

BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Sterilisasi

Cahyani (2014) menyatakan bahwa, sterilisasi dalam mikrobiologi merupakan suatu cara untuk mematikan dan menghilangkan semua organisme yang terdapat pada suatu benda. Pemindahan biakan bakteri secara aseptik menggunakan salah satu cara sterilisasi, yaitu pembakaran. Namun, ada pula beberapa peralatan dan media yang menjadi rusak apabila dibakar. Tiga cara utama yang biasa dipakai dalam sterilisasi yaitu penggunaan panas, bahan kimia, dan penyaringan atau filtrasi.

2.1.1 Sterilisasi Mekanik (Filtrasi)

Sterilisasi dengan penyaringan (filtrasi) yaitu teknik sterilisasi dengan menggunakan suatu saringan yang berpori sangat kecil yang berukuran 0,22 mikron atau 0,45 mikron. Cairan yang akan disterilisasi dilewatkan ke suatu saringan sehingga mikroba tertahan pada saringan tersebut. Sterilisasi dengan penyaringan dilakukan untuk mensterilisasi bahan yang mudah rusak jika terkena panas dan bahan yang tidak tahan panas, misalnya larutan enzim antibiotik.

2.1.2 Sterilisasi Fisika

Sterilisasi fisika dapat dilakukan dengan cara pemanasan dan penyinaran.

a. Pemanasan

- 1) Pemijaran (dengan api langsung), yaitu membakar alat pada api secara langsung. Contoh alat: jarum inokulum (jarum ose), pinset, batang L.

- 2) Panas kering, yaitu sterilisasi dengan oven kira-kira 60-180°C. Sterilisasi panas kering cocok untuk alat yang terbuat dari kaca, seperti erlenmeyer, tabung reaksi, cawan.
- 3) Uap air panas, merupakan sterilisasi dengan konsep mirip dengan mengukus. Bahan yang mengandung air lebih tepat menggunakan metode ini supaya tidak terjadi dehidrasi.
- 4) Uap air panas bertekanan, yaitu sterilisasi menggunakan autoklaf.

b. Radiasi

- 1) Sinar Ultra Violet (UV) dapat digunakan untuk proses sterilisasi, misalnya untuk membunuh mikroba yang menempel pada permukaan interior Biological Safety Cabinet (BSC) atau Laminar Air Flow (LAF) dengan disinari lampu UV.
- 2) Gamma bersumber dari C_{60} dan C_{137} dengan aktivitas sebesar 50-500 kilo curie serta memiliki daya tembus sangat tinggi. Dosis efektifitasnya adalah 2,5 MRad. Gamma digunakan untuk mensterilkan alat-alat yang terbuat dari logam, karet serta bahan sintesis seperti polietilen.

2.1.3 Sterilisasi Kimia

Sterilisasi kimiawi merupakan sterilisasi menggunakan senyawa desinfektan. Desinfektan adalah suatu bahan kimia yang dapat membunuh sel-sel vegetatif dan jasad renik, bersifat merusak jaringan. Contoh desinfektan adalah alkohol, fenol, dan halogen.

(Cahyani, 2014)

2.2 Autoklaf

Autoklaf merupakan suatu alat pemanas tertutup yang digunakan untuk mensterilisasi suatu benda menggunakan uap dengan temperatur 121°C sampai 134°C dan tekanan maksimum 2 bar_(g) (3 bar_(abs)) dengan waktu kurang lebih 45 menit waktu pemanasan dan 15 menit untuk proses sterilisasi. Penurunan tekanan pada autoklaf berfungsi untuk meningkatkan temperatur dalam autoklaf sehingga mikroorganisme akan terbunuh. Autoklaf ditujukan untuk sterilisasi alat yang mengandung endospora, yaitu sel resisten yang diproduksi oleh bakteri yang tahan terhadap pemanasan, kekeringan, dan antibiotik. Autoklaf yang sederhana menggunakan sumber uap dari pemanasan air yang ditambahkan ke dalam autoklaf. Pemanasan air dapat dilakukan menggunakan kompor atau api bunsen. (Deni, 2014)

2.3 Prinsip Kerja Autoklaf

Autoklaf adalah alat yang digunakan untuk mensterilkan berbagai macam alat dan bahan dengan menggunakan tekanan 15 psi (2 atm) dan suhu 121°C. Suhu dan tekanan tinggi yang diberikan kepada alat dan media yang disterilisasi memberikan kekuatan yang lebih besar untuk membunuh sel dibanding dengan udara panas. Untuk mensterilkan media digunakan suhu 121°C dan tekanan 15 psi selama 15 menit. Suhu yang digunakan sebesar 121°C karena air mendidih pada suhu tersebut jika digunakan tekanan 15 psi. Semua bentuk kehidupan akan mati jika dididihkan pada suhu 121°C dan tekanan 15 psi selama 15 menit. Pada saat sumber panas dinyalakan, air dalam autoklaf akan mendidih dan uap air yang terbentuk mendesak udara yang mengisi autoklaf. Setelah semua udara dalam autoklaf diganti dengan uap air, katup uap/udara ditutup sehingga tekanan udara

dalam autoklaf naik. Pada saat tercapai tekanan dan suhu yang sesuai, maka proses sterilisasi dimulai dan timer mulai menghitung waktu mundur. Setelah proses sterilisasi selesai, sumber panas dimatikan dan tekanan dibiarkan turun perlahan hingga mencapai 0 psi. Autoklaf tidak boleh dibuka sebelum tekanan mencapai 0 psi. (Amane, 2012)

2.4 Jenis-Jenis Autoklaf

2.4.1 Autoklaf Berdasarkan Sumber Pemanasan

Dilihat berdasarkan sumber pemanasan, autoklaf dapat dioperasikan menggunakan pemanas gas dan pemanas listrik.

1. Pemanas Gas

Autoklaf yang sederhana menggunakan sumber uap dari pemanasan air yang ditambahkan ke dalam autoklaf. Pemanasan air dapat menggunakan kompor atau api bunsen. Dengan autoklaf sederhana ini, tekanan dan temperatur diatur dengan jumlah panas dari api.

Kelemahan autoklaf ini adalah perlu penjagaan dan pengaturan panas secara manual selama masa sterilisasi dilakukan. Autoklaf ini juga mempunyai keuntungan, diantaranya sederhana, harga relatif murah, tidak tergantung dari aliran listrik, serta lebih cepat dari autoklaf listrik yang seukuran dan setara.



Gambar 1. Autoklaf Gas

(Deni, 2014)

2. Pemanas Listrik

Autoklaf yang lebih baik menggunakan sumber energi listrik. Alatnya dilengkapi dengan *timer* dan *thermostat*. Bila pengatur otomatis ini berjalan dengan baik, autoklaf dapat dijalankan sambil mengerjakan pekerjaan lain. Kelemahan dari autoklaf ini adalah bila salah satu pengatur tidak bekerja, maka pekerjaan persiapan media tidak dapat dilakukan dan kemungkinan menyebabkan kerusakan total pada autoklaf. Sumber uap berasal dari air yang ditambahkan ke dalam autoklaf dan didihkan.



Gambar 2. Autoklaf Listrik

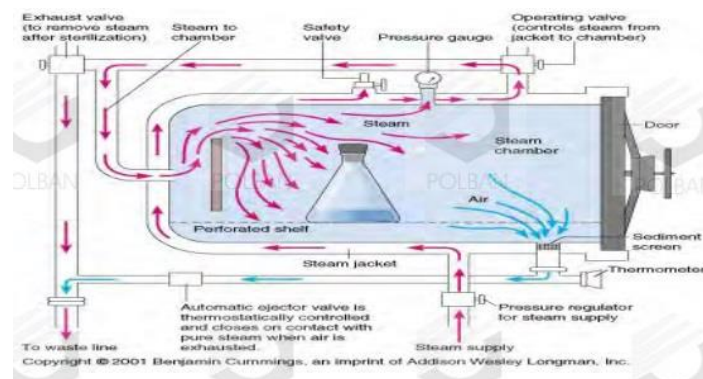
(Deni, 2014)

2.4.2 Autoklaf Berdasarkan Sistem Kerja

Autoklaf berdasarkan sistem kerja dapat dibagi menjadi tiga jenis autoklaf, yaitu *gravity displacement*, *prevacuum* atau *high vacuum*, dan *steam-flush pressure-pulse*. Perbedaan ketiga jenis autoklaf ini terletak pada bagaimana udara dihilangkan dari dalam autoklaf selama proses sterilisasi.

1. *Gravity Displacement Autoclave*

Pada *Gravity Displacement Autoclave*, udara dalam ruang autoklaf dipindahkan berdasarkan gravitasi. Prinsipnya memanfaatkan keringanan uap dibandingkan dengan udara, sehingga udara terletak di bawah uap. Cara kerjanya dimulai dengan memasukkan uap melalui bagian atas autoklaf sehingga udara tertekan ke bawah. Secara perlahan uap mulai semakin banyak sehingga menekan udara semakin turun dan keluar melalui saluran bagian bawah autoklaf, selanjutnya temperatur meningkat dan terjadi sterilisasi. Autoklaf ini dapat bekerja pada temperatur antara 121-134°C dan dengan waktu 10-30 menit.



Gambar 3. *Gravity Displacement Autoclave*

(Deni, 2014)

2. *Prevacuum* atau *High Vacuum Autoclave*

Prevacuum atau *high vacuum autoclave* merupakan jenis autoklaf yang dilengkapi dengan pompa yang mengevakuasi hampir semua udara dari dalam autoklaf. Cara kerja dari jenis autoklaf ini dimulai dengan pengeluaran udara yang berlangsung selama 8-10 menit. Pada saat keadaan vakum tercipta, uap dimasukkan ke dalam autoklaf. Akibat kevakuman udara tersebut, uap segera berhubungan dengan seluruh permukaan benda sehingga kemudian terjadi peningkatan temperatur sehingga proses sterilisasi berlangsung. Autoklaf *prevacuum* atau *high vacuum autoclave* bekerja dengan waktu 3-4 menit dan dengan temperatur sekitar 132-135°C.



Gambar 4. *High Vacuum Autoclave*

(Deni, 2014)

3. *Steam-Flush Pressure-Pulse Autoclave*

Autoklaf jenis *steam-flush pressure-pulse* merupakan autoklaf yang menggunakan aliran uap dan dorongan tekanan di atas tekanan atmosfer dengan rangkaian berulang. Waktu siklus yang diperlukan pada autoklaf ini tergantung pada benda yang akan disterilisasi.



Gambar 5. *Steam Flush Autoclave*

(Deni, 2014)

2.5 Fermentasi

Pengertian fermentasi yang dikembangkan oleh ahli biokimia yaitu proses yang menghasilkan energi dengan perombakan senyawa organik, sedangkan ahli mikrobiologi industri memperluas pengertian fermentasi menjadi segala proses untuk menghasilkan suatu produk dari kultur mikroorganismenya. Fermentasi dapat juga diartikan sebagai suatu disimilasi senyawa organik yang disebabkan oleh aktivitas mikroorganismenya. Pada proses disimilasi, senyawa substrat yang merupakan sumber energi diubah menjadi senyawa yang lebih sederhana atau tingkat energinya lebih rendah. Kemajuan bidang teknologi fermentasi memungkinkan untuk memproduksi berbagai produk yang sulit diproduksi melalui proses kimia. Teknologi fermentasi merupakan suatu upaya manusia untuk memanfaatkan bahan-bahan yang berharga relatif murah menjadi produk yang bernilai ekonomi tinggi dan berguna bagi kesejahteraan manusia. (Sulistyaningrum, 2008)

Menurut Haryadi (2008), ada beberapa faktor yang mempengaruhi keberhasilan fermentasi, antara sebagai berikut :

a) Keasaman

Makanan yang mengandung asam biasanya tahan lama, tetapi jika oksigen cukup jumlahnya dan kapang dapat tumbuh serta fermentasi berlangsung terus, maka daya tahan awet dari asam tersebut akan hilang. Tingkat keasaman sangat berpengaruh dalam perkembangan bakteri. Kondisi keasaman yang baik untuk pertumbuhan bakteri adalah 3,5 - 5,5.

b) Mikroba

Fermentasi biasanya dilakukan dengan kultur murni yang dihasilkan di laboratorium. Pembuatan makanan dengan cara fermentasi dengan tidak menggunakan kultur murni sebagai contoh misalnya ragi pasar mengandung beberapa ragi diantaranya *Saccharomyces cereviseae* yang dicampur dengan tepung beras dan dikeringkan. Kultur murni biasa digunakan dalam fermentasi pembuatan anggur, bir, keju, sosis, dan lain-lainnya.

c) Suhu

Suhu fermentasi sangat menentukan macam mikroba yang dominan selama fermentasi. Mikroorganisme memiliki suhu maksimal, suhu minimal dan suhu optimal pertumbuhan. Suhu pertumbuhan optimal adalah suhu yang memberikan pertumbuhan terbaik dan memperbanyak diri tercepat.

d) Alkohol

Mikroorganisme yang terkandung dalam ragi tidak tahan terhadap alkohol dalam kepekatan (kadar) tertentu, kebanyakan mikroba tidak tahan pada konsentrasi alkohol 12–15%.

e) Oksigen

Oksigen selama proses fermentasi harus diatur sebaik mungkin untuk memperbanyak atau menghambat pertumbuhan mikroba tertentu. Setiap mikroba membutuhkan oksigen yang berbeda jumlahnya untuk pertumbuhan atau membentuk sel-sel baru dan untuk proses fermentasi. Misalnya *Saccharomyces sp* yang melakukan fermentasi terhadap gula jauh lebih cepat pada keadaan anaerobik, akan tetapi mengalami pertumbuhan lebih baik pada keadaan aerobik sehingga jumlahnya bertambah banyak.

f) Substrat dan Nutrien

Mikroorganisme memerlukan substrat dan nutrien yang berfungsi untuk menyediakan :

- Energi, biasanya diperoleh dari substansi yang mengandung karbon, yang salah satu sumbernya adalah gula.
- Nitrogen, sebagian besar mikroba yang digunakan dalam fermentasi berupa senyawa organik maupun anorganik sebagai sumber nitrogen. Salah satu contoh sumber nitrogen yang dapat digunakan adalah urea.
- Mineral, yang diperlukan mikroorganisme salah satunya adalah fosfat yang dapat diambil dari pupuk TSP.
- Vitamin, sebagian besar sumber karbon dan nitrogen alami mengandung semua atau beberapa vitamin yang dibutuhkan.

(Haryadi, 2013)

Secara umum ada empat kelompok fermentasi yang penting secara ekonomi, yaitu :

1. Fermentasi yang memproduksi sel mikroba (biomass)

Produksi komersial dari biomass dapat dibedakan menjadi produksi *yeast* untuk industri roti dan produksi sel mikroba untuk digunakan sebagai makanan manusia dan hewan.

2. Fermentasi yang menghasilkan enzim dari mikroba

Secara komersial enzim dapat diproduksi oleh tanaman, hewan, dan mikroba. Namun enzim yang diproduksi oleh mikroba memiliki beberapa keunggulan yaitu, mampu dihasilkan dalam jumlah besar dan mudah untuk meningkatkan produktivitas bila dibandingkan dengan tanaman atau hewan.

3. Fermentasi yang menghasilkan metabolit mikroba

Metabolit mikroba dapat dibedakan menjadi metabolit primer dan metabolit sekunder. Produk metabolisme primer yang penting contohnya etanol, asam sitrat, polisakarida, asteton, butanol, dan vitamin. Sedangkan metabolit sekunder sekunder yang dihasilkan mikroba contohnya antibiotik, pemacu pertumbuhan, dan inhibitor enzim.

4. Proses transformasi

Sel mikroba dapat digunakan untuk mengubah suatu senyawa menjadi senyawa lain yang memiliki kemiripan struktur namun memiliki nilai komersial yang lebih tinggi. Proses transformasi dengan menggunakan mikroba ini lebih baik bila dibandingkan dengan proses kimia. Selain itu proses dapat berlangsung pada suhu rendah tanpa membutuhkan katalis

logam berat yang berpotensi menimbulkan potensi.
(Sulistyaningrum, 2008)

2.6 *Lactobacillus bulgaricus*

Lactobacillus bulgaricus pertama kali dikenal oleh Stamen Grigorov yang merupakan seorang dokter asal Bulgaria yang menganalisis yoghurt pada tahun 1905. Pada penelitiannya tersebut, Grigorov mengidentifikasi sejenis mikroba yang memakan laktosa dan mengeluarkan asam laktat yang sekaligus dapat mengawetkan susu dan mendegradasi laktosa (gula susu) sehingga orang yang tidak toleran terhadap susu murni dapat mengonsumsi yoghurt tanpa mendapat masalah kesehatan.

Lactobacillus delbrueckii Subsp. *bulgaricus* atau biasa disebut *Lactobacillus bulgaricus* adalah salah satu bakteri asam laktat (BAL) yang digunakan sebagai starter kultur untuk susu fermentasi. Bakteri ini dapat ditemukan di dalam vagina dan sistem pencernaan, dimana mereka bersimbiosis dan merupakan sebagian kecil dari flora usus. *Lactobacillus* tersebar luas di lingkungan, terutama pada hewan dan produk makanan sayur-sayuran. *Lactobacillus* biasanya mendiami saluran usus burung dan mamalia, dan vagina mamalia, dan tidak bersifat patogen. Menurut Syah (2011), dalam susu *Lactobacillus bulgaricus* akan mengubah laktosa menjadi asam laktat. Bakteri ini bersifat termotoleran yaitu bakteri yang dapat hidup pada suhu pasteurisasi 63 – 75°C.

L. bulgaricus merupakan isolat yang diperoleh dari yoghurt komersial bersifat membentuk lendir. *L. bulgaricus* berbentuk batang dengan sel berukuran 0,5-0,8 µm x 2,0-9,0 µm. Merupakan bakteri gram positif, bersifat anaerob

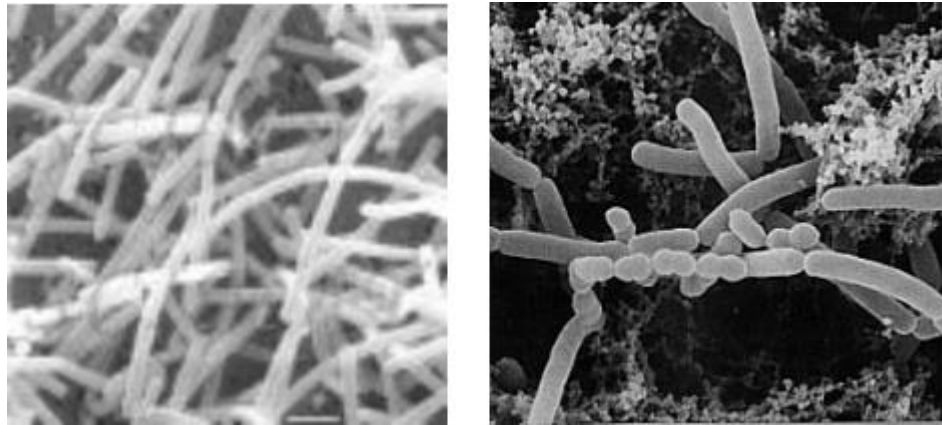
fakultatif, tidak membentuk spora, dan non. Pada susu, bakteri ini membentuk rantai pendek yang terdiri dari 3-4 sel. *Lactobacillus* memiliki suhu optimum pertumbuhannya sekitar 37- 45°C, bersifat homofermentatif dengan menghasilkan asam laktat sebesar 1,7- 2,1% pada susu. Kondisi optimum untuk pertumbuhannya adalah sedikit asam atau sekitar pH 5,5.

Pertumbuhan *L. bulgaricus* sangat cepat yaitu telah mencapai fase pertumbuhan eksponensial pada waktu inkubasi 4 jam, sedangkan pada suhu inkubasi 25°C dan 30°C sampai inkubasi 6 jam masih menunjukkan fase pertumbuhan adaptasi. *L. bulgaricus* tumbuh optimal pada 37°C dengan fase adaptasi (lag phase) pada 0 – 2 jam, fase eksponensial 2 – 14 jam dan mulai mencapai fase stasioner pada 14 jam inkubasi. Bakteri *L.bulgaricus* adalah bakteri probiotik karena telah lolos dari uji klinis, enzimnya mampu mengatasi intoleransi terhadap laktosa, menormalkan komposisi bakteri saluran pencernaan serta meningkatkan system kekebalan tubuh. (Syah, 2011)

Adapun Klasifikasi dari bakteri *L. bulgaricus* dapat digolongkan sebagai berikut:

- Kingdom : Prokariotik
- Divisio : Schizophyta
- Kelas : Eubacteriales
- Familia : Lactobacillaceae
- Genus : Lactobacillus
- Species : *Lactobacillus bulgaricus*

(Lasaka, 2014)



Gambar 6. *Lactobacillus bulgaricus*

(Sari, 2007)

2.7 Kopi Arabika

Kopi Arabika menurut Rahardjo (2012) merupakan jenis kopi tertua yang dikenal dan dibudidayakan di dunia. Kopi Arabika tumbuh di iklim subtropik dengan bulan-bulan kering untuk pembungaannya. Di Indonesia tanaman kopi Arabika cocok dikembangkan di daerah dengan ketinggian 800-1500 m di atas permukaan laut dan dengan suhu rata-rata 15-24°C. Pada suhu 25°C kegiatan fotosintesis akan menurun dan akan berpengaruh langsung pada hasil kebun. Jenis kopi Arabika belum banyak yang tahan akan penyakit karat daun, sehingga dianjurkan penanaman kopi Arabika tidak di daerah-daerah di bawah ketinggian 800 m dpl. Klasifikasi tanaman kopi Arabika (*Coffea arabica L.*) adalah sebagai berikut:

- Kingdom : Plantae
- Subkingdom : Tracheobionta
- Super Divisi : Spermatophyta
- Divisi : Magnoliophyta
- Kelas : Magnoliopsida
- Sub Kelas : Asteridae

- Ordo : Rubiales
- Famili : Rubiaceae
- Genus : *Coffea*
- Spesies : *Coffea arabica L.*

Tinggi tempat dan tipe curah hujan merupakan kondisi lingkungan tumbuh tanaman kopi yang paling berpengaruh terhadap produktivitas tanaman kopi, sehingga jenis tanaman kopi yang ditanam harus disesuaikan dengan kondisi tinggi tempat dan curah hujan di daerah setempat. Karakter morfologi yang khas pada kopi arabika adalah tajuk yang kecil, ramping, ada yang bersifat ketai dan ukuran daun yang kecil. Biji kopi arabika memiliki beberapa karakteristik yang khas dibandingkan biji jenis kopi lainnya, seperti bentuknya yang agak memanjang, bidang cembungnya tidak terlalu tinggi, lebih bercahaya dibandingkan dengan jenis lainnya, ujung biji mengkilap, dan celah tengah dibagian datarnya berlekuk. (Rahardjo, 2012)



Gambar 7. Tanaman Kopi Arabika Sidikalang

(Novie, 2013)

2.8 Laktosa

Laktosa merupakan disakarida yang terdiri dari glukosa dan galaktosa. Laktosa merupakan sumber energi yang memasok hampir setengah dari keseluruhan kalori yang terdapat pada susu (35-45%). Selain itu, laktosa juga diperlukan untuk absorpsi kalsium. Hasil hidrolisa laktosa yang berupa galaktosa yang merupakan senyawa penting untuk pembentukan serebrosida yang berfungsi penting untuk proses perkembangan fungsi otak. Galaktosa juga dapat dibentuk oleh tubuh dari glukosa di hati. Karena itu keberadaan laktosa sebagai karbohidrat utama yang terdapat di susu mammalia, termasuk ASI. Laktosa hanya dibuat di sel-sel kelenjar mamma pada masa menyusui melalui reaksi antara glukosa dan galaktosa uridin difosfat dengan bantuan *lactose synthetase*. Kadar laktosa dalam susu sangat bervariasi antara satu mammalia dengan yang lain. ASI mengandung 7% laktosa, sedangkan susu sapi hanya mengandung 4%. (Intanwati, 2012)

2.9 Bakteri Asam Laktat

Bakteri Asam laktat (BAL) merupakan kelompok bakteri gram positif, katalase negatif yang dapat memproduksi asam laktat dengan cara memfermentasi karbohidrat. Selnnya berbentuk kokus, tersusun berpasangan atau berbentuk rantai, tidak bergerak, tidak berspora, anaerob fakultatif, bersifat non motil dan mesofil. Kelompok bakteri asam laktat bersifat homofermentatif merupakan Bakteri Asam Laktat yang menghasilkan dua molekul asam laktat dari fermentasi glukosa, sedangkan Bakteri Asam Laktat yang menghasilkan satu molekul asam laktat dan satu molekul etanol serta satu molekul karbon dioksida dikenal dalam kelompok Bakteri asam laktat bersifat heterofermentative.

Bakteri Asam Laktat menghasilkan antibakteri berupa asam organik, bakteriosin, metabolit primer, hidrogen peroksida, diasetil, karbondioksida, asetaldehid dan menurunkan pH lingkungannya dengan mengeksresikan senyawa yang mampu menghambat bakteri patogen. Beberapa genera yang memproduksi bakteriosin dan mempunyai aktivitas hambat besar terhadap pertumbuhan beberapa bakteri patogen adalah *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Streptococcus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus*, *Bifidobacterium* dan *Propionibacterium* yang terdapat di dalam saluran pencernaan. Ada 2 kelompok BAL yaitu :

1. Bakteri homofermentatif yaitu glukosa difermentasi menghasilkan asam laktat sebagai satu-satunya produk. Contoh : *Streptococcus*, *Pediococcus*, dan *Lactobacillus*.
2. Bakteri heterofermentatif yaitu glukosa difermentasikan menghasilkan asam laktat juga memproduksi senyawa-senyawa lainnya seperti etanol, asam asetat, dan CO₂.

(Ray, 2004)