

BAB III

METODE PENELITIAN

3.1 Jenis Penelitian

Jenis Penelitian yang dilakukan dalam penelitian ini adalah penelitian deskriptif dan eksperimental. Penelitian deskriptif adalah penelitian yang menjelaskan fenomena-fenomena yang ada (Rusandi & Muhammad Rusli, 2021). Penelitian eksperimental merupakan penelitian yang mencari hubungan sebab akibat antara variabel bebas dengan variabel terikat, dimana variabel bebas dikontrol untuk dapat menentukan pengaruh pada variabel terikat (Ratminingsih, 2010). Variabel bebas dalam penelitian ini adalah konsentrasi substrat awal sedangkan variabel terikatnya adalah jumlah gula hidrolisat dan jumlah sel bakteri yang dihasilkan.

3.2 Desain Penelitian

Desain penelitian yang digunakan adalah Rancangan Acak Lengkap (RAL). Rancangan ini digunakan sebab kondisi bahan percobaan dan lingkungan penelitian bersifat homogen. Rancangan ini dikatakan acak karena setiap percobaan memiliki peluang yang sama untuk mendapatkan perlakuan dan dikatakan lengkap karena seluruh perlakuan yang dirancang dalam penelitian digunakan.

3.3 Waktu dan Lokasi Penelitian

Penelitian dilaksanakan mulai dari bulan Januari 2024 hingga Mei 2024. Penelitian ini dilakukan di Laboratorium Riset Bioteknologi Departemen Pendidikan Biologi, Fakultas Pendidikan Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam (FPMIPA) Universitas Pendidikan Indonesia yang berlokasi di Jalan Dr. Setiabudi No. 299, Kota Bandung, Jawa Barat.

3.4 Populasi dan Sampel Penelitian

Populasi yang menjadi objek penelitian ini adalah isolat bakteri selulolitik yang diperoleh dari hasil isolasi air lindi yang diambil dari Tempat Pembuangan Sementara (TPS) Pasar Gegerkalong, Kota Bandung. Sampel penelitian pada penelitian ini adalah isolat bakteri asal air lindi di TPS Gegerkalong, Kota Bandung.

3.5 Prosedur Penelitian

3.5.1 Persiapan Alat dan Bahan Penelitian

Tahapan persiapan akan memastikan bahwa seluruh alat dan bahan yang akan digunakan dalam penelitian ini telah bebas kontaminasi atau telah disterilkan.

Alat dan bahan yang telah steril tersebut akan digunakan untuk serangkaian tahapan penelitian. Tahapan yang dimaksud mencakup tahapan isolasi bakteri dari *leachate*, seleksi bakteri selulolitik, identifikasi bakteri selulolitik, uji biokimia bakteri, pembuatan serbuk substrat, dan produksi gula hidrolisat. Alat dan bahan perlu dilakukan sterilisasi menggunakan autoclave di suhu 121°C selama 15 menit. Sebelum proses sterilisasi menggunakan autoclave alat yang akan digunakan perlu dilindungi kertas terlebih dahulu, kemudian dimasukkan ke dalam plastik tahan panas. Bahan yang akan disterilisasi dimasukkan ke dalam wadah kaca yang bersih kemudian dimasukkan dalam plastik tahan panas. Proses sterilisasi dilakukan di Laboratorium Riset Biologi, Universitas Pendidikan Indonesia. Daftar lengkap alat dan bahan yang digunakan dalam penelitian ini dapat dilihat pada Lampiran 1.

Seluruh alat dan bahan yang akan digunakan dalam penelitian ini telah tersedia dalam Laboratorium Riset, FPMIPA, UPI. Bahan tambahan yang digunakan dalam penelitian ini berupa substrat selulosa yang merupakan tanaman tebu yang diperoleh dari diperoleh dari Desa Cinta Asih, Kecamatan Cipongkor, Kabupaten Bandung Barat.

3.5.2 Pengambilan Sampel

Pengambilan sampel *leachate* diambil di Tempat Pembuangan Sementara pasar Gegerkalong, Jalan Gegerkalong Tengah, Kecamatan Sukasari, Kota Bandung. Pengambilan sampel *leachate* dilakukan dengan menggunakan botol vial 10 mL pada kedalaman dasar tempat pengambilan sampel (Garcete *et al.*, 2022). Setelah pengambilan sampel dilanjutkan dengan proses pengenceran.

3.5.3 Isolasi Bakteri

Dalam melakukan prosedur pengenceran dan isolasi bakteri, akan mengacu pada penelitian yang telah dilakukan oleh Murtiyaningsih & Hazmi (2017). Pengenceran sampel dengan mengambil sebanyak 1 ml sampel air lindi (*leachate*) dilarutkan dalam 9 ml larutan garam fisiologis (NaCl 0,85%) lalu divortex hingga diperoleh pengenceran 10^{-1} . Suspensi dari pengenceran 10^{-1} diambil 1 ml lalu dimasukkan ke dalam 9 ml garam fisiologis sehingga diperoleh pengenceran 10^{-2} . Selanjutnya dilakukan pengenceran berseri hingga didapatkan pengenceran 10^{-10} . Dari pengenceran 10^{-6} , 10^{-7} , 10^{-8} , 10^{-9} dan 10^{-10} diambil 0,1 ml dan diinokulasikan dengan metode sebaran (*spread plate*) pada media padat selektif *Carboximethyl*

cellulase (CMC). Setelah diinokulasi pada media, diratakan menggunakan batang L atau batang bengkok. Setelah itu, selama 24 jam diinkubasi pada suhu 37°C. Dokumentasi hasil pengenceran dapat dilihat pada Lampiran 4. Koloni bakteri yang telah tumbuh pada media CMC Agar, kemudian dipisahkan menjadi kultur murni pada medium NA miring.

3.5.4 Pemiakan Isolat Bakteri

Untuk pembiakan bakteri selulolitik, akan digunakan tiga jenis media. Komposisi masing-masing media dapat dilihat pada Lampiran 3. Tiga media tersebut adalah:

a) NA (*Nutrient Agar*) dan NB (*Nutrient Broth*)

Nutrient Agar dan *Nutrient Broth* merupakan media nutrisi yang berguna untuk media pertumbuhan bakteri. Media ini mengandung banyak nutrisi yang diperlukan untuk pertumbuhan suatu mikroorganisme (Aryal, 2022). Perbedaan diantara kedua medium ini yaitu *Nutrient Agar* berbentuk padat sementara *Nutrient Broth* berbentuk cair.

b) CMC (*Carboxymethyl Cellulose*) Agar

Media CMC merupakan media selektif yang dapat digunakan untuk menumbuhkan bakteri yang dapat menghidrolisis selulosa (Wahyuningsih & Zulaika, 2019). Zona bening akan terbentuk disekitar koloni bakteri ketika ditetesi larutan *congo red* 0,1%.

c) Medium Fermentasi

Medium fermentasi akan berperan sebagai sumber nutrisi untuk pertumbuhan isolat bakteri (Nafion *et al.*, 2019). Medium fermentasi akan digunakan untuk menentukan keadaan optimal untuk waktu fermentasi, pH, suhu, densitas bakteri, dan volume enzim yang dihasilkan (Shahid *et al.*, 2016).

3.5.5 Seleksi Bakteri Selulolitik pada Media CMC Agar

Isolat bakteri yang telah tumbuh pada media NA miring akan dilanjutkan dengan proses seleksi bakteri berdasarkan kemampuan selulolitik pada media CMC Agar. Penanaman bakteri pada media CMC menggunakan metode titik. Sebanyak 1 ose isolat bakteri ditanamkan dengan metode titik pada media CMC Agar dan kemudian media CMC Agar diinkubasi 48 jam pada suhu 37°C. Selanjutnya, dilakukan pewarnaan media CMC Agar menggunakan larutan *congo red* 0.1%

selama 30 menit lalu dibilas menggunakan larutan NaCl 1 M. Seleksi bakteri selulolitik didasarkan pada zona bening yang terbentuk pada media CMC (Arifin *et al.*, 2019). Nilai Indeks Selulolitik (IS) dihitung dengan rumus sebagai berikut :

$$IS = \frac{\text{Diameter Zona Bening} - \text{Diameter Koloni}}{\text{Diameter Koloni}}$$

(Nababan *et al.*, 2019)

3.5.6 Identifikasi Bakteri Selulolitik

Identifikasi bakteri selulolitik dilakukan dengan tiga tahapan, yaitu:

1) Pengamatan Morfologi Koloni

Pengamatan makroskopis terhadap morfologi dilakukan secara menyeluruh dengan mengamati koloni bakteri termasuk bentuk, elevasi, tepi, dan warna koloni (Cappuccino & Wels, 2019). Pengamatan morfologi koloni bakteri dilakukan dengan melihat secara langsung koloni bakteri yang telah tumbuh pada media NA setelah diinkubasi selama 1x24 jam.

2) Pewarnaan Bakteri

Proses pewarnaan bakteri untuk melihat dan mengamati berbagai ciri fisiologis akan dilakukan dengan pewarnaan sederhana, pewarnaan Gram, pewarnaan kapsul, dan pewarnaan endospora (Cappuccino & Wels, 2019).

a) Pewarnaan Gram

Pewarnaan Gram dilakukan dengan mengambil satu ose biakan bakteri dari medium, kemudian meratakannya pada slide dan mengeringkannya. Setelah itu, slide difiksasi dengan melewatkannya di atas api bunsen. Selanjutnya, slide diberi beberapa tetes larutan kristal violet dan dibiarkan selama sekitar 20 detik, kemudian dicuci dengan akuades mengalir, preparat ditetesi dengan larutan iodin dan dibiarkan sekitar 1 menit, lalu dicuci dengan akuades mengalir. Preparat lalu diberi larutan pemucat (etanol 96%), dicuci dengan akuades mengalir, ditetaskan safranin di atas ulasan, dibiarkan selama 20 detik, lalu dicuci dengan akuades mengalir. Setelah proses pencucian, preparat dikeringkan. Preparat lalu ditetesi dengan minyak imersi dan dilihat dengan mikroskop pada pembesaran 100× (Deviani *et al.*, 2014).

b) Pewarnaan Kapsul

Pewarnaan kapsul memiliki dua jenis pewarna yaitu metode pewarnaan negatif dan metode pewarnaan positif. Metode pewarnaan negatif dengan

nigrosin akan mewarnai latar belakangnya menjadi hitam gelap sedangkan metode pewarnaan positif dengan kristal violet akan mewarnai dinding sel bakteri. Pewarnaan diawali dengan membuat apusan bakteri tanpa difiksasi panas. Kemudian ditetesi oleh kristal violet selama 5-7 menit, kristal violet yang berlebihan dicuci dengan $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 20% dan dikeringkan. Apusan bakteri lalu diamati menggunakan mikroskop dengan perbesaran 1000x (Aryal, 2018).

c) Pewarnaan Endospora

Pewarnaan endospora diawali dengan membuat fiksasi biakan murni bakteri, setelah itu ditambahkan *malachite green* 5%. Setelah diberi *malachite green* 5%, apusan bakteri diuapkan selama 5 menit diatas penangas air lalu dibilas dengan air mengalir. Apusan bakteri kemudian ditetesi oleh safranin selama 30 detik dan dicuci kembali dengan air mengalir. Preparat kemudian dilihat dibawah mikroskop dengan perbesaran 1000x untuk melihat warna spora berwarna hijau (Hamdiyati & Kusnadi, 2018).

3) Uji Biokimia

Pengujian biokimia bertujuan untuk mengidentifikasi mikroorganisme secara fisiologis berdasarkan reaksi biokimia yang dihasilkan (Apriyanthi *et al.*, 2022). Pengujian biokimia dapat meliputi uji fermentasi karbohidrat (glukosa, sukrosa, laktosa, dan dekstrosa), uji hidrolisis (pati, lipid, kasein, dan gelatin), uji *Methyl Red-Voges Proskauer* (MR-VP), uji sitrat, uji motilitas, uji TSIA, uji indol, dan uji katalase (Cappuccino & Wels, 2019).

a) Uji Hidrolisis

Dalam hidrolisis pati, medium yang digunakan merupakan medium agar pati. Bakteri diinokulasikan pada medium agar pati kemudian diinkubasi pada suhu 37°C selama 48 jam. Setelah itu, medium ditetesi dengan lugol. Hasil positif ditunjukkan dengan terbentuknya daerah zona bening disekitar koloni bakteri (Cappuccino & Wels, 2019).

Hidrolisis lipid menggunakan medium lipid agar. Bakteri diinokulasikan pada medium agar pati kemudian diinkubasi pada suhu 37°C selama 48 jam. Hasil positif ditunjukkan dengan terbentuknya zona bening disekitar koloni bakteri dan adanya perubahan warna merah pada bagian bawah koloni bakteri (Cappuccino & Wels, 2019).

Hidrolisis gelatin menggunakan medium nutrient gelatin. Bakteri diinokulasikan pada medium agar pati kemudian diinkubasi pada suhu 37°C selama 48 jam, kemudian disimpan pada inkubator pada suhu 4°C selama 30 menit. Hasil positif ditunjukkan oleh media gelatin yang tetap cair setelah diinkubasi bakteri pada suhu 4°C (Cappuccino & Wels, 2019).

Hidrolisis kasein menggunakan medium susu skim agar. Bakteri diinokulasikan pada medium agar pati kemudian diinkubasi pada suhu 37°C selama 48 jam. Hasil positif ditunjukkan dengan terbentuknya zona bening disekitar koloni bakteri (Cappuccino & Wels, 2019).

b) Uji Fermentasi

Uji fermentasi dilakukan untuk mengetahui kemampuan isolat bakteri dalam memfermentasi karbohidrat. Penelitian ini akan menggunakan tiga jenis gula, yaitu: glukosa, dekstrosa, laktosa, dan sukrosa. *Brom Cressol Purple* (BCP) akan ditambahkan sebagai indikator. Isolat bakteri diinokulasikan ke dalam medium lalu diinkubasi selama 1-2 x 24 jam pada suhu 37°C. Hasil positif akan ditunjukkan dengan adanya gelembung atau gas pada tabung Durham dan perubahan warna medium fermentasi menjadi kuning (Nuryanti *et al.*, 2021).

c) Tes Susu Litmus

Medium susu litmus memiliki protein kasein, gula laktosa, vitamin dan mineral. Pengujian dengan menginokulasikan bakteri pada medium susu litmus menggunakan ose lalu diinkubasi pada suhu 37°C selama 48 jam (Aryal, 2018).

d) Uji Reaksi Katalase

Pengujian reaksi katalase dengan menginokulasikan 1 ose koloni bakteri pada objek glass kemudian ditetesi larutan H₂O₂ Reaksi positif uji katalase ditandai dengan terbentuknya gelembung udara yang menunjukkan bahwa bakteri tersebut menghasilkan enzim katalase (Lasmini *et al.*, 2022).

e) IMViC

IMViC merupakan singkatan dari (*Indole, Methyl red, Voges Proskauer, dan Citrat*). Pengujian *indole* dilakukan dengan menginokulasikan bakteri pada media *trypton broth* lalu diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam. Setelah itu,

ditambahkan 3-5 tetes pereaksi Kovac's lalu dihomogenkan. Hasil positif akan menunjukkan adanya cincin merah (Saridewi *et al.*, 2017).

Pengujian *methyl red* dengan menggunakan medium yang digunakan untuk pengujian ini adalah medium MR-VP broth. Tujuan pengujian *methyl red* untuk menentukan glukosa yang dapat diubah menjadi produk asam seperti asam laktat, asam asetat, atau asam format. Isolat bakteri diinokulasikan ke dalam media MR-VP broth lalu diinkubasi selama 24 jam. Setelah itu ditambahkan 3-5 tetes metil merah pada masing-masing tabung reaksi lalu dihomogenkan. Hasil positif menunjukkan warna merah muda pada media cair. Hasil negatif menunjukkan warna kuning (Nuryanti *et al.*, 2021).

Pengujian VP dilakukan dengan menginokulasikan bakteri ke dalam medium MR-VP broth lalu diinkubasi selama 24 jam. Setelah itu, ditambahkan 5 tetes reagen VP A (yang mengandung naftol) dan reagen VP B (yang mengandung KOH) kemudian dihomogenkan. Hasil positif ditunjukkan dengan adanya perubahan warna menjadi pink atau merah yang mengindikasikan adanya kehadiran aseton. Hasil negatif ditunjukkan dengan tidak berubahnya warna medium atau berubah warna menjadi warna tembaga (Nuryanti *et al.*, 2021).

Pengujian sitrat dilakukan dengan menginokulasikan 1 ose bakteri pada medium *Simmons citrate* agar, kemudian diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam. Hasil positif ditunjukkan dengan perubahan warna dari hijau ke biru (Aryal, 2018).

f) Uji Produksi H₂S

Media SIM agar (Sulfide, Indole, Motility) agar diinokulasikan bakteri kemudian diinkubasi pada suhu 37°C selama 1-2x24 jam. Hasil positif diperoleh apabila medium berubah warna menjadi hitam yang menandakan bakteri tersebut mampu memproduksi H₂S untuk memetabolisme senyawa yang mengandung sulfur (Aryal, 2018).

g) Kebutuhan Oksigen

Pengujian kebutuhan oksigen dilakukan dengan menginokulasikan isolat bakteri ke medium *nutrient agar*, lalu medium ditutup menggunakan paraffin agar tidak ada udara yang masuk (Hamdiyati & Kusnadi, 2018). Uji ini

bertujuan untuk mengetahui apakah bakteri tersebut bersifat aerob, anaerob, atau fakultatif anaerob.

h) Motilitas

Untuk melakukan uji motilitas, bakteri diinokulasikan dengan cara di stab ke medium nutrient agar kemudian diamati pertumbuhannya. Hasil positif didapatkan apabila terdapat pertumbuhan koloni yang menyebar (Ukit *et al.*, 2022).

3.5.7 Pembuatan Kurva Tumbuh Bakteri Selulolitik

Fase pertumbuhan bakteri dapat diketahui dengan adanya kurva pertumbuhan bakteri, yang akan menghasilkan waktu inkubasi optimal untuk bakteri tersebut menghasilkan enzim selulase. Sebanyak 2 ose isolat bakteri diinokulasikan ke media *Nutrient Broth* (NB) sebanyak 50 ml, kemudian diinkubasi dalam pada suhu 37°C selama 24 jam (Fauzi *et al.*, 2023). Sebanyak 1 ml inokulum diambil setiap 1 jam sekali untuk dilakukan pengukuran OD (Optical Density) atau kepadatan sel menggunakan spektrofotometer dengan panjang gelombang 600 nm (Chusniasih *et al.*, 2023). Menurut (Furqonita *et al.*, 2021) panjang gelombang dengan rentang 600-625 nm merupakan rentang yang umum digunakan dalam uji antibakteri menggunakan spektrofotometer UV-Vis. Rentang panjang gelombang tersebut dapat melihat tingkat kekeruhan mulai dari larutan yang berwarna kuning hingga yang berwarna coklat.

3.5.8 Pembuatan Kurva Standar Bakteri

Kurva standar bakteri dibuat untuk dapat menentukan jumlah bakteri yang terdapat dalam sampel. Pembuatan kurva standar bakteri dengan cara menginokulasikan 2 ose isolat bakteri pada 25 ml media NB, lalu diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam (Rosmania & Yanti, 2020). Setelah itu, inokulum bakteri diukur menggunakan spektrofotometer untuk menyamakan OD (Maryanty *et al.*, 2020). Inokulum bakteri diukur menggunakan spektrofotometer dengan panjang gelombang 610 nm (Anggraeni & Triajie, 2021). Rentang tingkat OD yang digunakan dalam penelitian ini adalah 0,2 hingga 1,2 dengan interval 0,2. Setelah tingkat absorbansi tersebut didapat, dilakukan pengenceran bertingkat hingga 10^{-10} . Tiga urutan terakhir dalam pengenceran yaitu 10^{-8} , 10^{-9} , dan 10^{-10} ditanam pada media *Nutrient Agar* lalu diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam (Kurniawan *et*

al., 2023). Hasil TPC kemudian dihitung menggunakan *colony counter*. Hasil TPC dapat menunjukkan hubungan linear yang dapat digunakan untuk menjadi standar dalam menentukan jumlah sel bakteri yang belum diketahui dalam sampel berdasarkan nilai absorbansi.

3.5.9 Delignifikasi Ampas Tebu

Ampas tebu dikeringkan di dalam oven pada suhu 100°C selama 24 jam (Tahir *et al.*, 2016). Ampas tebu yang sudah kering kemudian diblender dan disaring dengan saringan ukuran 100 mesh. Selanjutnya proses delignifikasi dilakukan dengan merendam serbuk ampas tebu menggunakan H₂SO₄ 0,05 M dengan perbandingan (1:10 (b/v)) pada suhu 121°C selama 15 menit (Sutikno *et al.*, 2015). Tahap delignifikasi akan menghilangkan lignin dari ampas tebu. Setelah itu dilakukan pembilasan menggunakan air hingga pH netral. Dokumentasi proses pengeringan hingga delignifikasi dapat dilihat pada Lampiran 2.

3.5.10 Produksi Gula Hidrolisat Secara *Submerged Fermentation* (SmF)

Sebelum tahapan produksi enzim secara SmF, 1 ose bakteri selulolitik diinokulasikan pada 25 ml NB dalam 250 ml labu Erlenmeyer yang telah disterilisasi dengan suhu 121°C, 15 psi selama 20 menit, kemudian diinkubasi pada suhu 37°C, 120 rpm selama 24 jam (Shahid *et al.*, 2016). Langkah produksi enzim secara SmF diperlukan 25 ml medium fermentasi (yeast extract 1 gr, sukrosa 2 gr, K₂HPO₄ 1 gr dan FeSO₄ 0,01 gr/l) mengandung 0,5 ml basal salt solution (NaNO₃ 10 gr, KCl 2,5 gr, MgSO₄ 2,5 gr dan air distilasi 50 ml) (Kumar, 2009). Setelah itu Ditambahkan 5% dan 10% (b/v) ampas tebu yang telah di treatment, semua bahan dimasukkan ke dalam tabung 100 ml dan disterilisasi menggunakan autoklaf dengan suhu 121°C, 15 psi selama 15 menit. Setelah disterilisasi, labu Erlenmeyer yang berisi medium fermentasi didinginkan pada suhu ruang dan sebanyak 1% inokulum kultur murni bakteri selulolitik diinokulasikan pada medium fermentasi. Setelah inokulasi, medium fermentasi diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam (Shahid *et al.*, 2016).

3.5.11 Pembuatan Larutan Standar Glukosa

Sebelum membuat kurva standar glukosa diperlukan pembuatan larutan standar glukosa terlebih dahulu. Pada pembuatan larutan standar glukosa, konsentrasi yang digunakan adalah konsentrasi glukosa 50, 100, 150, 200, 250, 300,

350, 400, 450, dan 500 ppm. Pembuatan larutan standar glukosa diawali dengan membuat larutan induk glukosa 1000 ppm yang dibuat dengan cara menimbang 0,10 gram glukosa kemudian dilarutkan dengan aquades sampai volume 100 ml. larutan induk kemudian diencerkan hingga diperoleh konsentrasi yang diinginkan (Baharuddin *et al.*, 2014).

3.5.12 Pembuatan Kurva Standar Glukosa

Pembuatan kurva standar glukosa bertujuan untuk mengukur konsentrasi glukosa yang terkandung dalam sampel. Fungsi adanya kurva kalibrasi atau kurva standar adalah untuk menentukan konsentrasi suatu zat dalam suatu sampel yang tidak diketahui dengan membandingkan yang tidak diketahui kedalam seperangkat sampel standar dari konsentrasi yang telah diketahui (Nisah & Nadhifa, 2020).

Pada penelitian ini akan dibuat larutan standar glukosa dengan konsentrasi 50, 100, 150, 200, 250, 300, 350, 400, 450, dan 500 ppm. Diambil 1 ml dari masing-masing konsentrasi dan dimasukkan kedalam tabung reaksi. Kemudian ditambahkan 1 ml reagen DNS dan dihomogenkan. Mulut tabung lalu ditutup dengan aluminium foil dan dipanaskan dalam air mendidih selama 5-15 menit hingga larutan menjadi berwarna merah-coklat. Aquades ditambahkan dalam tabung reaksi hingga volumenya 10 ml dan dihomogenkan. Setelah itu, larutan diukur absorbansinya menggunakan spektrofotometer pada panjang gelombang 540 nm (Ginting *et al.*, 2020).

3.5.13 Pengukuran Parameter

1) Jumlah Sel Bakteri Selulolitik

Penghitungan jumlah sel bakteri selulolitik mengacu pada penelitian yang dilakukan oleh Lizayana *et al.*, (2016). Sebanyak 1 ml sampel dimasukkan kedalam kuvet dengan aquades dijadikan sebagai blanko. Suspensi tersebut kemudian diukur nilai absorbansi menggunakan spektrofotometer dengan panjang gelombang 610 nm.

2) Gula Hidrolisat

Perhitungan gula hidrolisat akan menggunakan metode DNS. Diambil 0,5 ml sampel lalu ditambahkan aquades 0,5 ml, dan larutan DNS 0,5 ml. Panaskan dengan waterbath selama 5 menit, lalu ditambahkan 0,5 ml Garam Rochelle dan

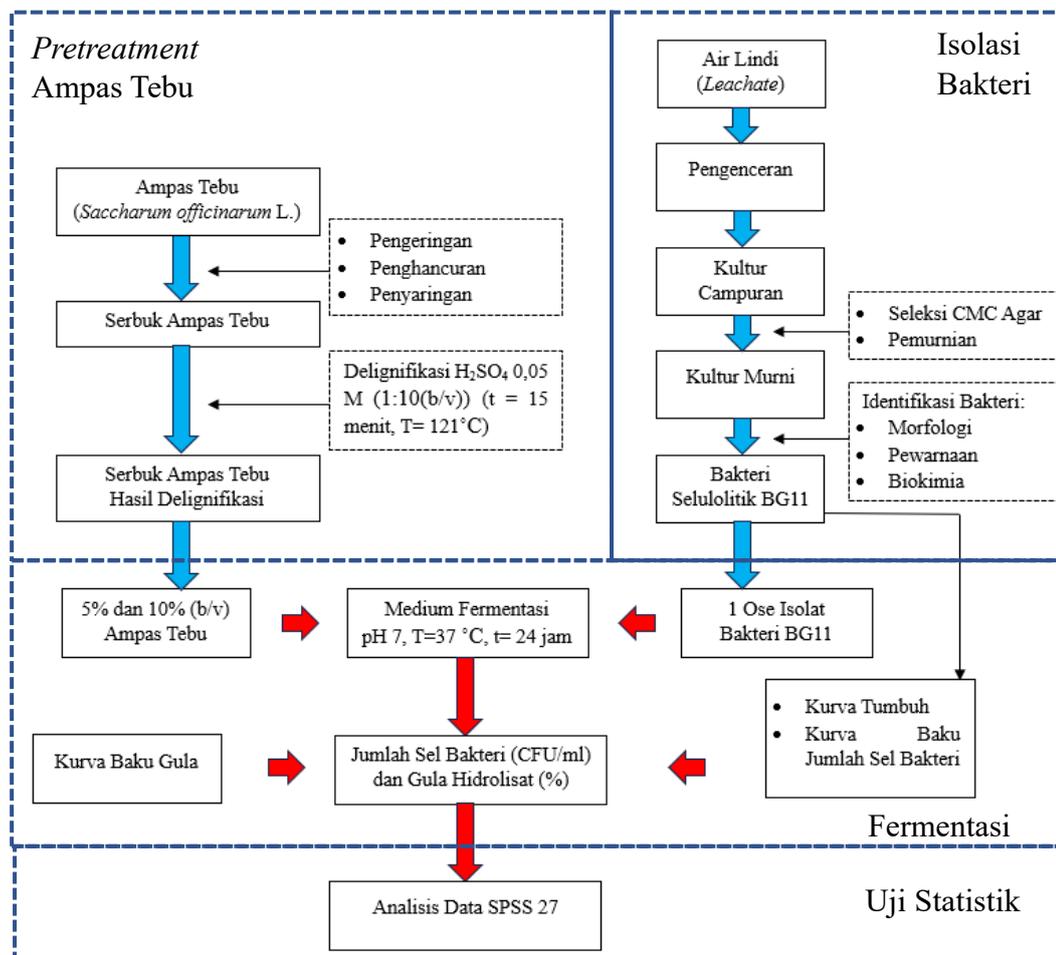
divortex. Setelah itu, larutan diukur menggunakan spektrofotometer dengan panjang gelombang 540 nm (Santi & Widyaningrum, 2022).

3.6 Analisis Data

Analisis data menggunakan program IBM SPSS Statistics 27 for windows. Langkah pertama akan dilakukan uji normalitas dan uji homogenitas data. Jika data yang dihasilkan termasuk data normal dan homogen, maka akan dilakukan uji *Two Way ANOVA (Analysis of Variance)* kemudian dilanjutkan dengan uji Post Hoc, sementara jika data tidak homogen akan dilakukan non-parametrik berupa uji Friedman.

3.7 Alur Penelitian

Alur penelitian yang akan dilakukan adalah sebagai berikut.



Gambar 3.1 Alur Penelitian Produksi Gula Hidrolisat dengan Metode Fermentasi SmF menggunakan Media Serbuk pada Ampas Tebu (*Saccharum officinarum* L.)