

KESTABILAN AKTIVITAS ANTIBAKTERI HASIL FERMENTASI MOLASE OLEH *STREPTOMYCES RIMOSUS* ATCC 33022

Sri Handayani*, Krisanti Yuwati* dan A.T. Karossi**

* Jurusan Kimia, FMIPA, Universitas Indonesia, Kampus Depok

** Puslitbang Kimia Terapan - LIPI, Jl. Cicitu Sangkuriang, Bandung 40135

INTISARI

Molase dapat digunakan sebagai sumber karbon bersama-sama dengan $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ sebagai sumber nitrogen, dalam media fermentasi untuk memproduksi antibakteri menggunakan *S.rimosus* ATCC 33022. Selama proses fermentasi diamati harga pH, biomassa, dan aktivitas antibakteri menggunakan *Bacillus cereus* sebagai mikroba penguji. Dari hasil penelitian ini diketahui bahwa produksi antibakteri dimulai pada periode inkubasi 48 jam dan mencapai harga maksimum pada periode 144 jam. Proses isolasi antibakteri dilakukan dengan cara ekstraksi menggunakan *n*-butanol teknis dan HCl 0,1 N. Pemurnian dilakukan dengan cara rekristalisasi menggunakan etanol sebagai pelarut. Hasil yang diperoleh 50,278 mg antibakteri/liter media fermentasi. Dari pengujian dengan spektroskopi ultraviolet didapatkan bahwa antibakteri hasil isolasi mempunyai λ_{max} pada 266 nm dan untuk oksitetrasiklin hidroklorida standar λ_{max} pada 267 nm dengan harga E_0 1,8529. $10^4 \text{ cm}^{-1} \text{ M}^{-1}$. Harga R_f hasil analisis dengan kromatografi lapisan tipis, dengan menggunakan tiga macam eluen, adalah 0,76; 0,65 dan 0,77 untuk antibakteri hasil isolasi dan 0,76; 0,64 dan 0,75 untuk oksitetrasiklin standar. Analisis dengan menggunakan HPLC pada kolom μ -bondapak C-18 dengan eluen campuran metanol -asetonitril - asam oksalat 0,1 M (1 : 1,5 : 7) menunjukkan bahwa antibakteri hasil isolasi dan oksitetrasiklin standar mempunyai waktu retensi yang sama yakni 4,35 menit. Dari analisis dengan spektroskopi infra merah, antibakteri hasil isolasi menunjukkan puncak serapan yang mirip dengan standar, yaitu pada bilangan gelombang 3400, 1650 - 1600, 1238, dan 2916 - 2848 cm^{-1} . Puncak-puncak tersebut menunjukkan adanya gugus fenol, amida, amina, dan gugus metil. Pengujian aktivitas antibakteri hasil isolasi yang disimpan dalam berbagai konsentrasi HCl menunjukkan bahwa, pada pelarut HCl 0,1 N antibakteri mempunyai aktivitas terbesar. Keadaan ini berlaku baik pada suhu penyimpanan 4 °C maupun -12°C.

ABSTRACT

Molases and ammonium sulfate can be used as medium component to supply carbon and nitrogen respectively for production of antibacterial, through fermentation by *S.rimosus* ATCC 33022. During fermentation, pH, biomass and antibacterial activity against *Bacillus cereus* were observed. The results of this investigation indicated that the antibacterial production started after 48 hours of incubation and the maximum production was achieved after 144 hours of incubation. The antibacterial agent was extracted with *n*-butanol of technical grade and HCl 0.1 N and purification was carried out by

recrystallization with ethanol as the solvent. The yield was 50.278 mg antibacterial agent per litre of fermentation medium. The isolated antibacterial compound possesses λ_{max} of 266 nm whereas the oxytetracycline demonstrated maximum peak at 267nm with E_0 1.8529 $\times 10^4 \text{ cm}^{-1} \text{ M}^{-1}$. Thin layer chromatography with three eluents of the standard oxytetracycline gave R_f of 0.76; 0.64 and 0.75 while the isolated compound gave 0.76; 0.65 and 0.77 for the respective eluent. HPLC analysis on μ -bondapak C-18 column with methanol-acetonitrile-oxalic acid 0.1 M (1 : 1.5 : 7) being the solvent indicated that the isolated antibacterial agent and oxytetracycline standard were eluted at 4.35 minutes. Further analysis with FTIR of both isolated antibacterial agent and oxytetracycline standard had peaks at 3400, 1650-1600, 1238 and 2916-2848 cm^{-1} indicating the presence of phenol, amide, amine and methyl groups. Antimicrobial activity tests during storage at 4 °C and -12 °C of the isolated compound in various HCl solutions showed that HCl 0.1 N gave the best stability.

PENDAHULUAN

Di Indonesia, seperti di negara berkembang pada umumnya, penyakit yang disebabkan oleh infeksi mikroba masih menduduki persentase yang tinggi. Sampai saat ini, untuk menanggulangi hal tersebut obat yang efektif digunakan adalah antibiotika. Antibiotika ini sebagian besar diproduksi secara fermentasi dengan bahan baku impor. Untuk menanggulangi masalah tersebut, akhir-akhir ini di Indonesia telah banyak dilakukan penelitian mengenai metoda dan teknologi fermentasi antibiotika disamping memilih strain mikroorganisme penghasil antibiotika serta mengembangkan teknik-teknik dalam isolasi dan pemurniannya.

Untuk produksi golongan tetrasiklin secara fermentasi, digunakan mikroorganisme dari kelas Actinomycetes genus *Streptomyces* (1,2). *S.rimosus* dilaporkan pertama kali oleh Finlay *et al.* (1950) sebagai mikroorganisme penghasil antibiotika oksitetrasiklin (1, 3).

Oksitetrasiklin merupakan antibiotika spektrum luas yang aktif terhadap berbagai mikroorganisme, baik gram positif maupun gram negatif, juga terhadap Rickettsiae dan beberapa virus tertentu. Namun oksitetrasiklin tidak aktif terhadap jamur (4). Zat ini mempunyai toksisitas yang

rendah sehingga dapat digunakan dalam dosis yang cukup besar tanpa menimbulkan efek samping yang berarti (5).

Untuk memproduksi antibiotika golongan tetrasiklin secara fermentasi sumber karbon dan nitrogen mempunyai peranan yang penting (2). Sumber nitrogen yang baik untuk produksi oksitetrasiklin adalah senyawa organik (1).

Potensi ekonomi beberapa antibiotika bergantung pada adanya media murah yang tersedia (6). Dalam penelitiannya, Abou Zeid menggunakan tetes tebu sebagai media fermentasi untuk memproduksi oksitetrasiklin (1). Tetes tebu atau molase adalah hasil samping industri gula, yang masih mengandung kadar gula yang cukup tinggi. Oleh karena itu molase dapat digunakan sebagai bahan dasar media fermentasi, yaitu sebagai sumber karbon (7).

Pada dasarnya oksitetrasiklin termasuk antibiotik yang bersifat relatif stabil. Namun kestabilannya dipengaruhi oleh fotooksidasi dan lingkungan seperti pH, temperatur dan kelembaban (8). Oksitetrasiklin relatif stabil pada pH asam (3). Dalam proses isolasinya, ekstraksi untuk mendapatkan oksitetrasiklin memakan waktu yang relatif cukup panjang. Oleh karena itu perlu diketahui pengaruh lama penyimpanan oksitetrasiklin dalam larutan yang bersifat asam, mengingat salah satu pelarut yang digunakan dalam ekstraksi adalah larutan HCl encer (9).

Pada penelitian ini molase dan garam amonium sulfat digunakan sebagai bahan utama media fermentasi. Pengamatan dilakukan terhadap aktivitas antibakteri, filtrat media, pH media dan berat sel. Pada saat aktivitas antibakteri menunjukkan harga maksimum, dilakukan isolasi antibakteri dari filtrat media. Hasil ekstraksi dimurnikan dan dilakukan identifikasi dengan kromatografi lapisan tipis, HPLC, spektroskopi ultra violet dan infra merah.

Untuk mengetahui pengaruh lama penyimpanan terhadap kestabilan, senyawa hasil isolasi dilarutkan dalam HCl dan disimpan dalam suhu yang berbeda. Pengujian aktivitas antibakteri serta perubahan harga ekstingsi molar (E_0) pada panjang gelombang maksimum dalam daerah ultra violet diamati.

PERCOBAAN

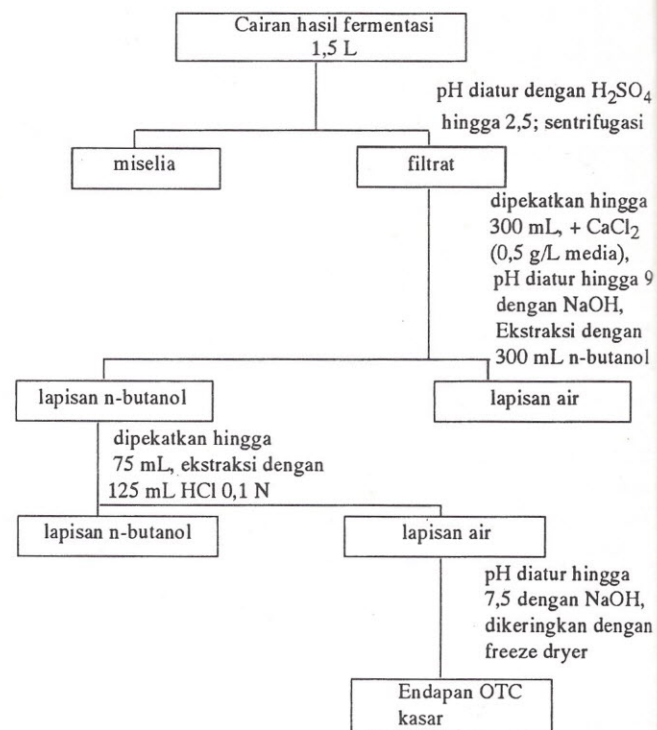
Bahan

Strain *S.rimosus* ATCC 33022 dan *Bacillus cereus* merupakan koleksi dari Pusat Penelitian dan Pengembangan Kimia Terapan - LIPI. Bahan yang digunakan dalam percobaan mempunyai derajat pro analisis, kecuali bila disebutkan lain. Air yang dimaksud disini adalah aquadest. Untuk ekstraksi digunakan n-butanol teknis. Molase digunakan untuk campuran media fermentasi sebagai sumber karbon. Oksitetrasiklin hidroklorida standar (dari Sigma) digunakan sebagai pembanding.

Metode

Untuk produksi antibakteri secara fermentasi dengan menggunakan *S.rimosus* ATCC 33022, diperlukan bebe-

rapa tahapan kerja yang meliputi pembiakan *S.rimosus* ATCC 33022 dalam media agar miring, pengaktifan *S.rimosus* ATCC 33022 dalam media cair, fermentasi antimiroba oleh *S.rimosus* ATCC 33022 dalam media yang mengandung molase, isolasi antibakteri dari media (Gambar 1) dan pemurnian antibakteri tersebut.



Gambar 1. Diagram Proses Ekstraksi.

Tahap selanjutnya adalah identifikasi antibakteri hasil isolasi dan pengujian aktivitas serta kestabilan antibakteri tersebut.

Pembiakan dalam media agar miring, aktivasi dalam media cair dan fermentasi dalam media molase dilakukan seperti yang telah dilaporkan sebelumnya (8, 10). Demikian pula halnya dengan pengukuran pH dan penentuan biomassa selama fermentasi.

Pengujian aktivitas antibakteri dilakukan dengan metode kertas cakram (10). Senyawa hasil isolasi dianalisis secara kualitatif dan kuantitatif dengan spektroskopi ultra violet yang meliputi pembuatan kurva puncak serapan, penentuan kadar oksitetrasiklin dan penentuan harga E_0 (ekstingsi molar). Sebagai pembanding, hal yang sama dilakukan terhadap oksitetrasiklin standar.

Setelah konsentrasi antibakteri dalam larutan diketahui, ditentukan harga E_0 dengan menggunakan Hukum Lambert Beer. Harga E_0 untuk larutan oksitetrasiklin standar juga ditentukan.

Pemisahan Garam NaCl dari Contoh Cuplikan Hasil Isolasi

Untuk memisahkan garam NaCl dari contoh hasil isolasi, mula-mula dilakukan percobaan dengan meng-

gunakan resin penukar ion. Contoh hasil isolasi (10 mg) dilarutkan dalam aquamillipore. Larutan tersebut dilewatkan melalui kolom yang berisi resin penukar anion (Amberlite IR - 120) dan kation (Dowex 50 W - X 8) dengan perbandingan 1:1 lalu dielusi dengan aquamillipore dan effluennya ditampung. Sebelum dilewatkan melalui kolom, aktivitas antibakteri larutan diuji terlebih dahulu. Efluen yang ditampung, dipekatkan dan diuji aktivitas antibakterinya. Sebelum dilewatkan melalui kolom larutan contoh menunjukkan adanya aktivitas antibakteri, sedangkan efluen tidak menunjukkan aktivitas.

Karena pemisahan garam dengan resin penukar ion memberikan hasil yang negatif, maka dilakukan cara rekristalisasi dari 2,5 g senyawa hasil isolasi dilarutkan dalam 10 mL etanol. Garam yang tidak larut dipisahkan dengan cara sentrifugasi, filtrat diuapkan. Rekristalisasi diulangi dua kali dengan menggunakan 5 mL etanol.

Analisis dengan Kromatografi Lapisan Tipis dilakukan pada lapisan tipis kieselguhr G. Eluen yang digunakan adalah campuran aseton - etil asetat - air (E_1) dengan perbandingan 20 : 10 : 3, campuran aseton - etanol - air (E_2) dengan perbandingan 20 : 10 : 3, dan campuran aseton - air (E_3) dengan perbandingan (30 : 3).

Analisis dengan HPLC

Pelarut dan fasa gerak yang akan digunakan, adalah campuran metanol - asetonitril - asam oksalat 0,1 M dengan perbandingan 1 : 1,5 : 7. Larutan standar campuran tetrasiklin dan oksitetrasiklin hidroklorida digunakan dengan konsentrasi masing-masing 0,04 mg/mL. Senyawa hasil isolasi (1 mg) yang telah dipisahkan dari garam, dilarutkan dalam pelarut yang telah disiapkan hingga volume 25 mL. Selanjutnya 20 μ L larutan tersebut disuntikkan ke HPLC dan dielusi. Kondisi percobaan yang digunakan adalah : sensitivitas 0,2, kolom μ -bondapak C 18, laju alir 1 mL/menit, detektor spektrofotometer ultra violet pada λ 365 nm, dan kecepatan jalannya kertas pencatat 1 cm/menit.

Identifikasi Struktur dengan Spektroskopi Infra Merah

Analisis spektroskopi inframerah ini dilakukan dengan menggunakan pelet KBr.

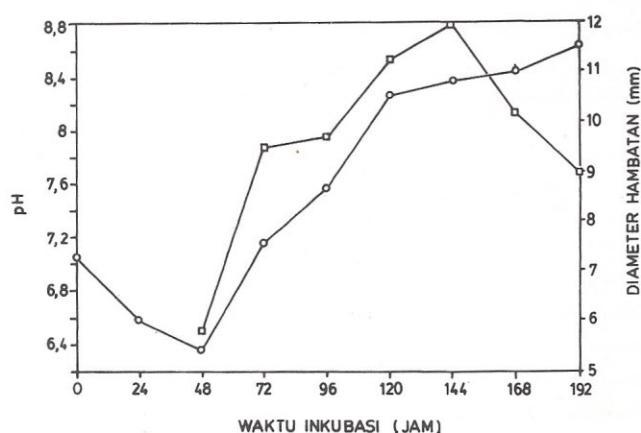
Pengujian Kestabilan Antibakteri

Sebanyak 5 mg hasil isolasi dilarutkan dalam pelarut HCl hingga volume 250 mL. Konsentrasi HCl yang digunakan bervariasi, yaitu 0,1; 0,2; 0,3; 0,4; dan 0,5 N. Masing-masing larutan dibagi dua. Bagian pertama disimpan di dalam lemari es pembeku (-12°C), dan bagian kedua disimpan di dalam lemari es pendingin (4°C). Setiap tiga hari dilakukan pengukuran serapan pada panjang gelombang 267 nm dan pengujian aktivitas antibakteri,

selama satu bulan. Sebagai pembanding digunakan larutan oksitetrasiklin hidroklorida standar dengan konsentrasi 20 $\mu\text{g/mL}$. Pengamatan kestabilan diikuti dengan membuat kurva lama penyimpanan terhadap harga E_0 larutan dan kurva antara lama penyimpanan terhadap aktivitas antibakteri (11).

HASIL DAN PEMBAHASAN

Produksi antibakteri oleh *S.rimosus* ATCC 33022 dalam media yang mengandung 5% molase dan 0,6% $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, dimulai pada periode inkubasi 48 jam. Hasil pengujian aktivitas antibakteri menunjukkan bahwa semakin lama waktu inkubasi, daerah hambatan yang dihasilkan semakin besar. Pada periode inkubasi 144 jam, aktivitas antibakteri mencapai harga maksimum dan setelah itu mengalami penurunan (Gambar 2).



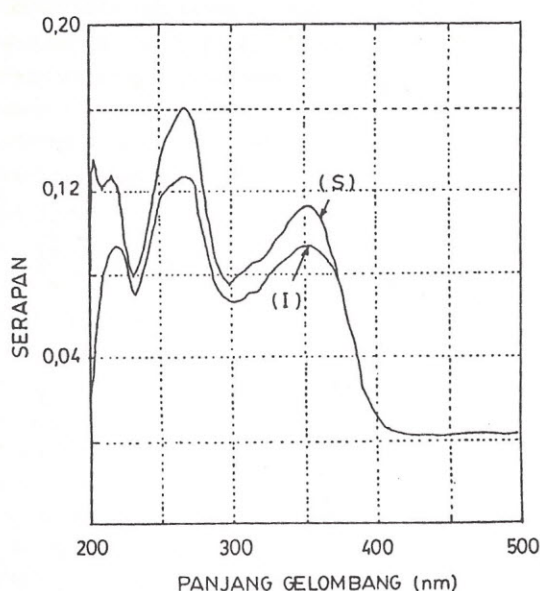
Gambar 2. Pengamatan harga pH (o) dan aktivitas antibakteri (□) larutan media selama proses fermentasi.

Pada Gambar 2 dapat pula dilihat bahwa selama 0-48 jam terjadi penurunan pH media akibat akumulasi asam-asam organik sebagai hasil degradasi gula oleh *S.rimosus* ATCC 33022. Selanjutnya pH mengalami kenaikan hingga pH 8,63 yang mungkin disebabkan adanya degradasi protein oleh *S.rimosus* ATCC 33022, menghasilkan amonia.

Dari hasil ekstraksi 1,44 L filtrat hasil fermentasi didapat 2,5 g antibakteri yang masih mengandung garam NaCl. Dengan kata lain, untuk tiap liter filtrat media didapat 1,736 g antibakteri kasar.

Selanjutnya ditentukan kadar antibakteri dengan spektroskopi ultra violet. Dari hasil penelitian didapatkan bahwa λ_{maks} untuk oksitetrasiklin standar 267 nm, dan λ_{maks} untuk antibakteri hasil isolasi 266 nm. (Gambar 3).

Harga E_0 untuk larutan oksitetrasiklin standar adalah $1,8538 \times 10^4 \text{ cm}^{-1}\text{M}^{-1}$, dan untuk larutan contoh $1,8529 \times 10^4 \text{ cm}^{-1}\text{M}^{-1}$.



Gambar 3. Spektrum ultra violet larutan oksitetrasiklin standar (S) dan hasil isolasi (I) dalam pelarut HCl.

Proses pemisahan garam NaCl dari contoh hasil isolasi dengan menggunakan resin penukar ion tidak berhasil sehingga dicoba cara lain, yaitu pemurnian dengan cara rekristalisasi menggunakan etanol sebagai pelarut. Dengan cara ini, dari 2,5 g sampel hasil ekstraksi, dapat diperoleh 72,41 mg antibakteri (dari 1,44 L media fermentasi). Pada pengujian dengan kromatografi lapisan tipis, antibakteri yang telah dipisahkan dari garam menunjukkan harga R_f yang mendekati harga R_f oksitetrasiklin standar sebagaimana yang tercantum dalam Tabel 1.

Tabel 1. Harga R_f antibiotika hasil isolasi dan standar oksitetrasiklin dalam beberapa sistem pelarut

Sistem pelarut	Contoh	R_f	Standar
E ₁	0,76		0,76
E ₂	0,65		0,64
E ₃	0,77		0,75

Keterangan:

E₁; aseton : etil asetat : air = 20 : 10 : 3

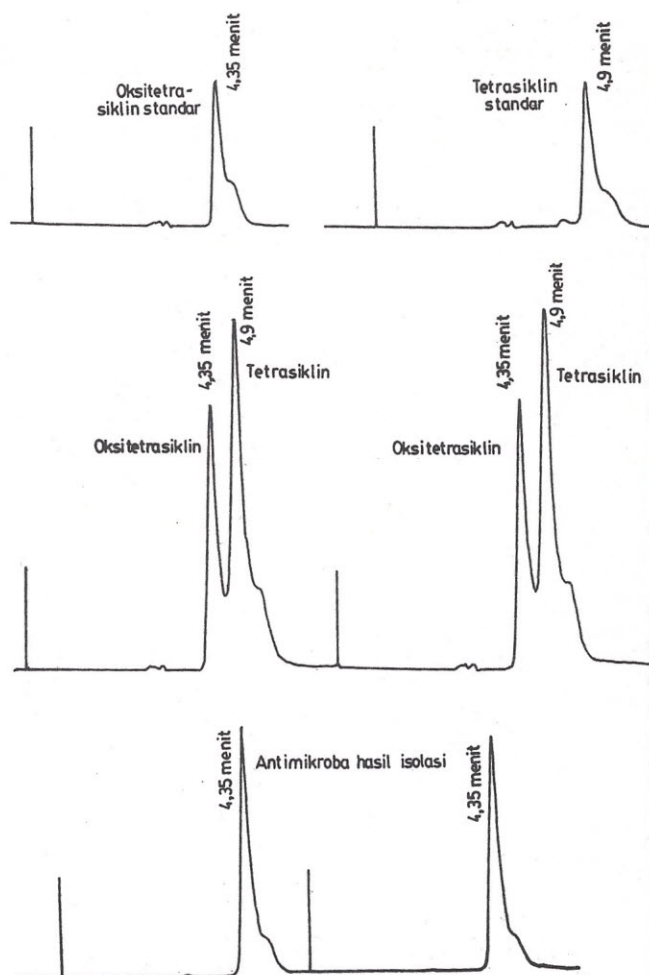
E₂; aseton : etanol : air = 20 : 10 : 3

E₃; aseton : air = 30 : 3

Noda dideteksi di bawah sinar ultra violet pada λ 366 nm.

Pada penelitian ini HPLC digunakan untuk analisis kualitatif maupun kuantitatif. Analisis kualitatif dilakukan dengan membandingkan waktu retensi oksitetrasiklin standar dengan waktu retensi antibiotika hasil isolasi. Dalam percobaan, sebagai pembanding digunakan larutan

standar campuran oksitetrasiklin dan tetrasiklin mengingat *S.rimosus* selain menghasilkan oksitetrasiklin juga menghasilkan tetrasiklin (7). Dari hasil penelitian didapatkan waktu retensi untuk tetrasiklin 4,9 menit dan untuk oksitetrasiklin 4,35 menit. Sedangkan waktu retensi antibakteri hasil isolasi adalah 4,35 menit. Berdasarkan data tersebut maka hampir dapat dipastikan bahwa antibakteri hasil isolasi adalah oksitetrasiklin (Gambar 4).

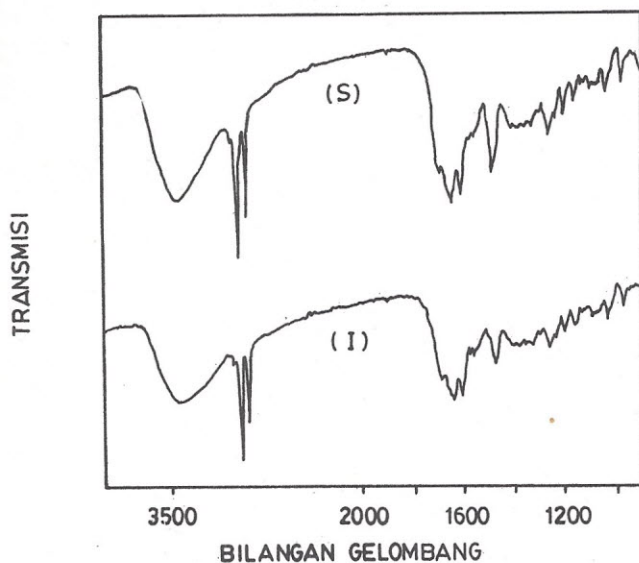


Gambar 4. Kromatogram tetrasiklin, oksitetrasiklin standar, standar campuran, dan antibakteri hasil isolasi.

Analisa kuantitatif dengan menggunakan HPLC dilakukan untuk menghitung kadar oksitetrasiklin dalam sampel antibakteri hasil isolasi yang telah dipisahkan dari garam. Perhitungan dilakukan dengan cara membandingkan luas puncak kromatogram oksitetrasiklin standar dengan luas puncak kromatogram contoh. Dari hasil perhitungan dapat diketahui kadar oksitetrasiklin dalam contoh adalah 92,5%.

Dari analisis dengan spektroskopi infra merah, antibakteri hasil isolasi menunjukkan adanya serapan pada

panjang gelombang 3400, 1650 - 1600, 1238, dan 2916 - 2848 cm^{-1} . Puncak-puncak serapan tersebut menunjukkan adanya gugus fenol, amida, amina, dan gugus metil, yang mirip dengan puncak-puncak serapan oksitetrasiklin standar. Dengan demikian dapat dikatakan bahwa antibakteri hasil isolasi adalah oksitetrasiklin. Pada Gambar 5 dapat dilihat spektrum infra merah oksitetrasiklin standar dan antibakteri hasil isolasi.



Gambar 5. Spektrum infra merah standar oksitetrasiklin (S) dan antibakteri hasil isolasi (I).

Tahap akhir penelitian yang dilakukan adalah pengujian kestabilan oksitetrasiklin hasil isolasi. Pengujian kestabilan diikuti dengan mengamati aktivitas antibakteri dan harga E_0 larutan oksitetrasiklin hasil isolasi yang disimpan pada dua suhu yang berbeda selama satu bulan.

Laju penurunan antibakteri tiap jenis larutan pada setiap konsentrasi HCl yang digunakan sebagai pelarut dapat dilihat pada Tabel 2. Pada larutan contoh dengan suhu penyimpanan -12°C , penambahan konsentrasi HCl memperbesar laju penurunan aktivitas antibakteri. Terlihat pula bahwa baik untuk larutan oksitetrasiklin standar maupun hasil isolasi, pada suhu penyimpanan -12°C laju penurunan aktivitas larutan lebih besar jika dibandingkan dengan larutan yang disimpan pada suhu 4°C .

Tabel 2. Laju penurunan aktivitas antibakteri larutan oksitetrasiklin standar dan antibakteri hasil isolasi.

Konsentrasi HCl (N)	Laju penurunan aktivitas (mm/hari)		Standar	
	4°C	-12°C	4°C	-12°C
0,1	0,11	0,13	0,11	0,13
0,2	0,13	0,15	0,13	0,14
0,3	0,11	0,14	0,11	0,14
0,4	0,12	0,13	0,12	0,15
0,5	0,12	0,13	0,11	0,16

KESIMPULAN

Berdasarkan hasil penelitian yang dilakukan dapat disimpulkan bahwa:

- Molase dapat digunakan sebagai sumber karbon dalam media untuk produksi oksitetrasiklin secara fermentasi dengan menggunakan *S. rimosus* ATCC 33022.
- Produksi antibakteri dimulai pada periode inkubasi 48 jam dan mencapai maksimum pada periode inkubasi 144 jam. Setelah itu produksi antibakteri mengalami penurunan.
- Pada penelitian ini dari 1,44 liter media fermentasi didapat 72,4 mg (atau 50,3 mg/L media) antibakteri dengan kadar 92,5%.
- Analisis kualitatif antibakteri hasil isolasi yang meliputi analisis dengan kromatografi lapisan tipis, spektroskopi ultra violet, HPLC, dan spektroskopi infra merah membuktikan bahwa antibakteri yang didapatkan dari hasil fermentasi adalah oksitetrasiklin. Untuk pembuktian tersebut semua metode dibandingkan dengan standar oksitetrasiklin.
- Hasil pengujian kestabilan untuk larutan oksitetrasiklin (dalam pelarut HCl) yang disimpan pada suhu -12°C dan yang disimpan pada suhu 4°C tidak dapat dibandingkan, karena untuk suhu penyimpanan -12°C dalam pengambilan contoh terjadi perubahan fasa yang berulang.
- HCl 0,1 N merupakan pelarut oksitetrasiklin terbaik yang dapat digunakan, karena dalam pelarut ini oksitetrasiklin mempunyai aktivitas awal terbesar.

PUSTAKA

- A.A. Abou - Zeid, A.I. El - Diwany and H.M. Shaker. Utilization of Food Industry By-product in The Production of Oxytetracycline by *Streptomyces rimosus* 93060. *Agricultural Wastes*, 2:293-301, (1980).
- A.A. Abou - Zeid, A.I. El - Diwany and H.M. Shaker. Role of Nitrogen Sources in Fermentative Production of Oxytetracycline by *Streptomyces rimosus* 93060. *Agricultural Wastes*, 3 :257-265, (1981).
- J.N. Porter. Antibiotic. In: Industrial Microbiology, Editor: B.M. Miller, Ph.D. and Warren Litsky, Ph.D., Mc. Graw Hill Book Company, New York, (1976).
- L.P. Garrod, H.P. Lambert, F.O. Grady, and P.M. Waterworth Antibiotic and Chemotherapy, 4th ed., Churchill Livingstone, Edinburgh and London, (1973).
- H. Welch. Principles and Practice of Antibiotic Therapy, Medicinal Encyclopedia Inc., New York, (1954).

6. L.Z. Udin, S. Pudjiraharti and A.T. Karossi, Effects of medium composition on oxytetracycline production by *Streptomyces rimosus* ATCC 33022, *Indonesian Journal of Applied Chemistry*, 2 (1-2), 80-85, (1992).
7. S. Pudjiraharti. Media Tetes untuk Produksi Oksitetrasiklin, Skripsi, Jurusan Kimia, FMIPA ITB, Bandung, (1987).
8. H.M. Mukhtar. Pembuatan Tetrasiklin secara Fermentasi, Jurusan Farmasi, FMIPA, ITB, Bandung, (1984).
9. M.J. Weinstein and G.H. Wagman. Antibiotics Isolation and Purification, Elsevier Publishing Company, Amsterdam, (1978).
10. A.T. Karossi, T.A. Budiwati and L.Z. Udin. Utilization of Agroindustrial By-product for Biosynthesis of Oxytetracycline. Proceedings Seventh Australian Biotechnology Conference. University of Melbourne. 25-28 August 1986, pp 376-379, (1986).
11. Sri Handayani. Kestabilan dan aktivitas oksitetrasiklin hasil fermentasi molase oleh *Streptomyces rimosus* ATCC 33022, Skripsi, FMIPA, Universitas Indonesia, Depok, (1989).

**Proceedings dan majalah berikut ini dapat dipesan pada
Rosidin d/a HKI, Puslitbang Kimia Terapan-LIPI**

DAFTAR HARGA PROCEEDINGS/MAJALAH DI UNION SHOP HKI

NO.	NAMA	HARGA JUAL
1.	Proceedings of the ASEAN-EC workshop on the scale up, cost evaluation and technology transfer of biotechnological processes.....	Rp 12.500,-
2.	Proceedings on the first ASEAN workshop on biochemical engineering.....	Rp 12.500,-
3.	Proceedings lokakarya pertama evaluasi biologi kimia dan fisika limbah lignosellulosa.....	Rp 7.500,-
4.	Proceedings of the first ASEAN workshop on the technology of animal feed production utilising foodwaste materials.....	Rp 7.500,-
5.	Invited papers presented at the first ASEAN workshop on the technology of animal feed production utilising foodwaste materials.....	Rp 7.500,-
6.	Proceedings of the second ASEAN workshop on the technology of animal feed production utilising foodwaste materials.....	Rp 12.500,-
7.	ASEAN bibliography on fermentation technology	Rp 7.500,-
8.	Biogasification of various organic residues in the ASEAN region	Rp 5.000,-
9.	Proceedings of the first ASEAN seminar workshop on biogas technology (+ supplementary information).....	Rp 12.500,-
10.	Buletin Limbah Pangan	Rp 1.500,-
11.	Proceedings of the First ASEAN workshop on solid substrate fermentation.....	Rp 7.500,-
12.	Proceedings of the second ASEAN workshop on food analytical techniques	Rp 7.500,-
13.	Jurnal Kimia Terapan 1991-1992	Rp 3.500,-
14.	Warta Kimia Analitik.....	Rp 2.000,-