



## OPTIMASI KONDISI EKTRAKSI VANILLIN HASIL DEGRADASI LIGNOSELULOSA BAGAS TEBU MENGGUNAKAN *RESPONSE SURFACE METHOD* (RSM)

### Optimization of Vanillin Extraction Conditions from Lignocellulose Degradation of Sugarcane Bagasse using the Response Surface Method (RSM)

Irnia Nurika\*, Faudina Nurin Nisa', Nurul Azizah, Sri Suhartini

Jurusan Teknologi Industri Pertanian, Fakultas Teknologi Pertanian, Universitas Brawijaya  
Jl. Veteran, Malang, Jawa Timur 65145, Indonesia

\*Email: [irnia@ub.ac.id](mailto:irnia@ub.ac.id)

#### **ABSTRACT**

*Sugarcane bagasse is an agricultural waste containing lignocellulose and has the potential to be processed into high-value chemicals such as vanillin. The degradation of sugarcane bagasse lignocellulose can be carried out biologically by the white rot fungus *Phanerochaete chrysosporium*. This study aims to obtain optimal extraction conditions in the form of ethyl acetate solvent volume and extraction time, using the response surface method (RSM). Two optimized factors were the volume of ethyl acetate (71.72; 80; 100; 120; and 128.28 mL) and the extraction time (35.16; 60; 120; 180; 204.84 minutes). The response variables were the concentration (%) and yield of vanillin ( $\mu\text{g g}^{-1}$ ). The research on the optimization of the response of vanillin levels and vanillin yield was carried out at 14 days incubation with the highest average total soluble phenol (TSP) value of  $0.101 \text{ mg g}^{-1}$ . The optimal condition of ethyl acetate volume of 109.730 mL with an extraction time of 137.302 minutes was predicted to produce vanillin levels and yields of 0.0078% and  $8.9089 \text{ g g}^{-1}$ , respectively, with an accuracy value of 93.4%. Based on the verification results, the optimal vanillin concentration and yield were 0.0077% and  $8.9805 \text{ g g}^{-1}$ , respectively.*

**Keywords:** *optimization by RSM, *Phanerochaete chrysosporium*, sugarcane bagasse, vanillin concentration, vanillin yield*

#### **ABSTRAK**

Bagas tebu merupakan limbah pertanian yang mengandung lignoselulosa dan berpotensi diolah menjadi bahan kimia bernilai tinggi seperti vanillin. Degradasi lignoselulosa bagas tebu dapat dilakukan secara biologis oleh jamur pelapuk putih *Phanerochaete chrysosporium*. Penelitian ini bertujuan mendapatkan kondisi ekstraksi optimal berupa volume pelarut etil asetat dan lama waktu ekstraksi, menggunakan *response surface method* (RSM). Dua faktor yang dioptimasi adalah *volume* etil asetat (71,72; 80; 100; 120; dan 128,28 mL) dan lama waktu ekstraksi (35,16; 60; 120; 180; 204,84 menit). Variabel respons adalah kadar (%) dan *yield* vanillin ( $\mu\text{g g}^{-1}$ ). Penelitian optimasi respons kadar vanillin dan *yield* vanillin dilakukan pada inkubasi 14 hari dengan nilai *total soluble phenol* (TSP) rata-rata tertinggi 0,101  $\text{mg g}^{-1}$ . Kondisi optimal *volume* etil asetat 109,730 mL dengan waktu ekstraksi 137,302 menit diprediksi menghasilkan kadar dan *yield* vanillin sebesar 0,0078% dan  $8,9089 \mu\text{g g}^{-1}$  dengan nilai ketepatan 93,4%. Berdasar hasil verifikasi, konsentrasi dan *yield* vanillin yang optimal masing-masing adalah 0,0077% dan  $8,9805 \mu\text{g g}^{-1}$ .

**Kata Kunci:** bagas tebu, kadar vanillin, optimasi dengan RSM, *Phanerochaete chrysosporium*, *yield* vanillin

## PENDAHULUAN

Tebu (*Saccharum officinarum*) merupakan tanaman tahunan yang dikenal luas sebagai bahan baku pembuatan gula (Cheavegatti-Gianotto et al. 2011; Nofu et al. 2014; Arif et al. 2019) dan bahan dasar pembuatan makanan dan minuman (Cheavegatti-Gianotto et al. 2011; Nofu et al. 2014). Pada industri gula, bagas tebu merupakan salah satu produk samping yang tersisa setelah batang tebu diekstrak untuk menghasilkan gula (Chandel et al. 2011; Solomon 2011). Bagas tebu yang dihasilkan sekitar 35-40% dari setiap tebu yang diproses (Yusuf et al. 2018). Sekitar 60% dari total bagas tebu yang dihasilkan dimanfaatkan sebagai bahan bakar pada pabrik gula, bahan baku untuk kertas, bahan baku industri kampas rem, industri jamur, dan lain-lain. Sementara sekitar 40% dari ampas tebu tersebut diperkirakan belum dimanfaatkan (Hermanto et al. 2019). Bagas tebu sebagai limbah lignoselulosa memiliki komposisi kimia yang terbilang cukup baik dan berpotensi dimanfaatkan menjadi produk dengan nilai guna lebih (Paola et al. 2018). Kandungan lignin yang tinggi pada limbah lignoselulosa dapat diolah menjadi produk turunan lignin dengan nilai ekonomi tinggi seperti vanillin (Isola et al. 2018).

Vanillin banyak digunakan dalam industri makanan (Zhu et al. 2018; Paramita dan Yulianto 2019) dan pada konsentrasi tinggi dapat digunakan sebagai antioksidan (Kadarohman et al. 2010; Listarina 2012). Secara alami, vanillin dapat diperoleh dengan isolasi dari buah vanilla (Kumar et al. 2010; Hartati et al. 2019; Paramita dan Yulianto 2019). Namun seiring dengan laju pertumbuhan penduduk dan kebutuhan dunia akan bahan pengharum dan pewangi makanan, minuman dan bahan kosmetika yang menggunakan vanillin maka untuk memenuhinya, vanillin dibuat secara sintesis (Kadarohman et al. 2010). Lignin merupakan salah satu komponen penyusun biomassa lignoselulosa yang tersusun dari komponen selulosa, hemiselulosa, lignin, dan pektin (Manavalan et al. 2015). Lignoselulosa dari bagas tebu terdiri dari 24,7% lignin, 35,2% selulosa, dan 23,7% hemiselulosa (Zanchetta et al. 2018), dimana dalam memanfaatkannya diperlukan *pretreatment* (Eisenhuber et al. 2013). *Pretreatment* bahan

baku dilakukan untuk mempercepat proses degradasi bahan organik yang mengandung lignoselulosa (Zheng et al. 2014; Amin et al. 2017). Pada penelitian ini, *pretreatment* dilakukan secara biologis menggunakan *Phanerochaete chrysosporium*, salah satu jamur pelapuk putih yang paling efisien untuk mendegradasi dan memineralisasi lignin (Janusz et al. 2017; Su et al. 2018). *P. chrysosporium* memiliki kemampuan mendegradasi lignoselulosa secara selektif dengan mendegradasi komponen lignin terlebih dahulu, kemudian komponen selulosa (Yakin et al. 2017; Andlar et al. 2018). Enzim lignin peroksidase (LiP) dan mangan peroksidase (MnP) yang dihasilkan *P. chrysosporium* berperan melapukkan kayu dan mendegradasi lignin (Yakin et al. 2017). *P. chrysosporium* sendiri merupakan jamur yang pertumbuhannya cepat dan mudah ditumbuhkan pada kultur (Chandra et al. 2019) serta memiliki kemampuan oksidasi yang potensial dan efisien pada biodegradasi lignin (Sigoillot et al. 2012; Falade et al. 2016) sehingga vanillin yang dihasilkan dari lignin hasil degradasi biomassa lignoselulosa bersifat terbarukan dan mempunyai potensi bahan baku yang melimpah (Gallage dan Møller 2015).

Vanillin dapat diperoleh salah satunya dengan proses ekstraksi (Gu et al. 2012; Zhang et al. 2014). Pelarut yang dapat digunakan adalah etil asetat, karena etil asetat merupakan pelarut yang bersifat semi polar dan tidak higroskopis serta mempunyai afinitas tinggi terhadap vanillin (Sciubba et al. 2009; Mota et al. 2016).

Penelitian ini bertujuan untuk menentukan lama waktu inkubasi terbaik untuk kemudian dilanjutkan dengan ekstraksi vanillin dari hasil degradasi lignoselulosa limbah bagas tebu oleh jamur *P. chrysosporium*, serta menganalisa hasil optimasi *volume* pelarut etil asetat dan lama waktu ekstraksi terhadap hasil kadar vanillin dan *yield* vanillin serta mendapatkan nilai *volume* pelarut etil asetat dan lama waktu ekstraksi yang optimal.

## BAHAN DAN METODE

### Tempat dan waktu penelitian

Penelitian dilaksanakan di Laboratorium Bioindustri, Jurusan Teknologi Industri Pertanian, Fakultas Teknologi

**Tabel 1.** Taraf level faktor volume pelarut etil asetat dan lama waktu ekstraksi

Faktor	Taraf Level		
	-1	0	1
Volume pelarut etil asetat (mL)	80	100	120
Lama waktu ekstraksi (menit)	60	120	180

Pertanian, Universitas Brawijaya, Malang. Waktu pelaksanaan penelitian adalah pada bulan Juni 2019 sampai dengan Desember 2019.

**Alat dan bahan**

Alat yang digunakan antara lain gelas ukur, tabung reaksi, labu erlenmeyer, corong, beaker glass, autoklaf, oven listrik, *laminar air flow* (LAF), *waterbath shaker*, timbangan digital, timbangan analitik, inkubator, desikator, mikropipet, pH-meter, spektrofotometer UV-Vis, sentrifugator, rotary vacuum evaporator.

Bahan utama penelitian ini adalah bagas tebu yang diambil dari Pabrik Gula (PG) Kebon Agung, Jalan Raya Kebonagung, Kecamatan Pakisaji, Malang. Kultur jamur *P. chrysosporium* diperoleh dari Laboratorium Bioindustri, Jurusan Teknologi Industri Pertanian, Universitas Brawijaya, Malang. Bahan lainnya antara lain barley, kalsium sulfat (CaSO<sub>4</sub>), kalsium karbonat (CaCO<sub>3</sub>), malt extract agar (MEA), sodium hidroksida (NaOH), 3,5-dinitrosalylic acid (DNS), asam sulfat (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>), alkohol 70%, spirtus, etil asetat, metanol, sodium karbonat (Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>), reagen Folin-Ciocalteu, asam galat (*gallic acid*), dan standar vanillin (Merck).

**Rancangan penelitian**

Penelitian diawali dengan proses degradasi lignoselulosa pada bagas tebu menggunakan *P. chrysosporium*, yang diinkubasi selama 35 hari. Sampel bagas tebu yang digunakan sebanyak 10 gram. Pengamatan dilakukan setiap tujuh hari yaitu hari ke-0, 7, 14, 21, 28, dan 35. Parameter yang diamati terdiri dari total soluble phenol (TSP), total gula reduksi (TGR), pH, susut berat (*weight loss*), dan kadar lignin. Setelah didapatkan hasil lama inkubasi dengan kadar TSP yang tertinggi selanjutnya dilakukan ekstraksi menggunakan pelarut etil asetat. Optimasi dilakukan pada tahap ekstraksi dengan dua

faktor yaitu *volume* pelarut etil asetat dan lama waktu ekstraksi menggunakan *response surface method* (RSM) untuk mengetahui kondisi optimal dari kadar vanillin yang dihasilkan pada substrat bagas tebu.

Rancangan penelitian yang digunakan untuk optimasi menggunakan RSM adalah rancangan komposit terpusat (CCD). Faktor yang digunakan dalam penelitian ini adalah *volume* pelarut etil asetat (mL) dan lama waktu ekstraksi (menit). Variabel respons yang ditetapkan adalah kadar vanillin (%) dan *yield* vanillin (µg g<sup>-1</sup>). Adapun level dari masing-masing faktor yang digunakan dalam penelitian ini setelah dilakukan percobaan pendahuluan adalah sebagai berikut:

1. Faktor *volume* pelarut (Shu et al. 2016)
  - a. *Volume* Pelarut = 80 mL ( $X_{1_1} = 1$ )
  - b. *Volume* Pelarut = 120 mL ( $X_{1_2} = 1$ )
2. Faktor lama waktu ekstraksi (Lun et al. 2014)
  - a. Waktu ekstraksi 60 menit ( $X_{2_1} = 1$ )
  - b. Waktu ekstraksi 180 menit ( $X_{2_2} = 1$ )

Taraf level dari kedua faktor dapat dilihat pada Tabel 1. Rancangan penelitian menggunakan RSM dapat dilihat pada Tabel 2. Berdasarkan Tabel 1 dapat diketahui jarak antara level yaitu:

$$\text{Jarak antara level faktor volume pelarut} = 100 - 80 = 20$$

$$\text{Jarak antara level faktor lama waktu ekstraksi} = 120 - 60 = 60$$

Menetapkan level-level faktor yang sesuai dengan titik pusat  $X_1 = 0$  dan  $X_2 = 0$ . Hubungan antar variabel  $X_1$  dengan variabel asli dapat dilihat pada persamaan (1) dan hubungan antara variabel  $X_2$  dengan variabel asli dapat dilihat pada persamaan (2) sebagai berikut:

$$X_1 = \frac{A-(100)}{20}, A = 20X_1 + 100 \tag{1}$$

$$X_2 = \frac{B-(120)}{60}, B = 60X_2 + 120 \tag{2}$$

Nilai  $\alpha$  diperoleh dari perhitungan  $\alpha = 2^{\frac{k}{4}}$ , karena penelitian ini menggunakan dua faktor maka nilai  $k = 2$ , sehingga  $\alpha = 2^{\frac{2}{4}} = 1,414$ . Kemudian nilai  $\alpha$  tersebut disesuaikan dengan level faktor yang telah ditetapkan yaitu  $\alpha = -1,414$  dan  $\alpha = 1,414$ . Selanjutnya nilai A dan B untuk masing-masing level faktor ( $\alpha$  dan  $\alpha$ ) adalah sebagai berikut:

Dari persamaan (1) diketahui bahwa

$$X_1 = 1,414; \text{ sehingga} \\ A = 20(-1,414) + 100 = 71,72 \text{ mL}$$

$$X_1 = 1,414; \text{ sehingga} \\ A = 20(1,414) + 100 = 128,28 \text{ mL}$$

Dari persamaan (2) diketahui bahwa

$$X_2 = -1,414; \text{ sehingga} \\ B = 60(-1,414) + 120 = 35,16 \text{ menit}$$

$$X_2 = 1,414; \text{ sehingga} \\ B = 60(1,414) + 120 = 204,84 \text{ menit}$$

### Persiapan bahan dan mikroorganisme

Tahap ini terdiri dari persiapan bahan, pembuatan media *malt extract agar* (MEA) dan dilanjutkan dengan proses inokulasi jamur *P. chrysosporium*. Kemudian pembuatan media *Grain Spawn* dengan menggunakan barley dan dilanjutkan dengan inokulasi jamur *P. chrysosporium* pada media *Grain Spawn* yang bertujuan untuk mempermudah dalam penimbangan inokulum yang akan diinokulasi ke dalam bagas tebu.

### Pretreatment pada bagas tebu

Bagas tebu yang akan digunakan telah melalui proses pengecilan ukuran dan pengeringan di pabrik. Namun ukurannya masih terlalu besar dan tidak seragam. *Pretreatment* diawali dengan pengecilan ukuran bagas tebu menjadi 1–2 cm. Hasil potongan bahan dimasukkan ke dalam

botol kaca (jar) berdiameter 8 cm sebanyak 10 g per botol. Sampel kemudian disterilisasi menggunakan autoklaf pada suhu 121 °C dengan tekanan 1 atm selama 15–20 menit sebanyak 2 kali dengan jarak waktu antar proses sterilisasi ~24 jam. Sampel yang telah disterilisasi didinginkan hingga suhunya 40–50 °C. Sampel kemudian diinokulasi dengan jamur *P. chrysosporium* sebanyak  $2 \pm 0,2$  g pada masing-masing botol. Botol sampel ditutup rapat dan diinkubasi selama 35 hari pada suhu  $30 \pm 2$  °C.

### Ekstraksi

Proses ekstraksi untuk analisis parameter degradasi lignoselulosa dilakukan menggunakan aquades. Sampel yang telah diinkubasi, diekstrak pada hari ke-0, 7, 14, 21, 28, dan 35 untuk dilakukan pengujian TSP, TGR, dan pH. Sedangkan sampel padat (ampas) diukur susut berat dan kadar lignin. Langkah pertama ekstraksi menggunakan aquades dengan penambahan 100 mL aquades 80 °C pada setiap sampel untuk membantu melarutkan gula reduksi dan fenol terlarut dari dalam biomas. Sampel dihomogenkan menggunakan *waterbath shaker* pada suhu 40 °C dengan frekuensi 150 rpm selama 1 jam. Ampas hasil ekstraksi dengan aquades kemudian diekstraksi dengan pelarut etil asetat dan lama waktu ekstraksi dengan perlakuan berdasarkan Tabel 2.

**Tabel 2.** Rancangan komposit terpusat *Design Expert 11.1.2.0*

No	Variabel Kode		Variabel Asli		Respon	
	$X_1$	$X_2$	Volume Pelarut Etil Asetat (mL)	Lama Waktu Ekstraksi (menit)	Kadar Vanilin (%)	Yield Vanilin ( $\mu\text{g g}^{-1}$ )
1	1	-1	120	60	$Y_1$	$Y_2$
2	0	0	100	120	$Y_1$	$Y_2$
3	1,414	0	128,28	120	$Y_1$	$Y_2$
4	0	1,414	100	204,85	$Y_1$	$Y_2$
5	0	-1,414	100	35,15	$Y_1$	$Y_2$
6	0	0	100	120	$Y_1$	$Y_2$
7	1	1	120	180	$Y_1$	$Y_2$
8	0	0	100	120	$Y_1$	$Y_2$
9	0	0	100	120	$Y_1$	$Y_2$
10	-1,414	0	71,72	120	$Y_1$	$Y_2$
11	0	0	100	120	$Y_1$	$Y_2$
12	-1	1	80	180	$Y_1$	$Y_2$
13	-1	-1	80	60	$Y_1$	$Y_2$

Keterangan:  $X_1$  = Faktor volume etil asetat;  $X_2$  = Faktor lama waktu ekstraksi

### Pengujian ekstrak dan ampas bagas tebu

Pengujian TSP, TGR, pH, susut berat, dan kadar lignin dilakukan pada hari ke-0, 7, 14, 21, 28, dan 35. Uji TSP dilakukan secara spektrofotometri menggunakan reagen Folin-Ciocalteu dengan metode yang mengacu pada Singleton dan Rossi (1965). Uji TGR dilakukan secara spektrofotometri dengan menggunakan reagen DNS (3,5-dinitrosalicylic acid) dengan metode yang mengacu pada Miller (1959). Pengukuran pH menggunakan pH meter dengan metode sesuai SNI 06-6989.11-2004. Susut berat sampel diuji menggunakan metode pengeringan oven mengacu pada Pitt dan Hocking (2009). Sedangkan pengujian kadar lignin dilakukan secara gravimetri menggunakan metode Chesson (Datta 1981). Pengujian kadar vanillin dan perhitungan *yield* vanillin dilakukan secara spektrofotometri mengacu pada Barbosa et al. (2008) dan Rasoamandrary et al. (2013).

### Pengolahan dan analisa data

Data hasil penelitian yang diperoleh berupa kadar dan *yield* vanillin diolah serta dianalisa menggunakan *software Design Expert 11.1.2.0* versi trial. Data dimasukkan pada rancangan komposit terpusat 2 faktor dengan respons kadar dan *yield* vanillin. Faktor perlakuan terdiri dari *volume* pelarut etil asetat dan lama waktu ekstraksi.

## HASIL DAN PEMBAHASAN

### Parameter degradasi lignoselulosa

Kenampakan pertumbuhan jamur *P. chrysosporium* pada bagas tebu setiap minggunya selama 35 hari dapat dilihat pada Gambar 1. Hasilnya menunjukkan bahwa semakin lama inkubasi, maka semakin banyak miselium jamur yang tumbuh. Berdasarkan kenampakan tersebut maka jamur *P. chrysosporium* akan mendegradasi komponen lignoselulosa pada bagas tebu yang ditunjukkan dengan adanya perubahan pada masing-masing parameter degradasi lignoselulosa, dapat dilihat pada hasil *scanning electron microscope* (SEM) antara hari ke-0 dan hari ke-35 pada Gambar 2.

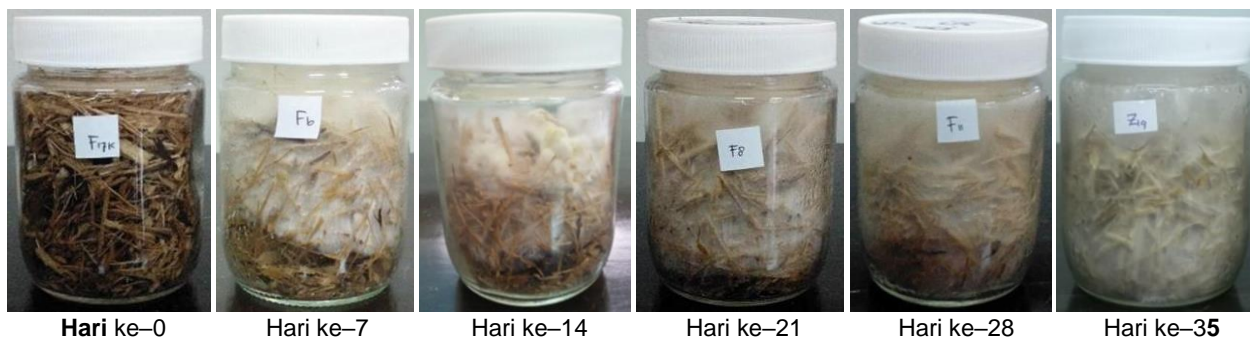
Hasil rata-rata TSP dari degradasi lignoselulosa bagas tebu oleh jamur *P. chrysosporium* selama 35 hari inkubasi dapat dilihat pada Gambar 3a. Hasil

degradasi bagas tebu memiliki nilai rata-rata TSP yang meningkat dari inkubasi 0 sampai 14 hari dan mengalami penurunan pada inkubasi 21 hari sampai 35 hari dengan nilai TSP terendah pada hari ke-0 sebesar 0,014 mg g<sup>-1</sup> dan tertinggi pada hari ke-14 sebesar 0,107 mg g<sup>-1</sup>. Peningkatan dan penurunan nilai TSP, masing-masing diduga karena pengaruh lamanya inkubasi dan nutrisi yang ada. Peningkatan nilai TSP dari hari ke-0 sampai hari ke-14 diduga karena semakin lama waktu inkubasi maka semakin banyak senyawa fenol yang didegradasi sehingga nilai TSP mengalami peningkatan. Sedangkan penurunan nilai TSP dari hari ke-21 sampai hari ke-35 diduga karena degradasi lignin telah optimal pada hari ke 14 dan kandungan lignin telah habis. Selain itu penurunan nilai TSP juga diduga karena adanya peran fenol sebagai senyawa pereduksi dalam reaksi fenton. Menurut Ivanova et al. (2012), semakin lama inkubasi maka akan semakin banyak fenol yang dihasilkan. Namun pada lama waktu tertentu hasilnya akan tetap dan semakin berkurang. Jumlah jamur selama inkubasi dan jumlah senyawa fenol yang terdegradasi berbanding lurus, dimana semakin banyak jamur yang tumbuh setiap minggunya maka senyawa fenol yang terdegradasi juga akan semakin banyak. Oleh karena itu akan berdampak pada peningkatan nilai fenol (Supriya dan Neehar 2014; Ibrahim dan El-Gamdi 2019). Pertumbuhan dan perkembangan mikroorganisme sangat dipengaruhi oleh adanya nutrisi dan lingkungan yang baik (Frey-Klett et al. 2011; Nottingham et al. 2018), ketika ketersediaan nutrisi telah habis dan mikroorganisme tidak dapat beradaptasi dengan lingkungan maka jumlah mikroorganisme tersebut akan berkurang karena mengalami kematian (Haruta dan Kanno 2015). Hal tersebut diduga akan berpengaruh terhadap penurunan nilai fenol karena jamur pendegradasi mengalami kematian akibat tidak adanya nutrisi atau nutrisi telah habis. Menurut Arantes et al. (2012) pada reaksi Fenton, fenol juga digunakan pada reduksi Fe<sup>3+</sup> menjadi Fe<sup>2+</sup>. Sehingga penggunaan fenol pada reaksi Fenton tersebut juga dapat mempengaruhi jumlah senyawa fenol yang dihasilkan.

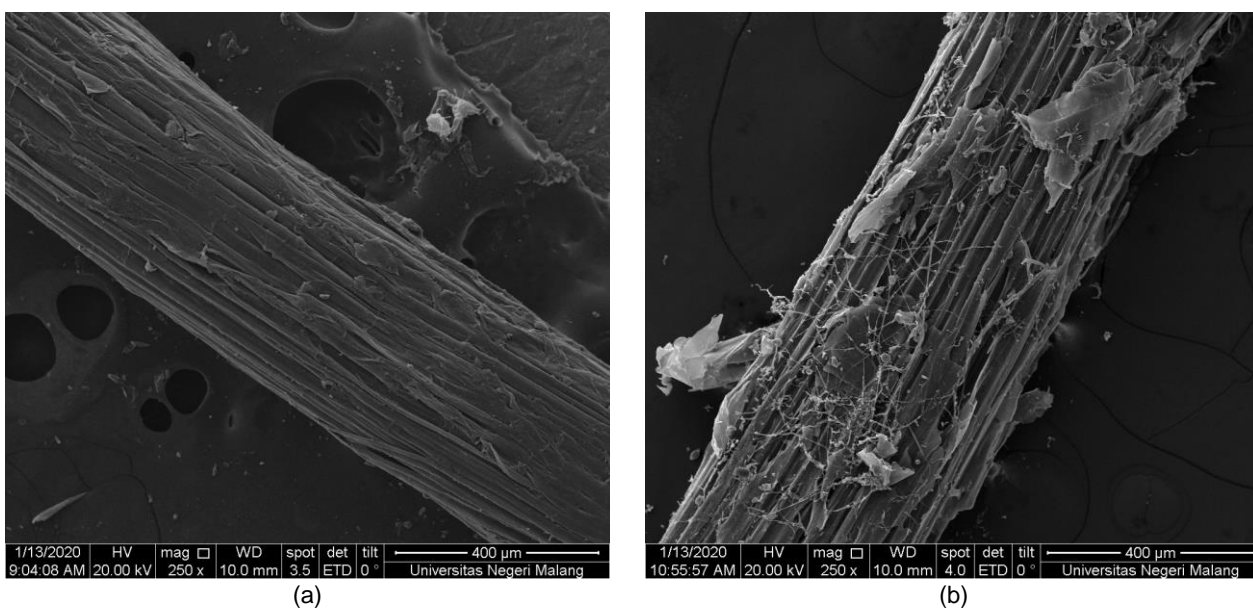
Hasil rata-rata TGR dari degradasi lignoselulosa bagas tebu oleh jamur *P. chrysosporium* selama 35 hari dapat dilihat pada Gambar 3b. Hasil degradasi memiliki nilai rata-rata TGR yang meningkat dari inkubasi 0 hari sampai 14 hari dan mengalami penurunan pada inkubasi 21 hari sampai 35 hari. Peningkatan nilai TGR diduga karena adanya degradasi hemiselulosa dan selulosa menjadi gula sederhana. Menurut Madadi dan Abbas (2017), *pretreatment* dengan menggunakan fungi atau jamur pelapuk akan meningkatkan total gula yang dihasilkan selama proses sakarifikasi biomasa lignoselulosa. Metabolisme mikroorganisme akan menghasilkan gula dari konversi selulosa dan hemiselulosa (Su et al. 2018). Menurut Zhang et al. (2019), semakin lama waktu inkubasi *pretreatment* maka akan semakin meningkat aksesibilitas selulosa dan hemiselulosa sehingga semakin banyak monosakarida yang terurai. Pada penelitian

ini, penurunan nilai TGR diduga karena jamur memanfaatkan gula reduksi yang diperoleh dari hasil degradasi selulosa dan hemiselulosa sebagai sumber karbon untuk metabolisme. Menurut Lalak et al. (2016), penurunan gula reduksi dikarenakan oleh adanya perombakan komponen gula menjadi glukosa, di mana glukosa tersebut dikonsumsi oleh mikroorganisme sebagai sumber energi selama proses *pretreatment*.

Hasil rata-rata susut berat dari degradasi lignoselulosa bagas tebu oleh jamur *P. chrysosporium* selama 35 hari dapat dilihat pada Gambar 3c. Berdasarkan Gambar 3c diketahui bahwa semakin lama waktu inkubasi bagas tebu maka semakin meningkat presentase susut beratnya. Persentase susut berat terendah pada 0 hari inkubasi dengan nilai 0%, kemudian meningkat menjadi 2,00% pada inkubasi 7 dan paling tinggi sebesar 22,44% pada inkubasi 35 hari. Menurut Zhang et al. (2012),



**Gambar 1.** Kenampakan pertumbuhan miselia jamur *P. chrysosporium* pada bagas tebu dengan lama inkubasi 0–35 hari



**Gambar 2.** Kenampakan permukaan bagas tebu hasil SEM dengan perbesaran 250x: (a) sebelum (hari ke-0), dan (b) sesudah (hari ke-35) *pretreatment* menggunakan jamur *P. chrysosporium*

**Tabel 3.** Data respon kadar vanilin dan yield vanillin yang diperoleh dari kombinasi perlakuan volume pelarut dan lama waktu ekstraksi

No	Variabel Kode		Variabel Asli		Respon	
	$X_1$	$X_2$	Volume Pelarut Etil Asetat (mL)	Lama Waktu Ekstraksi (menit)	Kadar Vanilin (%)	Yield Vanilin ( $\mu\text{g g}^{-1}$ )
1	-1	-1	80	60	0,0036	3,304
2	1	-1	120	60	0,0027	3,190
3	-1	1	80	180	0,0038	4,101
4	1	1	120	180	0,0072	6,797
5	-1,414	0	71,72	120	0,0035	4,913
6	1,414	0	128,28	120	0,006	9,341
7	0	-1,414	100	35,15	0,0037	3,270
8	0	1,414	100	204,85	0,0042	5,198
9	0	0	100	120	0,0079	9,034
10	0	0	100	120	0,0078	8,001
11	0	0	100	120	0,0075	7,729
12	0	0	100	120	0,0081	9,298
13	0	0	100	120	0,0064	8,211

Keterangan:  $X_1$  = Faktor volume etil asetat;  $X_2$  = Faktor lama waktu ekstraksi

dihasilkannya produk degradasi lignoselulosa bersamaan dengan terjadinya penurunan berat bahan. Hal tersebut terjadi karena bahan terurai dan menjadi lebih sedikit dan terbentuk suspensi yang agak halus. Kondisi struktur bahan yang terurai tersebut yang akan menyebabkan terjadinya penurunan berat bahan. Hal tersebut menunjukkan bahwa peningkatan degradasi lignoselulosa akan berdampak pada penurunan berat bahan sehingga menunjukkan peningkatan persentase susut berat (Gajendiran et al. 2016).

Hasil rata-rata pH dari degradasi lignoselulosa bagas tebu oleh jamur *P. chrysosporium* selama 35 hari inkubasi dapat dilihat pada Gambar 3d. Hasil menunjukkan bahwa nilai rata-rata pH menurun dari inkubasi hari ke-0 sampai 35 hari. pH tertinggi terjadi pada inkubasi hari ke-0 sebesar 6,97 dan nilai pH terendah pada inkubasi 35 hari sebesar 5,97. Penurunan nilai pH umumnya diduga karena jamur pelapuk memiliki kemampuan untuk memproduksi asam-asam organik sehingga tingkat keasamannya tinggi (Liaud et al. 2014; Li et al. 2016). Namun, pada *P. chrysosporium*, tingginya tingkat keasaman kemungkinan disebabkan oleh penghilangan amonium dari garam amonium sulfat, yang digunakan sebagai sumber nitrogen, atau ekskresi ion  $\text{H}^+$  dari asimilasi  $\text{NH}_4^+$  (Liaud et al. 2014).

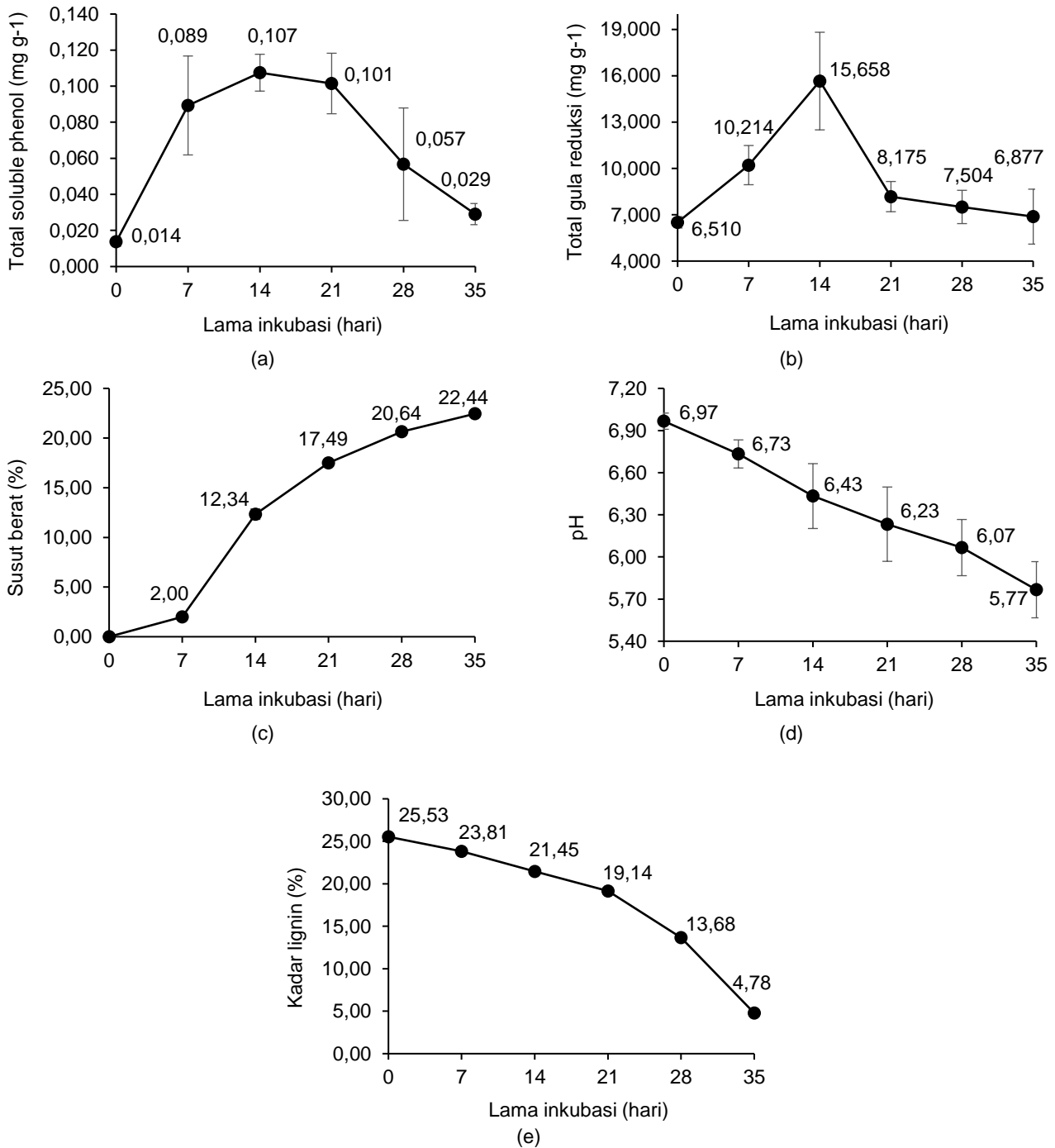
Persentase kadar lignin pada bagas tebu setelah degradasi lignoselulosa oleh jamur *P. chrysosporium* selama 35 hari inkubasi dapat dilihat pada Gambar 3e. Hasil menunjukkan persentase kadar lignin yang menurun selama inkubasi 35 hari. Persentase kadar lignin tertinggi terjadi pada inkubasi hari ke-0 sebesar 25,53% dan persentase kadar lignin terendah terjadi pada inkubasi 35 hari yaitu sebesar 4,78%. Hasil tersebut menunjukkan bahwa semakin lama waktu inkubasi maka semakin banyak lignin pada bagas tebu yang terdegradasi. Perubahan kandungan lignin pada substrat, menurut Mustabi et al. (2018) diduga terjadi akibat pemanfaatan struktur lignin untuk pertumbuhan jamur pelapuk putih. Mikroorganisme mampu mendegradasi lignin dalam proses pelapukan biomassa menjadi  $\text{CO}_2$  dan  $\text{H}_2\text{O}$ . Menurut Sun et al. (2016), persentase lignin yang semakin menurun seiring dengan lama waktu degradasi diduga karena lignin telah terdegradasi sehingga lignin yang ada pada biomassa lignoselulosa, dalam hal ini bagas tebu, berkurang dan semakin rendah persentasenya.

#### Optimasi ekstraksi vanillin

Optimasi ekstraksi vanillin hasil degradasi bagas tebu oleh *P. chrysosporium* dilakukan berdasarkan lama inkubasi

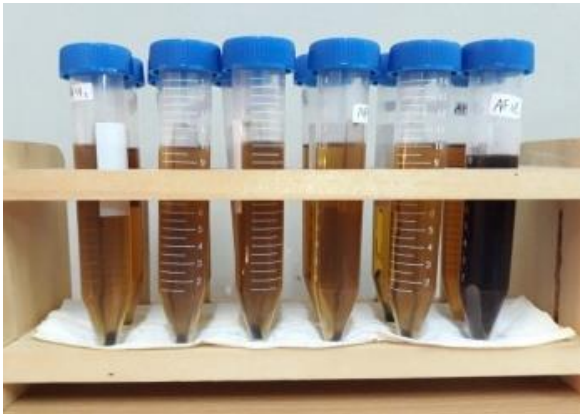
dengan rata-rata nilai TSP tertinggi, yaitu diperoleh pada waktu inkubasi 14 hari yakni sebesar 0,107 mg g<sup>-1</sup>. Selanjutnya lama inkubasi 14 hari digunakan sebagai lamanya inkubasi sampel untuk optimasi ekstraksi vanillin. Hasil ekstraksi dengan faktor pelarut etil asetat dan lama waktu ekstraksi berdasarkan rancangan pada *Design-Expert 11.1.2.0* dapat dilihat pada Gambar 4.

Kadar vanillin tertinggi diperoleh pada lama waktu ekstraksi 180 menit dengan *volume* pelarut etil asetat sebanyak 100 mL yaitu sebesar 0,0081% (Tabel 3). Sementara kadar vanillin terendah (0,0027%) diperoleh pada lama waktu ekstraksi 60 menit dengan *volume* pelarut etil asetat sebanyak 120 mL. Hasil pengolahan data menggunakan *Design Expert 11.1.2.0* didapatkan data *Fit Summary* penggunaan model yang terpilih adalah



**Gambar 3.** Pengaruh lama inkubasi (0-35 hari) terhadap parameter degradasi lignoselulosa hasil degradasi bagas tebu oleh jamur *P. chrysosporium*: (a) Total soluble phenol (TSP); (b) Total gula reduksi (TGR); (c) Susut berat; (d) pH; dan (e) Kadar lignin

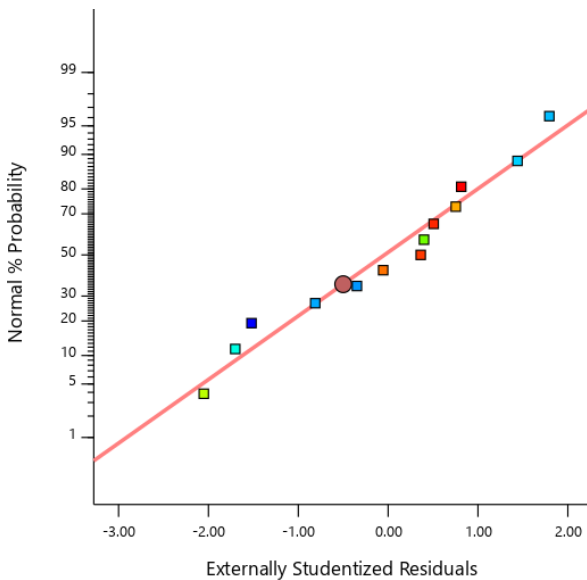




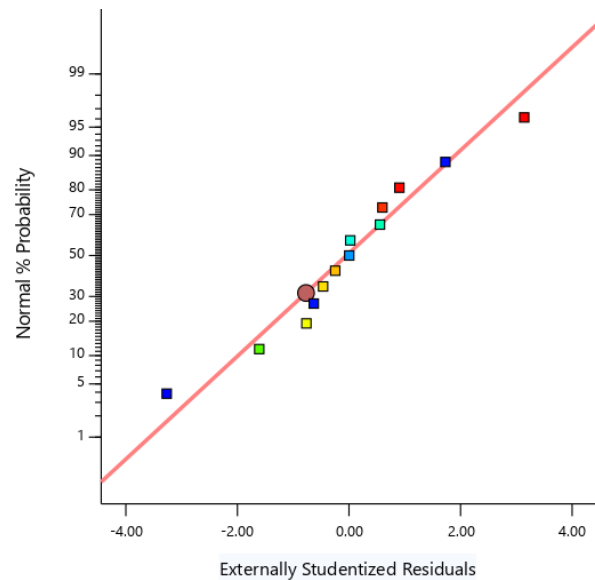
**Gambar 4.** Sampel hasil ekstraksi dengan perlakuan faktor volume pelarut etil asetat (mL) dan lama waktu ekstraksi (menit) sesuai rancangan *Design-Expert 11.1.2.0*

model kuadratik. Model tersebut memiliki nilai  $p = 0,0004$  yang signifikan ( $p < 0,05$ ) dan nilai  $F$  tertinggi sebesar 28,60 serta memiliki keterangan “*suggested*”. Model kuadratik juga memiliki nilai  $R^2$  tertinggi dibandingkan model lain yaitu 0,9195. Menurut Myers et al. (2016), model akan berpengaruh secara signifikan pada saat nilai  $F$  yang diperoleh tinggi dan nilai  $p$  yang rendah.

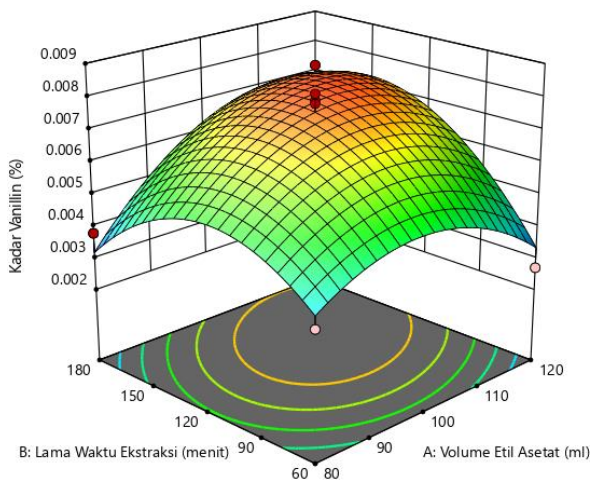
Hasil analisis ragam ANOVA diperoleh nilai  $p = 0,0010$  ( $p < 0,05$ ) yang menunjukkan bahwa model signifikan. Nilai  $p$ -value pada volume etil asetat adalah 0,0249 dan pada lama waktu ekstraksi adalah 0,0382 sehingga kedua faktor tersebut berpengaruh nyata terhadap respons kadar vanillin. Menurut Khoshnamvand et al. (2018), hasil



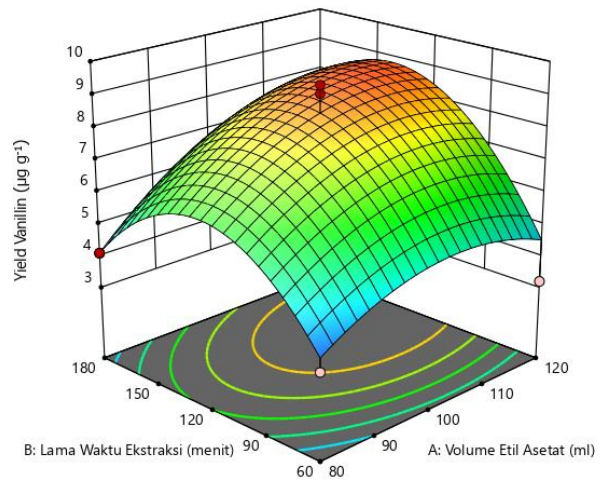
**Gambar 5.** Grafik *Normal Plot of Residual* kadar vanilin



**Gambar 7.** Grafik *Normal Plot of Residual* yield vanilin



**Gambar 6.** Kurva *Response Surface* Tiga Dimensi untuk hubungan faktor volume pelarut etil asetat dan lama waktu ekstraksi terhadap respon kadar vanilin



**Gambar 8.** Kurva *Response Surface* Tiga Dimensi untuk hubungan faktor volume pelarut etil asetat dan lama waktu ekstraksi terhadap respon yield vanilin

didefinisikan signifikan secara statistik jika nilai  $p$  lebih rendah dari 0,05. Semakin kecil nilai  $p$ , maka model dikatakan semakin baik. Nilai *lack of fit* sebesar 0,3292 yang lebih besar dari 0,05 ( $p > 0,05$ ) artinya ketidaktepatan model kuadratik bersifat tidak signifikan atau tepat untuk digunakan dan dapat jelaskan suatu permasalahan dari suatu analisis yang dikaji. Menurut Jibril et al. (2019), uji *lack of fit* menentukan kecukupan model yang dipilih untuk menggambarkan variasi dalam data eksperimen di sekitar model. Persamaan regresi model kuadratik yang terpilih terhadap respons kadar vanillin ditunjukkan pada persamaan (3).

$$Y_1 = 75 \times 10^{-4} + (8 \times 10^{-4})X_1 + (7 \times 10^{-4})X_2 - (11 \times 10^{-4})X_1X_2 - (14 \times 10^{-4})X_1^2 - (18 \times 10^{-4})X_2^2 \quad (3)$$

Dimana:

- $Y_1$  = Variabel Respons Kadar Vanillin (%)
- $X_1$  = Faktor *Volume* Etil Asetat (mL)
- $X_2$  = Faktor Lama waktu ekstraksi (menit)

Distribusi data yang diperoleh dapat dilihat pada grafik normal plot pada Gambar 5, sedangkan pengaruh interaksi *volume* etil asetat dan lama waktu ekstraksi terhadap kadar vanillin digambarkan pada kurva permukaan respons yang ditunjukkan pada Gambar 6. Berdasarkan grafik Gambar 5 diketahui bahwa data untuk masing-masing kombinasi perlakuan terletak menyebar di sekitar garis lurus. Hasil tersebut menunjukkan bahwa residu untuk respons kadar vanillin mengikuti distribusi normal dengan hamburan yang tidak jauh dari garis lurus (hamburan sedang).

Sementara itu dari kurva pada Gambar 6 diketahui bahwa terdapat 5 wilayah dengan warna yang berbeda, dimana semakin pekat warna merah pada kurva maka kadar vanillin semakin tinggi. Sebaliknya, semakin pekat warna biru pada kurva maka semakin rendah kadar vanillin yang dihasilkan. Garis yang melingkar pada gambar kontur plot menunjukkan nilai respons kadar vanillin grafik yang dihasilkan berbentuk kuadratik. Gambar kurva memiliki bentuk menyerupai parabola terbalik atau terbuka ke bawah. Hal ini menunjukkan bahwa adanya nilai kadar vanillin optimal pada bagian puncak sebelum akhirnya menurun. Posisi nilai kadar vanillin minimal ditunjukkan pada permukaan paling rendah dibandingkan lainnya.

Data pada Tabel 3 menunjukkan hubungan antara *volume* pelarut etil asetat (mL) dan lama waktu ekstraksi (menit) terhadap *yield* vanillin. Berdasarkan penelitian yang telah dilakukan, *yield* vanillin tertinggi diperoleh sebesar 9,341  $\mu\text{g g}^{-1}$  pada ekstraksi selama 120 menit dengan *volume* pelarut etil asetat 128,28 mL. *Yield* vanillin terendah diperoleh yaitu sebesar 3,190  $\mu\text{g g}^{-1}$  dengan ekstraksi selama 60 menit dengan *volume* pelarut etil asetat 120 mL. Hasil pengolahan data menggunakan *Design Expert 11.1.2.0* didapatkan *fit summary* penggunaan model yang terpilih adalah model kuadratik karena model memiliki nilai  $p = 0,0011$  yang signifikan ( $p < 0,05$ ) dan memiliki nilai  $F$  tertinggi yaitu 21,09 dan nilai  $R^2$  sebesar 0,8943.

Hasil analisis ragam ANOVA diperoleh nilai  $p$ -value sebesar 0,0026 ( $p < 0,05$ ) menunjukkan model yang diperoleh adalah signifikan. Sementara nilai  $p$ -value *volume* etil asetat adalah sebesar 0,0190 dan  $p$ -value lama waktu ekstraksi adalah 0,0443 sehingga kedua faktor tersebut dapat dikatakan berpengaruh nyata (signifikan) terhadap respons *yield* vanillin. Nilai *lack of fit* sebesar 0,1047 yang lebih besar dari 0,05 ( $p > 0,05$ ) artinya ketidaktepatan model kuadratik bersifat tidak signifikan atau tepat untuk digunakan dan dapat menjelaskan suatu permasalahan dari suatu analisis yang dikaji. Persamaan regresi model kuadratik yang terpilih terhadap respons *yield* vanillin ditunjukkan pada persamaan (4).

$$Y_2 = 845 \times 10^{-2} + (111 \times 10^{-2})X_1 + (89,13 \times 10^{-2})X_2 - (70,25 \times 10^{-2})X_1X_2 - (99,69 \times 10^{-2})X_1^2 - (244 \times 10^{-2})X_2^2 \quad (4)$$

Dimana:

- $Y_2$  = Variabel Respons *Yield* Vanillin ( $\mu\text{g g}^{-1}$ )
- $X_1$  = Faktor *Volume* Etil Asetat (mL)
- $X_2$  = Faktor Lama waktu ekstraksi (menit)

Gambar 7 menunjukkan grafik normal plot untuk distribusi data respon *yield* vanillin yang diperoleh. Berdasarkan grafik pada Gambar 7 diketahui bahwa data untuk masing-masing kombinasi perlakuan, *volume* etil asetat dan lama waktu ekstraksi, terletak menyebar di sekitar garis lurus. Hasil tersebut menunjukkan bahwa residu untuk respons *yield* vanillin mengikuti distribusi normal dengan hamburan sedang, yang tidak jauh dari garis lurus.

**Tabel 4.** Batas optimasi respon kadar vanilin dan yield vanilin dari kombinasi faktor volume etil asetat dan lama waktu ekstraksi

Kriteria	Nama (Satuan)	Target	Batas		Tingkat Kepentingan
			Bawah	Atas	
Faktor	Volume etil asetat (mL)	<i>in Range</i>	80	120	3
	Lama waktu ekstraksi (menit)	<i>in Range</i>	60	180	3
Respon	Kadar vanillin (%)	<i>Maximize</i>	0,0027	0,0081	3
	Yield vanillin ( $\mu\text{g g}^{-1}$ )	<i>Maximize</i>	3,19	9,341	3

Keterangan:

1. Sangat tidak penting; 2. Tidak penting; 3. Penting; 4. Lebih penting; dan 5. Sangat penting

**Tabel 5.** Solusi optimal respon kadar vanilin dan yield vanilin dari kombinasi faktor perlakuan volume etil asetat dan lama waktu ekstraksi hasil komputasi *Design-Expert* 11.1.2.0

Parameter	Standar Prediksi
Volume pelarut etil asetat (mL)	109,730
Lama waktu ekstraksi (menit)	137,302
Kadar vanilin (%)	0,0078
Yield vanillin ( $\mu\text{g g}^{-1}$ )	8,9089
<i>Desirability</i>	0,934
Keterangan	<i>Selected</i>

Selanjutnya, Gambar 8 menunjukkan kurva permukaan respons yang menggambarkan pengaruh interaksi *volume* etil asetat dan lama waktu ekstraksi terhadap kadar vanillin. Berdasarkan kurva pada Gambar 8 diketahui terdapat warna yang berbeda, dimana semakin mendekati warna merah maka *yield* vanillin semakin tinggi, sebaliknya jika semakin mendekati warna biru maka *yield* vanillin semakin rendah. Kurva yang menyerupai parabola terbalik, menunjukkan adanya nilai *yield* vanillin optimal pada bagian puncak sebelum akhirnya menurun. Posisi *yield* vanillin minimal ditunjukkan pada permukaan paling rendah dibandingkan lainnya.

#### Solusi optimal pada desain komposit terpusat

Optimasi yang dilakukan bertujuan untuk mengoptimalkan nilai respons berupa kadar vanillin dan *yield* vanillin berdasarkan batasan-batasan faktor yang telah ditentukan yaitu *volume* pelarut etil asetat dan lama waktu ekstraksi. Nilai ideal pada respons kadar vanillin dan *yield* vanillin dipilih maksimal dikarenakan semakin tinggi nilai kadar vanillin maka hasil yang didapatkan semakin banyak. Terdapat batas bawah dan batas atas untuk masing-masing faktor. Berdasarkan rancangan percobaan, pada

faktor *volume* pelarut etil asetat, batas bawah yang digunakan sebesar 80 mL dan batas atas sebesar 120 mL. Sementara pada faktor lama waktu ekstraksi, batas bawah yang digunakan sebesar 60 menit dan batas atas 180 menit. Batas-batas optimasi faktor (lama waktu ekstraksi dan volume pelarut etil asetat) dan respons (kadar vanillin dan *yield* vanillin) dapat dilihat pada Tabel 4.

Berdasarkan batas-batas optimasi dari Tabel 4, diperoleh solusi optimal hasil komputasi menggunakan *Design-Expert* 11.1.2.0 yang dapat dilihat pada Tabel 5. Solusi optimal pada Tabel 5 menunjukkan kombinasi perlakuan dari *volume* pelarut etil asetat 109,730 mL dan lama waktu ekstraksi 137,302 menit akan menghasilkan kadar vanillin 0,0078% dan *yield* vanillin 8,9089  $\mu\text{g g}^{-1}$ . Nilai *desirability* (ketepatan) sebesar 0,934 yang berarti semakin mendekati 1 menunjukkan kemampuan program untuk mencapai solusi optimum yang diinginkan. Titik optimum masing-masing variabel merupakan titik stasioner yang diduga merupakan respons optimum. Namun hasil solusi optimal tersebut memiliki kadar vanillin dan *yield* vanillin yang tergolong rendah. Metode dan proses ekstraksi yang digunakan diduga berpengaruh terhadap hasil vanillin yang diperoleh, di mana pada penelitian ini menggunakan metode ekstraksi dengan *waterbath shaker*. Jika dibandingkan dengan metode ekstraksi yang lain, metode ekstraksi yang digunakan pada penelitian ini masih belum optimum untuk ekstraksi vanillin dari biomassa lignoselulosa. Penelitian Rasoamandary et al. (2013) menunjukkan perbandingan penggunaan metode ekstraksi vanillin dari biji vanili dengan menggunakan *ultrasound-assisted extraction* dan *hot waterbath shaker* dimana metode *ultrasound-assisted extraction* lebih efektif untuk digunakan. Hasil vanillin yang diperoleh dengan lama waktu ekstraksi optimum

**Tabel 6.** Perbandingan antara hasil validasi dan solusi optimal *Design Expert* 11.1.2.0

Parameter	Prediksi (*)	Hasil Verifikasi (**)	Selisih	Simpangan (%)
Kadar Vanillin (%)	0,0078	0,0077	0.0001	1,282
Yield vanillin ( $\mu\text{g g}^{-1}$ )	8,9089	8,8905	0.0184	0,206

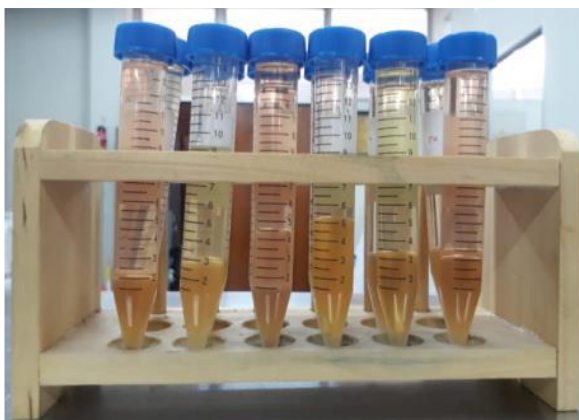
\*Hasil dari program *Design Expert* 11.1.2.0

\*\*Data hasil validasi

selama 1 jam adalah  $471,2 \pm 9$  ppm atau  $0,04712 \pm 0,0009\%$ . Dong et al. (2014) yang membandingkan metode maserasi, *ultrasound-assisted extraction*, *pressure-assisted extraction*, dan *microwave-assisted extraction*, diperoleh metode terbaik untuk ekstraksi vanillin adalah *microwave-assisted extraction*. Yield vanillin yang optimal diperoleh pada rasio sampel dan pelarut terbaik rasio 4 g/100 mL untuk ekstraksi vanillin. Selain metode ekstraksi yang digunakan, jenis bahan lignoselulosa juga berpengaruh terhadap hasil vanillin karena perbedaan kandungan lignoselulosa pada masing-masing bahan berbeda.

### Validasi solusi optimal

Validasi kadar vanillin dan *yield* vanillin dilakukan untuk memastikan hasil prediksi solusi optimal dari masing-masing variabel sesuai dengan hasil yang sesungguhnya. Validasi dilakukan dengan ekstraksi sesuai kombinasi perlakuan optimal dari *volume* pelarut etil asetat dan lama waktu ekstraksi, yaitu masing-masing 109,730 mL dan 137,302 menit. Sampel hasil ekstraksi untuk validasi tersebut dapat dilihat pada Gambar 9. Hasil validasi diperoleh kadar vanillin 0,0077% dan *yield* vanillin  $8,8905 \mu\text{g g}^{-1}$  (5,32



**Gambar 9.** Sampel hasil ekstraksi untuk validasi solusi optimal dengan faktor volume pelarut etil asetat (mL) dan lama waktu ekstraksi (menit)

$\times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ ). Hasil validasi kemudian dibandingkan dengan hasil solusi optimal yang diperoleh dari *Design Expert 11.1.2.0* dan dilihat pada Tabel 6. Hasil tersebut sudah sesuai karena hasil validasi tidak berbeda jauh dengan hasil prediksi dengan perbedaan kurang dari 5%. Menurut Sugiono (2015), besarnya simpangan untuk pengukuran kecermatan antara nilai validasi dengan nilai prediksi harus bernilai kurang atau sama dengan 5%. Hasil validasi untuk semua respons berada dalam rentang prediksi sehingga dianggap memenuhi syarat perhitungan prediksi secara komputasi. Menurut Khoshnamvand et al. (2018), hasil validasi solusi optimal sesuai dengan efisiensi yang diprediksi menunjukkan bahwa model tersebut memadai untuk optimalisasi variabel.

### KESIMPULAN

Lama inkubasi berpengaruh terhadap degradasi lignoselulosa bagas tebu oleh jamur *P. chrysosporium*. Nilai rata-rata TSP tertinggi pada inkubasi ke-14 hari sebesar  $0,107 \text{ mg g}^{-1}$ . Nilai rata-rata TGR tertinggi juga pada inkubasi ke-14 hari, sedangkan susut berat bahan dan pH mengalami penurunan setiap minggunya. Hasil analisis kadar lignin menunjukkan penurunan persentase lignin pada setiap minggunya, hingga menjadi 81,27% pada hari ke-35. Lama inkubasi terbaik untuk proses ekstraksi vanillin berdasarkan nilai TSP tertinggi adalah pada inkubasi selama 14 hari. Hasil analisis *Design Expert* menunjukkan *volume* pelarut etil asetat dan lama waktu ekstraksi berpengaruh terhadap respons kadar vanillin dan *yield* vanillin dengan model kuadratik. Solusi optimal diperoleh kombinasi perlakuan *volume* pelarut etil asetat 109,730 mL dan lama waktu ekstraksi 137,302 menit dengan standar prediksi akan didapatkan kadar vanillin sebesar 0,0078% dan *yield* vanillin sebesar  $8,9089 \mu\text{g g}^{-1}$ . Hasil validasi solusi

optimal yang dilakukan menghasilkan kadar vanillin dan *yield* vanillin berturut-turut sebesar 0,0077% dan 8,8905  $\mu\text{g g}^{-1}$  ( $5,32 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ ). Hasil yang diperoleh tersebut cenderung lebih rendah jika dibandingkan dengan penelitian sejenis lainnya dengan metode ekstraksi yang berbeda.

## UCAPAN TERIMA KASIH

Ucapan terimakasih ditujukan kepada Kementerian Riset dan Teknologi / Badan Riset dan Inovasi Nasional, yang telah memberikan pendanaan melalui Hibah Penelitian PTUPT tahun 2019-2020.

## DAFTAR PUSTAKA

- Amin FR, Khalid H, Zhang H, Rahman SU, Zhang R, Liu G, Chen C (2017) Pretreatment methods of lignocellulosic biomass for anaerobic digestion. *AMB Express* 7: 72. doi: 10.1186/s13568-017-0375-4
- Andlar M, Rezić T, Marđetko N, Kracher D, Ludwig R, Šantek B (2018) Lignocellulose degradation: An overview of fungi and fungal enzymes involved in lignocellulose degradation. *Eng Life Sci* 18: 768–778. doi: 10.1002/elsc.201800039
- Arantes V, Jellison J, Goodell B (2012) Peculiarities of brown-rot fungi and biochemical Fenton reaction with regard to their potential as a model for bioprocessing biomass. *Appl Microbiol Biotechnol* 94: 323–338. doi: 10.1007/s00253-012-3954-y
- Arif S, Batool A, Nazir W, Khan RS, Khalid N (2019) Physiochemical characteristics nutritional properties and health benefits of sugarcane juice. *Non-Alcoholic Beverages* 6: 227–257. doi: 10.1016/B978-0-12-815270-6.00008-6
- Barbosa EDS, Perrone D, Vendramini AA, Leite SGF (2008) Vanillin production by *Phanerochaete chrysosporium* grown on green coconut agro-industrial husk in solid state fermentation. *BioResources* 3: 1042–1050. doi: 10.15376/biores.3.4.1042-1050
- Chandel AK, da Silva SS, Carvalho W, Singh OV (2011) Sugarcane bagasse and leaves: Foreseeable biomass of biofuel and bio-products. *J Chem Technol Biotechnol* 87: 11–20. doi: 10.1002/jctb.2742
- Chandra P, Arora DS, Pal M, Sharma RK (2019) Antioxidant potential and extracellular auxin production by white rot fungi. *Appl Biochem Biotechnol* 187: 531–539. doi: 10.1007/s12010-018-2842-z
- Cheavegatti-Gianotto A, de Abreu HMC, Arruda P, Bessalho Filho JC, Burnquist WL, Creste S, di Ciero L, Ferro JA, de Oliveira Figueira AV, de Sousa Filgueiras T, Grossi-de-Sá MDF, Guzzo EC, Hoffmann HP, de Andrade Landell MG, Macedo N, Matsuoka S, de Castro Reinach F, Romano E, da Silva WJ, de Castro Silva Filho M, César Ulian E (2011) Sugarcane (*Saccharum × officinarum*): A reference study for the regulation of genetically modified cultivars in Brazil. *Trop Plant Biol* 4: 62–89. doi: 10.1007/s12042-011-9068-3
- Datta R (1981) Acidogenic fermentation of lignocellulose—acid yield and conversion of components. *Biotechnol Bioeng* 23: 2167–2170. doi: 10.1002/bit.260230921
- Dong Z, Gu F, Xu F, Wang Q (2014) Comparison of four kinds of extraction techniques and kinetics of microwave-assisted extraction of vanillin from *Vanilla planifolia* Andrews. *Food Chem* 149: 54–61. doi: 10.1016/j.foodchem.2013.10.052
- Eisenhuber K, Krennhuber K, Steinmüller V, Jäger A (2013) Comparison of different pre-treatment methods for separating hemicellulose from straw during lignocellulose bioethanol production. *Energy Procedia* 40: 172–181. doi: 10.1016/j.egypro.2013.08.021
- Falade AO, Nwodo UU, Iweriebor BC, Green E, Mabinya LV, Okoh AI (2016) Lignin peroxidase functionalities and prospective applications. *Microbiol Open* 6: e00394. doi: 10.1002/mbo3.394
- Frey-Klett P, Burlinson P, Deveau A, Barret M, Tarkka M, Sarniguet A (2011) Bacterial-fungal interactions: Hyphens between agricultural, clinical, environmental, and food microbiologists. *Microbiol Mol Biol Rev* 75: 583–609. doi: 10.1128/mmbr.00020-11

- Gajendiran A, Krishnamoorthy S, Abraham J (2016) Microbial degradation of low-density polyethylene (LDPE) by *Aspergillus clavatus* strain JASK1 isolated from landfill soil. *3 Biotech* 6: 52. doi: 10.1007/s13205-016-0394-x
- Gallage NJ, Møller BL (2015) Vanillin–bioconversion and bioengineering of the most popular plant flavor and its *de novo* biosynthesis in the vanilla orchid. *Mol Plant* 8: 40–57. doi: 10.1016/j.molp.2014.11.008
- Gu F, Xu F, Tan L, Wu H, Chu Z, Wang Q (2012) Optimization of enzymatic process for vanillin extraction using response surface methodology. *Molecules* 17: 8753–8761. doi: 10.3390/molecules17088753
- Hartati I, Ardi PRR, Milzam M, Paramita V (2019) Economic factor on the *in situ* vanillin enzymatic formation from the green pods vanilla. *J Vocat Stud Appl Res* 1: 26–29. doi: 10.14710/jvsar.1.1.2019.26-29
- Haruta S, Kanno N (2015) Survivability of microbes in natural environments and their ecological impacts. *Microbes Environ* 30: 123–125. doi: 10.1264/jsme2.ME3002rh
- Hermanto BM, Noor E, Arkeman Y, Riani E (2019) Analisis kelayakan produksi silikon dari abu ampas tebu. *J Nat Resour Environ Manag* 9: 818–825. doi: 10.29244/jpsl.9.3.818-825
- Ibrahim AG, EL-Gamdi LSYA (2019) Characterization of fungi that able to degrade phenol from different contaminated areas in Saudi Arabia. *J Biol Sci* 19: 210–217. doi: 10.3923/jbs.2019.210.217
- Isola C, Sieverding HL, Numan-Al-Mobin AM, Rajappagowda R, Boakye EA, Raynie DE, Smirnova AL, Stone JJ (2018) Vanillin derived from lignin liquefaction: A sustainability evaluation. *Int J Life Cycle Assess* 23: 1761–1772. doi: 10.1007/s11367-017-1401-0
- Ivanova V, Vojnoski B, Stefova M (2012) Effect of winemaking treatment and wine aging on phenolic content in Vranec wines. *J Food Sci Technol* 49: 161–172. doi: 10.1007/s13197-011-0279-2
- Janusz G, Pawlik A, Sulej J, Świdarska-Burek U, Jarosz-Wilkolazka A, Paszczyński A (2017) Lignin degradation: Microorganisms, enzymes involved, genomes analysis and evolution. *FEMS Microbiol Rev* 41: 941–962. doi: 10.1093/femsre/fux049
- Jibril S, Basar N, Sirat HM, Abdul Wahab R, Mahat NA, Nahar L, Sarker SD (2019) Application of Box–Behnken design for ultrasound-assisted extraction and recycling preparative HPLC for isolation of anthraquinones from *Cassia singueana*. *Phytochem Anal* 30: 101–109. doi: 10.1002/pca.2795
- Kadarohman A, Siti HH, Fareza MS (2010) Konversi dan karakterisasi isoeugenol asetat menjadi vanillin asetat. *J Sains Teknol Kim* 1: 177–181
- Khoshnamvand N, Kord Mostafapour F, Mohammadi A, Faraji M (2018) Response surface methodology (RSM) modeling to improve removal of ciprofloxacin from aqueous solutions in photocatalytic process using copper oxide nanoparticles (CuO/UV). *AMB Express* 8: 48. doi: 10.1186/s13568-018-0579-2
- Kumar KK, Kumar AAA, Ahmad R, Adhikari S, Variyar PS, Sharma A (2010) Effect of gamma-radiation on major aroma compounds and vanillin glucoside of cured vanilla beans (*Vanilla planifolia*). *Food Chem* 122: 841–845. doi: 10.1016/j.foodchem.2010.03.006
- Lalak J, Kasprzycka A, Martyniak D, Tys J (2016) Effect of biological pretreatment of *Agropyron elongatum* “BAMAR” on biogas production by anaerobic digestion. *Bioresour Technol* 200: 194–200. doi: 10.1016/j.biortech.2015.10.022
- Li Z, Bai T, Dai L, Wang F, Tao J, Meng S, Hu Y, Wang S, Hu S (2016) A study of organic acid production in contrasts between two phosphate solubilizing fungi: *Penicillium oxalicum* and *Aspergillus niger*. *Sci Rep* 6: 25313. doi: 10.1038/srep25313
- Liaud N, Giniés C, Navarro D, Fabre N, Crapart S, Herpoel-Gimbert I, Levasseur A, Raouche S, Sigoillot JC (2014) Exploring fungal biodiversity: Organic acid production by 66 strains of filamentous fungi. *Fungal Biol Biotechnol* 1: 1. doi: 10.1186/s40694-014-0001-z



- Listarina (2012) Sintesis vanilil butil eter dari vanillin cap X. Skirpsi, Universitas Indonesia
- Lun OK, Wai TB, Ling LS (2014) Pineapple cannery waste as a potential substrate for microbial biotransformation to produce vanillic acid and vanillin. *Int Food Res J* 21: 953–958. Corpus ID: 41350146
- Madadi M, Abbas A (2017) Lignin degradation by fungal pretreatment: A review. *J Plant Pathol Microbiol* 8: 398. doi: 10.4172/2157-7471.1000398
- Manavalan T, Manavalan A, Heese K (2015) Characterization of lignocellulolytic enzymes from white-rot fungi. *Curr Microbiol* 70: 485–498. doi: 10.1007/s00284-014-0743-0
- Miller GL (1959) Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Anal Chem* 31: 426–428. doi: 10.1021/ac60147a030
- Mota MIF, Pinto PCR, Loureiro JM, Rodrigues AE (2016) Recovery of vanillin and syringaldehyde from lignin oxidation: A review of separation and purification processes. *Sep Purif Rev* 45: 227–259. doi: 10.1080/15422119.2015.1070178
- Mustabi J, Wedawati, Armayanti AK (2018) Improving quality and digestibility of cocoa pod with white rot fungi. *IOP Conf Ser: Earth Environ Sci* 157: 012002. doi: 10.1088/1755-1315/157/1/012002
- Myers RH, Montgomery DC, Anderson-Cook CM (2016) *Response Surface Methodology: Process and product optimization using designed experiments*, 4th Ed. Wiley & Sons Inc, New Jersey, USA
- Nofu K, Khotimah S, Lovadi I (2014) Isolasi dan karakteristik bakteri pendegradasi selulosa pada ampas tebu kuning (*bagasse*). *J Probiot* 3: 25–33
- Nottingham AT, Hicks LC, Ccahuana AJQ, Salinas N, Bååth E, Meir P (2018) Nutrient limitations to bacterial and fungal growth during cellulose decomposition in tropical forest soils. *Biol Fertil Soils* 54: 219–228. doi: 10.1007/s00374-017-1247-4
- Becerra P, Acevedo P, Gonzalez L, Ortiz N, Cabeza I (2018) Sustainability evaluation of sugarcane bagasse valorization alternatives in Valle del Cauca - Colombia. *Chem Eng Trans* 65: 817–822. doi: 10.3303/CET1865137
- Paramita V, Yulianto ME (2019) Response surface analysis on the microwave integrated-rumen based extraction of natural vanillin from cured vanilla pods. *J Phys Conf Ser* 1295: 012016. doi: 10.1088/1742-6596/1295/1/012016
- Pitt JI, Hocking AD (2009) *Fungi and Food Spoilage*. Springer, New York, USA. doi: 10.1007/978-0-387-92207-2
- Rasoamandrary N, Fernandes AM, Bashari M, Masamba K, Xueming X (2013) Improved extraction of vanillin 4-hydroxy-3-methoxybenzaldehyde from cured vanilla beans using ultrasound-assisted extraction: A comparison of ultrasound-assisted and hot water bath extraction. *Akademik Gida* 11: 6–12
- Sciubba L, Di Gioia D, Fava F, Gostoli C (2009) Membrane-based solvent extraction of vanillin in hollow fiber contactors. *Desalination* 241: 357–364. doi: 10.1016/j.desal.2007.10.104
- Shu M, Man Y, Ma H, Luan F, Liu H, Gao Y (2016) Determination of vanillin in milk powder by capillary electrophoresis combined with dispersive liquid-liquid microextraction. *Food Anal Methods* 9: 1706–1712. doi: 10.1007/s12161-015-0347-8
- Sigoillot JC, Berrin JG, Bey M, Lesage-Meessen L, Lévassieur A, Lomascolo A, Record E, Uzan-Boukhris E (2012) Fungal strategies for lignin degradation. In: Jouanin L, Lapiere C (Ed.), *Advances in Botanical Research*. Elsevier Ltd, Amsterdam, hal. 263–308. doi: 10.1016/B978-0-12-416023-1.00008-2
- Singleton VL, Rossi JA (1965) Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. *Am J Enol Vitic* 16: 144–158
- Solomon S (2011) Sugarcane by-products based industries in India. *Sugar Tech* 13: 408–416. doi: 10.1007/s12355-011-0114-0
- Su Y, Yu X, Sun Y, Wang G, Chen H, Chen G (2018) Evaluation of screened lignin-degrading fungi for the biological pretreatment of corn stover. *Sci Rep* 8: 5385. doi: 10.1038/s41598-018-23626-6
- Sugiono (2015) Isolasi dan karakterisasi fukoidan dari alga coklat *Sargassum sp.*

- Agrosains 2: 96–107
- Sun S, Sun S, Cao X, Sun R (2016) The role of pretreatment in improving the enzymatic hydrolysis of lignocellulosic materials. *Bioresour Technol* 199: 49–58. doi: 10.1016/j.biortech.2015.08.061
- Supriya C, Neehar D (2014) Biodegradation of phenol by *Aspergillus niger*. *IOSR J Pharm* 4: 11–17
- Yakin EA, Bachruddin Z, Utomo R, Millati R (2017) Effect of lignoselulolitic fungus to enzymatic activity, fiber fraction, and digestibility on fermentation process of cocoa pod. *Bul Peternak* 41: 250–256. doi: 10.21059/buletinpeternak.v41i3.22657
- Yusuf M, Sarjiyah S, Mulyono M (2018) Effects of appropriate composition of sugarcane bagasse compost and nitrogen fertilizer on the growth and yield of soybean (*Glycine max* L. Merrill). *Adv Eng Res* 172: 126–132. doi: 10.2991/fanres-18.2018.25
- Zanchetta A, dos Santos ACF, Ximenes E, da Costa Carreira Nunes C, Boscolo M, Gomes E, Ladisch MR (2018) Temperature dependent cellulase adsorption on lignin from sugarcane bagasse. *Bioresour Technol* 252: 143–149. doi: 10.1016/j.biortech.2017.12.061
- Zhang H, Huang S, Wei W, Zhang J, Xie J (2019) Investigation of alkaline hydrogen peroxide pretreatment and Tween 80 to enhance enzymatic hydrolysis of sugarcane bagasse. *Biotechnol Biofuels* 12: 107. doi: 10.1186/s13068-019-1454-3
- Zhang S, Jiang M, Zhou Z, Zhao M, Li Y (2012) Selective removal of lignin in steam-exploded rice straw by *Phanerochaete chrysosporium*. *Int Biodeter Biodegr* 75: 89–95. doi: 10.1016/j.ibiod.2012.09.003
- Zhang Y, Mo L, Chen F, Lu M, Dong W, Wang Q, Xu F, Gu F (2014) Optimized production of vanillin from green vanilla pods by enzyme-assisted extraction combined with pre-freezing and thawing. *Molecules* 19: 2181–2198. doi: 10.3390/molecules19022181
- Zheng Y, Zhao J, Xu F, Li Y (2014) Pretreatment of lignocellulosic biomass for enhanced biogas production. *Prog Energy Combust Sci* 42: 35–53. doi: 10.1016/j.peccs.2014.01.001
- Zhu H, Zhang Y, Tian J, Chu Z (2018) Effect of a new shell material-Jackfruit seed starch on novel flavor microcapsules containing vanilla oil. *Ind Crops Prod* 112: 47–52. doi: 10.1016/j.indcrop.2017.10.060