

## AKTIVITAS ANTIMIKROBA PARTIKEL NANO CaO DARI KULIT KERANG MUTIARA (*Pinctada maxima*)

Kendri Wahyuningsih<sup>1</sup> dan Lovy Perdani<sup>2</sup>

<sup>1</sup>) Balai Besar Litbang Pascapanen Kementerian Pertanian  
Jl. Tentara Pelajar No.12, Cimanggu, Bogor, Jawa Barat

<sup>2</sup>) Fakultas Biologi, Universitas Gadjah Mada  
Jl. Teknika Selatan, Sinduadi, Sleman, Yogyakarta

E-mail: kendriwahyuni@gmail.com

26 Desember 2019; 20 Januari 2020; 6 Maret 2020

### ABSTRAK

**AKTIVITAS ANTIMIKROBA PARTIKEL NANO CaO DARI KULIT KERANG MUTIARA (*Pinctada maxima*).** Kulit kerang mutiara (*Pinctada maxima*) mengandung senyawa oksida logam CaO yang berpotensi sebagai antimikroba. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui aktivitas partikel nano CaO dari kulit kerang mutiara laut (*P. maxima*) sebagai antimikroba. CaO diperoleh dari hasil kalsinasi kulit kerang mutiara laut (*P. maxima*) pada suhu 650°C selama 24 jam. Pembuatan partikel nano CaO menggunakan *shaker mill* dengan kondisi proses penggilingan selama 3 jam, kecepatan kocok *shaker mill* 750 rpm, rasio berat antara serbuk kulit *P. maxima* dengan bola-bola penggiling 1:10, diameter bola-bola penggiling 5 mm dan kapasitas volume pengisian *jar shaker mill* 55%. Karakterisasi partikel nano CaO menggunakan metode analisis *X-Ray Fluorescence* (XRF), *X-Ray Diffraction* (XRD), *Brunauer Emmett Teller* (BET), dan *Transmission Electron Microscope* (TEM). Metode pengujian aktivitas antimikroba dilakukan menggunakan metode difusi cakram. Hasil pengamatan menunjukkan bahwa kulit kerang *P. maxima* mengandung senyawa CaO sebesar 93,9%, rata-rata ukuran kristalin partikel CaO 92,66 nm, dan luas permukaan spesifik 16,4 m<sup>2</sup>/g. Partikel nano CaO mampu menghambat pertumbuhan bakteri gram negatif (*S. dysenteriae*), bakteri gram positif (*S. epidermidis*), dan jamur (*C. albicans*) dengan rata-rata daya hambat secara berurutan sebesar 11,96 mm, 12,77 mm, dan 12,82 mm.

Kata kunci : *Pinctada maxima*, Partikel nano, Kalsium oksida, Bakteri gram positif, Bakteri gram negatif

### ABSTRACT

**ANTIMICROBIAL ACTIVITY OF CaO NANOPARTICLES FROM *Pinctada maxima* SHELL.** *Pinctada maxima* shell contains metal oxide (CaO) that has the potency as antimicrobial agents. The aim of the research was to determine the activity of CaO nanoparticles from *P. maxima* shell as an antimicrobial. CaO was obtained from the calcination of *P. maxima* shell at 650°C for 24 hours. The production of CaO nanoparticles was performed using a shaker mill for 3 hours at 750 rpm with a ball-to-powder weight ratio of 1:10, diameter beads milling of 5 mm, and 55% of vial filling capacity. Characterization of the CaO nanoparticles was performed using X-Ray Fluorescence (XRF), X-Ray Diffraction (XRD), Brunauer Emmett Teller (BET), and Transmission Electron Microscopy (TEM). Antimicrobial activity was tested using well diffusion assay. The results showed that *P. maxima* shell contained 93.9% of CaO with an average particle size of 92.66 nm, and specific surface area of 16.4 m<sup>2</sup>/g. CaO nanoparticles were able to inhibit the growth of gram-negative bacteria (*S. dysenteriae*), gram-positive bacteria (*S. epidermidis*), and fungi (*C. albicans*) with an average inhibitory power of 11.96 mm, 12.77 mm and 12.82 mm, respectively.

Key words : *Pinctada maxima*, Nanoparticle, Calcium oxide, Gram-positive bacteria, Gram-negative bacteria

### PENDAHULUAN

Kebutuhan akan senyawa oksida logam kian meningkat di berbagai bidang, khususnya senyawa kalsium oksida. Kalsium oksida banyak dimanfaatkan sebagai katalis heterogen (Anantharaman, Ramalakshmi, and George 2016), *filler* (Yuvaraj et al. 2018; (El-sheikh, El-sheikh, and Barhoum 2015), antimikroba (Roy et al. 2013), penjernih air (Bhavya et al. 2016),

dan dapat mengurangi kelebihan senyawa ortopospat pada tanah akibat masalah eutrofikasi (Chen et al. 2016). Akan tetapi, aplikasi senyawa oksida logam dari beberapa penelitian di atas telah memberikan hasil yang kurang optimal. Hal ini seperti yang telah dilakukan Wahyudi, Sugiyana, and Helmy (2011) yang memanfaatkan logam perak oksida

sebagai antimikroba. Hasil penelitiannya menunjukkan bahwa logam perak tidak memiliki aktivitas yang efektif dalam menghambat pertumbuhan bakteri *S. aureus* dan *E. coli*, akan tetapi pada saat logam perak disintesis menjadi partikel nano perak melalui metode reduksi perak nitrat efektif menghambat pertumbuhan mikroba. Dengan demikian perlu pengembangan melalui pendekatan nanoteknologi agar senyawa logam oksida efektif sebagai antimikroba. Partikel nano memiliki sifat antimikroba spektrum luas yang secara signifikan dapat menghambat pertumbuhan dan reproduksi bakteri (Wang, Hu, and Shao 2017). Elsyah, Zuhadri, and Arief (2019) telah membuktikan bahwa Nanopartikel Tembaga Ferit (NTF) yang disintesis dari ekstrak daun gambir (*Uncaria gambir* Roxb.) menggunakan metode *green* sintesis dan hidrotermal efektif menghambat pertumbuhan bakteri *E. coli* dan *S. aureus*.

Senyawa logam dalam skala nanometer memiliki luas permukaan partikel yang lebih besar dibandingkan skala mikrometer. Besarnya luas permukaan tersebut mampu meningkatkan permeabilitas senyawa partikel nano sehingga mengakibatkan aktivitas antioksidan meningkat (Ningsih 2015). Selain itu, senyawa oksida logam dalam skala nanometer mampu mendenaturasi dinding sel mikroba sampai mengalami kerusakan sehingga sel mikroba tersebut mati (Sharmila et al. 2018). Partikel nano oksida logam ( $Ag_2O$ ,  $Cu_2O$ ,  $CeO_2$  dan  $NiO$ ) yang telah disintesis melalui metode sol gel oleh Hou et al. (2018) menunjukkan bahwa serbuk partikel nano  $Ag_2O$  dan  $Cu_2O$  memiliki efek antibakteri yang besar terhadap bakteri *Staphylococcus aureus* sehingga mampu menghambat terjadi infeksi bakteri. Namun metode ini kurang efisien karena mahal, tidak ramah lingkungan, dan prosesnya tidak bersifat *green*. Dengan demikian perlu dicari sumber alternatif bahan baku dan metode proses produksi oksida logam skala nanometer sebagai agen antimikroba yang bersifat *green*, murah, dan efisien.

Pemanfaatan bahan baku dari limbah kulit molusca merupakan salah satu alternatif bahan baku yang bersifat ramah lingkungan, murah, dan kandungan senyawa kalsium oksidanya cukup tinggi. Beberapa peneliti telah meneliti kandungan senyawa  $CaO$ , misalnya pada kulit kerang *Orbicularia orbiculata* 98,5% (Taufiq-Yap, Lee, and Lau 2012), kulit kerang darah *Anadara granosa* 71% (Boey et al. 2011), dan kulit kerang *Meretrix meretrix* 97% (Nair et al. 2012).

Tujuan dari penelitian ini adalah untuk mengetahui aktivitas partikel nano  $CaO$  dari kulit kerang mutiara laut (*P. maxima*) spesifik dari perairan laut Nusa Tenggara Barat sebagai antimikroba. Metode *ball mill* merupakan salah satu metode untuk mensintesis partikel nano

$CaO$  yang bersifat *green*, dapat dilakukan secara *dry milling*, tanpa penambahan pelarut dan proses pemurnian yang lebih sederhana (Mosaddegh et al. 2013).

## BAHAN DAN METODE

### Bahan

Kulit kerang mutiara laut (*P. maxima*) dari PT Autore Lombok-Nusa Tenggara Barat, akuades, isolat bakteri gram negatif *S. dysenteriae*, bakteri gram positif *S. epidermis*, dan jamur *C. albicans* dari laboratorium mikrobiologi UGM.

### Metode

#### Sintesis dan Karakterisasi Partikel Nano $CaO$

Sintesis partikel nano  $CaO$  menggunakan pendekatan yang telah dilakukan oleh Wahyuningsih, Jumeri, and Wagiman (2019). Kulit kerang mutiara jenis *Pinctada maxima* dibersihkan dan dicuci dengan air hangat, diampas, kemudian dioven pada suhu  $110^{\circ}C$  selama 1 jam. Setelah dingin, kulit kerang mutiara digiling menggunakan *disk mill* sampai menjadi tepung. Tepung yang diperoleh disaring menggunakan ayakan 200 mesh. Tepung kulit kerang mutiara dikalsinasi dengan *furnace* pada suhu  $650^{\circ}C$  selama 12 jam sehingga diperoleh senyawa kalsium oksida ( $CaO$ ). Partikel nano  $CaO$  diproduksi dengan metode *top-down* menggunakan *shaker mill* UPP-FG pada kondisi proses selama 3 jam, perbandingan antara bola-bola penggiling dengan berat sampel 1:10, diameter bola penggiling 5 mm, dan volume pengisian sebesar 55% dari total kapasitas wadah jar.

Karakterisasi dilakukan dengan mengacu kepada ketentuan Badan Standar Nasional Indonesia untuk partikel nano dalam bentuk serbuk yaitu SNI ISO/TS 17200:2015, yang meliputi (1) persentase  $CaO$  menggunakan metode *X-Ray Fluorescence/XRF* Rigaku Nex QC+ quantEZ, sebanyak 3 gram sampel di-press dalam wadah cetakan secara merata dan *compact*, kemudian dimasukkan ke dalam alat *XRF* dan pengukuran analisa; (2) ukuran kristalin partikel dengan metode *X-Ray Diffraction/XRD* Rigaku Miniflex600 yang dioperasikan dengan sinar monokromatik  $Cu K\alpha$ , panjang gelombang =  $1.54060 \text{ \AA}$ , range sudut  $2\theta$  mulai dari  $2^{\circ}$  sampai  $80^{\circ}$  dengan *interval scanning*  $0,02^{\circ}$  setiap 10 menit pada suhu ruangan, penentuan rata-rata ukuran kristal nanopartikel menggunakan pendekatan dari persamaan Deybe-Scherrer sesuai dengan SNI ISO/TS 17200:2015 dan Pandit and Fulekar (2017); (3) luas permukaan partikel dengan metode *Brunauer Emmett Teller/BET*, sampel sebanyak 0,1-1,0 gram dibuat dalam bentuk *pellet* dan dioperasikan pada alat dengan kondisi

suhu *heating mantle* dan kecepatan keluarnya gelembung gas N<sub>2</sub> sekitar 3-5 gelembung/detik; (4) dan metode *Transmission Electron Microscope New JEOL TEM (JEM 1400)* dilakukan untuk melihat struktur dan bentuk pori-pori nanopartikel dengan resolusi yang lebih tinggi, kondisi pengoperasian dilakukan pada voltase akselerasi 120 kV.

### Uji Aktivitas Antimikroba

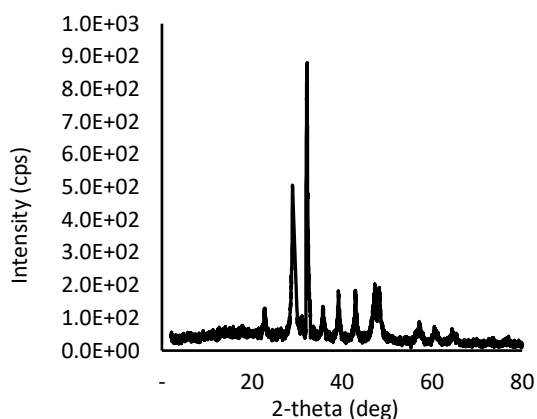
Pengujian aktivitas terhadap antimikroba dilakukan terlebih dahulu dengan preparasi mikroba target. Mikroba *S. dysenteriae*, *S. epidesmidis*, dan *C. albicans* terlebih dahulu disubkultur dalam medium *nutrient agar* (bakteri) dan *potato dextrose agar* (fungi) dengan metode *streak plate*, kemudian diinkubasi dalam suhu ruangan selama dua sampai tiga hari. Metode pengujian aktivitas antimikroba dilakukan menggunakan metode difusi cakram, modifikasi dari metode Nirbhavane and Bagde (2015). Konsentrasi larutan nano CaO 1% disiapkan dengan cara serbuk partikel nano CaO dilarutkan dalam akuades steril dan diaduk dengan *magnetic stirrer* selama 15 menit. Mueller-Hinton agar dituang ke dalam *petridish* yang telah disterilisasi. Setelah medium memadat, inokulum *S. dysenteriae*, *S. epidesmidis*, dan *C. albicans* digoreskan pada permukaan inokulan, lalu diinkubasi selama 16-24 jam pada suhu ruangan. Pengujian ini dilakukan dengan tiga kali ulangan dengan kontrol positif amoxilin yang dilarutkan dan kontrol negatif akuades. Zona hambat diukur setelah proses inkubasi berakhir dengan skala standard dan dibandingkan dengan kriteria kekuatan antimikroba sesuai *Clinical and Laboratory Standards Institute* (2017). Kriteria kekuatan antibakteri berpengaruh sangat kuat jika diameter zona hambat lebih dari 20 mm, kuat 15-19 mm, lemah kurang dari atau sama dengan 14 mm dan tidak berpengaruh jika kurang dari 5 mm.

## HASIL DAN PEMBAHASAN

### Sintesis dan Karakterisasi Partikel Nano CaO

Kulit kerang mutiara laut (*P. maxima*) yang telah ditepungkan menggunakan *disk mill* menghasilkan rata-rata rendemen sebesar 74,3%. Proses kalsinasi terhadap tepung kulit *P. maxima* dimaksudkan untuk mendekomposisi senyawa kalsium karbonat menjadi senyawa kalsium oksida dan gas karbon dioksida. Hasil pengujian dengan metode XRF diperoleh bahwa kandungan kalsium oksida sebesar 93,9%. Tingginya kandungan logam oksida CaO pada kulit *P. maxima* tersebut menunjukkan bahwa limbah ini memiliki potensi yang besar untuk dikembangkan sebagai sumber logam oksida yang bersifat *green*, murah dan meningkatkan nilai tambah ekonomi limbah tersebut.

Keberadaan senyawa CaO juga diperkuat dari hasil analisis menggunakan metode XRD yang ditunjukkan pada Gambar 1, spektra yang muncul dengan intensitas tinggi pada daerah 2 $\theta$  32,21° dan 33,63° merupakan senyawa CaO. Pandit and Fulekar (2017) melaporkan bahwa senyawa nanokatalis CaO dari kulit telur muncul pada difraktogram XRD di daerah 2 $\theta$  32,23°; 37,31°; 54,10°; 64,20° dan 67,45° sesuai dengan standar sampel serbuk CaO yang terdapat pada JCPDS 77-9574. Sedangkan Yuvaraj et al. (2018) juga menyebutkan bahwa senyawa CaO muncul pada difraktogram XRD sekitar 2 $\theta$  33,8°.

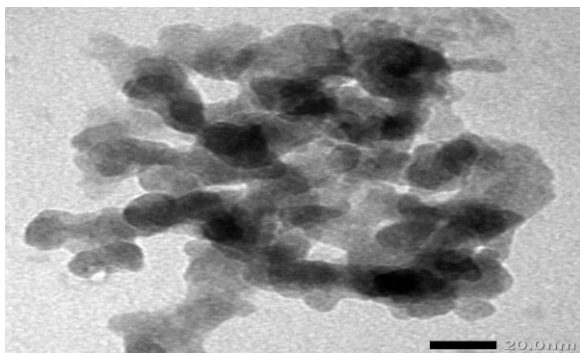


Gambar 1. Spektra X-Ray Diffraction partikel nano CaO dari kulit *P. maxima*

Sintesis partikel nano CaO melalui proses *milling* terhadap serbuk CaO selama 3 jam menggunakan *shaker mill* diperoleh rata-rata rendemen sebesar 95,7%. Menurut SNI ISO/TS 80004-4:2013, suatu material memiliki struktur partikel nano jika mempunyai struktur internal atau struktur permukaannya berskala nano antara 1-100 nm, sedangkan SNI ISO/TS 17200:2015 menyebutkan bahwa ukuran kristalin partikel nano dalam bentuk serbuk diukur dengan menggunakan persamaan Deybe-Scherrer. Hasil analisis menunjukkan bahwa serbuk CaO yang telah diproses secara *milling* dengan *shaker mill* memiliki rata-rata ukuran kristalin 92,66 nm. Dengan demikian serbuk CaO hasil *milling* disebut sebagai partikel nano CaO karena memiliki skala ukuran kristalin lebih kecil dari 100 nm. Hal ini juga didukung dari hasil analisis menggunakan metode TEM pada Gambar 2. Gambar 2 menunjukkan bahwa partikel nano CaO mengalami agregasi. Hasil analisis menggunakan TEM ditunjukkan pada Gambar 2, dimana partikel-partikel nano CaO berada dalam kondisi teragregasi sehingga bentuk partikel yang muncul tidak teridentifikasi secara jelas. Hal ini disebabkan karena serbuk CaO dalam ukuran nano memiliki luas permukaan yang besar sehingga permukaannya sangat reaktif terhadap kelembaban dan mudah

mengikat molekul air dari udara membentuk senyawa kalsium hidroksida ( $\text{Ca}(\text{OH})_2$ ), dan senyawa ini memiliki sifat yang mudah menyerap  $\text{CO}_2$  dari udara membentuk senyawa yang lebih stabil dalam bentuk kalsium karbonat (Panjaitan, Yamanaka, and Kuga 2017). Keberadaan senyawa  $\text{CaCO}_3$  pada produk partikel nano ini terdeteksi pada analisis menggunakan metode XRD yang muncul pada daerah  $2\theta$  sekitar  $28^\circ$  hingga  $29^\circ$  dan sekitar  $39^\circ$  seperti yang ditunjukkan pada gambar 2. Penelitian yang telah dilakukan oleh Mosaddegh et al. (2013) menunjukkan bahwa analisis keberadaan senyawa  $\text{CaCO}_3$  menggunakan metode XRD muncul pada daerah  $2\theta$  sekitar  $29,4^\circ$ .

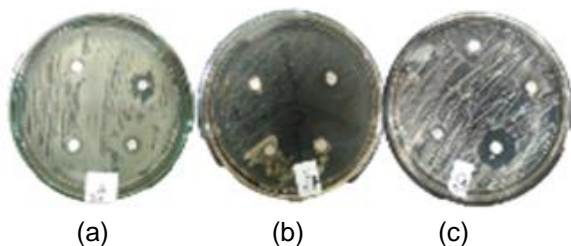
Karakteristik dari rata-rata luas permukaan spesifik partikel nano CaO diperoleh sebesar  $10,41\text{- m}^2/\text{g}$ . Hasil eksperimen ini mendekati dengan eksperimen yang telah dilakukan oleh Pandit and Fulekar (2017) yang telah membuat nano-CaO melalui metode *ball mill* dari kulit telur ayam, senyawa CaO yang dihasilkan memiliki ukuran partikel 75 nm dan luas permukaan spesifik sebesar  $16,4\text{ m}^2/\text{g}$ .



Gambar 2. Spektra TEM dengan perbesaran 150K partikel nano CaO dari kulit *P. Maxima*

### Uji Aktivitas Antimikroba

Bakteri gram negatif *S. dysenteriae* hasil isolasi dan peremajaan pada media *Nutrien Agar* memiliki karakter koloni berwarna putih dengan bagian dasar koloni berwarna putih dan permukaan koloni lembut. Bakteri gram positif *S. epidermidis* memiliki karakter koloni yang bening, baik pada permukaan dan dasar koloni. Sementara jamur *C. albicans* memiliki tekstur permukaan koloni yang lembut dengan warna putih.



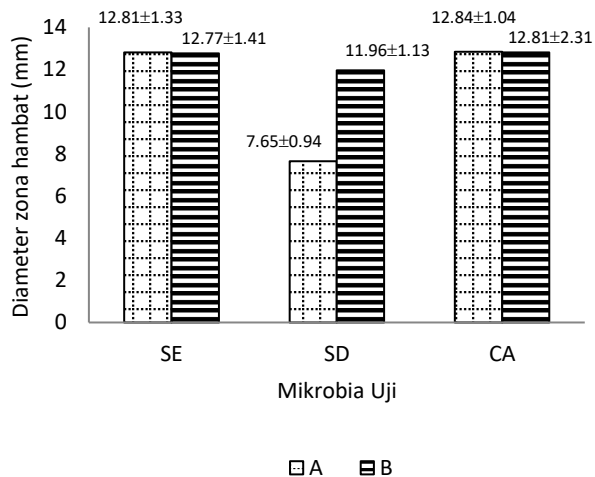
(a)

(b)

(c)

Gambar 3. Zona hambat senyawa CaO berskala mikrometer dan nanometer pada isolat (a) *S. dysenteriae*; (b) *S. epidermidis*; dan (c) *C. albicans* masing-masing pada konsentrasi 1%

Senyawa CaO yang diperoleh baik skala mikrometer maupun nanometer telah diujikan terhadap terhadap isolat *S. dysenteriae* (Gambar 3a), *S. epidesmidis* (Gambar 3b) dan *C. albicans* (Gambar 3c).



Gambar 4. Rerata diameter zona hambat senyawa CaO pada mikrobia uji *S. epidermidis* (SE); *S. dysenteriae* (SD); dan *C. albicans* (CA); A = skala mikrometer; B = skala nanometer

Berdasarkan Gambar 4, dapat diketahui bahwa partikel nano CaO memiliki daya hambat terhadap bakteri gram positif, *S. epidermidis*, bakteri gram negatif *S. dysenteriae* dan jamur *C. albicans* dengan kriteria daya hambat dalam kategori lemah karena diameter zona hambatnya kurang dari 14 (*Clinical and Laboratory Standards Institute* 2017). Partikel nano CaO yang diujikan pada bakteri *S. epidermidis*, *S. dysenteriae* dan jamur *C. albicans* memiliki rata-rata zona hambat secara berturut-turut seluas 12,77 mm, 11,96 mm, dan 12,81 mm. Sharmila et al. (2018) telah menunjukkan hasil uji aktivitas bakteri menggunakan partikel nano CuO dari ekstrak daun *Bauhinia tomentosa* yang luar biasa terhadap bakteri gram negative *E. coli* dan *P. aeruginosa* dengan zona hambat masing-masing sebesar 22 mm dan 17 mm. Sedangkan senyawa CaO dalam bentuk mikropartikel tidak memiliki pengaruh terhadap bakteri gram negatif *S. dysenteriae*. Selain itu juga diketahui bahwa perbedaan besaran zona hambat yang didapatkan tidak terlalu besar antara partikel CaO berskala mikrometer dan nanometer yang diujikan pada *S. epidermidis* dan *C. albicans*. Hal tersebut disebabkan oleh sifat partikel nano CaO yang mudah teraglomerasi yang

menyebabkan ukuran partikel menjadi lebih besar sehingga luas permukaannya menjadi kecil. Dengan demikian kemampuan partikel nano CaO dalam melakukan penetrasi ke dinding sel mikrobial menjadi lebih lemah sehingga aktivitas partikel nano CaO dalam merusak dinding sel berkurang dan tidak mampu menembus hingga ke bagian sel mikrobial (Sharmila et al. 2018).

## KESIMPULAN

Hasil penelitian ini didapatkan bahwa kulit kerang *P. maxima* spesifik dari perairan laut Lombok provinsi Nusa Tenggara Barat mengandung senyawa CaO sebesar 93,9%. Hasil pengujian aktivitas antimikrobanya memperlihatkan bahwa senyawanya mampu menghambat aktivitas metabolisme bakteri gram negatif (*S. dysenteriae*), bakteri gram positif (*S. epidermidis*), dan jamur (*C. albicans*) dengan rata-rata daya hambat secara berurutan sebesar 11,96 mm, 12,77 mm dan 12,82 mm. Karena itu, hasil isolasinya berpotensi besar untuk dikembangkan sebagai agen antibakteri.

## DAFTAR PUSTAKA

- Anantharaman, Ashwini, S Ramalakshmi, and Mary George. 2016. 'Green Synthesis of Calcium Oxide Nanoparticles and Its Applications'. *Int. Journal of Engineering Research and Application* 6 (10): 27–31.
- Bhavya, C, K Yogendra, K M Mahadevan, and N Madhusudhana. 2016. 'Synthesis of Calcium Oxide Nanoparticles and Its Mortality Study on Fresh Water Fish *Cyprinus carpio*'. *IOSR Journal of Environmental Science, Toxicology and Food Technology* 10 (12): 55–60. doi:10.9790/2402-1012015560.
- Boey, Peng-lim, Gaanty P. Maniam, Shafida A. Hamid, and Dafaalla M.H. Ali. 2011. 'Utilization of Waste Cockle Shell (*Anadara granosa*) in Biodiesel Production from Palm Olein: Optimization Using Response Surface Methodology'. *Fuel* 90: 2353–58. doi:10.1016/j.fuel.2011.03.002.
- Chen, Dong, Paul Szostak, Zongsu Wei, and Ruiyang Xiao. 2016. 'Reduction of Orthophosphates Loss in Agricultural Soil by Nano Calcium Sulfate'. *Science of the Total Environment* 539: 381–87. doi:10.1016/j.scitotenv.2015.09.028.
- Clinical and Laboratory Standards Institute. 2017. *M100 Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing*. Edited by Jean B. et al Patel. 27th ed. Wayne, Pennsylvania USA: Clinical and Laboratory Standards Institute.
- El-sherbiny, S, S M El-sheikh, and A Barhoum. 2015. 'Preparation and Modification of Nano Calcium Carbonate Filler from Waste Marble Dust and Commercial Limestone for Papermaking Wet End Application'. *Powder Technology* 279: 290–300. doi:10.1016/j.powtec.2015.04.006.
- Elsya, Suci Aulia Rahmi, Zulhadjri, and Syukri Arief. 2019. 'Green Synthesis Approach of CuFe<sub>2</sub>O<sub>4</sub> Nanoparticles Using Gambir Leaf Extract And Its Antibacterial Activity.' *Jurnal Kimia Dan Kemasan* 41 (2): 55–64. doi:http://dx.doi.org/10.24817/jkk.v41i2.54.
- Hou, Yong-xuan, Hairus Abdullah, Dong-hau Kuo, and Sy-jye Leu. 2018. 'A Comparison Study of SiO<sub>2</sub>/Nano Metal Oxide Composite Sphere for Antibacterial Application'. *Composites Part B* 133: 166–76. doi:10.1016/j.compositesb.2017.09.021.
- Mosaddegh, Elaheh, Asadollah Hassankhani, Sadegh Pourahmadi, and Dadkhoda Ghazanfari. 2013. 'Ball Mill-Assisted Preparation of Nano-CaCO<sub>3</sub> as a Novel and Green Catalyst-Based Eggshell Waste : A Green Approach in the Synthesis of Pyrano[4,3-B]Pyrans'. *International Journal of Green Nanotechnology* 1: 1–5. doi:10.1177/1943089213507160.
- Nair, Praful, B Singh, S N Upadhyay, and Y C Sharma. 2012. 'Synthesis of Biodiesel from Low FFA Waste Frying Oil Using Calcium Oxide Derived from *Meretrix meretrix* as a Heterogeneous Catalyst'. *Journal of Cleaner Production* 29: 82–90. doi:10.1016/j.jclepro.2012.01.039.
- Ningsih, Sherly Kasuma Warda. 2015. 'Effect of Various Solvent on the Synthesis of NiO Nanopowders by Simple Sol-Gel Methods and Its Characterization'. *Indonesian Journal of Chemistry* 15 (1): 50–55.
- Nirbhavane, H.M, and U.S. Bagde. 2015. 'Study of Resistance Mechanism in *Enterobacter Spp.* with Special Reference to Antimicrobials Ceftazidime, Moxifloxacin and Nalidixic Acid'. *Afr. J. Microbial. Res.* 9 (49):2364-73. doi:10.5897/AJMR2015.7783.
- Pandit, Priti R, and M H Fulekar. 2017. 'Egg Shell Waste as Heterogeneous Nanocatalyst for Biodiesel Production: Optimized by Response Surface Methodology'. *Journal of Environmental Management* 198:319-29. doi:10.1016/j.jenvman.2017.04.100.
- Panjaitan, Frisda R, Shinya Yamanaka, and Yoshikazu Kuga. 2017. 'Soybean Oil Methanolysis over Scallop Shell-Derived CaO Prepared via Methanol-Assisted Dry Nano-Grinding'. *Advanced Powder Technology* 28: 1627–35. doi:10.1016/j.appt.2016.12.020.
- Roy, Arup, Samiran S Gauri, Madhusmita Bhattacharya, and Jayanta Bhattacharya. 2013. 'Antimicrobial Activity of CaO Nanoparticles'. *Journal of Biomedical*

- Nanotechnology* 9(xx): 1–8.  
doi:10.1166/jbn.2013.1681.
- Sharmila, G, R Sakthi Pradeep, K Sandiya, S Santhiya, C Muthukumaran, J Jeyanthi, N Manoj Kumar, and M Thirumarimurugan. 2018. 'Biogenic Synthesis of CuO Nanoparticles Using *Bauhinia tomentosa* Leaves Extract: Characterization and Its Antibacterial Application'. *Journal of Molecular Structure* 1165: 288–92. doi:10.1016/j.molstruc.2018.04.011.
- Taufiq-Yap, Y H, H V Lee, and P L Lau. 2012. 'Transesterification of *Jatropha curcas* Oil to Biodiesel by Using Short Necked Clam (*Orbicularia orbiculata*) Shell'. *Energy Exploration & Exploitation* 30 (5): 853–66.
- Wahyudi, Tatang, Doni Sugiyana, and Qomarudin Helmy. 2011. 'Sintesis Nanopartikel Perak dan Uji Aktivitasnya Terhadap Bakteri *E.coli* Dan *S. Aureus*'. *ArenaTekstil* 26 (1): 55–60.
- Wahyuningsih, Kendri, Jumeri, and Wagiman. 2019. 'Optimization of Production Process of Nano-Calcium Oxide from *Pinctada maxima* Shell by Using Taguchi Method'. *Indonesian Journal of Chemistry* 19 (2): 356–67. doi:10.22146/ijc.33871.
- Wang, Linlin, Chen Hu, and Longquan Shao. 2017. 'The Antimicrobial Activity of Nanoparticles: Present Situation and Prospects for the Future'. *International Journal of Nanomedicine* 12: 1227–49. doi:10.2147/IJN.S121956.
- Yuvaraj, P, J Raghava Rao, N Nishad Fathima, N Natchimuthu, and R Mohan. 2018. 'Complete Replacement of Carbon Black Filler in Rubber Sole with CaO Embedded Activated Carbon Derived from Tannery Solid Waste'. *Journal of Cleaner Production* 170: 446–50. doi:10.1016/j.jclepro.2017.09.188.