



AKTIVITAS ANTI BAKTERI KITOSAN DARI CANGKANG KERANG SIMPING PADA KONDISI LINGKUNGAN YANG BERBEDA : KAJIAN PEMANFAATAN LIMBAH KERANG SIMPING (*Amusium sp.*)

Rina Setyowati Sulistiyoningrum^{*)}, Jusup Suprijanto dan Agus Sabdono

Program Studi Ilmu Kelautan, Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan, Universitas Diponegoro

Kampus Tembalang, Semarang 50275 Telp/Fax. 024-7474698

email : rina.marine@gmail.com

Abstrak

Limbah merupakan salah satu masalah besar di berbagai Negara di dunia, salah satunya yaitu limbah hasil laut seperti cangkang kerang. Limbah tersebut dapat diolah menjadi kitin dan kitosan. Kitosan sendiri memiliki berbagai manfaat yang memiliki nilai ekonomi yang relatif tinggi, salah satunya sebagai sumber antibakteri alami sehingga dapat diproduksi secara efektif. Derajat deasetilasi kitosan ditentukan dengan menggunakan data dari spektra FTIR dan diperoleh nilai sebesar 69,11349%. Hasil penelitian menunjukkan kitosan yang larut dengan asam asetat 1%. Uji antibakteri kitosan terhadap *e.coli* dan *S. aureus* menunjukkan adanya pembentukan zona hambat pada media agar. Kitosan memberikan zona hambat besar pada konsentrasi 0.01 µg/disk dan 0.02 µg/disk namun faktor kondisi media yang digunakan juga berpengaruh terhadap pertumbuhan kedua bakteri. Bakteri *E. coli* lebih sensitif terhadap salinitas daripada bakteri *S. aureus*, dan bakteri *S. aureus* lebih sensitif terhadap pH daripada bakteri *E. coli*.

Kata Kunci : *Amusium sp.*; kitin; kitosan; limbah cangkang; uji anti bakteri

Abstract

Waste is one of the major problems in various countries in the world, one of which is the waste of marine products, for example clam shells. This waste can be processed into chitin and chitosan. Chitosan alone has a lot of benefits that have relatively high economic value, such as chitosan as a natural source antibacterial that can be effectively produced. Deacetylation degree of chitosan determined by using data from FTIR spectra and the value was 69.11349%. The results showed that there were soluble chitosan with 1% acetic acid. In the antibacterial test of chitosan on *E. coli* and *S. aureus* showed inhibition zone on agar medium. Chitosan provided large inhibition zones on 0.01 µg/disk and 0.02 µg/disk concentrations, however conditions factor of the media effected the growth of those bacteria. Bacteria *E. coli* bacterium was more sensitive to salinity than thah of *S. aureus*, while the *S. aureus* bacterium is more sensitive to pH than that of *E. coli* bacterium.

Keywords: *Amusium sp.*; chitin; chitosan; waste shells; anti-bacterial test

^{*)} Penulis penanggung jawab

Pendahuluan

Indonesia merupakan negara penghasil sumberdaya kelautan yang sangat besar. Pembangunan Perikanan yang sedang digalakkan saat ini selain menghasilkan produk untuk memenuhi kebutuhan pangan, industri maupun sumber pendapatan, juga menghasilkan limbah baik berupa limbah padatan, cairan maupun gas (Harini *et al.*, 2004). Hasil

sampingan dan limbah perlu manajemen pengelolaan yang tepat, karena memiliki kemungkinan yang sangat tinggi untuk menjadi rusak, berpengaruh pada aksi dari jasad renik yang berperan dalam proses perkembangan yang sempurna (Ferraro *et al.*, 2010)).

Kerang *Amusium sp.* adalah salah satu kerang di Indonesia yang dipasarkan secara lokal dan juga diekspor ke luar

negeri. Produk ini dapat ditemukan di sepanjang pantai utara Jawa Tengah (Brebek, Tegal, Pemalang, Pekalongan, Weleri-Kendal, Semarang) dan Jawa Timur (Tuban, Pasuruan). Masyarakat mengkonsumsi daging segar kerang simping, sedangkan cangkang kerang sering digunakan oleh masyarakat Jawa Timur untuk hiasan atau aksesori (Susilowati *et al.*, 2008). Pemanfaatan dari kerang simping di Indonesia masih di bawah kapasitas dan dapat diperbesar dengan nilai tambah yang diperlukan.

Kitin dan kitosan merupakan senyawa golongan karbohidrat yang dapat dihasilkan dari limbah hasil laut, khususnya golongan udang, kepiting, ketam, dan kerang (Harini *et al.*, 2004). Manfaat kitin dan kitosan di berbagai bidang industri moderen cukup banyak, diantaranya dalam industri farmasi, biokimia, bioteknologi, biomedikal, pangan, gizi, kertas, tekstil, pertanian, kosmetik, membran dan kesehatan.

Kitosan yang diperoleh diujikan dengan bakteri *S. aureus* dan *E. coli*, hal ini dipilih karena kitosan yang merupakan turunan N-deasetilasi kitin. Kitosan merupakan senyawa yang dapat didegradasi dan tidak beracun. Kitosan merupakan polikationik dalam media asam dan memberikan aktivitas antibakteri (Kurniasih & Kartika, 2009).

Materi dan Metode

Materi penelitian ini menggunakan limbah cangkang kerang dari limbah kerang simping (*Amusium sp.*) Bakteri uji yang digunakan yaitu *S. aureus* yang mewakili bakteri Gram positif dan *E. coli* yang merupakan bakteri Gram negatif, sehingga mewakili uji dari segi ketahanan jenis bakterinya.

1. Demineralisasi

Cangkang kerang dicuci dan dikeringkan, kemudian digiling. Kemudian dilakukan proses demineralisasi (proses penghilangan mineral) dengan HCl 1%,

pada suhu kamar antara 28-32°C, dan diaduk selama 30 menit. Residu yang diperoleh dari proses demineralisasi dicuci dan direndam dalam air selama 6-8 jam dan dikeringkan (Darmanto *et al.*, 2011).

2. Deproteinasi

Randemen dari proses demineralisasi kemudian dilanjutkan proses deproteinase (proses penghilangan protein) dengan larutan NaOH 3,5%, pada suhu 65°C dan diaduk selama 2 jam. Residu yang diperoleh dari proses deproteinasi disaring sehingga diperoleh padatan bebas dari kandungan protein, kemudian dicuci dengan *aquadest* hingga diperoleh pH netral, dikeringkan dan diperoleh kitin (Darmanto *et al.*, 2011).

3. Deasetilasi

Proses deasetilasi (proses penghilangan gugus asetil) dilakukan setelah kitin diperoleh, yaitu dengan menggunakan NaOH 50%, pada suhu 100°C, dan diaduk selama 1 jam. Randemen yang diperoleh dalam proses deasetilasi disaring dengan kertas saring (*whatman* 42) dan dicuci dengan *aquadest* hingga pH netral kemudian dikeringkan, sehingga diperoleh padatan yang berupa produk kitosan (Darmanto *et al.*, 2011).

4. Uji FTIR

Gugus fungsi kitosan dikarakterisasi menggunakan FTIR (Kusumaningsih *et al.*, 2004). Pada penelitian kali ini uji FTIR dilakukan di laboratorium Teknik Kimia, Universitas Diponegoro, Semarang dan Laboratorium Kimia, Universitas Negeri Sebelas Maret, Surakarta.

5. Uji Anti Bakteri

Media Zobell 2216E yang dibuat dengan variasi pada pelarut media dengan pH (5, 6, 7, 8, dan 9) dan salinitas (0 ‰, 10 ‰, 20 ‰, 30 ‰, dan 40 ‰). Kontrol yang digunakan pada dua perlakuan

tersebut menggunakan kondisi kadar air pada umumnya yaitu pada pH 7 dan salinitas 0%. Penelitian uji anti bakteri dalam penelitian ini menggunakan dua kali ulangan. pH dan salinitas media setelah sterilisasi tidak diukur untuk mencegah kontaminasi.

E. coli dan *S. aureus* masing - masing sebanyak 20 µml diambil dengan mikropipet dan diratakan pada permukaan medium Zobell 2216E dalam cawan petri, dengan spreader. Setelah 30 menit media siap digunakan, letakkan *paper disc* (*advantec* 6mm) dengan konsentrasi kitosan sebesar 0 µg/disk, 0.0025 µg/disk, 0.005 µg/disk, 0.01 µg/disk dan 0.02 µg/disk. Pengamatan dilakukan selama 2 kali 24 jam. Inkubasi dilakukan pada suhu kamar selama 24 jam, setelah itu diukur diameter zona beningnya (Pelzcar & Chan 1986).

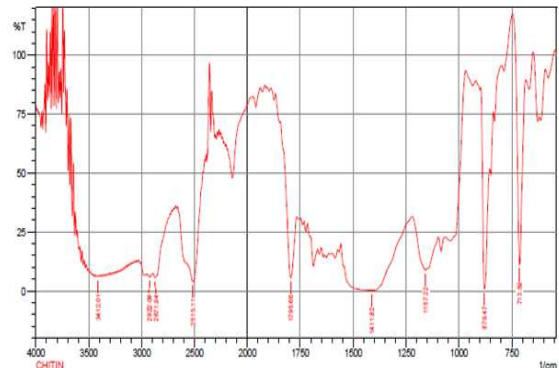
Hasil dan Pembahasan

1. Demineralisasi dan Deproteinasi Menjadi Kitin

Senyawa kitin diperoleh dengan melalui proses deproteinasi dengan menambahkan NaOH encer, dan proses demineralisasi dengan menggunakan HCL. Gelembung gas CO₂ yang berbentuk seperti busa detergen timbul pada saat penambahan HCl, hal ini menunjukkan adanya reaksi HCl dengan garam mineral yang terdapat dalam cangkang kerang simping.

Spektra FTIR kitin ditunjukkan pada Gambar 1, bilangan gelombang 3412,01 cm⁻¹ sebagai akibat vibrasi ulur gugus -OH. Adanya pita serapan pada bilangan gelombang 1157,22 cm⁻¹ menunjukkan vibrasi ulur gugus -C-O-. Serapan pada bilangan gelombang 2922,09 cm⁻¹ dan 2871,94 cm⁻¹ muncul disebabkan oleh vibrasi ulur gugus C-H dari alkana (Silverstein *et al.*, 1986). Serapan uluran gugus -CH₃ dan -CH₂- terletak didaerah 2960-2850 cm⁻¹, sehingga pita yang terdapat pada bilangan gelombang 2922,09

cm⁻¹ dan 2871,94 cm⁻¹ menunjukkan serapan uluran gugus -CH₃ dan -CH₂- (Silverstein *et al.*, 1986).



Gambar 1. Spektra FTIR Kitin

Silverstein *et al.*, (1986) menyatakan bahwa getaran tekuk -NH amida diketahui di daerah 1570-1515 cm⁻¹. Serapan lebar gugus -CH₃ pada amida merupakan tumpang tindih dengan vibrasi tekuk gugus NH amida, sehingga tidak tampak pada spektra ini. Masih adanya serapan gugus karbonil dari amida (kitin) hal ini terlihat ada puncak diantara rentang 713.59 cm⁻¹ dan 879.47 cm⁻¹.

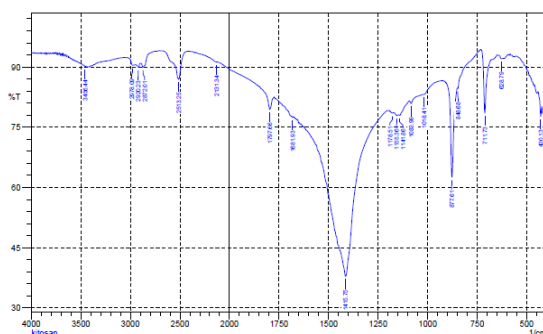
2. Deasetilasi Kitin Menjadi Kitosan

Menurut Kusumaningsih *et al.*, (2004) kitosan diperoleh dengan melakukan proses deasetilasi pada kitin, pada proses tersebut terjadi perubahan gugus asetil (-NHCOCH₃) menjadi gugus amina (-NH₂) dengan cara menambahkan NaOH konsentrasi tinggi. Reaksi deasetilasi kitin pada dasarnya adalah suatu reaksi hidrolisis amida dari -(1-4)- 2-asetamida-2-deoksi-D-glukosa.

Spektra kitosan pada Gambar 2 menginformasikan adanya pita serapan pada bilangan gelombang 3456,44 cm⁻¹ sebagai hasil dari vibrasi rentangan gugus -OH. Lebarnya serapan dan pergeseran bilangan gelombang gugus -OH ini disebabkan adanya tumpang tindih dengan gugus NH dari amina. Serapan pada bilangan gelombang 2872,01 cm⁻¹, 2920,23

cm^{-1} , dan $2978,09 \text{ cm}^{-1}$ mengindikasikan gugus C-H dari alkana yaitu menunjukkan vibrasi ulur gugus $-\text{CH}_2-$ (Silverstein *et al.*,1986).

Hilangnya gugus metil ($-\text{CH}_3$) yang terikat pada amida ($-\text{NHCOCH}_3$) dapat diketahui dari hilangnya serapan pada bilangan gelombang $2918,1 \text{ cm}^{-1}$ serta hilangnya gugus C=O suatu amida ($-\text{NHCO}-$) diketahui dari hilangnya pita serapan yang terdapat pada bilangan gelombang $1647,1 \text{ cm}^{-1}$ dan $1637,5 \text{ cm}^{-1}$. Serapan khas kitosan terlihat pada bilangan gelombang $711,73 \text{ cm}^{-1}$, $848,68 \text{ cm}^{-1}$, dan $877,61 \text{ cm}^{-1}$ menunjukkan getaran tekuk N-H dari amina ($-\text{NH}_2$) (Silverstein *et al.*,1986). Pita serapan pada bilangan $1018,41 \text{ cm}^{-1}$ menunjukkan vibrasi ulur gugus $-\text{C}-\text{O}-$.



Gambar 2. Spektra FTIR Kitin

Kitosan yang diperoleh dari berbagai sumber memiliki struktur yang sama, meskipun diambil dari sampel yang berbeda yaitu $(\text{C}_6\text{H}_{11}\text{NO}_4)_n$, karena sampel mengalami proses yang sama yaitu demineralisasi, deproteinasi dan deasetilasi, sehingga senyawa lain yang menyusun sampel dapat dipisahkan sehingga terbentuk senyawa murni yang berupa kitosan.

Cangkang hasil limbah kerang yang digunakan dalam penelitian ini sebanyak $756,504 \text{ gram}$, setelah digiling menjadi tepung kemudian diayak, diambil ukuran butir yang paling kecil sebanyak 500 gram untuk diproses menjadi kitin dan kitosan,

dan terbentuk menjadi kitin sebanyak $325,3 \text{ gram}$ kitin.

Kitin yang diperoleh kemudian dideasetilasi sebanyak 200 gram dan terbentuk kitosan sebanyak 159 gram kitosan. Umumnya kitosan yang dihasilkan dari cangkang moluska sebanyak 1% , namun pada penelitian ini sebanyak 60% , hal ini dapat terjadi karena metode yang dipakai dalam pemurnian kitosan berbeda.

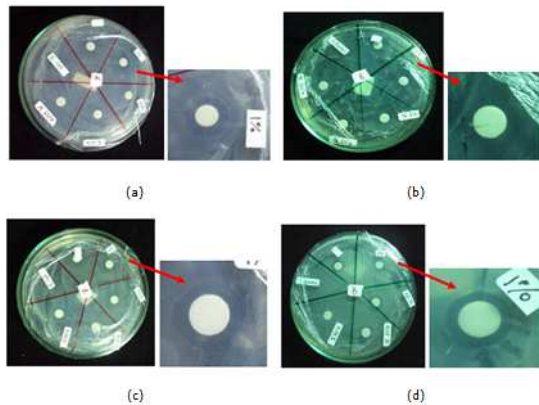
Penghitungan derajat deasetilasi dilakukan untuk mengetahui terbentuknya kitosan dari kitin. Derajat deasetilasi berpengaruh terhadap kelarutan kitosan terhadap pelarut, sehingga dalam pelarutan kitosan kedalam asam asetat 1% berpengaruh terhadap lamanya pengadukan, serta homogenitas dari larutan kitosan itu sendiri yang nantinya berperan sebagai senyawa anti bakteri. Derajat deasetilasi kitosan pada penelitian ini sebesar $69,11349\%$, sehingga mendekati parameter mutu kitosan khususnya DD dapat digunakan untuk menentukan pemakaiannya di industri.

Menurut Tsugita (1997) dalam Yulina (2011), pada industri pengolahan makanan menggunakan kitosan dengan $\text{DD} \geq 70\%$, sedangkan untuk industri kosmetik kitosan yang digunakan memiliki $\text{DD} \geq 80\%$ dan bidang biomedis dibutuhkan kitosan yang memiliki $\text{DD} \geq 90\%$. DD kitosan berpengaruh terhadap kemampuannya sebagai anti bakteri, dimana jika derajat deasetilasi kitosan bertambah maka homogenitasnya juga semakin tinggi sehingga kitosan lebih cepat bereaksi dalam merusak dinding sel (mengikat molekul negatif pada dinding sel).

3. Uji Anti Bakteri

Uji anti bakteri berfungsi untuk mengetahui keaktifan kitosan terhadap bakteri uji, karena aktivitas antibakteri dari kitosan diperlihatkan dengan muncul zona hambat atau daerah bening disekitar paper disk seperti pada Gambar 3. Apabila zona

hambat tidak nampak diasumsikan bahwa tidak ada zona hambat pada film tersebut (Darmantao *et al.*, 2011). Antimikroba dari kitosan ataupun turunannya, berasal dari muatan molekul kation kitosan untuk mengikat secara agresif hingga ke permukaan sel mikroba, memimpin penyusutan bertahap membran sel dan akhirnya terjadi kematian sel.



Gambar 3. Zona Hambat Kitosan Terhadap Bakteri (a) *E. coli* pH (b) *S. aureus* pH (c) *E. coli* salinitas (d) *S. aureus* salinitas

Menurut Prashanth & Tharanathan (2007) aktivitas antimikroba, yaitu. molekul polikationik kitosan berinteraksi dengan sel didominasi komponen anionik dinding (lipopolisakarida dan protein) dari mikroorganisme, yang mengakibatkan kebocoran intraseluler komponen akibat perubahan permeabilitas membrane, mencegah nutrisi memasuki sel, pada saat masuk ke sel, mengikat DNA, menghambat RNA dan sintesis protein, mengikat melalui interaksi hidrofobik. Kitosan menunjukkan spektrum luas aktivitas antimikroba terhadap kedua gram positif dan bakteri gram negatif dan jamur.

Aktifitas antibakteri kitosan berhubungan dengan karakteristik permukaan sel mikroba tersebut. Hal ini dikarenakan muatan positif yang berasal dari gugus asam amino dalam suasana pH asam (dibawah 6,5), yang menyebabkan depolarisasi membran seluler mikroba,

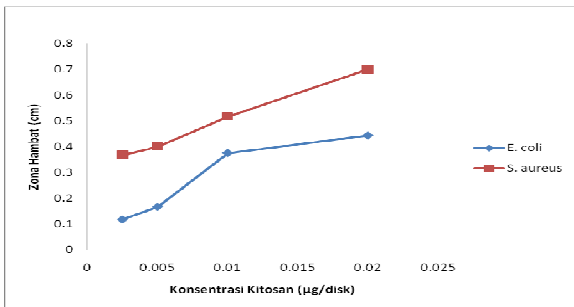
sebagai akibat terganggunya integritas dinding sel dari hubungan molekul yang menyebabkan kematian bagi mikroba. Kitosan tidak larut dalam air diatas pH 5.5, basa dan kebanyakan pelarut organik, tetapi ,larut dalam asam organik encer (Swastawati *et al.*, 2007), sehingga pada suasana asam kitosan dapat larut dan bekerja, sedangkan dalam suasana basa dia tidak akan bereaksi.

Uji kualitatif (anti bakteri) aktivitas penghambat bakteri *E. coli* dan *S. aureus* dengan larutan kitosan, pada penelitian ini digunakan parameter perairan yaitu pH dan salinitas. Dalam penelitian ini konsentrasi yang baik digunakan sebagai antibakteri yaitu pada konsentrasi 0.01 µg/disk dan 0.02 µg/disk, pada konsentrasi tersebut zona hambat yang terbentuk besar.

Menurut Waluyo (2005) pertumbuhan dan perkembangan mikroorganisme dipengaruhi oleh konsentraasi ion hydrogen, misalnya pH media. Kebanyakan bakteri dapat tumbuh hanya dengan rentang pH 4-9. Mekanisme matinya bakteri oleh kitosan diakibatkan adanya muatan positif kitosan yang mengikat muatan negative pada dinding sel yaitu protein sehingga terjadi kerusakan dinding sel, sehingga mengganggu pemasukan nutrisi yang akan masuk ke sel dan mengganggu sintesis DNA dan RNA sehingga terjadi pemutusan dan kematian.

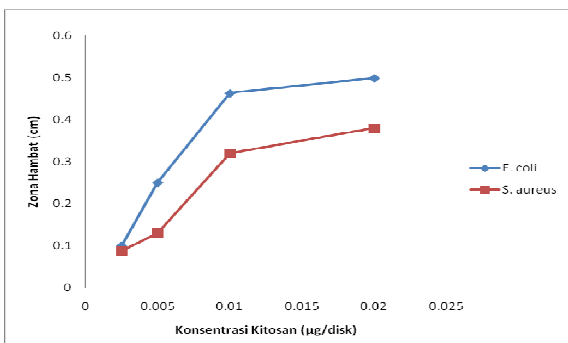
Zona hambat pada bakteri *E. coli* dan bakteri *S. aureus* pada media yang disesuaikan pH nya (Gambar 4) terlihat kitosan lebih aktif pada bakteri *S. aureus*, zona hambat yang terbentuk lebih besar daripada bakteri *E. coli*, hal ini disebabkan ketahanan masing – masing bakteri terhadap kondisi pH berbeda, bakteri *S. aureus* tumbuh optimum pada kondisi pH antara 7 –7.5 serta mampu bertahan hidup minimum pada 4.2, maksimum 9.3, sedangkan rentang pH nya lebih panjang, *E. coli* dapat tumbuh optimum pada pH 6 -

7, dan dapat bertahan hidup pada kisaran pH 4.4 –9. (ESR, 2001).



Gambar 4. Grafik Aktivitas Antibakteri Kitosan Terhadap *E. coli* dan *S. aureus* pada pH yang Sama

Perbandingan salinitas juga menentukan sebagian besar komunitas kehidupan di air. Konsentrasi NaCl pada air laut menentukan perbedaan perkembangan fisiologis organism air tawar dan air laut (Waluyo, 2005). Menurut Waluyo (2005), kadar garam optimum untuk sebagian besar bakteri halofilik dan fungi antara 2.5% dan 4 %. Rentang ini meliputi garam alamiah yang terdapat pada laut dalam; dan rata-rata pada laut terbuka 3.5%. Pada daerah air payau, organisme halofilik dengan kadar garam optimal 0.5% - 2%.



Gambar 5. Grafik Aktivitas Antibakteri Kitosan Terhadap *E. coli* dan *S. aureus* pada Salinitas yang Sama

Zona hambat pada bakteri *E. coli* dan bakteri *S. aureus* pada media yang disesuaikan salinitasnya, terlihat pada Gambar 5 kitosan lebih aktif pada bakteri *E. coli* dimana zona hambat yang terbentuk lebih besar daripada bakteri *S. aureus*. Hal tersebut terjadi karena kemampuan bakteri

S. aureus dalam berhadapan dengan kondisi NaCl lebih baik daripada bakteri *E. coli*, menurut pelczar (1986) *S. aureus* optimum pada pH 7.0 – 7.5, batas bawah pada pH 4.2 dan batas atas pada pH 9.3, sedangkan menurut ESR (2001) jumlah garam diperlukan untuk mengurangi hambatan sebagai faktor-faktor lain seperti suhu dan pH menjadi mendekati optimal (sub-optimal). bakteri *E. coli* dalam suhu 37 oC pada kondisi 8,5% NaCl pertumbuhannya dapat terhambat, pertumbuhan bakteri *E. coli* dapat berlangsung hingga kondisi NaCl 2,5%.

Kesimpulan

Kitosan yang diperoleh dari cangkang kerang (*Amusium sp.*) memiliki derajat deasetilasi (DD) sebesar 69,11349% dan dapat dimanfaatkan sebagai anti bakteri, zona hambat yang bagus yaitu pada konsentrasi 0.01 µg/disk dan 0.02 µg/disk. Salinitas dan pH berpengaruh terhadap pembentukan zona hambat, pada pH 6, pH7, salinitas 0‰, dan salinitas 10‰, zona hambat yang terbentuk kecil. Bakteri *E. coli* lebih sensitif terhadap salinitas daripada bakteri *S. aureus*, dan bakteri *S. aureus* lebih sensitif terhadap pH daripada bakteri *E. coli*.

Ucapan Terimakasih

Penulis menyampaikan terimakasih kepada Dr. Ir. Jusup Suprijanto, DEA dan Prof. Dr. Ir. Agus Sabdono, MSc sebagai dosen pembimbing yang telah memberikan pengarahan dan petunjuk dalam menyelesaikan jurnal ilmiah ini serta semua pihak dan instansi yang telah memberikan bantuan dan fasilitas dalam penulisan jurnal ilmiah ini.

Daftar Pustaka

Anonim, 2001. *Prepared for the Ministry of Health*. ESR Ltd. (5 Juli 2013)



- Darmanto, M., Atmaja, L., Nadjib, M., 2011. *Studi Analisis Antibakteri dari Film Gelatin-Kitosan Menggunakan Staphylococcus Aureus*. Jurusan Kimia, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam. Institut Teknologi Sepuluh Nopember. Surabaya. (8 Halaman)
- Ferraro, V., Cruz, I.B., Jorge, R.F., Malcata, F.X., Pintado, M.E., and Castro, P.M.L., 2010. *Valorisation of natural extracts from marine source focused on marine by-products: A review*. Food Research International. Elsevier Ltd. All rights reserved. 43 (2010) (Page 2221–223)
- Harini, N, Winarni, S, dan Setyaningsih, E., 2004. *Pemanfaatan Teknologi Pengolahan Limbah Kulit /Kepala Udang Menjadi Chitosan Untuk Ingredient Pembuatan Permen Di Home Industri Kebon Agung Kepanjen Malang*, Fak. Pertanian UMM, Malang. *Junal Dedikasi* Volume I No. 2 (Halaman 1-17)
- Kurniasih, M., dan Kartika, D., 2009. *Aktivitas Antibakteri Kitosan Terhadap Bakteri S.aureus*. Fakultas Sains dan Teknik. Universitas Jenderal Soedirman. Purwokerto.
- Kusumaningsih, T., Masykur, A., Arief, U., 2004. *Pembuatan Kitosan dari Kitin Cangkang Bekicot (Achatina Fulica) Synthesis of Chitosan from Chitin of Escargot (Achatina Fulica)*, Jurusan Kimia Fmipa, Universitas Sebelas Maret, Surakarta. (Halaman 64 – 68)
- Pelzcar, M.J. and Chan, E.C.S., 1986. *Dasar – dasar Mikrobiologi*. UI – Press. Jakarta. (443 Halaman)
- Prashanth, H.K.V, and Tharanathan, R.N., 2007. *Chitin/chitosan:modifications and their unlimited application potential-an overview*. Department of Biochemistry & Nutrition. Central Food. Technological Research Institute. India. ELSEVIER, Trends in Food Science & Technology (Page 117-131)
- Silverstein et al., 1986. *Penyidikan Spektrometri Senyawa Organik*. Erlangga. Jakarta.(476 Halaman)
- Susilowati, I., Widowati, I., Agustini, T.W., and Raharjo. A.B., 2008. *Empowering A-B-G-C to Promote Simping Clam (Amusium pleuronectes) as one of the way out line to raise the welfare of Fishers and Regional Income in Northern-Coast of Central Java-INDONESIA: with Special Reference to Brebes Regency as the Pilot Project*. Research Institutes. Diponegoro University (UNDIP). Semarang. (11 Halaman)
- Swastawati, F., Fahmi, A.S., Riyadi, P.H. 2007. *Pemanfaatan Limbah Hasil Perikanan*. Badan Penerbit Universitas Diponegoro. Semarang. (96 Halaman)
- Waluyo, L., 2005. *Mikrobiologi Lingkungan*. UMM Press. Malang. (469 Halaman)
- Yulina, I. K., 2011, *Aktivitas Antibakteri Kitosan Berdasarkan Perbedaan Derajat Deasetilasi dan Bobot Molekul*. Sekolah Pascasarjana Institut Pertanian Bogor. Bogor. (78 Halaman)