandang berbeda terhadap konsumsi air minum broiler dapat juga akan berbeda. Hasil penelitian Anggraini (2020) menunjukkan bahwa tidak ada interaksi ( $P > 0,05$ ) antara pemberian GABA dan kepadatan kandang berbeda terhadap konsumsi air broiler. Sementara itu, kepadatan kandang dan dosis pemberian GABA memberikan pengaruh sangat nyata ( $P < 0,01$ ) terhadap konsumsi air broiler.

Terjadi peningkatan konsumsi air dengan semakin meningkatnya kerapatan kandang broiler. Kondisi kepadatan 8 ekor/m<sup>2</sup> konsumsi air broiler 8101,329 ml dan meningkat menjadi 8503,506 dan 9066,768 pada kepadatan 12 dan 16 ekor/m<sup>2</sup>. Hal ini disebabkan oleh broiler dengan kepadatan yang tinggi akan menyebabkan broiler mengalami stres panas yang disebabkan sulitnya pelepasan panas, serta kondisi berdesakan yang membuat suhu lingkungan meningkat. Suhu lingkungan sendiri merupakan salah satu faktor terpenting yang mempengaruhi pola asupan air broiler. Feddes, *et al.*, (2002) menjelaskan bahwa ketika kepadatan kandang meningkat akan mengakibatkan konsumsi air meningkat.

Air bukan hanya salah satu nutrisi terpenting dalam hewan nutrisi, melainkan juga memainkan peran fisiologis penting terkait dengan homeostasis hewan, terutama selama stres panas (Bruno, *et al.*, 2011). Leeson and Summers (1991) dan Lott (1992) melaporkan bahwa ayam pedaging yang diberi stres panas akut memiliki asupan air yang lebih tinggi. Asupan air meningkat untuk menjaga keseimbangan termoregulasi (Bruno and Macari, 2002), karena tekanan panas menginduksi kehilangan air yang tinggi melalui saluran pernapasan sebagai sarana untuk mencapai termoregulasi yang efisien melalui pendinginan evaporatif. Dalam situasi stres panas kritis, kehilangan air dapat menyebabkan perubahan nyata pada keseimbangan termoregulasi unggas (Belay, *et al.*, 1993) dan dapat menyebabkan kematian. Oleh karena itu, di samping peran nutrisi, permainan air lebih penting untuk termoregulasi pada ayam broiler modern dibandingkan dengan spesies hewan lainnya (Bruno and Macari, 2002), terutama dalam kondisi panas. May and Lott (1992) dan Wideman, *et al.*, (1994) melaporkan bahwa ayam pedaging yang dikirim ke suhu siklik mengembangkan pola asupan air yang berbeda dan suhu aklimasi yang berbeda mungkin memiliki pengaruh dalam asupan air yang berbeda dan kapasitas ekskresi untuk menjaga

keseimbangan hidro-elektrolitik.

Pemberian GABA mempengaruhi konsumsi air. Adanya penurunan konsumsi air ketika dilakukan pemberian GABA pada broiler. Hal ini disebabkan oleh GABA yang berfungsi sebagai anti-stres. Stres pada ayam telah dilaporkan menyebabkan penurunan tingkat reseptor GABA di otak ayam (Fluck, *et al.*, 1997) dan respons ini dalam kelenjar hipofisis mengurangi asupan pakan dan berat badan (Jonaidi, *et al.*, 2002). Dalam mekanismenya, GABA yang dilepaskan oleh neuron mengaktifkan saluran ion GABA-A dan reseptor GABA-B dalam membrane plasma. Aktivasi saluran dan reseptor umumnya menghasilkan penurunan rangsangan neuron (Jin, *et al.*, 2011) sehingga rangsangan stres yang diterima tidak diteruskan oleh impuls saraf. Pemberian GABA menawarkan strategi nutrisi potensial untuk mencegah stres akibat stres panas pada ayam broiler (Zhu, *et al.*, 2009; Dai, *et al.*, 2011; Wang, *et al.*, 2011).

#### **5.1.6. pH Daging**

Pengaruh pemberian GABA pada broiler dan kepadatan kandang berbeda terhadap pH daging dari hasil penelitian Angrain 2020, menunjukkan bahwa tidak adanya interaksi ( $P>0,05$ ) antara pemberian GABA dan kepadatan kandang terhadap tingkat keasaman (pH) daging broiler pasca post-mortem. Faktor kepadatan kandang memberikan pengaruh berbeda nyata ( $P<0,05$ ) dan pemberian dosis GABA memberikan pengaruh tidak nyata ( $P>0,05$ ) terhadap pH daging broiler. Dari data tersebut dapat dilihat bahwa terjadi peningkatan pH sering dengan meningkatnya kepadatan kandang. Pada perlakuan ini, didapat pH daging broiler pasca postmortem adalah 6,044; 6,089; dan 6,289 pada kepadatan 8, 12, dan 16 ekor/meter secara berturut-turut.

Nilai rata-rata pH daging pada penelitian dipengaruhi oleh kepadatan kandang dalam pemeliharaan broiler. Hasil penelitian ini sejalan dengan studi sebelumnya oleh Osman (1993) dan Tong, *et al.*, (2012) dengan didapatkan bahwa kepadatan tinggi dikaitkan dengan peningkatan pH daging ayam.

Warris (2000) menjelaskan bahwa penanganan sebelum postmortem dapat mempengaruhi kualitas daging ayam karena dapat mempengaruhi keasaman atau perkembangan waktu rigor. Daging ayam mudah mengalami penurunan kualitas sebagai akibat dari adanya perlakuan yang kurang baik pada saat ayam masih hidup. Pada saat penanganan atau pada saat penyimpanan yang kurang

sempurna (Sams, 2001). Hasil dari penelitian ini sesuai dengan dengan laporan McKee and Sams (1997), Petracci, *et al.*, (2004), Lu, *et al.*, (2007), Chiang, *et al.*, (2008), Tong, *et al.*, (2002) dan Uzum, *et al.*, (2013) yang menunjukkan bahwa stres panas dapat menurunkan nilai pH pada otot. Sejalan dengan hasil penelitian, *et al.*, (2012) yang mendapatkan bahwa daging dada broiler yang terkena stres panas tidak menunjukkan karakteristik PSE (*pale, soft, dan exudative*) yang khas dan nilai pH lebih rendah.

Faktor kandang yang padat mengakibatkan kurangnya oksigen dalam kandang sehingga diduga terjadi akumulasi asam laktat pada daging ayam. Kadar asam laktat meningkat karena adanya proses glikogenolisis pada otot ayam yang meningkat. Meningkatnya glikogenolisis pada otot ayam menyebabkan akumulasi asam laktat sehingga menghasilkan nilai pH daging yang rendah (Zhang, *et al.*, 2009). Hal ini juga dijelaskan oleh Forres, *et al.*, (1975) dan Lawrie (1996) bahwa proses glikolisis dan dihasilkan asam laktat yang akan mempengaruhi pH.

Jaringan otot hewan pada saat masih hidup mempunyai pH pada kisaran 7,2 sampai 7,4 dan akan menurun setelah pemotongan (Buckle, *et al.*, 1987; Foegeding, *et al.*, 1996). Pada pH akhir yang tinggi dapat menyebabkan daging berwarna gelap dan permukaan daging menjadi sangat kering karena cairan daging terikat secara erat dengan protein (Lawrie, 1996; Foegeding, *et al.*, 1996). pH rendah akan mengakibatkan warna merah muda yang cerah pada daging yang disukai konsumen, palatabilitas yang baik dan tahan terhadap kerusakan akibat mikroorganisme, sedangkan pH tinggi menyebabkan sebaliknya, daging berwarna gelap dan permukaan potongan daging menjadi sangat kering karena cairan daging terikat sehingga erat oleh protein (Buckle, *et al.*, 1987).

Pada pemberian perlakuan GABA, terlihat bahwa terjadi penurunan nilai pH daging broiler seiring dengan penambahan jumlah GABA yang diberikan. pH yang dihasilkan adalah 6,244; 6,122 dan 6,056 untuk perlakuan D1, D2, dan D3 secara berturut-turut. Sejalan dengan Dai, *et al.*, (2012) mendapatkan bahwa pemberian GABA pada ayam yang terkena cekaman panas menghasil pH daging yang lebih rendah dibanding yang tidak diberi GABA.

Van, *et al.*, (2000) menyatakan bahwa pH normal daging ayam broiler berkisar antara 5,96-6,07, sedangkan Suradi (2006) mendapatkan pH daging broiler sesaat setelah pemotongan adalah

6,31. Soeparno (2009) menjelaskan dalam kondisi normal, daging ayam segar memiliki kisaran pH sekitar 5,3-6,5 pasca pemotongan. Pada penelitian ini, pH daging broiler yang didapat berkisar antara 6,1-6,5 (Tabel 15). Bila merujuk pada hasil penelitian tersebut daging broiler pada penelitian ini masih wajar untuk dikonsumsi. Hasil pH pada penelitian ini juga sesuai dengan SNI, yaitu 6 - 7 (SNI).

### **5.1.7. Bursa Fabricius**

Pengaruh pemberian GABA pada broiler dan kepadatan kandang berbeda terhadap berat bursa fabricius. Hasil analisa statistik menunjukkan bahwa tidak adanya interaksi ( $P > 0,05$ ) antara pemberian GABA dan kepadatan kandang terhadap berat bursa fabricius (Anggraini, 2020). Faktor kepadatan kandang dan pemberian dosis GABA masing-masing memberikan pengaruh nyata ( $P < 0,05$ ) terhadap berat bursa fabricius. Faktor pemberian GABA menunjukkan tidak adanya perbedaan ( $P > 0,05$ ) antara perlakuan.

Dari data diatas dapat dilihat bahwa kepadatan 8 ekor/m<sup>2</sup> memiliki broiler dengan berat bursa fabricius paling besar diantara perlakuan lainnya yaitu 0,217 gr/kg berat badan broiler, diikuti perlakuan lain. Terjadi pengecilan organ BF broiler seiring dengan peningkatan kepadatan kandang. Hal ini disebabkan oleh kondisi kurang nyaman yang tercipta selama pemeliharaan broiler. Sejalan dengan penelitian (Kusnadi, 2009) yang mendapatkan bahwa bahwa meningkatnya suhu lingkungan dapat menurunnya bobot bursa fabricius. Heckert, *et al.*, (2002) dalam penelitiannya mendapatkan bahwa terjadinya penurunan bobot bursa fabricius pada broiler yang dipelihara pada kepadatan yang tinggi. Turunnya bobot bursa fabricius akan menurunkan jumlah limfosit sehingga antibodi seperti gama globulin yang penting dalam sistem kekebalan dalam tubuh menjadi rendah (Siegel, 1995).

Pertumbuhan BF dipengaruhi pada tipe, galur, kondisi ayam dan hormone seks, sementara kecepatan tumbuh dan besar bursa pada anak ayam ada hubungannya dengan resistensi terhadap penyakit (Glick, 1994). Broiler yang dipelihara dalam kondisi kepadatan yang tinggi akan mengakibatkan terjadinya stres karena panas yang dihasilkan oleh tubuh. Panas ini tidak dapat dikeluarkan karena kondisi berdesakan dalam kandang sehingga suhu disekitar broiler menjadi lebih panas. Keadaan ini menunjukkan bahwa meningkatnya suhu lingkungan dapat menyebabkan menurunnya ukuran bobot bursa

fabricius. Pengurangan ukuran ini diakibatkan oleh aktivitas hormonal yang disebabkan stres panas. BF merupakan organ limfoid yang sangat dipengaruhi oleh adanya hormon kortikosteron. Ternak yang menderita cekaman panas menyebabkan hormone kortikosteronnya akan meningkat (Yunianto, *et al.*, 1999).

Hormon kortikosteron terbukti akan menekan pertumbuhan organ limfoid (bursa fabrisius dan limpa) (Siegel, 1995), dimana kortikosteron yang berasal dari adrenal kortek akan masuk dalam sirkulasi darah untuk meningkatkan metabolisme pada broiler (Aengwinach, 2009). Heckert, *et al.*, (2002) juga mendapatkan bahwa terjadi penurunan bobot bursa fabricius pada ayam broiler yang dipelihara dengan kepadatan kandang tinggi. Penelitian Puvadolpirod and Thaxton (2000) mendapatkan bahwa pemberian ACTH pada ayam broiler selain terbukti meningkatkan kandungan hormon kortikosteron juga terbukti menurunkan bobot BF.

Penurunan bobot relatif organ limfoid (BF dan tymus) dapat dijadikan sebagai indikator immunosupresi. Immunosupresi merupakan kondisi ternak mengalami penurunan dalam pembentukan antibodi yang disebabkan oleh kerusakan organ limfoid. Penurunan ini akan menyebabkan tubuh ternak rentan akan penyakit sehingga menyebabkan terganggunya pertumbuhan ataupun produksi (Al-Ghamdi, 2008). Turunnya bobot bursa fabricius ternyata menurunkan jumlah limfosit sehingga antibodi antara lain gama globulin yang penting dalam sistem kekebalan dalam tubuh menjadi rendah (Siegel, 1995).

Selanjutnya bahwa pemberian GABA mempengaruhi besarnya bursa fabricius menjadi lebih besar. GABA sebagai inhibitor neurotransmitter di otak telah terlihat di sini. GABA menghambat impuls saraf untuk mengeksresikan hormone kortikotropin oleh hipotalamus sehingga tidak terjadi regulasi efek heat stres. GABA menggunakan fungsi biologisnya melalui interaksi dengan reseptor GABA. Aktivasi saluran dan reseptor GABA umumnya menghasilkan penurunan rangsangan neuron (Jin, *et al.*, 2011). Stres yang disebabkan panas dapat mengurangi tingkat positif dan nilai rata-rata densitometrik dari reseptor GABAB dalam immunostaining serta menunjukkan keterlambatan perkembangan reseptor GABAB (Wang, *et al.*, 2011; Xie, *et al.*, 2011).

GABA juga diketahui sebagai molekul immunomodulator yang efektif (Jin, *et al.*, 2011). Tidak hanya hadir dalam sistem saraf pusat (CNS),

tetapi GABA juga telah ditemukan di banyak organ seperti pankreas, hipofisis, testis, saluran pencernaan, ovarium, plasenta, uterus, dan medula adrenal (Gladkevich, *et al.*, 2006). Sel-sel sistem kekebalan tubuh juga dapat menghasilkan GABA dan mengekspresikan saluran ion GABA-A, transporter GABA, dan reseptor GABA-B (Jin, *et al.*, 2011).

### 5.1.8. Organ Dalam

Pengaruh pemberian GABA pada broiler dengan kepadatan kandang yang berbeda terhadap berat organ . kepadatan kandang yang meningkat sehingga menyebabkan cekaman panas pada broiler dan terjadi perubahan kerja jantung menjadi lebih berat. Broiler yang mengalami peningkatan panas tubuh mengakibatkan respirasi meningkat atau terjadi *panting* sebagai akibat tidak adanya kelenjar keringat. Sohail, *et al.*, 2010 menjelaskan bahwa suhu lingkungan tinggi akan mempengaruhi tingkah laku ternak serta fungsi beberapa organ tubuh, seperti jantung dan alat pernapasan. Jantung broiler menjadi bekerja lebih banyak sehingga terjadi pelebaran ruang serta menebalnya dinding ventrikel kanan.

Peningkatan ukuran jantung broiler disebabkan oleh penambahan jaringan otot jantung. Kontraksi berlebihan pada jantung mengakibatkan penebalan dinding jantung, sedangkan ventrikel relatif menyempit (Ressang, 1984). Peningkatan ukuran jantung dipengaruhi juga oleh ukuran tubuh. Unggas dengan ukuran tubuh lebih kecil mempunyai laju kerja jantung yang lebih tinggi sehingga mengakibatkan peningkatan bobot organ tersebut, sedangkan unggas yang mempunyai ukuran tubuh lebih besar sebaliknya (North and Bell, 1990).

Pada kondisi normal, broiler melakukan respirasi dengan normal sehingga detak jantung pun normal. Namun dalam kondisi terkena cekaman panas, broiler kesulitan dalam menjaga suhu tubuh yang terpapar panas lingkungan serta panas yang dihasilkan dari metabolisme tubuh dengan panas yang dikeluarkan (*heat loss*). Arimbi, *et al.*, (2009) menjelaskan bahwa broiler yang tepapar cekaman panas akan mengalami peningkatan respirasi. Hal ini meyebabkan *hipertrofi cordis* yang menyebabkan perubahan patologi anatomi jantung pada broiler, terutama pada bagian ventrikel kanan yang ditandai dengan pertambahan berat jantung sebagai akibat pelebaran ruang dan penebalan dinding ventrikel. Virden and Kidd (2009) lebih lanjut menjelaskan bahwa sistem neurogenik akan diaktifkan ketika ternak mengalami stres. Hal ini ditandai dengan terjadinya peningkatan

tekanan darah, otot, sensitivitas saraf, gula darah, dan respirasi. Lebih lanjut untuk mengatasi kondisi stres, maka tubuh akan mengaktifkan *hypothalamic-pituitary-adrenal cortical system*.

Proventrikulus merupakan organ yang terbentuk dari pelebaran esophagus sebelum berhubungan dengan gizzard atau ventrikulus (Suprijatna, *et al.*, 2005). Menurut Scanes, *et al.*, (2004), dalam proventrikulus, pakan akan dicerna secara cepat dan terbatas. Hasil analisis keragaman menunjukkan bahwa bobot proventrikulus tidak berbeda secara nyata. Dari penelitian ini didapatkan bobot proventrikulus 0,399%-0,482% dari bobot hidup.

Hasil analisis keragaman menunjukkan bahwa bobot ventrikulus tidak berbeda secara nyata kepadatan dan pemberian GABA. Hal ini menunjukkan bahwa kepadatan kandung belum mempengaruhi proses pencernaan yang terjadi di ventrikulus. Tidak adanya perbedaan bobot ventrikulus diakibatkan oleh kandungan serat kasar ransum yang relatif sama sehingga aktivitas ventrikulus untuk mencerna tidak mengakibatkan penebalan urat daging ventrikulus yang dapat menyebabkan pembesaran ukuran ventrikulus. Akoso (1993) menyatakan bahwa bobot ventrikulus dipengaruhi oleh kadar serat kasar ransum. Semakin tinggi kadar serat kasar ransum, maka aktifitas rempela juga semakin tinggi, sehingga bobotnya juga semakin besar. Di dalam ventrikulus terdapat material yang bersifat menggiling, seperti grit, karang, atau batu kerikil yang memiliki fungsi untuk membantu memperkecil ukuran partikel makanan yang dikonsumsi (Suprijatna, dkk. 2005). Menurut Scanes, *et al.*, (2004), di dalam ventrikulus partikel makanan akan dicampur dan dihancurkan menjadi lebih kecil (pencernaan secara mekanik).

Dalam penelitian ini rata-rata berat proventrikulus dan ventriculus adalah 44,892 gr dengan rentangan nilai berat 41,533-49,120. Nilai berat proventrikulus dan ventriculus ini berada pada kisaran nilai berat berat proventrikulus dan ventriculus menurut Denbow (2015) yaitu 43,5 gr. Organ fisiologis lain yang terganggu dengan adanya stres adalah hati. Pada ternak yang mengalami stres panas ditemukan degenerasi lemak dengan adanya vakuola, serta ditemukan adanya nekrosis dan infiltrasi sel-sel radang (Sugito, *et al.*, 2007). Hal ini tentu akan mengakibatkan pengecilan ukuran hati. Degenerasi dan nekrosis tidak hanya terjadi pada hati, tetapi juga ginjal yang diduga karena kekurangan asupan oksigen dan gangguan pengaturan energi pada sel selama mengalami cekaman panas.

### 5.1.9. Suhu Rektal

Pengaruh pemberian GABA pada broiler dan kepadatan kandang berbeda terhadap suhu rektal broiler. Hasil analisis statistik menunjukkan bahwa tidak adanya pengaruh ( $P>0,05$ ) dari interaksi antara pemberian GABA dan kepadatan kandang terhadap suhu rektal broiler pada periode *finisher*. Begitu juga dengan faktor pemberian dosis GABA memperlihatkan tidak adanya pengaruh ( $P>0,05$ ) pada suhu rektal, namun faktor kepadatan kandang menunjukkan pengaruh sangat nyata ( $P<0,05$ ) terhadap suhu rektal broiler pada periode *finisher*.

Semakin tinggi kepadatan kandang maka akan menyebabkan kenaikan suhu rektal broiler. Pengukuran suhu rektal menjadi salah satu indikator dalam melihat suhu tubuh (Geraert, *et al.*, 1996; Cooper and Washburn, 1998). Suhu normal untuk tubuh ternak unggas berkisar antara 40,5-41,5°C (Etches, *et al.*, 2008), sedangkan menurut Olanrewaju, *et al.*, (2010) sedikit lebih tinggi yaitu berkisar 40,6-41,7°C.

Ternak unggas termasuk dalam golongan hewan *homeothermic* atau berdarah panas yang dicirikan dengan tidak adanya memiliki kelenjar keringat dan tubuh yang ditutupi bulu. Kondisi biologis ini menyebabkan unggas dalam kondisi panas, mengalami kesulitan membuang panas tubuhnya ke lingkungan (Ewing, *et al.*, 1999). Kepadatan kandang yang tinggi menyebabkan ayam berdesakkan di dalam kandang, serta kurangnya aliran udara sehingga ayam kesulitan dalam melepaskan panas. Pada siang hari suhu rata-rata dalam kandang berada pada rentang 30,57-32,31°C. Kondisi yang sangat jauh dari kondisi suhu nyaman broiler yang berkisar 14-22°C (Charles, *et al.*, 2002). Hal ini dipastikan memberikan dampak pada suhu tubuh ayam. Panas yang diterima dari lingkungan serta panas yang dihasilkan dari metabolisme tubuh tidak dapat dikeluarkan karena kondisi yang berdesakkan di dalam kandang.

Ternak unggas pada kondisi normal di bawah 26,7°C (Nesheim, *et al.*, 1979), lebih banyak melepaskan panas melalui *Sensible heat loss* (Bird, *et al.*, 2003). *Sensible heat loss* meliputi radiasi, konduksi, dan konveksi, yaitu melalui permukaan lantai atau dinding kandang atau dengan adanya udara serta aliran udara. Pelepasan panas dari dalam tubuh ternak unggas dilakukan melalui dua cara, yaitu secara *sensible heat loss* dan *insensible heat loss* (Bird, *et al.*, 2003). Namun, ketika dalam keadaan tidak nyaman, unggas lebih banyak melepaskan panas

dengan cara *insensible heat loss*, yaitu hilangnya panas tubuh melalui proses panting (Bird, *et al.*, 2003).

Tingginya suhu tubuh ternak pada penelitian ini disebabkan oleh suhu kandang yang relatif tinggi, Lin, *et al.*, (2005) melaporkan bahwa peningkatan suhu lingkungan nyata meningkatkan suhu tubuh. Tamzil, *et al.*, (2013) menjelaskan bahwa ayam broiler yang berumur lebih dari 3 minggu akan mengalami stres panas yang serius bila mendapat suhu lingkungan 32°C. Peningkatan suhu darah lebih dari 1°C dari suhu tubuh normal akan mengaktifkan reseptor panas pada perifer. Sebagai respon, terjadi *panting* dan pada permukaan kulit terlihat pelebaran pembuluh darah.

#### **5.1.10. Mortalitas**

Pengaruh pemberian GABA pada broiler dan kepadatan kandang berbeda terhadap mortalitas broiler. Efek dari kepadatan kandang dan pemberian GABA pada kematian tidak signifikan. Kematian pada keseluruhan adalah 0,62% dengan total 2 ekor dari 324 ekor. Kematian pertama terjadi pada satu hari pasca broiler dipindahkan ke dalam kandang percobaan, diduga broiler terkena *shock*. Kematian kedua terjadi pada minggu keempat yang disebabkan oleh cedera fisik yang dialami broiler, yaitu kaki terjepit pada lantai kandang. Silondae and Sari (2017) menyatakan bahwa tingkat mortalitas dipengaruhi oleh beberapa faktor di antaranya bobot badan, bangsa, tipe ayam, iklim, kebersihan dan suhu lingkungan, sanitasi peralatan, serta kandang dan penyakit. Lebih lanjut dijelaskan bahwa jika secara keseluruhan kematian kurang dari 5%, pemeliharaan broiler secara komersial dinyatakan berhasil. Bell and Weaver (2002) menerangkan bahwa kandang memiliki peranan penting dalam menciptakan kondisi iklim mikro yang diinginkan agar proses-proses fisiologis dapat berjalan dengan normal. Peran kandang tersebut antara lain menciptakan suasana tetap segar pada musim panas, menciptakan suasana tetap hangat pada keadaan musim dingin, menurunkan kelembaban yang terlalu tinggi, menurunkan kandungan amonia yang terlalu tinggi, dan memberikan aliran udara yang baik melalui dinding kandang.

## 5.2. Aplikasi GABA pada ayam Petelur

Gamma-aminobutyric acid (GABA) adalah asam amino nonesensial yang banyak ditemukan di alam termasuk pada bakteri, ragi, tumbuhan, dan hewan. Dia dibiosintesis melalui -dekarboksilasi dari asam glutamat, dikatalisis oleh glutamat dekarboksilase (Chung et al. 2009). GABA tidak hanya memainkan peran neurotransmitter inhibisi utama dalam sistem saraf pusat, tetapi juga menunjukkan berbagai fungsi nutrisi dan farmakologis, seperti: induksi diuresis, penurunan tekanan darah, promosi penyerapan ion logam, efek penenang, melindungi hati terhadap kerusakan alkohol, dan efek imunomodulator (Omori dkk. 1987; Oh dan Choi 2000; Adeghate dan Ponery 2002; Kimura dkk. 2002; Jin dkk. 2013).

Sampai saat ini, ada beberapa penelitian tentang produksi GABA dengan metode fermentasi menggunakan bakteri, jamur, dan ragi (Smith et al. 1992; Lu et al. 2008). Beberapa strain *Escherichia coli* telah dilaporkan untuk mengubah L-glutamat menjadi GABA dan isolasi strain ini telah dipelajari untuk keperluan industri.

GABA telah menunjukkan manfaat potensial pada hewan untuk digunakan sebagai aditif pakan. Di sektor peternakan, telah ditunjukkan bahwa memberi makan GABA meningkatkan asupan pakan dan penambahan berat badan dalam pertumbuhan babi dan babi yang disapih, dan menurunkan bobot babi kehilangan laktasi (Fan et al. 2007; Liang et al. 2009; Yang dkk. 2009). Wang dkk. (2013) melaporkan bahwa GABA memiliki efek menguntungkan seperti peningkatan asupan pakan, kinerja laktasi, dan kesehatan sapi perah pada masa awal laktasi. Dai et al. (2011) menunjukkan bahwa diet GABA diberikan fungsi relaksasi stres, membantu mencegah panas gejala terkait stres dalam kinerja pertumbuhan dan sifat karkas pada ayam pedaging.

Park and Kim 2015 melaporkan penggunaan GABA yang di produksi oleh *E.coli*. terhadap produktivitas, kualitas telur, dan profil darah, menggunakan 288 ayam petelur diberi pakan dengan empat tingkat pemberian GABA yang berbeda (0, 25, 50, dan 100 ppm), dalam diet basal berbasis tepung jagung-kedelai, selama lima minggu. Produksi telur, berat telur, dan massa telur selama minggu 32 hingga 36 menunjukkan peningkatan yang signifikan, memberikan pengaruh yang linier sesuai dengan peningkatan GABA di dalam pakan.

Selain itu, suplementasi GABA dikaitkan dengan peningkatan kekuatan kulit telur dan tinggi albumen Variabel darah, seperti

sel darah putih, sel darah merah, limfosit, kortisol, epinefrin, dan konsentrasi norepinefrin, tidak dipengaruhi oleh penambahan GABA ke dalam makanan; Namun, konsentrasi haptoglobin menurun secara signifikan dan konsentrasi IgG meningkat pada kelompok ayam petelur yang diberi GABA. Hasil ini menunjukkan bahwa diet yang mengandung GABA dapat mempengaruhi produktivitas, telur kualitas, serum haptoglobin, dan konsentrasi IgG pada ayam petelur.

### **5.2.1. Produksi telur dan Performa**

Ayam petelur yang diberi GABA di dalam pakan selama minggu 32-36 menunjukkan perbedaan yang signifikan dalam produksi telur, berat telur, dan massa telur dibandingkan dengan perlakuan kontrol, sebagai diet GABA meningkat dari 25 menjadi 100 ppm (linier, semua  $P < 0,001$ ). Namun, tidak ada perbedaan yang signifikan dalam konsumsi pakan atau rasio konversi pakan yang diberi makan dengan berbagai tingkat GABA.

Dalam penelitian ini, penambahan 0,25 sampai 100 ppm GABA menghasilkan peningkatan yang bergantung pada dosis dalam produksi telur, berat telur, dan kualitas telur. Peningkatan produksi telur dan kualitas telur pada ayam petelur yang ada GABA dalam pakanya berhubungan dengan sistem neuroendokrin yang dijelaskan sebelumnya pada metabolisme nutrisi (Zhang et al. 2012). Dilaporkan bahwa masuknya GABA ke dalam pakan ayam petelur tidak hanya mengurangi stres pada ayam di bawah panas stres tetapi juga berperan dalam pengaturan nafsu makan dan peningkatan pemanfaatan nutrisi.

Baru-baru ini studi, Zhu et al. (2015) menyarankan kemungkinan bahwa mikroorganisme penghasil GABA dapat meningkatkan pemanfaatan kalsium dan fosfor makanan, sehingga meningkatkan kualitas telur. Selain itu, GABA memiliki banyak aktivitas antioksidan (Huang et al. 2011; Chen et al. 2013. Zhang et al. (2012) juga mengamati bahwa meningkatkan suplementasi GABA meningkatkan tingkat superoksida dismutase (SOD) dan glutathione peroksidase (GSH-Px), dan penurunan tingkat malondialdehid (MDA). Dengan demikian, peningkatan pemanfaatan nutrisi dan aktivitas antioksidan dalam respon terhadap GABA kemungkinan merupakan penyebab utama dari peningkatan performa bertelur dan kualitas telur ayam petelur. Temuan kami menunjukkan bahwa GABA memiliki efek menguntungkan langsung pada kinerja performa dan terutama kualitas telur, yang dimanifestasikan sebagai pengaruh yang signifikan

terhadap produksi telur, massa telur, berat telur, kekuatan pecah kulit telur, dan tinggi albumen.

### **5.2.2. Kualitas Telur**

Kekuatan pemecahan kulit telur ditemukan meningkat (secara kuadrat) dibandingkan dengan kelompok kontrol. Juga, ada efek linier pada tinggi albumen karena tingkat GABA dalam pakan. Tidak ada perbedaan yang signifikan dalam ketebalan kulit telur, unit Haugh, atau warna kuning telur dari ayam petelur diberi makan dengan berbagai tingkat GABA dalam makanan (Park dan KIM, 2015).

### **5.2.3 Profil darah dan haptoglobin**

Kadar serum IgG meningkat pada GABA kelompok perlakuan dibandingkan dengan kelompok kontrol secara linier. Konsentrasi haptoglobin lebih rendah pada unggas yang diberi pakan tambahan GABA, dibandingkan dengan unggas yang diberi pakan kontrol. Namun, pemberian GABA tidak memiliki efek yang signifikan pada WBC, RBC, atau limfosit. Juga, kadar hormon serum (kortisol, epinefrin, dan norepinefrin) adalah tidak terpengaruh oleh penambahan GABA (Park dan Kim, 2015).

Kadar epinefrin dan norepinefrin adalah yang utama neurotransmitter sistem saraf simpatik (McCorry 2007), dan sekresi kortisol sebagian dikendalikan oleh GABA (Rosmond et al. 2002). Untuk mengevaluasi efek GABA pada kemampuan fungsional sistem saraf simpatik, konsentrasi epinefrin, norepinefrin dan kortisol dievaluasi dalam serum ayam petelur, tetapi tidak ditemukan berbeda tingkat dalam kontrol. Dengan demikian, hasil kami menunjukkan bahwa GABA tidak memiliki efek langsung pada simpatik sistem saraf dibandingkan dengan kontrol (Park dan Kim, 2015).

Haptoglobin adalah protein fase akut yang cepat meningkat dalam darah oleh agen penyebab penyakit dan banyak perubahan fisiologis dan memainkan peran penting, berperan dalam imunitas. Koutsos dkk. (2006) mengamati bahwa tantangan lipopolisakarida (LPS) pada anak ayam menghasilkan respons imun inflamasi, seperti yang ditunjukkan oleh peningkatan kadar haptoglobin. GABA memiliki beberapa efek positif pada fungsi kekebalan seluler, seperti: sebagai aktivasi atau penekanan sekresi sitokin, modifikasi proliferasi sel dan bahkan migrasi sel (Jin et al. 2013). Tingkat faktor nekrosis tumor yang

diinduksi lipopolisakarida $\alpha$  dan inflamasi sitokin (interleukin (IL)-1 $\beta$ , IL-6) dalam serum menurun secara signifikan oleh GABA pada 80 mg/kg di bawah stres pemotongan paruh seperti yang dilaporkan oleh Xie et al. (2013).

Zhang et al. (2012), yang mendokumentasikan sebuah peningkatan kekebalan (serum IgG dan IgA) antara ransum perlakuan dan kontrol GABA. Haptoglobin serum konsentrasi berkurang dalam GABA-supplemented burung, dibandingkan dengan kontrol, peningkatan konsentrasi serum IgG diamati dengan suplementasi GABA, menunjukkan pola yang berlawanan dengan konsentrasi serum haptoglobin. Dengan demikian, mungkin diharapkan bahwa GABA mungkin memiliki efek modulasi pada respon imun humoral oleh mengaktifkan IgG dan menurunkan haptoglobin, meskipun tidak ada perbedaan signifikan yang diamati pada WBC atau jumlah limfosit antara perawatan GABA dan kontrol.

### **5.3. Aplikasi GABA dalam Peningkatan Kesehatan Manusia**

Gamma-aminobutyric acid (Gaba) adalah asam amino non-protein yang tersebar luas di alam. Terutama, Gaba hadir dalam konsentrasi tinggi di berbagai daerah otak (Olsen et al., 2006). Selain itu, itu juga ditemukan dalam berbagai makanan seperti teh hijau, kedelai, beras merah berkecambah, kimchi, acar kubis, yogurt, dll. Umumnya, Gaba diproduksi oleh asam l-glutamat di bawah katalis asam glutamat asam dekarboksilase (Martin, and Olsen, 2000). Dalam sistem saraf, Gaba yang baru disintesis dikemas menjadi sinaptik vesikel dan kemudian dilepaskan ke celah sinaptik untuk berdifusi ke reseptor target di postsinaptik permukaan (Madsen et al., 2009). Sejumlah penelitian telah mengidentifikasi dua kelas reseptor Gaba yang berbeda termasuk GabaA dan GabaB (Mann et al., 2009).

Reseptor ini berbeda karena farmakologi, elektrofisiologi, dan sifat biokimia. Reseptor GabaA adalah saluran klorida bergerak gaba yang terletak di postsinaptik membran, sedangkan reseptor GabaB adalah reseptor berpasangan protein G yang terletak baik pra dan pascasinaps. Gaba dikenal sebagai neurotransmitter penghambat utama di sistem saraf pusat mamalia. Dilaporkan memainkan peran penting dalam memodulasi transmisi sinaptik, mempromosikan pengembangan neuronal dan relaksasi, dan mencegah sulit tidur dan depresi (Stagg et al., 2011; Nuss., 2011; Wagner et al., 1997; Gottesmann., 2002; Plante et al., 2012). Khususnya, berbagai aktivitas

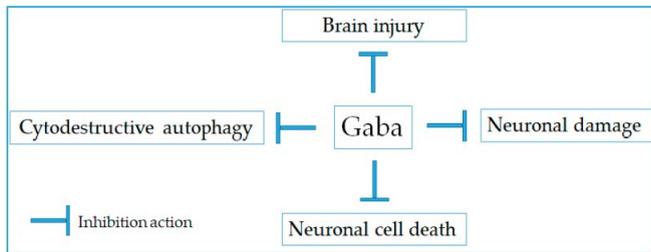
biologis Gaba didokumentasikan karena anti-hipertensi, anti-diabetes, anti-kanker, antioksidan, anti inflamasi, anti mikroba, dan anti alergi. Selain itu, Gaba juga dilaporkan sebagai agen pelindung hati, ginjal, dan usus terhadap kerusakan akibat toksin (Rashmi et al., 2018). Dalam kontribusi ini, sifat farmasi Gaba pada jaringan dan organ perifer non-saraf terutama difokuskan untuk menekankan perannya yang bermanfaat dalam pencegahan dan pengobatan berbagai penyakit.

### 5.3.1. Efek Neuroprotektif

Telah dilaporkan bahwa kerusakan jaringan saraf memicu respon inflamasi, menyebabkan pelepasan berbagai mediator inflamasi seperti spesies oksigen reaktif (ROS), oksida nitrat, dan sitokin. Mediator ini dapat menyebabkan beberapa degenerasi saraf di sistem saraf pusat seperti: Alzheimer, Parkinson, dan multiple sclerosis (Kaminsky et al., 2016; Bagli, et al., 2016). Sejauh ini, banyak penelitian telah dilaporkan mengenai peran penting Gaba pada perlindungan saraf terhadap degenerasi yang disebabkan oleh toksin atau cedera (Gambar 16).

Menurut Cho et al. (2007), Gaba diproduksi oleh kimchi-derived *Lactobacillus buchneri* menunjukkan efek perlindungan terhadap kematian sel yang diinduksi neurotoksik (Cho et al., 2007). Lebih-lebih lagi, Susu yang diperkaya Gaba dapat melindungi sel neuroendokrin PC-12 dari cedera akibat MnCl<sub>2</sub>, meningkatkan viabilitas sel, dan mengurangi pelepasan laktat dehidrogenase (Li et al., 2016). Di sisi lain, Zhou dan rekan telah menentukan bahwa agonis reseptor Gaba juga memiliki efek neuroprotektif terhadap cedera iskemik otak. Baik agonis reseptor Gaba A dan Gaba B (muscimol dan baclofen) dapat secara signifikan melindungi neuron dari kematian yang disebabkan oleh iskemia melalui peningkatan nNOS (Ser847) fosforilasi (Zhou et al 2008). Demikian pula, pemberian baclofen agonis reseptor Gaba B secara signifikan mengurangi kerusakan saraf dan menekan autophagy cytodestructive melalui pengaturan rasio dari Bcl-2/Bax dan meningkatkan aktivasi Akt, GSK-3 $\beta$ , dan ERK (Liu et al., 2015). Selain itu, aktivasi bersama agonis reseptor Gaba (muscimol dan baclofen) mengakibatkan atenuasi apoptosis Fas/FasL jalur pensinyalan, penghambatan peningkatan aktivitas thioredoxin reduktase yang diinduksi asam kainic, penekanan aktivasi procaspase-3, dan penurunan pembelahan caspase-3. Ini menunjukkan bahwa ko-aktivasi agonis reseptor Gaba menghasilkan perlindungan saraf

dengan mencegah caspase-3 denitrosilasi pada tikus yang diinduksi asam kainic (Wei et al., 2012).



Gambar 16. Target terapi untuk aktivitas neuroprotektif Gaba.

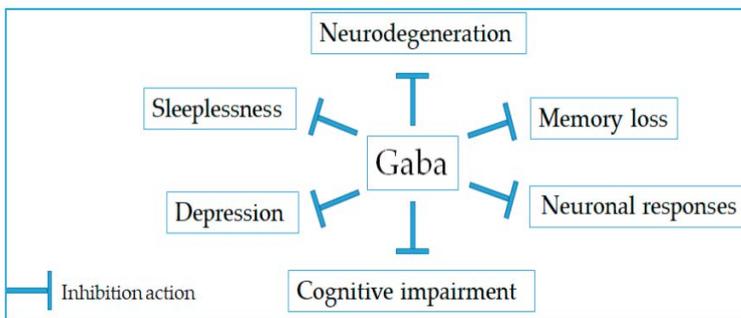
### 5.3.2. Pencegahan Gangguan Neurologis

Gangguan neurologis dikaitkan dengan disfungsi di bagian otak atau sistem saraf, yang mengakibatkan: dalam gejala fisik atau psikologis. Ini termasuk epilepsi, penyakit Alzheimer, serebrovaskular penyakit, multiple sclerosis, penyakit Parkinson, infeksi saraf, dan insomnia (Parvez, 2018). Itu terbukti bahwa Gaba dapat menekan neurodegenerasi dan meningkatkan memori serta fungsi kognitif dari otak (Gambar 17). Menurut Okada dkk. (2000), kegunaan benih padi yang diperkaya Gaba pada seseorang yang sulit tidur, depresi, dan gangguan otonom diperiksa (Okada et al., 2000). Dua puluh pasien wanita adalah diberikan oleh bibit beras kaya Gaba selama tiga kali per hari. Diamati bahwa yang paling umum gejala mental selama periode menopause dan pra-pikun seperti sulit tidur, somnipati, dan depresi sangat meningkat pada lebih dari 65% pasien dengan gejala seperti itu. Juga, pemberian oral produk fermentasi Monaskus yang kaya Gaba menunjukkan efek perlindungan terhadap depresi pada model tikus renang paksa.

Efek antidepresannya disarankan karena pemulihan tingkat monoamines norepinefrin, dopamin, dan 5-hydroxytryptamine di hipokampus (Chuang et al., 2011). Sementara itu, Yamatsu dkk. (2016) melaporkan bahwa pemberian Gaba secara signifikan mempersingkat waktu tidur latensi dan meningkatkan total waktu tidur gerakan mata yang tidak cepat, menunjukkan peran penting Gaba dalam pencegahan gangguan tidur (Yamatsu et al., 2016). Selain itu, campuran Gaba dan l-theanine bisa berkurang latensi tidur, meningkatkan durasi tidur, dan mengatur ekspresi Gaba dan glutamat GluN1 subunit reseptor (Kim et

al., 2019). Di sisi lain, uji elektro ensefalogram telah mengungkapkan secara signifikan peran Gaba dalam meningkatkan gelombang alfa, menurunkan gelombang beta, dan meningkatkan kadar IgA di bawah kondisi stres. Ini menunjukkan bahwa Gaba mampu menginduksi relaksasi, mengurangi kecemasan, dan meningkatkan kekebalan dalam kondisi stres (Abdou et al., 2006). Administrasi produk yang diperkaya Gaba yang difermentasi oleh bakteri asam laktat yang berasal dari kimchi juga meningkatkan pemulihan kehilangan memori jangka panjang dalam kognitif tikus yang mengalami penurunan fungsi dan meningkatkan proliferasi sel neuroendokrin PC-12 secara in vitro (Seo et al., 2012).

Selain itu, *Laminaria japonica* (GFL) yang diperkaya Gaba memberikan efek perlindungan terhadap gangguan kognitif yang terkait dengan demensia pada orang tua (Reid et al., 2018). Selain itu, Reid dan rekannya telah menunjukkan bahwa GFL dapat meningkatkan gangguan kognitif dan neuroplastisitas pada tikus model demensia yang diinduksi skopolamin dan etanol (Reid et al., 2018). Terutama, GFL efektif dalam meningkatkan serum tingkat faktor neurotropik yang diturunkan dari otak yang terkait dengan risiko demensia dan Alzheimer yang lebih rendah penyakit pada wanita paruh baya (Choi et al., 2016). Hasil ini menunjukkan bahwa penggunaan fungsi yang diperkaya Gaba makanan dapat memperbaiki depresi, sulit tidur, gangguan kognitif, dan kehilangan memori.



Gambar 17. Tindakan pencegahan Gaba pada gangguan neurologis.

### 5.3.3. Efek Anti-Hipertensi

Hipertensi diketahui berhubungan dengan kondisi tekanan darah tinggi, menyebabkan berbagai penyakit kardiovaskular penyakit seperti stroke iskemik dan hemoragik, infark miokard, dan gagal jantung dan ginjal (Schellack et al., 2015). Khususnya, enzim pengubah angiotensin-I (ACE) terungkap memainkan peran penting, berperan dalam regulasi tekanan darah melalui konversi angiotensin I menjadi vasokonstriktor kuat angiotensin II (Murray, et al., 2007). Oleh karena itu, ACE adalah salah satu di antara target terapi untuk pengendalian hipertensi. Menurut Nejadi et al., (2013) menyatakan susu yang difermentasi oleh *Lactococcus lactis* DIBCA2 dan *Lactobacillus plantarum* PU11 menunjukkan aktivitas penghambatan ACE hingga nilai IC50  $0,70 \pm 0,07$  mg/mL.

Demikian pula, aktivitas penghambatan ACE yang tinggi juga diamati oleh Gaba, yang dicapai dari *L. plantarum* NTU 102 susu fermentasi (Tung et al., 2011). Selain itu, kedelai fermentasi *L. brevis* mengandung sekitar 1,9 g/kg Gaba ditemukan memiliki aktivitas penghambatan ACE yang lebih tinggi daripada produk kedelai tradisional (Jang et al., 2015). Selain itu, fermentasi larutan kedelai oleh bakteri asam laktat yang berasal dari kimchi di kondisi telah mencapai kandungan Gaba hingga 1,3 mg/g biji kedelai, dan aktivitas penghambatan ACE-nya diamati hingga 43% dibandingkan dengan kontrol (Sang et al., 2018). Khususnya, kandungan Gaba yang tinggi (10,42 mg/g ekstrak) dan aktivitas penghambatan ACE yang signifikan (hambatan 92%) juga ditentukan oleh lentil (Torino et al., 2018).

Di sisi lain, aktivitas anti-hipertensi Gaba juga dilaporkan dalam banyak penelitian menggunakan model eksperimen yang berbeda . Kimura et al., (2002). telah menyelidiki efek dari Gaba pada tekanan darah pada tikus hipertensi spontan. Diamati bahwa intraduodenal pemberian Gaba (0,3 hingga 300 mg/kg) menyebabkan penurunan tekanan darah terkait dosis dalam 30 hingga 50 menit.

Efek hipotensi dari Gaba disarankan karena melemahkan transmisi simpatik melalui aktivasi reseptor GabaB di situs presinaptik atau ganglion. Apalagi menurunkan efek produk susu yang diperkaya Gaba pada tekanan darah penderita hipertensi spontan dan tikus Wistar-Kyoto normotensif juga ditentukan (Hayakawa et al, 2004). Khususnya, uji klinis telah mengkonfirmasi bahwa suplementasi harian 80 mg Gaba efektif dalam pengurangan tekanan darah pada orang dewasa dengan hipertensi ringan (Matsubara et al., 2002) . Oleh karena itu,

konsumsi produk susu yang diperkaya Gaba akan bermanfaat untuk down-regulasi hipertensi. Memang, pemberian yang diperkaya Gaba butir beras membawa sekitar 20 mmHg penurunan tekanan darah pada tikus hipertensi spontan, sementara tidak ada efek hipotensi yang signifikan pada tikus normotensif (Akama et al., 2009). Demikian pula, signifikan aktivitas anti-hipertensi dan efek penurunan kolesterol serum dari beras merah kaya Gaba adalah ditunjukkan pada tikus hipertensi spontan dibandingkan dengan kontrol (Ebizuka et al., 2009; Kawakami et al., 2018). Dalam uji klinis, efek beras putih yang diperkaya Gaba pada tekanan darah pada 39 orang dewasa dengan hipertensi ringan telah diperiksa secara acak, double blind, studi terkontrol plasebo (Nishimura et al., 2016). Terungkap bahwa konsumsi beras gaba dapat meningkatkan tekanan darah pagi hari dibandingkan dengan plasebo nasi setelah minggu ke-1 dan selama minggu ke-6 dan ke-8. Dalam tren yang sama, Tsai dan rekan-rekannya telah menentukan bahwa susu fermentasi ubi jalar ungu *Chingshey* yang diperkaya Gaba oleh bakteri asam laktat (*L. acidophilus* BCRC 14065, *L. delbrueckii ssp. lactis* BCRC 12256, dan *L. gasseri* BCRC 14619) mampu mengurangi baik tekanan darah sistolik dan tekanan darah diastolik pada tikus hipertensi spontan (Tsai et al., 2013). Efek meringankan yoghurt ubi jalar ungu fermentasi probiotik pada hipertrofi jantung di jantung tikus hipertensi spontan juga ditentukan lebih lanjut oleh Lin dan rekan (2012).

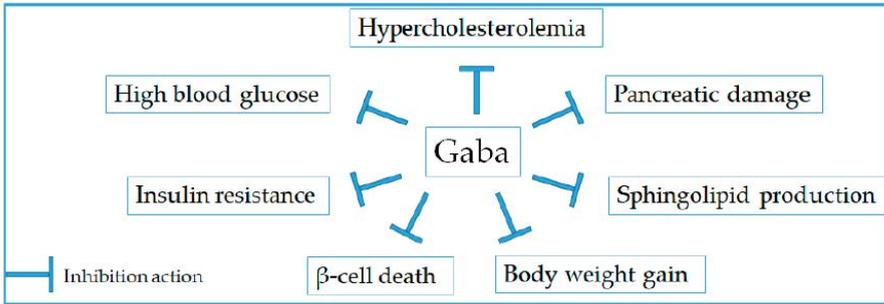
Selain itu, produk kaya Gaba lainnya dari kacang, tomat, dan roti juga dilaporkan efektif dalam atenuasi hipertensi *in vivo*. Penurunan pasti dalam darah sistolik dan diastolik nilai tekanan dan tingkat nitrogen urea darah dicapai pada tikus hipertensi spontan yang diberi makan dengan kacang yang diperkaya Gaba (Suwanmanon, et al., 2014; Aoki et al 2003). Demikian juga, aktivitas anti-hipertensi dari tomat kaya Gaba adalah terbukti menurunkan tekanan darah pada tikus hipertensi spontan secara signifikan (Yoshimura et al., 2010). Lebih-lebih lagi, tekanan darah pasien dengan hipertensi pra atau ringan hingga sedang menurun secara signifikan selama konsumsi 120 g/hari roti kaya Gaba (Becerra-Tomás, et al., 2015). Oleh karena itu, makanan susu yang diperkaya Gaba mungkin lebih disukai untuk digunakan untuk terapi anti-hipertensi.

#### 5.3.4. Efek Anti-Diabetes

Diabetes adalah gangguan endokrin yang berhubungan dengan disregulasi metabolisme karbohidrat dan defisiensi sekresi insulin atau kerja insulin, menyebabkan hiperglikemia kronis (Khairrobi et al., 2015). Sejauh ini penderita diabetes penyakit dapat dikelola dengan intervensi farmakologis (Li et al., 2008). Namun, penurunan glukosa darah efek obat farmakologis disertai dengan berbagai kerugian seperti resistensi obat, efek samping, dan bahkan toksisitas (Babiker and Dubaye 2007). Oleh karena itu, diet dan olahraga yang tepat telah direkomendasikan dan disukai sebagai terapi alternatif untuk pengaturan penyakit diabetes. Khususnya, Gaba dan produk alami yang diperkaya Gaba telah terbukti sebagai agen yang efektif dalam menurunkan glukosa darah, melemahkan resistensi insulin, merangsang pelepasan insulin, dan mencegah kerusakan pankreas (Gambar 18)

Soltani dan rekan telah menunjukkan bahwa Gaba meningkatkan fungsi sel pulau melalui produksi penurunan asupan air dan menurunkan kadar glukosa darah dan HbA1c pada tikus diabetes (Lee et al., 2013). Selain itu, kacang hijau yang difermentasi oleh *Rhizopus sp.* (Yeap et al., 2012), yogurt yang difermentasi oleh *Streptococcus salivarius* subsp. *thermophiles* fmb5 (Chen et al., 2016) dan ekstrak kedelai yang difermentasi oleh *Bacillus subtilis* MORI (Nam et al., 2012) bisa meningkatkan efek anti-hiperglikemik mereka melalui pengurangan glukosa darah, HbA1c, kolesterol, trigliserida, dan tingkat lipoprotein densitas rendah pada tikus diabetes. Dalam tren yang sama, susu difermentasi oleh galur komersial YF-L812 (*S. thermophilus*, *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus*), galur standar. B. Singkat KCTC 3419, dan *L. sakei* LJ011. Susu fermentasi efektif menurunkan gula darah puasa, insulin serum, leptin, glukosa dan toleransi insulin, kolesterol total, trigliserida, dan kepadatan rendah kolesterol lipoprotein (Song et al., 2013). Terutama, konsumsi susu fermentasi probiotik (kefir) berdasarkan jenisnya 2 paten diabetes menurunkan tingkat HbA1C, penilaian model homeostatis resistensi insulin, dan jumlah homosistein (Ostadrahimi, et al., 2015; Alihosseini, et al., 2017). Dengan demikian, beras yang berkecambah dan makanan fermentasi, yang mengandung.

Gaba dalam jumlah tinggi, dapat digunakan sebagai makanan fungsional antidiabetes untuk menjaga kesehatan dan mencegah komplikasi pada diabetes tipe 2.



Gambar 18. Target terapi Gaba untuk aktivitas anti-diabetes

Fakta bahwa perkecambahan beras dan fermentasi makanan disertai dengan peningkatan kandungan Gaba (Imam et al., 2012; Sivamaruthi, et al., 2018), oleh karena itu, beras pra dan berkecambah dan makanan fermentasi sangat dihargai untuk peran mereka dalam regulasi positif diabetes dan komplikasinya. Berdasarkan Hagiwara dan rekan, pemberian diet beras merah pra-kecambah untuk tikus diabetes secara signifikan penurunan glukosa darah, konsentrasi adipositokin PAI-1, dan peroksida lipid plasma (Hagiwara et al., 2004). Lebih-lebih lagi, beras merah pra-kecambah menurunkan konsentrasi HbA(1c) dan adipositokin (TNF- dan PAI-1) dan meningkatkan tingkat adiponektin pada tikus diabetes tipe-2, yang mengarah pada pencegahan potensi komplikasi diabetes (Torimisu et al., 2010).. Selain itu, tikus hamil diabetes yang diinduksi diet tinggi lemak yang diberi makan dengan beras merah berkecambah menyebabkan peningkatan kadar adiponektin dan pengurangan insulin, penilaian model homeostasis resistensi insulin, leptin, dan stres oksidatif di musim semi mereka (Adamu et al., 2016).

Di sisi lain, beras berpigmen ungu kehitaman dengan embrio raksasa menurun secara signifikan glukosa darah dan kadar insulin plasma, konsentrasi adipokin, dan pengaturan glukosa hepatik aktivitas enzim pada tikus yang diovariectomi (Chung et al., 2019). Sementara itu, homeostasis glukosa sangat meningkat melalui intervensi dedak gandum yang diperkaya Gaba dalam konteks tikus diet tinggi lemak (Shang et al., 2018).. Itu suplemen dedak padi yang diperkaya Gaba untuk tikus gemuk juga menunjukkan efek yang efisien dalam menurunkan serum sphingolipids, penanda resistensi insulin (Si et al., 2018). Dalam uji klinis, Ito dan rekan menyarankan: bahwa asupan beras merah pra-kecambah efektif dalam menurunkan glukosa darah

postprandial konsentrasi tanpa peningkatan sekresi insulin (Ito et al., 2005). Demikian juga, Hsu et al. (2008) dan Hayakawa et al., (2009), telah mengkonfirmasi bahwa beras merah pra-kecambah menurunkan glukosa darah dan hiperkolesterolemia di pasien diabetes tipe 2.

Selain beras yang berkecambah, makanan fermentasi juga diketahui mengandung sejumlah besar Gaba dan memiliki potensi aktivitas anti-diabetes. Pemberian oral ekstrak air panas yang difermentasi teh yang diperoleh dengan pengolahan teh loquat (*Eriobotrya japonica*) secara signifikan menurunkan kadar glukosa dan sekresi insulin serum pada tikus Sprague-Dawley yang sarat maltosa (Tamaya et al., 2010). Demikian pula, Efek anti-diabetes teh hijau yang difermentasi oleh cheongguk yang diamati melalui penurunan asupan air dan menurunkan kadar glukosa darah dan HbA1c pada tikus diabetes (Lee et al., 2009). Selain itu, kacang hijau difermentasi oleh *Rhizopus sp.* (Yeap et al., 2011), yoghurt difermentasi oleh *Streptococcus salivarius* subsp. *thermophiles* fmb5 (Chen et al., 2016), dan ekstrak kedelai yang difermentasi oleh *Bacillus subtilis* MORI (Nam et al 2012). dapat meningkatkan efek antihiperlikemiknya melalui pengurangan glukosa darah, HbA1c, kolesterol, trigliserida, dan tingkat lipoprotein densitas rendah di tikus diabetes. Dalam tren yang sama, susu difermentasi dengan strain komersial YF-L812 (*S. thermophilus*, *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus*), galur standar. *B. breve* KCTC 3419, dan *L. sakei* LJ011. Difermentasi susu efektif dalam menurunkan glukosa darah puasa, insulin serum, leptin, glukosa dan insulin toleransi, kolesterol total, trigliserida, dan kolesterol lipoprotein densitas rendah (Song et al., 2016). Terutama konsumsi susu fermentasi probiotik (kefir) dengan paten diabetes tipe 2 menurunkan kadar HbA1C, penilaian model homeostatik resistensi insulin, dan jumlah homosistein (Oastabrahimi et al., 2015; alihosaini et al., 2017). Demikian, beras yang berkecambah dan makanan yang difermentasi, yang mengandung banyak Gaba, dapat digunakan sebagai makanan fungsional antidiabetes untuk menjaga kesehatan dan mencegah komplikasi pada diabetes tipe 2.

### 5.3.5. Anti-Kanker

Kanker terlibat dalam proliferasi sel yang tidak diatur, penekanan apoptosis, invasi, dan metastasis (Ribas, et al 2016). Terapi kanker saat ini terkait dengan pembedahan, pengobatan radiasi, dan kemoterapi, yang banyak diterapkan untuk pengobatan semua jenis kanker. Namun, terapi ini memiliki kelemahan utama termasuk kekambuhan

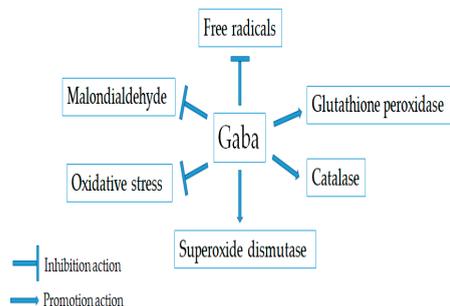
kanker, resistensi obat, dan efek samping. Oleh karena itu, penemuan obat alternatif dengan sifat yang diinginkan selalu diperlukan. Dalam hal ini, Gaba muncul sebagai senyawa yang menjanjikan yang mampu mengatur kanker karena induksi apoptosis dan penghambatan proliferasi dan metastasis. Ekstrak beras merah yang diperkaya gaba secara signifikan memperlambat tingkat proliferasi sel leukemia L1210 dan Molt4 dan meningkatkan apoptosis sel kultur sel L1210 (Oh et al., 2004). Selain itu, Schuller et al. (2008) menyarankan bahwa Gaba memiliki penekan tumor fungsi di epitel saluran napas kecil dan adenokarsinoma paru, memberikan pendekatan untuk pencegahan adenokarsinoma paru pada perokok. Menurut Huang dan rekan, Gaba menghambat aktivitas dan ekspresi MMP-2 dan MMP-9 pada cholangiocarcinoma sel QBC939, menunjukkan perannya dalam pencegahan invasi dan metastasis pada kanker (Huang et al., 2011). Song dan rekan juga menemukan efek penghambatan Gaba pada proliferasi dan metastasis sel kanker usus besar (sel SW480 dan SW620) karena peningkatan siklus sel yang menekan (G2/M atau G1/S fase), melemahkan ekspresi mRNA dari sumbu EGR1-NR4A1 dan EGR1-Fos, dan mengganggu MEK-EGR1 jalur sinyal [80]. Terutama, pengobatan bersama Gaba dan Celecoxib secara signifikan menghambat molekul VEGF, PGE2, dan cAMP sistemik dan tumor dan COX-2 dan p-5-LOX yang diatur ke bawah protein dalam sel kanker pankreas (Al-Wadei et al., 2011).

Selain itu, pemberian Gaba yang berkepanjangan pada 1000 mg / kg berat badan secara signifikan menurunkan jumlah kanker lambung dari perut kelenjar di Wk 52 tikus. Secara paralel, metode histologis juga mengungkapkan peran Gaba dalam mengurangi pelabelan indeks mukosa antral dan meningkatkan tingkat serum gastrin (Tatsuka et al., 1990). Demikian juga, pra-perawatan Gaba juga secara signifikan mengurangi metastasis hati intrahepatik dan pembentukan tumor primer pada tikus dan menghambat migrasi dan invasi sel kanker hati manusia melalui induksi sel kanker hati reorganisasi sitoskeletal (Chen et al., 2012). Sementara itu, peningkatan aktivitas reseptor GabaA berkontribusi untuk menurunkan regulasi ekspresi mRNA alfa-fetoprotein dan proliferasi sel pada maligna garis sel hepatosit (Zhang et al., 2000).

### 5.3.6. Antioksidan

Radikal bebas mengandung satu atau lebih elektron tidak berpasangan yang dihasilkan dari makhluk hidup organisme dan sumber eksternal. Radikal bebas yang tinggi dapat menyebabkan kerusakan pada tubuh jaringan dan sel, menyebabkan penuaan manusia dan berbagai penyakit (Phaniendra, et al., 2015; Lobo et al 2010). Dengan demikian, konsumsi bahan alami produk dengan efek anti oksidan tinggi berguna untuk pencegahan penyakit akibat radikal bebas Lobo et al., 2010). Di sini, sifat antioksidan Gaba telah dibuktikan dalam banyak penelitian (Gambar 19). Beberapa penelitian menunjukkan bahwa Gaba mampu menjebak zat antara reaktif selama peroksidasi lipid dan bereaksi dengan mudah dengan malondialdehid dalam kondisi fisiologis (Deng et al., 2010). Selain itu, pemberian Gaba secara signifikan menurunkan konsentrasi malondialdehid dan meningkatkan aktivitas superoksida dismutase dan glutathione peroksidase di korteks serebral dan hipokampus epilepsi akut tikus (Deng et al., 2013).

Dalam penelitian lain, efek perlindungan Gaba terhadap stres oksidatif yang diinduksi H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> dalam sel pankreas (Tang et al., 2018) dan sel endotel vena umbilikal manusia (Zhu et al., 2019), diamati melalui reduksi kematian sel, menghambat produksi spesies oksigen reaktif (ROS), dan meningkatkan pertahanan antioksidan sistem. Demikian pula, stres oksidatif yang diinduksi sinar gamma di usus kecil tikus secara signifikan sistem pertahanan. Demikian pula, stres oksidatif yang diinduksi sinar gamma di usus kecil tikus diperbaiki secara signifikan melalui penurunan malondialdehid dan protein oksidasi tingkat lanjut produksi, meningkatkan aktivitas katalase dan glutathione peroksidase, mencegah kerusakan mukosa dan perdarahan, dan menginduksi regenerasi sel-sel usus kecil (El-Hady et al., 2019)



Gambar. 19. Aktivitas modulasi Gaba untuk promosi antioksidan.

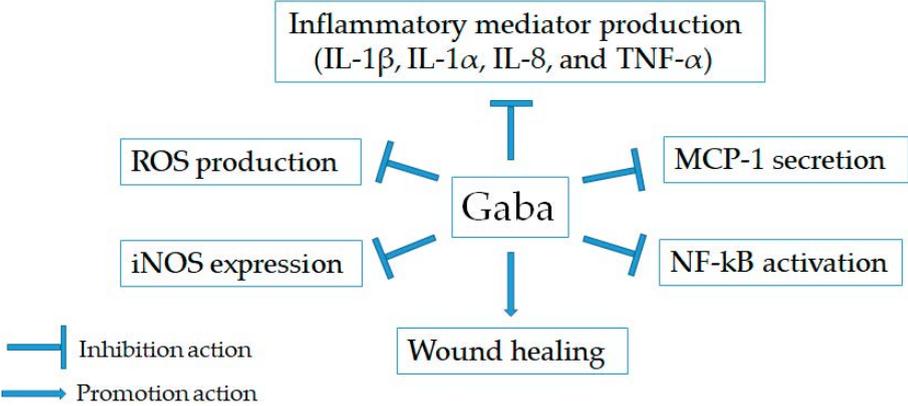
Gaba juga mencegah kerusakan oksidatif otak yang dilemahkan terkait dengan perubahan insulin pada tikus yang diobati dengan streptozotocin (Eltaway et al., 2019). Di sisi lain, Gaba dari larutan rumput laut yang difermentasi *L. brevis* diamati menunjukkan: aktivitas antioksidan yang lebih kuat daripada kontrol positif BHA dalam mengais DPPH dan superoksida radikal dan menghambat xantin oksidase (Lee et al., 2010). Sementara itu, beras merah berkecambah yang kaya Gaba mengekstrak radikal hidroksil dan zat reaktif asam tiobarbiturat yang sangat banyak di keduanya media bebas sel dan media kultur pasca perawatan, menunjukkan kapasitas pemulungan radikalnya di tindakan langsung dan tidak langsung (Md-Zamri et al 2014). Baru-baru ini, cuka beras berpigmen yang dikecambahkan juga disarankan sebagai produk baru dengan aktivitas antioksidan tinggi.

### 5.3.7. Efek Anti-Peradangan

Respon inflamasi dipicu oleh rangsangan berbagai faktor seperti kerusakan fisik, iradiasi ultra violet, invasi mikroba, dan reaksi imun [96]. Hal ini terkait dengan produksi berbagai macam mediator pro-inflamasi seperti sitokin, NO, dan PGE2 (Abdulkhaleq, et al., 2018). Terutama, Gaba diindikasikan sebagai penghambat peradangan melalui penurunan mediator pro-inflamasi produksi dan memperbaiki gejala inflamasi (Gambar 20). Pada awalnya, Han et al. (2007) telah menentukan aktivitas anti-inflamasi Gaba melalui penghambatan produksi dan ekspresi iNOS, IL-1, dan TNF- dalam sel RAW 264,7 yang distimulasi LPS. Akibatnya, itu berkontribusi pada pengurangan seluruh periode penyembuhan dan peningkatan penyembuhan luka pada tahap awal. Juga, Gaba menekan produksi sitokin inflamasi dan penghambatan NF-kB di kedua limfosit dan sel beta pulau pankreas (Prud'homme, et al., 2013). Baru-baru ini, rumput laut yang diperkaya Gaba *L. japonica*, perkecambahan yang kaya Gaba beras merah, dan mikroalga merah kaya Gaba *Rhodorus marinus* dilaporkan untuk penghambatannya kapasitas pada respon inflamasi. Ekstrak rumput laut *L. japonica* yang diperkaya dengan gaba menekan nitrat oksida dan ekspresi sintase oksida nitrat yang dapat diinduksi dalam makrofag tikus yang diinduksi LPS RAW264.7 sel (Choi et al., 2012). Beras merah berkecambah kaya Gaba menghambat sekresi IL-8 dan MCP-1 dan ROS produksi dari Caco-2 sel usus manusia diaktifkan oleh H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> dan IL-1 (Tuntipopipat et al., 2015) Merah kaya Gaba ekstrak mikroalga *Rhodorus marinus* secara negatif memodulasi ekspresi

dan pelepasan pro-inflamasi IL-1 dalam keratinosit manusia normal yang distimulasi phorbol miristat asetat, oleh karena itu menunjukkan pengobatan potensial kulit sensitif, atopia, dan dermatitis (Scandelora et al.,2018).

Selain itu, peran Gaba dalam pelemahan peradangan usus dan peningkatan penghalang epitel usus disarankan melalui menghambat produksi IL-8 dan merangsang ekspresi protein sambungan ketat serta ekspresi sitokin TGF- dalam sel Caco-2 (Skovic bajic et al., 2019).



Gambar 20. Target terapi untuk aktivitas anti-inflamasi Gaba

**5.3.8. Efek Anti-Mikroba**

Teh Gaba adalah sejenis teh yang diperkaya Gaba dengan perawatan berulang dari anaerobik alternatif dan kondisi aerobik. Ekstrak teh Gaba menunjukkan aktivitas penghambatan terhadap *Vibrio parahaemolyticus*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus*, *Salmonella typhimurium*, dan *Escherichia coli* (Mau et al., 2012).

Gaba bisa meningkatkan virulensi *Pseudomonas aeruginosa* karena stimulasi cyanogenesis, pengurangan oksigen aksesibilitas, dan ekspresi berlebih dari protein pemulung oksigen. Gaba juga mempromosikan perubahan spesifik dalam ekspresi faktor pemanjangan termostabil dan tidak stabil yang terlibat dalam interaksi bakteri dengan protein inang (Dagon et al 2013).

Baru-baru ini, peran Gaba dalam pertahanan inang anti-mikroba adalah dijelaskan oleh Kim dan rekan (2018). Pengobatan makrofag dengan Gaba meningkatkan fagosom pematangan dan respon anti-

mikroba terhadap infeksi mikobakteri. Studi ini mengidentifikasi peran pensinyalan Gabaergic dalam menghubungkan autophagy anti-bakteri untuk meningkatkan pertahanan bawaan inang terhadap infeksi bakteri intraseluler termasuk *Mycobacteria*, *Salmonella*, dan *Listeria*.

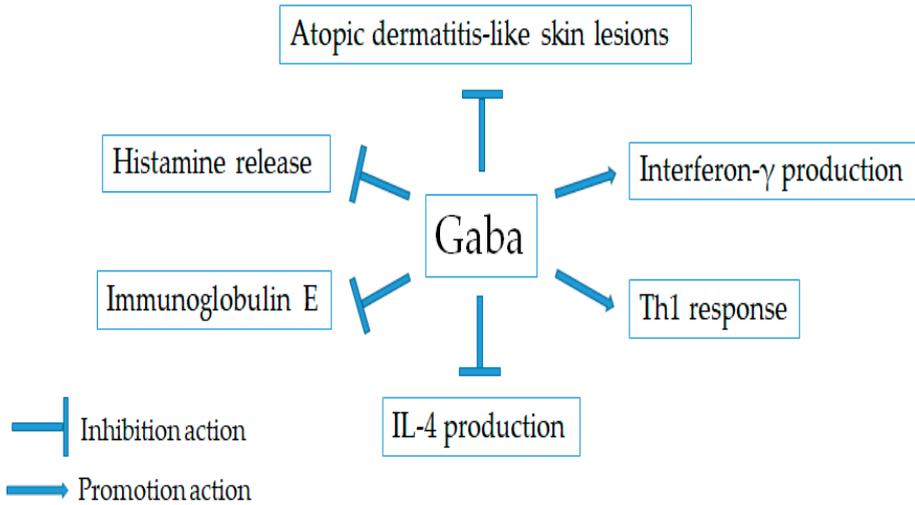
### 5.3.9. Efek Anti-Alergi

Alergi adalah gangguan sistem kekebalan yang berhubungan dengan reaksi berlebihan dari sistem kekebalan tubuh terhadap zat lingkungan yang tidak berbahaya. Reaksi alergi ditandai dengan aktivasi berlebihan sel mast dan basofil, menyebabkan pelepasan berbagai mediator seperti histamin dan berbagai sitokin (Galli and Tsai 2012). Di antara mereka, histamin dianggap sebagai target utama untuk potensi terapi anti alergi. Di sini, aktivitas penghambatan Gaba pada pelepasan histamin dari yang diaktifkan sel mast diselidiki secara in vitro (Hori et al., 2008; Kawasaki et al., 2018). Sel leukemia basofilik tikus dan eksudat peritoneum tikus sel peka dengan anti-dinitrofenil (DNP) IgE dan ditantang dengan sapi terkonjugasi DNP albumin serum mengakibatkan pelepasan histamin dalam media kultur sel. Namun, diperantarai IgE pelepasan histamin dihambat oleh pengobatan Gaba di kedua sel.

Sebaliknya, aktivitas penghambatan Gaba diturunkan dengan penambahan CGP35348, antagonis reseptor GabaB. Ini menunjukkan bahwa Gaba menghambat degranulasi dari basofil dan sel mast melalui reseptor GabaB pada permukaan sel. Di sisi lain, Hokazono et al., 2010 telah mengevaluasi efek perlindungan Gaba terhadap perkembangan lesi kulit seperti dermatitis atopik (AD) pada tikus NC/Nga. Diamati bahwa Gaba dapat mencegah perkembangan lesi kulit seperti AD pada tikus melalui pengurangan imunoglobulin serum

E (IgE) dan splenosit IL-4 produksi.

Administrasi gabungan Gaba dan yang difermentasi ekstrak barley sangat meningkatkan interferon sel limpa produksi, menunjukkan dominasi Th1/Th2 menyeimbangkan respon Th1. Oleh karena itu, asupan Gaba dan jelai yang difermentasi secara bersamaan ekstrak didorong untuk memperbaiki gejala alergi seperti dermatitis atopik (Gambar 21).



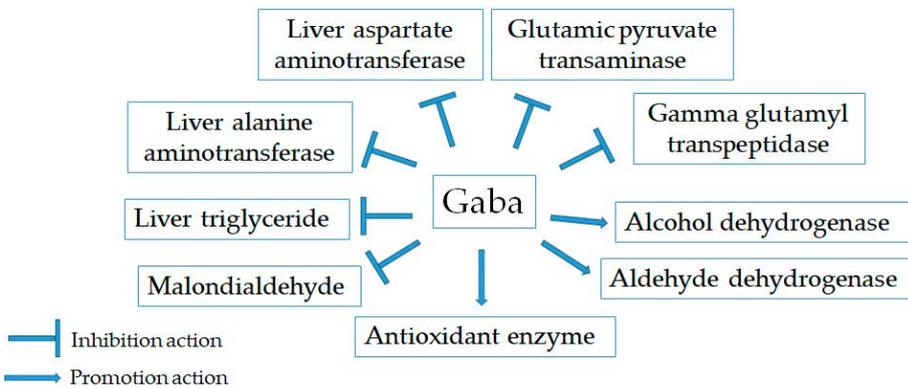
Gambar 21. Target terapi untuk aktivitas anti-alergi Gaba

### 5.3.10. Efek hepatoprotektif

Penggunaan etanol dalam jangka panjang dapat menyebabkan kerusakan hati dan profil lipid yang tidak menguntungkan pada manusia. Asetaldehida beracun terbentuk dari alkohol di bawah katalisis alkohol dehidrogenase, menyebabkan berbagai efek samping seperti haus, muntah, kelelahan, sakit kepala, dan sakit perut (Nagy et al., 2004). Untuk pertama kalinya, Oh dan rekan telah mengevaluasi efek perlindungan dari beras merah berkecambah yang kaya Gaba terhadap konsekuensi toksik dari penggunaan etanol kronis (Oh et al 2003). Menariknya, serum low-density lipoprotein, kadar kolesterol, aspartat aminotransferase hati, dan alanin aminotransferase hati menurun pada tikus yang diberi makan etanol dan ekstrak beras merah selama 30 hari. Selanjutnya, ekstrak beras merah secara signifikan meningkatkan konsentrasi kolesterol lipoprotein densitas tinggi serum dan hati dan mengurangi trigliserida hati dan konsentrasi kolesterol total. Dalam tren yang sama, Lee et al. (2010) telah melaporkan bahwa Gaba-rich fermented sea tangle (GFST) dapat mencegah induksi etanol dan karbon tetraklorida hepatotoksisitas pada tikus.

Pemberian oral GFST menurunkan kadar serum piruvat glutamat transaminase, gamma glutamyl transpeptidase, dan kadar malondialdehida dan peningkatan antioksidan enzim seperti

superoksida dismutase, katalase, dan glutathione peroksidase [113]. Selain itu, GFST meningkatkan aktivitas dan tingkat transkrip enzim metabolisme alkohol utama, seperti alkohol dehidrogenase dan aldehida dehidrogenase, dan mengurangi konsentrasi alkohol dan asetaldehida (Cha et al., 2011). Dalam studi in vitro, efek perlindungan GFST terhadap hepatotoksisitas alkohol dalam sel HepG2 yang terpapar etanol terungkap dengan mencegah penipisan glutathione intraseluler, menurunkan aktivitas gamma-glutamyl transpeptidase, dan menekan enzim sitokrom P450 2E1 ekspresi (Kang et al., 2011). Hasil ini menunjukkan bahwa makanan kaya Gaba mungkin memiliki peran farmasi dalam pencegahan penyakit kronis terkait alkohol (Gambar 22).



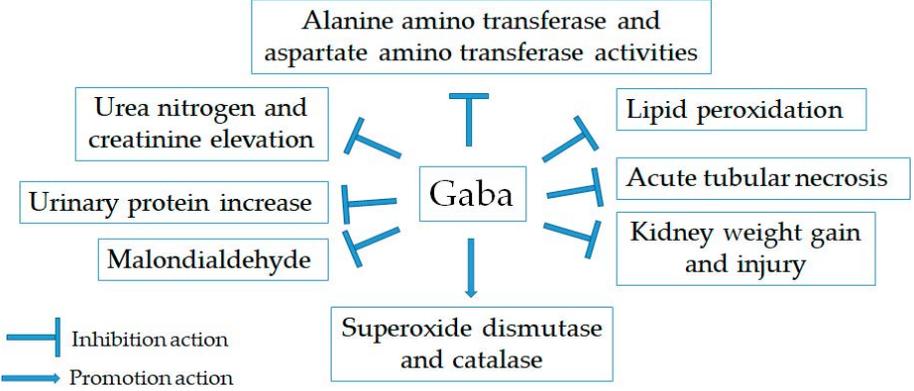
Gambar 22. Mekanisme aksi Gaba untuk Hepatoproteksi

### 5.3.11. Renoprotektif

Cedera ginjal akut terlibat dalam kerusakan ginjal dan kematian sel, menyebabkan morbiditas yang tinggi dan kematian di seluruh dunia (Markis et al., 2016). Agen renoprotektif yang berasal dari produk alami mungkin penting untuk pencegahan atau pengobatan penyakit terkait cedera ginjal. Memang, banyak penelitian telah membuktikan efek perlindungan Gaba terhadap cedera ginjal akut (Gambar 23). Menurut Kim et al. (2004), perubahan fisiologis yang disebabkan oleh gagal ginjal akut seperti berat badan dan berat ginjal peningkatan, peningkatan nitrogen urea dan kreatinin, pengurangan klirens kreatinin, sekresi natrium FE(Na), dan penurunan osmolaritas urin pada tikus secara signifikan ditingkatkan dengan pemberian oral Gaba (Kim et al., 2004).

Selain itu, status albumin serum menurun, protein urin meningkat, dan profil lipid serum benar-benar ditingkatkan oleh Gaba. Selain itu, Gaba mengurangi reaksi oksidatif yang diinduksi nefrektomi stres dengan meningkatkan superoksida dismutase dan katalase, dan menurunkan peroksidasi lipid pada tikus (Sasaki et al 2006). Selanjutnya, Gaba mengurangi fibrosis tubular, atrofi tubular, dan faktor pertumbuhan transformasi-beta1 dan ekspresi fibronektin (Sasaki et al 2007). Nekrosis tubular akut juga tampaknya berkurang menjadi normal kondisi proksimal dengan pengobatan Gaba (Ali et al 2015).

Dalam studi lain, Talebi dan rekan telah menunjukkan efek perlindungan Gaba pada cedera ginjal yang disebabkan oleh iskemia-reperfusion ginjal pada tikus yang diovariectomi melalui penurunan kadar serum kreatinin dan nitrogen urea darah, berat ginjal, dan jaringan ginjal kerusakan (Talebi et al 2016). Sementara itu, peningkatan alanine amino transferase dan aspartate amino transferase aktivitas, tingkat urea dan kreatinin, malondialdehidida dan tingkat protein oksidasi lanjutan, dan kerusakan oksidatif pada jaringan ginjal yang disebabkan oleh -iradiasi- dan tikus yang diberi streptozotocin adalah nyata dilemahkan oleh administrasi Gaba pada tikus (Saada et al., 2016). Terutama, Gaba diamati untuk memperbaiki cedera ginjal yang disebabkan oleh cedera iskemia/reperfusion ginjal dengan cara yang bergantung pada jenis kelamin (Vafapour, et al., 2015). Ini hasil menekankan efek perlindungan Gaba terhadap kerusakan ginjal yang melibatkan gagal ginjal.



Gambar 23. Mekanisme aksi Gaba untuk Renoprotektif

### 5.3.12. Efek Perlindungan Usus

Chen dan rekan telah memeriksa peran menguntungkan dari Gaba pada mukosa usus in vivo (Chen et al., 2014; Chen et al., 2015). Hal ini menunjukkan bahwa ayam yang diinduksi stres panas menurunkan aktivitas Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-ATPase, maltase, sukrase, dan enzim alkaline phosphatase di mukosa usus (Chen et al., 2014). Selain itu, stres panas menyebabkan penurunan yang nyata pada panjang vili, ketebalan mukosa, usus ketebalan dinding, dan kedalaman ruang bawah tanah di duodenum dan ileum (Chen et al., 2015). Namun, pengobatan pemberian Gaba secara nyata meningkatkan aktivitas maltase, sukrase, alkaline phosphatase, dan Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-ATPase (Chen et al 2014). Selanjutnya, Gaba meningkatkan panjang vili, ketebalan mukosa, dinding usus ketebalan, dan kedalaman ruang bawah di duodenum dan ileum (Chen et al., 2015). Ini menunjukkan bahwa Gaba dapat secara efektif mengurangi kerusakan mukosa usus yang disebabkan oleh stres panas.

Dalam studi lebih lanjut, mereka menyelidiki efek suplementasi Gaba pada kinerja pertumbuhan, kekebalan usus, dan mikroflora usus dari anak babi yang disapih (Chenn et al., 2019). Khususnya, suplementasi Gaba meningkatkan kinerja pertumbuhan, menghambatekspresi sitokin proinflamasi (IL-1 dan IL-18), mempromosikan sitokin antiinflamasi (IFN-,ekspresi IL-4, dan IL-10), dan meningkatkan populasi mikroba dominan, kekayaan komunitas, dan keragaman mikrobiota ileum. Di sisi lain, Xie dan rekannya juga menyelidiki efeknya dari Gaba pada kesehatan usus besar pada tikus (Xie et al 2017).

Diamati bahwa tikus Kunming betina diadministrasikan dengan Gaba pada dosis 40 mg/kg/hari selama 14 hari dapat meningkatkan konsentrasi asetat, propionat, butirat, dan total asam lemak rantai pendek, dan penurunan nilai pH pada isi kolon dan sekum. Baru-baru ini, Kubota dan rekan telah mengungkapkan bahwa Gaba melemahkan iskemia yang diinduksi reperfusi perubahan imunitas usus melalui peningkatan sekresi IgA, ekspresi alpha-defensin-5, dan aktivitas superoksida dismutase di usus kecil tikus (Kobuta et al 2015). Selain itu, Jiang dan rekannya juga menunjukkan efek perlindungan Gaba terhadap cedera penghalang mukosa usus kolitis yang disebabkan oleh 2,4,6-trinitrobenzene asam sulfonat dan alkohol (Jiang et al., 2018). Hasil ini telah membuktikan fisiologis fungsi Gaba dalam peningkatan dan promosi kesehatan usus.

## DAFTAR PUSTAKA

- Abbasiliasi, S., J.S. Tan and T.A. Ibrahim. 2012. Isolation of *Pediococcus acidilactici* Kp10 With Ability to Secrete Bacteriocin-Like Inhibitory Substance from Milk Products for Applications in Food Industry. BMC Microbiol. 12:260.
- Abudobos, A., M.S Emad, Samara, E.O.S. Hussein, M.Q. Al-Ghadi, and R.M. Al-Atiyat. 2013. Impacts of Stocking Density on The Performance and Welfare of Broiler Chickens. Italian Journal of Animal Science. 12: 66-71
- Abdou, A.M., S. Higashiguchi, K. Horie, M. Kim, H. Hatta and H. Yokogoshi. 2006. Relaxation and Immunity Enhancement Effects of Aminobutyric Acid (GABA) Administration in Human. Biofactors. 26: 201-208.
- Adam, R., J.R. Johnson and C.F. Wilcox. 1963. *Laboratory Experiments in Organic Chemistry*. The Macmillan Company, New York.
- Adams, M. R. and R. Nout. 2001. *Fermentation and Food Safety*. Aspen Publishers, Washington DC.
- Aengwanich, W. 2009. Comparative Ability to Tolerate Heat Between Thai Indigenous Chickens, Thai Indigenous Chickens Crossbred and Broiler By Using Percentage of Lymphocyte. Int. J. Poult. Sci. 7: 1071-1073
- Afrianto, E. and L. Evi. 1989. *Pengawetan and Pengolahan Ikan*. Penerbit Kanisius, Yogyakarta.
- Al-Ghamdi, Z. H. 2008. Effect of Commutative Heat Stress on Immunoresponses in Broiler Chickens Reared in Closed System System. Int. J. Poult. Sci. 7: 964-968.
- Ali, F.W.O., N. Saari, F.A Bakar, A.S. Abdulamir, A. Mohammed., Y.M.A. Manap., and A.Z. Hidayah. 2009. Novel, Practical and Cheap Source for Isolating  $\gamma$ -Aminobutyric Acid-Producing *Leuconostoc NC5* Bacteria. Research Journal of Medical Science. 3(4): 146-153.
- Anggraini L, 2020. Isolasi Karakterisasi dan Identifikasi Bakteri Asam laktat (BAL) Asal pangan Fermentasi Sumatera Barat Penghasil Gamma Aminobutyric (GABA) Dan Aplikasinya Dalam Menurunkan Stres pada Broiler. Disertasi. Program Studi S3

- Ilmu Pertanian Fakultas Pertanian Universitas Andalas Padang
- Amin, M.A., J. Zakiah and N.L. Khim,. 2004. Effect of Salt on Tempoyak Fermentation and Sensory Evaluation. *Journal of Biology Science*. 4: 650-653.
- Arimbi, I. Arianto, and R Sukamto. 2009. Pengaruh Pemberian Elektrolit and Multivitamin Terhadap Gambaran Patolog Jantung Pada Broiler yang Terpapar Heat Stress Kronis. *Journal of Poultry Disease*. 2(1): 28-32.
- Aughey, E. and F.L. Frye. 2001. *Comparative Veterinary Histology with Clinical Correlates*. London (EN): Manson Publising. p: 252-270.
- Barla, F, K. Takashi. T. Naoko, M. Hiroshi, K. Takane, K. Hidehiko, M. Toshihide, S. Tetsuya, T. Atsushi and E. Toshiki. 2016. The Gamma aminobutyric Acid-Producing Ability Under Low pH conditions of Lactic Acid Bacteria Isolated from Traditional Fermented Foods of Ishikawa Prefecture, Japan, with A Strong Ability to Produce. *Biotechnology Reports*. 10: 105-110.
- Barnett, A.G., S. Hajat, A. Gassparrini and J. Rocklov. 2012. Cold and Heat Wave in Unite States. *Environ. Res*. 112: 218-224.
- Beg, M.A.H., M.A. Baqui, N.R. Sarker and M.M. Hossain. 2011. Effect of Stocking Density and Feeding Regime on Performance of Broiler Chicken in Summer Season. *International Journal of Poultry Science*. 10(5): 365-375.
- Belay, T, R.G. Teeter. 1993. Broiler Water Balance and Thermobalance During Thermoneutral and High Ambient Temperature Exposure. *Poultry Science*. 72: 116-124.
- Bell, C., P. Neaves, and AP. Williams. 2005. *Food microbiology: Laboratory Pratices*. Blackwell Publishing, USA.
- Bell, D.D. and W.D. Weaver Jr. 2002. *Commercial Chicken Meat and Egg Production*. 5 th Ed. Springer Science and Business Media, Inc. Spring Street. New York.
- Berdy, J. 2005. Bioactive Microbial Metabolites A Personal View. *J Antibiot*. 58: 1-26.
- Biase, D. D., A. Tramonti, F. Bossa, and P. Visca. 1999. The Response to Stationary Phase Stress Condition in *Escherichia coli*: Role and Regulation of The Glutamic Acid Decarboxylase System. *Mol. Microbiol*. 32: 1198-1211.
- Biase, D.D and E. Pennacchiotti. 2012. Glutamate Decarboxylase-dependent Acid Resistance in Orally Acquired Bacteria: Function,

- Distribution and Biomedical Implication of The *gadBC* Operon. *Molecular Microbiology*. 86(4): 770-786.
- Bibb, M.J. 2005. Regulation of Secondary Metabolism in *Streptomyces*. *Curr Op Microbiol*. 8: 208-215.
- Bintsis. 2018. Lactic Acid Bacteria: Their Applications in Foods. *Journal of Bacteriology & Mycology*. 6(2): 89-94.
- Bird, N.A., P. Hunton, W.D. Morrison, and L.J. Weber. 2003. *Heat stress in cage layer*. Ontario (Canada): Ministry of Agriculture and Food.
- Birnir, B, and E.R. Korpi. 2007. The Impact of Sub-Cellular Location and Intracellular Neuronal Proteins on Properties Of GABA(A) Receptors. *Curr Pharm*. 13(31): 3169-3177.
- Boonstra R., 2005. Coping with Changing Northern Environment; Role of The Stress Axis in Bird and Mammals. *Integr Comp Biol*. 44: 95-108.
- Bowery, N. G., and B. Bettler. 2002. International Union of Pharmacology XXXIII. Mammalian GABAB receptor: Structure and Function. *Pharmacol Rev*. 54(2): 247-264.
- Bradbury, J.H and W.D. Holloway. 1988. Cassava, *M. esculenta*. *Chemistry of Tropical Root Crops: Significance for Nutrition and Agriculture in The Pacific*. Australian Centre for International Agriculture Research. 6: 76-104
- Braun, M., and R. Ramracheya. 2010. Gamma-aminobutyric Acid (GABA) is An Autocrine Excitatory Transmitter in Human Pancreatic Beta-cells. *Diabetes*. 59(7): 1694-1701.
- Buckle, K.A., R.A. Edwards, G.A. Fleet, and M. Wooton. 1987. *Ilmu Pangan Terjemahan Hari P. and Adiono*. Universitas Indonesia Press. Jakarta.
- Burkovski, A. 2003. Ammonium Assimilation and Nitrogen Control in *Corynebacterium glutamicum* and Its Relatives: An example for New Regulatory Mechanisms in *Actinomyces*. *FEMS Microbiology Reviews*. 27: 617-628.
- Cagno, R.D., F. Mazzacane, C.G. Rizzello, M. De-Angelis, G. Giuliana, M. Meloni, B. De-Servi, and M. Gobetti. 2010. Synthesis of  $\gamma$ -aminobutyric Acid (GABA) by *Lactobacillus plantarum* DSM19463: Functional Grape Must Beverage and Dermatological Applications. *Appl Microbial Biotechnol*, 86. 731-741.
- Cahyono, B. 2004. *Cara Meningkatkan Budidaya Ayam Ras Pedaging (Broiler)*. Pustaka Nusatama. Yogyakarta.

- Cai, H., M. Archambault, and J.F. Prescott. 2003. 16S Ribosomal RNA Sequence-based Identification of Veterinary Clinical Bacteria. *J Vet Diagn Invest.* 15: 465-469.
- Carroll J.A., N.C. Burdick, C.C. Chase, S.W. Coleman and D.E. Spiers. 2012. Influence of Environmental Temperature on the Physiological, Endocrine, and Immune Responses in Livestock Exposed to A Provocative Immune Challenge. *Domestic Anim. Endocrinol.* 43(2): 146-153.
- Chandy, K.G., and H. Wulff. 2004. K<sup>+</sup> Channels as Targets for Specific Immunomodulation. *Trends Pharmacol Sci.* 25(7): 5188-5192.
- Chartrin, P.K. Me´teau, H. Juin, M.D. Bernadet, G. Guy, C. Larzul, H. Re´mignon, J. Mourot, M.J. Duclos, and E. Bae´za. 2006. Effects of Intramuscular Fat Levels on Sensory Characteristics of Duck Breast Meat. *Poultry Sci.* 85: 914-922.
- Chen, Z, J. Xie, B. Wang and J. Tang. 2014. Effect of  $\gamma$ -aminobutyric Acid on Digestive Enzymes, Absorption Function and Immune Function of Intestinal Mucosa in Heat-Stressed Chicken. *Poultry Science.* 93(10): 2490-2500.
- Chen, Z, J. Tang, Y. Q. Sun and J. Xie. 2013. Protective Effect of  $\gamma$ -aminobutyric Acid on Antioxidation Function in Intestinal Mucosa of Wenchang Chicken Induced by Heat Stress. *The Journal of Anim. & Plant Scie.* 23(6): 1634-1641.
- Chen, Z., T. Wang, L. Huang, and D. Fang. 2001. Effects of GABA on The Heat Stress Broilers. *Zoological Research.* 23(4): 341-344.
- Cho Y.R., J.Y. Chang and H.C. Chang. 2007. Production of Gamma-aminobutyric Acid (GABA) by *Lactobacillus Buchneri* Isolated from Kimchi and Its Neuroprotective Effect on Neuronal Cells. *J. Microbiol. Biotechnol.* 17: 104-109.
- Clarridge, J.E. 2004. Impact of 16S rRNA Gene Sequence Analysis for Identification of Bacteria on Clinical Microbiology and Infectious Diseases. *Clinical Microbiol.* 17. 840-862.
- Claus, G.W. 1995. *Understanding Microbes.* 4th ed. W. H. Freeman and Company, New York. p. 547.
- Coda, R., C.G. Rizzello, and M, Gobbetti. 2010. Use of Sourdough Fermentation and Pseudo-cereals and Leguminous Flours for The Making Of A Functional Bread Enriched Of  $\Gamma$ -Aminobutyric Acid (GABA) *Int. J. Food Microbiol.* 137: 236-245.
- Collado, M.C., I.S. Surono, and J. Meriluoto. 2007. Potential Probiotic

- Characteristics of *Lactobacillus* and *Enterococcus* Strains Isolated from Traditional Dadih Fermented Milk Against Pathogen Intestinal Colonization. *J. Food Prot.*, 70(3): 700-705.
- Cooper, M.A., and K.W. Washburn. 1998. The Relationships of Body Temperature to Weight Gain, Feed Consumption, and Feed Utilization in Broilers Under Heat Stress. *Poul. Sci.* 77(2): 237-242.
- Correa, M.M., and A.A. Yousten. 2001. Pulsed-field Gel Electrophoresis for The Identification of Bacteria Causing Milky Disease in Scarab Larvae. *J. Invertebr. Pathol.*, 78: 278-279.
- Daghir. 1995. *Poultry Production in Hot Climates*. CAB Internasional.
- Dai, S.F, F. Gao, W.H. Zhang, S.X. Song, X.L. Xu, and G.H. Zhou. 2012. Effects of Dietary Glutamine and Gamma-aminobutyric Acid on Meat Colour, pH, Composition, and Water-holding Characteristic in Broilers Under Cyclic Heat Stress. *British Poultry Science*, 53(4): 471-481.
- Dai, S.F, F. Gao, W.H. Zhang, S.X. Song, X.L. Xu, and G.H. Zhou. 2011. Effects of Dietary Glutamine and Gamma-aminobutyric Acid on Performance, Carcass Characteristic and Serum Parameters in Broiler Under Circular Heat Stress. *Animal Feed Science and Technology*. 168: 52-60.
- Denbow, D.M. 2015. *Sturkie's Avian Physiology: Gastrointestinal Anatomy and Physiology*. Elsevier Inc. All rights reserved.
- Dharmawan, I.S. Surono, and Y.K. Lee. 2006. Adhesion Properties of Indigenous Dadih Lactic Acid Bacteria on Human Intestinal Mucosal Surface Asian-Australas. *J. Anim. Sci.*, 19(5): 751-755.
- Demain, Al. 1989. *Carbon Source Regulationo Idiolite Biosynthesis. in: Regulation of Secondary Metabolism in Actinomycetes*. Shapiro S Ed. Boca Raton, Fl: CRC Press.
- Demain, A.L, and A. Fang. 2000. The Natural Functions of Secondary Metabolites. In: *Advances in Biochemical Engineering/ Biotechnology: History of Modern Biotechnology I*, Vol 69, Fietcher A. Ed. Berlin: Springer.
- De-Angelis, M, and M, Gobetti. 2004. Environmental Stress Responses in *Lactobacillus*. *A Review Proteomics*. 4: 106-112.
- Djanah, 1985. *Beternak Ayam and Itik*. Jakarta: Yasaguna.
- Dhakal, R., K. Vivek, Baipai, and K.H. Baek. 2012. Production of GABA ( $\gamma$  - Aminobutyric Acid) by Microorganisms: a Review. *Braz J.*

Microbiol, 43(4): 1230-1241.

- Donnell, M.M.O', B.M. Forde, B. Neville, P.R. Ross, and P.W.O' Toole. 2011. Carbohydrate Catabolic Flexibility in The Mammalian Intestinal Commensal *Lactobacillus Ruminis* Revealed by Fermentation Studies Aligned to Genome Annotations. *Microbial Cell Factories*. 10: S12.
- Duna, A.A., D.J. Kilpatrick and N.F.S. Gault. 1993. Effect of Postmortem Temperatur on Chiken in Pectorales. Major: Muscle Shortening and Cooked Meat Tenderness. *J. British Poultry Sci.* 34: 689-697.
- Effendi, M. and Supli. 2012. *Teknologi Pengolahan and Pengawetan Pangan*. Penerbit Alfabet, Bandung.
- Eklund, C. and C.E. Lankford. 1967. *Laboratory Manual for General Microbiology*. Prentice-Hall International, Inc., London. pp. 299.
- El-Boushy, A.R., and A.L. Van Morle. 1978. The Effect of Climate on Poultry Physiology in The Tropic and Their Improvement. *World's Poultry Sci.* 34: 155-169.
- Erdo, S. L. and J. R. Wolff. 1990. Gamma-amminobutyric Acid Outside The Mammalian Brain. *J. Neurochem.* 54(2): 363-372.
- Esmaeili, A., and K. Ghaed. 2010. GABAA Receptors As Novel Drug Targets for Treatment of Mental Disorders. *J Paramedi. Sci.* 1: 50-61.
- Etches, S. A. C. Donal, J. Lay and E.V. Borrel. 2008. Behavioural, physiological, neuroendocrine and Molecular Responses to Heat Stress. In: Dagher NJ, editor. *Poult Prod Hit Clim.* p. 49-69.
- Fachrial, Edy. 2014. Isolasi, Aktivitas Antimikroba, Karakterisasi Bakteriosin and Identifikasi Molekular 16S rRNA Bakteri Asam Laktat dari Daduh Asal Kabupaten Solok Selatan Sumatera Barat. Tesis. Program Pascasarjana Universitas Andalas.
- Fadillah, R., A. Polana, S. Alam, and E. Purwanto. 2007. *Sukses Beternak Ayam Broiler*. Agromedia Pustaka. Jakarta.
- Fanatico, A.C., P.B. Pillai, J.L. Emmert, and C.M. Owens. 2007. Meat quality of slow- and fastgrowing chicken genotypes fed low-nutrient or standard diets and raised indoors or with outdoor access. *Poultry Sci.* 86: 2245-2255.
- Feddes, J.J.R., E.J. Emmanuel, and M.J. Zuidhof. 2002. Broiler Performance, Bodyweight Variance, Feed and Water Intake, and Carcass Quality at Different Stocking Densities. *Poultry Science.* 81. 774-79.

- Felsenstein, J. 1985. Confidence Limits on Phylogenies: An Approach Using The Bootstrap. *Evolution*. 39(4): 783-791.
- Feng, Y., X. J. Yang, Y. B. Wang, W. L. Li, Y. Liu, R. Q. Yin and J. H. Yao. 2012. Effect on Immune Stress on Performance Parameters Intestinal Enzyme Activity and mRNA Expression of Intestinal Transport in Broiler Chicken. *Asian-australas. J. Anim. Sci.* 25: 701-707.
- Firth, G.A. 1977. The Normal Lymphatic System of The Domestic Fowl. *Vet. Bull.* 47: 167-179.
- Fletcher, D.L. 1999. Broiler Breast Meat Color Variation, pH, and Texture. *Poultry Sci.* 78: 1323-1327.
- Fluck, E., S. Hogg, R. Bryan, R. Bourne and E. Sandra. 1997. Changes in Tonic Immobility and The GABA-Benzodiazepine System in Response to Handling in The Chick. *Pharm. Biochem. Behav.* 58: 269-274.
- Foegeding, E.A., T.C. Lanier and H.O. Hultin. 1996. Characteristics of Edible Muscle Tissues. *Pada Food Chemistry*. Ed. O.R. Fennema. Marcel Dekker, Inc., New York.
- Forrest, J.C., E.B. Aberle, H.B. Hedrick, M.D. Judge, and R.A. Merkel. 1975. *Principles of Meat Science*. W.H. Freeman and Co., San Fransisco.
- Fuller, H.L. and M. Rendon. 1977. Energetic Efficiency of Different Dietary Fats for Growth of Young Chicks. *Poultry Poultry Sci.* 56: 549.
- Fu, W., and A.P. Mathews. 1999. Lactic acid production from lactose by *Lactobacillus plantarum*: kinetic model and effects of pH, substrate, and oxygen. *Biochemical Engineering Journal*. 3.
- Garrity, G. M. 2005. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology The Proteobacteria* 2nd ed. New York: Springer. pp. 2816.
- Geraert, PA, J.C. Padilha and S. Guillaumin. 1996. Metabolic and Endocrine Changes Induced by Chronic Heat Exposure in Broiler Chickens: Biological and Endocrinological Variables. *Br. J. Nutr.* 75: 205-216.
- Gladkevich, A., and J. Korf. 2006. The Peripheral GABAergic System as A Target in Endocrine Disorder. *Auton Neurosci.* 124: 1-8.
- Glick, B. 2000. *Immunophysiology*. In Whittow G.C., editor. *Sturkie's Avian Physiology*. 5th ed. London: academic Press. p. 658-659.
- Glick, B. 1994. *The Burca of Fabricus: The Evolution of A Discovery*.

- Poultry Sci., 73: 979-983.
- Glick, B.R., J.J. Pasternak and C.L. Patten. 2010. *Molecular Biotechnology: Principles and Applications of Recombinant DNA*. 4 ed. Washington, DC: ASM Press.
- Ghosh, Sarbaswarup, Debasis M., and G. Rupak. 2012. Broiler Performance at Different Stocking Density. *Indian J. Anim.* 46(4): 381-384.
- Gitawati. 2008. Interaksi Obat and Beberapa Implikasinya. *Media Litbang Kesehatan*. 18(4): 175-184.
- Gregory, N. G and T. Grandin. 1998. *Animal Welfare and Meat Science*. CABI Publishing, New York.
- Guardia, S., B. Konsak, S. Combes, F. Levenez, L. Cauquil, J. F. Guillot, C. Moreau Vauzella, M. Lessire, H. Juin, I. Gabriewl. 2011. Effect of Stocking Density on Growth Performance and Digestive Microbiota of Broiler Chickens. *Poultry Sci.* 90: 1878-1889.
- Gunawan and D.T.H. Sihombing. 2004. Pengaruh Suhu Lingkungan Tinggi Terhadap Kondisi Fisiologis and Produktivitas Ayam Buras. *Wartazoa*. 14(1).
- Gupta, G., S. Srivastava, S.K. Khare, and V. Prakash. 2014. Extremophiles: an overview of microorganism from extreme environment. *International Journal of Agriculture, Environment and Biotechnology*. 7(2).
- Guyton, A.C. 1976. *Fisiologi Kedokteran*. Trans by: Adji Dharma and P. Lukmanto. CV. EGC. Penerbit Buku Kedokteran, Jakarta.
- Han, D., Kim H.Y., H.J. Lee and I. Shim. 2007. Wound Healing Activity of Gamma-Aminobutyric Acid (GABA) in Rats. *J. Microbiol Biotechnol* 17: 1661-1669.
- Harimurti, S., E. S. Rahayu, N. Nasroedin, and K. Kurniasih. 2005. Bakteri Asam Laktat Intestine Ayam sebagai Agensi Probiotik. *Anim. Prod.* 9: 82-91.
- Hassan, S.A., Al-Tememy, J.I.S. Hussein and B.S. Rasool. 2011. Histological Study on Bursa of Fabricius of Quail birds (*Coturnix coturnix japonica*). *Egypt Poult Sci.* 31(11): 613-620.
- Heckert, R.A., I. Estevez, E.R. Cohen and R.P. Riley. 2002. Effects of Density and Perch Availability on The Immune Status of Broilers. *Poultry Science*, 81: 451-457.
- Henry, D.E., P.M. Halami and S.G. Prapulla. 2015. *Lactobacillus*

- plantarum* mcc2034, a novel isolate from Traditional Indian Lactic Fermented Preparation: Molecular Identification and Evaluation of Its In Vitro Probiotic Potential. *J Microbiol Biotechnol Food Sci.* 4(4): 328-331.
- Higuchi, T., H. Hayashi and K. Abe. 1997. Exchange of Glutamate and Gamma-Aminobutyrate in a *Lactobacillus* strain. *J. Bacteriology.* 179: 3362-3364.
- Hiraga, K., Y. Ueno, and K. Oda. 2008. Glutamate Decarboxylase from *Lactobacillus brevis*: Activation by Ammonium Sulfate. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry.* 72(5): 1299-1306.
- Hosseini, E., J. Cheraghi, S.S. Taheri, K. Taherpour, K.Z. Kaviani and L. Rezazadeh, 2013. Thyroid Hormones Investigation Under Heat Stress in Broilers Administered with Probiotic (BIO-SAF) and Prebiotic (BIO-MOS). *Eur. J. Exp. Biol.* 3: 562-567.
- Hugenholtz, P., Brett M. Goebel, and Norman R. Pace. 1998. Impact of Culture-Independent Studies on The Emerging Phylogenetic View of Bacterial Diversity. *J Bacteriol.* 80(18): 4765-4774.
- Hu, Y. X., C. Xiao, R. P. She, F. M. Zhang, Y. J. Guo, D. Luo, and F.H. Liu. 2009. Effect of Heat Stress on Structure and Function of Pigs Intestines. *Si. Technol. Eng.* 9: 581-585.
- Huang, J., L. Mei, H. Wu and D. Lin. 2007. Biosynthesis of  $\gamma$ -aminobutyric acid (GABA) Using Immobilized whole Cells of *Lactobacillus brevis*. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 23: 865-871
- Huda, N. and R. Ahmad. 2006. Budu and Tukai-endemic Fermented Fish Products from West Sumatera. *INFOFISH Int.* 3. 2006. ISSN 15115976.
- Hutkin, R. W. 2006. *Microbiology in Technology of Fermented Foods*. IFT Press. Blackwell Publishing Ltd. Iowa.
- Ibrahim, S., and M. Sitorus. 2013. *Teknik Laboratorium Kimia Organik*. Yogyakarta: Graha Ilmu. Hal. 135.
- Inoue, K., T. Shirai, H. Ochiai, M. Kasao, K. Hayakawa, M. Kimura and H. Sansawa. 2003. Blood-pressure-lowering Effect of a Novel Fermented Milk Containing Gamma-Aminobutyric Acid (GABA) in Mild Hypertensives. *Eur J. Clin. Nutr.* 57: 490-495.
- Iskandar, S., S.D. Setyaningrum, Y. Amanda and I. Rahayu. 2009. Pengaruh Kepadatan Kaandg Terhadap Pertumbuhan and Perilaku Ayam Wareng-Tangerang Dara. *JITV.* 14(1) 19-24.
- Isnawati and G. Trimulyono. 2018. Temperature Range and Degree of

- Acidity Growth of Isolate of Indigenous Bacteria on Fermented Feed "Fermege". The 2nd International Joint Conference on Science and Technology (IJCST). J. Phys.: Conf. Ser. 953 012290.
- Ito, K., K. Tanaka, Y. Nishibe, J. Hasegawa. 2007. GABA-synthesizing Enzyme, GAD67, from Dermal Fibroblasts: Evidence for a New Function. *Biochim Biophys Acta*. 1770: 291-296.
- Jamsari. 2007. *Bioteknologi Pemula: Prinsip Dasar and Aplikasi Analisis Molekuler*. Unri Press.
- Jin, Z., K.M. Suresh and B. Bryndis. 2011. GABA is an Effective Immunomodulatory Molecule. *Amino Acids*. 45(1) 87-94.
- Johnston, G. A. 2005. GABAA Receptor Channel Pharmacology. *Curr. Pharm. Des* 11(15): 1867-1885.
- Jonaidi, H., V. Babapour and D. Denbo. 2002. GABAergic Control of Food Intake in the Meat-Type Chickens. *Physiol. & Behav*. 76: 465-468.
- Jonaidi, H., and Z. Noori. 2012. Neuropeptide Y-induced Feeding is Dependent on GABAA Receptors in Neonatal Chicks. *J Comp Physiol A* 198: 827-832.
- Judge, M.D., E.D. Aberle, J.C. Forrest, H.B. Hedrick and R.A. Merkel 1989. *Principle of Meat Science*. 2nd Ed. Kendal/Hunt Publishing Co., Dubuque, Iowa.
- Kato, S., H. Araki and S. Kawauchi. 2001. Body Temperature Dependence in Baclofen-Induced Gastric Acid Secretion in Rats Relation to Capsaicin Sensitive Afferent Neurons. *Life Sci*. 68: 1951-1963.
- Kim, S. J., J. Chang, and M. Singh. 2015. Peptidoglycan Architecture of Gram-positive Bacteria by Solid-state NMR. *Biochimica Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes*. 1848: 350-362.
- Kim, J.Y., E.J. Geun, S.L. Yeon and T.H. Keum. 2009. Production of  $\gamma$ -Aminobutyric Acid in Black Raspberry Juice During Fermentation by *Lactobacillus brevis* GABA100. *International J. Food Microbila*. 130: 12-16.
- Ketsa, S. and T. Daengkanit. 1998. Physiological Changes During Postharvest Ripening of Durian Fruit (*Durio zibethinus*). *J. Hort. Sci. Biothecnol*. 73: 575-577.
- Khalid, K. 2011. An Overview of Lacti Acid Bacteria. *International Journal of Biosciences*. 1(3): 1-17.
- Khan, R.U., V. Laudadio and V. Tufarelli. 2012. Semen Traits and Seminal Plasma Biochemical Parameters in White Leghorn Layer

- Breeders. Rep. Dom. Anim 37: 190-195.
- Khan, R.U., S. Naz, Z. Nikousefat, V. Tufarelli, M. Javaandi, N. Rana, and V. Laudadio. 2011. Effect of Vitamin E in Heat-stressed Poultry. *J. World Poultry Sci.* 67(3): 469-478.
- Komatsuzaki, N., J. Shima,, S. Kawamoto, H. Momose, and K. Kimura. 2005. Production of  $\gamma$  amino Butyric Acid (GABA) by *Lactobacillus paracasei* Isolated from Traditional Fermented Foods. *Food Microbiol.* 22: 497-504.
- Komatsuzaki, N., T. Nakamura, T. Kimura and J. Shima, 2008. Characterization of glutamate decarboxylase from a high gamma-aminobutyric acid (gaba)-Producer, *Lactobacillus paracasei*. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 72: 278-285.
- Kook, M.C. and S.C. Cho. 2013. Production of GABA (gamma amino butyric acid) by Lactid Acid Bacteria. *Korean Journal Food and Science.* 3(3): 377-387.
- Kook, M.C., M.J. Seo, C.I. Cheigh, Y.R. Pyun, S.C. Cho and H. Park. 2010. Enhanced Production of  $\gamma$  -Aminobutyric Acid Using Rice Bran Extracts by *Lactobacillus sakei* B2-16. *J. Microbiol. Biotechnol.* 20(4): 763-766.
- Koppenhöfer, A. M., T.A. Jackson and M.G. Klein. 2012. Bacteria for Use Against Soil-inhabiting Insects. *Manual of Techniques in Invertebrate Pathology.* p. 129-140.
- Krogh, T.H. 2000. Wrong Climate May Result in Loss of Production. *Skov A/S Opslag-Artikel.* 71.
- Kumala, S, A.T. Dewi and Y.A. Nugroho. 2013. Efek Imunostimulan Ekstrak Etanol Herba Pegagan (*Centell asiatica*) terhadap 169 Mencit Jantan yang Diinduksi Sel Darah Merah Domba. *J Med Vet Indones.*
- Kumar, S., G. Stecher, and K. Tamura. 2016. MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 7.0 for bigger datasets. *Mol Biol Evol.* 2016; 33(7): 1870-1874.
- Kuncoro, D.M. and M. Saribi. 1984. *Makanan Non Beras.* Penerbit Pustaka Dian, Jakarta.
- Kusnai, E. 2009. Perubahan Malonaldehida Hati, Bobot Relatif Bursa Fabricius and Rasio Heterofi l/Limfosit (H/L) Ayam Broiler yang Diberi Cekaman Panas. *Media Peternakan.* 32: 81-87.
- Laurie, D.J., P.H. Seeburg and W. Wisden. 1992. The Distribution of 13 GABAA Receptor Subunit mRNAs in The Rat Brain. II. Olfactory

- bulb and cerebellum. *J Neurosci.* 12(3): 1063-1076.
- Lara, L.R. and M.H. Rostagno. 2013. Impact of Heat Stress on Poultry Production. *Animals.* 3: 356-369.
- Lawrence, T.E., M.E. Dikeman, M.C. Hunt, C.L. Kastner and D.E. Johnson. 2004. Effects of Enhancing Beef Longissimus with Phosphate Plus Salt, or Calcium Lactate Plus Non-Phosphate Water Binder Plus Rosemary Extract. *Meat Science.* 67: 129-137.
- Lawrie, R.A. 2003. *Ilmu Daging* Terjemahan Aminuddin P. 5nd Ed. Penerbit Universitas Indonesia Press, Jakarta
- Lawrie, R.A. 1996. *Ilmu Daging* Terjemahan Aminuddin P. Penerbit Universitas Indonesia Press, Jakarta.
- Lee, B.J., J.S. Kim, Y.M. Kang, J.H. Lim, Y.M. Kim, M.S. Lee, M.H. Jeong, C.B. Ahn and J.Y. Je. 2010. Antioxidant Activity and  $\gamma$ -aminobutyric Acid (GABA) Content in Sea Tangle Fermented By *Lactobacillus Brevis* BJ20 Isolated from Traditional Fermented Foods. *Food Chem.* 122(1): 271-276.
- Lei, Z., T. Jiewei, Q. Peng, W. Lei, L. Xiufeng, Z. Shuai, Z. Zhigang and T. Yongqiang. 2014. Research Article Biosynthesis of Gamma-aminobutyric Acid by Induced Resting Cells of *Lactobacillus brevis* SIIA11021. *J. of Chem. and Pharma. Resea.* 6(12): 342-348.
- Leisner, J.J., M. Vancanneyt, G. Rusul, B. Pot, K. Levebvre, A. Fresi and L.K. Tee. 2001. Identification of Lactic Acid Bacteria Constituting The Predominating Microflora in Acid-Fermented Condiment (*tempoyak*) Popular in Malaysia. *International Journal of Food Microbiology.* 63: 149-157..
- Leoangraini, U. and B.I. Muhadi. 2011. Fermentasi Mikroaerofilik *Lactobacillus acidophilus* untuk Produksi Probiotik. Industrial Research Workshop and National Seminar.
- Lesson, S. 2000. Feed efficiency Still a Usefull Measure of Broiler Performance. Department Animal and Poultry Science. University of Guelph. Ontario.
- Leeson, S, and J.D. Summers. 1991. *Commercial Poultry Nutrition.* Montreal: University Books. p. 400.
- Li, H., D. Gao, Y. Cao and H. Xu. 2008. A High  $\Gamma$ -Aminobutyric Acid-Producing *Lactobacillus Brevis* Isolated from Chinese Traditional Paocai. *Ann. Microbiol.* 58(4): 649-653.
- Li, H., T. Qiu, D. Gao and Y. Cao. 2010a. Medium Optimization for Production of Gamma-aminobutyric Acid by *Lactobacillus brevis*

- NCL912. *Amino Acids*. 38: 1439-1445.
- Li, H., T. Qiu, G. Huang and Y. Cao. 2010b. Production of Gamma-aminobutyric Acid by *Lactobacillus brevis* NCL912 Using Fed-batch Fermentation. *Microb. Cell Fact.* 9: 85.
- Li, W.L., J. Lu, and Z.J. Sun. 2011. Effects of Glutamate on Antioxidation Function of Broiler Under Heat Stress. *Chin. J. Anim. Nutr.* 23(4): 695-702.
- Li, W., W. Mingming, W. Junjun, R. Xin and D. Mingsheng. 2016. Novel Fermented Chickpea Milk with Enhanced Level of  $\gamma$ -aminobutyric Acid and Neuroprotective Effect on PC12 Cells. *PeerJ.* 4: 2292.
- Li, Y.H., F. Li, M. Liu, J.J. Yin, B.J. Cheng, B.M. Shi and A.S. Shan. 2015. Effect of  $\gamma$ -aminobutyric Acid on Growth Performance, Behavior and Plasma Hormones in Weaned Pigs. *Canadian J Anim. Sci.* 95: 165-171.
- Lin, Q. 2013. Submerged Fermentation of *Lactobacillus rhamnosus* YS9 for Gamma-aminobutyric acid (GABA) Production. *Brazilian Journal of Microbiology.* 44(1): 183-187.
- Lokapirnasari, W. P., M.S. Adriana, T. Nurhajati, S. Koesnoto and B.Y. Andreas. 2017. Sekuensing 16S DNA Bakteri Selulolitik Asal Limbah Cairan Rumen Sapi Peranakan Ongole. *Jurnal Veteriner.* 18(1): 76-82.
- Lott, B.D., J.D. Simmons and J.D. May, 1992. An Automated Feed and Water Consumption Measuring System for Poultry Research. *Appl. Eng. Agric.* 8: 521-523.
- Lu, Q., J. Wen, and H. Zhang. 2007. Effect of Chronic Heat Exposure on Fat Deposition and Meat Quality in Two Genetic Types of Chicken. *Poultry Science.* 86: 1059-1064.
- Lu, X., C. Xie and Z. Gu. 2009. Optimisation of Fermentative Parameters for GABA Enrichment by *Lactococcus lactis*. *Czech. J. Food Sci.* 27(6): 433-442.
- Lu, X., C. Xie and Z. Gu. 2008. Isolation of  $\gamma$ -aminobutyric Acid-producing Bacteria and Optimization of Fermentative Medium. *Biochem. Eng. J.* 41: 48-52.
- Macdonald, R.L. and R.W. Olsen. 1994. GABAA Receptor Channels. *Annu. Rev. Neurosci.* 17: 569-602.
- Marlida, Y., Harnentis, and Nurmiati. Isolation and Screening of Lactic Acid Bacteria from Dadih For Glutamic Acid production as Precursor of  $\gamma$ -Amino Butyric Acid (GABA) Induced Heat Stress

- in Broiler. *Int. J Chem. Tech. Research.* 9: 534-540.
- Marshall, F. H, K.A. Jones, K. Kaupmann and B. Bettler. 1999. GABAB receptors: the first 7TM heterodimers. *Trends Pharmacol Sci.* 20(10): 396-399.
- May, J. D., and B.D. Lott. 1992. Feed and Water Consumption Patters of Broilers at High Environmental Temperatures. *Poultry Science.* 71: 331-336.
- Mckee, S.R. and A.R. Sams. 1997. The Effect of Seasonal Heat Stress on Rigor Development and The Incidence of Pale, Exudative Turkey Meat. *Poultry Science.* 76: 1616-1620.
- McMichael A.J. and B.G. Keith. 2010. Climate change: Heat, Health, and Longer Horizon. *PNAS.* 107(21): 9483-9484.
- Mench, J.A. and I.J.H. Duncan. 1998. Poultry welfare in North America: Opportunies and Challenges. *Poultry Sci.* 77: 1763-1765.
- Miller, J.H. 2001. DNA Sequencing. *Encyclopedia of Genetics.* 572.
- Montagnac, J.A., C.R. Davis and S.A. Tanumihardjo. 2009. Nutritional Value of Cassava for Use as A Staple Food and Recent Advance for Improvement. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety.* 8(3): 181-194.
- Monk, J.Y.S., C.J. Vink, L.M. Winder, M.R.H. Hurst and M. O'Callaghan. 2010. DNA Q-PCR and High-Resolution DNA Melting Analysis for Simple and Efficient Detection of Biocontrol Agents. In H.J. Ridgway, T.R. Glare & S.A. Wakelin (Eds.), *Paddock to PCR: Demystifying Molecular Technologies for Practical Plant Protection. Proceedings of an International Symposium held 9 August 2010.* (pp. 117e124). New Plymouth, New Zealand. Lincoln, New Zealand, New Zealand Plant Protection Society.
- Mora, D., M.G. Fortina and C. Parini. 1997. Identification of *Pediococcus acidilactici* and *Pediococcus pentosaceus* Based on 16s rRNA and *ldhD* Gene-targeted Multiplex PCR analysis. *FEMS Microbiol Lett.* 151(2): 231-236.
- Morita, R.Y., and C.L. Moyer. 2001. *Psychrophiles. Encyclopedia of Biodiversity.* John Wiley & Sons Ltd
- Morteza, Z., B. Vahhab, and J. Hossein. 2008. Effect of Central Histamine Receptors Blockade on GABAA Agonist-Induced Food Intake in Broiler Cockerels. *Pakistan Journal of Biological Sciences.* 11(3): 416-421.
- Mulyantini, NGA. 2011. *Produksi Ternak Unggas.* IPB Press.

- Munck, B.G., L.K. Munck, S.N. Rasmussen and A. Polache. 1994. Specificity of the Imino Acid Carrier in Rat Small Intestine. *Am. J. Physiol.* 266: 1154-1161.
- Muralidharan, K. and D. Nair. 2013. Coconut Neera – The Hidden Unexplored Treasure. *Indian Coconut Journal.* p. 4-8
- Murray, R.K, D.K. Granner, P.A. Mayes and V.W. Rodwell. 2003. *Harper's Illustrated Biochemistry.* 23th edition. McGraw-Hill Companies, Inc. United States of America.
- Murray, R.K, D.K. Granner, P.A. Mayes and V.W. Rodwell. 1995. *Biokimia Harper.* Edisi ke-22. Alih bahasa dr. Andry Hartono. Editor Devy H. Ronardy, dr. Jonatan Oswar. Penerbit Buku Kedokteran EGC. Jakarta.
- Mustafa, H., I. Rachmawati, and Y. Udin. 2016. Pengukuran Konsentrasi and Kemurnian DNA Genom Nyamuk *Anopheles barbirostris.* *Jurnal Vektor Penyakit.* 10(1): 7-10.
- Nacher, A., A. Pache, M.J. Moll-Navarro, J.M. Pla-Delfina and M. Merino. 1994a. Intestinal Absorption Pathway of  $\gamma$ -aminobutyric Acid in Rat Small Intestine. *Biopharm. Drug Disposition.* 15: 359-371.
- Nacher, A., A. Polache, M.J. Moll-Navarro, J.M. Pla-Delfina and M. Merino. 1994b. Influence of  $\gamma$ -aminobutyric Acid on Baclofen Intestinal Absorption. *Biopharm. Drug Disposition.* 15: 371-382.
- Nasreen, Z., T. Jameel, A. Hasan, N. Parveen and B. Sadasivudu. 2010. Glutamate Decarboxylase and GABA Aminotransferase Levels in Different Regions of Rat Brain on the Onset of Leptazol Induced Convulsions. *Neurochem. Res.* 37: 202-204.
- Neal, M.J., J.R. Cunningham, M.A. Shah and S. Yazulla. 1989. Immunocytochemical Evidence that Vigabatrin in Rats Causes GABA Accumulation in Glial Cells of The Retina. *Neurosci Lett.* 98(1): 29-32.
- Nesheim, M.C., R.E. Austic and L.E. Card. 1979. *Poultry Production.* 12 Edition. Lea and Febiger. Philadelphia.
- Ngoka, D.A. and G.W. Froning. 1982. Effect of Free Struggle and Preslaughter Excitement on Color of Turkey Breast Muscles. *Poultry Sci.* 61: 2291-2293.
- Nomura, M., H. Kimoto, Y. Someya, S. Furukawa and I. Suzuki. 1998. Production of  $\gamma$ -Aminobutyric Acid by Cheese Starter During Cheese ripening. *J. Dairy Sci.* 81: 1486-1491.
- Nomura, M., I. Nakajima, Y. Fujita, M. Kobayashi, H. Kimoto, I. Suzuki,

- and H. Aso. 1999. *Lactococcus lactis* Contains Only One Glutamate Decarboxylase Gene. *Microbiology*. 145: 1375-1380
- Nuraida, L. 2015. A review: Health Promoting Lactic Acid Bacteria in Traditional Indonesian Fermented Food. *Food Science and Human Wellness*. 4: 47-55.
- Oberman, H., and Z. Libudzisz, 1998. *Microbiology of Fermented Foods* In: B.J.B Wood (Ed.). Blackie Academic & Professional. London.
- Oh, H.M. and A. Rao. 2008. Calcium Signaling in Lymphocytes. *Curr Opin Immunol*. 20(3): 250-258.
- Ohnishi, Y., H. Yamazaki, J. Kato, A. Tomono and S. Horinouchi. 2005. AdpA, a Central Transcriptional Regulator in A-factor Regulatory Cascade that Leads to Morphological Development and Secondary Metabolism in *Streptomyces griseus*. *Biosci Biotechnol Biochem*. 69: 431-439.
- Oliver, S.R., N.A. Phillips, V.L. Novosad, M.P. Bakos, E.E. Talbert and T.L. Clanton. Hyperthermia Induces Injury to The Intestinal Mucosa in the Mouse: Evidence for an Oxidative Stress Mechanism. *Amer. J. Physiol*. 7(15): 144-149.
- Olsen, R.W. and W. Sieghart. 2008. Subtypes of Gamma-aminobutyric Acid(A) Receptor: Classification on The Basis of Function and Pharmacology. *Neuropharmacology*. 56(1): 141-148.
- Olsen, R.W. and W. Sieghart. 2009 GABAA Receptors: Subtypes Provide Diversity of Function and Pharmacology. *Neuropharmacology*. 56: 141-148.
- Olsen, R.W. and M.D. Timothy. 1999. GABA Synthesis, Uptake and Release. *Basic Neurochemistry: Molecular, Cellular and Medical Aspects*. 6th edition. Philadelphia. Lippincott-Raven.
- Ordway, G.A and D.J. Garry. 2004. Myoglobin: an Essential Hemoprotein in Striated Muscle. *J. Exp. Biol*. 2007: 3441-3446.
- Osman, A. 1993. Effect of The Stocking Rate on Growth Performance, Carcass Traits and Meat Quality of Male Peking Ducks. *Der Tropenlandwirt-cJournal of Agriculture in the Tropics and Subtropics*. 94: 147-156.
- O'Sullivan, D.J. *Methods for Analysis of The Intestinal Microflora*. 2000. *Curr Issues Intest Microbiol*. 1: 39-50.
- Panyi, G.Z. and Varga. 2004. Ion Channels and Lymphocyte Activation. *Immunol Lett*. 92: 55-66.

- Park, B.K-T, J. Kibbeum, N. Jungok, O. Mihyang, J.Y. Suk, J. Younghye and H. Jong-Kwon. 2016. Effects of Gamma Aminobutyric Acid and Yeast Culture on Performance Blood Cell of Broiler Subjected to Multi-Stress Environments. *Global Journal of Science Frontier Research: Agriculture and Veterinary*. 16(1).
- Park, K.B and S.S. Oh. 2005. Production and Characterization of GABA Rice Yogurt. *Food Sci. Biotech.* 14: 518-522.
- Pato, U. and I.S. Suron. 2013. Bile and Acid Tolerance of Lactic Acid Bacteria Isolated from *Tempoyak* and Their Probiotic Potential. *Int. J. Agric. Technol.* 9(7): 1849-1862.
- Payne, L.N. 1971. The lymphoid system. In: *Physiology and biochemistry of The Domestic Fowl*. D. J. Bell and B. M. Freeman, eds. Academic Press, London. 2: 985-1037.
- Pelezar, M.J., and E.C.S. Chan. *Dasar-dasar Mikrobiologi*, Penerjemah Ratna Siri Hadioetomo, Teja Imas, S. Sutarmi Tjitrosomo, Sri Lestari Angka. Penerbit Universitas Indonesia. Jakarta.
- Petracci, M., M. Betti, M. Bianchi and C. Cavani. 2004. Color Variation and Characterization of Broiler Breastmeat During Processing in Italy. *Poultry Science*. 83: 2086-2092.
- Pilas, B. and G. Durack. 1997. A flow Cytometric Method for Measurement of Intracellular Chloride Concentration in Lymphocytes Using the Hali Despecific Probe 6-methoxy-N-(3-sulfopropyl) Quinolinium (SPQ). *Cytometry*. 28(4): 316-322.
- Porto, M.C., T.M. Kuniyoshi and P.O. Azevedo. 2017. *Pediococcus spp.*: An Important Genus of Lactic Acid Bacteria and Pediocin Producers. *Biotechnol Adv.* 35(3): 361-374.
- Puvadolpirod, S. and J.P. Thaxton. 2000. Model of Physiological Stress in Chickens. Dosimetry of Adrenocorticotropin. *Poultry Sci.* 79: 370-376.
- Puron, D., R. Santamaria, J.C. Segaura, and J.L. Alamilla. 1995. Broiler Performance at Different Stocking Densities. *J. Appl. Poult. Res.* 4: 55-60.
- Qiao, M, D. Fletcher, D. Smith, J. Northcutt. 2001. The Effect of Broiler Breast Meat Color on pH, Moisture, Water-holding Capacity, and Emulsification Capacity. *Poult Sci.* 80(5): 676-680.
- Rhee, S.J., J-E. Lee, C-H. Lee. 2011. Importance of Lactic Acid Bacteria in Asia Fermented Foods. *Proceedings 10th Symposium on Lactic Acid Bacterium*.

- Riddle, C. 1987. Avian Histopathology. American Association of Avian Pathologists, Inc. Pennsylvania.
- Rizal, Y. and G. Wu. 2012. *Metabolisme Protein and Asam Amino*. Andalas University Press. Padang.
- Rizal, Y. 2015. *Ilmu Nutrisi Ternak Unggas*. Andalas University Press. Paandng.
- Rizzello C.G., A. Cassone., R.D.I. Cagno and M. Gobbetti. 2008. Synthesis of Angiotensin I-Converting Enzyme (ACE)-Inhibitory Peptides and  $\gamma$ -Aminobutyric Acid (GABA) During Sourdough Fermentation by Selected Lactic Acid Bacteria. *J. Agric. Food Chem.* 56: 6936-6943.
- Roberts, E. and K. Kuriyama .1968. Biochemical-physiological correlations in studies of gamma-aminobutyric acid system. *Brain Res* 8.
- Rogers, K. 2011. *New Thinking About Genetics*. New York: Britannica Educational Publishing. p. 132
- Rose, S.P. 1997. *Principles of Poultry Science*. London: CAB International.
- Ruiz, B., A. Chávez, A. Forero, Y. García-Huante, A. Romero, M. Sánchez, and E. Langley. 2010. Production of Microbial Secondary Metabolites: Regulation by the Carbon Source. *Critical Reviews in Microbiology*. 36(2): 146-167.
- Sahin, N., C. Orhan, M. Tuzcu, K. Sahin and O. Kucuk. 2007. The effect of Tomato Powder Supplementation on Performance and Lipid Peroxidation in Quail. *Poultry Sci.* 87: 276-283.
- Saitou, N., M. Nei. 1987. The Neighbor-Joining Method: a New Method for Reconstructing Phylogenetic Trees. *Mol Biol Evol.* 4(4): 406-425.
- Sams, A.R. 2001. *Poultry Meat Processing*. CRC Press. Washington D. C.
- Sarasa, S.B., R. Mahendran, G. Muthusamy, B. Thankappan, D.R.F. Selta and J. Angayarkanni. 2019. A Brief Review on the Non-protein Amino Acid, Gamma-amino Butyric Acid (GABA): Its Production and Role in Microbes. *Current Microbiology*. Desember: 2019.
- Sanders, J.W., K. Leenhouts, J. Burghoorn, J.R. Brands, G. Venema, and J. Kook. 1998. A Chloride-Inducible Acid Resistance Mechanism in *Lactococcus lactis* and Its Regulation. *Mol. Microbiol.* 27: 229-310.

- Sarwono and Saragih. 2001. *Membuat Aneka Tahu*, Jakarta: Penebar Swadaya.
- Savijoki, K., H. Ingmer and P. Varmanen. 2006. Proteolytic Systems of Lactic Acid Bacteria. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 71: 394-406.
- Schiraldi, C., and M.D. Rosa. 2014. Mesophilic Organisms. *Encyclopedia of Membranes*.
- Schmid-Schonbein, G. W. and M. Chang. 2014. The Autodigestion Hypothesis for Shock and Multi Organ failure. *Ann. Biomed. Eng.* 42: 405-414.
- Schousboe, A. and H.S. Waagepetersen. 2007. GABA: Homeostatic and Pharmacological Aspects. *Prog. Brain Res.* 160: 9-19.
- Scott, M.L., M.C. Nesheim and R.J. Young. 1982. *Nutrition of the chicken*. New York. 2nd edition. M. L Scot and Associates.
- Seid, R., N. Cairns, N. Singewald, S.T. Kaehler and G. Lubec. 2001. Differences Between GABA Levels in Alzheimer's Disease and Down Syndrome with Alzheimer-like neuropathology. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol.* 363: 139-145.
- Seok, J.H., K.B. Park, Y.H. Kim, M.O. Bae, M.K. Lee and S.H. Oh. 2008. Production and Characterization of Kimchi with Enhanced Levels of Gamma-aminobutyric Acid. *Food Sci. Biotechnol.* 17: 940-946.
- Shelp, B.J., A.W. Bown and D. McLean. 1999. Metabolism and Function of Gamma-Aminobutyric Acid. *Trends Plant Sci.* 4: 446-456.
- Shanwany, M.M. 1988. Broiler Performance Under High Stocking Densities. *Br. Poult. Sci.* 29: 43-52.
- Shen, Q., R. Lal, B.A. Luellem, J.C. Earnheart, A.M. Andrews and B. Lusche. 2010.  $\gamma$ -aminobutyric Acid-type a Receptor Deficit Cause Hypothalamic-Pituitary-Adrenal Axis Hyperactivity and Antidepressant Drug Sensitivity Reminiscent of Melancholic forms of Depression. *Biol. Psychiat.* 68: 512-520.
- Sherif, F.M. 1994. GABA-transaminase in Brain and Blood Platelets: Basic and clinical aspects. *Prog. Neuropsychopharmacol. Biol Psychiatry.* 18: 1219-1233.
- Siegel, H.S. 1995. Stress, Strains and Resistance. *Br. Poult. Sci.* 36: 3-22.
- Silondae, H., and Y.H. Sari. 2017. Pengaruh Kepadatan Ternak and Waktu Makan Berbeda Terhadap Penampilan Ayam Ras PedagingUmur

- 4 Minggu. Prosiding Seminar Nasional 2016 Membangun Pertanian Modern and Inovatif Berkelanjutan dalam Rangka Mendukung MEA. Balai Besar Pengkajian and Pengembangan Teknologi Pertanian, Kementerian Pertanian.
- Sinurat, A.P. 1986. The effect of High Ambient Temperature on Broiler Growth and Some Plasma Growth-Related Hormone Profiles. Phd. Thesis. University of Sydney, Camden, NSW, Australia
- Siong, T. E., S.M. Shahid, R. Kuladevan, S. Ing and K.S. Choo. 1987. Nutrient Composition of Malaysian Marine Fishes. *Asean Food Journal*. 3(2).
- Siragusa S., M. Angelis, R.D. De-Cagno., C.G. Rizzello, R. Coda and M. Gobbetti . 2007. Synthesis of  $\gamma$ -aminobutyric Acid by Lactic Acid Bacteria Isolated from a Variety of Italian Cheeses. *Appl. Environ. Microbiol.* 7283-7290.
- Small, P.L. and S.R. Waterma. 1998. Acid Stress, Anaerobiosis and *gadCB*: Lessons from *Lactococcus lactis* and *Escherechia coli*.
- Smith, D.K., T. Kassam, B. Singh and J.F. Elliott. 1992. *Escherichia coli* hastwo Homologousglutamate Decarboxylase Genes that Map to Distinct Loci. *J. Bacteriol.* 174: 5820-5829.
- Smith, G.J.E. and G.A. Koretzky. 2009. T Cell Activation. *Annu Rev Immunol.* 27: 591-619.
- Smulders, F., P. Barendsen, J.V Logtestijn, D. Mossel and G.V der Marel. 1986. Review: Lactic acid: Considerations in Favour of its Acceptance as a Meat Decontaminant. *Int. J. Food Sci. Technol.* 21: 419-436.
- Soeparno. 2005. *Ilmu and Teknologi Daging*. Cetakan Ke-4. Gadjah Mada University Press, Yogyakarta.
- Soeparno, I., S. Triatmojo, and Rihastuti. 2001. *Dasar Teknologi Hasil Ternak*. Fakultas Perternakan UGM, Yogyakarta.
- Sohail, M.U., A. Ijaz, M.S. Yousaf, K. Ashraf, H. Zaneb, M. Aleem and H. Rehman. 2010. Alleviation of Cyclic Heat Stress in Broilers by Dietary Supplementation of Mannan-oligosaccharide and *Lactobacillus*-based Probiotic: Dynamics of Cortisol, Thyroid Hormones, Cholesterol, C-Reactive Protein, and Humoral Immunity. *Poult Sci.* 89: 1934-1938.
- Stiles, M.E. 1994. Potential For Control Agents of Foodbone Disease. *Food Rest. Int.* 27: 245-250.
- Stryer, Lubert. 2000. *Biokimia Vol 1*. Penerjemah FKUI Editor

- Sjahbanar Soebianto and Evi Setiadi. Penerbit Buku Kedokteran. EGC. Jakarta.
- Sugito, M.W., D.A. Astuti, E. Handharyani and Chairul. 2007. Histopatologi Hati and Ginjal pada Ayam Broiler yang Dipapar Cekaman Panas and Diberi Ekstrak Kulit Batang Jaloh (*Salix tetrasperma Roxb*). JITV. 12: 68-73.
- Sujaya, I.N., A. Abe, K. Minamida, T. Sone, W.R. Aryanta, K. Asano and F. Tomita. 2006. Microbial Ecology of Traditional Balinese Rice Wine Fermentation. Food Micro. IJFM Special Issue. 1-6.
- Suprijatna, U., Atmomarsono and R. Kartasudjana. 2005. *Ilmu Dasar Ternak Unggas*. Penebar Swadaya.
- Sunatmo, T.I. 2009a. *Mikrobiologi Esensial Jilid 1*. Ardy Agency, Jakarta.
- Sunatmo, T.I. 2009b. *Eksperimen Mikrobiologi dalam Laboratorium*. Ardy Agency, Jakarta.
- Suradi, K. 2006. Perubahan Sifat Fisik Daging Ayam Broiler Post Mortem Selama Penyimpanan Temperatur Ruang. Jurnal Ilmu Ternak. 6(1): 23-27.
- Surono, I.S. 2004. *Probiotik Susu Fermentasi and Kesehatan*. PT. Tri Cipta Karya, Jakarta.
- Surono, I.S. 2003. In Vitro Probiotic Properties of Indigenous Dadih Lactic Acid Bacteria Asian-Australas. J. Anim. Sci., 16(5): 726-731.
- Syukur, S., and E. Purwati. 2013. *Bioteknologi Probiotik untuk Kesehatan Masyarakat*. Penerbit ANDI. Yogyakarta.
- Tajabadi, N., A. Ebrahimpour, A. Baradaran, R.A. Rahim, N.A. Mahyudin, M.Y. A. Manap, F.A. Bakar and N. Saari. 2015. Optimization of  $\gamma$ -aminobutyric acid Production by *Lactobacillus plantarum* Taj-Apis362 from Honeybees. Molecules. 20: 6654-6669.
- Tam, L.G., E.P. Berg, D.E. Gerrard, E.B. Sheiss, F.J. Tan, M.R. Okos, and J.C. Forres. 1998. Effect of Halothane Genotype On Porcine Meat Quality And Myoglobin autoxidation. Meat Sci. 49(1): 41-53.
- Tamalluddin, F. 2012. *Ayam Broiler, 22 Hari Panen Lebih Untung*. Penebar Swadaya. Depok.
- Tanaka, C.N.G.B.E. 1996. GABA: Receptors, Transporter and Metabolism. Establishment of GABA as an Inhibitory Neurotransmitter at Crustacean Neuromuscular Junction and in the Mammalian Central Nervous System. p. 1-6

- Tanasupawat, S. 2009. Thai Lactic Acid Bacteria: Diversity and Applications. *SWU Sci. J.* 25(1).
- Thome Research, Inc. 2007. Gamma-Aminobutyric Acid (GABA). *Alternative Medicine Review.* 12(3): 274-279.
- Thwaites, D.T., B. Laura, P.M.J. McCleave, M.C. Simon and L.S. Nicholas. 2000. Gamma-Aminobutyric Acid (GABA) Transport across human intestinal epithelial (Caco-2) Cell Monolayers. *Br J Pharmacol.* 129(3): 457-464.
- Thwaites D.T., G.T.A. Mcewan, B.H. Hirst and N.L. Simmons. 1995. H<sup>+</sup>-Coupled A-Methylaminoisobutyric Acid Transport in Human Intestinal Caco-2 Cells. *Biochim. Biophys. Acta.* 1234: 111-118.
- Thwaites, D.T. and B.C. Stevens. 1999. H<sup>+</sup>-zwitterionic amino acid symport at the brush-border membrane of Human Intestinal Epithelial (Caco-2) Cells. *Exp. Physiol.* 84: 275-284.
- Thwe, S.M., T. Kobayashi, T. Luan, T. Shirai, M. Onodera, N. Hamada-Sat, and C. Imada. 2011. Isolation, Characterization, and Utilation of  $\gamma$ -aminobutyric Acid (GABA)-producing Lactid Acid Bacteria from Myanmar Fishery Products Fermented with Boiled Rice. *Food Science and Technology.* 77: 279-288.
- Tian, J., and Y. Lu. 2004. Gamma-aminobutyric Acid Inhibits T Cell Autoimmunity and the Development of Inflammatory Responses in a Mouse Type 1 Diabetes Model. *J. Immunol.* 173(8): 5298-5304.
- Tizard, I.R. 1987. *Pengantar Immunologi Veteriner.* Penerjemah Soehardjo H. Airlangga University Press. Bogor.
- Tong, H.B., J. Lu, J.M. Zou, Q. Wang and S.R. Shi. 2012. Effects of Stocking Density on Growth Performance, Carcass Yield, and Immune Status of a Local Chicken Breed. *Poultry Science.* 91: 667-673.
- Town, K. 2014. Identification of Dominant Lactic Acid Bacteria During Tempeh Fermentation and Evaluation of Their Potential as a Probiotic. Faculty of Agricultural Technology. Bogor Agricultural University. Research report.
- Tung, Y-T., B-H. Lee, C-F. Liu and T-M. Pan. 2011. Optimazation of Culture Condition for ACEI and GABA Production by Lactic Acid Bacteria. *Journal of Ffoo Science.* 76: 585-591.
- Ueno, Y., K. Hayakawa, S. Takahashi and K. Oda. 1997. Purification and characterization of Glutamate Decarboxylase from *Lactobacillus brevis* IFO 12005. *Biosci Biotech Biochem.* 61: 1168-1171.

- Ujjawal, K. 2016. Black Rice: Research, History and Development.
- Uzum, M. H. and O. Toplu. 2013. Effects of Stocking Density and Feed Restriction on Performance, Carcass, Meat Quality Characteristics and Some Stress Parameters in Broilers under heat stress. *Revue Med. Vet.* 164: 546-554.
- Van, L.R, C-H. Liu, M. Smith and H. Loveday. 2000. Characteristics of Pale, Soft, Exudative Broiler Breast Meat. *Poult Sci.* 79(7): 1057-1061.
- Villegas, J.M., L. Brown, G.S. de Giori, and E.M. Hebert. 2016. Optimization of Batch Culture Condition for GABA Production by *Lactobacillus brevis* CRL 1942, Isolated from Quinoa Sourdough. *Food and Technology.* 67: 22-26.
- Villegas, G. and H. Hosokawa. 2004. Immunostimulant: Toward Temporary Prevention of Disease in Marine Fish. Kochi University. Monobe.
- Viriden, W.S. and M.T. Kidd. 2009. Physiological Stress in Broilers: Ramifications on Nutrient Digestibility and Responses. *J Appl Poult Res.* 18: 338-347.
- Vogel, A.I. 1989. *Textbook of Practical Organic Chemistry.* 5th Ed. Longman Group. London.
- Von, W.A and L. Axelsson, 2011. *Lactic Acid Bacteria: An Introduction.* Chapter 4: 1-16.
- Wang, Y., Y. Xian-Liang, C. Yuan, C. Lie-Ran and X. Xue-Ping. 2011. Effects on Growth of Chicken's Breast Muscle by Adding  $\gamma$ -aminobutyric Acid (GABA) and Vitamin E (VE) to Diets. *J. Anim. Sci. Technol. Uni.* 25: 5-9.
- Wang, B., J. Xie, Z. Chen, X. Lin and Z.W. Li. 2011. Effect of Prenatal Heat Stress on the Development of GABAB Receptor in Newborn Mouse Pituitary. *Progress in Veterinary Medicine.* 32(6): 60-63.
- Watanabe, M., K. Maemura, K. Kanbara, T. Tamayama and H. Hayasaki. 2002. GABA and GABA Receptors in the Central Nervous System and other Organs. *International Review of Cytology* 213: 1-47.
- Warris, P.D. 2000. *Meat Science.* CABI Publishing. UK.
- Wideman, R.F., B.C. Ford, J.D. May, and B.D. Lott. 1984. Acute Heat Acclimation and Kidney Function in Broilers. *Poultry Science.* 73: 75-88.

- Willey, J.M., and L.M. Sherwood. 2009. Woolverton CJ: Prescott's Principles of Microbiology. Boston: McGraw-Hill Higher Education.
- Wirawati, C.U. 2002. Potency of Lactic Acid Bacteria Isolated from *Tempoyak* as Probiotic (Thesis in Indonesian) Bogor Agricultural University, Bogor.
- Wisden, W., D.J. Laurie, H. Monyer and P.H. Seeburg. 1992. The Distribution of 13 GABAA Receptor Subunit mRNAs in the Rat Brain. I. Telencephalon, Diencephalon, Mesencephalon. *J. Neurosci.* 12: 1040-1062.
- Wizna, H. Abbas, Y. Rizal, A. Dharma and I.P. Kompang. 2009. Improving the Quality of Tapioca By-Products (Onggok) as Poultry Feed Throug Fermentation by *Bacillus amyloliquefaciens*. *Pakistan Journal of Nutrition* 8(10): 1636-1640.
- Woelfel, R, C. Owens, E. Hirschler, R. M-Dawson and A. Sams. 2002. The Characterization and Incidence of Pale, Soft, and Exudative Broiler Meat in a Commercial Processing Plant. *Poult Sci.* 81(4): 579-584.
- Woese, C.R. 1987. Bacterial Evolution. *Microbiol Rev.* 51: 221-271.
- Wu, G. 2010. Functional Amino Acids in Growth, Reproduction, and Health. *Advances in Nutrition.* 1(1): 31-37.
- Xie, Y.Z., J. Xie, Z. Chen, J. Tang, Z.W. Li and J.H. Zhang. 2011. Impact of Prenatal Heat Stress on the Development of GABA Receptors in the Genital Gland of Newborn Mice. *Veterinary Science in China.* 41(3): 298-302.
- Yadav, B. and J.P. Korde. 2011. Effect of Hyperthermia on Oxidative Status of a Primary Hepatocyte Culture. *J. Adv. Vet. Res.* 1(2): 69-73.
- Yokoyama, S., H. J-Ichi, and H. Kiyoshi. 2002. Production of  $\gamma$ -aminobutyric Acid from Alcohol Distillery Lees by *Lactobacillus brevis* IFO-12005. *Journal of Bioscience and Bioengineering.* 93(1): 95-97.
- Yuliana, N., I. Erlinda and Dizon. 2011. Phenotypic Identification of Lactic Acid Bacteria Isolated from Tempoyak (Fermented Durian) Made in the Philippines. *Journal of Biology.* 3(2): 145-152.
- Yunianto, V.D., N. Tiguchi, A. Ohtsuka and K. Hayashi. 1999. Effect of Environmental Temperature on Heat Production and Muscle Protein Turnover in Layer Chickens. *Poultry Sci.* 36: 219-228.

- Yusra, F. Azima, Novelina, and Periadnadi. 2014. Isolasi and identifikasi Mikroflora Indegenous dalam Budu. *Agritech*. 3(3): 316-321.
- Zhang, H., Y.H. Yao and F. Chen. 2006. Accumulation of Gamma-aminobutyric Acid in Rce Germ using Protease. *Biosci Biotechnol Biochem*. 70: 1160-1165.
- Zhang, L., H.Y Yue, H.J. Zhang, L. Xu, S.G. Wu, H.J. Yan, Y.S. Gong and G.H Qi. 2009. Transport Stress in Broilers: Blood Metabolism, Glycolytic Potential, and Meat Quality. *Poult. Sci*. 88: 2033-2041.
- Zhang, M., X-T.Zou, H. LI, X-Y Dong and Wenjing. 2012a. Effect of Dietary  $\gamma$ -Amino Butyric Acid on Laying Performance, Egg Quality, Immune Activity and Endocrine Hormone in Heat-Stressed Roman Hens. *Animal Journal Science*. 83: 141-147.
- Zhang, J., Y. Zhang, S. Liu, Y. Han and Z. Zhou. 2012b. Modelling Growth and Bacteriocin Production by *Pediococcus acidilactici* PA003 as a Function of Temperature and pH Value. *Applied Biochemistry and Biotechnology*. 166(6): 1388-1400.
- Zhao, A., X. Hu, L.Pan, and X. Wang. 2014. Isolation and Characterization of a Gamma-aminobutyric Acid Producing Strain *Lactobacillus buchneri* WPZ001 that Could Efficiently Utilize Xylose and Corncob Hydrolysate. *Appl Microbial Biothechnol*. 99(7): 3191-3200.
- Zhigang, S., A. Sheikahmadi, and Z. Li. 2013. Effect of Dietary  $\gamma$ -aminobutyric Acid on Performance Parameters and some plasma merabolites in Cherry Valley Duck Under High Ambient Temperature. *Iranian Journal of Veterinary Research, Shiraz University*. 14(4): 283-290.
- Zhong, C., J. Tang, Y. Q. Sun and J. Xie. 2013. Protective Effect of  $\gamma$ -aminobutyric Acid on Antioxidation Function in Intestinal Mucosa of Wenchang Chicken Induced by Heat Stress. *The Journal of Animal & Plant Science*, 23(6): 1634-1641.
- Zhong, C., W. Ting, H. Li-ming, and F. Dai-nan. 2002. Effects of GABA on the Heat Stress Broilers. *Zoological Research*, 23(4): 341-344.
- Zuniga, M., I. Pardo and S. Ferrer. 1993. An improved medium for distinguishing between homofermentative and heterofermentative lactic acid bacteria. *International Journal of Food Microbiology*. 18.

# GABA

## ASAM AMINO ANTI STRES

GABA adalah asam amino non protein atau asam amino bukan penyusun protein, namun dikenal dengan peranannya sebagai inhibitor neurotransmitter yang penting dalam otak. GABA dapat digunakan sebagai asam amino anti stres karena GABA dapat berfungsi sebagai inhibitor reaksi neurologis yang menyebabkan stres pada ayam broiler, petelur, sapi perah dan manusia. Pada manusia GABA dapat mengatasi stres seperti: depresi, susah tidur (insomnia) dan penderita hipertensi. GABA dapat dihasilkan oleh bakteri asam laktat (BAL) yang ditemukan dalam produk pangan fermentasi seperti dadih, tempoyak, kimchi, tapai ubi kayu maupun tapai kefan, ikan budu dan tempe. Bakteri asam laktat (BAL) yang telah berhasil kami temukan adalah *Pediococcus acidilactici* DS15 hasil identifikasi menggunakan 16 sRNA, yang mampu menghasilkan GABA yang telah diaplikasi untuk mengatasi stres pada broiler yang di pelihara dengan kapasitas kandang melebihi standar yaitu 12 ekor/M<sup>2</sup>. Di Indonesia, para peternak umumnya meningkatkan kapasitas kandang melebihi standar. Untuk kandang dengan kapasitas 5.000 ekor, digunakan untuk pemeliharaan 6.000 ekor. Hal ini menyebabkan broiler akan mengalami stres. Untuk mengatasi hal tersebut, peternak akan menambahkan antibiotik yang terkadang terdapat kandungan hormon pertumbuhan yang sudah dilarang penggunaannya sejak tahun 2019. Pada saat ini salah satu feed additive anti stres yang aman bagi konsumen (food safety) dan ramah lingkungan (eco-friendly) adalah GABA. Melalui penusuran literatur GABA juga dapat dijadikan pencegahan awal beberapa penyakit seperti: gangguan neurologis, hipertensi, diabetes, kanker, peradangan juga dapat digunakan sebagai antioksidan serta anti mikroba.