

PENGEMBANGAN METODA ANALISA KIMIA UNTUK PEMANTAUAN PROSES FERMENTASI PEMBUATAN ASAM CUKA, ANTIBIOTIKA DAN HORMON STEROID

A.T. Karossi dan Julia Kantasubrata

Pusat Penelitian dan Pengembangan Kimia Terapan - LIPI
Jalan Cisit - Sangkuriang, Bandung 40135

INTISARI

Analisa kimia mempunyai peranan yang tidak dapat diabaikan, baik sebagai alat pemandu proses maupun dalam menentukan mutu produk yang dihasilkan dari proses fermentasi. Kemajuan yang cukup pesat dalam metoda analisa kimia, diawali oleh metoda yang relatif konvensional menuju pada metoda instrumental, merupakan kenyataan saat ini. Perkembangan tersebut tidak hanya meningkatkan kepekaan dan ketelitian, tetapi juga mampu mengungkapkan terdapatnya berbagai jenis senyawa/komponen dalam campuran hasil fermentasi, yang tak mungkin ditemukan dengan metoda konvensional. Beberapa hasil penelitian dari metoda analisa kimia dengan teknik kromatografi cairan kinerja tinggi (HPLC) yang digunakan dalam memantau proses fermentasi untuk produksi asam cuka makan, antibiotika dan hormon steroid diuraikan dalam makalah ini. Pada fermentasi asam cuka, jenis analisa tersebut meliputi analisa gula, etanol dan asam-asam organik, sedangkan pada proses fermentasi antibiotika, selain analisa gula dilakukan pula analisa derivat tetrasiklin sebagai produk hasil fermentasi. Pada fermentasi steroid dilakukan analisa solasodine sebagai substrat, dan AD serta ADD sebagai produk yang dihasilkan pada proses fermentasi.

ABSTRACT

Chemical analysis plays an important role in monitoring fermentation process and determining product quality of the process. Nowadays the development of analytical methods, which commenced from relatively conventional method to instrumental method, has become a reality. The development does not only increase either sensitivity or reproducibility, but also could identify the existence of substances produced during fermentation, which could not be achieved by conventional methods. In this article, several chemical analyses used for monitoring the production of vinegar, antibiotic and steroid hormone are described. In vinegar fermentation, analyses cover the determination of sugars, ethanol and organic acids, while in antibiotic fermentation, in addition to determination of sugar, analyses of tetracycline derivatives as fermentation products, is also carried out. In steroid fermentation, analysis covers the determination of solasodine as substrate, AD and ADD as fermentation products.

PENDAHULUAN

Secara umum dalam suatu proses fermentasi dibutuhkan analisa dari komponen senyawa yang terdapat dalam substrat dan produk yang terbentuk dalam campuran hasil fermentasi. Kondisi optimum suatu proses fermentasi dapat dipelajari dengan jalan memantau kandungan komponen senyawa tersebut selama proses berlangsung. Jelas terlihat analisa yang cermat dan tepat memegang peranan yang sangat penting, sama pentingnya dengan teknik fermentasinya sendiri.

Metoda analisa konvensional membutuhkan waktu analisa yang relatif panjang dan umumnya hanya memberikan kandungan total senyawa. Hampir tidak mungkin dengan metoda analisa konvensional dapat ditentukan misalnya kandungan senyawa secara individual. Sejalan dengan berkembangnya teknik kromatografi, analisa senyawa secara individual mulai dapat dirintis. Kromatografi kertas, kromatografi lapisan tipis (TLC), kromatografi gas (GLC) dan kromatografi cairan kinerja tinggi (HPLC) telah banyak dipakai untuk keperluan tersebut. Kromatografi kertas dan TLC sangat menarik karena sederhana, murah dan dapat dipakai untuk analisa berbagai contoh secara serentak. Namun demikian untuk keperluan analisa kuantitatif, kedua cara diatas kurang dapat diandalkan karena masih berada pada tingkat semi-kuantitatif. Dengan metoda GLC, pada umumnya komponen senyawa yang akan dianalisa harus diubah terlebih dahulu menjadi turunannya (derivat) yang mudah menguap. Cara ini kurang disukai karena ketepatan hasil analisa menjadi kurang dapat diandalkan. Kromatografi cairan kinerja tinggi (HPLC) banyak dikembangkan untuk analisa komponen yang tidak mudah menguap. Terlihat adanya harapan yang cukup besar dari HPLC ini, untuk dapat digunakan sebagai suatu metoda yang spesifik, peka, cepat, cermat dan tepat.

Disampaikan pada Seminar Nasional Bioteknologi Industri. Peningkatan Peranan Bioteknologi Industri dalam Era Industrialisasi, Jakarta, 4 - 5 Maret 1991

PROSES FERMENTASI CUKA METE

Dalam beberapa tahun terakhir ini, industri mete telah menarik minat yang cukup besar, terutama sebagai komoditi ekspor disamping juga membuka lapangan pekerjaan yang cukup luas bagi penduduk disekitarnya. Pemerintah Indonesia telah turut menunjang peningkatan produksi biji mete dengan membuka perkebunan- perkebunan jambu mete terutama di Jawa, Sumatra, Sulawesi dan daerah Indonesia bagian timur. Hingga saat ini pemanfaatan jambu mete masih mengutamakan pengolahan biji (cashew nut) untuk mendapatkan kacang mete, sedangkan buahnya yang mempunyai kandungan karbohidrat cukup tinggi, kaya akan vitamin dan mineral belum banyak dimanfaatkan. Sebagian besar buah jambu mete membusuk dan terbuang, dan sedikit sekali buah yang dikonsumsi oleh masyarakat, terutama karena rasanya yang sepat. Salah satu pemanfaatan buah mete adalah dengan mengubahnya menjadi anggur mete, yang kemudian dapat dilanjutkan menjadi asam cuka beraroma melalui proses fermentasi dengan *Acetobacter aceti*.

Untuk itu dipandang perlu untuk meneliti mula-mula kondisi fermentasi anggur mete dan selanjutnya kondisi fermentasi asam asetat pada proses pembuatan asam cuka buah mete, sehingga akhirnya dapat diperoleh proses fermentasi yang efisien (1,2,3,4,5,6,7).

Dalam memantau proses fermentasi sari buah jambu mete untuk menghasilkan anggur dan cuka, dibutuhkan analisa gula dan analisa dari berbagai produk yang terbentuk (etanol dan asam-asam organik) dalam campuran hasil fermentasi. Perbandingan kandungan gula terhadap etanol dapat dipakai untuk menentukan titik optimum terminasi proses fermentasi anggur mete. Kandungan asam-asam organik merupakan indikator hasil metabolisme gula dalam campuran hasil fermentasi.

Jadi jelas terlihat dibutuhkannya penentuan yang akurat dari etanol dan asam-asam organik dalam suatu campuran yang juga mengandung gula. Analisa dari campuran komponen ini merupakan suatu pekerjaan yang cukup rumit, yang tidak dapat diselesaikan melalui cara analisa konvensional.

Dengan HPLC, analisa asam-asam organik juga agak sukar ditangani, karena sering terjadi reaksi ionisasi selama proses pemisahan kromatografi berlangsung. Seringkali pula terjadi interaksi yang cukup kuat antara asam-asam tersebut dengan berbagai jenis fasa diam yang umum digunakan pada HPLC, hingga dapat menyebabkan terbentuknya puncak yang berekor. Cara yang paling mudah untuk menanggulangnya adalah dengan jalan berusaha menghalangi terjadinya reaksi ionisasi asam-asam tadi secara sempurna, melalui cara pengaturan pH (menyangga pH) dari fasa gerak pada suatu harga yang tertentu. Cara penekanan ion (ion suppression) seperti ini dapat menjamin bahwa dalam fasa gerak hanya terdapat asam-asam dalam bentuk tak terionisasi. Jenis mekanisme kromatografi penekanan ion ini telah dicoba diterapkan pada analisa campuran hasil fermentasi jambu mete (8).

Akan tetapi dalam pemisahan tersebut, glukosa dan fruktosa mempunyai waktu retensi yang sama, segera setelah waktu retensi pelarut (t_0) dan hampir sama dengan waktu retensi asam tartrat. Dari kenyataan ini dapat disimpulkan bahwa sistem kromatografi yang digunakan hanya dapat memisahkan monosakarida dari disakarida (sakarosa), sedangkan tiap jenis monosakarida (glukosa, fruktosa) tidak dapat dipisahkan satu sama lain. Untuk dapat memisahkan glukosa dari fruktosa, harus dicari kondisi pemisahan yang lain, yang khusus diperuntukkan bagi pemisahan gula.

Suatu jenis pemisahan yang relatif baru telah dikembangkan oleh WATERS (9), menggunakan kolom dengan bahan dasar silika dan eluen yang mengandung senyawa poliamina (pereaksi SAM), yang sifatnya tidak reaktif. Pereaksi SAM (Silica Amine Modifier) ini mempunyai fungsi mengubah permukaan silika secara *in situ* melalui proses impregnasi. Telah dilakukan pemisahan dari gliserol dan tujuh jenis mono- dan disakarida lainnya (10). Pada saat campuran hasil fermentasi diinjeksikan kedalam kolom, dapat dideteksi terdapatnya gliserol, fruktosa, glukosa dan sukrosa dalam campuran tersebut. Kurva kalibrasi yang diperoleh untuk gliserol, fruktosa, glukosa dan sukrosa menunjukkan garis lurus dengan koefisien korelasi berturut-turut 0,9608; 0,9992; 0,9992 dan 0,9986.

Uji banding metoda HPLC ini terhadap metoda analisa gula yang lain, menggunakan spektrofotometri (metoda Nelson-Somogyi) juga telah dilakukan. Untuk keperluan tersebut, 22 jenis contoh yang diambil dari suatu campuran hasil fermentasi dengan waktu fermentasi yang berbeda dianalisa menggunakan metoda Nelson-Somogyi dan HPLC. Apabila kemudian hasil analisa dari ke 22 contoh yang diperoleh dengan metoda HPLC dibandingkan terhadap hasil analisa yang diperoleh dari metoda Nelson-Somogyi, dapat disimpulkan bahwa antara kedua metoda terdapat korelasi yang cukup baik (11,12).

Namun demikian ternyata batas deteksi metoda HPLC masih relatif lebih tinggi dibandingkan dengan metoda spektrofotometri. Hal ini disebabkan karena detektor yang digunakan untuk mendeteksi gula pada percobaan ini adalah detektor indeks refraksi (RI). Detektor ini memang bersifat universal, hanya saja kemampuan deteksinya masih terlalu rendah. Sebenarnya detektor UV atau fluoresensi mempunyai kepekaan yang relatif tinggi bila dibandingkan dengan detektor RI, oleh karena itu untuk memperkecil limit deteksi, sebaiknya digunakan detektor UV atau fluoresensi.

Gula memang memberikan penyerapan pada panjang gelombang 192 nm, tetapi umumnya pelarut-pelarut organik yang banyak digunakan sebagai fasa gerak pada HPLC juga menyerap kuat pada daerah panjang gelombang ini. Untuk mendeteksi gula pada daerah panjang gelombang tersebut diperlukan kemurnian fasa gerak yang sangat tinggi, suatu hal yang sangat sulit untuk dipenuhi.

Suatu jalan penyelesaian yang harus diusahakan adalah bagaimana caranya agar gula dapat memberikan penyerapan pada daerah panjang gelombang yang lebih tinggi misalnya pada daerah panjang gelombang sinar nampak, karena pengukuran pada 192 nm mempunyai kelemahan. Proses derivatisasi akan dapat menyelesaikan masalah ini. Pada proses derivatisasi, gula direaksikan dengan pereaksi kromoforik atau fluoroforik sehingga dapat menyerap pada daerah UV atau tampak. Yang penting dicari adalah reaksi pembentukan derivat gula yang sesuai untuk keperluan reaksi derivatisasi sebelum atau setelah melalui kolom pemisah. Mencari cara deteksi yang lebih memadai ini akan merupakan salah satu kelanjutan penelitian dalam bidang analisa gula.

PROSES FERMENTASI PEMBUATAN TETRASIKLIN

Dalam usaha memberikan pelayanan kesehatan yang cukup memadai bagi penduduk Indonesia dengan populasi yang relatif tinggi, telah dipertimbangkan untuk mempelajari produksi antibiotik secara fermentasi.

Tetrasiklin merupakan kelompok antibiotika dengan spektrum luas yang aktif terhadap hampir semua bakteri patogen. Antibiotika dapat diproduksi melalui proses fermentasi dan mengingat bahwa bahan baku untuk membuatnya banyak tersedia di Indonesia, usaha untuk melakukan studi pembuatan antibiotika melalui proses fermentasi dengan memanfaatkan bahan baku yang tersedia di Indonesia banyak dilakukan.

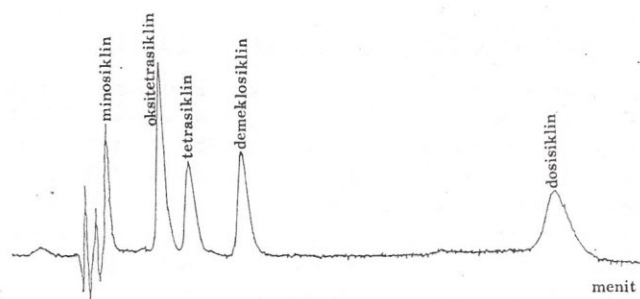
Usaha yang telah dilakukan adalah mencari kondisi fermentasi yang optimal, yang selain tergantung dari aktifitas mikroorganisme dan kondisi proses fermentasinya, juga tergantung dari jenis dan konsentrasi substrat yang digunakan. Dalam suatu proses fermentasi dibutuhkan sumber karbon dan sumber nitrogen untuk keperluan pertumbuhan mikroorganisme dan biosintesa senyawa antibiotika tersebut.

Sebagai sumber karbon telah diteliti kemungkinan pemanfaatan tetes tebu (13,14,15,16,17,18) yang merupakan hasil samping industri gula, sukrosa (19) yang merupakan gula hasil produksi dalam negeri dan HFS (high fructose syrup) (20), yang mempunyai harga relatif rendah apabila dibandingkan dengan sukrosa (20,21).

Sebagai sumber nitrogen, telah dicoba untuk menggunakan ragi pakan (22,24) dan membandingkannya terhadap pemakaian amonium sulfat (22,23). Telah diteliti pula pengaruh penambahan metionin ke dalam media fermentasi yang mengandung HFS (25). Kondisi yang paling optimal, yang diperoleh dari hasil penelitian dalam skala laboratorium ini telah pula dicoba diterapkan dalam skala 4 dan 80 liter (26), dengan tujuan untuk mencari kondisi optimal yang paling mendekati untuk pembuatan dalam skala besar.

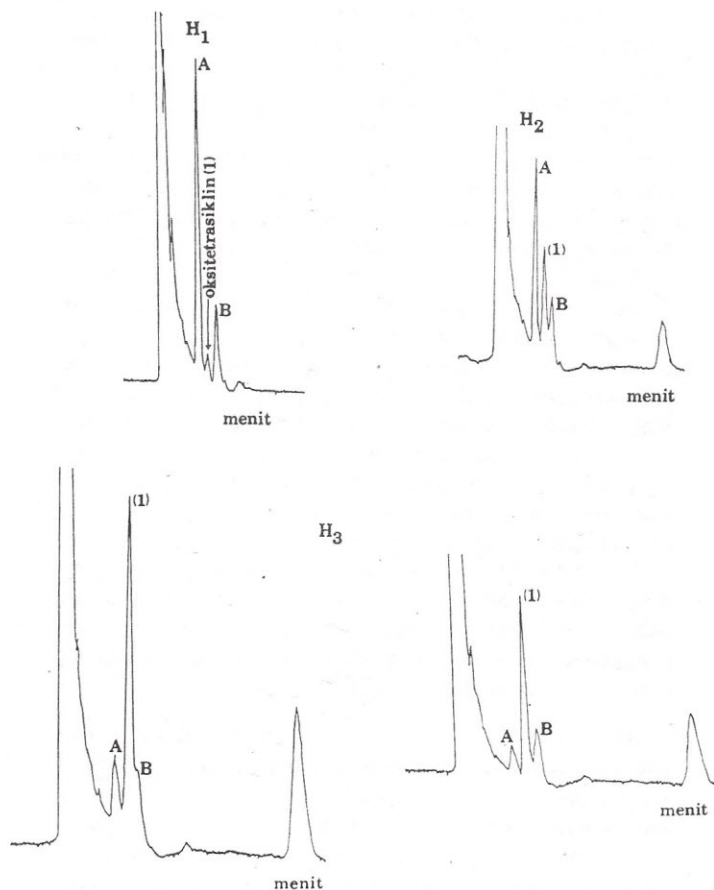
Dalam memantau kemajuan proses fermentasinya, perlu dilakukan analisa dari derivat tetrasiklin yang terbentuk dalam campuran hasil fermentasi dari waktu ke waktu. Pada mulanya analisa dilakukan dengan cara mikrobiologi, menggunakan *S. lutea*, *S. aureus* atau *B. pumilis* sebagai bakteri penguji (13). Dalam uji aktifitas ini, contoh ditotolkan diatas media uji dan hambatan terhadap pertumbuhan bakteri diukur, dimana besar hambatan yang diberikan akan sebanding dengan konsentrasi antibiotika yang ditotolkan. Meskipun cara mikrobiologi ini cukup spesifik, ternyata cara ini memberikan hasil yang kurang akurat karena dipengaruhi banyak faktor, antara lain porositas dari kertas cakram yang digunakan dan terdapatnya kesulitan teknis dalam menotolkan noda antibiotika yang sama besar pada media pertumbuhan bakteri tersebut. Selain itu, berdasarkan hasil yang diperoleh, dengan cara mikrobiologi hanya dapat dilakukan analisa dengan batas konsentrasi minimum 20 ppm. Nilai hambatan yang diberikan oleh oksitetrasiklin dengan konsentrasi dibawah 20 ppm tidak lagi memberikan hasil yang teliti.

Karena adanya kendala ini, dicoba untuk mencari metoda analisa yang lain. Dengan dasar pertimbangan bahwa penentuan derivat tetrasiklin secara individual hanya dapat dilakukan dengan metoda kromatografi, dipilih metoda kromatografi cairan kinerja tinggi (HPLC) (27). Lima jenis derivat tetrasiklin yaitu minosiklin-HCl (MC), oksitetrasiklin-HCl (OTC), tetrasiklin-HCl (TC), demeklosiklin-HCl (DMC) dan dosisiklin-HCl (DC) telah berhasil dipisahkan (Gambar 1) dan dengan menggunakan kondisi pemisahan tersebut, dicoba untuk mencari batas deteksi minimum dan membuat kurva kalibrasi dari kelima derivat tetrasiklin yang dipisahkan. Batas deteksi minimum yang dapat dicapai adalah 40; 12,5; 30; 50 dan 200 nanogram berturut-turut untuk minosiklin-HCl, oksitetrasiklin-



Gambar 1. Pemisahan dari 5 derivat tetrasiklin (27).

HCl, tetrasiklin-HCl, demeklosiklin-HCl dan dosisiklin-HCl. Kurva kalibrasi yang diperoleh untuk setiap derivat merupakan garis lurus dengan koefisien korelasi mendekati nilai satu. Metoda HPLC ini dicoba diterapkan untuk memantau kandungan derivat tetrasiklin dalam campuran hasil fermentasi yang diambil dari waktu ke waktu. Dari campuran hasil fermentasi pada hari pertama (Gambar 2), terdeteksi adanya tiga puncak yang terpisah dengan waktu retensi masing-masing 4,98; 5,62 dan 6,15 menit. Apabila data waktu retensi ini dibandingkan dengan waktu retensi senyawa standar, maka puncak dengan waktu retensi 5,62 menit, dapat diduga merupakan puncak senyawa oksitetrasiklin. Puncak tersebut selanjutnya dikonfirmasi dengan menggunakan detektor "spectrodiode-array". Namun demikian puncak yang keluar sebelum (waktu retensi



Gambar 2 Kromatogram campuran hasil fermentasi tetrasiklin pada hari pertama (H1), kedua (H2) dan ketiga (H3).

4,98 menit) dan sesudah (waktu retensi 6,15 menit) puncak oksitetrasiklin, belum dapat diidentifikasi. Akan tetapi apabila dilihat pada kromatogram dari campuran hasil fermentasi pada hari kedua (H_2) terlihat bahwa puncak oksitetrasiklin menjadi semakin tinggi, sedangkan dua puncak disebelah kiri dan kanannya menjadi semakin pendek. Berdasarkan pengamatan ini, besar kemungkinan kedua puncak tersebut adalah puncak dari senyawa-antara yang terbentuk selama proses fermentasi. Apabila untuk selanjutnya kedua puncak tersebut diberi notasi berturut-turut puncak A dan B, maka pada saat puncak OTC (oksitetrasiklin) mencapai maksimum pada hari ketiga (H_3), terlihat bahwa puncak OTC dan puncak B tidak dapat terpisahkan dengan baik. Hal ini disebabkan karena tingginya kandungan OTC apabila dibandingkan terhadap kandungan senyawa B. Karena keadaan yang seperti ini akan menyulitkan perhitungan kuantitatif, maka larutan contoh yang akan dianalisa sebaiknya diencerkan terlebih dahulu, sehingga kedua puncak, puncak OTC dan puncak B dapat terpisahkan cukup baik.

Melalui metoda pemisahan HPLC ini, dilakukan analisa kandungan derivat tetrasiklin yang terbentuk dalam campuran hasil fermentasi dengan berbagai kondisi fermentasi yang berbeda.

PROSES FERMENTASI STEROID

Sebagai negara tropis, Indonesia mempunyai potensi yang cukup besar sebagai pemasok pra-zat steroid yang diperlukan untuk sintesa berbagai obat antifertilitas. Perubahan dari pra-zat steroid menjadi bahan steroid yang mempunyai sifat aktif fisiologis, dapat dilakukan baik melalui proses kimia maupun mikrobiologi. Konversi secara mikrobiologi seringkali berlangsung lebih cepat dan ekonomis.

Senyawa 1,4-androstadiene-3,17-dione (ADD) merupakan pra-zat bagi sintesa bahan aktif obat anti fertilitas. Senyawa ADD dapat diperoleh melalui proses fermentasi kolesterol menggunakan bakteri *Mycrobacterium* sp. (28). Pembentukan senyawa ADD ini didahului dengan terbentuknya senyawa antara yang lain yaitu AD (4-androstene-3,17-dione).

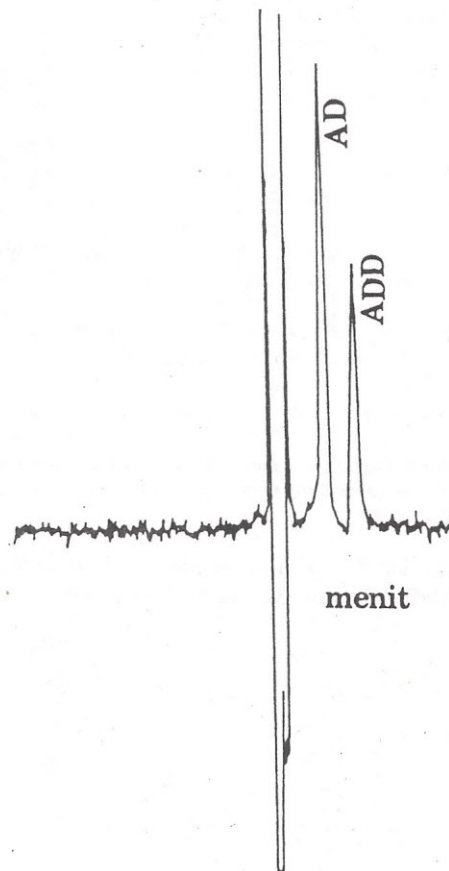
Di Indonesia banyak terdapat tumbuhan jenis solanum (terong), yang mengandung komponen senyawa solasodin. Melihat adanya kemiripan antara struktur diosgenin yang biasa digunakan sebagai pra-zat dan solasodin, diharapkan proses fermentasi solasodin juga dapat menghasilkan AD dan ADD. Dengan menggunakan jenis mikroorganisme yang tepat, konversi mikrobiologi dari solasodin menuju senyawa-antara ADD, diikuti dengan proses sintesa kimia menjadi obat steroid, akan merupakan suatu topik penelitian yang cukup menarik. Hasil penelitian ini selanjutnya dapat diterapkan dalam suatu bioindustri untuk memenuhi adanya permintaan obat steroid di Indonesia.

Pada penelitian mengenai proses fermentasi solasodin untuk menghasilkan AD dan ADD (29), dibutuhkan metoda analisa yang cepat dan akurat untuk dapat mendeteksi produk yang terbentuk dalam campuran hasil fermentasi. Dalam hal inipun, dipilih HPLC karena metoda ini menawarkan banyak kemudahan dan keunggulan.

Untuk menemukan sistim dan kondisi yang cocok bagi suatu pemisahan dalam HPLC, dibutuhkan banyak sekali waktu dan bahan. Terlihat adanya kepentingan untuk memperkirakan parameter-parameter pemisahan melalui percobaan pendahuluan yang relatif sederhana. Teknik yang dianggap cocok

untuk keperluan ini adalah TLC (30), karena TLC mudah dikerjakan dan relatif murah. Tambahan pula dengan menggunakan TLC, berbagai kombinasi sistem fasa diam dan fasa gerak dapat diselidiki secara simultan, dengan hanya menggunakan peralatan yang relatif tidak mahal.

Salah satu alasan paling penting dalam memilih TLC sebagai teknik pendahuluan adalah karena fasa diam dan fasa gerak pada TLC dan HPLC identik atau sekurang-kurangnya

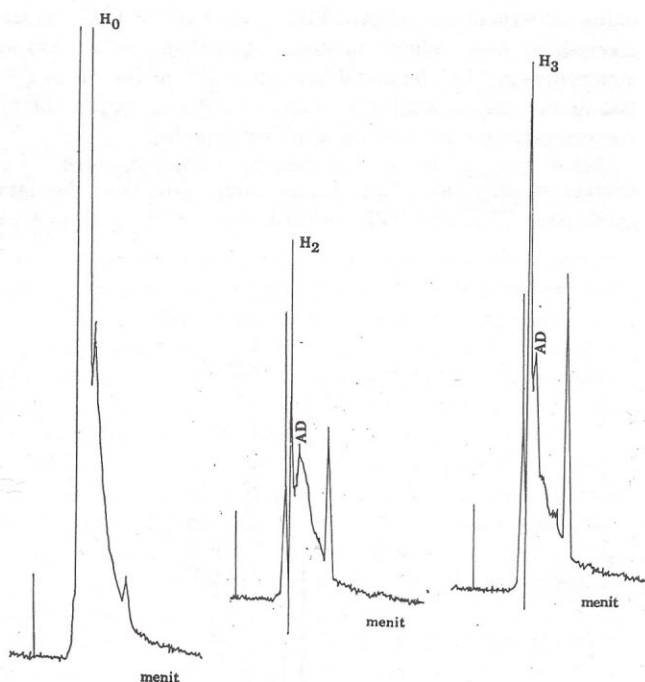


Gambar 3. Kromatogram pemisahan AD dan ADD

dapat dibandingkan. Dengan demikian terdapat persesuaian yang cukup banyak pada mekanisme retensi yang merupakan dasar pemisahan dari kedua metoda ini.

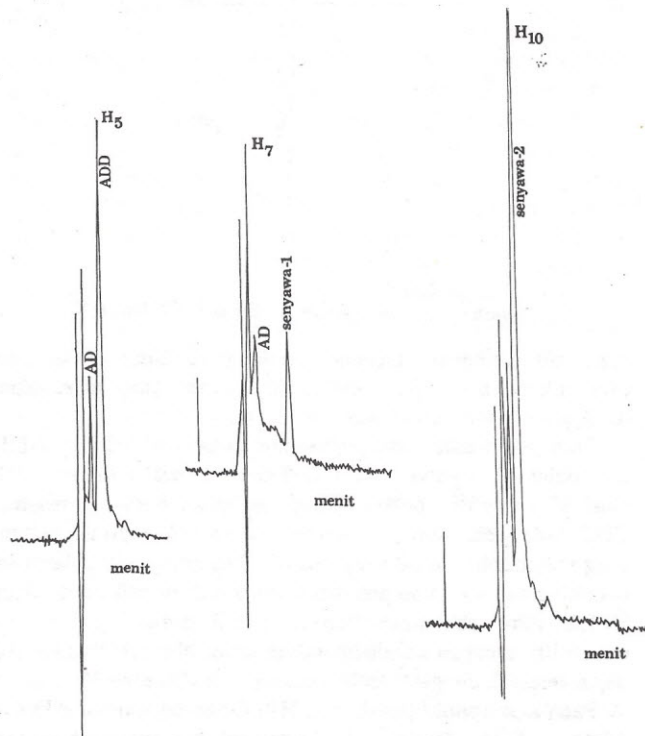
Transposisi data hasil pemisahan solasodin, AD dan ADD dari pelat TLC pada kolom HPLC telah mulai dicoba (31). Dari 37 komposisi pelarut yang dicobakan untuk pemisahan TLC pada pelat silika, diperoleh delapan komposisi pelarut yang memberikan hasil yang positif. Dari komposisi pelarut ini diambil salah satu komposisi pelarut untuk diaplikasikan pada HPLC yaitu campuran benzen : etil asetat : kloroform (40:80:10). Dengan kondisi pemisahan tersebut, AD dan ADD dapat terpisahkan dengan resolusi cukup baik (Gambar 3).

Pada saat kondisi pemisahan HPLC zat-zat standar AD dan ADD ini dicoba diaplikasikan pada contoh campuran hasil fermentasi, maka melalui kromatogram yang diperoleh dapat dimonitor pembentukan dari AD, ADD dan senyawa antara lainnya, yang saat ini belum teridentifikasi. Terlihat dari hasil analisa (Gambar 4) bahwa pada waktu awal fermentasi (H_0) belum terbentuk senyawa apapun. Pada hari kedua (H_2) mulai tampak adanya senyawa AD dan senyawa ini terlihat makin jelas pada hari ketiga (H_3).



Gambar 4. Kromatogram campuran hasil fermentasi solasodine pada waktu awal fermentasi (H0), hari kedua (H2) dan hari ketiga (H3)

Pada hari kelima (H5) disamping AD, terbentuk pula senyawa ADD (Gambar 5), sedangkan pada hari ketujuh



Gambar 5 Kromatogram campuran hasil fermentasi solasodine pada hari kelima (H5), hari ketujuh (H7) dan kesepuluh (H10).

(H7) senyawa ADD menghilang dan digantikan dengan senyawa-1 yang terdapat di belakang puncak AD dan ADD. Pada hari kesepuluh (H10), baik senyawa AD maupun ADD menghilang seluruhnya dan digantikan dengan senyawa-2. Pemantauan dari terbentuknya senyawa-senyawa antara ini

baru dilakukan secara kualitatif. Pemantauannya secara kuantitatif merupakan pekerjaan yang perlu dilakukan.

KESIMPULAN

Dalam mempelajari proses fermentasi, analisa kimia memegang peranan yang penting, sama pentingnya dengan teknik fermentasi itu sendiri. Dukungan metoda analisa yang tepat dan dapat langsung diterapkan, memerlukan studi tersendiri. Teknik kromatografi, diantaranya HPLC menawarkan banyak kemudahan dan keunggulan untuk mendeteksi produk yang terbentuk selama proses fermentasi berlangsung.

DAFTAR PUSTAKA

1. A.T. Karossi, T.A. Budiwati dan S.P. Raharti, Cashew apples as a potential substrate from cashew nut production, for wine and vinegar making, Makalah dipresentasikan pada 8th Australian Biotechnology Conference, Sydney, 6 - 9 February 1989.
2. T.A. Budiwati, S.P. Raharti dan A.T. Karossi, Konversi sari buah jambu mete menjadi anggur menggunakan berbagai konsentrasi dan jenis inokulum, Makalah dipresentasikan pada Seminar Nasional PERHIBI VIII, Palembang, 19 - 20 Nopember 1988.
3. A.S. Pramudi, Skripsi, Universitas Pajajaran, (1988).
4. A.T. Karossi, A.S. Pramudi dan O. Suwaryono, Study on formation of cashew vinegar, Proceedings of the Food Conference '88, Bangkok, 1988, hal 394.
5. S.P. Raharti, T.A. Budiwati dan A.T. Karossi, Fermentasi anggur sari buah jambu mete untuk produksi asam cuka, Makalah dipresentasikan pada Seminar Nasional PERHIBI VIII, Palembang, 19 - 20 Nopember 1988.
6. T.A. Budiwati, S.P. Raharti dan A.T. Karossi, Pengaruh pemberian gelatin pada fermentasi sari buah jambu mete terhadap etanol dan asam asetat yang dihasilkan, Proseding Kajian Kimiawi Pangan II, PAU Pangan Gizi, Universitas Gadjah Mada, Yogyakarta, 1989, hal 233
7. S.P. Raharti, T.A. Budiwati dan A.T. Karossi, Fermentasi anggur dan asam asetat skala fermentor 4L dari sari buah jambu mete, Proseding Kajian Kimiawi Pangan II, PAU Pangan Gizi, Universitas Gadjah Mada, Yogyakarta, 1989, 175
8. Julia Kantasubrata dan A.T. Karossi, The determination of carboxylic acids, saccharose and ethanol of fermentation broth using ion suppression reversed phase HPLC, Proceedings of the Food Conference '88, Bangkok, 1988, hal 475.
9. Choosing the Right Column Chemistry for Carbohydrate Analysis, Notes Food & Beverage, Waters Chromatography Division Millipore Corporation, 2: 4-6 (1987).
10. Julia Kantasubrata, A.T. Karossi dan A.S. Pramudi, HPLC in the analysis of cashew apple juice fermentation broths, Makalah dipresentasikan pada International Conference: Biotechnology and Food, Stuttgart, 20 - 24 February 1989.
11. Julia Kantasubrata dan A.T. Karossi, Alternative methods used for monitoring cashew-apple fermentation process, Food Forums Proceedings, Chemistry International, Brisbane, 1989, hal 133.
12. Julia Kantasubrata dan A.T. Karossi, Studi Perbandingan Metoda Analisa Gula menggunakan Teknik Spektrofotometri dan HPLC, Makalah dipresentasikan pada Seminar Nasional PERHIBI ke IX, Medan, 22 - 24 Januari 1991.
13. Karossi, A.T., Thelma A. dan Linar Z. Udin, Utilization of Agroindustrial by-product for biosynthesis of oxytetracycline, Makalah dipresentasikan pada Seventh Australian Biotechnology Conference, Melbourne, 25 - 28 Agustus 1986.
14. T.A. Budiwati dan A.T. Karossi, Pemanfaatan tetes tebu pada pembuatan antibiotika oleh Streptomyces rimosus ATCC 33022, Buletin Limbah Pangan II: 190-200 (1986)

15. Linar Z. Udin, A.T. Karossi dan Thelma A. Budiwati, Oksitetrasiklin hasil fermentasi media tetes tebu oleh *Streptomyces rimosus* ATCC 33022, Makalah dipresentasikan pada Seminar Nasional dan Temu Ilmiah Himpunan Kimia Indonesia, Surabaya, 17 - 19 November 1986.
16. A.T. Karossi, Thelma A. Budiwati dan Linar Z. Udin, Suatu usaha produksi oksitetrasiklin menggunakan tetes tebu dan bahan turunannya, Makalah dipresentasikan pada Seminar Nasional Produk Alami Bioaktif, Bandung, 11 - 12 Maret 1987.
17. Linar Z. Udin, T.A. Budiwati dan A.T. Karossi, Sukrosa sebagai komponen media penumbuh *Streptomyces rimosus* untuk produksi oksitetrasiklin, Laporan Penelitian 1988/1989, Puslitbang Kimia Terapan - LIPI.
18. Raharti S.P., Skripsi, Institut Teknologi Bandung (1988).
19. Mona, Skripsi, Universitas Padjadjaran (1989).
20. Sri Handayani, Skripsi, Universitas Indonesia (1989).
21. L.Z. Udin, T.A. Budiwati, S.P. Raharti dan A.T. Karossi, Pengaruh konsentrasi asam sitrat pada produksi oksitetrasiklin dalam media yang mengandung HFS, Laporan Penelitian 1989/1990, Puslitbang Kimia Terapan - LIPI.
22. Thelma A. Budiwati, A.T. Karossi dan Linar Z.U., Studi pembuatan oksitetrasiklin pada media tetes dengan amonium sulfat atau ragi pakan sebagai sumber nitrogen, Buletin Limbah Pangan IV: 430-436 (1988).
23. T.A. Budiwati dan A.T. Karossi, Penggunaan amonium sulfat dengan berbagai konsentrasi pada media tetes untuk pembentukan antibiotik, Laporan Penelitian 1988/1989, Puslitbang Kimia Terapan - LIPI.
24. T.A. Budiwati, A.T. Karossi dan L.Z. Udin, Utilization of Fodder yeast in the medium of molasses for antibiotic production by *Streptomyces rimosus* ATCC 33022, Makalah dipresentasikan pada 8th International Biotechnology Symposium, Paris, 17 - 22 Juli 1988.
25. L.Z. Udin, S.P. Raharti dan A.T. Karossi, Pengaruh penambahan metionin pada biosintesa oksitetrasiklin oleh *S. rimosus* ATCC 33022, Laporan Penelitian 1989/1990, Puslitbang Kimia Terapan - LIPI.
26. Lindajati T.W., Lik Anah dan Hari Rom H., Pembuatan oksitetrasiklin skala 4 liter dan 80 liter, Laporan Penelitian 1989/1990, Puslitbang Kimia Terapan - LIPI.
27. Evita Boes, Julia Kantasubrata dan A.T. Karossi, Metoda HPLC dan Spektrofotometer untuk monitoring hasil fermentasi tetrasiklin, Makalah dipresentasikan pada Seminar Nasional PERHIBI ke IX, Medan, 22 - 24 Januari 1991.
28. Kim H.S., Choi C.K., Park Y.H., Determination of cholesterol and its fermentation products by HPLC, *J. Chrom.* 398: 372 - 374 (1987).
29. T.A. Budiwati, S.Pujiraharti, J. Kantasubrata, A.T. Karossi, Biokonversi steroid oleh *Mycobacterium phlei* DSM 43286, Laporan intern P3KT-LIPI, 1991.
30. Jost W., Hauck H.E., Eisenbeiß F., Thin Layer Chromatography as a pilot technique for transferring retention data to HPLC, *Kontakte* 3: 45 (1984).
31. Loyniwati, Julia Kantasubrata, A.T. Karossi, Syafsir Akhlus, Transposisi data dari pelat KLT pada kolom KCKT. Laporan Intern.