

POTENSI NANOFILTRASI DALAM PEMEKATAN BAKTERI ASAM LAKTAT SEBAGAI PROBIOTIK SAVORY DARI KACANG HIJAU (*Phaseolus radiatus* L.) TERFERMENTASI OLEH *Rhizopus-C₁*

*The Potential Application of Nanofiltration for Concentrating Lactic Acid Bacteria as Savory Probiotic Prepared from Fermented Mung Beans (*Phaseolus radiatus* L.) by *Rhizopus-C₁**

Sri Moerniati, Agustine Susilowati, Aspiyanto

Pusat Penelitian Kimia – Lembaga Ilmu Pengetahuan Indonesia,
Kawasan PUSPIPTEK, Serpong, Tangerang.
Email: smoerni@gmail.com

ABSTRAK

Pemekatan konsentrat kacang hijau terfermentasi sebagai probiotik ingredient menggunakan sistem nanofiltrasi dengan waktu yang semakin meningkat pada tekanan & kecepatan motor tetap merupakan upaya untuk memperoleh kondisi operasi optimal sehingga dihasilkan produk fungsional savory dengan total BAL dan komposisi terbaik. Proses pemekatan dilakukan selama 30, 60, 90, 120, 150, 180, 210, 240, 270 dan 300 menit, tekanan 25 bar, frekwensi motor pompa 20 Hz, suhu ruang pada substrat kacang hijau terfermentasi oleh *Rhizopus C₁* yang difermentasi oleh BAL pada suhu 40 °C selama 48 jam menggunakan campuran *L. bulgaricus* dan *S. thermophilus* dan diperkaya dengan susu skim. Hasil penelitian menunjukkan bahwa peningkatan waktu proses akan menurunkan fluks bahan namun meningkatkan komposisi retentat terhadap total BAL, total solid, total asam, protein terlarut, gula pereduksi sedangkan kadar garam cenderung menurun. Berdasarkan jumlah BAL dan efisiensi proses, Waktu pemekatan 210 menit adalah optimal dalam dalam menghasilkan retentat sebagai probiotik savory dengan total padatan kering 21,25 %, total asam 1,35 %, protein terlarut 5,65 mg/mL, gula pereduksi 127,5 mg/mL, garam 0,57 % dan jumlah BAL $2,6 \times 10^{10}$ cfu/mL dan fluks permeat 9 L/m².jam sedangkan permeat sebagai produk samping yang berpotensi sebagai acidulant berprobiotik dengan kandungan total padatan kering 2,24 %, total asam 1,24 %, protein terlarut 0,02 mg/mL, gula pereduksi 2,985 mg/mL, garam 0,67 % dan jumlah BAL $1,2 \times 10^7$ cfu/ml.

Kata kunci: Nanofiltrasi (NF), kacang hijau (*Phaseolus radiatus* L.) terfermentasi, retentat/konsentrat, probiotik

ABSTRACT

Concentration of fermented Mung beans as ingredient probiotic through Nanofiltration at fixed pump motor frequency and pressure for long time was an important effort to reach optimal operation condition, so it is generated savory functional product with the best total LAB count and composition. Concentration process of fermented Mung beans substrates by *Rhizopus-C₁* fermented by LAB using mixed cultures of *L. bulgaricus* and *S. thermophilus* and enriched by full cream milk at 40 °C for 48 hours was performed at pump motor frequency of 20 Hz, room temperature and pressure of 25 bar for 30, 60, 90, 120, 150, 180, 210, 240, 270 and 300 minutes, respectively. The result of activity demonstrated that long time of concentration process would reduce permeate flux, increased retentate composition of total LAB count, total solids, total acids, dissolved protein and reducing sugar, while salt concentration would be declined. Based on total LAB count and process efficiency, optimal time of concentration to generate retentate as savory probiotic was 210 minutes with concentrations of total solids of 21.25 %, total acids of 1.35 %, dissolved protein of 5.65 mg/mL, reducing sugar of 127.5 mg/mL, salt of 0.57 % and total LAB count of 2.6×10^{10} cfu/mL, whereas permeate as side product could be used as probiotic acidulent gave flux of 9 L/m².hour with concentrations of total solids of 2.24 %, total acids of 1.24 %, dissolved protein of 0.02 mg/mL, reducing sugar of 2.985 mg/mL, salt of 0.67 % and total LAB count of 1.2×10^7 cfu/mL.

Keywords: Nanofiltration (NF), Mung beans (*Phaseolus radiatus* L.) broth, retentate/concentrate, probiotic

PENDAHULUAN

Kombinasi antara produk pangan fermentasi bersumber protein nabati dan probiotik merupakan suatu sinergi yang berpotensi sebagai pangan fungsional dan perolehan produk pangan bersifat inovatif. Perpaduan antara pangan fermentasi sebagai *flavor savory* dan probiotik memungkinkan dikonsumsi probiotik dengan cara berbeda. Kacang-kacangan terfermentasi oleh *Rhizopus* sp-C₁ yang dikenal sebagai *vegetable broth* (kaldu nabati) merupakan produk *seasoning* serupa dengan *miso* di Jepang, *chiang* di China atau *taucho* di Indonesia (Susilowati dkk., 2006). Fermentasi campuran *Lactobacillus bulgaricus* (*L. bulgaricus*) dan *Streptococcus thermophilus* (*S. thermophilus*) pada kaldu nabati akan menghasilkan senyawa-senyawa organik yang enak dan spesifik selain dari senyawa-senyawa volatil dan asam laktat yang diperoleh dari fermentasi Bakteri Asam Laktat (BAL) yang merupakan probiotik (Tamime dan Marshall, 1997). Produk *seasoning* berprobiotik ini dapat diaplikasikan dengan memfortifikasikan pada aneka saus atau sebagai bahan *coating* pada snack setelah melalui proses instanisasi pada suhu rendah.

Untuk memperoleh kaldu nabati berprobiotik dengan kepekatan tinggi yang mengandung jumlah sel BAL optimal dilakukan pemekatan menggunakan sistem nanofiltrasi. Sistem nanofiltrasi secara luas telah diterapkan di industri-industri farmasi, bioteknologi, makanan dan minuman, dan produk olahan susu. Membran nanofiltrasi yang merupakan jenis membran relatif baru diyakini memiliki ukuran pori-pori berkisar antara 1 – 10 nanometer (nm) dan mampu memisahkan anion monovalent serta anion di- & multivalent dan senyawa-senyawa organik berberat molekul sekitar 150 - 300 Dalton dengan tekanan operasi antara 7–30 bar (Anonim, 2005). Membran nanofiltrasi menahan partikel-partikel solut gula dan garam multivalent, tetapi melewatkan sejumlah besar garam-garam monovalent. Pada nanofiltrasi, hasil proses berupa permeat yang mengandung garam dan solut dengan ukuran partikel < 1 – 10 nm dan konsentrat yang mengandung solut dengan ukuran partikel > 1 – 10 nm, seperti protein, lemak, gula (Bruggen dkk, 1999). Dalam kaitannya dengan proses pemekatan kaldu nabati berprobiotik dengan ukuran BAL lebih besar daripada ukuran pori-pori membran nanofiltrasi memungkinkan tertahannya BAL pada permukaan membran sehingga meningkatkan jumlahnya dalam konsentrat. *L. bulgaricus* seperti BAL pada umumnya, berbentuk batang dengan kisaran ukuran 0,5 - 1,2 x 1 - 10 µm (Batt dkk, 1999) namun pada kondisi tertentu dapat berbentuk sedikit bulat, sedangkan *S. thermophilus* berbentuk bulat atau menyerupai telur dengan diameter kurang atau sama dengan 1 µm dan membentuk rantai (Salminen dan Wright, 1998). Dengan ukuran tersebut memungkinkan BAL dapat tertahan oleh membran nanofiltrasi sebagai retentat/konsentrat oleh

pengaruh tekanan hidrostatik yang tinggi. Seperti umumnya teknologi membran, kinerja membran nanofiltrasi dipengaruhi oleh tekanan, waktu, laju alir bahan dan suhu operasi. Kriteria kinerja membran yang ideal meliputi *performance* (fluks dan tingkat efisiensi pemisahan) yang tinggi (Cheryan, 1992). Selain dipengaruhi oleh kondisi operasi, materi bahan membran dan jenis bahan juga berpengaruh terhadap perolehan komposisi permeat maupun retentat/konsentrat. Umpan (feed) berupa suspensi dengan tingkat keasaman tinggi dan berisi mikroba hidup memungkinkan diperolehnya hasil pemekatan berbeda baik dari komposisi nutrisi maupun viabilitas BAL.

Tujuan dari penelitian ini adalah untuk mengetahui kondisi operasi optimal pada proses pemekatan biomassa kacang hijau terfermentasi sebagai ingredient berprobiotik melalui membran nanofiltrasi pada frekuensi motor pompa 20 Hz, suhu kamar dan tekanan operasi 25 bar selama 30, 60, 90, 120, 150, 180, 210, 270 dan 300 menit sehingga dihasilkan produk fungsional *savory* dengan total BAL dan komposisi terbaik.

METODE PENELITIAN

Bahan dan Peralatan

Bahan-bahan yang digunakan dalam kegiatan percobaan berupa konsentrat kacang hijau terfermentasi oleh *Rhizopus* sp-C₁ sebagai hasil pemurnian kacang hijau terfermentasi melalui membran mikrofiltrasi (MF) 0,45 µm, kultur campuran yang merupakan strain yogurt dari *Lactobacillus bulgaricus* dan *Streptococcus thermophilus* (Pusat Penelitian Kimia-LIPI), membran MF dan nanofiltrasi (NF) (DSS, Denmark) serta bahan-bahan kimia grade analitik dari E. Merck.

Peralatan utama yang dipergunakan dalam kegiatan ini berupa autoclave, incubator, sistem fermentasi skala laboratorium, modul membran MF/UF/NF/RO (DSS, Denmark) (Anonim, 2000), spektrofotometer, dan instrumen untuk analisis kimia dan pengamatan aspek mikrobiologi dari produk.

Rancangan Percobaan

Proses pemekatan terhadap konsentrat kacang hijau terfermentasi oleh *Rhizopus* sp-C₁ sebagai hasil pemurnian melalui membran mikrofiltrasi (MF) 0,45 µm dan diinokulasi oleh campuran kultur starter yogurt *L. bulgaricus* dan *S. thermophilus* dilakukan menggunakan sistem membran Nanofiltrasi (NF) pada laju alir 7 L/menit, suhu 25 °C dan tekanan 25 bar selama 30, 60, 90, 120, 150, 180, 210, 240, 270 dan 300 menit. Selama proses pemekatan, sampel feed/konsentrat/retentat dan permeat dianalisis setiap 30 menit.

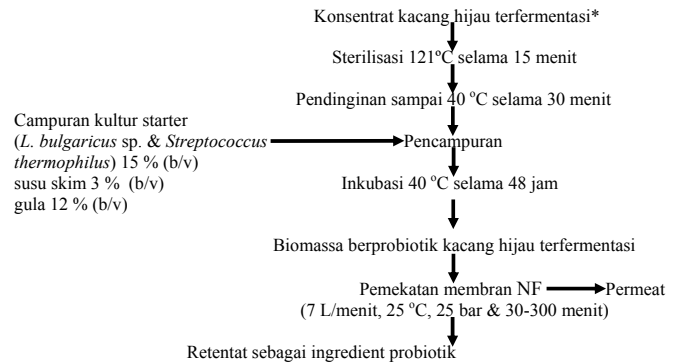
Pengamatan kinerja membran NF berupa fluks permeat. Analisis yang dilakukan terhadap komposisi biomassa kacang hijau terfermentasi berprobiotik (feed), probiotik ingredient (retentat) dan permeat meliputi padatan total (metoda Gravimetrik), padatan terlarut (Hand Refractometer ATAGO), protein terlarut (metoda Lowry), gula pereduksi (metoda Somogyi – Nelson), total asam (metoda titrasi), dan garam (Hand Salinity meter) (A.O.A.C., 1990), sementara jumlah BAL total dihitung menurut metoda pour plate pada agar MRS (metoda OXOID). Percobaan dilakukan dengan 3 kali ulangan.

Pembuatan dan Pemekatan Biomassa Kacang Hijau Terfermentasi Berprobiotik Melalui Membran Nanofiltrasi (NF)

Pembuatan biomassa probiotik dari kacang hijau terfermentasi dilakukan dengan menginokulasi konsentrat kacang hijau terfermentasi oleh *Rhizopus* sp-C₁ yang dihasilkan dari pemurnian melalui membrane MF 0,45 µm dengan 15 % (b/v) campuran kultur starter yogurt *L. bulgaricus* dan *S. thermophilus*. Dalam fermentasi ini ditambahkan susu skim sebagai sumber laktosa untuk pertumbuhan BAL hingga konsentrasi protein total mencapai 3 % (b/v) dan sukrosa 12 % (b/v). Campuran ini kemudian diinkubasi pada suhu 40 °C selama 48 jam sehingga dihasilkan biomassa probiotik dari kacang hijau terfermentasi. Guna memperoleh konsentrat biomassa probiotik dari kacang hijau terfermentasi dilakukan pemekatan melalui membran NF.

Sebanyak 5 L biomassa probiotik dari kacang hijau terfermentasi sebagai feed dalam tanki 9 L dipompa secara tangensial/cross flow menggunakan Positive Displacement Pump Rannie 25,38 melalui filter 200 µm, sistem penukar panas dan modul membran NF. Feed/konsentrat/retentat diatur pada laju alir 7 L/menit. Suhu feed/konsentrat/retentat dalam tanki distabilkan dengan menggunakan chiller. Pada percobaan ini, suhu chiller diatur pada 23 – 24 °C dan suhu tanki feed/konsentrat/retentat dijaga dan dipertahankan pada suhu ruang (~ 25 °C). Tekanan operasi sebesar 25 bar dicapai dengan merata-ratakan tekanan operasi feed dan retentat. Aliran cross-flow pada operasi NF, fluida dialirkan menuju permukaan membran NF dimana terjadi pemisahan komponen-komponen makromolekul, suspensi dan koloid dalam feed. Komponen tertolak yang tidak lolos melalui membran, disirkulasikan secara kontinue kedalam tanki feed/konsentrat/retentat sebagai retentat. Komponen yang lolos melalui membran dipisah sebagai permeat. Proses ini semakin lama akan meningkatkan konsentrasi solute dalam feed/konsentrat/retentat. Selama proses pemekatan, dilakukan sampling terhadap permeat dan feed/konsentrat/retentat setiap 30, 60, 90, 120, 150, 180, 210, 240, 270 dan 300 menit. Setelah proses pemekatan selesai, membran pada modul dibersihkan

dengan mengalirkan 1 % larutan sodium hidroksida pada laju alir 3,5 L/menit, suhu 60 °C dan tekanan 25 bar selama 30 menit, diikuti oleh pembilasan menggunakan air Reverse Osmosis (RO). Pembuatan dan pemekatan biomassa berprobiotik dari kacang hijau terfermentasi melalui membran NF ditunjukkan pada Gambar 1.



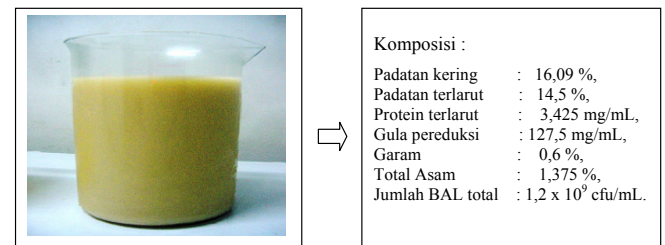
Catatan : *Konsentrat kacang hijau terfermentasi oleh *Rhizopus*-C₁ yang dimurnikan melalui membran MF 0,45 µm.

Gambar 1. Pembuatan dan pemekatan biomassa berprobiotik dari kacang hijau terfermentasi melalui membran NF

HASIL DAN PEMBAHASAN

Karakteristik Biomasa Probiotik dari Kacang Hijau Terfermentasi

Karakteristik biomassa probiotik dari kacang hijau terfermentasi menggunakan campuran kultur starter yogurt *L. bulgaricus* dan *S. thermophilus* ditunjukkan pada gambar 2. Dari komposisi biomassa probiotik dari kacang hijau terfermentasi, protein terlarut dan jumlah BAL total merupakan komponen-komponen paling penting. Ini berkaitan dengan fungsi konsentrat sebagai aditif pangan probiotik atau ingredien probiotik sebagai sumber protein nabati dalam produk pangan nabati. Konsentrasi protein terlarut yang tinggi (3,425 mg/mL) dalam biomassa probiotik dari kacang hijau



Gambar 2. Biomassa probiotik dari kacang hijau terfermentasi dan komposisinya yang digunakan sebagai umpan pada pemekatan melalui membran NF

terfermentasi menunjukkan banyaknya asam-asam amino dan peptide-peptida berberat molekul rendah guna mendukung sifat-sifat fungsionalnya sebagai bahan *seasoning* yang mengandung *flavor savory*. Konsentrasi gula pereduksi yang tinggi (127,5 mg/mL) dan garam (0,6 %) mengindikasikan pengaruh bahan awal yang dihasilkan oleh proses fermentasi garam yang merupakan reaksi dasar dari produk ini.

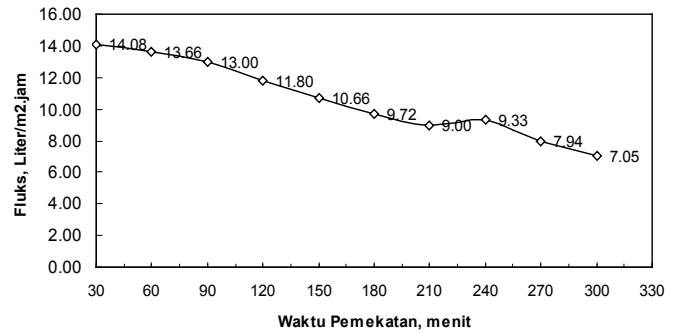
Fermentasi garam pada kacang hijau oleh 24% *Rhizopus-C₁*, 20 % garam dan 56 % kacang hijau menghasilkan citarasa kacang hijau yang spesifik sebagai hasil dari perombakkan protein, karbohidrat dan lemak oleh masing-masing aktivitas enzim protease, amilase dan lipase. Dari keseluruhan produk ini akan dihasilkan citarasa *savory (umami)* (Susilowati dkk., 2006).

Pengaruh Proses Pemekatan Terhadap Fluks

Pengaruh waktu pemekatan terhadap fluks permeat melalui membran NF pada laju alir 7 L/menit, suhu kamar dan tekanan 25 bar ditunjukkan pada gambar 3. Fluks (J) permeat diartikan sebagai sejumlah filtrat yang keluar (L) per satuan luas (A) per waktu (t) yang dihitung sebagai $J = L / (A \times t)$. Fluks permeat merupakan salah satu parameter kinerja membran dan menjadi suatu kriteria suatu proses membran (Mulder, 1996). Dalam pemekatan kaldu nabati probiotik melalui membran NF, umpan berupa biomassa BAL dari konsentrat kacang hijau terfermentasi sebagai hasil mikrofiltrasi 0,45 µm dengan kandungan padatan total 16,09 %. Tingginya konsentrasi padatan total ini berpengaruh langsung terhadap fluks permeat dimana dengan tekanan 25 bar menunjukkan penurunan fluks permeat secara tajam sejalan dengan lamanya waktu pemekatan. Penurunan fluks permeat yang tajam ini disebabkan oleh pemisahan bahan dimana partikel yang lebih kecil akan lolos sebagai permeat yang menyebabkan retentat semakin mengental.

Penurunan fluks permeat dipengaruhi tidak hanya oleh kondisi proses (tekanan transmembran, kecepatan *cross-flow*, suhu dan waktu) tetapi juga oleh faktor-faktor jenis dan konsentrasi biomassa serta jenis bahan membran yang digunakan. Faktor-faktor tersebut memberikan pengaruh terhadap fluks permeat berbeda-beda (Zeman dan Zydney, 1996). Tekanan akan berpengaruh terhadap laju alir permeat sedangkan frekuensi motor pompa berpengaruh terhadap laju alir biomassa. Umumnya laju alir akan berkorelasi positif terhadap nilai fluks permeat sehingga semakin tinggi laju alir biomassa maka nilai fluks permeat juga akan semakin tinggi (Michaels, 1989).

Membran NF yang memiliki ukuran pori-pori 1 – 10 nm dengan kemampuan memisahkan partikel pada kisaran 0,001 mikron (4×10^5 inci = $1 \times 4 A^\circ$ units) dapat memisahkan hampir seluruh partikel dari air termasuk asam laktat dan



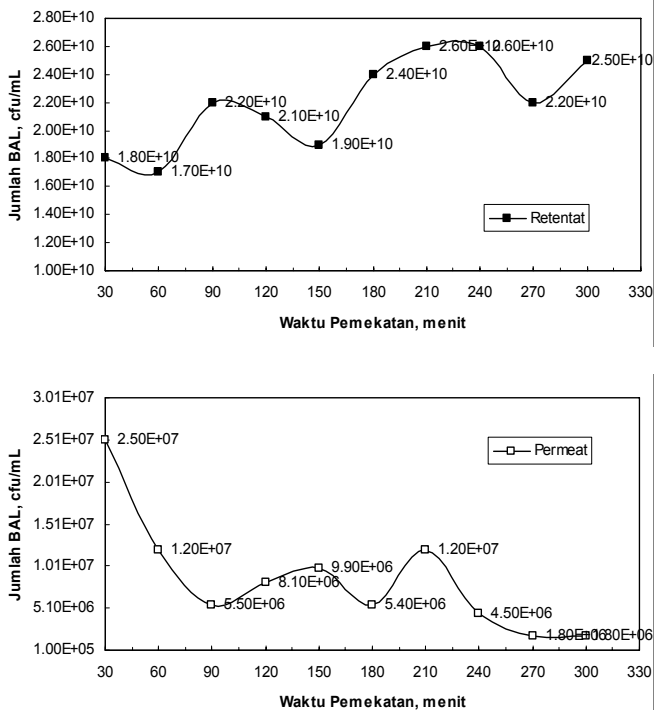
Gambar 3. Hubungan antara waktu pemekatan dan fluks permeat sebagai hasil pemekatan biomassa probiotik dari kacang hijau terfermentasi melalui membran NF pada laju alir 7 L/menit, suhu kamar, tekanan 25 bar

senyawa volatil (asetaldehida dan senyawa-senyawa organik hasil fermentasi BAL) yang merupakan metabolit BAL (Karos dkk, 1996). Pada pemisahan konsentrat berprobiotik ini dimana konsentrasi gula, protein dan jumlah BAL total cukup tinggi memungkinkan terbentuknya fouling karena peningkatan kekentalan fluida yang melewati permukaan membran. Pada proses ini lebih ditekankan pada kemampuan membran NF dalam memekatkan bahan biomassa, terutama BAL selain dari metabolit yang dihasilkan oleh BAL selama proses hidrolisis terutama kandungan asam laktatnya yang berfungsi langsung sebagai zat bioaktif produk konsentrat.

Pengaruh Proses Pemekatan Terhadap Jumlah BAL dan Komposisi Permeat dan Retentat

Terhadap jumlah BAL total, maka dengan semakin lamanya waktu pemekatan akan meningkatkan jumlah BAL total baik pada retentat maupun permeat. Peningkatan waktu optimal terjadi pada retentat dengan waktu pemekatan 210 dan 240 menit dengan menghasilkan jumlah BAL total masing-masing $2,6 \times 10^{10}$ cfu/mL, sedangkan pada permeat jumlah BAL total cenderung tetap dimana pada waktu pemekatan 210 menit menghasilkan jumlah BAL total sebesar $1,2 \times 10^7$ dan $4,5 \times 10^6$ cfu/mL, seperti ditunjukkan dalam gambar 4. Perbedaan jumlah BAL total dalam retentat dan permeat ditunjukkan dengan kisaran rejeksi antara 99,97 – 99,99 % atau dengan kata lain efisiensi proses pemekatan menggunakan membran NF menunjukkan pemisahan yang sempurna karena hampir seluruh BAL tertahan dalam retentat dan hanya sebagian kecil lolos dalam permeat (Paulson, 1995). Keadaan ini menunjukkan bahwa membran semipermeabel ideal dan partikel bebas melewati membran. Hal ini terjadi karena besarnya pori-pori membran NF berkisar antara 1 – 10 nm dimana BAL dari *S. thermophilus* memiliki bentuk sel bulat dengan diameter $\leq 1 \mu\text{m}$ membentuk rantai panjang sedangkan *L. bulgaricus* berbentuk batang dengan kisaran ukuran sel $0,5 - 1,2 \times 10^{-10} \mu\text{m}$ (Batt dkk, 1999 &

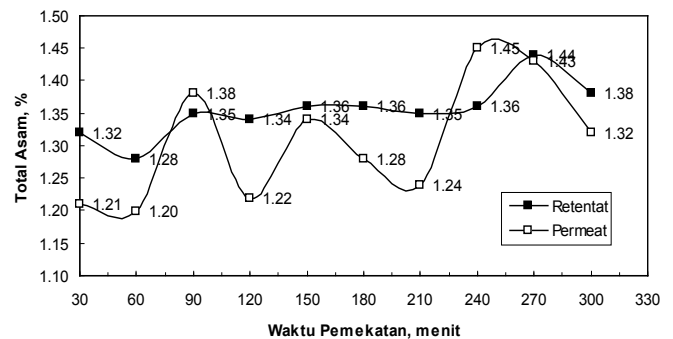
Salminen dan Wright, 1998) sehingga dengan ukuran BAL yang lebih besar daripada ukuran pori-pori membran NF memungkinkan terjadinya penumpukan partikel BAL pada permukaan membran sebagai retentat dan hanya sedikit yang lolos sebagai permeat, meskipun sejumlah sel dapat saja berubah bentuk oleh tekanan tinggi sehingga dapat melalui penghalang membran bahkan jika ukuran sel lebih kecil daripada ukuran pori-pori membran. Proses pemekatan ini memungkinkan juga terjadinya kematian sel BAL karena mengalami kerusakan dinding sel dan tidak aktifnya enzim intraseluler karena tekanan operasi tinggi (Tamime, 1980).



Gambar 4. Hubungan antara waktu pemekatan dan jumlah BAL total sebagai hasil pemekatan biomassa probiotik dari kacang hijau terfermentasi melalui membran NF pada laju alir 7 L/menit, suhu kamar, tekanan 25 bar

Dugaan inilah yang kemungkinan terjadi pada waktu pemekatan 270 dan 300 menit dimana jumlah BAL total dalam retentat menunjukkan penurunan masing-masing menjadi $2,2 \times 10^{10}$ dan $2,5 \times 10^{10}$ cfu/mL. Meskipun demikian, banyaknya jumlah BAL total yang lolos dalam permeat terdapat lebih dari batas banyaknya probiotik dalam suatu produk probiotik ($> 10^6$ cfu/mL) dimana dengan waktu pemekatan 30, 60, 90, 120, 150, 180, dan 210 menit berturut-turut menghasilkan jumlah BAL total $2,5 \times 10^7$, $1,2 \times 10^7$, $5,5 \times 10^6$, $8,1 \times 10^6$, $9,9 \times 10^6$, $5,4 \times 10^6$ dan $1,2 \times 10^7$ cfu/mL. Sedangkan retentat berupa suspensi kental, creammy, berwarna kekuningan berasa asam, manis dan gurih sedangkan permeat berupa cairan jernih menyerupai air, berasa gurih, asam dan sedikit manis berpotensi sebagai acidulant berprobiotik.

Waktu pemekatan yang semakin lama juga meningkatkan konsentrasi total asam dalam retentat dan permeat, seperti ditunjukkan dalam gambar 5. Asam laktat merupakan metabolit BAL dari proses fermentasi yang dihasilkan dengan memanfaatkan karbohidrat (glukosa, maltosa, fruktosa) dari media dan laktosa dari susu skim sebagai nutrisinya melalui jalur Tagatose dan Embden Meyerhof Parnas (EMP). Asam laktat dihitung sebagai asam total tertitrisasi dan merupakan parameter terjadinya proses metabolisme laktosa homofermentatif (Anonim, 2005) yang merupakan komponen bioaktif produk ini.



Gambar 5. Hubungan antara waktu pemekatan dan konsentrasi total asam sebagai hasil pemekatan biomassa probiotik dari kacang hijau terfermentasi melalui membran NF pada laju alir 7 L/menit, suhu kamar, tekanan 25 bar

Kandungan asam laktat sebagai total asam tertitrisasi optimal dalam retentat (1,44 %) dan permeat (1,43 %) diperoleh pada waktu pemekatan 270 menit. Selama pemekatan terlihat bahwa pemisahan asam laktat berlangsung cukup baik dimana secara keseluruhan asam laktat dalam retentat tertahan lebih banyak daripada lolos dalam permeat. Beberapa waktu pemekatan memperlihatkan fluktuatifnya konsentrasi asam laktat dengan konsentrasi dalam permeat yang lebih tinggi, seperti pada 90 menit (1,38 %) dan 240 menit (1,45 %) daripada dalam retentat masing-masing 1,35 % dan 1,36 %. Tabel 1 memberikan gambaran bahwa dari rasio konsentrasi asam laktat dalam retentat dan permeat yang hanya sedikit berbeda menunjukkan bahwa sistem NF beroperasi kurang optimal. Hal ini ditunjukkan dengan tingkat rejeksi yang rendah berkisar antara 0,69 – 8,95 %.

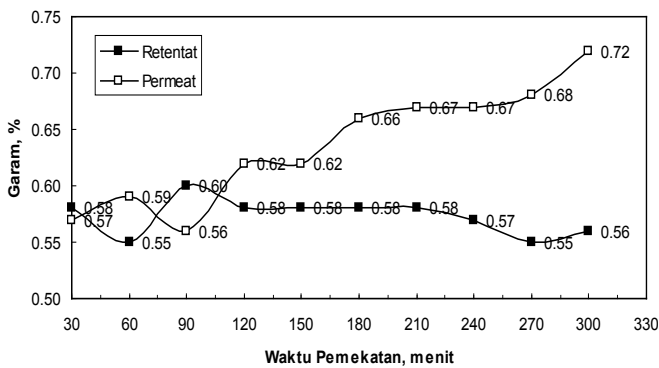
Rejeksi (R) yang merupakan tingkat penolakan membran atas suatu komponen menunjukkan kemampuan suatu membran untuk menahan komponen tertentu agar tidak melewati membran. Rejeksi dinyatakan dalam prosentase yang dapat dihitung sesuai dengan rumus $R = 1 - (C_p/C_f)$, dimana C_p merupakan konsentrasi solut dalam permeat dan C_f merupakan konsentrasi solut dalam umpan (feed). Apabila suatu zat tertahan sempurna oleh membran, maka konsentrasi zat dalam aliran permeat menjadi 0 ($C_p = 0$), tetapi karena

Tabel 1. Rejeksi komponen pada biomassa berprobiotik dari kacang hijau terfermentasi melalui membran NF pada laju alir 7 L/ menit, suhu kamar dan tekanan operasi 25 bar

Waktu pemekatan, menit	Rejeksi, %					
	Garam	Gula pereduksi	Protein terlarut	Asam total	Padatan kering	BAL
30	1,72	99,01	99,56	8,33	87,81	99,938
60	7,27	99,32	99,66	6,25	88,39	99,973
90	6,67	99,37	99,60	2,22	88,26	99,987
120	6,89	99,42	99,5	8,95	88,87	99,982
150	6,89	99,45	99,73	1,47	91,35	99,979
180	13,79	99,25	96,85	5,88	92,59	99,987
210	17,54	99,17	99,71	8,15	94,11	99,974
240	17,54	99,14	99,99	6,62	93,81	99,991
270	23,64	99,13	99,69	0,69	94,66	99,996
300	28,57	99,06	99,67	4,35	96,1	99,996

tidak ada membran yang mempunyai sifat ideal, nilai rejeksi antara 1-100% (Cheryan, 1992).

Diduga dengan ukuran partikel antara 0,0004 – 0,0008 μm (100 – 500 Dalton) (Scot dan Hughes 1996) memungkinkan asam laktat mudah lolos sebagai permeat. Konsentrat berprobiotik ini mempunyai kisaran pH antara 3,5 - 4,5 yang memungkinkan terjadinya interaksi antara bahan dan komponen membran sehingga menurunkan selektivitasnya karena pengaruh tingkat hidrolisis pada membran (Belitz dan Grosch, 1999). Materi membran berupa bahan komposit yang terdiri atas polietilen (PE) dan bahan-bahan selektif aktif dimana dalam spesifikasinya bahan ini selektif terhadap protein dengan perkiraan rejeksi < 45 % (Belitz dan Grosch, 1999) sehingga konsentrat berprobiotik dengan konsentrasi asam total cukup tinggi (1,28 – 1,44 %) kemungkinan akan berpengaruh terhadap ketahanan bahan yang menghasilkan rejeksi asam total < 45 %. Kecenderungan berbeda ditunjukkan pada konsentrasi garam dari bahan yang dinyatakan dengan rejeksi yang rendah selama waktu



Gambar 6. Hubungan antara waktu pemekatan dan konsentrasi garam sebagai hasil pemekatan biomassa probiotik dari kacang hijau terfermentasi melalui membran NF pada laju alir 7 L/menit, suhu kamar, tekanan 25 bar

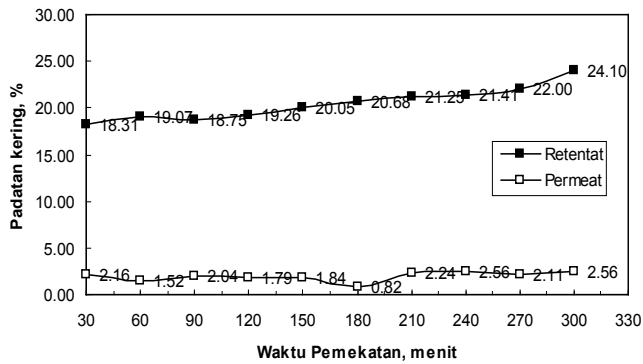
pemekatan 300 menit (Tabel 1). Semakin lama waktu pemekatan menghasilkan peningkatan konsentrasi garam dalam permeat namun semakin menurun pada retentat.

Tingkat pemisahan garam yang nyata tampak setelah proses pemekatan 120 menit dimana garam lebih banyak lolos dalam permeat daripada tertahan pada retentat, seperti ditunjukkan pada Gambar 6.

Hal ini diduga disebabkan selain besarnya partikel garam (0,001 – 0,01 μm) (Scot dan Hughes, 1996) juga sifat kelarutan garam dalam air cukup tinggi. NaCl merupakan elektrolit kuat yang berdisosiasi hampir sempurna membentuk partikel bermuatan (ion). Kuatnya ikatan elektrostatis ini dapat dipisahkan oleh air murni sebagai pelarut terbaik dimana daya tarik antara kutub-kutub air dan ion-ion Na⁺ dan Cl⁻ mengalahkan daya tarik menarik kedua ion tersebut sehingga garam larut dengan kestabilan tinggi meskipun hal ini juga dipengaruhi oleh faktor kondisi proses (tekanan, laju alir). Dugaan lain adalah tingginya tekanan proses (25 bar) menyebabkan gaya dorong yang cukup besar sehingga garam tampak berfluktuatif sampai proses pemekatan 90 menit dan mulai lolos sebagai permeat setelah waktu pemekatan 120 menit. Secara keseluruhan, sistem NF menghasilkan pemisahan garam kurang optimal yang ditunjukkan dengan tingkat rejeksi terhadap garam berkisar 1,72 – 28,57 %.

Terhadap konsentrasi padatan kering, waktu pemekatan menghasilkan produk probiotik dengan konsentrasi padatan kering dalam retentat semakin meningkat namun cenderung konstan pada permeat. Padatan kering dalam retentat lebih banyak daripada dalam permeat untuk seluruh waktu pemekatan, seperti ditunjukkan pada Gambar 7. Proses pemekatan selama 300 menit menghasilkan pemisahan padatan kering dengan tingkat rejeksi yang baik dengan kisaran antara 87,81 – 96,1 %, hal ini ditunjukkan pada Tabel 1. Dengan kata lain kinerja membran NF dalam pemisahan padatan kering adalah

optimal atau mendekati sempurna karena hanya sebagian kecil padatan kering saja yang lolos sebagai permeat. Peningkatan konsentrasi padatan kering ini disebabkan terjadinya pengurangan air yang lolos melewati pori-pori membran menyebabkan terjadinya akumulasi bahan pada permukaan membran meskipun membran mempunyai batas maksimal pemisahan (30 % dari total bahan) (Mulder, 1996). Padatan kering dari konsentrat kacang hijau terfermentasi berprobiotik ini mengandung komponen-komponen terlarut dan tidak terlarut, yaitu asam-asam amino, asam laktat, mineral, karbohidrat, senyawa volatil (alkohol, diasetildehida) dan mikroba hidup (BAL).

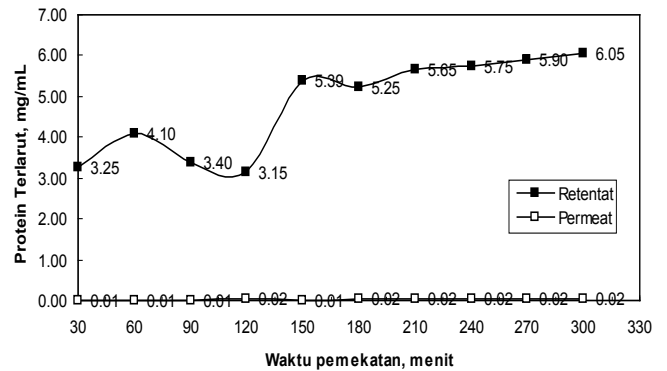


Gambar 7. Hubungan antara waktu pemekatan dan konsentrasi padatan kering sebagai hasil pemekatan biomassa probiotik dari kacang hijau terfermentasi melalui membran NF pada laju alir 7 L/menit, suhu kamar dan tekanan 25 bar

Hubungan antara waktu pemekatan dan konsentrasi protein terlarut sebagai hasil pemekatan biomassa probiotik dari kacang hijau terfermentasi melalui membran NF pada laju alir 7 L/menit, suhu kamar dan tekanan 25 bar ditunjukkan pada Gambar 8. Terhadap konsentrasi protein terlarut, waktu pemekatan semakin lama menghasilkan konsentrat dengan protein terlarut lebih tinggi daripada protein terlarut pada permeat.

Waktu pemekatan 30–60 menit menunjukkan adanya peningkatan yang tajam dalam retentat dengan konsentrasi protein terlarut optimal 4,1 mg/mL yang selanjutnya menurun sampai waktu pemekatan 120 menit (3,15 mg/mL) namun tetap lebih tinggi apabila dibandingkan dengan konsentrasi protein terlarut awal bahan (3,425 mg/mL). Sedangkan dalam permeat memperlihatkan konsentrasi protein terlarut cenderung konstan sampai waktu pemekatan 300 menit (0,02 mg/mL).

Proses pemekatan ini memperlihatkan efisiensi maksimal yang ditunjukkan pada rejeksi berkisar 96,85–99,99 % selama pemekatan waktu pemekatan 30–300 menit atau dengan kata lain pemisahan protein terlarut mendekati sempurna. Hal ini diduga disebabkan oleh penggunaan membran NF mempunyai

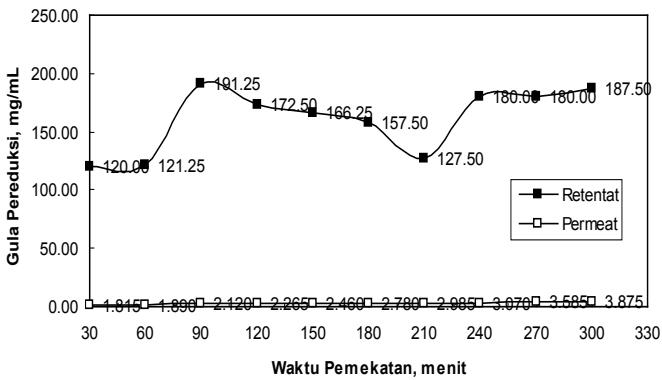


Gambar 8. Hubungan antara waktu pemekatan dan konsentrasi protein terlarut sebagai hasil pemekatan biomassa probiotik dari kacang hijau terfermentasi melalui membran NF pada laju alir 7 L/menit, suhu kamar dan tekanan 25 bar

ukuran pori-porinya (1 - 10 nm) lebih kecil daripada ukuran partikel komponen protein terlarut (asam-asam amino dan peptida) sehingga dapat memekatkan dengan sempurna yang ditunjang dengan pemilihan kondisi proses berupa laju alir 7 L/menit, suhu ruang dan tekanan 25 bar. Protein terlarut merupakan komponen penting pada produk konsentrat kacang hijau sebagai ingredien probiotik selain dari jumlah BAL total itu sendiri. Hal ini disebabkan protein terlarut merupakan parameter peptida dan asam-asam amino dengan berat molekul rendah karena pengaruh dari proses-proses fermentasi yang menyertainya, terutama pada saat fermentasi kacang hijau menggunakan inokulum dari kapang *Rhizopus* sp-C₁. Protein terlarut juga menunjukkan pengaruh enzim-enzim aktifitas β -galaktosidase dan β -fosfogalaktosidase dalam memfermentasikan laktosa membentuk asam laktat juga. Selama fermentasi BAL berlangsung, protein terlarut diperoleh sebagai asam-asam amino yang dihasilkan pada reaksi enzimatis melalui pemecahan protein susu skim oleh enzim proteinase menjadi peptida-peptida terlarut yang selanjutnya oleh enzim peptidase membentuk asam-asam amino (Anonim, 2005) yang memberi kontribusi protein terlarut pada keseluruhan biomassa. Dengan produksi asam laktat yang tinggi menyebabkan tingkat keasaman suspensi semakin tinggi yang menyebabkan terjadinya denaturasi protein yang ditunjukkan dengan pembentukan massa padat laktosa sebagai koagulan menyerupai yogurt.

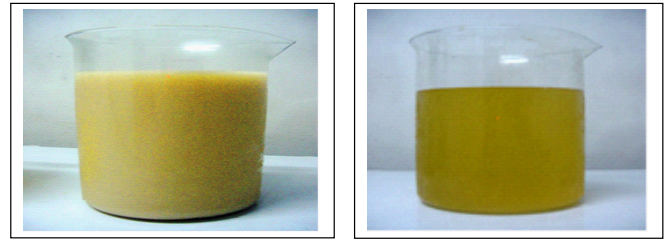
Kecenderungan berbeda terlihat pada kandungan gula pereduksi produk probiotik, seperti ditunjukkan dalam Gambar 9. Waktu pemekatan yang semakin lama akan menghasilkan konsentrasi gula pereduksi dalam retentat yang semakin meningkat sampai optimal pada waktu pemekatan 90 menit, selanjutnya berfluktuatif sampai waktu pemekatan 300 menit dengan menghasilkan konsentrasi gula pereduksi 187,5 mg/mL, sedangkan pada permeat tampak konstan sejalan

dengan lamanya waktu proses. Dari perbedaan konsentrasi gula pereduksi dalam retentat dan permeat ini menunjukkan efisiensi tinggi yang ditunjukkan dengan nilai rejeksi pada kisaran 99,01 - 99,42 % selama waktu pemekatan 30–300 menit atau tingkat pemisahan yang hampir sempurna. Pemisahan ini disebabkan oleh partikel gula (fruktosa, sukrosa, glukosa) memiliki ukuran partikel berkisar 0,0008 – 0,001 μm (200 – 400 Dalton). Dengan ukuran yang lebih besar daripada ukuran pori-pori membran NF sehingga sistem NF akan menahan partikel gula pada permukaan membran. Gula merupakan komponen cukup penting pada produk ini karena memberi kontribusi rasa keseluruhan pada produk probiotik. Kombinasi citarasa manis, asam, asin dan rasa gurih (*umami*) merupakan citarasa unik dan spesifik sebagai sumber nutrisi probiotik. Gula sebagai monosakarida (fruktosa dan glukosa) diperoleh dari hasil pemecahan karbohidrat dari kacang hijau oleh enzim amylase kapang *Rhizopus* sp-C₁ sebagai inokulum pada proses fermentasi garam pada kacang hijau terfermentasi (Susilowati dkk, 2006). Gula juga diperoleh dari pembubuhan susu skim dan sukrosa pada saat fermentasi BAL yang digunakan sebagai sumber nutrisi BAL.



Gambar 9. Hubungan antara waktu pemekatan dan konsentrasi gula pereduksi sebagai hasil pemekatan biomassa probiotik dari kacang hijau terfermentasi melalui membran NF pada laju alir 7 L/menit, suhu kamar dan tekanan 25 bar.

Dari keseluruhan proses pemekatan kaldu nabati berprobiotik diperoleh kondisi proses terbaik berdasarkan optimisasi jumlah BAL total dan efisiensi proses, yaitu pada waktu proses pemekatan 210 menit yang memberikan hasil retentat yang berupa suspensi kental, *creamy* dengan warna putih kekuningan yang berasa gurih, asam dan sedikit manis, mempunyai jumlah BAL total sebesar $2,6 \times 10^{10}$ cfu/mL, sedangkan hasil permeat berbentuk cairan jernih, berasa gurih, asam dan sedikit manis, mempunyai jumlah BAL total $1,2 \times 10^7$ cfu/mL, yang berpotensi sebagai acidulant berprobiotik. Gambar 10 memperlihatkan retentat (a) dan permeat (b) hasil pemekatan kaldu nabati berprobiotik melalui membran



Gambar 10. Retentat (a), permeat (b) hasil pemekatan kaldu kacang hijau berprobiotik melalui nanofiltrasi pada laju alir 7 L/menit, suhu kamar dan tekanan 25 bar selama 210 menit

NF pada laju alir 7 L/menit, suhu ruang dan tekanan 25 bar selama 210 menit.

KESIMPULAN

1. Proses pemekatan biomassa probiotik dari kaldu nabati melalui membran NF berpengaruh terhadap kinerja membran, komposisi dan jumlah BAL total. Retentat menunjukkan komposisi nutrisi lebih baik daripada permeat.
2. Semakin lama waktu konsentrasi akan menghasilkan pemisahan komponen-komponen dalam retentat dan permeat semakin optimal, mengurangi konsentrasi garam, dan meningkatkan padatan total, protein terlarut, gula pereduksi, asam total, dan jumlah BAL total dalam retentat, sementara fluks permeat menurun, konsentrasi gula pereduksi dan jumlah BAL total dalam permeat cenderung tetap dan konsentrasi garam berfluktuasi.
3. Berdasarkan jumlah BAL total dan efisiensi proses yang tertinggi, proses NF optimal tercapai pada waktu 210 menit. Kondisi proses ini menghasilkan retentat sebagai suspensi kental kaldu nabati berprobiotik, krim, putih kekuning-kuningan, berasa gurih, asam dan sedikit manis, sementara permeat sebagai asidulan probiotik berupa cairan jernih kekuning-kuningan dan berasa gurih, asam dan sedikit manis.

UCAPAN TERIMA KASIH

Penulis mengucapkan terima kasih kepada Pejabat Pembuat Komitmen atas diikutsertakannya kegiatan ini pada DIPA Satuan Kerja Bidang Teknologi Proses dan Katalisis di Serpong untuk T.A.2009. Penulis juga mengucapkan terima kasih kepada Kepala Bidang Bahan Alam, Pangan dan Farmasi, LIPI atas dukungan publikasi makalah ini. Penulis mengucapkan terima kasih kepada Yati Maryati, ST. sehingga kegiatan ini terlaksana dengan baik.

DAFTAR PUSTAKA

- Anonim. (2000). *Operating Manual of DSS LabUnit M20*, Danish Separation Systems AS (DSS), Denmark, January.
- Anonim. (2005). *Membrane Technology for Process Bio-separations*, MILLIPORE, USA. (1999). Industry, http://www.pcims.com/images/TP_105.5us.pdf, PCI Membrane System Inc. Milford, USA.
- Anonim. (2005). *Membrane Technology for Process Industry*, http://www.pcims.com/images/TP_105.5us.pdf; PCI Membrane System Inc., Milford, USA.
- A.O.A.C. (1990). *Official Methods of Analysis of The Association of Official Analytical Chemist*, 15th Edition, A.O.A.C., Washington D.C.
- Batt, C.A., Robinson, R.K. dan Patel, P.D. (1999). *Encyclopedia of Food Microbiology*. Academic Press, New York.
- Belitz, H.D. dan Grosch, W. (1999). *Food Chemistry*, 2nd edn. Springer-Verlag Berlin Heidelberg.
- Bruggen, B.V.D, Schaep, J., Wilms, D. dan Vandecasteele, C. (1999). Influence of molecular size, polarity and charge on the retention of organic molecules by nanofiltration. *Journal of Membrane Science* **156**: 29.
- Cheryan, M. (1992). *Membrane Technology in Food Bioprocessing*. Dalam: Singh, R.P. dan Wirakartakusumah, M.A. (eds). *Advances in Food Engineering*. CRC Press Inc., Boca Ratan, Florida.
- Fardiaz, S. (1989). *Penuntun Praktek Mikrobiologi Pangan*. IPB Press, Institut Pertanian Bogor, Bogor.
- Karos, W.J., Ma, Y.H. dan Shimidzu, T. (1996). Terminology for membranes and membranes processes (IUPAC Recommendations 1996). *Pure and Applied Chemistry* **68**: 1479-1489.
- Michaels, A.S. (1989). *Handbook of Industrial Membrane Technolog*. Noyes Publications, Park Ridge, USA.
- Mulder, M. (1996). *Basic Principles of Membrane Technology*. Kluwer Academic Publishers, Dordecht, The Nederlands.
- Paulson, D.J. (1995). *Membranes, the Finest Filtration*. By: Introduction to crossflow Membrane Technology. Published in Filtration News. http://www.environmental-expert.com/articles/article_11/article_11.htm.
- Salminen, S. dan Wright, A.V. (1998). *Lactic Acid Bacteria: Microbiology and Functional Aspects*. Marcel Dekker Inc., New York.
- Scot, K. dan Hughes, R. (1996). *Industrial Membrane Separation Technology*. Blackie Academic and Professionals, London.
- Susilowati, A., Aspiyanto, Melanie, H. dan Maryati, Y. (2006). Pemanfaatan kacang-kacangan endemik untuk pembuatan makanan fungsional dan flavor dari kaldu nabati skala pilot, *Laporan Semester I, Program Tematik - DIPA*, Pusat Penelitian Kimia – LIPI, PUSPIPTEK, Serpong.
- Tamime, A.Y. (1980). Yoghurt Technology and Biochemistry, *Journal of Food Protection* **43**: 939-977.
- Tamime, A.Y. dan Marshall, V.M.E. (1997). *Microbiology and Technology of Fermented Milks*. Dalam: *Microbiology and Biochemistry of Cheese and Fermented Milks*, 2nd edn. Blackie Academic and Professional, London.
- Zeman, L.J. dan Zydney, A.L. (1996). *Microfiltration and Ultrafiltration: Principles and Applications*. Marcel Dekker, New York.