

Identifikasi produksi GABA dari kultur Bakteri Asam Laktat (BAL) dengan metode TLC

Identification of GABA production from lactic acid bacteria by Thin Layer Chromatography

RINI HANDAYANI[✉], SULISTIANI, NINU SETIANINGRUM

Bidang Mikrobiologi, Pusat Penelitian Biologi, Lembaga Ilmu Pengetahuan Indonesia. Jl. Raya Bogor Km 46 Cibinong, Bogor 16911, Jawa Barat. Tel.: +62-21-8765066, Fax.: +62-21-8765067, ✉email: handayanirini@yahoo.co.uk

Manuskrip diterima: 8 September 2016. Revisi disetujui: 16 Desember 2016.

Abstrak. Handayani R, Sulistiani, Setianingrum N. 2016. Identifikasi produksi GABA dari kultur Bakteri Asam Laktat (BAL) dengan metode TLC. *Pros Sem Nas Masy Biodiv Indon 2: 208-213*. Tujuan penelitian ini adalah untuk mengetahui cara identifikasi senyawa γ -aminobutyric acid (GABA) yang dihasilkan oleh bakteri asam laktat. Bakteri asam laktat berkontribusi besar memberikan manfaat fungsional bagi tubuh manusia sebagai bakteri probiotik. Probiotik didefinisikan sebagai mikroorganisme hidup dalam bahan pangan yang tercatat dalam jumlah cukup serta memberikan manfaat kesehatan saluran pencernaan. Bakteri asam laktat juga diketahui dapat menghasilkan senyawa antioksidan. Fungsi sebagai antioksidan ditunjukkan oleh galur *Lactobacillus plantarum* DM5. Isolat yang digunakan adalah isolat bakteri asam laktat 478 dan 515. GABA adalah asam amino non-protein yang diproduksi melalui dekarboksilasi glutamat oleh enzim *glutamate decarboxylase* dan terdistribusi secara luas di alam diantara mikroorganisme, tumbuhan dan hewan. Produksi GABA dapat diketahui secara kualitatif dengan metode Kromatografi Lapis Tipis (KLT) atau *Thin Layer Chromatography* (TLC) menggunakan lempeng KLT aluminium (Silica gel F254, Merck, Mumbai India). Inokulum BAL dalam MRS cair disentrifugasi pada kecepatan 1.500 x gravitasi selama 15 menit, kemudian sebanyak 10 μ l supernatan dispotkan atau diteteskan pada lempeng KLT. KLT dilakukan menggunakan larutan pengembang (eluen) yang terdiri dari campuran n-butanol:asam asetat:akuades dengan perbandingan 4:1:1 dengan larutan pewarna ninhydrin dengan konsentrasi 0,2% (w/v-etanol). Setelah selesai, lempeng KLT disemprot menggunakan larutan ninhydrin 0,5% (w/v) dan kemudian dipanaskan hingga 110°C selama 10 menit. Senyawa GABA yang dihasilkan oleh isolat BAL dapat dilihat dari nilai *Retention factor* (Rf) yang sama dengan standar GABA yang digunakan yaitu Rf BAL=0,47, sedangkan standar GABA 0,48.

Kata kunci: Bakteri asam laktat, anti oksidan, KLT, GABA

Abstract. Handayani R, Sulistiani, Setianingrum N. 2016. Identification of GABA production from lactic acid bacteria by Thin Layer Chromatography. *Pros Sem Nas Masy Biodiv Indon 2: 208-213*. The purpose of this study was to determine how to identify compounds γ -aminobutyric acid (GABA), which is produced by lactic acid bacteria. Lactic acid bacteria contribute greatly to provide functional benefits to the human body as probiotic bacteria. Probiotics are defined as live microorganisms in foodstuffs recorded in sufficient quantities and benefit gastrointestinal health. Lactic acid bacteria are also known to produce antioxidant compounds. Functions as an antioxidant shown by strains of *Lactobacillus plantarum* DM5. Isolates used are lactic acid bacteria isolates 478 and 515. GABA is a non-protein amino acid that is produced via decarboxylation of glutamate by the enzyme *glutamate decarboxylase* and distributed widely in nature among microorganisms, plants, and animals. GABA production can be determined qualitatively by Thin Layer Chromatography (TLC) or Thin Layer Chromatography (TLC) using aluminum TLC plates (Silica gel F254, Merck, Mumbai India). BAL inoculum in liquid MRS centrifuged at 1,500 x gravity for 15 minutes, then as much as 10 mL of the supernatant was spotted or dropped on TLC plates. TLC performed using a developer solution (eluent) which consists of a mixture n-butanol: acetic acid: distilled water with a ratio of 4: 1: 1 with ninhydrin dye solution with a concentration of 0.2% (w/v ethanol). When finished, the TLC plates sprayed with a solution of ninhydrin 0.5% (w/v) and then heated to 110°C for 10 minutes. GABA compounds produced by LAB isolates can be seen from the Retention factor (Rf) equal to the standard GABA used is BAL Rf = 0.47, while the standard GABA 0.48.

Keywords: Lactic acid bacteria, anti-oxidants, TLC, GABA

PENDAHULUAN

Bakteri asam laktat (BAL) merupakan kelompok bakteri yang paling banyak dimanfaatkan dalam bidang industri, karena mempunyai beberapa keunggulan jika dibandingkan kelompok lainnya. Beberapa keunggulan BAL yaitu: (i) BAL mampu menghasilkan senyawa-senyawa yang dapat memberikan rasa dan aroma spesifik

pada makanan fermentasi (Rahayu 2001), (ii) BAL mampu meningkatkan nilai cerna pada makanan fermentasi karena dapat melakukan pemotongan pada bahan makanan yang sulit dicerna sehingga dapat langsung diserap oleh tubuh (Guerra et al. 2006), (iii) BAL menghasilkan senyawa antimikroba yang mampu menghambat pertumbuhan mikroba patogen dan pembusuk pada bahan makan sehingga dapat memperpanjang masa simpan produk

tersebut. Senyawa-senyawa antimikroba yang dihasilkan BAL antara lain: asam laktat, hydrogen peroksida, CO₂, dan bakteriosin (Holzapfel et al. 1995). Asam organik yang dihasilkan dapat menghambat pertumbuhan bakteri patogen seperti *Echerichia coli*, *Shigella* sp., dan *Salmonella* sp., yang sering menyebabkan diare (Astawan et al. 2011)

BAL juga diketahui dapat menghasilkan senyawa antioksidan. Fungsi sebagai antioksidan ditunjukkan oleh galur *Lactobacillus plantarum* DM5, dalam kemampuannya menghasilkan γ -aminobutyric acid (GABA) (Das and Goyal 2004). GABA adalah asam amino non-protein yang diproduksi melalui dekarboksilasi glutamat oleh enzim *glutamate decarboxylase* dan terdistribusi secara luas di alam diantara mikroorganisme, tumbuhan dan hewan (Ueno 2000). GABA berperan sebagai neurotransmitter penghambat utama dalam sistem syaraf pusat mamalia. GABA meningkatkan konsentrasi plasma, hormon pertumbuhan, dan sintesis protein di dalam otak (Cho et al. 2007). Konsumsi makanan yang diperkaya GABA dapat menghambat proliferasi sel kanker (Park dan Oh 2007) dan meningkatkan daya ingat serta kemampuan belajar (Miura et al. 2006). Beberapa galur BAL meliputi *L. brevis*, *L. plantarum*, *L. delbrueckii*, *L. paracasei* dan *Lactococcus lactis* dilaporkan memiliki aktivitas enzim *glutamate decarboxylase* dan kemampuan menghasilkan GABA dalam konsentrasi 10-350 mmol/L tergantung konsentrasi monosodium glutamat dalam medium fermentasi (Li and Cao 2010).

Tujuan penelitian ini adalah untuk mengetahui cara senyawa GABA yang dihasilkan BAL menggunakan metode KLT karena metode yang lain jauh lebih sulit.

BAHAN DAN METODE

Bahan

Bahan yang digunakan adalah isolat isolat Bakteri Asam Laktat (BAL) potensial yang memiliki kemampuan dalam memproduksi γ -aminobutyric acid (GABA) dengan metode TLC (*Thin Layer Chromatography*). Isolat BAL yang digunakan (kode: 487, 515) merupakan koleksi dari laboratorium Mikrobiologi Industri, Bidang Mikrobiologi, Pusat Penelitian Biologi, Lembaga Ilmu Pengetahuan Indonesia (LIPI), Cibinong, Bogor, Jawa Barat.

Peremajaan Isolat

Peremajaan dilakukan dengan cara menanam isolat yang telah dipreservasi dalam lemari es ke medium GYP (*Glucose Yeast Peptone*) agar dengan modifikasi, yang memiliki komposisi *Starch* atau pati 10 g, Ekstrak Yeast 5 gr, Peptone 5 g, Tween 80 0,5 mL, *Salt Solution* 5 mL, CaCO₃ 2% (medium padat) dan akuades 1000 mL. *Salt Solution* mengandung komposisi MgSO₄.7H₂O 40 g, MnSO₄.4H₂O 2 g, FeSO₄.7H₂O 2 g, dan NaCl 2 g yang dilarutkan dengan akuades 1000 mL. Semua komponen dicampur menjadi satu dan diaduk hingga tercampur merata, setelah itu disterilisasi menggunakan *autoclave* pada suhu 121°C dan tekanan 2 Atm selama 15 menit. Medium dituang pada cawan petri steril sebanyak 10-15 mL dan didiamkan hingga padat. Isolat yang telah

dikondisikan pada suhu ruang kemudian diinokulasi dalam medium dengan jarum ose menggunakan metode *streak* kuadran. Hasil inokulasi diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam.

Pembuatan Kurva Baku Pertumbuhan BAL

Pembuatan kurva baku dilakukan untuk mengetahui jumlah sel bakteri yang dibandingkan dengan kurva tumbuh atau nilai absorbansi dan waktu. Isolat BAL (stok) diaktivasi dengan mengambil 2 ose dan dimasukkan ke dalam 100 mL medium MRS dan diinkubasi selama 24 jam pada suhu 37°C. Medium MRS adalah medium khusus untuk bakteri asam laktat. Kandungan dari medium MRS adalah K₂HPO₄ 2 g/L, Glukosa 20 g/L, MgSO₄. 7 H₂O 0,2 g/L, MnSO₄.4H₂O 0,05 g/L dan meat ekstrak 8 g/L. Pengukuran dilakukan dengan membuat 9 titik, dimulai dari nilai absorbansi tertinggi hingga nilai terendah di dalam tabung reaksi steril masing-masing 5 mL. Setelah didapatkan nilai absorbansi, inokulum masing-masing tabung diencerkan menggunakan akuades steril hingga 10⁻⁶, dan 2 pengenceran terakhir di *plating* sebanyak 0,1 mL secara duplo pada medium MRS agar. Setelah diinkubasi selama 3 hari pada suhu 37°C, dilakukan pengamatan dan perhitungan jumlah sel/mL. Kurva baku dibuat secara statistik dengan nilai absorbansi sebagai x dan jumlah sel sebagai y.

Pembuatan Inokulum Produksi Senyawa GABA

Peremajaan isolat dilakukan untuk meregenerasi sel-sel baru. Hasil peremajaan diambil sebanyak 2-ose dan dimasukkan ke dalam 5 mL medium MRS cair dan diinkubasi selama 24 jam pada suhu 37°C sebagai aktivasi pertama. Hasil dari aktivasi pertama dipipet masing-masing 1 mL dan dimasukkan ke dalam 5 mL medium MRS cair sebagai aktivasi kedua dan kemudian diinkubasi selama 24 jam pada suhu 37°C. OD diukur pada kultur aktivasi kedua dengan λ 600 nm untuk didapatkan nilai absorbansi yang sama dengan hasil kurva tumbuh. Hal tersebut dimaksudkan untuk menyelaraskan jumlah sel/mL dari kurva baku dengan nilai absorbansi pada kurva tumbuh. Kemudian dipipet sebanyak 2% dari aktivasi kedua dan dimasukkan ke dalam 100 mL medium MRS cair yang ditambah 1% MSG.

Proses Fermentasi dan Produksi GABA

Masing-masing inokulum isolat 487 dan 515 diinokulasikan pada medium produksi. Medium produksi berupa 100 mL MRS cair yang mengandung monosodium glutamate atau MSG 1%. Proses fermentasi dimulai ketika medium produksi yang mengandung inokulum, diinkubasi di dalam inkubator selama 7 jam pada suhu 37°C. Setelah 7 jam, inkubator diturunkan suhunya menjadi 30°C dan dilanjutkan proses inkubasi selama 30 jam.

Identifikasi produksi GABA

Identifikasi produksi GABA oleh kultur BAL dilakukan dengan metode Kromatografi Lapis Tipis atau *Thin Layer Chromatography* (TLC) dengan menggunakan larutan MSG berbagai konsentrasi sebagai penanda. Inokulum BAL dalam medium MRS cair hasil fermentasi

dipindahkan kemasing-masing botol sentrifugasi. Sentrifugasi dilakukan pada kecepatan 1.500 x gravitasi dan dengan suhu 4°C selama 15 menit. Supernatan yang dihasilkan dipindah ke dalam botol kaca. Supernatan sebanyak 10 mL disaring menggunakan kertas saring (filter steril-R) dengan ukuran pori-pori 0,20 µm.

Lempeng TLC yang berukuran 20x20 cm diberi garis menggunakan pensil sebagai penanda awal. Garis dari tepi lempeng TLC berjarak 1,5 cm. Garis penanda awal diberi tanda titik sebanyak 15 titik dengan jarak 1 cm menggunakan pensil untuk tempat *spotting* sampel. Setiap titik diberi tanda berupa angka 1 hingga 15.

Konsentrasi larutan MSG dibuat dengan cara mengencerkan sebanyak 0,15 g MSG ke dalam 10 mL akuades untuk didapatkan konsentrasi 1,5% MSG. MSG dari konsentrasi 1,5% diencerkan bertingkat dengan akuades hingga diperoleh konsentrasi 1,35%, 1,2%, 1,05%, 0,90%, 0,75%, 0,60%, 0,45%, 0,30%, dan 0,15%. Sebanyak 10 µl seri konsentrasi MSG dispotkan atau diteteskan pada lempeng TLC alumunium (Silica gel F254, Merck, Mumbai India) pada titik nomer 1 hingga 10, larutan standar GABA, , supernatan isolat 487, supernatan 515, supernatant kontrol secara berurutan diteteskan pada lempeng TLC. Running TLC selama 3 jam. TLC dilakukan menggunakan larutan pengembang (eluen) yang terdiri dari campuran n-butanol:asam asetat:akuades dengan perbandingan 4:1:1 dengan larutan pewarna ninhydrin dengan konsentrasi 0,2% (w/v-etanol) (Kook dan Cho 2013). Setelah selesai, lempeng TLC disemprot menggunakan larutan ninhydrin 0,5% (w/v) dan kemudian dipanaskan hingga 110°C selama 10 menit. Senyawa GABA yang dihasilkan oleh isolate BAL dapat dilihat dari nilai *Retention factor* (Rf) yang sama dengan standar GABA yang digunakan (Ganguli 2011).

HASIL DAN PEMBAHASAN

Peremajaan Isolat Bakteri Asam Laktat (BAL)

Peremajaan dilakukan dengan cara memindahkan atau memperbarui biakan mikroba dari biakan lama ke medium tumbuh baru secara berkala, misalnya sebulan atau dua bulan sekali (Machmud 2001). Peremajaan bertujuan untuk mengaktivasi isolat bakteri dan mengoptimalkan pertumbuhan.

Peremajaan dilakukan dengan cara menanam isolat yang telah dipreservasi dalam lemari es kedalam medium GYP (*Glucose Yeast Peptone*) agar secara streak kuadran. Streak kuadran bertujuan untuk memurnikan kembali isolat yang telah lama disimpan, untuk menghindari terjadinya kontaminasi oleh mikroorganisme yang tidak diinginkan. Setelah diinkubasi, koloni bakteri akan tumbuh pada medium dengan pola 4 kuadran yang dapat dilihat pada Gambar 1.

Kurva pertumbuhan dan penentuan umur inokulum BAL

Pertumbuhan mikroba merupakan pertambahan jumlah atau volume serta ukuran sel. Dalam pertumbuhannya, mikroba terutama bakteri dan khamir berkembang biak dengan membelah dari satu sel menjadi dua sel.

Pertumbuhan sel bakteri biasanya mengikuti suatu pola pertumbuhan tertentu berupa kurva pertumbuhan sigmoid. Perubahan kemiringan pada kurva pertumbuhan menunjukkan transisi dari satu fase perkembangan ke fase lainnya. Kurva pertumbuhan bakteri dapat dipisahkan menjadi 4 fase utama, yaitu: fase lag (fase lambat), fase eksponensial (fase cepat), fase stasioner (fase statis), dan fase penurunan populasi (*decliner*). Pembuatan kurva pertumbuhan bertujuan untuk mengetahui laju pertumbuhan BAL. Laju pertumbuhan BAL dapat digunakan untuk menentukan umur inokulum optimum dan menentukan lama waktu proses fermentasi dalam menghasilkan senyawa metabolit. Kurva pertumbuhan BAL isolat 487 dan 5151 dapat dilihat pada Gambar 2.

Melalui kurva pertumbuhan BAL isolat 487 dan 515 dapat diketahui terjadinya fase pertumbuhan, dari fase lag, fase log (eksponensial), dan fase stasioner. Fase lag terjadi pada tejadi pada T_0 (jam ke-0) hingga T_1 (jam ke-2), pada fase ini sel-sel bakteri sedang beradaptasi dengan substratnya dan menghasilkan enzim-enzim metabolisme. Setelah itu, sel bakteri mengalami pertumbuhan cepat atau memasuki fase logaritmik pada T_2 (jam ke-4) hingga T_6 (jam ke-12). Pada fase ini sel-sel bakteri aktif bermetabolisme untuk memanfaatkan substrat yang tersedia. Terdapat kecocokan antara sel bakteri terhadap substrat berupa medium MRS cair, sehingga sel bakteri akan mengalami regenerasi dan pertambahan ukuran sel. Semakin lama waktu fermentasi makanan jumlah BAL akan meningkat yang disebabkan kondisi substrat yang masih memungkinkan berlangsungnya metabolisme BAL. Setelah memasuki T_8 (jam ke-16), BAL akan memasuki fase pertumbuhan stasioner yang dilihat dari penurunan laju pertumbuhan pada kurva pertumbuhan.

Pembuatan inokulum fermentasi

Isolat BAL dengan kode 487 dan 515 digunakan sebagai starter fermentasi produksi senyawa GABA. Sebelum dijadikan starter, isolat BAL disiapkan dalam bentuk inokulum cair pada medium MRS. Umur inokulum optimum BAL berdasarkan pengukuran kurva pertumbuhan adalah 7 hingga 8 jam pada inkubasi di suhu 37°C. Pertumbuhan bakteri dalam medium MRS cair ditunjukkan adanya peningkatan biomassa sel bakteri, yang mengakibatkan semakin keruhnya medium, dilihat pada Gambar 3.

Produksi senyawa GABA

γ -Aminobutyric acid (GABA) adalah asam amino non-protein yang terdistribusi secara luas di alam, dan dibentuk secara *irreversible* (searah) melewati α -dekarboksilasi dari L-asam glutamat dalam reaksi yang dikatalisasi oleh glutamat dekarboksilase (GAD). GAD dan GABA telah ditemukan dari bakteri yang secara luas tersebar pada organisme. GABA telah diketahui sebagai penghambat neurotransmitter. Konsentrasi dari glutamat sebagai pemicu neurotransmitter dan GABA di atur oleh GAD (Ueno 2000). GABA meningkatkan metabolisme sel-sel otak dengan cara meningkatkan suplai oksigen dan mengaktifkan aliran darah cerebral dan menghambat sekresi vasopressin (*anti diuretic hormone*) oleh peran pada pusat vasomotor dari

medulla oblongata. Selanjutnya, GABA mengatur sekresi hormon pertumbuhan, menurunkan tekanan darah dengan memperlebar pembuluh darah, dan mempunyai kemampuan diiritik, anti-depresif, efek anti-oksidan, serta untuk mencegah penyakit stroke (Hao dan Schmit 1993; Kono dan Himeno 2000; Leventhal et al. 2003; Shelp et al. 1999).

Produksi senyawa GABA dilakukan menggunakan medium fermentasi MRS cair yang ditambah *Mono Sodium Glutamate* (MSG) sebanyak 1% dari volume medium yang digunakan (Gambar 5). Inokulum BAL yang berumur 7 hingga 8 jam diukur nilai OD agar didapatkan nilai absorbansi kurang lebih sebesar 1,0. Nilai absorbansi 1,0 bertujuan untuk mengkondisikan sel bakteri pada jumlah 10^7 hingga 10^8 sel/mL.

Sebanyak 2% inokulum BAL 487 dan 515 dipipet pada masing-masing medium MRS 100 mL yang mengandung 1% MSG. Kemudian diinkubasi pada suhu 37°C selama 7 jam di dalam inkubator. Setelah 7 jam, suhu inkubasi diturunkan menjadi 30°C dan diinkubasi lagi hingga 30 jam. Inkubasi selama 7 jam bertujuan untuk memproduksi biomassa sel bakteri hingga mencapai laju pertumbuhan spesifik sesuai kurva pertumbuhan. Sedangkan inkubasi selama 30 jam bertujuan untuk memproduksi senyawa metabolit sekunder.

Monosodium glutamat digunakan sebagai substrat untuk produksi GABA oleh bakteri asam laktat. Monosodium glutamat adalah garam sodium dari asam glutamat. Glutamat adalah asam amino yang terbentuk secara alami yang ditemukan pada banyak makanan, khususnya makanan berprotein tinggi seperti produk susu, daging, ikan dan pada beberapa sayuran. Makanan sering digunakan untuk penambah cita rasa, seperti jamur dan tomat, yang mempunyai kadar tinggi dari glutamat alami. Glutamat ada dimana-mana di alam dan terdapat pada semua organisme hidup. Glutamat mempunyai prinsip meningkatkan neurotransmitter pada sistem syaraf pusat (Ganguli 2011).

Glutamat sudah digunakan sebagai bahan tambahan makanan untuk meningkatkan cita rasa selama 1200 tahun yang mempunyai rasa unik yang dikenal sebagai “umami” di Jepang. Umami telah dipasarkan selama kurang lebih 100 tahun. Cita rasa dari umami sekarang dikenali sebagai rasa dasar kelima. Beberapa makanan digunakan dalam memasak untuk meningkatkan cita rasa yang mengandung glutamate dalam jumlah yang tinggi. ASI mempunyai konsentrasi glutamate tertinggi diantara semua asam amino. Glutamat dalam dosis yang tinggi saat diinjeksikan telah dilaporkan dapat memproduksi neurodegenerasi pada anakan mencit. Neurodegenerasi tidak diproduksi ketika glutamat diberikan dengan makanan (Ganguli 2011).

Identifikasi GABA dengan metode *Thin Layer Chromatography* (TLC)

Kultur BAL dalam medium produksi hasil fermentasi 30 jam dipindahkan ke dalam botol sentrifugasi. Sentrifugasi bertujuan untuk mendapatkan memisahkan sel-sel bakteri agar diperoleh ekstrak berupa supernatan. Supernatan yang dihasilkan dapat dilihat pada Gambar 6.

Senyawa GABA dapat ditentukan secara kualitatif dengan metode TLC menggunakan lempeng TLC alumunium (Merck). Sebanyak 10 µl supernatan dispotkan atau ditetaskan pada lempeng TLC menggunakan mikropipet ukuran 10 µl dan dikeringkan dengan *hair dryer*. Setelah spotting, lempeng TLC direndam larutan eluen (larutan pengembang) dan disemprot dengan larutan ninhydrin 0,2% (w/v-etanol) sebagai reagen pewarna, akan terbentuk spot berwarna merah yang ditunjukkan pada Gambar 7.

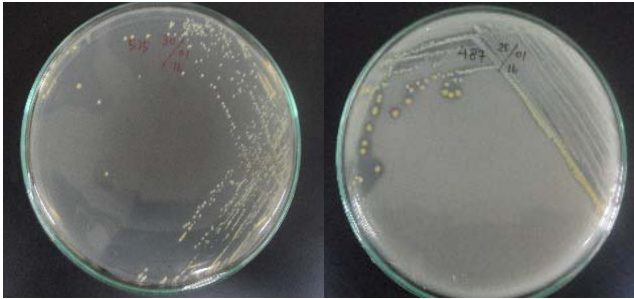
Spot warna merah menunjukkan adanya senyawa kimia yang terseparasi oleh fase gerak eluen dan terwarnai oleh larutan pewarna. Spot nomer 1 hingga 10 menunjukkan larutan standar MSG dengan konsentrasi 1,35%, 1,2%, 1,05%, 0,90%, 0,75%, 0,60%, 0,45%, 0,30%, dan 0,15%(w/v). Menurut Kook dan Cho, (2013), spot dari GABA dan MSG dapat secara mudah dikonfirmasi dengan larutan standar GABA karena GABA dan MSG terdeteksi dengan titik (spot) warna merah ketika disemprot dengan larutan ninhydrin. GABA mempunyai struktur kimia yang hampir sama dengan glutamat.

Menurut Ueno(2000), GABA merupakan asam amino non-protein yang diproduksi melalui dekarboksilasi glutamat oleh enzim *glutamate decarboxylase*. Sehingga spot tipis yang dihasilkan dibelakang spot MSG standar mengindikasikan senyawa GABA.

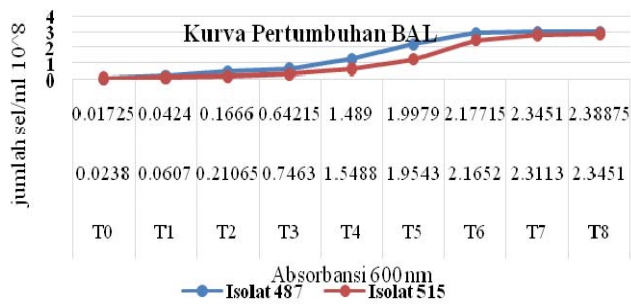
Jumlah mikroorganisme dari bakteri dan jamur telah dilaporkan dalam memproduksi GABA. Selain dibakteri, GABA juga ditemukan pada beberapa jamur, kapang dan khamir. Dari mikroorganisme, GABA pertama kali diisolasi dari perlakuan ekstrak asam khamir (Reed 1950). GABA dideteksi kembali ketika menyelidiki komposisi asam amino dari khamir merah *Rhodotorula glutinis* (Krishnaswamy dan Giri 1953). GABA juga telah diamati dari produksi fase awal *Neurospora crassa* saat perkecambahan spora (Schmit dan Brody 1975).

Penelitian tentang produksi GABA dalam konsentrasi tinggi menggunakan mikroorganisme masih dalam progres. Telah dilaporkan bahwa bakteri asam laktat yang diisolasi dari berbagai macam makanan fermentasi seperti kimchi dan makanan laut (*seafood*) mampu memproduksi GABA menggunakan substrat asam glutamat. *PharmaFood company* (Japan) telah memproduksi GABA dengan mengubah monosodium glutamate menggunakan bakteri asam laktat yang diisolasi dari kimchi dan dipasarkan sebagai bahan makanan fungsional dan telah dilaporkan untuk memproduksi 6,3 mM GABA dengan menginokulasikan *Lactobacillus brevis* IFO 12005 yang diisolasi dari kimchi untuk Soju jugemi yang dibuat dari beras (Ueno et al. 1997; Yokoyama et al. 2002), 302 mM GABA dengan penambahan fosfat piridoksal sebagai koenzim dari GAD oleh *Lb. paracasei* NFR17415 yang diisolasi dari makanan fermentasi tradisional Jepang funasushi (Komatsuzaki et al. 2005).

Dalam kesimpulan, identifikasi produksi γ -Aminobutyric Acid (GABA) oleh Bakteri Asam Laktat (BAL) dapat dilakukan dengan metode TLC *Thin Layer Chromatography*.



Gambar 1. Pemurnian isolat BAL 487, dan 515



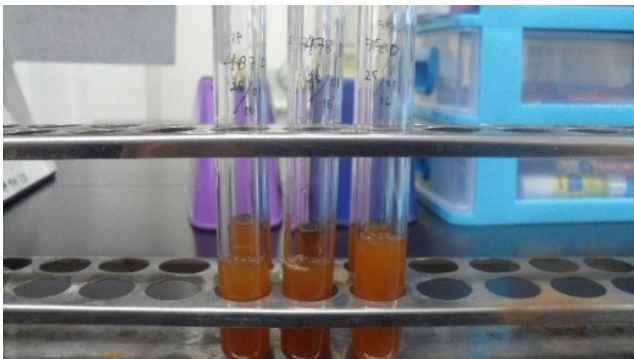
Gambar 2. Kurva pertumbuhan isolat BAL 487 dan 515



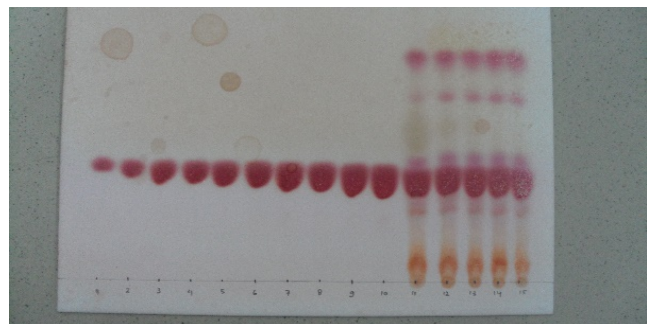
Gambar 5. Medium produksi setelah fermentasi 30 Jam



Gambar 6. Supernatan Hasil Ekstraksi



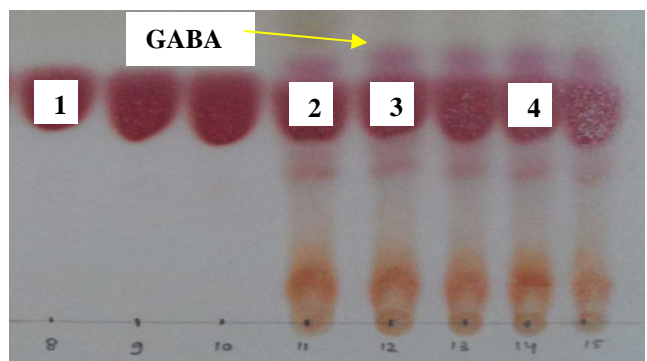
Gambar 3. Inokulum isolat BAL 487 dan 515



Gambar 7. Spot Hasil TLC. Spot no 1 - 10 adalah larutan MSG 1,35%, 1,2%, 1,05%, 0,90%, 0,75%, 0,60%, 0,45%, 0,30%, dan 0,15%(w/v), spot no.11-12 adalah larutan standar GABA, spot no 13 adalah supernatant isolat BAL 487, spot no 14 adalah supernatant isolat no. 515, Spot no 15 adalah supernatant kontrol



Gambar 4. Medium produksi sebelum fermentasi



Gambar 8. Profil TLC dari MSG dan GABA. No. 1-4 adalah glutamat

DAFTAR PUSTAKA

- Cho YR, Chang JY, Chang HC. 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.
- Das D, Goyal A. 2015. Antioxidant Activity and Gamma-aminobutyric Acid (GABA) Producing Ability of Probiotic *Lactobacillus plantarum* DM5 isolated from Marcha of Sikkim. *LWT - Food Sci Technol* 61: 263-268.
- Ganguli A. 2011. Evaluation of λ -Aminobutyric Acid Production by Indigenously Isolated Lactid Acid Bacteria. Departemen of Biotechnology and Environmental Sciences, Thapar University Patiala, India.
- Guerra NP, Bernadez PF, Mendez J, Cachaldora P, Castro LP. 2006. Production of four potentially probiotic lactid acid bacteria and their evaluation as feed additives for weaned piglets. *Anim Feed Sci Technol* 134: 89-107.
- Hao R, Schmit JC. 1993. Cloning of the gene for glutamate decarboxylase and its expression during condiation in *Neurospora crassa*. *Biochem J* 15: 887-890.
- Holzafel WH, Haberer P, Geisen R, Bjorkroth J, Schillinger U. 2001. Taxonomy and important features of probiotic microorganism in food and nutrition. *Amer J Clin Nutr* 73: 365S-373S
- Komatsuzaki N, Shima J, Kawamoto S, Momose H, Timura T. 2005. Production of γ -aminobutyric acid (GABA) by *Lactobacillus paracasei* Isolated from traditional fermented foods. *Food Microbiol* 22: 497-504.
- Kono I, Himeno K. 2000. Changes in γ -aminobutyric acid content during Beni-Koji Making. *Biosci Biotechnol Biochem* 64: 617-619.
- Krishnaswamy PR, Giri KV. 1953. The Occurrence of λ -aminobutyric acid and Glutamic acid Decarboxylase in Red Yeast (*Rhodotorula glutinis*). *Curr Sci* 22: 143-144.
- Leventhal AG, Wang YC, Pu ML, Zhou YF, Ma Y. 2003. GABA and its agonists improved visual cortical function in senescent monkeys. *Science* 300: 812-815.
- Machmud D. 2001. Teknik penyimpanan dan pemeliharaan mikroba. *Buletin AgroBio* 4 (1): 24-32.
- Miura D, Ito Y, Mizukuchi A, Kise M, Aoto H, Yagasaki K. 2006. Hypercholesterolemic action of pre-germinated brown rice in hepatoma-bearing rats. *Life Sci* 79: 259-264.
- Park KB, Oh SH. 2007. Production of yogurt with enhanced level of gamma-aminobutyric acid and valuable nutrients using lactic acid bacteria and germinated soybean extract. *Bioresour Technol* 98: 1675-1679.
- Rahayu E. 2001. Potensi bakteri asam laktat di bidang industri pangan. *Prosiding Seminar Ilmiah Tahunan Perhimpunan Mikrobiologi Indonesia*.
- Rao MM, Tanksale AM, Gatge MS, Desphander VV. 1998. Molecular and biotechnological aspects of microbial proteases. *Microbiol Mol Biol Rev* 62: 597-635.
- Reed LJ. 1950. The occurrence of λ -aminobutyric acid in yeast extract; its isolation and identification. *J Biol Chem* 183: 451-458.
- Schmit JC, Brody S. 1975. *Neurospora crassa* conidial germination: role of endogenous amino acid pools. *J Bacteriol* 124: 232-242.
- Shelp BJ, Bown AW, McLean MD. 1999. Metabolism and functions of gamma-aminobutyric acid. *Trends Plant Sci* 4: 446-452.
- Ueno H. 2000. Enzymatic and structural aspects on glutamate decarboxylase. *J Mol Catal B Enzym* 10: 67-79.
- Ueno Y, Hayakawa K, Takahashi S, Oda K. 1997. Purification and characterization of glutamate decarboxylase from *Lactobacillus brevis* IFO 12005. *Biosci Biotechnol Biochem* 61: 1168-1171.
- Yokoyama S, Hiramatsu J, Hayakawa K. 2002. Production of γ -aminobutyric acid by *Streptococcus salivarius* subsp. *Thermophiles* Y2 under submerged fermentation. *Amino Acids* 34: 473-478.