

II. TINJAUAN PUSTAKA

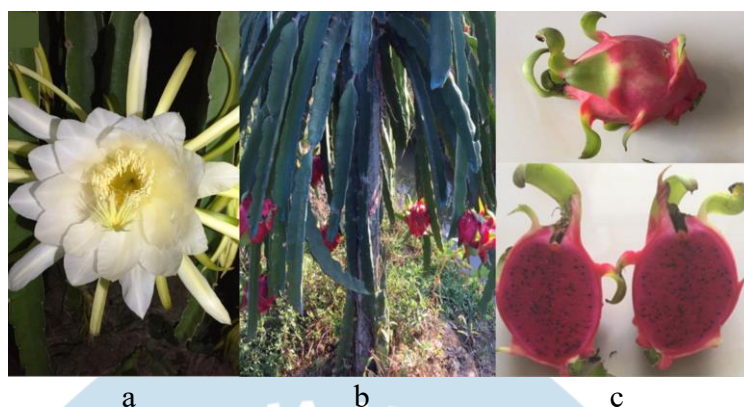
A. Kulit Buah Naga Merah (*Hylocereus polyrhizus*)

Buah naga merah (*Hylocereus polyrhizus*) merupakan tumbuhan iklim tropis maupun subtropis yang dapat tumbuh dengan baik pada ketinggian hingga 1700 meter di atas permukaan laut (dpl) dengan suhu 21-29°C (Taharuddin *et al.*, 2023). Klasifikasi tanaman buah naga merah berdasarkan Integrated Taxonomic Information System (2023a) adalah sebagai berikut:

Kerajaan : Plantae
Divisi : Magnoliophyta
Kelas : Magnoliopsida
Bangsa : Caryophyllales
Suku : Castaceae
Marga : *Hylocereus*
Spesies : *Hylocereus polyrhizus* (F.A.C. Weber) Britton & Rose

Tanaman buah naga merah terdiri dari akar, batang, bunga, dan daun yang termodifikasi menjadi duri (Sijabat *et al.*, 2022). Bagian batang tanaman buah naga merah merupakan batang sukulen sebagai penyimpan air. Bunga tanaman buah naga merah memiliki panjang sekitar 25-30 cm berwarna merah dan kuning (Ghorai, 2023).

Buah naga merah memiliki bentuk lonjong dengan panjang sekitar 10-12 cm dengan berat 130-150 gram. Daging buah naga merah berwarna merah tua berisi banyak biji berwarna hitam (Ghorai, 2023). Kulit buah naga merah memiliki ketebalan 3-4 mm (Merry *et al.*, 2021). Bagian-bagian tanaman buah naga merah menurut Luu *et al.* (2021) dapat dilihat pada Gambar 1.



Gambar 1. Bagian-bagian tanaman buah naga merah yaitu (a) bunga, (b) batang, dan (c) buah (Sumber: Luu *et al.*, 2021).

Kulit buah naga merah merupakan 30-35% bagian dari keseluruhan buahnya yang biasanya terbuang, padahal kulit buah merah mengandung berbagai macam kandungan kimia yang dapat dimanfaatkan (Andika *et al.*, 2023). Kulit buah naga merah memiliki kandungan karbohidrat seperti selulosa sebesar 34,45% (Taharuddin *et al.*, 2022). Kulit buah naga merah memiliki kandungan karbohidrat lainnya seperti pektin sebesar $10,79 \pm 0,01\%$ dan pati sebesar $11,07 \pm 0,03\%$ (Jamilah *et al.*, 2011). Kulit buah naga merah juga mengandung komposisi gula seperti glukosa sebesar $4,15 \pm 0,03\%$, maltosa sebesar $3,37 \pm 0,01\%$ dan fruktosa sebesar $0,86 \pm 0,02\%$ (Taharuddin *et al.*, 2023). Kandungan serbuk kulit buah naga merah dapat dilihat pada Tabel 1.

Tabel 1. Kandungan Serbuk Kulit Buah Naga Merah

Komposisi	Rata-rata (%)
Air	$6,73 \pm 0,68$
Abu	$18,51 \pm 1,40$
Protein	$6,38 \pm 1,50$
Lemak	$0,77 \pm 0,24$
Karbohidrat	$67,70 \pm 2,36$

Sumber: Hotmaida & Sutrisno (2020)

B. Bioetanol

Etanol atau etil alkohol memiliki rumus kimia C_2H_5OH adalah senyawa tidak berwarna, larut dalam air dan sebagian besar pelarut organik, serta memiliki aroma khas alkohol (Hidayat *et al.*, 2018). Etanol dapat diproduksi melalui dua cara yaitu melalui hidrasi senyawa kimia etilen dari minyak bumi dan fermentasi bahan organik dari tanaman (Wijayanti, 2023). Etanol yang dihasilkan dari fermentasi tanaman oleh mikroorganisme disebut bioetanol (Khabibulloh *et al.*, 2024). Bioetanol dengan kadar 95 hingga 99% dapat digunakan sebagai bahan pengganti bensin premium, sedangkan kadar 40% dapat digunakan sebagai pengganti minyak tanah (Pingky *et al.*, 2023). Sifat-sifat etanol dapat dilihat pada Tabel 2.

Tabel 2. Sifat-Sifat Etanol

Sifat	Nilai
Massa molekul relatif	46,07 g/mol
Titik beku	-114,1°C
Titik didih normal	78,32°C
Densitas pada 20°C	0,7893 g/mol
Kelarutan dalam air 20°C	sangat larut
Viskositas pada 20°C	1,17 cP
Kalor spesifik pada 20°C	0,579 kal/g
Kalor pembakaran pada 25°C	7092,1 kal/g
Kalor penguapan pada 78,32°C	200,6 kal/g

Sumber: Anggraini *et al.* (2019)

Etanol banyak digunakan sebagai alternatif bahan bakar, serta sebagai bahan pelarut pada industri farmasi dan kosmetika. Etanol umumnya digunakan sebagai bahan baku industri untuk campuran minuman keras beralkohol, bahan pada industri farmasi dan kosmetika seperti pelarut dan disinfektan. Etanol berdasarkan kadarnya terbagi menjadi beberapa jenis

industry grade dengan kadar 90-94%, netral dengan kadar 96-99,5% yang umum digunakan sebagai bahan baku farmasi dan minuman keras serta *grade* bahan bakar dengan kadar 99,5-100% (Hendrawati *et al.*, 2019).

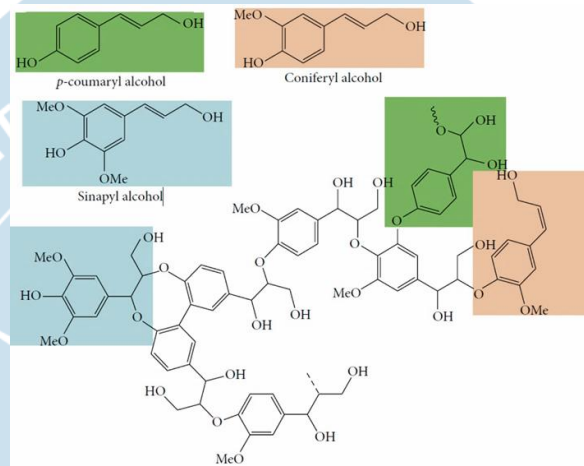
Bahan baku dalam produksi bioetanol terbagi menjadi tiga jenis bahan, yaitu bahan sukrosa, bahan berpati dan bahan berselulosa. Bahan sukrosa adalah bahan nabati yang mengandung sukrosa seperti nira kelapa dan nira aren. Bahan berpati merupakan bahan nabati yang mengandung pati seperti ubi kayu, ubi jalar, jagung dan sagu. Bahan berselulosa adalah bahan nabati yang mengandung selulosa seperti kayu, batang pisang dan jerami. Pembuatan bioetanol dengan bahan organik berselulosa dilakukan dengan empat tahap utama yaitu delignifikasi, hidrolisis, fermentasi, dan pemisahan produk etanol (Herawati *et al.*, 2021b).

C. Lignoselulosa

Lignoselulosa merupakan biomassa dari tumbuhan yang komponen utamanya berupa lignin (5-30%), selulosa (35-50%) dan hemiselulosa (20-35%) (Troncoso *et al.*, 2023). Ketersediaan biomassa ini cukup melimpah yang dapat diperoleh dari limbah pertanian, perkebunan maupun kehutanan yang menjadikan bahan ini memiliki potensi sebagai sumber energi. Lignoselulosa memiliki kandungan gula tinggi yang kemudian melalui proses fermentasi akan menghasilkan bioetanol (Verma, 2022).

Lignin adalah salah satu komponen utama pada dinding sel tumbuhan. Lignin adalah heteropolimer yang mengikat selulosa dan hemiselulosa secara

kovalen dan membentuk struktur yang kaku serta kedap air untuk melindungi tanaman terhadap serangan mikroba dan stres oksidatif. Lignin tersusun dari tiga jenis fenol berupa *p-coumaryl*, *coniferyl*, *sinapyl alcohols* yang terhubung dengan ikatan eter (Verma, 2022). Struktur lignin menurut Troncoso *et al.* (2023) dapat dilihat pada Gambar 2.

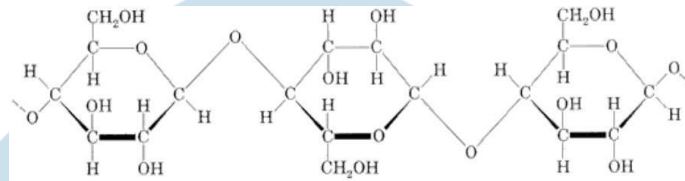


Gambar 2. Struktur lignin (Sumber: Troncoso *et al.*, 2023).

Keterangan: hijau = *p-coumaryl alcohols*,
coklat = *coniferyl alcohols*, biru = *sinapyl alcohols*

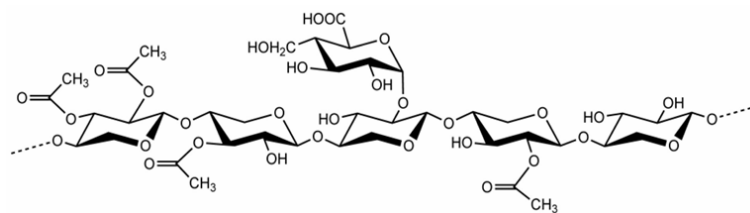
Selulosa adalah polimer organik dengan rumus kimia $(C_6H_{10}O_5)_n$ dengan n merupakan jumlah unit glukosa (Yustinah *et al.*, 2023). Selulosa merupakan polimer tidak berwarna, tidak berbau dan tidak larut dalam air maupun pelarut organik karena antar makromolekul selulosa memiliki gaya kohesif yang kuat sehingga tidak memungkinkan selulosa diubah menjadi cair. Selulosa bersifat stabil terhadap suhu, polimer ini dapat mempertahankan struktur dan sifat mekaniknya hingga suhu 200°C dengan titik leleh sekitar 400°C (Rahmi *et al.*, 2023).

Selulosa merupakan jenis homopolisakarida yang tersusun dari monomer D-glukosa yang dihubungkan oleh ikatan β -1,4-glikosidik. Selulosa dalam struktur lignoselulosa membentuk mikrofibril (Yustinah *et al.*, 2023). Struktur selulosa menurut Sutini *et al.* (2019) dapat dilihat pada Gambar 3.



Gambar 3. Struktur selulosa (Sumber: Sutini *et al.*, 2019).

Hemiselulosa adalah heteropolisakarida dalam susunan lignoselulosa. Hemiselulosa tersusun dari D-glukosa, D-mannosa, D-galaktosa, D-xilosa, L-arabinosa, dan asam glukuronat. Hemiselulosa berikatan dengan serat selulosa dan lignin yang memberikan kestabilan dan kekuatan struktur dinding sel (Simanjuntak *et al.*, 2021). Hemiselulosa adalah polisakarida yang larut dalam basa dalam konsentrasi rendah (Pazla *et al.*, 2022). Struktur hemiselulosa dapat dilihat pada Gambar 4.



Gambar 4. Struktur hemiselulosa (Sumber: Hu *et al.*, 2020).

Selulosa dan hemiselulosa pada biomassa lignoselulosa dapat dikonversikan menjadi polimer gula melalui proses hidrolisis dengan asam maupun enzim. Hidrolisis hemiselulosa akan menghasilkan xilosa, manosa galaktosa dan glukosa. Hidrolisis selulosa akan menghasilkan glukosa. Glukosa

hasil hidrolisis selanjutnya digunakan mikroorganisme pada proses fermentasi untuk menghasilkan produk bioetanol (Darwin, 2020).

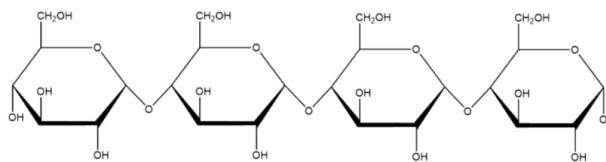
Kadar lignoselulosa dalam suatu bahan dapat diukur menggunakan metode Chesson Datta. Metode Chesson Datta adalah metode pengukuran lignoselulosa yang umum dilakukan dengan prinsip analisis gravimetri berdasarkan berat tiap komponen yang hilang dari proses hidrolisis. Metode ini diawali dengan menghilangkan ekstraktif dengan akuades dilanjutkan dengan hidrolisis hemiselulosa menggunakan asam encer pada suhu tinggi. Selanjutnya dilakukan hidrolisis selulosa dengan asam kuat tanpa pemanasan. Lignin merupakan bagian terakhir yang tidak larut sehingga kadar lignin diukur melalui kandungan abu (Zulnazri *et al.*, 2022).

D. Pati

Pati merupakan karbohidrat kompleks berbentuk bubuk putih, tidak larut dalam air, tidak berasa dan tidak berbau. Pati adalah bahan utama yang dihasilkan oleh tanaman untuk menyimpan kelebihan glukosa dari hasil fotosintesis dalam jangka waktu yang lama. Pati adalah homopolimer glukosa dengan ikatan α -glikosidik (Miksusanti *et al.*, 2020).

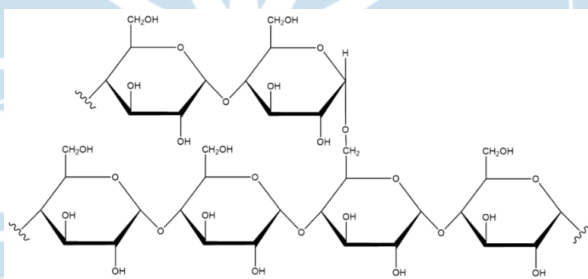
Pati adalah polisakarida yang terdiri dari dua komponen fraksi utama yaitu amilosa dan amilopektin. Amilosa adalah fraksi pati yang terdiri dari D-glukopiranosida dengan ikatan α dalam bentuk rantai linier. Amilosa dapat tersusun dari 500-6000 monomer glukosa. Kandungan amilosa pada pati adalah

sekitar 10-20% (Putri & Zubaidah, 2017). Struktur amilosa menurut Arfah *et al.* (2023) dapat dilihat pada Gambar 5.



Gambar 5. Struktur amilosa (Sumber: Arfah *et al.*, 2023).

Amilopektin adalah fraksi pati dengan struktur bercabang dengan ikatan α -(1,4)-glikosidik pada rantai linier dan ikatan α -(1,6) glikosidik pada rantai percabangannya. Amilopektin memiliki ukuran 1000 kali lebih besar dibandingkan amilosa. Pati tersusun dari 80-90% amilopektin. Struktur amilopektin menurut Arfah *et al.* (2023) dapat dilihat pada Gambar 6.



Gambar 6. Struktur amilopektin (Sumber: Arfah *et al.*, 2023).

Pati merupakan bahan baku yang dapat digunakan sebagai substrat untuk produksi bioetanol. Pati kaya akan polimer karbohidrat yang dapat melepaskan komponen glukosa melalui proses hidrolisis. Glukosa yang dihasilkan digunakan sebagai substrat fermentasi untuk menghasilkan bioetanol (Darwin, 2020).

Kadar pati dalam suatu bahan dapat diukur menggunakan metode Luff Schoorl dengan prinsip titrasi iometri. Bahan dihidrolisis dengan asam dan

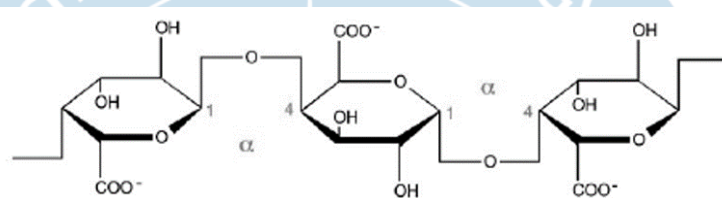
pemanasan lalu dinetralkan dan disaring. Filtrat kemudian ditambahkan larutan Luff Schoorl dan dididihkan selama 10 menit. Pendidihan dilakukan selama 10 menit supaya CuO (tembaga(II) oksida) pada larutan Luff Schoorl direduksi oleh monosakarida menjadi Cu₂O (tembaga(I) oksida). Larutan kemudian ditambahkan kalium iodida dan H₂SO₄. Kalium iodida akan mereduksi kelebihan CuO sehingga I₂ (iodin) akan terlepas dengan jumlah yang setara dengan jumlah CuO (Zuhairiah *et al.*, 2019).

I₂ selanjutnya dititrasi dengan Na₂S₂O₃ (natrium tiosulfat) dan ditambahkan indikator amilum pada akhir titrasi. Sampel dititrasi hingga terjadi perubahan warna menjadi putih pucat. Kadar pati dapat diketahui dengan menghitung selisih antara hasil titrasi blanko dengan titrasi sampel kemudian kadar gula reduksi sesudah inversi dicari dengan tabel selisih kadar gula sebelum dan sesudah inversi kemudian dikalikan 0,9 yang merupakan kadar pati dalam bahan (Ifmaily, 2018).

E. Pektin

Pektin adalah polisakarida larut dalam air yang merupakan asam-asam pektinat yang mengandung gugus metoksil. Pektin pertama kali diisolasi oleh Henri Braconnot pada tahun 1825 dari tumbuhan dan diberi nama asam pektat. Pektin berasal dari kata *pectos* yang berarti menjadi padat atau mengental. Pada industri pangan, pektin digunakan sebagai agen perekat dan penstabil makanan (Tumangger *et al.*, 2022)

Pektin terdapat pada lamella tengah dinding sel tanaman yang merupakan lapisan penyusun awal dinding sel terutama di antara selulosa dan hemiselulosa (Chales *et al.*, 2023). Struktur pektin berupa polimer asam α -D-galakturonat dengan monomer yang terhubung oleh ikatan β -1,4 glikosidik. Asam galakturonat mempunyai gugus karboksil yang dapat berikatan dengan ion Mg^{2+} dan Ca^{2+} dan membentuk gel (Roikah *et al.*, 2016). Struktur kimia pektin menurut Silsia *et al.*, (2021) dapat dilihat pada Gambar 7.



Gambar 7. Struktur kimia pektin (Sumber: Silsia *et al.*, 2021).

Pengukuran kadar pektin dilakukan dengan cara mengekstraksi pektin dari bahan menggunakan asam dan etanol. Bahan baku dipanaskan dalam larutan asam klorida pada suhu 100°C selama 90 menit. Asam klorida digunakan untuk menghidrolisis protopektin menjadi pektin yang larut air serta melepaskan pektin dari ikatan senyawa lain seperti lignoselulosa. Setelah proses hidrolisis selanjutnya dilakukan pengendapan pektin. Pengendapan pektin dilakukan dengan cara menambahkan etanol 96% pada filtrat hasil hidrolisis dan dibiarkan selama 24 jam (Rahmayulis *et al.*, 2022).

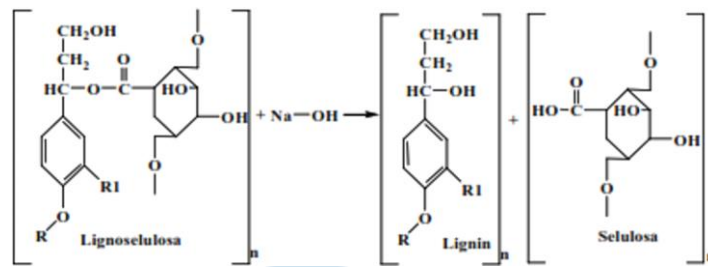
Etanol digunakan sebagai pengdehidrasi. Ion hidrogen alkohol berikatan dengan ion hidrogen air sehingga jumlah molekul air di sekitar pektin berkurang dan membuat pektin mengendap. Pektin yang mengendap lalu disaring dan dikeringkan. Kadar pektin dihitung dengan cara membagi berat

pektin kering dengan berat bahan baku dikalikan dengan 100% sehingga diperoleh persentase kadar pektin (Rahmayulis *et al.*, 2022).

F. Delignifikasi

Delignifikasi merupakan tahap pertama dalam produksi bioetanol. Delignifikasi adalah suatu proses penghilangan lignin dari bahan baku untuk memperoleh selulosa dengan kemurnian yang lebih tinggi. Kemurnian selulosa dapat ditingkatkan dari kadar 31,11% menjadi 80,85% melalui tahap delignifikasi (Gunawan *et al.*, 2021). Delignifikasi bertujuan untuk membuka struktur lignin supaya selulosa lebih mudah dicapai oleh senyawa pemecah polisakarida menjadi glukosa pada tahap hidrolisis (Herawati *et al.*, 2021b). Serbuk kulit buah naga merah memiliki kandungan lignin sebesar 6,73% sehingga perlu dilakukan proses delignifikasi agar dapat diperoleh selulosa dengan kemurnian yang lebih tinggi (Taharuddin *et al.*, 2022).

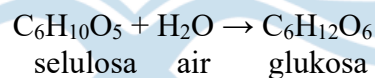
Proses delignifikasi umumnya menggunakan basa seperti natrium, kalium, kalsium dan amonia (Hargono *et al.*, 2021). Larutan basa yang sering digunakan pada delignifikasi adalah NaOH (natrium hidroksida). NaOH dapat digunakan untuk proses delignifikasi karena mampu merusak ikatan hidrogen, ester dan eter yang menghubungkan selulosa dengan lignin (Listiandari & Herdyastuti, 2022). Mekanisme pemutusan lignin pada proses delignifikasi menurut Jasman & Ahmad (2021) dapat dilihat pada Gambar 8.



Gambar 8. Mekanisme delignifikasi (Sumber: Jasman & Ahmad, 2021).

G. Hidrolisis

Hidrolisis adalah proses terurainya suatu senyawa menjadi molekul sederhana dengan bantuan air. Proses hidrolisis menjadi tahap yang penting pada produksi bioetanol karena proses hidrolisis akan menentukan jumlah gula reduksi seperti glukosa yang dihasilkan untuk difermentasi menjadi bioetanol. Hidrolisis dengan air murni memerlukan waktu yang lebih lama sehingga diperlukan katalis tambahan untuk mempercepat reaksi (Pinky *et al.*, 2023). Reaksi hidrolisis menurut Herawati *et al.* (2021b) adalah sebagai berikut:



Hidrolisis dalam produksi bioetanol berdasarkan jenis katalisatornya terbagi menjadi hidrolisis enzim dan hidrolisis asam. Hidrolisis enzimatis adalah proses penguraian senyawa kompleks dengan bantuan enzim. Hidrolisis enzimatis dalam penguraian senyawa pati digunakan enzim α -amilase dan glukamilase (Herawati *et al.*, 2021a). Penguraian senyawa selulosa umumnya digunakan enzim selulase (Widyaningrum & Parahadi, 2020).

Hidrolisis enzimatis umumnya memerlukan waktu reaksi yang lebih lama karena mudah dipengaruhi oleh pH dan suhu. Semua enzim bekerja pada

rentang pH dan suhu tertentu, jika enzim tidak bekerja pada pH dan suhu optimum maka aktivitas enzim akan menurun sehingga memperlambat laju reaksi (Baharuddin *et al.*, 2014). Kekurangan dari hidrolisis enzimatik lainnya yaitu harga enzim mahal (Herawati *et al.*, 2021a). Keuntungan penggunaan enzim pada hidrolisis enzimatik yaitu limbah yang dihasilkan bersifat lebih ramah lingkungan dibandingkan dengan penggunaan asam (Kusniawati, 2015).

Hidrolisis asam merupakan proses penguraian senyawa polisakarida menjadi monomer yang lebih sederhana menggunakan asam. Asam pada proses hidrolisis akan menurunkan energi aktivasi sehingga mempercepat reaksi hidrolisis dalam membentuk monomer gula (Artati *et al.*, 2012). Hidrolisis asam dapat dibedakan menjadi hidrolisis asam pekat dan hidrolisis asam encer. Hidrolisis asam pekat dapat digunakan konsentrasi asam berkisar 10-35% (Roni, 2015). Hidrolisis dengan asam konsentrasi tinggi dilakukan pada suhu rendah misalnya 40°C (Jahnavi *et al.*, 2017). Hidrolisis asam pekat dilakukan pada suhu rendah untuk mencegah degradasi monosakarida menjadi produk samping seperti hidroksimetil furfural yang dapat menghambat proses fermentasi (Zhang *et al.*, 2021).

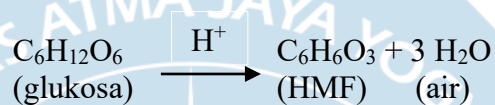
Hidrolisis asam encer dapat digunakan asam dengan konsentrasi di bawah 10% yang dilakukan pada suhu tinggi untuk memperoleh konversi selulosa yang tinggi (sekitar 90% glukosa) (Sudiyani *et al.*, 2019). Hidrolisis asam encer memiliki keunggulan yaitu konsentrasi asam yang rendah sehingga pengolahan limbah lebih sederhana dibandingkan dengan asam pekat yang bersifat korosif (Chen, 2015).

Asam yang biasanya digunakan pada proses hidrolisis yaitu asam klorida atau asam sulfat dengan konsentrasi tertentu (Herawati *et al.*, 2021b). Asam klorida merupakan larutan asam yang terbentuk ketika gas hidrogen klorida dilarutkan dalam air. Asam klorida adalah asam kuat anorganik yang tidak berwarna (Harvey & Rutledge, 2019). Asam klorida tergolong cukup stabil untuk disimpan dan dapat terus mempertahankan konsentrasinya (Yusan *et al.*, 2023). Penggunaan asam klorida dalam proses hidrolisis memiliki kekurangan yaitu bersifat korosif sehingga dibutuhkan peralatan yang tahan korosi (Murti *et al.*, 2019).

Hidrolisis dengan HCl dapat menghasilkan gula reduksi yang lebih tinggi sebesar 0,87% dibandingkan menggunakan H₂SO₄ sebesar 0,38% pada konsentrasi, suhu dan waktu hidrolisis yang sama yaitu konsentrasi 7%, suhu 80°C selama 60 menit. Hidrolisis menggunakan HCl dapat menghasilkan kadar gula reduksi lebih tinggi karena HCl adalah asam monoprotik yang melepaskan ion H⁺ dalam satu tahap sehingga ion H⁺ tersedia secara langsung untuk memutus ikatan glikosidik polisakarida menjadi monomernya. (Dewi *et al.*, 2018).

H₂SO₄ merupakan asam diprotik yang melepaskan ion H⁺ dalam dua tahap. Pelepasan ion H⁺ dari H₂SO₄ pada tahap awal akan memutus ikatan glikosidik polisakarida menjadi monomer glukosa atau pentosa, sisa ion H⁺ yang dilepaskan H₂SO₄ selanjutnya dapat memprotonasi OH⁻ monomer gula sehingga menyebabkan terjadinya pelepasan air dan membentuk hidroksimetilfurfural (HMF) (Tuas & Lerrick, 2017). Adanya HMF dapat

memberikan dampak negatif bagi pertumbuhan sel mikroorganisme selama proses fermentasi. HMF dapat menyebabkan sel mengalami stres oksidatif dengan menghambat aktivitas enzimatis sel, merusak DNA serta menghambat sintesis protein sehingga sel berhenti bereplikasi dan mengalami kematian sel (Dien, 2016). Reaksi dehidrasi glukosa menjadi hidroksimetilfurfural oleh H_2SO_4 adalah sebagai berikut (Anjana *et al.*, 2014):



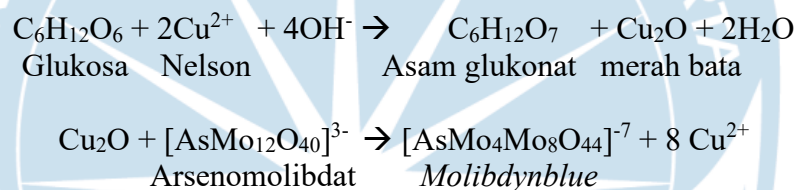
Proses hidrolisis dapat dipengaruhi oleh beberapa faktor yaitu suhu, lama waktu hidrolisis dan konsentrasi katalisator. Suhu dapat berpengaruh terhadap laju reaksi, semakin tinggi suhu semakin cepat laju reaksi, namun jika suhu yang digunakan terlalu tinggi konversi penguraian polisakarida menjadi monomer gula akan menurun. Lama waktu hidrolisis akan mempengaruhi hasil konversi hidrolisis, semakin lama waktu hidrolisis semakin besar hasil konversi yang diperoleh dengan batas waktu tertentu (Sriyana & Nasita, 2019). Suhu maksimal yang digunakan untuk hidrolisis asam adalah 100°C , apabila suhu yang digunakan terlalu tinggi dapat menyebabkan gula terdegradasi sehingga kadar gula menurun (Guntama *et al.*, 2019). Konsentrasi asam yang semakin tinggi menghasilkan kadar reduksi yang semakin tinggi pula, namun apabila konsentrasi asam terlalu tinggi atau melebihi batas optimum menyebabkan gula reduksi terdegradasi membentuk hidroksimetilfurfural (HMF) sehingga kadar gula reduksi yang dihasilkan menurun (Febriani *et al.*, 2014). Konsentrasi asam

yang digunakan dengan hidrolisis asam encer umumnya tidak melebihi dari 10% (Chen, 2015).

Hidrolisis akan memecah polisakarida menjadi polimer sederhana termasuk gula pereduksi. Gula reduksi merupakan gula yang dapat mereduksi senyawa penerima elektron (reduktor) seperti logam tembaga Cu (II) karena memiliki gugus aldehid atau keton bebas (Wilberta *et al.*, 2021). Gula pereduksi antara lain yaitu glukosa, galaktosa, fruktosa, arabinosa, xilosa, ramnosa dan manosa (Wang & Zhang, 2023). Hidrolisis selulosa dan pati akan menghasilkan glukosa, sedangkan hidrolisis hemiselulosa akan menghasilkan glukosa, galaktosa, manosa dan xilosa (Avgouropoulos & Tabakova, 2013). Hidrolisis pektin menghasilkan galaktosa, arabinosa dan asam galakturonat (Pal *et al.*, 2021).

Analisis yang dapat digunakan untuk mengukur kadar gula reduksi hasil hidrolisis yaitu dengan metode Nelson Somogyi. Nelson Somogyi merupakan metode pengukuran kadar gula reduksi dengan pereaksi berupa tembaga dalam reagen Nelson dan arsenomolibdat menggunakan spektrofotometer UV-Vis. Reagen Nelson dibagi menjadi reagen Nelson A dan Nelson B. Nelson A terbuat dari Na_2CO_3 anhidrat, NaHCO_3 , Na_2SO_4 anhidrat, garam Rochelle (natrium kalium tartrat) dan akuades, sedangkan Nelson B terbuat dari $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, Na_2SO_4 , H_2SO_4 pekat dan akuades. Reagen arsenomolibdat terbuat dari ammonium molibdat, akuades, sedikit H_2SO_4 pekat yang dicampurkan dengan $\text{Na}_2\text{HAsO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (disodium hidrogen arsenat) (Wonorahardjo, 2022).

Nelson A dan Nelson B pada proses analisis dicampurkan dengan perbandingan reagen Nelson A dan Nelson B 1:25. Sampel ditambahkan campuran reagen Nelson lalu dipanaskan, pada proses ini gula reduksi akan mereduksi ion Cu^{2+} menjadi Cu^+ dan membentuk senyawa Cu_2O yang merupakan endapan merah bata. Penambahan arsenomolibdat selanjutnya akan membentuk senyawa *molibdynblue* berwarna biru (Budiono & Dhurhanian, 2023). Reaksi gula reduksi dengan reagen Nelson dan arsenomolibdat pada metode Nelson Somogyi menurut Wulandari *et al.* (2023) adalah sebagai berikut:



Hidrolisis limbah ampas tebu menggunakan HCl 2 N menghasilkan kadar gula reduksi sebesar 16,54% dan pada konsentrasi HCl 3 N menghasilkan kadar gula reduksi sebesar 18,9% pada suhu 95°C selama 90 menit (Ardiansyah *et al.*, 2024). Hidrolisis kulit buah kakao menggunakan hidrolisis HCl menghasilkan kadar gula reduksi terbaik sebesar 0,473% pada HCl 2 N dengan suhu 75°C selama 60 menit hidrolisis (Shet *et al.*, 2018). Hidrolisis HCl jerami padi menghasilkan kadar glukosa tertinggi sebesar 0,48% pada konsentrasi HCl 3 N dengan suhu 121°C selama 20 menit (Sen *et al.*, 2015). Hidrolisis limbah ampas sagu menggunakan asam klorida menghasilkan kadar gula reduksi sebesar 52,26 ppm atau 0,104% pada konsentrasi HCl 3 N dengan suhu 80°C selama 60 menit hidrolisis (Devitria & Sepriyani, 2018).

H. Fermentasi

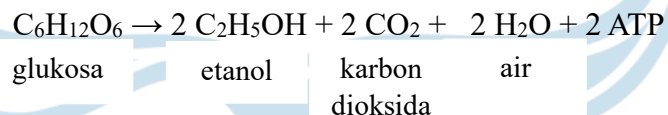
Fermentasi merupakan proses biokimia yang dilakukan oleh mikroorganisme untuk mengubah bahan organik seperti karbohidrat menjadi produk seperti alkohol atau asam (Nurmalasari *et al.*, 2024). Fermentasi merupakan bentuk respirasi anaerobik dengan gula sebagai bahan umum yang digunakan pada proses fermentasi. Fermentasi berdasarkan hasil akhirnya terdapat enam jenis, yaitu homofermentasi asam laktat, heterofermentasi asam laktat, fermentasi asam propionat, fermentasi diasetil dan 2,3-butilen glikol, fermentasi asam butirat dan fermentasi alkohol. Fermentasi asam laktat merupakan fermentasi yang terjadi melalui aktivitas bakteri asam laktat (BAL) yang dapat mengubah glukosa menjadi asam laktat, karbon dioksida dan senyawa volatil dalam jumlah kecil (Meiyasa & Nurjanah, 2021).

Homofermentasi asam laktat menghasilkan 2 molekul asam laktat dari 1 molekul glukosa. Heterofermentasi asam laktat akan menghasilkan asam laktat, asam asetat serta etanol. Fermentasi asam propionat adalah fermentasi yang menghasilkan asam propionat serta asam asetat dari glukosa dan asam laktat. Fermentasi diasetil dan 2,3-butilen glikol akan mengubah asam sitrat menjadi asam piruvat kemudian menjadi asetilmetilkarbinol dan karbondioksida selanjutnya dioksidasi menjadi diasetil dan direduksi menjadi 2,3-butilen glikol (Erkmen & Bozoglu, 2016).

Fermentasi asam asetat merupakan fermentasi yang terjadi secara anaerob pada tahap awal fermentasi dilanjutkan tahap kedua dalam kondisi

aerob yaitu oksidasi etanol menjadi asam asetat oleh bakteri asam asetat seperti *Acetobacter aceti*. Fermentasi asam butirat adalah fermentasi yang dilakukan oleh mikroorganisme dengan cara mengoksidasi gula menjadi piruvat yang selanjutnya dioksidasi menjadi acetyl-CoA hingga menjadi asam butirat. Fermentasi asam butirat ini dilakukan oleh *Clostridium butyricum* (Hurst, 2023).

Fermentasi alkohol adalah suatu reaksi perubahan glukosa menjadi etanol dan karbon dioksida. Fermentasi alkohol umumnya dilakukan oleh khamir seperti *Saccharomyces cerevisiae* dan bakteri *Zymomonas* (Hurst, 2023). Fermentasi alkohol dengan *S. cerevisiae* secara teoritis dapat menghasilkan 0,51 kg etanol dan 0,49 kg karbon dioksida dari 1 kg glukosa (Sudiyani *et al.*, 2019). Reaksi kimia yang terjadi pada fermentasi alkohol menurut Wahyuni & Ramadhani (2020) adalah sebagai berikut:



Proses fermentasi khususnya dalam produksi bioetanol dapat dipengaruhi oleh beberapa faktor antara lain suhu, pH, lama waktu fermentasi, konsentrasi inokulum dan agitasi. Suhu dapat mempengaruhi tingkat pertumbuhan mikroorganisme yang digunakan pada proses fermentasi. Suhu optimum untuk fermentasi dalam produksi bioetanol berkisar antara 20°C hingga 35°C. Proses fermentasi di industri dengan ragi *S. cerevisiae* umumnya menggunakan suhu 30°C (Azhar *et al.*, 2017).

Proses fermentasi dalam produksi bioetanol dengan ragi *S. cerevisiae* memiliki pH optimal pada kisaran nilai 4-5, apabila pH medium di bawah 4

memerlukan masa inkubasi yang lebih lama sedangkan pH di atas 5 dapat mengurangi konsentrasi produk etanol. Waktu fermentasi yang singkat menyebabkan produk hasil fermentasi tidak dapat diperoleh secara maksimal karena tingkat pertumbuhan mikroorganisme tidak mencukupi, sedangkan waktu fermentasi yang lama akan menjadi toksik bagi pertumbuhan mikroorganisme karena jumlah produk hasil fermentasi dalam medium yang besar (Azhar *et al.*, 2017). Proses fermentasi yang optimal umumnya 30 hingga 72 jam. Jika waktu inkubasi terlalu cepat, khamir masih dalam masa pertumbuhan sehingga etanol yang dihasilkan sedikit, namun jika waktu fermentasi terlalu lama sel khamir memasuki fase kematian sehingga etanol yang dihasilkan tidak maksimal (Febriani *et al.*, 2014).

Konsentrasi inokulum fermentasi tidak berpengaruh secara signifikan terhadap hasil akhir konsentrasi etanol, namun memberi pengaruh terhadap tingkat konsumsi gula. Peningkatan konsentrasi sel akan mengurangi waktu fermentasi karena gula pada medium terkonsumsi secara cepat. Jumlah inokulum yang umum digunakan dalam produksi bioetanol yaitu berkisar 5-10%. Agitasi selama proses fermentasi akan membantu menjaga nutrisi pada medium merata serta membantu pembebasan etanol pada sel (Azhar *et al.*, 2017). Laju agitasi yang umum digunakan pada fermentasi oleh sel ragi yaitu 120-200 rpm (Srivastava *et al.*, 2021).

Fermentasi pada produksi bioetanol dapat dilakukan dalam tiga jenis metode yaitu *batch*, kontinu dan *fed-batch*. Fermentasi *batch* adalah fermentasi dengan sistem tertutup yaitu mikroorganisme diinokulasikan pada medium

fermentasi lalu diinkubasikan pada waktu tertentu tanpa adanya penambahan medium maupun pengunduhan hasil selama fermentasi. Fermentasi *batch* dilakukan apabila digunakan kultur murni pada proses fermentasi untuk menghindari kontaminasi. Keunggulan fermentasi *batch* yaitu sistem operasional sederhana, pengontrolan mudah, serta rendahnya risiko kontaminasi, namun sistem fermentasi *batch* etanol yang dihasilkan terbatas serta kemungkinan terjadinya akumulasi senyawa toksik pada medium karena tidak ada medium yang dikeluarkan selama proses fermentasi (Darwin, 2020).

Fermentasi kontinu adalah fermentasi sistem terbuka yaitu adanya penambahan medium dan pengunduhan hasil selama proses fermentasi. Jumlah volume medium yang dikeluarkan harus sama dengan volume medium yang ditambahkan pada reaktor. Keunggulan fermentasi kontinu ini yaitu dapat meningkatkan produktivitas sel sehingga produksi etanol tinggi. Kekurangan sistem fermentasi kontinu adalah pengontrolan sistem dan pencegahan kontaminasi sulit dilakukan serta sulitnya mengetahui penyebab terjadinya kontaminasi pada medium fermentasi (Darwin, 2020).

Fermentasi *fed-batch* adalah sistem fermentasi gabungan antara *batch* dengan kontinu yaitu mikroorganisme diinokulasi pada medium dan ditumbuhkan selama waktu tertentu, umumnya hingga mencapai akhir fase eksponensial kemudian diberikan penambahan medium baru secara berkala tanpa mengeluarkan medium fermentasi. Fermentasi *fed-batch* ini memiliki keunggulan yaitu jumlah sel yang viabel lebih banyak sehingga jumlah etanol yang dapat dihasilkan lebih besar. Kelemahan sistem *fed-batch* yaitu sistem

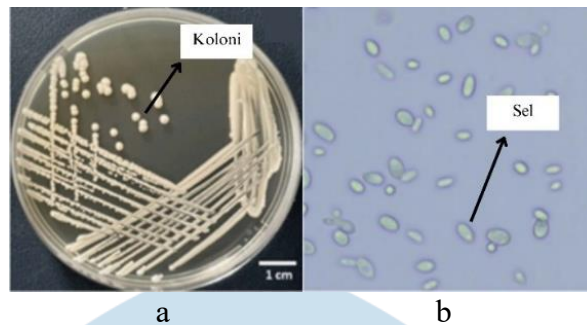
pengontrolannya lebih sulit dan risiko terjadinya kontaminasi lebih tinggi (Tse *et al.*, 2021). Sistem fermentasi *batch* dan *fed-batch* sering digunakan pada skala industri. Penggunaan sistem kontinu pada industri masih terbatas karena sulitnya mempertahankan kondisi aseptis selama fermentasi (Suhartatik, 2016).

I. Khamir *Saccharomyces cerevisiae*

Saccharomyces cerevisiae adalah salah satu jenis ragi atau khamir yang memiliki kemampuan dalam mengubah glukosa menjadi etanol dan karbon dioksida. *S. cerevisiae* merupakan mikroorganisme bersel tunggal yang dapat tumbuh baik pada suhu 30°C dengan derajat keasaman 4,5 hingga 5 (Setiarto, 2020). Klasifikasi khamir *S. cerevisiae* menurut Integrated Taxonomic Information System (2023b) adalah sebagai berikut:

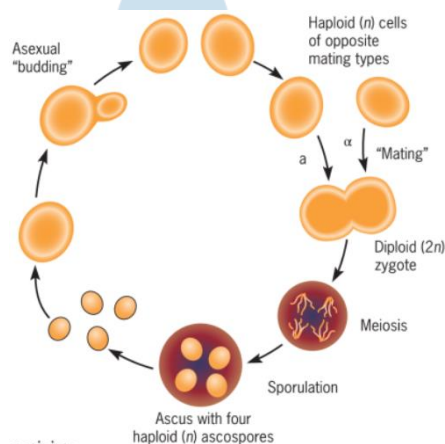
Kerajaan	: Fungi
Divisi	: Ascomycota
Kelas	: Saccharomycetes
Bangsa	: Saccharomycetales
Suku	: Saccharomycetaceae
Marga	: <i>Saccharomyces</i>
Spesies	: <i>Saccharomyces cerevisiae</i>

S. cerevisiae memiliki bentuk koloni bulat hingga elips, berwarna putih, tepian koloni rata, elevasi cembung, dan permukaan koloni halus (Linawati *et al.*, 2021). *S. cerevisiae* memiliki bentuk sel yaitu bulat hingga oval dengan panjang 1-50 µm dengan lebar 1-10 µm. Bentuk sel dan koloni *S. cerevisiae* menurut Unban *et al.* (2023) dapat dilihat pada Gambar 9.



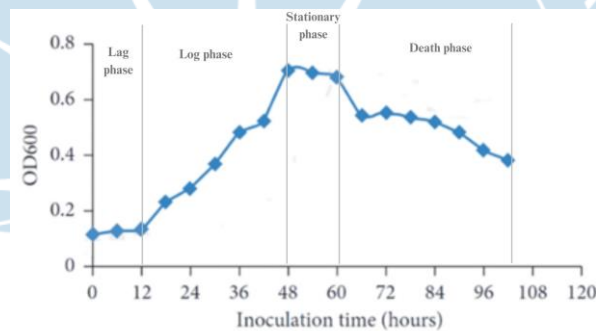
Gambar 9. Bentuk (a) koloni dan (b) sel *S. cerevisiae* (Sumber: Unban *et al.*, 2023).

S. cerevisiae adalah khamir yang dapat bereproduksi secara aseksual maupun seksual. Reproduksi khamir secara aseksual terjadi melalui proses *budding* yang melibatkan pembelahan mitosis dari nukleus sel haploid. Pembelahan tersebut menghasilkan satu anak inti yang bergerak menuju *bud* sel kemudian akan terpisah dari sel induk melalui sitokinesis. Reproduksi secara seksual pada khamir terjadi ketika adanya perkawinan dua sel haploid menghasilkan sel diploid yang selanjutnya melalui proses meiosis akan menghasilkan 4 sel haploid. Siklus hidup *S. cerevisiae* menurut Snustad & Simmons (2016) dapat dilihat pada Gambar 10.



Gambar 10. Siklus hidup *S. cerevisiae* (Sumber: Snustad & Simmons, 2016).

S. cerevisiae merupakan mikroorganisme yang dapat memanfaatkan glukosa, manosa dan galaktosa untuk pertumbuhannya (Fatimah *et al.*, 2017). *S. cerevisiae* memetabolisme gula menjadi etanol melalui glikolisis atau jalur Embden Meyerhof Parnas (EMP). Pada glikolisis molekul gula diubah menjadi piruvat. Piruvat kemudian diubah menjadi asetaldehida dan karbon dioksida oleh piruvat dekarboksilase pada proses fermentasi, selanjutnya asetaldehida direduksi menjadi etanol oleh enzim dehidrogenase (Topaloğlu *et al.*, 2023). Grafik pertumbuhan *S. cerevisiae* menurut Kolo *et al.* (2020) dapat dilihat pada Gambar 11.



Gambar 11. Pertumbuhan *S. cerevisiae* pada medium yeast extract peptone dextrose (YEPD) (Sumber: Kolo *et al.*, 2020).

Pola pertumbuhan *S. cerevisiae* pada Gambar 11 menunjukkan bahwa *S. cerevisiae* mengalami fase adaptasi atau fase lag pada jam ke-0 hingga jam ke-12. Inokulum *S. cerevisiae* pada fase lag masih beradaptasi dengan kondisi lingkungan medium, dan sel *S. cerevisiae* mulai membelah diri dengan kecepatan rendah. Fase logaritmik atau eksponensial terjadi pada jam ke-12 hingga ke-48 yang ditandai dengan meningkatnya massa sel karena pada fase ini sel-sel ragi membelah dengan sangat cepat. Pada fase logaritmik hingga

awal stasioner sel ragi umumnya menghasilkan banyak senyawa metabolit (Kolo *et al.*, 2020).

Fase stasioner terlihat pada jam ke-48 sampai jam ke-60. Fase kematian sel *S. cerevisiae* terlihat dari jam ke-60 yang ditandai dengan berkurangnya jumlah sel. Jumlah sel *S. cerevisiae* pada fase kematian banyak yang telah mati karena kekurangan nutrisi dan akumulasi metabolit yang dihasilkan bersifat toksik bagi sel ragi (Kolo *et al.*, 2020).

S. cerevisiae adalah jenis mikroorganisme yang banyak digunakan dalam industri produksi bioetanol (Topaloglu *et al.*, 2023). Penggunaan *S. cerevisiae* dalam produksi etanol memiliki beberapa keunggulan seperti laju pertumbuhannya cepat, dapat tumbuh pada kondisi asam sehingga tidak mudah terkontaminasi serta tidak sensitif terhadap suhu (Faustine *et al.*, 2021). Selain itu, *S. cerevisiae* juga bersifat anaerob fakultatif yang dapat tumbuh baik pada kondisi aerob maupun anaerob (Tse *et al.*, 2021).

Pertumbuhan khamir *S. cerevisiae* dapat dipengaruhi oleh berbagai faktor antara lain suhu, cahaya, oksigen, pH, nutrisi serta senyawa toksik yang ada pada media tumbuh. Khamir umumnya dapat tumbuh baik pada suhu 20-37°C. Suhu di atas 50°C menyebabkan kematian sel khamir. Sel khamir dalam pertumbuhannya tidak membutuhkan cahaya atau sinar matahari, radiasi ultraviolet dari sinar matahari akan dapat menyebabkan kematian sel (Junior *et al.*, 2022).

Khamir membutuhkan oksigen dalam reproduksi sel, namun pada proses fermentasi sel khamir membutuhkan kondisi anaerob untuk menghasilkan

etanol. Sel khamir membutuhkan kondisi medium pertumbuhan yang sedikit asam. Nilai pH optimum untuk pertumbuhan *S. cerevisiae* adalah 4,5-5,5. Pertumbuhan sel khamir memerlukan nutrisi untuk reproduksi sel antara lain karbon, nitrogen serta garam mineral (Junior *et al.*, 2022). Gula merupakan sumber karbon yang digunakan sebagai sumber energi utama untuk pertumbuhan sel khamir (Li & Samir, 2017).

Etanol adalah produk utama dari fermentasi alkohol oleh *S. cerevisiae*, namun jika kadar etanol dalam medium yang terlalu tinggi (>18%) akan menjadi senyawa toksik bagi khamir. *S. cerevisiae* memiliki tingkat toleransi terhadap etanol pada medium fermentasi sebesar 13-15%, lebih dari itu aktivitas sel akan terhambat dan menyebabkan penurunan viabilitas sel khamir (Junior *et al.*, 2022). Kadar etanol di atas 20% pada medium fermentasi menyebabkan kematian sel khamir (Yang & Tavazoie, 2020).

Kadar etanol yang umumnya dapat dihasilkan dari fermentasi gula oleh khamir yaitu sebesar 8% (Pimentel & Marcia, 2008). Fermentasi batang pohon pisang melalui hidrolisis HCl menggunakan *S. cerevisiae* menghasilkan bioetanol sebesar 2,5 g/L atau 0,25% (Gupta *et al.*, 2019). Fermentasi limbah pertanian jagung (*corn stover*) melalui hidrolisis HCl menghasilkan bioetanol 21,47 g/L atau 2,147% menggunakan *S. cerevisiae* selama 48 jam fermentasi (Aderibigbe *et al.*, 2021). Fermentasi kulit buah naga merah dengan *S. cerevisiae* melalui hidrolisis asam sulfat menghasilkan bioetanol 5% pada 72 jam fermentasi (Satiyarti *et al.*, 2024). Fermentasi kulit singkong dan kertas koran menghasilkan bioetanol 6,6% melalui hidrolisis HCl dan fermentasi *S.*

cerevisiae selama 72 jam (Mutiara *et al.*, 2020). Selain itu, fermentasi dengan *S. cerevisiae* dari kulit buah semangka melalui hidrolisis HCl juga dapat menghasilkan kadar bioetanol 3,58 hingga 8,35% (Ezejirofor *et al.*, 2018).

J. Destilasi

Destilasi merupakan suatu metode pemisahan bahan kimia menurut perbedaan titik didih atau kecepatan bahan untuk menguap. Tujuan dari proses destilasi yaitu memurnikan suatu zat dari campurannya. Pada proses destilasi campuran bahan akan dididihkan dan uap yang terbentuk kemudian didinginkan kembali dalam bentuk cairan. Bahan yang memiliki titik didih yang lebih rendah akan menguap terlebih dahulu dan terkondensasi dalam kondensor pendingin (Rifdah *et al.*, 2022). Destilasi bioetanol dapat dilakukan pada suhu 78-80°C karena titik didih etanol adalah 78°C (Maulana *et al.*, 2024).

K. Hipotesis

1. Konsentrasi asam klorida yang menghasilkan kadar gula reduksi tertinggi dari kulit buah naga merah adalah 2-3 N.
2. Kadar etanol dari fermentasi hidrolisat kulit buah naga merah dengan *S. cerevisiae* FNCC 3012 selama 72 jam sebesar 0,25-8,35%.