

Imobilisasi *Crude Enzyme* Dari Limbah Buah dan Sayur Menggunakan Material Berbasis Cangkang Telur

Immobilization of Crude Enzyme from Fruit and Vegetable Waste Using Eggshell-Based Material

Ery Susiany Retnoningtyas¹✉, Adriana Anteng Anggorowati², Shella Permatasari Santoso¹, Debora Ayuningtyas³, Kevina Tomiko Juanda³

¹Chemical Engineering Master Program, Widya Mandala Surabaya Catholic University, Surabaya, Indonesia

²Professional Engineer Study Program, Widya Mandala Surabaya Catholic University, Surabaya, Indonesia

³Department of Chemical Engineering, Widya Mandala Surabaya Catholic University, Surabaya, Indonesia

✉Corresponding author email: ery@ukwms.ac.id

Article history: submitted: February 11, 2024; accepted: July 20, 2024; available online: July 31, 2024

Abstract. The abundance of agricultural waste such as fruit peels, vegetable waste and egg shells has the opportunity to be processed into valuable products such as enzymes and biomaterials. The shift in industrial processes towards a more environmentally friendly direction has gradually given rise to the need for enzymes as reaction biocatalysts. This research aims to study the potential of egg shell waste as a support material for immobilizing crude enzymes produced from fermentation of dragon fruit peels, orange peels, avocado peels and vegetable waste, namely water spinach rootstock. The research was carried out on a laboratory scale. The experimental method is divided into several stages, namely: synthesis of crude enzyme from fruit and vegetable waste, purification of enzyme by concentration, synthesis of eggshell-based material, and the final stage is immobilization of crude enzyme into the material. The results of this study indicate that egg shell membrane (MCT) and processed egg shell into hydroxyapatite (HA) material have the potential to be materials for immobilizing crude enzyme respectively: $33.05 \pm 3.62 \text{ U.mL}^{-1}$ and $46.73 \pm 0.27 \text{ U.mL}^{-1}$ for MCT and HA. These results indicate that HA material has more potential than MCT for use as enzyme immobilization. HA material from egg shells which is able to immobilize crude enzymes provides an illustration of the benefits of waste into products that can be used to develop processes in industries that are environmentally conscious.

Keywords: crude enzyme; egg shell; immobilization

Abstrak. Berlimpahnya sisa hasil pertanian seperti kulit buah, sisa sayur dan cangkang telur berpeluang untuk diolah menjadi produk yang berharga seperti enzim maupun biomaterial. Beralihnya proses industri ke arah yang lebih ramah lingkungan berangsur-angsur memunculkan kebutuhan enzim sebagai biokatalis reaksi. Penelitian ini bertujuan untuk mempelajari potensi limbah cangkang telur sebagai material *support* untuk mengimobilisasi *crude enzyme* yang dihasilkan dari fermentasi kulit buah naga, kulit jeruk, kulit alpukat dan sisa sayur yaitu sisa batang bawah kangkung. Penelitian dilakukan dalam lingkup skala laboratorium. Metode percobaan terbagi menjadi beberapa tahapan yaitu: sintesa *crude enzyme* dari limbah buah dan sayur, purifikasi enzim dengan pemekatan, sintesa material berbahan dasar cangkang telur, dan tahap terakhir adalah imobilisasi *crude enzyme* ke dalam material. Hasil penelitian ini menunjukkan bahwa membran cangkang telur (MCT) dan olahan cangkang telur menjadi material *hydroxyapatite* (HA) berpotensi menjadi material untuk mengimobilisasi *crude enzyme* berturut-turut: $33,05 \pm 3,62 \text{ U.mL}^{-1}$ dan $46,73 \pm 0,27 \text{ U.mL}^{-1}$ untuk MCT dan HA. Dari hasil ini mengindikasikan bahwa material HA lebih berpotensi daripada MCT untuk digunakan sebagai imobilisasi enzim. Material HA dari cangkang telur yang mampu mengimobilisasi *crude enzyme* ini memberikan gambaran akan manfaat limbah menjadi produk yang dapat digunakan untuk pengembangan proses di industri yang konsen terhadap lingkungan.

Kata kunci: cangkang telur; *crude enzyme*; imobilisasi

PENDAHULUAN

Produksi telur ayam di Indonesia mengalami kenaikan tiap tahunnya. Bahkan kenaikannya hingga 9,9% untuk tahun 2023 yaitu sebesar 6.117.905,40 ton (BPS, 2023). Keadaan ini menunjukkan bahwa tingkat konsumsi telur di Indonesia cukup tinggi,

tentunya limbah cangkang telur yang dihasilkan juga meningkat. Limbah cangkang telur ini harus dikendalikan agar tidak menimbulkan pencemaran lingkungan. Komposisi kimia dari cangkang telur adalah 94% berupa kalsium karbonat dan sisanya adalah mineral seperti P, Mg, Na, K, Zn, Mn sedangkan bagian membran cangkang

telurnya banyak mengandung protein sekitar 90%, lemak 3%, gula 2% dan sisanya mineral 5 % (Han et al., 2023). Oleh karena itu apabila tidak diolah dengan baik akan menjadi tempat hidupnya mikroorganisme yang dapat mencemari lingkungan, berupa bau yang kurang sedap hasil degradasi protein yang berasal dari membran cangkang telur yang banyak mengandung protein, lemak dan gula tempat yang subur bagi mikroba pembusuk.

Pemanfaatan limbah cangkang telur menjadi suatu material yang mempunyai nilai yang tinggi telah banyak dilakukan seperti di bidang pertanian menjadi pupuk tanaman (Vu et al., 2022), bidang farmasi menjadi komponen produk kosmetik, (Baláz et al., 2021), bidang industri menjadi material *calcite* (Cree & Rutter, 2015), dan imobilisasi biomassa ataupun enzim (Rasheed et al., 2020; Shahrin et al., 2020). Pemanfaatan cangkang telur sebagai material untuk mengimobilisasi enzim, saat ini berkembang seiring dengan maraknya proses hijau. Proses hijau lebih diminati karena lebih ramah terhadap lingkungan. Penggunaan enzim dalam industri merupakan alternatif proses yang potensial dikembangkan.

Produksi enzim dapat dilakukan melalui proses fermentasi limbah buah dan sayur seperti nenas, jeruk, mangga, tomat dan kembang kol (Arun & Sivashanmugam, 2015). Tetapi harga enzim yang mahal menjadi kendala untuk diaplikasikan di industri, sehingga metode imobilisasi enzim merupakan salah satu alternatif untuk menyelesaikan permasalahan ini. Beberapa keunggulan dari enzim yang diimobilisasi adalah meningkatkan kestabilan, memudahkan pemeliharaan, mempermudah pemisahan dengan produk, serta dapat digunakan kembali (*reuse*) (Shahrin et al., 2020).

Tujuan penelitian ini adalah mempelajari kinerja limbah cangkang telur sebagai media untuk mengimobilisasi enzim selulase kasar (*crude*) yang dibuat dari limbah sisa hasil pertanian. Enzim selulase sering digunakan dalam industri *pulp* dan kertas, *biofuel*

maupun industri bahan kimia etanol (Imran et al., 2019; Hamzah et al., 2019; Pardeny et al., 2023; Widyaningrum & Rizqiyah, 2023).

METODE

Penelitian ini dilakukan di laboratorium Biomaterial, Universitas Katolik Widya Mandala Surabaya dengan waktu selama 12 bulan. Pada penelitian ini terbagi dalam 4 tahap: (1) sintesa enzim, (2) purifikasi *crude enzyme*, (3) sintesa material dan (4) imobilisasi enzim ke dalam material. Tahapan ini berdasarkan metode yang telah dilakukan oleh Ainiyah tetapi dengan modifikasi (Ainiyah, 2017).

Tahap (1): Dimulai dengan pemilihan sisa hasil pertanian yang akan digunakan sebagai bahan baku dalam sintesis enzim berdasarkan kandungan makro nutrisi (karakterisasi bahan baku). Hasil pertanian yang mengandung makro nutrisi karbohidrat, lemak, protein, dan serat seperti kulit buah naga, kulit jeruk, kulit alpukat serta batang kangkung dipilih untuk substrat bagi mikroba untuk produksi enzim dengan menambahkan molase sebagai sumber karbon. Setelah itu dilakukan proses fermentasi untuk masing-masing jenis substrat kulit buah dan sisa sayur tersebut, dengan menggunakan beberapa jenis mikroba yaitu bakteri dan fungi yang biasa digunakan untuk pangan. Untuk bakteri dipilih *mixed culture* spesies konsorsium bakteri probiotik yaitu *Lactobacillus bulgaricus*, *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus acidophilus* dan *Lactobacillus plantarum* sedangkan fungi dipilih khamir *Saccharomyces cereviceae*. Proses fermentasi berlangsung selama 2 bulan dengan suhu fermentasi 30°C.

Pemilihan suhu fermentasi ini agar mendekati suhu ruang dan supaya kinerja optimal maka durasi waktu fermentasi selama 2 bulan. Kondisi ini untuk mendapatkan aktivitas enzim yang paling tinggi sehingga dapat diaplikasikan pada produksi skala industri dengan meminimalkan kebutuhan energi. Proses fermentasi dilakukan dalam fermentor yang dibuat dari botol plastik bertutup volume 1,5 Liter yang dilengkapi

dengan selang yang dihubungkan dengan botol plastik volume 600 mL tanpa tutup yang berisi 200 mL etanol untuk menjaga agar kondisi tetap steril dan gas yang terbentuk selama proses fermentasi dapat keluar dari fermentor. Untuk pengukuran aktivitas *crude enzyme* dipilih kondisi pH dan suhu optimum masing-masing aktivitas *crude enzyme*. Tahap (2): Proses pemurnian *crude enzyme* dipilih proses pemekatan dengan metode evaporasi dengan menggunakan *rotary evaporator*.

Tahap (3): Sintesa material berbahan dasar cangkang telur yaitu membran cangkang telur (MCT) dan *hydroxyapatite* (HA) yang dibuat dari cangkang telur. Proses pembuatan ke-2 material ini akan dijelaskan lebih lanjut. Tahap (4) Imobilisasi enzim ke dalam material, dilakukan dengan metode adsorpsi selama 24 jam dengan suhu 30°C sambil di-*shaker* 145 rpm di dalam alat *Shaker Memmerth*. Selanjutnya dilakukan analisis untuk mengukur banyaknya enzim yang terimobilisasi ke dalam material. Analisis yang dilakukan adalah analisis aktivitas enzim terimobilisasi dengan metode CMCase dan analisis kandungan protein yang terimobilisasi dengan metode *Bradford*.

Metode pembuatan material MCT dapat dijelaskan sebagai berikut: mula-mula limbah cangkang telur ayam dibersihkan terlebih dahulu dengan air. Membran kemudian secara perlahan dipisahkan dari cangkangnya dan dibersihkan dengan aquades selanjutnya dikeringkan pada suhu kamar. Untuk menghomogenkan kondisi maka dilanjutkan dengan proses pengeringan menggunakan *Oven Memmert* pada suhu 70°C selama 3 jam. Setelah kering, MCT dihaluskan menggunakan blender dan diayak hingga 140 mesh dan siap digunakan.

Persiapan sintesis material HA dari cangkang telur dimodifikasi dari (Sanosh et al., 2009). Serbuk cangkang telur dikalsinasi pada suhu 900°C selama 5 jam. Serbuk CaO yang dihasilkan dari proses kalsinasi kemudian dilarutkan dengan cairan asam nitrat pekat (HNO₃) 65%. CaO yang telah larut kemudian diencerkan dengan aquades

sehingga didapatkan larutan kalsium nitrat (Ca(NO₃)₂) 1 M. Secara perlahan, larutan kalium dihidrogen fosfat (KH₂PO₄) 0,6 M ditambahkan ke dalam larutan kalsium nitrat (Ca(NO₃)₂) sambil diaduk. Kedua larutan tersebut ditambahkan amonia untuk mempertahankan pH 10 sambil diaduk menggunakan *magnetic stirrer* selama 1 jam. Kemudian larutan tersebut didiamkan selama 24 jam. Selama 24 jam, larutan terbentuk 2 bagian dimana amonia berada di atas sedangkan endapan putih berada di bagian bawah. Larutan ammonia di bagian atas dibuang dan endapan dicuci dengan aquades untuk menghilangkan keberadaan ion NH₄⁺ dan NO₃⁻, kemudian disaring dengan menggunakan kertas saring dan dikeringkan menggunakan *Oven Memmerth* pada suhu 65°C selama 5 jam dan dilanjutkan dengan pemanasan di dalam *furnace* pada suhu 700°C selama 30 menit. Setelah dingin, serbuk putih material HA siap untuk digunakan.

HASIL DAN PEMBAHASAN

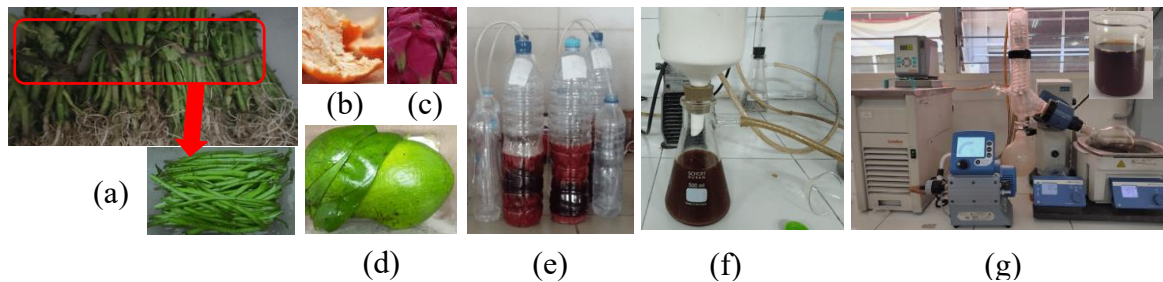
Pemanfaatan produk fermentasi dari sisa hasil pertanian seperti kulit buah, menjadi pupuk organik cair, telah dimanfaatkan sebagai campuran media tanam untuk produk tomat dan cabai rawit (Assadiyah et al., 2023; Azzahra et al., 2023). Selain sebagai pupuk organik cair, fermentasi kulit buah juga dapat digunakan sebagai media untuk sintesa enzim.

Sisa hasil pertanian yang digunakan sebagai bahan baku untuk sintesa enzim, dipilih kulit jeruk, kulit buah naga, kulit alpukat dan batang kangkung. Proses sintesa enzim dapat dilihat pada **Gambar 1**.

Selanjutnya *crude enzyme* yang dihasilkan, dilakukan analisis untuk menentukan aktivitas enzim amilase, lipase, protease dan selulase. Penentuan aktivitas enzim amilase, menggunakan metode Dinitrosalicylic acid (DNS) dengan amilum sebagai substrat, metode titrimetri untuk aktivitas lipase dengan menggunakan virgin olive oil sebagai substrat, dan aktivitas enzim

protease menggunakan metode Casein Digestion Unit (CDU) dengan substrat casein, sedangkan aktivitas selulase

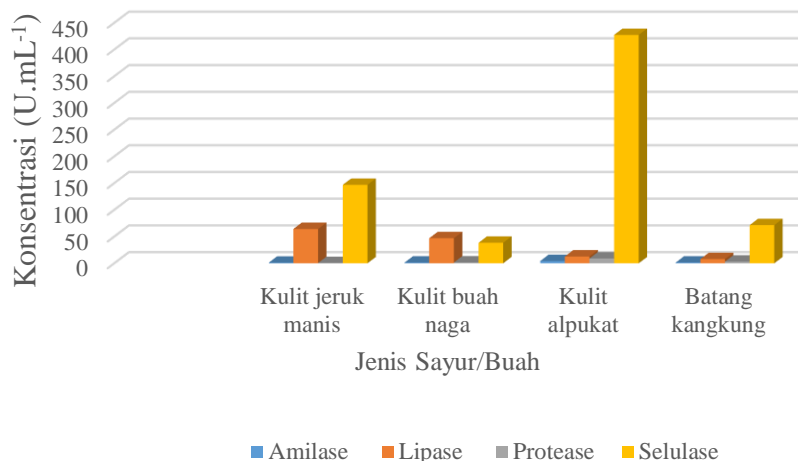
menggunakan metode CMCase dengan substrat Carboxy Methyl Cellulose (Arun & Sivashanmugam, 2015).



Gambar 1. Rangkaian sintesa enzim: (a) batang bawah kangkung, (b) kulit jeruk, (c) kulit buah naga, (d) kulit alpukat, (e) proses fermentasi, (f) proses filtrasi vakum *crude enzyme*, (g) proses pemekatan *crude enzyme*

Berdasarkan **Gambar 2** dan **Tabel 1**, menunjukkan bahwa ke-4 jenis sisa hasil pertanian tersebut dapat menghasilkan 4 jenis enzim yaitu amilase, lipase, protease dan selulase. Data yang tercantum dalam **Gambar 2**, dipilih hasil analisis kandungan enzim yang tertinggi. Jika dicermati dari ke-4 jenis enzim yang dihasilkan maka aktivitas enzim selulase adalah yang tertinggi berturut-turut: 427,31 U.mL⁻¹; 146,76 U.mL⁻¹ dan

71,46 U.mL⁻¹ untuk kulit alpukat, kulit jeruk dan batang kangkung. Hasil ini selaras dengan kandungan nutrisi yang terdapat pada sisa sayur dan buah tersebut yaitu didominasi oleh komponen selulosa (karbohidrat), setelah komponen air (dapat dilihat pada **Gambar 3** dan **Tabel 2**). Oleh sebab itu, dipilih enzim selulase yang digunakan untuk mempelajari karakteristik imobilisasi enzim di dalam material *support*.



Gambar 2. Kandungan enzim pada berbagai limbah sayur dan buah

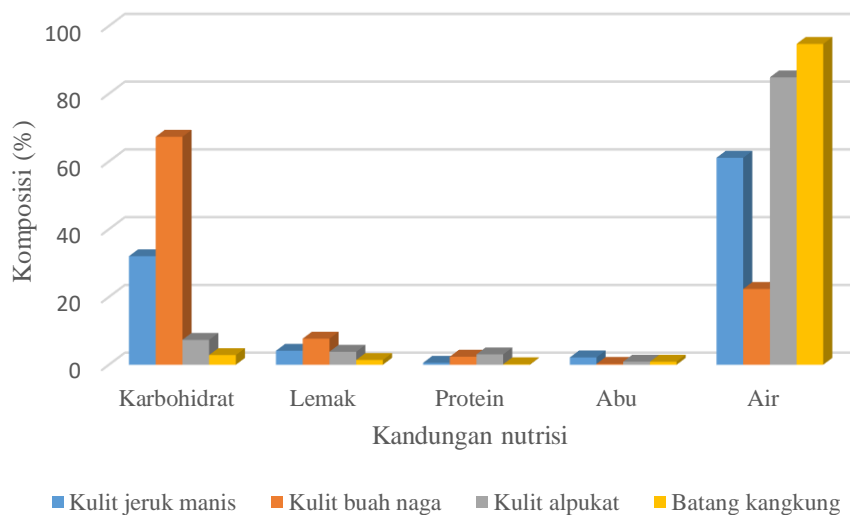
Selanjutnya enzim selulase hasil fermentasi ini disebut *crude enzyme*. Proses purifikasi *crude enzyme* yang digunakan adalah metode pemekatan. Mekanisme dari metode ini adalah dengan menguapkan sebagian kandungan air yang terdapat di dalam *crude enzyme*. Proses pemekatan dapat dilihat pada **Gambar 1(g)** yaitu dilakukan

dengan kondisi operasi tekanan dibawah 1 atm agar enzim tidak mengalami kerusakan.

Pada penelitian dipilih tekanan 70 mbar dan suhu 50°C. Hasil analisis aktivitas *crude enzyme* ini adalah 104,20 ± 0,87 U.mL⁻¹ dengan pH=5. *Crude enzyme* selanjutnya diimobilisasi ke dalam material *support*.

Tabel 1. Hasil analisis aktivitas enzim yang terkandung pada beberapa jenis kulit buah dan batang kangkung

Jenis sayur/buah	Amilase (U.mL ⁻¹)	Lipase (U.mL ⁻¹)	Protease (U.mL ⁻¹)	Selulase (U.mL ⁻¹)
Kulit jeruk	1,06 ±0,48	64,18 ±0,62	0,42 ±0,71	146,76 ±0,28
Kulit buah naga	1,28 ±0,58	46,94 ±0,97	1,59 ±0,07	38,51 ±0,30
Kulit alpukat	4,19 ±0,24	12,73 ±0,33	9,09 ±0,21	427,31 ±0,51
Batang kangkung	1,35 ±0,52	7,89 ±0,49	3,14 ±0,97	71,46 ±0,19



Gambar 3. Komposisi nutrisi pada berbagai limbah sayur dan buah

Tabel 2. Hasil analisis proksimat nutrisi pada berbagai jenis kulit buah dan batang kangkung

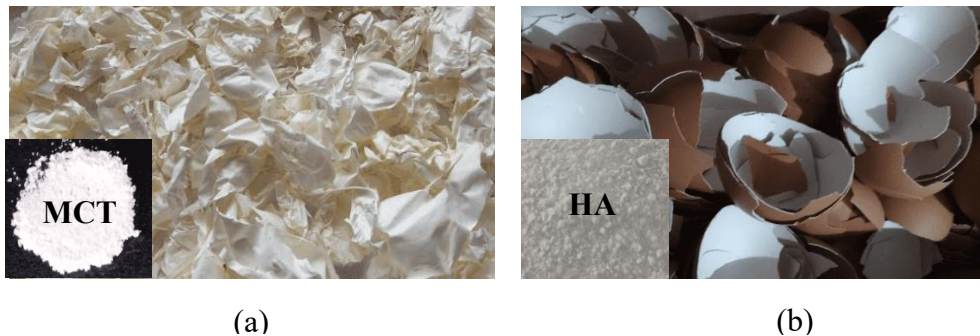
Komponen	Komposisi (%)			
	Kulit jeruk	Kulit buah naga	Kulit alpukat	Batang kangkung
Karbohidrat	32,04 ± 0,00	67,29 ± 0,00	7,35 ± 0,00	2,86 ± 0,00
Lemak	4,13 ± 0,55	7,70 ± 0,15	3,84 ± 0,04	1,40 ± 0,18
Protein	0,56 ± 0,41	2,38 ± 0,25	3,07 ± 0,13	0,15 ± 0,00
Abu	2,17 ± 0,35	0,25 ± 0,58	0,91 ± 0,06	0,89 ± 0,00
Air	61,10 ± 0,72	22,38 ± 0,03	84,83 ± 0,07	94,70 ± 0,08

Pembuatan material *support* ini dilakukan dengan memanfaatkan bahan baku limbah cangkang telur. Bagian cangkang telur yang dimanfaatkan adalah membran dan cangkangnya, dapat dilihat pada **Gambar 4**. Bahan dasar material dipilih cangkang telur karena limbah ini sangat berlimpah, oleh karena konsumsi telur di Indonesia juga besar. Material yang digunakan dipilih membran cangkang telur yang banyak

mengandung protein dan cangkang telur yang diolah lebih lanjut menjadi material HA karena banyak mengandung mineral kalsium. Sudah banyak penelitian yang memanfaatkan MCT dan HA sebagai material untuk imobilisasi enzim, tetapi semuanya menggunakan enzim murni pada skala laboratorium (Girelli et al., 2020; Girelli & Scuto, 2021; Zdarta et al., 2022). Hal ini tentunya kurang ekonomis apabila

diaplikasikan dalam jumlah yang besar skala industri. Oleh karena inilah perlu dilakukan penelitian terkait kedua material tersebut

dalam kemampuannya mengimobilisasi *crude enzyme* yang disintesa melalui proses fermentasi limbah buah dan sayur.



Gambar 4. Material *support*: (a) membran cangkang telur (MCT) dan (b) cangkang telur yang diolah lebih lanjut menjadi *hydroxyapatite* (HA)

Pada **Tabel 3**, disajikan data penelitian yaitu parameter *pH point zero charge* (pH_{pzc}) dari material MCT dan HA. Dari data tersebut dapat dijelaskan bahwa untuk material MCT saat pH larutan di bawah pH_{pzc} (7,36) maka permukaan material MCT akan bermuatan positif sebaliknya saat pH larutan di atas

pH_{pzc} (7,36) maka permukaan material MCT akan cenderung bermuatan negatif. Hal yang sama juga terjadi pada material HA akan tetapi pada $pH_{pzc} = 8,41$. Oleh karena *crude enzyme* yang akan diimobilisasi mempunyai $pH=5$, maka baik material MCT maupun HA akan bermuatan positif.

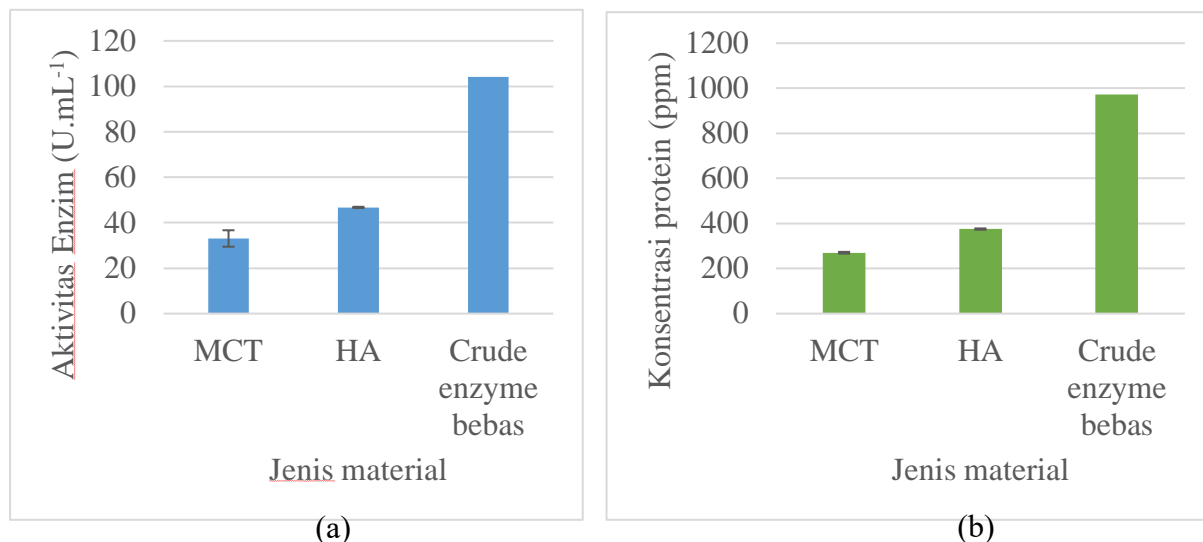
Tabel 3. pH_{pzc} pada material MCT dan HA

Jenis Material	pH_{pzc}
MCT	7,36
HA	8,41

Keberadaan *crude enzyme* yang dapat terimobilisasi ke dalam material diindikasikan dengan parameter aktivitas enzim dan konsentrasi protein. Data hasil penelitian kedua parameter ini disajikan pada **Gambar 5**. Pada **Gambar 5(a)** menunjukkan bahwa aktivitas *crude enzyme* terimobilisasi pada material berturut-turut adalah $33,05 \pm 3,62$ dan $46,73 \pm 0,27$ U.mL⁻¹ untuk MCT dan HA, sedangkan **Gambar 5(b)** menunjukkan konsentrasi protein yang terimobilisasi pada material berturut-turut adalah $270,17 \pm 3,88$ dan $375,13 \pm 3,01$ ppm untuk MCT dan HA. Dari kedua data ini dapat dilaporkan bahwa material HA mempunyai kemampuan untuk mengimobilisasi *crude enzyme* lebih baik daripada MCT.

Material HA mempunyai kemampuan aktivitas enzim terimobilisasi 41,4% lebih baik daripada MCT.

Berdasarkan data yang disajikan pada **Tabel 4** dan **Gambar 5**, menunjukkan bahwa aktivitas *crude enzyme* setelah diimobilisasi ke dalam material, mengalami penurunan baik di material MCT maupun HA dibandingkan saat dalam keadaan bebas. Keadaan ini serupa dengan penelitian yang dilakukan peneliti yang lain (Chattopadhyay & Sen, 2012; Cheng et al., 2023). Hal ini disebabkan sisi aktif dari *crude enzyme* mengalami perubahan saat terimobilisasi ke dalam material akibatnya afinitas antara *crude enzyme* dan substrat mengalami penurunan.



Gambar 5. Performa material *support* dibandingkan dengan *crude enzyme* bebas: (a) aktivitas enzim terimobilisasi dalam material, (b) konsentrasi protein terimobilisasi dalam material

Tabel 4 Aktivitas *crude enzyme* pada pH 5 dan suhu 30°C, sebelum dan sesudah imobilisasi

Enzim	Aktivitas enzim (U.mL ⁻¹)	Retensi aktivitas (%)
<i>Crude enzyme</i> bebas	104,20 ± 0,87	100
<i>Crude enzyme</i> terimobilisasi dalam material MCT	33,05 ± 3,62	32
<i>Crude enzyme</i> terimobilisasi dalam material HA	46,73 ± 0,27	45

SIMPULAN

Olahan cangkang telur yang banyak mengandung kalsium menjadi material baru seperti *hydroxyapatite* mampu digunakan sebagai imobilisasi *crude enzyme*. Selain itu fermentasi limbah buah dan sayur seperti kulit buah naga, kulit jeruk, kulit alpukat dan sisa batang bagian bawah kangkung memberikan gambaran potensinya sebagai sumber bahan baku untuk sintesa *crude enzyme* selulase. Peningkatan retensi aktivitas enzim yang lebih baik dapat dilakukan dengan pencarian material yang lain tentunya dicari yang lebih sesuai dengan karakteristik dari *crude enzyme* selulase.

UCAPAN TERIMA KASIH

Peneliti mengucapkan terima kasih kepada Lembaga Penelitian dan Pengabdian kepada Masyarakat (LPPM), Universitas Katolik Widya Mandala Surabaya (UKWMS) yang telah mendanai kegiatan

penelitian ini sehingga terlaksana dengan baik.

DAFTAR PUSTAKA

- Ainiyah, S. (2017). *Imobilisasi Selulase dan Xylanase pada Magnetic Kitosan untuk Produksi Gula Reduksi*. [Tesis]: Surabaya: Institut Teknologi Sepuluh Nopember.
<https://repository.its.ac.id/50916/1/File%20Rep.pdf> [10 April 2024]
- Arun, C., & Sivashanmugam, P. (2015). Investigation of biocatalytic potential of garbage enzyme and its influence on stabilization of industrial waste activated sludge. *Process Safety and Environmental Protection*, 94(C), 471–478.
<https://doi.org/10.1016/j.psep.2014.10.008>
- Assadiyah, A. N., Dewanti, F. D., & Sulistyono, A. (2023). Respon Hasil Tanaman Tomat (*Solanum*

- lycopersicum L.) terhadap Macam Media Tanam dan Konsentrasi Pupuk Organik Cair Limbah Kulit Buah. *Agro Bali : Agricultural Journal*, 6(1), 93–104.
<https://doi.org/10.37637/ab.v6i1.1079>
- Azzahra, A., Guniarti, G., & Dewanti, F. D. (2023). Pengaruh Komposisi Media Tanam dan Konsentrasi Pupuk Organik Cair Kulit Pisang Kepok terhadap Produksi Cabai Rawit (*Capsicum frutescens* L.). *Agro Bali : Agricultural Journal*, 6(1), 82–92.
<https://doi.org/10.37637/ab.v6i1.1076>
- Baláž, M., Boldyreva, E. V., Rybin, D., Pavlović, S., Rodríguez-Padrón, D., Mudrinić, T., & Luque, R. (2021). State-of-the-Art of Eggshell Waste in Materials Science: Recent Advances in Catalysis, Pharmaceutical Applications, and Mechanochemistry. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 8, 612567.
<https://doi.org/10.3389/fbioe.2020.612567>
- BPS. (2023). *Produksi telur ayam petelur menurut propinsi (Ton), 2021-2022*. <https://www.bps.go.id/id/statistics-table/2/NDkxIzI=/produksi-telur-ayam-petelur-menurut-provinsi.html> [11 Februari 2024]
- Chattopadhyay, S., & Sen, R. (2012). A comparative performance evaluation of jute and eggshell matrices to immobilize pancreatic lipase. *Process Biochemistry*, 47(5), 749–757.
<https://doi.org/10.1016/j.procbio.2012.02.003>
- Cheng, Z., Sun, Z., Wei, F., Yu, J., Zhao, J., Chen, J., Wang, J., & Zhang, Y. (2023). Immobilization of the crude enzyme extracted from *Stenotrophomonas* sp. GYH within modified zeolitic imidazolate framework (ZIF-8-NH₂) and its application in trichloromethane removal. *Environmental Functional Materials*, 2(1), 36–45.
<https://doi.org/10.1016/j.efmat.2023.02.001>
- Cree, D., & Rutter, A. (2015). Sustainable Bio-Inspired Limestone Eggshell Powder for Potential Industrialized Applications. *ACS Sustainable Chemistry and Engineering*, 3(5), 941–949.
<https://doi.org/10.1021/acssuschemeng.5b00035>
- Girelli, A. M., Astolfi, M. L., & Scuto, F. R. (2020). Agro-industrial wastes as potential carriers for enzyme immobilization: A review. *Chemosphere*, 244, 125368.
<https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2019.125368>
- Girelli, A. M., & Scuto, F. R. (2021). Eggshell membrane as feedstock in enzyme immobilization. *Journal of Biotechnology*, 325, 241–249.
<https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2020.10.016>
- Hamzah, A., Ainiyah, S., Ramadhani, D., Parwita, G. E. K., Rahmawati, Y., Soeprijanto, Ogino, H., & Widjaja, A. (2019). Cellulase and xylanase immobilized on chitosan magnetic particles for application in coconut husk hydrolysis. *International Journal of Technology*, 10(3), 613–623.
<https://doi.org/10.14716/ijtech.v10i3.2905>
- Han, C., Chen, Y., Shi, L., Chen, H., Li, L., Ning, Z., Zeng, D., & Wang, D. (2023). Advances in eggshell membrane separation and solubilization technologies. *Frontiers in Veterinary Science*, 10, 1116126.
<https://doi.org/10.3389/fvets.2023.1116126>
- Imran, M., Bano, S., Nazir, S., Javid, A., Asad, M. J., & Yaseen, A. (2019). Cellulases Production and Application of Cellulases and Accessory Enzymes in Pulp and Paper Industry: A Review. *Biological Research*, 4(1), 29–39.
<https://journals.pmpublishers.org/index.php/biolres>
- Pardeny, V. I., Nurfadiya, A., Hidayatulloh, I., Haq, M. U. U., & Permanasari, A. R.

- (2023). Reducing Sugar Production by Cellulose Immobilized Enzyme from the Oil Palm Empty Fruit Brunch (OPEFB) Treated by Organosolv Pretreatment. *Jurnal Teknik Kimia Dan Lingkungan*, 7(2), 58–66. <https://doi.org/10.33795/jtkl.v7i2.2437>
- Rasheed, A., Ghous, T., Mumtaz, S., Zafar, M. N., Akhter, K., Shabir, R., Abdin, Z. U., & Shafqat, S. S. (2020). Immobilization of *Pseudomonas aeruginosa* static biomass on eggshell powder for on-line preconcentration and determination of Cr (VI). *Open Chemistry*, 18(1), 303–313. <https://doi.org/10.1515/chem-2020-0031>
- Sanosh, K. P., Chu, M.-C., Balakrishnan, A., Kim, T. N., & Cho, S.-J. (2009). Utilization of biowaste eggshells to synthesize nanocrystalline hydroxyapatite powders. *Materials Letters*, 63(24–25), 2100–2102. <https://doi.org/10.1016/j.matlet.2009.06.062>
- Shahrin, N. A., Yong, G. G., & Serri, N. A. (2020). Fructose stearate esterify in packed bed reactor using immobilized lipase. *IOP Conference Series: Materials Science and Engineering*, 716(1). <https://doi.org/10.1088/1757-899X/716/1/012017>
- Vu, N. T., Dinh, T. H., Le, T. T. C., Vu, T. T. H., Nguyen, T. T. T., Pham, T. A., Vu, N. L., Koji, S., Hama, S., Kim, I. S., Jang, D. C., Kim, D. H., & Tran, A. T. (2022). Eggshell powder as calcium source on growth and yield of groundnut (*Arachis hypogaea* L.). *Plant Production Science*, 25(4), 413–420. <https://doi.org/10.1080/1343943X.2022.2120506>
- Widyaningrum, T., & Rizqiyah, A. A. (2023). Pengaruh Rasio Crude Enzim Selulase *Trichoderma reesei* dan *Aspergillus niger* terhadap Kadar Gula dan Bioetanol Fermentasi Kulit Kacang Tanah (*Arachis hypogaea* L.) Menggunakan *Zymomonas mobilis*. *Bioscientist : Jurnal Ilmiah Biologi*, 11(2), 1615. <https://doi.org/10.33394/bioscientist.v11i2.9487>
- Zdarta, J., Jesionowski, T., Pinelo, M., Meyer, A. S., Iqbal, H. M. N., Bilal, M., Nguyen, L. N., & Nghiem, L. D. (2022). Free and immobilized biocatalysts for removing micropollutants from water and wastewater: Recent progress and challenges. *Bioresour Technol*, 344, 126201. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2021.126201>