

**PEMBUATAN ZAT AKTIF ANTIOKSIDAN KONJUGAT
KITOSAN-ASAM FERULAT MENGGUNAKAN INISIATOR
GOLONGAN ALKOHOL MELALUI METODE *GRAFTING*
RADIKAL BEBAS**

SKRIPSI

**Diajukan untuk Memenuhi Salah Satu Syarat Mencapai
Gelar Sarjana Sains (S.Si.) pada Program Studi Kimia
Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam
Universitas Islam Indonesia
Yogyakarta**



Diajukan oleh :

**ARINDA DWI RIZKI
No Mhs : 16612060**

PROGRAM STUDI KIMIA

FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM

UNIVERSITAS ISLAM INDONESIA

2020

**PEMBUATAN ZAT AKTIF ANTIOKSIDAN KONJUGAT KITOSAN-
ASAM FERULAT MENGGUNAKAN INISIATOR GOLONGAN
ALKOHOL MELALUI METODE GRAFTING RADIKAL BEBAS**

SKRIPSI

yang diajukan oleh:

ARINDA DWI RIZKI
No Mhs: 16612060

Telah dipertahankan di hadapan Panitia Penguji Skripsi
Prodi Kimia Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam
Universitas Islam Indonesia

Tanggal: 12 Mei 2020

Dewan Penguji

1. Dhina Fitriastuti, S.Si., M.Sc.
2. Muslih Anwar, S.Si., M.Sc.
3. Dr. Habibi Hidayat, S.Si., M.Si.
4. Febi Indah Fajarwati, S.Si., M.Sc.

Tanda tangan



Mengetahui,

Dekan Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam
Universitas Islam Indonesia




Prof. Riyanto, S.Pd., M.Si., Ph.D.

PERNYATAAN KEASLIAN TULISAN

Yang bertanda tangan di bawah ini :

Nama : Arinda Dwi Rizki
NIM : 16612060
Program studi : Kimia
Fakultas : Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam

Dengan ini saya menyatakan bahwa skripsi dengan judul Pembuatan Zat Aktif Antioksidan Konjugat Kitosan-Asam Ferulat Menggunakan Inisiator Golongan Alkohol Melalui metode Grafting Radikal Bebas, bersifat asli dan tidak berisi material yang telah diterbitkan sebelumnya kecuali referensi yang disebutkan di dalam skripsi ini. Apabila terdapat kontribusi dari penulis lain, maka penulis tersebut secara eksplisit telah disebutkan di dalam skripsi ini, maka saya bersedia dituntut dan diproses sesuai dengan ketentuan yang berlaku.

Demikian pernyataan ini dibuat dengan sesungguhnya dan penuh tanggung jawab.

Yogyakarta, 8 Juni 2020


Arinda Dwi Rizki
NIM. 16612060

KATA PENGANTAR

Assalamualaikum wr.wb

Alhamdulillahirobbil'alamin. Skripsi ini telah terselesaikan dengan baik dan tepat pada waktunya. Puji syukur penulis panjatkan kepada Allah SWT yang telah memberikan rahmat dan hidayah-Nya serta kelancaran dalam penulisan skripsi saya yang berjudul **“Pembuatan Zat Aktif Antioksidan Kitosan-Asam Ferulat Terkonjugasi Menggunakan Inisiator Golongan Alkohol Melalui Metode *Grafting Radikal Bebas*”**. Sholawat serta salam penulis haturkan kepada Nabi Muhammad *SAW* beserta keluarganya, sahabat dan seluruh umatnya hingga akhir zaman, yang telah membawa kita zaman yang kelam menuju zaman yang terang benderang akan ilmu pengetahuan. Skripsi ini disusun untuk memenuhi salah satu persyaratan mencapai gelar Sarjana Sains (S.Si.) Program Studi Kimia, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Islam Indonesia. Skripsi ini disusun untuk memenuhi salah satu persyaratan mencapai gelar Sarjana Sains (S.Si.) Program Studi Ilmu Kimia, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Islam Indonesia.

Penulis menyadari bahwa masih banyak terdapat kekurangan dalam tulisan, sehingga perlu adanya saran serta masukan dari berbagai pihak. Selain itu tidak lupa pula saya ucapkan terimakasih kepada orang-orang yang saya sayangi dan pihak-pihak yang telah mendukung dalam penyelesaian penulisan skripsi ini, yaitu:

1. Kedua orang tua, kakak, serta adik saya yang selalu memanjatkan doa, semangat serta dukungan kepada saya baik secara materiil dan non-materiil.
2. Bapak Prof. Riyanto, S.Pd., M.Si., Ph.D. selaku Dekan Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Islam Indonesia.
3. Bapak Dr. Dwiwarso Rubiyanto, S.Si., M.Si. selaku Ketua Program Studi Kimia Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Islam Indonesia.
4. Ibu Dhina Fitriastuti, S.Si., M.Sc. selaku Dosen Pembimbing I skripsi di Program Studi Kimia Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Islam Indonesia.

5. Bapak Muslih Anwar, S.Si, M.Sc. selaku Pembimbing II skripsi di Balai Penelitian Teknologi Bahan Alam-Lembaga Ilmu Pengetahuan Indonesia (BPTBA-LIPI)
6. Teman-teman saya Nadiya Irmasakti, Sekar Asmara Jati, Labibatul Ikhmalia, Huzaimah Aspuri Hamzah, Nabhan Faisal Bariz.
7. Rekan penelitian skripsi Nadha Yuliningtyas. Terimakasih atas kerja sama dan kebersamaannya pada saat menjalani Penelitian di BPTBA-LIPI.
8. Serta kepada semua pihak yang tidak dapat saya sebutkan satu per satu, terimakasih telah membantu demi terselesaikannya tugas akhir ini.

Skripsi ini sebagai batu loncatan untuk saya dalam meraih mimpi-mimpi saya yang lebih besar lagi dan tidak terlepas dari motto hidup saya yaitu “Jalankan segala usaha mu karna Allah”, Karena apabila segala sesuatu yang kita niatkan untuk mengharap ridho dari Allah SWT. InsyaAllah akan dilancarkan.

Wassalamualaikum Wr.Wb

Yogyakarta, Mei 2020

Arinda Dwi Rizki

DAFTAR ISI

HALAMAN JUDUL.....	i
HALAMAN PENGESAHAN.....	ii
KATA PENGANTAR	iv
DAFTAR ISI.....	vi
DAFTAR TABEL.....	ix
DAFTAR GAMBAR	x
INTISARI.....	xi
ABSTRACT.....	xii
BAB I 1	
PENDAHULUAN	1
1.1. Latar Belakang	1
1.2. Rumusan Masalah	3
1.3. Tujuan Penelitian.....	3
1.4. Manfaat Penelitian.....	4
BAB II 5	
TINJAUAN PUSTAKA	5
Gambar 1. Proses <i>grafting</i> kitosan-senyawa fenolat.....	7
2.1 Hipotesis	8
BAB III 9	
DASAR TEORI	9
3.1. Kitosan	9
Gambar 2. Struktur kitosan	9
3.2. Senyawa Fenolat	11
3.3. Asam Ferulat	13
Gambar 3. Struktur asam ferulat	13
Gambar 4. Skema asam ferulat menstabilkan radikal bebas.....	14
3.4. <i>Grafting</i> Kopolimerisasi Dengan Inisiator Radikal Bebas.....	14
3.5. Inisiator.....	16
Gambar 5. Persamaan waktu paruh peroksida pengaruh temperatur.....	17

3.6. Antioksidan	18
Gambar 6. Skema aktivitas antioksidan	19
BAB IV 21	
METODE PENELITIAN.....	21
Gambar 7. Tahapan Alur Penelitian.....	21
4.1. Alat dan Bahan	21
4.2. Cara Kerja	21
4.2.1. Pembuatan Konjugat Kitosan-Asam Ferulat	22
4.2.2. Karakterisasi Konjugat Kitosan-Asam Ferulat	22
4.2.2.1 Pengujian Total Fenol.....	23
4.2.3. Pengujian Aktivitas Antioksidan Kitosan-Asam Ferulat Terkonjugasi	23
BAB V 25	
HASIL DAN PEMBAHASAN.....	25
5.1. Pembuatan Konjugat Kitosan-Asam Ferulat	25
Gambar 8. Reaksi pembentukan askorbat monoanion dan askorbat dianion (Liu et al., 2018)	26
Gambar 9. Proses reaksi <i>grafting</i> kitosan-asam ferulat dengan radikal inisiator asam askorbat-H ₂ O ₂ (Liu et al., 2017)	27
Tabel 1. Hasil reaksi kitosan-asam ferulat dengan inisiator alkohol-H ₂ O ₂	29
Gambar 10. Sampel hasil proses <i>grafting</i> dengan radikal inisiator	30
Gambar 11. Endapan sampel hasil proses <i>grafting</i> dengan radikal inisiator	31
5.2 Total Fenol Konjugat Kitosan-Asam Ferulat	32
Gambar 12. Reaksi senyawa fenol dengan Follin-Ciocalteu	32
Tabel 2. Total Fenol Sampel Kitosan-Asam Ferulat.....	33
Gambar 13. Persamaan reaksi konjugat kitosan-asam ferulat	34
Gambar 14. Perbandingan persentase <i>grafting</i> konjugat kitosan-asam ferulat	37
5.3 Karakterisasi Struktur Kitosan-Asam Ferulat dengan FTIR.....	37
Tabel 3. Perbandingan Puncak Spektra Sampel.....	39
5.4 Karakterisasi Kristalinitas	40
Gambar 16. Difraktogram Kitosan dan Kitosan-Asam Ferulat	41
Tabel 4. Derajat Kristalinitas Sampel dan Kitosan	41

5.5 Uji Antioksidan Kitosan-Asam Ferulat Terhadap 2,2'-azino-bis (3-ethyl benzothiazoline-6-sulfonic acid (ABTS).....	42
Gambar 17. Reaksi Senyawa ABTS Dengan Antioksidan (Oliveiraa et al., 2014)	43
Gambar 18. Aktivitas Sampel Menghambat Radikal ABTS	44
Tabel 5. Konsentrasi Minimal Sampel Untuk Menghambat Radikal ABTS	44
BAB VI 46	
KESIMPULAN DAN SARAN.....	46
6.1. Kesimpulan.....	46
6.2. Saran.....	46
DAFTAR PUSTAKA	47
LAMPIRAN.....	50



DAFTAR TABEL

Tabel 1. Hasil reaksi kitosan-asam ferulat dengan inisiator alkohol-H ₂ O ₂	29
Tabel 2. Total Fenol Sampel Kitosan-Asam Ferulat.....	33
Tabel 3. Perbandingan Puncak Spektra Sampel.....	39
Tabel 4. Derajat Kristalinitas Sampel dan Kitosan	42
Tabel 5. Konsentrasi Minimal Sampel Untuk Menghambat Radikal ABTS	45



DAFTAR GAMBAR

Gambar 1. Proses <i>grafting</i> kitosan-senyawa fenolat.....	7
Gambar 2. Struktur kitosan	9
Gambar 3. Struktur asam ferulat	13
Gambar 4. Skema asam ferulat menstabilkan radikal bebas.....	14
Gambar 5. Persamaan waktu paruh peroksida pengaruh temperatur.....	17
Gambar 6. Skema aktivitas antioksidan	19
Gambar 7. Tahapan Alur Penelitian.....	21
Gambar 8. Reaksi pembentukan askorbat monoanion dan askorbat dianion.....	26
Gambar 9. Proses reaksi <i>grafting</i> kitosan-asam ferulat dengan radikal inisiator asam askorbat-H ₂ O ₂	27
Gambar 10. Sampel hasil proses <i>grafting</i> dengan radikal inisiator	30
Gambar 11. Endapan sampel hasil proses <i>grafting</i> dengan radikal inisiator	31
Gambar 12. Reaksi senyawa fenol dengan Follin-Ciocalteu.....	32
Gambar 13. Persamaan reaksi konjugat kitosan-asam ferulat	34
Gambar 14. Perbandingan persentase <i>grafting</i> konjugat kitosan-asam ferulat	37
Gambar 15.....	38
Gambar 16. Difraktogram Kitosan dan Kitosan-Asam Ferulat	41
Gambar 17. Reaksi Senyawa ABTS Dengan Antioksidan	43
Gambar 18. Aktivitas Sampel Menghambat Radikal ABTS	44

**PEMBUATAN ZAT AKTIF ANTIOKSIDAN KONJUGAT KITOSAN-
ASAM FERULAT MENGGUNAKAN INISIATOR GOLONGAN
ALKOHOL MELALUI METODE *GRAFTING* RADIKAL BEBAS**

**ARINDA DWI RIZKI
(16612060)**

INTISARI

Teknik *grafting* dengan radikal bebas merupakan metode yang banyak digunakan dalam industri pangan dan kesehatan untuk mengoptimalkan aplikasi kitosan. Proses ini menggunakan inisiator yang berperan sebagai tahap awal reaksi radikal terjadi. Sampel kitosan-asam ferulat dalam penelitian ini dimodifikasi dengan menggunakan inisiator redoks yaitu golongan alkohol-H₂O₂. Reagen alkohol yang digunakan yaitu metanol, etanol, 1-propanol, 2-propanol, 1-butanol, 2-butanol, dan t-butanol. Proses dilakukan dua tahap yaitu tahap inisiasi dan *grafting*. Reaksi disiapkan dengan menggunakan perbandingan mol kitosan-asam ferulat 1:1, selama 24 jam, pada temperatur ruang. Karakterisasi struktur sampel dilakukan dengan analisis FTIR dan XRD. Jumlah fenol yang tercangkok pada kitosan dilakukan dengan metode Follin-Ciocalteu dan aktivitas antioksidan dilakukan dengan mengukur aktivitas penangkap radikal ABTS. Berdasarkan hasil penelitian, sampel dengan inisiator etanol memberikan hasil yang lebih baik dibandingkan dengan sampel lainnya. Uji total fenol dengan metode Follin-Ciocalteu pada sampel dengan inisiator etanol sebesar 78,963 mg/g dengan nilai IC₅₀ antioksidan terhadap radikal ABTS sebesar 438,92 ppm. Karakterisasi sampel dengan FTIR menunjukkan terjadinya pergeseran bilangan gelombang pada 1633cm⁻¹ untuk sampel metanol, etanol, 1-propanol, 2-propanol dan 1653cm⁻¹ untuk 1-butanol, 2-butanol, t-butanol yang merupakan serapan dari gugus amida. Serta data dari XRD menunjukkan karakteristik puncak baru pada 2θ = 30-40° dari masing-masing sampel. Hal ini menunjukkan bahwa inisiator mampu menginisiasi reaksi *grafting* radikal bebas kitosan-senyawa fenolat.

Kata Kunci: Kitosan, *Grafting* radikal bebas, Inisiator, Senyawa Fenolat

**SYNTHESIS CHITOSAN-FERULIC ACID AS ANTIOXIDANT
MEDIATED BY FREE RADICAL GRAFTING METHOD USING
ALCOHOL DERIVATIVE INITIATOR**

**ARINDA DWI RIZKI
(16612060)**

ABSTRACT

Grafting mediated by free radical technique is one of the considerable methods to utilize chitosan in the food and medical industry. The process was using some chemicals which initiated the grafting reaction. Chitosan-ferulic acid in this research was modified by a redox initiator system from alcohol derived- H_2O_2 . Methanol, ethanol, 1-propanol, 2-propanol, 1-butanol, 2-butanol, and t-butanol were used as an initiator. The process was performed in a two-step, which is initiation and grafting. The reaction was designed by using mol of chitosan-ferulic acid 1:1, 24 hours reaction, and was carried out at room temperature. Structure characterization was used FTIR and XRD. Follin-Ciocalteu method measured the content of phenol graft onto chitosan. The ability of scavenging activity was measured by ABTS radical. The result has shown, samples using ethanol- H_2O_2 initiator has good ability compared with another sample. Sample ethanol showed 78,963 mg/g sample and a concentration minimum of inhibitory 438,92. Spectrum FTIR of each sample is shown shifting peak at 1633 sample methanol, ethanol, 1-propanol, 2-propanol dan 1653cm^{-1} 1-butanol, 2-butanol, t-butanol known as amide. The crystallinity of the sample measured by XRD has shown new characteristic diffraction peaks ranging from $2\theta = 30-40^\circ$. These data showed that this redox initiator has an ability to initiate grafting reaction.

Keyword: Chitosan, Grafting by Free Radical, Initiator, Phenolic Compound

BAB I PENDAHULUAN

1.1. Latar Belakang

Kitosan merupakan polisakarida yang dapat diperoleh melalui deasetilasi turunan kitin. Kitosan telah banyak digunakan dalam berbagai bidang seperti industri farmasi, biomedis, makanan, pemurnian air limbah, dan lainnya. Pemanfaatan kitosan dalam berbagai aplikasi ini dikarenakan beberapa sifatnya sebagai senyawa bioaktif diantaranya yaitu memiliki aktivitas antitumor, meningkatkan imun, memiliki aktivitas antioksidan, dan memiliki sifat sebagai antibakteri (Liu et al., 2018). Karakteristik ini didasarkan atas sifat khas yang dimiliki kitosan yaitu non-toksik, biokompabilitas yang tinggi, dan bersifat biodegradable (Li and Li, 2017).

Keterbatasan kitosan yang hanya dapat larut pada asam lemah serta sifat bioaktifnya seperti antioksidan yang lemah karena kurangnya atom H donor pada kerangka kitosan menjadikan pemanfaatan dari kitosan hanya dapat diaplikasikan pada bidang tertentu dan kurang optimal. Berdasarkan hal ini, perlu adanya peningkatan kemampuan kitosan agar pemanfaatan kitosan dapat digunakan secara maksimal.

Salah satu metode yang dapat digunakan untuk meningkatkan sifat kelarutan dan kemampuan bioaktif dari kitosan yaitu dengan metode *grafting* radikal bebas. Proses ini memerlukan suatu inisiator yang berperan penting untuk terjadinya suatu reaksi. Metode *grafting* menggunakan media radikal bebas memiliki beberapa keunggulan dari metode grafting lainnya yaitu prosesnya yang lebih mudah, ramah lingkungan, dan lebih aman digunakan dalam aplikasinya terhadap produk makanan dan kesehatan (Jing et al., 2019).

Saat ini penelitian terhadap senyawa fenolat dalam meningkatkan kemampuan kitosan semakin besar. Para peneliti melaporkan bahwa modifikasi kitosan dengan senyawa fenolat mampu meningkatkan aktivitas antioksidan dan memperluas spektrum aktivitas antimikroba terhadap bakteri penyebab pembusukan makanan (Li and Li, 2017). Selain itu, Curcio et al., 2009, juga

menjelaskan bahwa senyawa fenolat yang dikonjugasikan pada kitosan tidak hanya meningkatkan aktivitas antioksidan, tetapi juga meningkatkan sifat kelarutan kitosan yang dibandingkan dengan kitosan itu sendiri.

Asam askorbat dan hidrogen peroksida merupakan sistem inisiator redoks yang sering digunakan dalam metode *grafting* radikal bebas karena beberapa keunggulannya, yaitu lebih murah dibandingkan dengan reagen grafting lainnya seperti karboimida dan enzim, memiliki sifat toksisitas yang rendah, dan reaksi dapat dilakukan pada ruang temperatur (Liu et al., 2017). Sehingga pasangan redoks asam askorbat dan hidrogen peroksida ini banyak digunakan dalam sintesis senyawa fenolat-kitosan. Inisiator ini berperan dalam pembentukan radikal dari suatu polimer atau monomer sehingga proses reaksi *grafting* dapat berlangsung. Dalam prosesnya, inisiator asam askorbat- H_2O_2 mengalami dekomposisi inisiator yang membentuk radikal primer. Radikal ini berperan dalam pembentukan situs aktif pada polimer ataupun monomer. Asam askorbat akan mendonorkan satu elektronnya pada senyawa H_2O_2 sehingga terbentuk radikal hidroksil ($\cdot OH$) dan askorbat ($AscH\cdot$) (Hu et al., 1997)

Secara umum, radikal hidroksil ($\cdot OH$) dianggap sebagai radikal utama dalam sintesis senyawa kitosan terkonjugasi asam fenolat melalui metode *grafting* menggunakan radikal bebas (Liu et al., 2017). Radikal ini akan mengabtraksi atom hidrogen pada kitosan sehingga terbentuk situs aktif pada kerangka kitosan kemudian senyawa fenolat dapat terkonjugasi pada polimer. Akan tetapi, pada penelitian Liu et al., 2018, menyebutkan bahwa $\cdot OH$ tidak cukup kuat dalam menginisiasi reaksi grafting kitosan-senyawa fenolat, radikal ini hanya memutus ikatan β 1-4 glikosidik pada struktur kitosan yang membuat konjugasi senyawa fenolat dengan rantai kitosan menjadi sulit. Sebaliknya, radikal askorbat membentuk sebuah situs aktif pada kerangka kitosan dengan cara memutus ikatan inter dan intra atom hidrogen dari kitosan.

Kondisi reaksi dan reaktivitas suatu inisiator merupakan faktor yang perlu diperhatikan dalam pemilihan inisiator agar radikal primer yang terbentuk menghasilkan produk kitosan-asam ferulat dengan sifat yang diinginkan. Senyawa peroksida yang digunakan pada reaksi radikal bebas harus memenuhi kriteria

sebagai berikut : memiliki toksisitas yang rendah, bersifat volatil, waktu paruh (*half-life*) yang sesuai, efisiensi inisiator tinggi, dan radikal yang terbentuk mampu mengabstraksi atom hidrogen pada kerangka polimer (Hu et al., 1997).

Kemampuan abtraksi atom hidrogen pada kerangka polimer dari radikal inisiator asam askorbat dikarenakan gugus-gugus yang terikat pada struktur asam askorbat yaitu gugus alkohol, dimana pembentukan radikal terjadi pada atom oksigen. Atom oksigen yang terikat pada senyawa alkohol mengakibatkan senyawa ini dapat digunakan sebagai radikal inisiator. Untuk mengetahui faktor-faktor yang mempengaruhi kemampuan radikal inisiator dalam menginisiasi reaksi grafting senyawa kitosan dengan asam ferulat diperlukan analisis lebih lanjut terhadap kemampuan radikal yang terbentuk pada senyawa alkohol tersebut.

Berdasarkan permasalahan yang telah dijabarkan tersebut, pada penelitian ini akan dilakukan modifikasi suatu polimer kitosan dengan asam ferulat untuk mengetahui kemampuan inisiator dari golongan alkohol dalam menginisiasi reaksi radikal bebas konjugat kitosan-asam ferulat dengan teknik *grafting* radikal bebas menggunakan inisitor golongan alkohol.

1.2. Rumusan Masalah

Berdasarkan latar belakang tersebut, rumusan masalah dalam penelitian ini sebagai berikut.

1. Bagaimana kemampuan inisiator dari golongan alkohol dalam menginisiasi reaksi *grafting* kitosan dengan asam ferulat?
2. Bagaimana derajat substitusi dari produk akhir dengan inisiator golongan alkohol?
3. Bagaimana kemampuan antioksidan dari produk yang dihasilkan radikal inisiator golongan alkohol?

1.3. Tujuan Penelitian

Adapun tujuan dari penelitian ini sebagai berikut.

1. Mempelajari kemampuan radikal inisiator dari golongan alkohol dalam reaksi *grafting* asam ferulat pada kitosan.

2. Mengetahui derajat substitusi dari produk akhir yang dihasilkan dari inisiator golongan alkohol.
3. Mengetahui kemampuan antioksidan dari produk yang dihasilkan radikal inisiator golongan alkohol.

1.4. Manfaat Penelitian

Adapun manfaat dari penelitian ini yaitu:

1. Memberikan informasi pengaruh kestabilan radikal dari inisiator golongan alkohol terhadap derajat substitusi kitosan-asam ferulat.
2. Memberikan informasi kemampuan antioksidan dari produk kitosan-asam ferulat terkonjugasi.



BAB II TINJAUAN PUSTAKA

Kitosan merupakan polisakarida yang banyak terdapat di alam dan telah banyak digunakan dalam berbagai bidang karena kemampuannya sebagai senyawa bioaktif. Beberapa sifat bioaktivitasnya yaitu antijamur, antioksidan, meningkatkan imun, penyembuhan luka, serta memiliki aktivitas antibakteri (Curcio et al., 2009). Kitosan tersusun atas kerangka utama D-glukosa dengan gugus amina (-NH₂) dan hidoksil (-OH) yang terikat. Kitosan memiliki berbagai kelebihan seperti memiliki biokompabilitas yang tinggi, bersifat biodegradable, non-toksik, dan non antigenik (Li and Li, 2017) sehingga banyak dimanfaatkan pada berbagai bidang seperti rekayasa jaringan, farmasi, pangan, pertanian, dan kosmetik (Anwar et al., 2019).

Kelarutan kitosan yang hanya dapat larut dalam asam encer dan karakteristik bioaktifnya yang rendah membuat aplikasi kitosan menjadi terbatas (Li and Li, 2017). Berat molekul yang tinggi menyebabkan kitosan sukar larut dalam pelarut yang bersifat netral, serta kurangnya atom donor pada kerangka kitosan membuat kemampuan antioksidan kitosan kurang optimal, sehingga perlu adanya peningkatan untuk memperbaiki kelemahan dari kitosan agar aplikasi kitosan dapat digunakan dalam berbagai bidang. Kitosan dapat dengan mudah dimodifikasi dengan berbagai metode kimia seperti alkilasi, asilasi, hidroksilasi, dan grafting kopolimerisasi. Teknik *grafting* kopolimerisasi menjadi salah satu teknik modifikasi yang sering digunakan untuk mendapatkan sifat kitosan yang diinginkan (Liu et al., 2018).

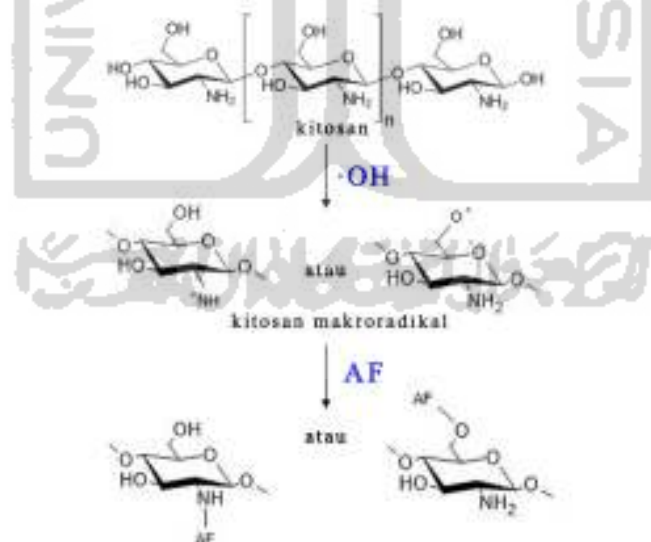
Senyawa fenolat yang dicangkok pada polimer kitosan terbukti mampu memperbaiki sifat kelarutan dan meningkatkan sifat bioaktif dari kitosan, karena kelebihan dari senyawa ini yaitu memiliki aktivitas antioksidan yang kuat. Asam ferulat merupakan senyawa turunan dari asam fenolat yang berasal dari metabolisme fenilalanin dan tirosin (Listyo et al., 2018). Senyawa ini banyak digunakan dalam industri kosmetik, pangan, dan farmasi karena kemampuannya sebagai antioksidan, antibakteri, antiinflamasi, dan lainnya (Woranuch and Yoksan, 2013). Beberapa penelitian yang melakukan modifikasi kitosan dengan asam ferulat

terbukti mampu meningkatkan aktivitas biologis dari kitosan. Penelitian yang dilakukan oleh Liu et al., 2014, membuktikan bahwa produk konjugat dari kitosan-asam ferulat memiliki aktivitas penangkap radikal yang lebih tinggi daripada kitosan terhadap radikal superoksida seperti H_2O_2 pada konsentrasi 1 mg/mL dengan aktivitas sebesar 35,18% untuk kitosan dan 56, 58 % untuk kitosan-asam ferulat. Dimana konsentrasi minimal untuk menghambat radikal tersebut sebesar 2,12 mg/mL untuk kitosan dan 0,7 mg/mL untuk kitosan-asam ferulat.

Terdapat empat jenis teknik *grafting* yang sering digunakan untuk memodifikasi sifat kitosan, yaitu *grafting* dengan kopling karboimida, *grafting* katalis enzim, *grafting* dengan media radikal bebas, dan metode elektrokimia (Liu et al., 2017). Proses *grafting* dengan kopling karboimida menggunakan reagen kimia seperti 1-etil-3-(3-dimetil propil) karboimida (EDC) dan disikloheksilkarboimida (DCC) dalam modifikasi kitosan dengan senyawa fenolat, akan tetapi teknik ini membutuhkan reagen yang cukup banyak dalam prosesnya sehingga dapat menimbulkan pencemaran lingkungan dan efek negatif terhadap kesehatan apabila produk *grafting* digunakan dalam industri pangan atau farmasi. *Grafting* dengan katalis enzim juga merupakan salah satu metode yang digunakan untuk memperbaiki keterbatasan dari kitosan, metode ini lebih ramah lingkungan, aman terhadap kesehatan, dan murah. Akan tetapi, enzim akan mengkatalis oksidasi dari gugus hidroksil fenol menjadi O-kuinon yang dapat menurunkan aktivitas biologis dari senyawa fenolat seperti antioksidan dan antimikroba. Sementara itu, proses pencangkakan senyawa fenolat dengan kitosan melalui metode elektrokimia memiliki kemiripan terhadap proses *grafting* dengan katalis enzim. Proses modifikasi dengan elektrokimia akan menimbulkan terjadinya reaksi oksidasi pada senyawa fenolat yang dapat mengurangi sifat biologis dari senyawa tersebut. Ditambah lagi, Metode ini hanya dapat digunakan pada senyawa fenolat tertentu dan membutuhkan alat yang spesifik dalam prosesnya. Teknik *grafting* digunakan untuk modifikasi suatu polimer induk dengan tujuan untuk meningkatkan kekuatan adhesif polimer (Song et al., 2006), biodegradasi polimer (Hendri et al., 2008), memberikan sifat penghantar proton sebagai membran sel bahan bakar (Christina et al., 2008), dan berbagai tujuan lainnya.

Salah satu teknik *grafting* yang banyak digunakan dalam bidang pangan dan kesehatan adalah *grafting* dengan inisiator radikal bebas. Metode *grafting* dengan media radikal bebas merupakan teknik yang sering digunakan dalam industri pangan dan kesehatan, karena proses yang dilakukan tidak menghasilkan produk yang bersifat toksik akibat penggunaan reagen kimia seperti dalam reaksi kopleng menggunakan karboimida, sehingga metode ini bersifat lebih aman dan ramah lingkungan aplikasinya dalam industri pangan (İlyasoğlu et al., 2019). Modifikasi suatu polimer dengan metode *grafting* menggunakan media radikal bebas ini melibatkan pembentukan situs aktif berupa radikal bebas pada monomer atau polimer induk oleh suatu inisiator (Dyer, 2006).

Asam askorbat (Asc) dan hidrogen peroksida (H_2O_2) merupakan inisiator redoks yang paling banyak digunakan dalam metode *grafting* dengan radikal bebas karena beberapa kelebihan yang dimilikinya yaitu reagensinya yang lebih murah dibandingkan dengan karboimida dan enzim, sifat toksisitasnya yang lebih rendah dibandingkan dengan reagen karboimida, dan reaksi dapat dilakukan pada ruang temperatur sehingga dapat mencegah degradasi dan oksidasi dari senyawa fenolat (Liu et al., 2017).



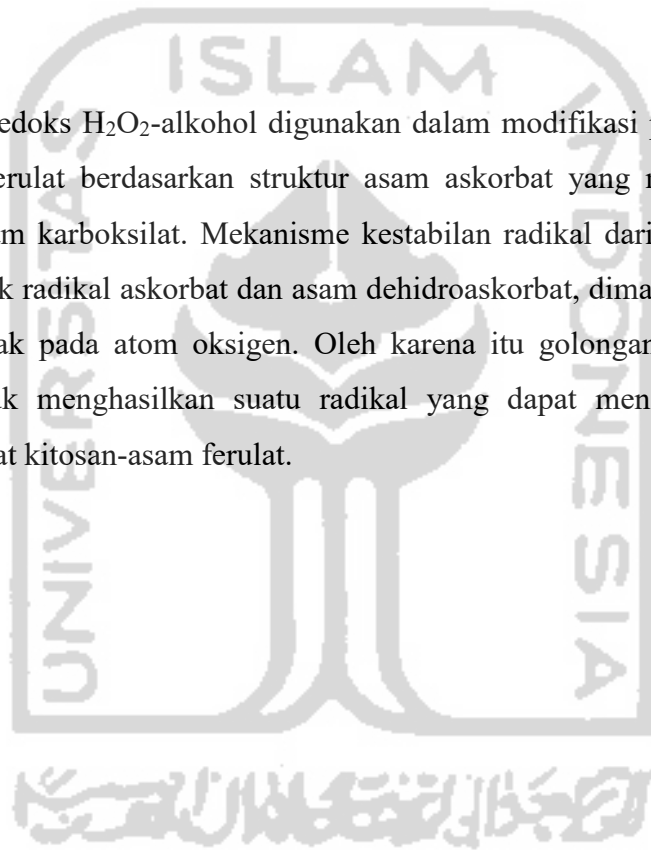
Gambar 1. Proses *grafting* kitosan-senyawa fenolat

Sistem inisiator redoks bekerja berdasarkan prinsip reaksi oksidasi dan reduksi. Asam askorbat berperan sebagai reduktor yang mendonorkan satu elektron terhadap senyawa peroksida yang merupakan oksidator sehingga terbentuk radikal.

hidroksil dan askorbat. Radikal yang terbentuk ini kemudian akan menginisiasi pembentukan situs aktif pada polimer kitosan sehingga dihasilkan radikal kitosan. Radikal polimer yang terbentuk kemudian akan bereaksi dengan senyawa fenolat sehingga terbentuk suatu produk baru kitosan-senyawa fenolat. Reaksi *grafting* yang terjadi ditunjukkan pada Gambar 1. (Liu et al., 2017).

2.1 Hipotesis

Inisiator redoks H_2O_2 -alkohol digunakan dalam modifikasi polimer kitosan dengan asam ferulat berdasarkan struktur asam askorbat yang memiliki gugus alkohol dan asam karboksilat. Mekanisme kestabilan radikal dari asam askorbat akan membentuk radikal askorbat dan asam dehidroaskorbat, dimana radikal yang terbentuk terletak pada atom oksigen. Oleh karena itu golongan alkohol dapat digunakan untuk menghasilkan suatu radikal yang dapat menginisiasi reaksi *grafting* konjugat kitosan-asam ferulat.



BAB III DASAR TEORI

3.1. Kitosan

Kitosan merupakan biopolimer glukosaminoglikan yang terdiri dari dua jenis gula yaitu glukosamina dan N-asetilglukosamina. Biopolimer ini dapat diperoleh melalui proses deasetilasi (proses penghilangan gugus asetil dengan atom hidrogen yang menghasilkan gugus amina) kitin sempurna ataupun sebagian. Proses deasetilasi menggunakan natrium hidroksida (NaOH) 40-45% pada temperatur 120° yang berlangsung selama 1-3 jam. konsentrasi basa, waktu, dan temperatur menentukan derajat deasetilasi kitosan (Bakshi et al., 2019). Derajat deasetilasi kitosan dengan nilai lebih dari 75% memiliki gugus amino bebas, hal ini yang membuat kitosan dapat larut dalam kondisi asam. Kerangka kitosan terdiri dari poli (2-deoksi-2-asetilamin-2-glukosa) dan poli (2-deoksi-2-aminoglukosa) yang berikatan secara (1-4) glikosidik (Kurniasih and Kartika, 2009). Kitosan dapat ditemukan dalam dinding sel kelompok krustasea dan serangga. Terdapat tiga gugus fungsi utama pada kerangka kitosan yaitu gugus amino atau asetamida, gugus hidroksil primer dan sekunder pada rantai karbon posisi C_2, C_3 , dan C_6 (Hu and Luo, 2016). Penelitian terhadap pengembangan kitosan dalam berbagai industri menjadi semakin besar, karena keunikan yang dimilikinya yaitu dalam larutan asam kitosan memiliki karakteristik kation dan bermuatan positif. Sementara dalam larutan alkali kitosan akan mengendap (Pratiwi, 2014).



Gambar 2. Struktur kitosan

Tidak seperti polisakarida pada umumnya yang bermuatan netral ataupun negatif, kitosan merupakan polisakarida yang unik, karena memiliki gugus amin bermuatan positif (Angka and Suhartono, 2000), sehingga memungkinkan gugus

amin dari kitosan berinteraksi dengan muatan negatif suatu molekul seperti protein atau polimer lainnya (Goosen, 1997). Kitosan dapat diperoleh dengan berbagai macam struktur morfologi seperti struktur kristalin, semikristalin, dan bentuk tidak teratur. Struktur kitosan analog terhadap kerangka selulosa, dimana gugus hidroksil pada C₂ digantikan dengan gugus asetamida atau amina. Ditambah lagi, kitosan juga dapat berbentuk padatan amorf berwarna putih dengan struktur kristal tetap dari bentuk awal kitin murni (Pratiwi, 2014). Struktur kristalin ini dipengaruhi oleh banyaknya gugus hidroksil dan tingginya reaktivitas gugus amina yang menyebabkan terbentuknya interaksi ikatan inter dan intra atom hidrogen pada kitosan (Bakshi et al., 2019).

Sifatnya yang khas menjadikan kitosan sebagai biopolimer yang banyak digunakan dalam berbagai bidang seperti agen *coating* dalam industri pangan, agen pembentuk film dalam material pembungkus makanan, nanopartikel dalam fungsi distribusi bahan makanan, agen enkapsulasi dan biomaterial terbarukan (Liu et al., 2017), biomedis, pengolahan air limbah, kosmetik dan lainnya (Liu et al., 2014).

Selain fungsi tersebut, kitosan juga memiliki potensi sebagai senyawa bioaktif yang mana sifat tersebut dapat berguna dalam kehidupan makhluk hidup, seperti aktivitas antitumor, meningkatkan imun, penyembuhan luka, antijamur, dan antibakteri, serta memiliki sifat antioksidan. Beberapa karakteristik ini dikarenakan sifat khas dari kitosan yaitu biokompatibel yang tinggi, biodegradasi, nontoksik, dan nonantigenik (Li and Li, 2017).

Akan tetapi, berat molekul yang tinggi membuat kelarutan kitosan yang hanya dapat larut dalam larutan asam encer (Woranuch and Yoksan, 2013). Selain kekurangan tersebut, beberapa keterbatasan lainnya yaitu lemahnya sifat antioksidan dari kitosan yang disebabkan oleh kurangnya donor atom hidrogen dari kerangka kitosan, dan tingginya laju adsorpsi air, membuat aplikasi dari kitosan menjadi terbatas (Hu and Luo, 2016).

Berdasarkan keterbatasan yang dimiliki kitosan tersebut, perlu dilakukannya modifikasi terhadap polimer kitosan untuk memperbaiki sifat fisikokimia dari kitosan. Selain itu, modifikasi kerangka kitosan juga dapat membantu meningkatkan berbagai kemampuan bioaktivitasnya seperti antioksidan,

antibakteri, antitumor sehingga kitosan dapat digunakan dalam berbagai bidang aplikasi yang lebih luas (Moreno-Vásquez et al., 2017).

3.2. Senyawa Fenolat

Senyawa fenolat merupakan metabolit sekunder yang dapat ditemukan dalam tanaman dengan gugus fenol yang terikat, yaitu gugus -OH terikat pada cincin aromatik. Senyawa ini bersifat asam dengan nilai pKa = 10 (Fessenden and Fessenden, 1986). Fenolat diproduksi melalui jalur asam sikimat dengan mengkonversi karbohidrat sederhana menjadi fenilalanin dan triptofan (Kumar and Goel, 2019). Pada kehidupan sehari-hari senyawa fenol memiliki peran penting dalam pertumbuhan, reproduksi, pigmentasi, dan mekanisme pertahanan dari radiasi sinar ultraviolet dan patogen serta memiliki berbagai aktivitas biologis seperti antioksidan, antialergi, antibakteri, antiinflamasi, antitumor, dan berbagai aktivitas lainnya. Dari berbagai aktivitas biologis yang dimilikinya, aktivitas antioksidan menarik perhatian besar terhadap para peneliti untuk dikembangkan. Karena beragam manfaat yang dimilikinya, senyawa ini banyak digunakan dalam bidang pangan, kosmetik, dan obat-obatan.

Kemampuan aktivitas penangkap radikal pada *reactive oxygen species* (ROS) seperti radikal hidroksil, anion superoksida, hidrogen peroksida, memiliki potensi yang baik dalam pencegahan dampak negatif yang ditimbulkan oleh turunan ROS seperti penuaan dini dan berbagai penyakit kronis (Hu and Luo, 2016). Hal ini disebabkan karena kemampuan dari senyawa fenolat yang mampu mentransfer atom hidrogen pada radikal bebas tersebut, sehingga radikal dapat distabilkan (Wang et al., 2019). Senyawa fenolat dapat dijumpai pada sayuran, buah-buahan, teh, kopi. Berdasarkan perbedaan jumlah fenol dan jenis unsur yang terikat pada cincin aromatis, senyawa fenol dikategorikan menjadi empat kelompok yaitu asam fenolat, flavonoid, stilben, dan lignan (Hu and Luo, 2016).

Secara umum senyawa asam fenolat merupakan senyawa yang mengandung gugus asam karboksilat. Senyawa asam fenolat adalah salah satu kelompok utama dari senyawa fenolat yang banyak terdapat dalam biji, kulit buah, daun, dan sayuran

dengan konsentrasi yang tinggi. Asam fenolat dibagi dalam dua sub-kategori yaitu asam hidroksi benzoat dan asam hidroksi sinamat (Kumar and Goel, 2019)

Asam hidroksi sinamat merupakan senyawa turunan dari asam sinamat yang dapat ditemukan dalam makanan dalam bentuk ester sederhana dengan asam kuinik atau glukosa. Senyawa yang umum dikenal dalam kelompok asam hidroksi sinamat yaitu asam ferulat, asam kafeat, asam para kumarat, dan asam sinapat, dan lainnya (Kumar and Goel, 2019)

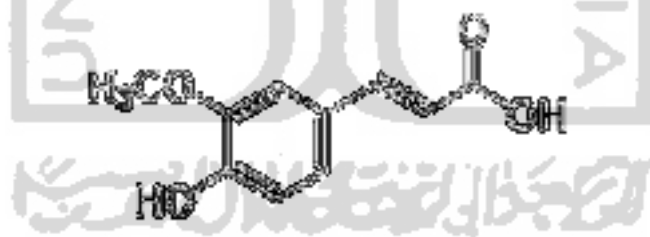
Dalam perkembangannya, senyawa asam fenolat yang dikonjugasikan pada polimer kitosan dapat mengoptimalkan aktivitas dari kitosan melalui berbagai teknik modifikasi baik metode secara fisik, enzimatis, maupun kimia, salah satunya yaitu teknik *grafting* dengan radikal bebas. Curcio et al., 2009, menyebutkan bahwa insersi molekul antioksidan pada kitosan melalui metode *grafting* menggunakan radikal bebas memberikan peningkatan terhadap kelarutan kitosan, tetapi juga meningkatkan aktivitas antioksidan dari kitosan. Hal ini dikarenakan adanya penambahan gugus hidroksil yang bersifat hidrofilik terhadap kerangka kitosan (Hu and Luo, 2016). Jenis senyawa fenolat, konsentrasi senyawa fenolat yang dapat terkonjugasi pada kerangka kitosan, perbandingan konsentrasi kitosan dan senyawa fenolat, teknik modifikasi yang digunakan menjadi faktor yang mempengaruhi kemampuan antioksidan kitosan-senyawa fenolat terkonjugasi (Hu et al., 2016; Wang et al., 2019; Xie et al., 2014).

Penelitian Cho et al., 2011, menjelaskan bahwa kemungkinan besar senyawa fenolat yang dikonjugasi pada kerangka kitosan akan terikat pada gugus $-NH_2$ dari atom C_2 dan gugus $-OH$ dari atom C_6 , sedangkan kemungkinan kecil senyawa fenolat dapat terkonjugasi pada gugus $-OH$ dari atom C_3 karena adanya faktor halangan sterik. Ditambah lagi beberapa penelitian menyebutkan, modifikasi kitosan-senyawa fenolat dapat mengubah sifat fisikokimia dari kitosan diantaranya yaitu sifat kristalinitas dan kelarutan kitosan. Ketika suatu fenolat dikonjugasi pada kitosan dengan teknik *grafting* menggunakan media radikal bebas, kristalinitas dari kitosan menurun dan memberikan karakteristik puncak yang melebar. Penurunan ini disebabkan karena adanya kemungkinan pemutusan ikatan inter dan intra hidrogen kitosan. Hal ini menyebabkan strukturnya kristal dari kitosan menjadi amorf.

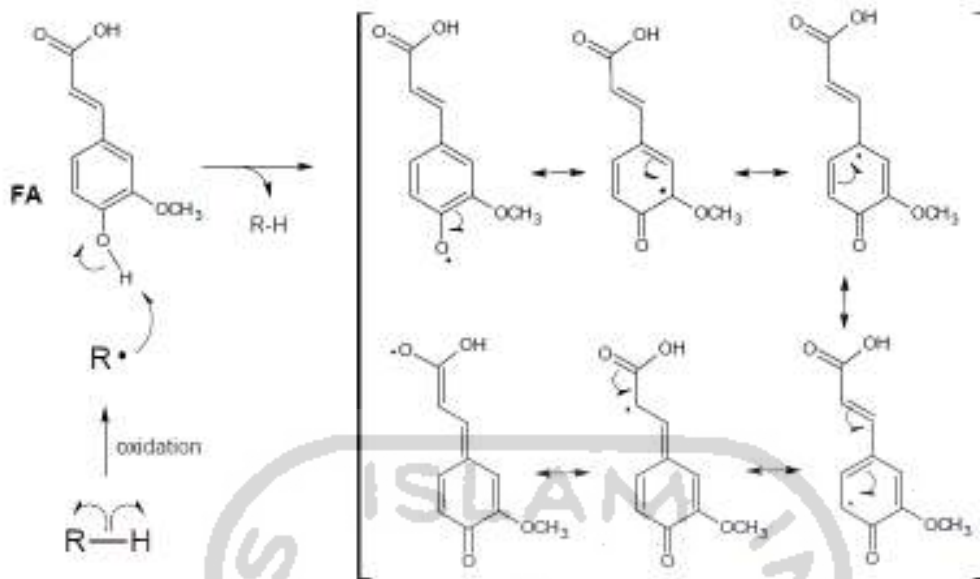
Perubahan sifat kristal ini juga mempengaruhi sifat kelarutan kitosan, dimana kitosan sulit larut dalam pelarut netral diakibatkan interaksi yang kuat dari ikatan inter dan intra molekul hidrogen ini (Liu et al., 2018, 2017; Woranuch and Yoksan, 2013).

3.3. Asam Ferulat

Asam ferulat merupakan salah satu kelompok senyawa asam fenolat yang dapat ditemukan dalam tanaman hasil dari metabolisme fenilalanin dan tirosin. Senyawa ini memiliki inti fenolik dan diperpanjang rantai samping konjugasi sehingga mudah membentuk resonansi stabil radikal fenoksil yang memiliki potensi aktivitas antioksidan yang kuat (Listyo et al., 2018). Radikal fenoksil yang dihasilkan bersifat tidak reaktif sehingga tidak menimbulkan reaksi inisiasi maupun propagasi yang dapat memicu suatu reaksi berantai pembentukan radikal bebas yang baru. Kestabilan ini disebabkan oleh adanya resonansi dari cincin aromatis dan rantai tidak jenuh dari struktur asam ferulat. Atom hidrogen yang berasal dari radikal bebas akan diabstraksi oleh asam ferulat yang menghasilkan suatu senyawa yang bersifat stabil, sehingga tidak menimbulkan reaksi berantai yang menyebabkan kerusakan oksidatif yang diakibatkan oleh radikal bebas (Batista, 2014). Struktur dan mekanisme penangkap radikal bebas oleh asam ferulat ditunjukkan pada Gambar 3 dan 4.



Gambar 3. Struktur asam ferulat



Gambar 4. Skema asam ferulat menstabilkan radikal bebas

Kemampuannya sebagai senyawa antioksidan menunjukkan potensi yang besar terhadap pengobatan berbagai penyakit kronis seperti alzheimer, kanker, kardiovaskular, diabetes melitus dan lainnya (Li and Li, 2017). Ditambah lagi, Paiva et al., 2013, menjelaskan bahwa senyawa ini dapat digunakan untuk mengurangi efek samping yang ditimbulkan oleh kemoterapi pada pengobatan kanker dengan meningkatkan sistem imun tubuh. Berbagai penelitian telah membuktikan bahwa senyawa asam ferulat yang dikonjugasikan dengan kitosan dapat meningkatkan aktivitas antioksidan dari kitosan. Hu and Luo, 2016, menjelaskan bahwa gugus hidroksil yang terdapat dalam senyawa asam ferulat memiliki kontribusi yang sangat kuat terhadap aktivitas antioksidan. Senyawa Asam 4-hidroksi-3-metoksi sinamat atau asam ferulat ini memiliki struktur gugus karboksilat yang mana mampu bereaksi dengan gugus amino yang ada pada kitosan sehingga sifat kelarutan dan aktioksidan meningkat (Woranuch and Yoksan, 2013).

3.4. *Grafting* Kopolimerisasi Dengan Inisiator Radikal Bebas

Metode *grafting* dengan menggunakan induksi radikal bebas telah diterima sebagai metode yang efektif dalam memodifikasi polimer kitosan yang dikonjugasi dengan senyawa asam fenolat. Kitosan dapat dimodifikasi menggunakan metode *grafting* melalui inisiator radikal bebas karena memiliki dua gugus fungsi yang

bersifat reaktif yaitu gugus amino dan hidroksil sehingga dapat digrafting dengan senyawa lain untuk mendapatkan sifat yang diinginkan. Pada proses modifikasi ini akan terjadi pembentukan turunan fungsional melalui ikatan kovalen dari molekul yang digrafting pada kerangka kitosan (Anah et al., 2015).

Modifikasi suatu polimer dengan menggunakan teknik *grafting* melibatkan pembentukan situs aktif berupa radikal bebas terlebih dahulu pada polimer induk yang diinisiasi dengan suatu inisiator, radikal yang terbentuk akibat adanya abstraksi atom hidrogen oleh inisiator sehingga polimer dapat digrafting dengan senyawa lain (Hidayani, 2018). Metode ini banyak digunakan dalam proses modifikasi kitosan karena tidak menghasilkan produk samping yang bersifat toksik akibat penggunaan reagen kimia seperti yang digunakan dalam kopling karboimidida, sehingga lebih bersifat aman dan ramah terhadap lingkungan, dan baik diaplikasikan dalam industri pangan (İlyasoğlu et al., 2019). Selain itu, proses *grafting* ini dapat dilakukan pada ruang temperatur, hal ini dapat mencegah terjadinya degradasi dari senyawa yang tidak tahan terhadap temperatur tinggi.

Asam askorbat (AA) dan hidrogen peroksida (H_2O_2) merupakan radikal inisiator redoks yang efektif dalam memodifikasi kitosan-senyawa fenolat. Pasangan redoks ini digunakan untuk menghasilkan radikal hidroksil dan menyerang tiga jenis atom hidrogen yang berbeda dari tiap gugus yang terdapat pada kerangka kitosan, seperti gugus hidroksil, amino, dan α -metilen sehingga terbentuk makromolekul radikal kitosan. Senyawa fenolat kemudian disisipkan secara kovalen terhadap makroradikal kitosan pada posisi tiga gugus fungsi tersebut, sehingga kitosan yang dikonjugasikan dengan senyawa fenolat dapat disintesis (Hu and Luo, 2016). Sedangkan, inisiator konvensional seperti senyawa azo dan peroksida dianggap kurang efektif dalam modifikasi senyawa kitosan-asam fenolat karena memerlukan kondisi reaksi pada temperatur yang tinggi untuk dekomposisi yang cepat. Sementara itu, inisiator redoks seperti asam askorbat dan hidrogen peroksida lebih efektif digunakan karena tidak menimbulkan produk samping yang bersifat toksik, dapat dilakukan pada ruang temperatur, serta mereduksi resiko terjadinya degradasi antioksidan akibat kondisi reaksi yang menggunakan suhu tinggi (Curcio et al., 2009).

Penelitian yang dilakukan oleh Liu et al., 2014, mensintesis kitosan-asam ferulat menggunakan teknik *grafting* dengan media radikal bebas bahwa kitosan berhasil dikonjugasikan dengan senyawa fenolat dengan rasio *grafting* produk yang dihasilkan yaitu 66,7 mg/g. hal ini membuktikan bahwa kitosan dapat disintesis melalui metode *grafting* menggunakan radikal bebas dengan memberikan rasio *grafting* yang tinggi. Dengan demikian, teknik modifikasi dengan *grafting* radikal bebas dapat menjadi strategi yang efektif untuk mensintesis kitosan-senyawa fenolat.

3.5. Inisiator

Teknik *grafting* dengan menggunakan perantara radikal bebas membutuhkan suatu inisiator untuk terjadinya sebuah reaksi radikal bebas. Inisiator merupakan suatu zat yang dapat mengawali suatu reaksi radikal bebas. Salah satu contoh yang dapat berperan sebagai inisiator yaitu peroksida (ROOR). Senyawa ini mudah membentuk radikal bebas karena adanya energi disosiasi ikatan RO-OR sekitar 35 kkal/ mol, dimana energi ini lebih rendah dibandingkan dengan kebanyakan ikatan (Fessenden and Fessenden 1986). Berdasarkan jenisnya, inisiator dibedakan menjadi empat kelompok yaitu peroksida dan hidroperoksida, senyawa azo, inisiator redoks, dan senyawa yang dapat membentuk radikal karena pengaruh cahaya (Stevens, 2001). Inisiator redoks bekerja berdasarkan prinsip reaksi reduksi oksidasi. Pembentukan radikal dengan inisiator redoks terjadi karena adanya proses transfer elektron yang berasal dari suatu senyawa terhadap atom atau ion yang tidak stabil kemudian terbentuk ikatan kovalen pada atom tersebut (Sarac, 1999).

Laju dekomposisi dari suatu inisiator menjadi hal yang perlu diperhatikan untuk pemilihan inisiator yang sesuai dalam reaksi radikal bebas. Senyawa peroksida yang digunakan harus memiliki karakteristik sifat tertentu yaitu memiliki toksisitas yang rendah, bersifat volatil, waktu paruh yang sesuai, efisiensinya tinggi, mampu mengabstraksi atom hidrogen pada kerangka polimer (Hu et al., 1997).

Waktu paruh dari suatu peroksida diukur berdasarkan laju dekomposisi pada temperatur tertentu. Hal ini mengindikasikan waktu yang dibutuhkan untuk sejumlah peroksida tersebut terdekomposisi menjadi setengah dari jumlah awal peroksida. Semakin rendah laju dekomposisi, waktu yang dibutuhkan untuk

senyawa peroksida terdekomposisi akan semakin lama, menghasilkan sejumlah radikal yang cukup untuk digunakan pada proses inisiasi reaksi radikal bebas. Sehingga, waktu paruh menjadi faktor penting yang perlu diperhatikan dalam pemilihan suatu inisiator yang sesuai untuk reaksi *grafting*. Dekomposisi termal dari senyawa peroksida berlangsung pada orde kinetik pertama

$$-\frac{dc}{dt} = kc \quad (1.1)$$

$$t = k_0 \left(\frac{c_0}{k} \right)^{1/2} \quad (1.2)$$

$$t_{1/2} = \ln \left(\frac{2}{k} \right) \quad (1.3)$$

Persamaan 1.3 mengindikasikan karakteristik $t_{1/2}$ bergantung pada faktor laju intrinsik konstan k . nilai k ini mempengaruhi tiga faktor yaitu kestabilan radikal, faktor sterik, dan efek elektron. Faktor-faktor ini menghasilkan energi aktivasi dan k_0 dalam persamaan Arrhenius :

$$k = k_0 \exp \left(-\frac{E_a}{RT} \right) \quad (1.4)$$

Sehingga pengaruh temperatur pada $t_{1/2}$ dapat dituliskan sebagai berikut

$$t_{1/2} = \ln \left(\frac{2}{k_0} \right) \exp \left(\frac{E_a}{RT} \right) \quad (1.5)$$

Gambar 5. Persamaan waktu paruh peroksida pengaruh temperatur

Jenis pelarut dan polaritas dari pelarut juga berpengaruh pada waktu paruh dari senyawa peroksida. Beberapa jenis radikal primer dari peroksida dapat menyerang secara langsung membentuk radikal primer pada pelarut tertentu. Selain itu, radikal tersebut juga dapat menyerang pelarut tertentu untuk membentuk radikal sekunder, kemudian radikal ini akan menyerang senyawa peroksida untuk membentuk radikal primer yang lebih banyak (Hu et al., 1997).

Reaktivitas suatu radikal bebas juga menjadi faktor pendukung dari pemilihan inisiator. Urutan reaktivitas suatu radikal bebas dari golongan alkohol sama halnya dengan urutan reaktivitas karbokation. Urutan reaktivitas tersier > sekunder > primer > metil timbul dari kemampuan keadaan transisi yang menghasilkan radikal bebas. Karena keadaan transisi memiliki sifat radikal bebas, stabilitasnya akan paralel dengan stabilitas radikal bebas itu sendiri. Stabilitas ini dihubungkan dengan energi disosiasi ikatan O-H yang akan putus. Pemutusan ikatan untuk menuju ke suatu radikal bebas yang lebih stabil membutuhkan energi yang lebih rendah daripada pemutusan ikatan yang menuju ke radikal yang kurang stabil (Fessenden and Fessenden, 1986).

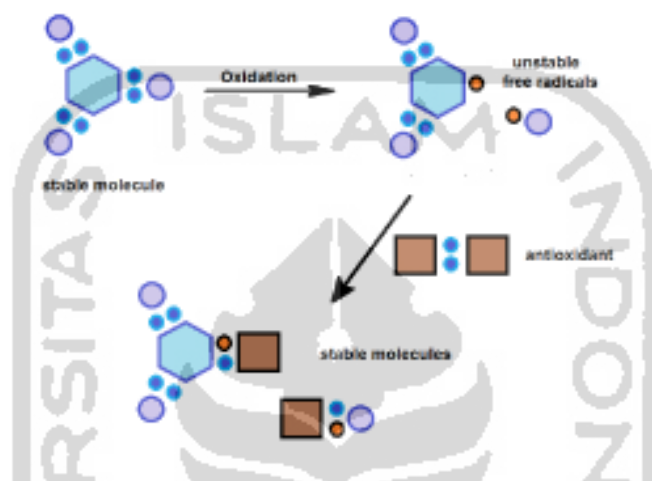
3.6. Antioksidan

Proses oksidatif yang terjadi akibat metabolisme tubuh dapat menimbulkan spesi oksigen reaktif atau *reactive oxygen species* (ROS) yang merupakan faktor utama dari kerusakan DNA dan mutasi gen dan berbagai dampak negatif lainnya yang dapat ditimbulkan (Kumar and Goel, 2019). Spesi oksigen reaktif (ROS) seperti hidrogen peroksida (H_2O_2), radikal hidroksil ($\cdot OH$), anion superoksida (O_2^-), oksigen singlet (1O_2) diperlukan pada sel normal dalam jumlah tertentu, akan tetapi jumlah ROS yang berlebih di dalam tubuh juga dapat merusak komponen seluler seperti lipid, protein, dan DNA (Kumar and Goel, 2019 ; Liu et al., 2014).

Radikal bebas merupakan suatu atom atau molekul yang mengandung satu atau lebih elektron tidak berpasangan dan bersifat sangat reaktif (Fessenden and Fessenden 1986). Sehingga untuk menjadi stabil radikal bebas cenderung akan mengambil elektron dari molekul lain yang menimbulkan ketidakstabilan molekul lain dan mengakibatkan reaksi berantai yang dapat merusak jaringan (Da'i and Triharman, 2010). Untuk mencegah efek negatif yang ditimbulkan dari radikal bebas ini dibutuhkan antioksidan.

Antioksidan adalah suatu substansi dalam kadar yang rendah mampu menghambat proses oksidasi (Da'i and Triharman, 2010). Molekul antioksidan berperan sebagai sistem pertahanan untuk melawan kerusakan dari proses oksidatif yang diakibatkan oleh radikal bebas seperti penuaan sel (Liu et al., 2014). Molekul ini akan menurunkan atau menghambat radikal dan turunan ROS yang

mengoksidasi biomakromolekul yaitu DNA, membran lipid, dan protein (Cho et al., 2011). Aktivitas senyawa antioksidan meliputi berbagai mekanisme seperti memutus reaksi berantai yang ditimbulkan radikal bebas, mencegah terjadinya reaksi inisiasi, mencegah dekomposisi dari lipid, meredam reaktivitas oksigen singlet, dan lain-lain (Xie et al., 2014). Senyawa ini berperan sebagai agen reduktor yang bereaksi dengan radikal bebas, kemudian membentuk senyawa yang bersifat stabil (Batista, 2014). Skema aktivitas antioksidan ditunjukkan pada Gambar 6.



Gambar 6. Skema aktivitas antioksidan

Pada umumnya, tubuh makhluk hidup dilengkapi dengan sistem pertahanan yang dapat mencegah terjadinya reaksi oksidasi yang ditimbulkan oleh radikal bebas, seperti vitamin C, A, E, enzim katalase, superoksida dimustase (SOD), dan enzim peroksidase lainnya. Akan tetapi, antioksidan alami yang dimiliki dalam tubuh organisme ini tidak cukup efektif dalam mencegah secara keseluruhan proses oksidasi yang diakibatkan oleh radikal bebas. Sehingga perlu dilakukan penelitian mengenai pengembangan aktivitas antioksidan yang baik dari berbagai sumber alam (Liu et al., 2014).

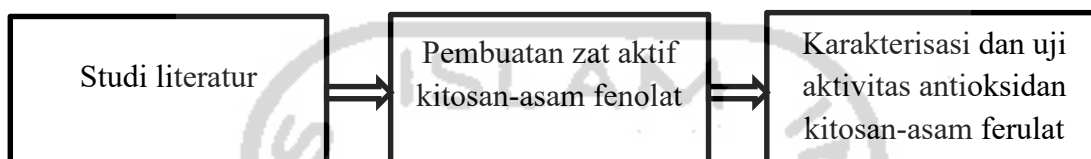
Curcio et al., 2009, menjelaskan bahwa gugus amino yang ada pada molekul kitosan berperan sebagai nukleofil kuat dalam modifikasi struktur kitosan yang bereaksi secara cepat dengan elektrofil kemudia membentuk kitosan makroradikal, pada sisi ini molekul antioksidan dari senyawa fenolat dapat dimasukkan pada kerangka kitosan. Sementara itu, Hu and Luo, 2016, menjelaskan aktivitas

antioksidan dari senyawa kitosan-asam ferulat memiliki spektrum yang lebih luas dalam kemampuannya menangkap radikal bebas dari DPPH, ABTS, hidroksil, superoksida, dan hidrogen peroksida dibandingkan dengan kitosan murni. Aktivitas antioksidan dari modifikasi kitosan-senyawa fenolat bergantung pada gugus hidroksil yang dapat dikonjugasikan pada kerangka kitosan.

Dalam teknik modifikasi kitosan dengan senyawa fenolat, jenis fenol, jumlah gugus hidroksil, teknik *grafting*, konsentrasi perbandingan inisiator yang digunakan menjadi faktor penting yang perlu diperhatikan (Liu et al., 2017, 2014; Wang et al., 2019; Xie et al., 2014). Liu et al., 2014, membuktikan bahwa senyawa asam kafeat yang dikonjugasikan pada kitosan memiliki aktivitas penangkap radikal yang lebih besar dibandingkan dengan asam ferulat terhadap radikal superoksida, radikal hidroksil, dan hidrogen peroksida. Perbedaan aktivitas ini disebabkan karena perbedaan struktur kimia dari kedua senyawa tersebut. Asam ferulat (Asam 4-hidroksi-3-metoksi sinamat) hanya memiliki satu gugus hidroksil yang tersubstitusi di posisi para pada cincin aromatik. Sedangkan, struktur dari asam kafeat (Asam 3,4-dihidroksi sinamat) memiliki dua gugus hidroksil yang terletak di posisi ortho dan para pada cincin aromatik. Adanya gugus hidroksil yang lebih banyak pada posisi orto dan para ini terbukti dapat meningkatkan aktivitas antioksidan karena adanya resonansi stabil dari gugus tersebut.

BAB IV METODE PENELITIAN

Penelitian dilaksanakan di Laboratorium Pangan Balai Penelitian Teknologi Bahan Alam Lembaga Ilmu Pengetahuan Indonesia. Tahapan penelitian ini meliputi studi literatur, persiapan penelitian, pelaksanaan penelitian, analisis data, evaluasi, dan penulisan. Berikut tahapan dari pengumpulan data yang disajikan pada Gambar 7.



Gambar 7. Tahapan Alur Penelitian

4.1. Alat dan Bahan

Alat yang digunakan dalam penelitian ini yaitu gelas beker, Erlenmeyer, kaca arloji, pipet ukur, mikropipet, tabung reaksi, instrumen FTIR plat KBR (Prestige-21 Shimadzu), XRD (Rigaku Miniflex 600 Benchtop), ELISA reader (Thermo Scientific™ Multiskan™ GO Microplate Spectrophotometer).

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini yaitu asam 4-hidroksi-3-metoksi sinamat (Merck), *Chitosan* (Sigma Aldrich– No. katalog 448869, 75-85% deacetylated, 50,000-190,000 Da), hidrogen peroksida 30% (Merck), asam asetat (Merck), NaOH (Merck), reagen *methanol for analysis* (Merck), *ethanol absolute for analysis* (Merck), *1-propanol for analysis* (Merck), *2-propanol for analysis* (Merck), *1-butanol for analysis* (Merck), *2-butanol for analysis* (Merck), *for analysis* (Merck), akuades, reagen Follin-Ciocalteu (Merck), ABTS (2,2'-azino-bis (3-ethyl-benzothiazoline-6-sulfonic acid-Sigma Aldrich), natrium karbonat 20%.

4.2. Cara Kerja

Cara kerja didasarkan pada penelitian yang telah dilakukan sebelumnya seperti dalam Anwar et al., 2019, dengan sedikit modifikasi. Prosedur dalam penelitian sebagai berikut.

4.2.1. Pembuatan Konjugat Kitosan-Asam Ferulat

Pembuatan konjugat kitosan-asam ferulat dilakukan dengan menggunakan metode *grafting* dengan inisiator radikal bebas. Inisiator yang digunakan dalam penelitian ini sebanyak tujuh inisiator yang berasal dari golongan alkohol yaitu 1-propanol, 2-propanol, 1-butanol, 2-butanol, dan t-butanol. Sampel yang digunakan adalah kitosan dan asam ferulat (1:1) sebanyak 0,5 g masing-masing yang ditimbang sebanyak tujuh kali kemudian diberi kode masing-masing untuk menandakan inisiator yang digunakan yaitu kode sampel 1 (metanol) ; 2 (etanol) ; 3 (1-propanol); 4 (2-propanol); 5 (1-butanol) ; 6 (2-butanol) ; 7 (t-butanol), setelah diberi kode tersebut, kitosan dilarutkan dalam 50 mL asam asetat 1%, sedangkan asam ferulat dilarutkan secara sempurna ke dalam reagen alkohol yaitu metanol, etanol, 1-propanol, 2-propanol, 1-butanol, 2-butanol, dan t-butanol. Selanjutnya asam ferulat ditambahkan ke dalam larutan kitosan masing-masing secara berturut-turut dengan kode yang sesuai. Reaksi dibiarkan selama 24 jam dalam keadaan gelap pada ruang temperatur. Selanjutnya, masing-masing sampel 1 ; 2; 3 ;4 ; 5; 6; 7 dicuci dengan larutan NaOH 2 N hingga terbentuk endapan. Produk kemudian disaring dan endapan yang diperoleh dicuci dengan metanol. Sampel disaring kembali dan dikeringkan di dalam ruang temperatur lalu ditimbang massa sampel yang diperoleh.

4.2.2. Karakterisasi Konjugat Kitosan-Asam Ferulat

Karakterisasi produk *grafting* kitosan-asam ferulat terkonjugasi dengan inisiator radikal bebas dievaluasi menggunakan instrument spektroskopi inframerah plat KBr untuk mengetahui gugus fungsi yang terdapat dalam produk *grafting*, spektrofotometer UV-Vis, ELISA *reader* untuk mengukur aktivitas antioksidan kitosan-asam ferulat, X-Ray *Diffraction* untuk karakterisasi kristalinitas dari kitosan-asam ferulat terkonjugasi, dan uji total fenol dengan metode Follin-Ciocalteu.

4.2.2.1 Pengujian Total Fenol

Pengujian total polifenol dilakukan untuk menentukan jumlah fenol yang dapat dikonjugasikan dalam kerangka kitosan atau menentukan derajat substitusi produk. Dimana prosedur pengujian dilakukan sebagai berikut.

Sampel kitosan-asam ferulat dengan kode 1; 2; 3; 4; 5; 6; dan 7 ditimbang masing-masing sebanyak 5 mg kemudian dilarutkan dengan akuades sebanyak 2 mL, sampel kemudian ditambahkan 0,4 mL asam asetat dan ditambahkan metanol sebanyak 2,6 mL sehingga volume total akhir sampel sebanyak 5 mL.

Pembuatan standar dilakukan dengan menggunakan asam ferulat. Sebanyak 10 mg asam ferulat ditimbang kemudian dilarutkan dalam metanol. Larutan kemudian diencerkan dalam labu ukur 10 mL menggunakan metanol dan ditera hingga tanda batas, sehingga diperoleh konsentrasi standar asam ferulat 1000 ppm. Standar asam ferulat 1000 ppm kemudian diencerkan dengan variasi konsentrasi 0; 20; 40; 60; 80; 100; 125; 150 ppm dengan metanol.

Standar asam ferulat konsentrasi 0; 20; 40; 60; 80; 100; 125; 150 ppm kemudian dimasukkan ke dalam tabung reaksi gelap sebanyak 25 mL kemudian ditambahkan akuades hingga 4 mL dan ditambahkan reagen Follin-Ciocalteu sebanyak 0,25 mL. masing-masing standar diaduk hingga sempurna dengan vortex mixer kemudian diinkubasi selama delapan menit. Setelah selesai diinkubasi masing-masing standar ditambahkan Na_2CO_3 20% dan diaduk kembali kemudian diinkubasi selama dua jam. Setelah inkubasi masing-masing standar dibaca absorbansinya pada panjang gelombang 765 nm, pembacaan dilakukan sebanyak tiga kali pengulangan. Dilakukan alur analisis yang sama untuk pembacaan absorbansi sampel.

4.2.3. Pengujian Aktivitas Antioksidan Kitosan-Asam Ferulat Terkonjugasi

Uji aktivitas antioksidan dilakukan menurut metode (Jing et al., 2019), dengan sedikit modifikasi. Kemampuan penangkap radikal bebas dari produk kitosan-asam ferulat terkonjugasi dievaluasi dengan metode 2,2'-azino-bis (3-ethyl-benzothiazoline-6-sulfonic acid) (ABTS). Reagen ABTS dibuat dengan cara melarutkan ABTS (7,4 mM) sebanyak 101,509 mg ABTS dalam 25 mL akuades,

kemudian dibuat larutan potassium persulfate (2,6mM) sebanyak 17,57 mg dalam 25 mL akuades. Larutan ABTS dan potassium persulfate yang telah dilarutkan tersebut kemudian dicampurkan dan diinkubasi dalam kurun waktu 16 jam.

Kitosan-asam ferulat terkonjugasi masing-masing ditimbang 5 mg dan dilarutkan dalam pelarutnya (2 mL akuades, 0,4mL asam asetat, dan 2,6 mL metanol). Masing-masing sampel kemudian dibuat variasi konsentrasinya 1000; 750; 500; dan 250 ppm. Selanjutnya, masing-masing sampel yang telah diencerkan dimasukkan ke dalam *microplate* sebanyak 15 μ L dan ditambahkan reagen ABTS 285 μ L dan dibaca absorbansi sampel pada panjang gelombang 734 nm. Dilakukan perlakuan yang sama terhadap kontrol positif (kitosan dan asam ferulat) dan kontrol negatif (pelarut sampel) pada preparasi uji antioksidan terhadap kontrol. Kemampuan inhibisi sampel dan control dihitung berdasarkan persamaan berikut :

$$\text{Inhibisi (\%)} = \left[\frac{A_0 - A_1}{A_0} \right] \times 100\%$$

Dimana A_0 adalah absorbansi dari standar, A_1 adalah absorbansi sampel. Kemudian ditentukan nilai IC_{50} sampel sebagai konsentrasi yang dibutuhkan pada sampel atau zat aktif untuk menghambat setengah jumlah dari radikal ABTS.

BAB V

HASIL DAN PEMBAHASAN

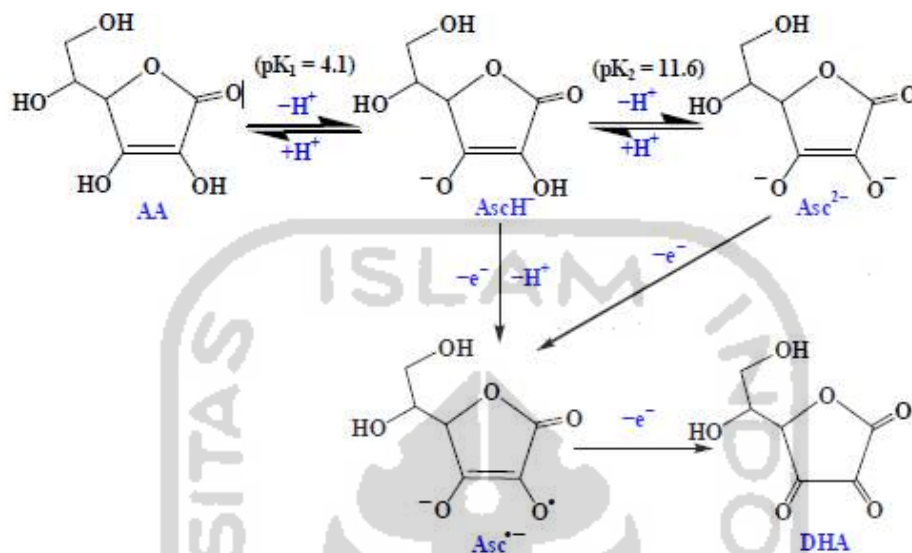
5.1. Pembuatan Konjugat Kitosan-Asam Ferulat

Sintesis zat aktif antioksidan konjugat kitosan-asam ferulat dilakukan dengan teknik grafting radikal bebas menggunakan inisiator dari golongan alkohol. Proses *grafting* dengan radikal bebas merupakan salah satu metode yang efektif dan efisien dalam modifikasi polimer kitosan dengan senyawa ferulat dalam memperbaiki sifat kelarutan dari kitosan serta meningkatkan aktivitas biologisnya. Kitosan merupakan salah satu polisakarida yang memiliki karakteristik yang unik yaitu memiliki biokompabilitas yang tinggi, bersifat *biodegradable*, non-toksik. Sifatnya yang khas ini menjadi landasan aplikasi kitosan pada berbagai bidang seperti industri pangan, farmakologi, medis, dan lain-lain. Akan tetapi, berat molekul kitosan yang tinggi mempengaruhi sifat kelarutan dari kitosan, dimana kitosan hanya dapat larut dalam pelarut asam encer, sehingga hal ini membuat aplikasi kitosan menjadi terbatas (Liu et al., 2014).

Teknik *grafting* dengan radikal bebas merupakan teknik yang sering digunakan dalam modifikasi polimer kitosan dengan senyawa ferulat pada industri pangan dan kesehatan. Proses grafting dengan media radikal bebas terdiri dari dua tahapan, yaitu tahap inisiasi dan proses *grafting*. Tahap inisiasi merupakan langkah awal yang dilakukan dalam modifikasi polimer agar terjadi reaksi *grafting* melalui radikal bebas, dimana pada tahap ini akan terbentuk situs aktif pada kerangka polimer (Curcio et al., 2009; Li and Li, 2017; Liu et al., 2017)

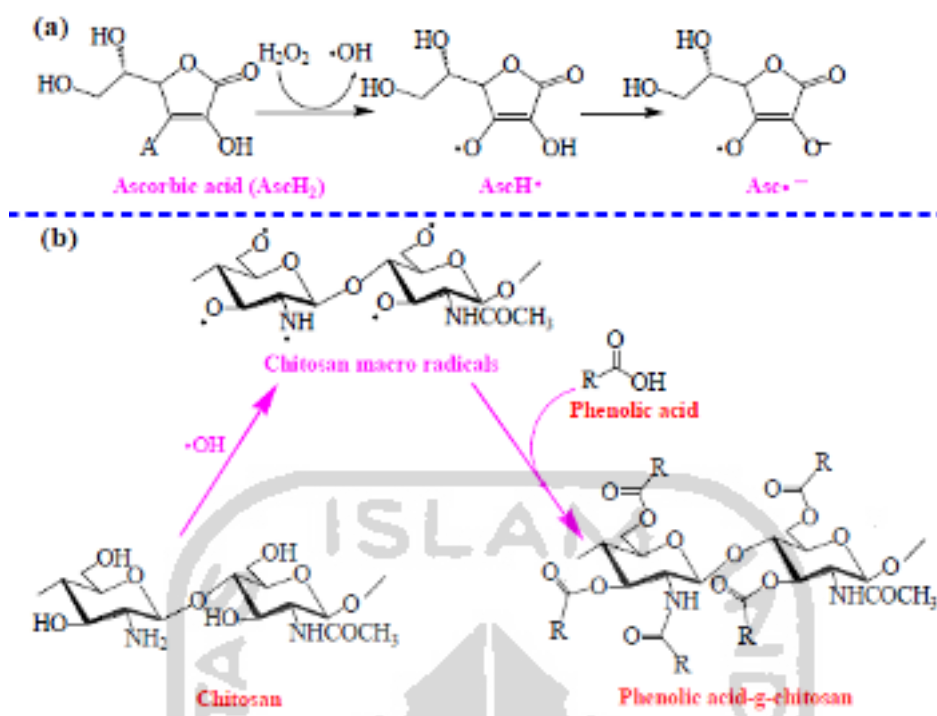
Sistem inisiator redoks merupakan suatu sistem yang menginisiasi reaksi *grafting* dengan radikal bebas berdasarkan prinsip reaksi oksidasi-reduksi. Senyawa asam askorbat dan hidrogen peroksida merupakan pasangan inisiator yang banyak digunakan dalam modifikasi polimer kitosan dengan senyawa asam ferulat pada industri pangan dan kesehatan. Dalam prosesnya, sifat reduktor ini berasal dari ikatan disosiasi gugus -OH pada karbon C₂ dan C₃ yang menghasilkan askorbat monoanion (AscH⁻) yang memiliki nilai pKa 4,1 atau dianion (Asc²⁻) dengan nilai pKa 11,6. Askorbat monoanion merupakan agen pereduksi yang baik dalam

menstabilkan senyawa peroksida karena dapat mengalami reaksi oksidasi dua kali berturut-turut pada satu elektron yang membentuk radikal askorbat ($\text{Asc}\cdot$), kemudian membentuk asam dehidroaskorbat. Reaksi pembentukan askorbat monoanion dan askorbat dianion ditunjukkan pada Gambar 8 (Liu et al., 2017).



Gambar 8. Reaksi pembentukan askorbat monoanion dan askorbat dianion (Liu et al., 2018)

Radikal askorbat yang terbentuk kemudian akan mengabstraksi atom hidrogen pada polimer kitosan sehingga terbentuk radikal kitosan yang disebabkan oleh adanya pemutusan ikatan inter dan intra atom hidrogen dari kitosan. Selanjutnya, melalui proses *grafting* suatu monomer (senyawa ferulat) yang berperan sebagai akseptor dapat tercangkokkan pada kerangka polimer (Curcio et al., 2009; Liu et al., 2017). Reaksi *grafting* kitosan-senyawa ferulat dengan radikal inisiator asam askorbat- H_2O_2 ditunjukkan pada Gambar 9 (Liu et al., 2017).



Gambar 9. Proses reaksi *grafting* kitosan-asam ferulat dengan radikal inisiator asam askorbat- H_2O_2 (Liu et al., 2017)

Metode ini dipilih karena prosesnya yang mudah, tidak menimbulkan produk yang bersifat toksik dan dapat dilakukan pada temperatur ruang, sehingga hal ini dapat mencegah terjadinya degradasi senyawa fenolat. *Grafting* dengan radikal bebas membutuhkan suatu inisiator sebagai tahap awal dari suatu reaksi, dimana radikal bebas akan menginisiasi suatu polimer, sehingga terbentuk situs aktif dari polimer, dan monomer dapat dicangkokkan pada kerangka polimer (Hu and Luo, 2016; Jing et al., 2019; Liu et al., 2014).

Inisiator yang digunakan dalam penelitian ini adalah sistem inisiator redoks yaitu alkohol- H_2O_2 . Reagen alkohol yang digunakan yaitu metanol, etanol, 1-propanol, 2-propanol, 1-butanol, 2-butanol, dan t-butanol. Pemilihan pasangan inisiator ini didasarkan pada gugus alkohol dan asam karboksilat yang terdapat pada struktur asam askorbat, dimana radikal terbentuk pada atom oksigen. Sehingga inisiator alkohol- H_2O_2 digunakan untuk mengetahui bagaimana kemampuan suatu radikal dari golongan alkohol untuk menginisiasi reaksi *grafting* pada modifikasi kitosan-senyawa ferulat yang paling baik diantara inisiator dari golongan alkohol yang digunakan. Sehingga menghasilkan persentase produk yang optimal dalam

pembuatan sampel kitosan-asam ferulat. Sampel yang digunakan adalah kitosan dengan derajat deasetilasi 75-85% yang akan dimodifikasi dengan asam 4-hidroksi 3-metoksi sinamat (asam ferulat).

Pembuatan konjugat-kitosan-asam ferulat menggunakan metode radikal bebas yang dilakukan dalam beberapa tahapan yaitu pelarutan kitosan dengan asam asetat 1%, penambahan campuran radikal inisiator, dan penambahan asam ferulat. Kitosan dapat larut dalam pelarut asam encer karena adanya gugus amina pada kerangka kitosan yang mudah mengalami protonasi. Penambahan inisiator (golongan alkohol-H₂O₂) pada larutan kitosan sebagai tahap awal dari proses reaksi inisiasi dari radikal bebas yang dihasilkan. Reaksi inisiasi terjadi karena adanya pemisahan secara homolitik pada molekul H₂O₂ yang melibatkan suatu energi ikatan disosiasi, dimana energi ikatan dari senyawa H₂O₂ berkisar diantara 25-35 kkal/mol sehingga mudah membentuk radikal bebas (Fessenden and Fessenden, 1986 ; Hu et al., 1997). Radikal bebas yang terbentuk dari molekul H₂O₂ akan menyerang atom H dari senyawa alkohol yang membentuk radikal sekunder, kemudian radikal yang terbentuk akan bereaksi dengan molekul polimer untuk membentuk suatu situs aktif pada kerangka polimer sehingga suatu monomer (asam ferulat) dapat dicangkokkan dengan polimer (Hu et al., 1997).

Reagen alkohol yang direaksikan dengan H₂O₂ akan membentuk •OH. Radikal hidroksil yang terbentuk kemudian akan bereaksi dengan polimer kitosan dengan cara memutus ikatan β 1-4 glikosidik pada rantai kitosan. Hal ini membuat proses grafting kitosan-asam ferulat menjadi sulit karena tidak adanya pembentukan situs aktif disepanjang rantai kitosan. Proses ini terjadi karena •OH tidak mampu bereaksi dengan gugus amino pada rantai kitosan, karena pemutusan ikatan untuk membentuk radikal yang bersifat tidak stabil membutuhkan energi yang lebih tinggi (Fessenden and Fessenden, 1986 ; Liu et al., 2018).

Asam ferulat ditambahkan ke dalam campuran reaksi pada tahap terakhir agar terjadi proses *grafting* kitosan dengan senyawa asam ferulat. Asam ferulat yang berperan sebagai akseptor akan bereaksi dengan kitosan, sehingga senyawa asam ferulat dapat tercangkok pada polimer kitosan. Reaksi dilakukan selama 24 jam

pada temperatur ruang untuk mencegah terjadinya degradasi senyawa asam ferulat yang dapat mengurangi aktivitas antioksidan dari senyawa tersebut.

Setelah proses reaksi selesai, reaksi dihentikan dengan penambahan larutan NaOH 2 M untuk memperoleh produk *grafting*. Masing-masing produk *grafting* yang diperoleh menghasilkan warna produk yang berbeda-beda. Hasil reaksi produk kitosan-asam ferulat dengan metode *grafting* radikal bebas ditunjukkan pada Tabel 1. dan Gambar 10.

Tabel 1. Hasil reaksi kitosan-asam ferulat dengan inisiator alkohol-H₂O₂

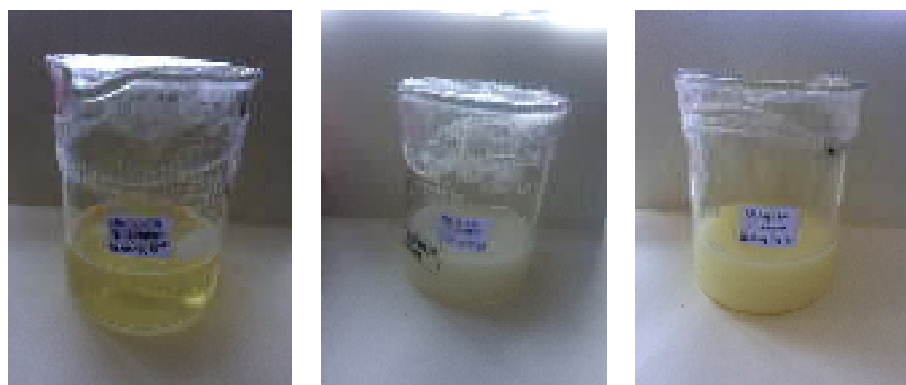
No.	Radikal Inisiator	Bentuk dan Warna (pH < 4)	Bentuk dan Warna (pH 13)	Kelarutan
1	Metanol	Kuning	Kuning	Terbentuk endapan
2	Etanol	Coklat muda	Kuning	Terbentuk endapan
3	1-propanol	Kuning	Kuning	Terbentuk endapan
4	2-propanol	Kuning	Kuning	Terbentuk endapan
5	1-butanol	Putih	Kuning	Terbentuk endapan
6	2-butanol	Putih	Kuning	Terbentuk endapan
7	t-butanol	Kuning	Kuning	Terbentuk endapan



1

2

3



4

5

6



7

Gambar 10. Sampel hasil proses *grafting* dengan radikal inisiator (1) metanol ; (2) etanol ; (3) 1-propanol ; (4) 2-propanol ; (5) 1-butanol ; (6) 2-butanol ; (7) t-butanol

Penambahkan natrium hidroksida (NaOH) 2N untuk mengendapkan produk dan mengeliminasi asam ferulat yang tidak terkonjugasi pada kitosan. Terbentuknya endapan dikarenakan sifat kelarutan kitosan yang tidak dapat larut dalam pelarut dengan $\text{pH} > 7$, sedangkan pada senyawa asam ferulat terjadi reaksi asam basa pada ikatan ester dari senyawa asam ferulat, sehingga senyawa tersebut akan larut dalam pelarut basa. Endapan yang didapat kemudian dicuci dengan metanol dengan tujuan untuk menghilangkan residu dari asam ferulat. Selanjutnya, produk dikeringkan di dalam desikator untuk ditentukan persentase *grafting* dan rendemen dari produk. Produk *grafting* yang telah kering kemudian digerus untuk memperluas luas permukaan dari produk dan memudahkan proses karakterisasi kitosan-asam ferulat lebih lanjut. Hasil endapan yang diperoleh dari proses

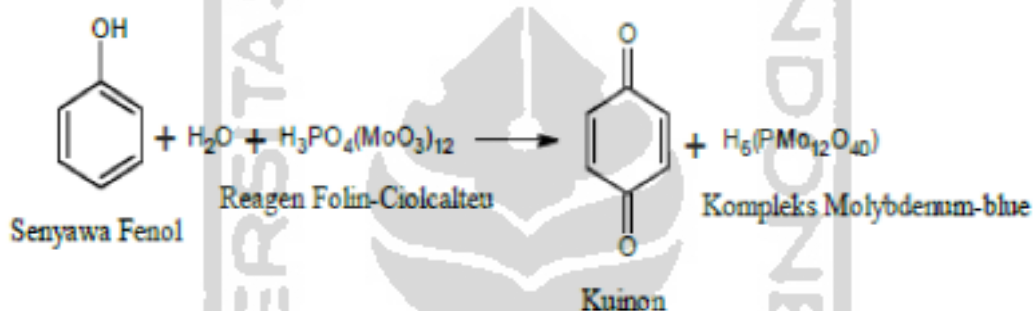
pembuatan konjugat kitosan-asam ferulat dengan teknik *grafting* radikal bebas ditunjukkan pada Gambar 11.



Gambar 11. Endapan sampel hasil proses *grafting* dengan radikal inisiator (1) metanol ; (2) etanol ; (3) 1-propanol ; (4) 2-propanol ; (5) 1-butanol ; (6) 2-butanol ; (7) t-butanol

5.2 Total Fenol Konjugat Kitosan-Asam Ferulat

Pengujian total fenol dari produk dilakukan dengan metode Follin-Ciocalteu. Metode ini digunakan untuk menentukan jumlah fenol yang terkonjugasi pada kerangka polimer kitosan. Prinsip metode ini didasarkan pada reaksi oksidasi-reduksi, yaitu kemampuan reagen Follin mengoksidasi gugus hidroksil dari senyawa fenol. Pereaksi ini terdiri dari asam fosfomolibdat dan asam fosfotungstat yang akan bereaksi dengan senyawa asam ferulat. Reagen Follin akan mengoksidasi gugus fenolik dari senyawa asam ferulat dan mereduksi asam heteropoli sehingga membentuk suatu kompleks molibdenum-tungsten yang berwarna biru dan dapat dideteksi menggunakan instrumen spektrofotometer. Reaksi antara senyawa fenol dengan reagen Follin-Ciocalteu ditunjukkan pada Gambar 12.



Gambar 12. Reaksi senyawa fenol dengan Follin-Ciocalteu

Semakin tinggi konsentrasi senyawa fenolik yang terdapat di dalam sampel, akan semakin tinggi jumlah ion fenolat yang mereduksi asam heteropoli sehingga warna biru yang dihasilkan akan semakin pekat (Singleton and Rossi, 1965). Pengukuran jumlah fenol dengan metode Follin-Ciocalteu dipilih karena metodenya yang relatif sederhana, sensitif, dapat diulang, hasilnya yang relatif akurat, tidak memerlukan peralatan yang spesifik dan canggih, pengaruh matrik dari sampel dapat diminimalkan pada panjang gelombang maksimum 765 nm (Yusnawan and Utomo, 2017).

Sampel masing-masing dilarutkan ke dalam pelarut yang sesuai (2 mL akuades ; 0,4 mL asam asetat 1% ; dan 2,6 mL metanol) sehingga diperoleh larutan sampel dengan konsentrasi 1000 ppm. Sampel kemudian dimasukkan ke dalam tabung gelap untuk dilakukan pengujian total fenol dalam sampel. Hal ini untuk mencegah terjadinya reaksi reagen Follin-Ciocalteu oleh paparan sinar matahari,

karena reagen Follin bersifat tidak stabil. Masing-masing sampel kemudian ditambahkan reagen Follin dan Na_2CO_3 20%. Penambahan Na_2CO_3 20% ini bertujuan untuk membentuk suasana basa sehingga terjadi reaksi reduksi Follin-Ciocalteu oleh gugus hidroksil yang terdapat di dalam sampel. Sampel kemudian diinkubasi selama dua jam dan dilakukan pengukuran absorbansi sampel dan standar menggunakan spektrofotometer UV-Visible pada panjang gelombang 765 nm, pemilihan panjang gelombang didasarkan pada panjang gelombang maksimal. Dilakukan tiga kali pengulangan untuk pengukuran absorbansi yang akurat.

Penentuan kandungan fenol dalam produk *grafting* dinyatakan dalam miliekuivalen asam ferulat/ gram sampel dengan menggunakan kurva standar asam ferulat. Berdasarkan hasil perhitungan yang diperoleh, konsentrasi asam ferulat, persentase *grafting* dan rendemen produk konjugasi kitosan-asam ferulat disajikan dalam Tabel 2.

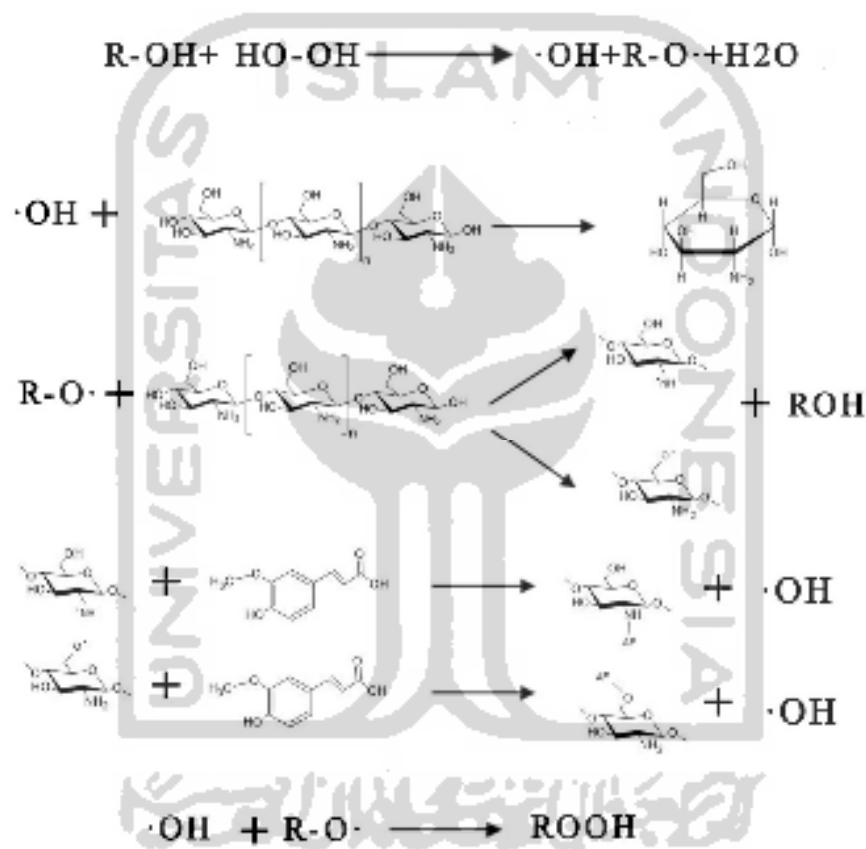
Tabel 2. Total Fenol Sampel Kitosan-Asam Ferulat

No	Radikal inisiator	Berat porодук (g)	Mr sampel (DD 80%)	Rendemen (%)	C (mg/g)	% <i>grafting</i>
1	Metanol	0,8075	197,35	146,81	50,4165	5,0416
2	Etanol	0,6651	202,88	118,76	78,963	7,8963
3	1-propanol	0,6907	199,8	124	63,0369	6,3036
4	2-propanol	0,7939	201,24	141,51	70,44	7,044
5	1-butanol	0,7299	196,57	133,19	46,4	4,64
6	2-butanol	0,9666	197,79	174,42	52,56675	5,2556
7	t-butanol	0,7084	198,95	127,63	58,65	5,865

Pada data tersebut, diketahui bahwa sampel dengan inisiator etanol memiliki nilai persentase yang lebih tinggi dibandingkan dengan sampel lainnya, yaitu 78,963%. Sedangkan sampel 2-propanol > 1-propanol dan t-butanol > 2-butanol > 1-butanol, serta sampel dengan inisiator metanol memiliki persentase yang paling

kecil. Persentase *grafting* mendeskripsikan berapa banyak jumlah asam ferulat yang dapat terkonjugasi pada polimer kitosan. Perbedaan ini disebabkan oleh adanya kestabilan radikal dari inisiator alkohol-H₂O₂ yang digunakan.

Hidrogen peroksida yang berperan sebagai oksidator akan mengoksidasi alkohol yang menghasilkan radikal hidroksil dan radikal alkohol. Radikal yang terbentuk ini akibat adanya reaksi redoks dari interaksi senyawa peroksida dengan alkohol. Persamaan reaksi dekomposisi inisiator alkohol-H₂O₂ ditunjukkan pada Gambar 13.



Gambar 13. Persamaan reaksi konjugat kitosan-asam ferulat

Radikal hidroksil yang terbentuk tidak mampu untuk membentuk situs aktif pada kerangka polimer kitosan karena radikal ini tidak dapat bereaksi dengan gugus NH₂ pada kitosan akibat energi ikatan disosiasi rendah sehingga tidak cukup kuat untuk memecah ikatan inter dan intra atom hidrogen dari kitosan, akibatnya radikal

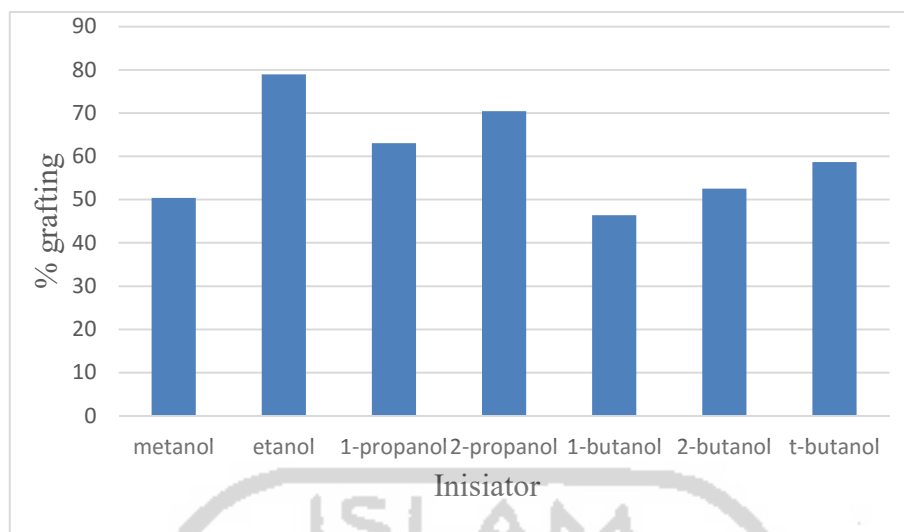
ini memutus ikatan β 1-4 glikosidik pada kitosan sehingga senyawa asam ferulat dapat terkonjugasi pada rantai kitosan (Liu et al., 2018).

Perbedaan hasil persentase *grafting* dari masing-masing inisiator ini dapat dipengaruhi oleh adanya selektivitas dalam abstraksi hidrogen dari kitosan. Dimana tiap-tiap atom hidrogen dari kerangka kitosan tidak diserang oleh $\cdot\text{OH}$ pada laju reaksi yang sama. Adanya atom hidrogen yang mudah diabstraksi dipengaruhi oleh keadaan transisi yang mempengaruhi stabilitas suatu radikal. Stabilitas ini dapat dihubungkan dengan adanya waktu paruh dari laju dekomposisi pada radikal alkohol yang terbentuk ($\text{RO}\cdot$). Waktu paruh diukur berdasarkan laju dekomposisi pada temperatur tertentu. Dekomposisi akan menghasilkan radikal primer yang akan digunakan untuk menginisiasi reaksi *grafting*, Laju reaksi dekomposisi yang tinggi dengan waktu paruh yang singkat, akan menghasilkan radikal yang bersifat sangat reaktif sehingga reaksi sulit untuk dikendalikan. Radikal hidroksil yang dihasilkan oleh suatu peroksida memiliki waktu paruh yang singkat, ketika digunakan secara langsung dalam menginisiasi reaksi *grafting*, radikal ini dapat memutus ikatan β 1-4 glikosidik kitosan atau terjadinya depolimerisasi kitosan. Penambahan alkohol pada peroksida berfungsi untuk mengurangi laju waktu paruh tersebut, sehingga reaksi dapat dikontrol dan hanya bereaksi pada rantai samping kitosan. Hal ini bertujuan agar reaksi *grafting* lebih selektif. Ditambah lagi, energi disosiasi dari ikatan O-H yang akan putus juga berpengaruh dalam kestabilan suatu radikal. Pemutusan ikatan untuk menuju ke suatu radikal yang bersifat lebih stabil membutuhkan energi yang lebih rendah daripada pemutusan ikatan yang menuju ke radikal yang bersifat kurang stabil (Fessenden and Fessenden, 1986 ; Hu et al., 1997).

Urutan kestabilan suatu radikal sama halnya dengan stabilitas karbokation, yaitu tersier > sekunder > primer > metil, dimana radikal tersier lebih bersifat stabil dibandingkan radikal metil. Adanya perbedaan reaktivitas ini juga akan mempengaruhi persentase *grafting* dari sampel. Hasil perhitungan menunjukkan bahwa persen *grafting* dari inisiator etanol- H_2O_2 lebih tinggi dibandingkan dengan inisiator lainnya. Dari hal ini dapat disimpulkan bahwa semakin stabil suatu radikal bebas inisiator yang digunakan akan berpengaruh terhadap kemampuan dari

inisiator untuk menginisiasi suatu reaksi radikal bebas, yang dalam hal ini adalah modifikasi kitosan dengan senyawa ferulat menggunakan teknik *grafting* radikal bebas. Hal ini sesuai dengan pernyataan Hu et al., 1997, dimana kondisi reaksi dan reaktivitas dari radikal inisiator merupakan faktor yang perlu diperhatikan dalam pemilihan suatu inisiator untuk memperoleh produk *grafting* yang optimal, dengan sifat yang diinginkan.

Urutan stabilitas radikal senyawa 2-propanol yang lebih stabil dibandingkan dengan 1-propanol dan senyawa t-butanol > 2-butanol > 1-butanol membuktikan bahwa kestabilan radikal mempengaruhi persen *grafting* dari produk yang diperoleh. Dimana radikal O yang terikat pada C tersier bersifat lebih stabil dibandingkan dengan C sekunder dan primer. Selain itu, panjang rantai dari senyawa golongan alkohol juga berpengaruh terhadap reaktivitas dari radikal yang terbentuk. Hal ini dapat dilihat pada senyawa metanol dan etanol dengan posisi radikal O nya terikat pada atom C primer dengan panjang rantai karbon yang berbeda. Sehingga apabila diurutkan urutan kemampuan inisiator dari golongan alkohol dalam mengabstraksi atom H berdasarkan data total fenol yang diperoleh maka etanol > 1-propanol > metanol > 1-butanol. Panjang rantai karbon yang optimum berada pada etanol dan propanol. Dimana polaritas suatu senyawa yang rendah mengakibatkan kemampuan inisiator mengabstraksi atom H yang rendah pula. Sehingga inisiator yang menggunakan reagen etanol memiliki panjang rantai karbon yang optimum sehingga inisiator ini dapat memberikan persentase *grafting* yang lebih baik dibandingkan dengan inisiator lainnya. Perbedaan persentase *grafting* masing-masing sampel dapat dilihat pada grafik berikut.

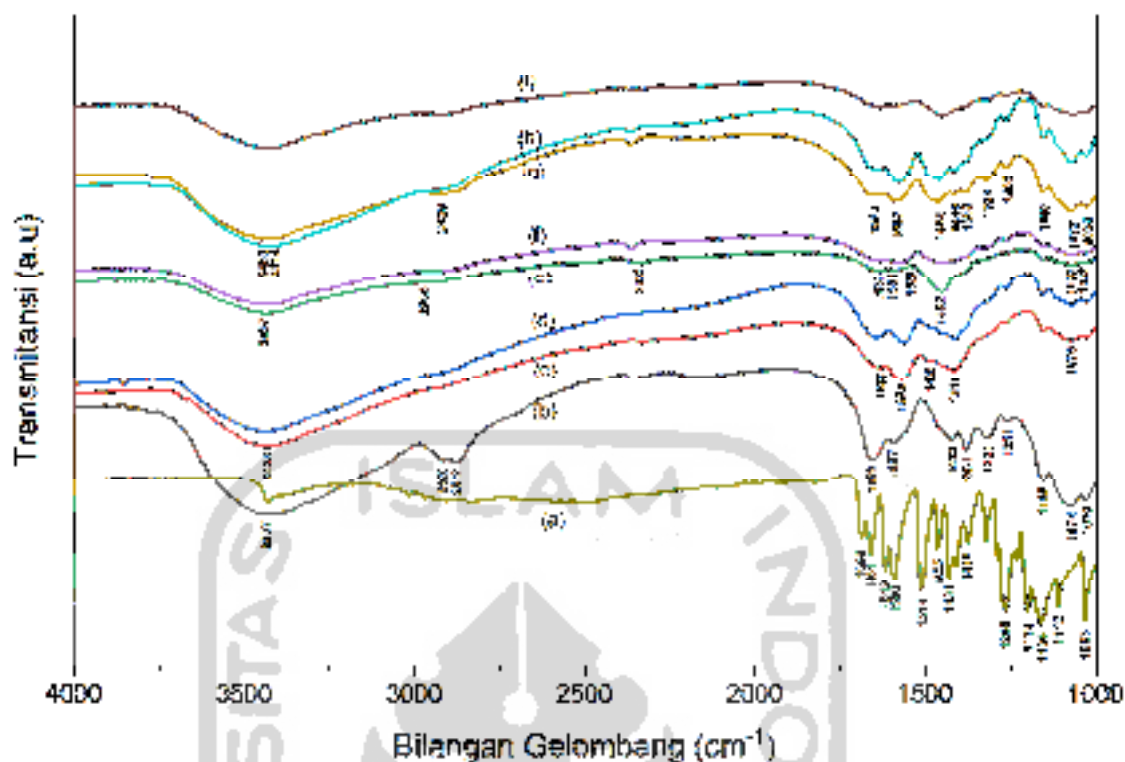


Gambar 14. Perbandingan persentase grafting konjugat kitosan-asam ferulat

5.3 Karakterisasi Struktur Kitosan-Asam Ferulat dengan FTIR

Konfirmasi struktur kitosan dengan senyawa asam ferulat menggunakan inisiator dari golongan alkohol dilakukan dengan analisis menggunakan instrumen FTIR. *Fourier transform infrared* (FTIR) merupakan salah satu teknik spektroskopi yang digunakan untuk mengukur absorpsi radiasi inframerah pada berbagai panjang gelombang oleh suatu gugus fungsi dari molekul. Suatu senyawa organik akan menyerap energi pada panjang gelombang tertentu bergantung pada struktur senyawanya (Fessenden and Fessenden, 1986). Oleh karena itu, teknik ini bermanfaat untuk mengkonfirmasi keberhasilan dari modifikasi polimer kitosan dengan senyawa asam ferulat menggunakan teknik *grafting* radikal bebas.

Spektrum inframerah dari kitosan murni, asam ferulat, sampel dengan inisiator metanol, etanol, 1-propanol, 2-propanol, 1-butanol, 2-butanol, t-butanol ditunjukkan pada Gambar 15. Pada spektrum tersebut dapat diketahui bahwa sampel kitosan memiliki karakteristik serapan inframerah pada 3437 cm^{-1} (-OH) ; $2920\text{-}2879\text{ cm}^{-1}$ (-CH alifatis) ; 1659 cm^{-1} (N-H amina) ; 1423 cm^{-1} (-NH, amida II) ; $1381\text{-}1321\text{ cm}^{-1}$ (C-N, amida III) ; $1157\text{-}1030\text{ cm}^{-1}$ (C-O-C, struktur dari sakarida).



Gambar 15. Spektra inframerah sampel kitosan-asam ferulat

(a), kitosan (b), konjugat kitosan-asam ferulat dengan radikal inisiator H_2O_2 -metanol (c), etanol (d), 1-propanol (e), 2-propanol (f), 1-butanol (g), 2-butanol (h), t-butanol (i)

Asam ferulat menunjukkan karakteristik serapan yang berbeda pada kitosan. Dimana serapan dari gugus $\text{C}=\text{O}$ dari asam karboksilat pada struktur asam ferulat lebih tinggi yaitu 1689 cm^{-1} ; karakteristik $\text{C}=\text{C}$ dari cincin aromatis terdapat pada 1590 dan 1465 cm^{-1} ; $1266\text{-}1033\text{ cm}^{-1}$ merupakan ciri serapan dari ikatan $\text{C}-\text{O}$ karboksil ditandai dengan tipe serapannya yang kuat dan tajam.

Sementara itu, sampel kitosan yang dimodifikasi dengan senyawa asam ferulat menunjukkan karakteristik serapan dengan intensitas yang berbeda. Pada sampel 1 (metanol) dan 2 (etanol) terjadi pergeseran serapan pada bilangan gelombang 3433 cm^{-1} yang merupakan ciri serapan dari ikatan $-\text{OH}$, serta muncul puncak baru pada serapan $1633\text{-}1489$ dari $\text{C}=\text{O}$, dan serapan pada bilangan gelombang 1076 cm^{-1} yang merupakan karakteristik ikatan $\text{C}-\text{O}-\text{C}$ dari struktur sakarida.

Sampel 3 (1-propanol) dan 4 (2-propanol) menunjukkan serapan pada panjang gelombang 3437 cm^{-1} (-OH) dengan intensitas yang lebih lemah dibandingkan dengan kitosan, serapan pada $2966\text{-}2335\text{ cm}^{-1}$ (C-H alifatis), muncul puncak baru pada 1633 cm^{-1} (C=O) dengan intensitas yang lebih lemah dibandingkan pada sampel 1 dan 2. Pada bilangan gelombang 1070 cm^{-1} yang merupakan serapan dari ikatan C-O-C dari struktur sakarida.

Sedangkan sampel 5 (1-butanol), 6 (2-butanol), dan 7 (t-butanol) menunjukkan spektrum yang berbeda pada sampel 1 ; 2 ; 3 ; dan 4. Serapan pada bilangan gelombang 3450 cm^{-1} muncul pada spektrum sampel 5 ; 6 ; dan 7 yang merupakan karakteristik serapan dari -NH (amina). Gugus -OH menyerap pada bilangan 3414 cm^{-1} , kemudian tampak ciri serapan dari gugus -CH alifatis pada 2926 cm^{-1} , dan serapan baru pada $1653\text{-}1464$ dari ikatan C=O, serta serapan pada 1072 cm^{-1} dan 1028 cm^{-1} yang merupakan karakteristik ikatan C-O-C dan cincin piranosa dari struktur sakarida. Dari data tersebut, diketahui bahwa senyawa asam ferulat berhasil dikonjugasikan menggunakan teknik *grating* dengan media radikal bebas dari golongan alkohol. Rangkuman masing-masing intensitas dari puncak sampel kitosan, asam ferulat, kitosan-asam ferulat ditunjukkan pada Tabel 3.

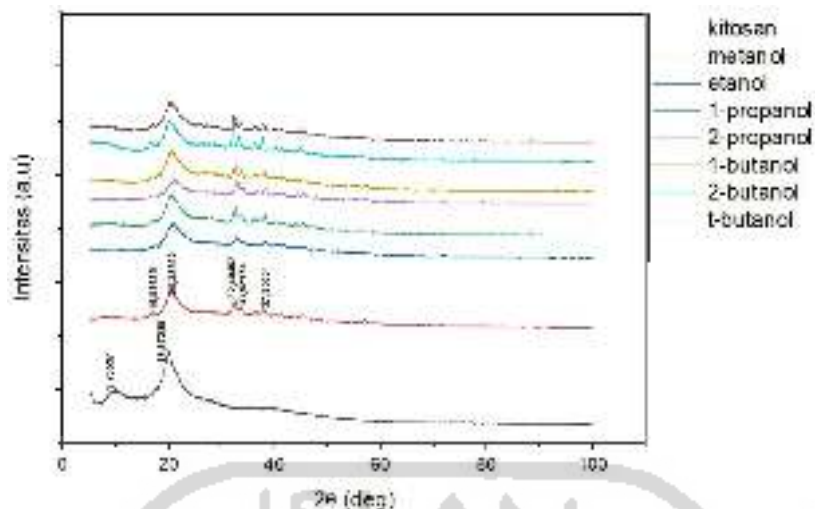
Tabel 3. Perbandingan Puncak Spektra Sampel

Sampel / produk konjugasi	Bilangan Gelombang (cm^{-1})						
	3400	2900	1680- 1630	1659 dan 1400	1590	1070	1030
	O-H	C-H alifatis	C=O (amida I)	C=C aromatis	N-H (amida II)	C-O-C	Pyranose
Asam Ferulat	Ada (kecil)	Ada (kecil)	Ada (sedang) 1689	Ada (kuat)	-	-	-
Kitosan	Ada (melebar)	Ada (kecil)	Ada (kuat) 1659	-	Ada (kecil)	Ada (kecil)	Ada (kecil)

Metanol*	Ada (melebar)	Ada (kecil)	Ada (kecil) 1633	Ada (kecil)	Ada (kecil)	Ada (sangat kecil)	-
Etanol*	Ada (melebar)	Ada (kecil)	Ada (kecil) 1633	Ada (kecil)	Ada (kecil)	Ada (sangat kecil)	-
1-propanol	Ada (melebar)	Ada (kecil)	Ada (sedang) 1633	Ada (kecil)	Ada (sangat kecil)	Ada (sangat kecil)	Ada (sangat kecil)
2-propanol	Ada (melebar)	Ada (kecil)	Ada (kecil) 1633	Ada (sangat kecil)	Ada (sangat kecil)	Ada (sangat kecil)	Ada (sangat kecil)
1-butanol	Ada (melebar)	Ada (kecil)	Ada (kecil) 1653	Ada (sangat kecil)	Ada (sangat kecil)	Ada (sangat kecil)	Ada (sangat kecil)
2-butanol	Ada (melebar)	Ada (kecil)	Ada (kecil) 1653	Ada (kecil)	Ada (sangat kecil)	Ada (sangat kecil)	Ada (sangat kecil)
t-butanol	Ada (melebar)	Ada (kecil)	Ada (kecil) 1653	Ada (sangat kecil)	Ada (sangat kecil)	Ada (sangat kecil)	Ada (sangat kecil)

5.4 Karakterisasi Kristalinitas

Kristalinitas suatu material dapat diukur menggunakan teknik *X-ray diffraction* (XRD). Teknik ini memberikan informasi struktur dari suatu material yang dianalisis (Khondker and Lakhani, 2015). Derajat kristalinitas merupakan salah satu sifat fisikokimia yang berhubungan dengan derajat deasetilasi kitosan dan turunannya. Secara umum, kitosan menunjukkan pola difaksi pada puncak $2\theta = 20^\circ$, yang merupakan bentuk kristal II (Liu et al., 2017). Kristalinitas kitosan dan kitosan-asam ferulat ditunjukkan pada Gambar 16.



Gambar 16. Difraktogram Kitosan dan Kitosan-Asam Ferulat

Berdasarkan hasil analisis, kitosan memberikan karakteristik pada puncak 2θ yaitu $9,75^\circ$ dan $19,97^\circ$ dengan puncak difraksi yang tajam, menunjukkan sifat bentuk kristal II, hal yang sama juga diperoleh dalam penelitian Liu et al., 2017, sifat kristal diperoleh karena adanya interaksi dari ikatan inter dan intra molekul hidrogen. Adanya interaksi ikatan inter dan intra molekul hidrogen yang kuat dari kitosan mempengaruhi struktur kristal dari kitosan serta pengaruhnya terhadap kelarutan dari kitosan. Sampel 1 ; 2 ; 3 ; 4 ; 5 ; 6 ; juga menunjukkan pola difraksi yang tajam dan terjadi pergeseran pada puncak $2\theta = 16-25^\circ$ serta tidak terdapat puncak $9,75$ pada masing-masing sampel. Pola difraksi yang tajam menunjukkan bahwa sifat fisikokimia dari masing-masing sampel sama seperti kitosan, sehingga sifat kelarutan dari sampel yang dimodifikasi menyerupai sifat fisikomia dari kitosan murni. Hal ini juga didukung berdasarkan data dari derajat kristalinitas dari sampel. Dimana masing-masing sampel menunjukkan karakteristik kristalinitas berada pada rentang 9-16%. Derajat kristalinitas kitosan dan sampel ditunjukkan pada Tabel 4.

Tabel 4. Derajat Kristalinitas Sampel dan Kitosan

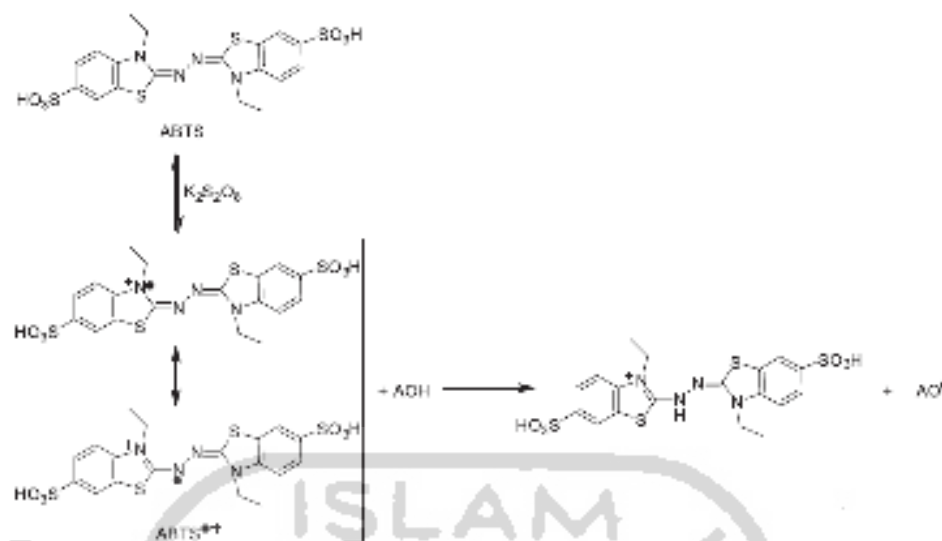
Sampel	Derajat kristalinitas (%)
Kitosan	4,6
Metanol	9,5

Etanol	11,8
1-propanol	6,7
2-propanol	16,4
1-butanol	13,6
2-butanol	13,7
t-butanol	11,9

Pola difraktogram pada sampel juga menunjukkan adanya karakteristik puncak baru pada $2\theta = 30-40^\circ$ hal ini dapat terjadi karena adanya pencangkakan senyawa asam ferulat pada kerangka kitosan, sehingga sifat struktur kristal menjadi semi kristalin. Dari data tersebut menunjukkan bahwa adanya perubahan struktur kristal dari sampel yang dimungkinkan karena adanya perubahan struktur samping rantai kitosan oleh senyawa asam ferulat. Berdasarkan hasil karakteristik produk dengan menggunakan analisis XRD diketahui bahwa kitosan-asam ferulat berhasil disintesis dengan teknik *grafting* radikal bebas menggunakan pasangan inisiator redoks alkohol- H_2O_2 .

5.5 Uji Antioksidan Kitosan-Asam Ferulat Terhadap 2,2'-azino-bis (3-ethyl benzothiazoline-6-sulfonic acid (ABTS))

Senyawa 2,2'-azino-bis (3-ethyl benzothiazoline-6-sulfonic acid (ABTS)) digunakan untuk mengukur kemampuan aktivitas penangkap radikal bebas dari suatu molekul antioksidan. Metode ABTS menjadi suatu metode pengujian antioksidan yang efektif karena sifatnya yang lebih stabil dalam menerima atom hidrogen yang berasal dari antioksidan. Senyawa antioksidan akan menstabilkan radikal ABTS ditandai dengan terjadinya perubahan warna reagen ABTS yang berwarna biru menjadi tidak berwarna (Lee et al., 2015; Mareček et al., 2017). Reaksi antioksidan menstabilkan senyawa ABTS ditunjukkan oleh Gambar 17.

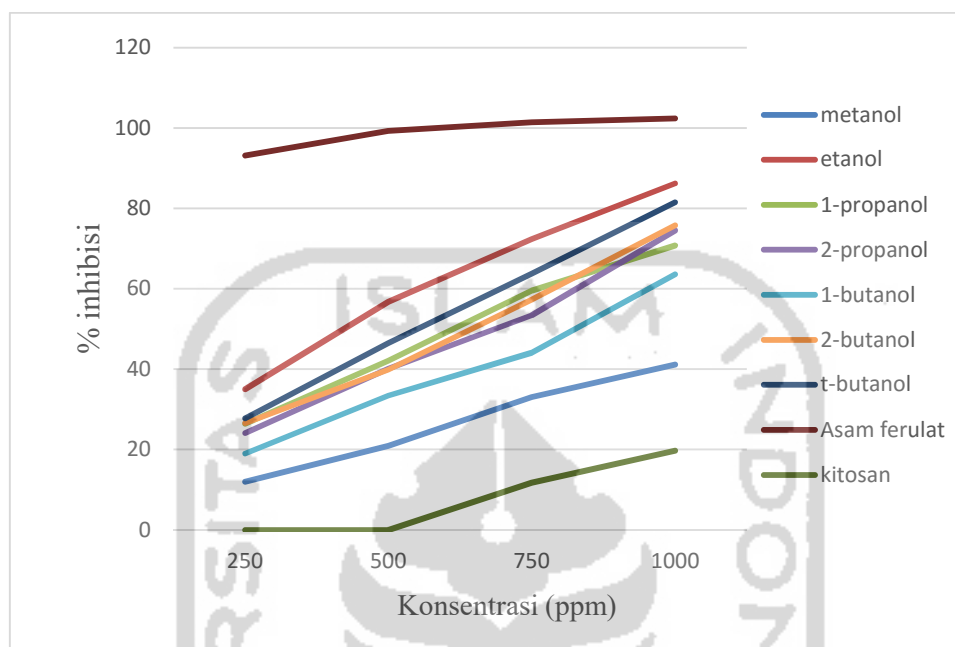


Gambar 17. Reaksi Senyawa ABTS Dengan Antioksidan (Oliveiraa et al., 2014)

Senyawa ABTS yang berperan sebagai oksidator akan mengoksidasi senyawa kalium persulfat ($K_2S_2O_8$) yang menghasilkan radikal ABTS yang berwarna biru, warna biru yang dihasilkan akibat adanya suatu gugus dari senyawa azo pada struktur ABTS, gugus ini bersifat reaktif karena kemampuannya sebagai gugus pergi yang sangat baik dari gas nitrogen, (Fessenden and Fessenden, 1986 ; Shalaby and Shanab, 2013). Radikal ABTS yang ditimbulkan kemudian mengalami reduksi oleh senyawa antioksidan sehingga menghasilkan senyawa yang bersifat stabil ditandai dengan terjadinya perubahan warna pada larutan ABTS (Oliveiraa et al., 2014). Metode ini memiliki beberapa keuntungan, yaitu fleksibilitasnya terhadap berbagai kondisi pH sehingga dapat digunakan untuk mempelajari efek pH terhadap aktivitas antioksidan dari berbagai senyawa, dapat dilarutkan dalam pelarut air dan organik sehingga pengukuran aktivitas antioksidan sampel dalam berbagai media menjadi lebih efektif, serta senyawa antioksidan dari sampel dapat bereaksi secara cepat dengan ABTS untuk mencapai kondisi yang stabil (Shalaby and Shanab, 2013).

Kemampuan inhibisi suatu sampel diinterpretasikan sebagai penurunan absorbansi dari reagen ABTS setelah penambahan sampel yang mengandung antioksidan. Persentase inhibisi yang dihasilkan dipengaruhi oleh uji total fenol yang dilakukan, dimana semakin banyak senyawa fenolat yang terkonjugasi pada

rantai kitosan, kemampuan inhibisi suatu sampel akan semakin baik terhadap radikal ABTS. Berdasarkan hasil penelitian yang dilakukan, persentase inhibisi dari sampel kitosan, asam ferulat, dan produk dalam menghambat aktivitas radikal ABTS ditunjukkan pada Gambar 18.



Gambar 18. Aktivitas Sampel Menghambat Radikal ABTS

Pada grafik tersebut, sampel etanol memiliki kemampuan inhibisi radikal ABTS dengan persentase yang lebih tinggi dibandingkan dengan sampel lainnya dan kontrol positif dari kitosan. Akan tetapi kemampuan inhibisi ini lebih rendah dibandingkan dengan kontrol positif dari asam ferulat. Hal ini menjelaskan bahwa kemampuan aktivitas inhibisi dari produk yang diperoleh berasal dari kemampuan antioksidan senyawa asam ferulat. Data ini mendukung penjelasan bahwa inisiator alkohol-H₂O₂ yang digunakan tidak membentuk situs aktif pada kerangka kitosan, sehingga sifat fisikokimia dan aktivitas biologis pada produk grafting tidak meningkat secara signifikan. Persentase inhibisi yang diperoleh diukur sebagai kemampuan minimal sampel dalam menghambat radikal ABTS pada kitosan, asam ferulat, dan produk ditunjukkan pada Tabel 5.

Tabel 5. Konsentrasi Minimal Sampel Untuk Menghambat Radikal ABTS

Sampel	IC 50 (ppm)
--------	-------------

Metanol	1209
Etanol	438,92
1-propanol	629,63
2-propanol	654,94
1-butanol	797,51
2-butanol	627,012
t-butanol	557,36

Data aktivitas antioksidan menunjukkan bahwa sampel kitosan-asam ferulat yang dikonjugasi menggunakan inisiator dari golongan alkohol memiliki kemampuan antioksidan yang lebih rendah dibandingkan dengan senyawa asam ferulat murni. Berdasarkan data yang diperoleh kemampuan antioksidan sampel dapat diurutkan sebagai berikut, etanol > t-butanol > 2-butanol > 1-propanol > 2-propanol > 1-butanol > metanol > kitosan, tetapi tidak 1. Sampel dengan inisiator etanol memiliki potensi antioksidan yang kuat dibandingkan dengan sampel lainnya, dimana nilai IC_{50} produk konjugat sebesar 438,92 ppm, nilai ini menunjukkan bahwa aktivitas antioksidan dari zat aktif yang menggunakan inisiator bersifat menghambat aktivitas radikal bebas, dikarenakan sifat antioksidannya yang lemah. Kategori nilai IC_{50} suatu antioksidan berdasarkan nilai IC_{50} ditunjukkan pada Tabel 6.

Tabel 6. Kategori sifat antioksidan berdasar nilai IC_{50}

Nilai IC_{50} (ppm)	Sifat Antioksidan
50-100	Kuat
100-150	Sedang
150-200	Lemah

Hal ini mendukung bahwa kemampuan aktivitas antioksidan dari produk meningkat dikarenakan kemampuan antioksidan dari gugus fenolat dari senyawa asam ferulat.

BAB VI

KESIMPULAN DAN SARAN

6.1. Kesimpulan

Berdasarkan hasil dari penelitian yang telah dilakukan, dapat disimpulkan bahwa polimer kitosan yang dimodifikasi dengan senyawa asam ferulat melalui teknik grafting dengan radikal bebas menggunakan inisiator alkohol-H₂O₂ mampu meningkatkan aktivitas antioksidan dibandingkan dengan kitosan murni. Inisiator alkohol- H₂O₂ tidak mampu membentuk situs aktif pada kerangka kitosan, sehingga sifat fisikokimia dari produk sama dengan kitosan murni. Sistem inisiator ini memutus ikatan β 1-4 glikosidik dari kerangka kitosan, sehingga pencangkakan senyawa asam ferulat pada kitosan menjadi sulit. Hal ini didukung oleh karakterisasi struktur kitosan menggunakan XRD dan FTIR, serta uji total polifenol dan uji aktivitas antioksidan menggunakan metode radikal ABTS.

6.2. Saran

1. Perlu dilakukan analisis lebih lanjut terhadap mekanisme reaksi inisiator alkohol-H₂O₂ pada modifikasi kitosan dengan senyawa asam ferulat menggunakan metode EPR.
2. Perlu dilakukan penelitian lebih lanjut terhadap sistem inisiator redoks yang digunakan seperti perbandingan mol hidrogen peroksida dan alkohol, pengaruh temperatur, pH, dan waktu reaksi, sehingga didapatkan produk kitosan-senyawa asam ferulat dengan sifat yang diinginkan

DAFTAR PUSTAKA

- Anah, L., Astrini, N., Haryono, A., 2015. metode grafting radikal bebas. *Jurnal Sains Materi Indonesia*. 17 (2), 63-68.
- Anwar, M., Nisa, K., Indirayati, N., 2019. Acid-base evaluation of chitosan-ferulic acid conjugate by a free radical grafting method. *IOP Conference Series Earth : Environmental Science*. 251, 012023. <https://doi.org/10.1088/1755-1315/251/1/012023>
- Bakshi, P.S., Selvakumar, D., Kadirvelu, K., Kumar, N.S., 2019. Chitosan as an environment friendly biomaterial – a review on recent modifications and applications. *International Journal of Biological Macromolecules*. S0141813018357933. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2019.10.113>
- Batista, R., 2014. Uses And Potential Applications Of Ferulic Acid. *Nova Science Publisher*. 33, 39-70.
- Cho, Y.-S., Kim, S.-K., Ahn, C.-B., Je, J.-Y., 2011. Preparation, characterization, and antioxidant properties of gallic acid-grafted-chitosans. *Carbohydrate Polymer*. 83, 1617–1622. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2010.10.019>
- Curcio, M., Puoci, F., Iemma, F., Parisi, O.I., Cirillo, G., Spizzirri, U.G., Picci, N., 2009. Covalent Insertion of Antioxidant Molecules on Chitosan by a Free Radical Grafting Procedure. *Journal Agriculture Food Chemistry*. 57, 5933–5938. <https://doi.org/10.1021/jf900778u>
- Da'i, M., Triharman, F., 2010. Uji Aktivitas Penangkap Radikal DPPH (1,1-difenil-2-pikrilhidrazil) Isolat Alfa Mangostin Kulit Buah Manggis (*Garcinia mangostana* L.). *Pharmakon* 11, 47–50.
- Fessenden, R. J and Fessenden, J.S. 1986. *Kimia Organik Dasar Edisi Ketiga*. Jilid 1. Erlangga. Jakarta
- Hidayani, T.R., 2018. Grafting Polipropilena Dengan Maleat Anhidrida Sebagai Pengikat Silang Dengan Inisiator Benzoil Peroksida. *EKSAKTA Berkala Ilmiah Bidang MIPA* 19, 56–62. <https://doi.org/10.24036/eksakta/vol19-iss1/127>
- Hu, Q., Luo, Y., 2016. Polyphenol-Chitosan Conjugates: Synthesis, Characterization, and Applications. *Carbohydrate Polymer*. 109, 63. <http://dx.doi.org/doi:10.1016/j.carbpol.2016.05.109>
- Hu, Q., Wang, T., Zhou, M., Xue, J., Luo, Y., 2016. In Vitro Antioxidant-Activity Evaluation of Gallic-Acid-Grafted Chitosan Conjugate Synthesized by Free-Radical-Induced Grafting Method. *Journal Agriculture Food Chemistry*. 64, 5893–5900. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.6b02255>
- Hu, G.H., Flat, J.J., Lambra M., 1997. *Free-Radical Grafting of Monomers Onto Polymers by Reactive Extrusion : Principles and Applications*. Blackie Academic and Professional. London
- İlyasoğlu, H., Nadzieja, M., Guo, Z., 2019. Caffeic acid grafted chitosan as a novel dual-functional stabilizer for food-grade emulsions and additive antioxidant property. *Food Hydrocolloids*. 95, 168–176. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2019.04.043>
- Jing, Y., Diao, Y., Yu, X., 2019. Free radical-mediated conjugation of chitosan with tannic acid: Characterization and antioxidant capacity. *Reactive and Functional Polymers*. 135, 16–22. <https://doi.org/10.1016/j.reactfunctpolym.2018.12.005>

- Khondker, A., Lakhani, S., 2015. X-Ray Diffraction: A Comprehensive Explanation for Multipurpose Research. *International Journal Interdisciplinary Research and Innovations*. 3, 5.
- Kumar, N., Goel, N., 2019. Phenolic acids: Natural versatile molecules with promising therapeutic applications. *Biotechnology Reports*. 24, e00370. <https://doi.org/10.1016/j.btre.2019.e00370>
- Kurniasih, M., Kartika, D., 2009. Aktivitas Antibakteri Kitosan Terhadap Bakteri *S.aureus*. *Molekul*. 4 (1), 1-5. <https://doi.org/10.20884/1.jm.2009.4.1.56>
- Lee, K.J., Oh, Y.C., Cho, W.K., Ma, J.Y., 2015. Antioxidant and Anti-Inflammatory Activity Determination of One Hundred Kinds of Pure Chemical Compounds Using Offline and Online Screening HPLC Assay. *Evidence Based Complementary Alternative Medicine*. 2015, 1–13. <https://doi.org/10.1155/2015/165457>
- Li, C., Li, J.-B., 2017. Preparation of chitosan-ferulic acid conjugate: Structure characterization and in the application of pharmaceuticals. *International Journal Biological Macromolecules*. 105, 1539–1543. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2017.04.103>
- Listyo, A.B., Kusriani, D., Fachriyah, E., 2018. Isolation of Ferulic Acid from Leaves of Mindi (*Melia azedarach* L.) and Its Antioxidant Activity Test. *JKPK Jurnal Kimia Dan Pendidikan Kimia*. 3, 30. <https://doi.org/10.20961/jkpk.v3i1.11858>
- Liu, J., Pu, H., Chen, C., Liu, Y., Bai, R., Kan, J., Jin, C., 2018. Reaction Mechanisms and Structural and Physicochemical Properties of Caffeic Acid Grafted Chitosan Synthesized in Ascorbic Acid and Hydroxyl Peroxide Redox System. *Journal Agriculture Food Chemistry*. 66, 279–289. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.7b05135>
- Liu, J., Pu, H., Liu, S., Kan, J., Jin, C., 2017. Synthesis, characterization, bioactivity and potential application of phenolic acid grafted chitosan: A review. *Carbohydrate Polymer*. 174, 999–1017. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2017.07.014>
- Liu, J., Wen, X., Lu, J., Kan, J., Jin, C., 2014. Free radical mediated grafting of chitosan with caffeic and ferulic acids: Structures and antioxidant activity. *International Journal Biological Macromolecules*. 65, 97–106. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2014.01.021>
- Mareček, V., Mikyška, A., Hampel, D., Čejka, P., Neuwirthová, J., Malachová, A., Cerkal, R., 2017. ABTS and DPPH methods as a tool for studying antioxidant capacity of spring barley and malt. *Journal of Cereal Science*. 73, 40–45. <https://doi.org/10.1016/j.jcs.2016.11.004>
- Moreno-Vásquez, M.J., Valenzuela-Buitimea, E.L., Plascencia-Jatomea, M., Encinas-Encinas, J.C., Rodríguez-Félix, F., Sánchez-Valdes, S., Rosas-Burgos, E.C., Ocaño-Higuera, V.M., Graciano-Verdugo, A.Z., 2017. Functionalization of chitosan by a free radical reaction: Characterization, antioxidant and antibacterial potential. *Carbohydrate Polymer*. 155, 117–127. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2016.08.056>
- Oliveira, S., Glalci, A.S., Camila, R.E., Thuany, A.S., Edmar, S., Oriana, A.F., Marcelo, J., Pena F., Paulete, R., 2014. Evaluation of Antiradical Assays Used in Determining The Antioxidant Capacity of Pure Compounds and Plan Extracts. *Artigo*. 37 (3), 497-503

- Paiva, L.B. de, Goldbeck, R., Santos, W.D. dos, Squina, F.M., 2013. Ferulic acid and derivatives: molecules with potential application in the pharmaceutical field. *Brazilian Journal Pharmaceutical Science*. 49, 395–411. <https://doi.org/10.1590/S1984-82502013000300002>
- Shalaby, E.A., Shanab, S.M.M., 2013. Comparison of DPPH and ABTS assays for determining antioxidant potential of water and methanol extracts of *Spirulina platensis*. *Indian Journal Geo-Marine Science*. 42, 556–554.
- Wang, Y., Xie, M., Ma, G., Fang, Y., Yang, W., Ma, N., Fang, D., Hu, Q., Pei, F., 2019. The antioxidant and antimicrobial activities of different phenolic acids grafted onto chitosan. *carbohydrate Polymer*. 225, 115238. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2019.115238>
- Woranuch, S., Yoksan, R., 2013. Preparation, characterization and antioxidant property of water-soluble ferulic acid grafted chitosan. *Carbohydrate Polymer*. 96, 495–502. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2013.04.006>
- Xie, M., Hu, B., Wang, Y., Zeng, X., 2014. Grafting of Gallic Acid onto Chitosan Enhances Antioxidant Activities and Alters Rheological Properties of the Copolymer. *Journal Agriculture Food Chemistry*. 62, 9128–9136. <https://doi.org/10.1021/jf503207s>
- Yusnawan, E., Utomo, J.S., 2017. Mikroanalisis Kandungan Senyawa Fenolik Total Ekstrak Biji Kedelai dengan Reagen Folin-Ciocalteu. *Jurnal Penelitian Pertanian Tanaman Pangan*. 1, 73. <https://doi.org/10.21082/jpntp.v1n1.2017.p73-81>



LAMPIRAN

1. Perhitungan persentase grafting, berat molekul produk, dan rendemen produk

$$\text{mol kitosan} = \frac{0,5 \text{ g}}{179 \text{ g/mol}} = 2,79 \times 10^{-3}$$

$$\text{mol asam ferulat} = \frac{0,5 \text{ g}}{194 \text{ g/mol}} = 2,79 \times 10^{-3}$$

	Kitosan	+	asam ferulat	→	Produk
m	$2,79 \times 10^{-3}$		$2,79 \times 10^{-3}$		
r	$2,79 \times 10^{-3}$		$2,79 \times 10^{-3}$		$2,79 \times 10^{-3}$
s	-		-		$2,79 \times 10^{-3}$

a. Persentase grafting

- Metanol

$$\% \text{ grafting} = \frac{50,4165 \text{ mg/g}}{1000} = 50,4165 \times 100\% = 5,041\%$$

- Etanol

$$\% \text{ grafting} = \frac{78,963 \text{ mg/g}}{1000} = 78,963 \times 100\% = 7,89\%$$

- 1-propanol

$$\% \text{ grafting} = \frac{63,0369 \text{ mg/g}}{1000} = 63,0369 \times 100\% = 6,303\%$$

- 2-propanol

$$\% \text{ grafting} = \frac{70,44 \text{ mg/g}}{1000} = 70,44 \times 100\% = 7,044\%$$

- 1-butanol

$$\% \text{ grafting} = \frac{46,4 \text{ mg/g}}{1000} \times 100\% = 4,64\%$$

- 2-butanol

$$\% \text{ grafting} = \frac{52,56675 \text{ mg/g}}{1000} \times 100\% = 5,25\%$$

- t-butanol

$$\% \text{ grafting} = \frac{58,65 \text{ mg/g}}{1000} \times 100\% = 5,86\%$$

b. berat molekul produk (derajat deasetilasi 80%)

- metanol

$$\begin{aligned} \text{Mr produk} &= (5,041\% \times \text{Mr asam ferulat}) + (80\% \times \text{Mr glukosamin}) + (20\% \times \\ &\quad \text{Mr N-asetilglukosamin}) \\ &= (5,041\% \times 194) + (80\% \times 179) + (20\% \times 221) \\ &= 197,35 \text{ g/ mol} \end{aligned}$$

- etanol

$$\begin{aligned} \text{Mr produk} &= (7,89\% \times \text{Mr asam ferulat}) + (80\% \times \text{Mr glukosamin}) + (20\% \times \\ &\quad \text{Mr N-asetilglukosamin}) \\ &= (7,89\% \times 194) + (80\% \times 179) + (20\% \times 221) \\ &= 202,8 \text{ g/mol} \end{aligned}$$

- 1-propanol

$$\begin{aligned} \text{Mr produk} &= (6,303\% \times \text{Mr asam ferulat}) + (80\% \times \text{Mr glukosamin}) + (20\% \times \\ &\quad \text{Mr N-asetilglukosamin}) \\ &= (6,303\% \times 194) + (80\% \times 179) + (20\% \times 221) \\ &= 199,8 \end{aligned}$$

- 2-propanol

$$\begin{aligned} \text{Mr produk} &= (7,044\% \times \text{Mr asam ferulat}) + (80\% \times \text{Mr glukosamin}) + (20\% \times \\ &\quad \text{Mr N-asetilglukosamin}) \end{aligned}$$

$$= (7,044\% \times 194) + (80\% \times 179) + (20\% \times 221)$$

$$= 201,24$$

- 1-butanol

$$\text{Mr produk} = (4,64\% \times \text{Mr asam ferulat}) + (80\% \times \text{Mr glukosamin}) + (20\% \times \text{Mr N-asetilglukosamin})$$

$$= (4,64\% \times 194) + (80\% \times 179) + (20\% \times 221)$$

$$= 196,57$$

- 2-butanol

$$\text{Mr produk} = (5,25\% \times \text{Mr asam ferulat}) + (80\% \times \text{Mr glukosamin}) + (20\% \times \text{Mr N-asetilglukosamin})$$

$$= (5,25\% \times 194) + (80\% \times 179) + (20\% \times 221)$$

$$= 197,8$$

- t-butanol

$$\text{Mr produk} = (5,86\% \times \text{Mr asam ferulat}) + (80\% \times \text{Mr glukosamin}) + (20\% \times \text{Mr N-asetilglukosamin})$$

$$= (5,86\% \times 194) + (80\% \times 179) + (20\% \times 221)$$

$$= 198,95$$

c. Rendemen produk

$$\text{Rendemen} = \frac{\text{Berat produk} \times 100\%}{\text{Berat teoritis}}$$

- metanol

$$\text{Rendemen} = \frac{0,8075}{0,55} \times 100\% = 146,8\%$$

- etanol

$$\text{Rendemen} = \frac{0,6651}{0,56} \times 100\% = 118,8\%$$

- 1-propanol

$$\text{Rendemen} = \frac{0,6907}{0,55} \times 100\% = 124\%$$

- 2-propanol

$$\text{Rendemen} = \frac{0,7939}{0,561} \times 100\% = 141,51\%$$

- 1-butanol

$$\text{Rendemen} = \frac{0,7299}{0,548} \times 100\% = 133,19\%$$

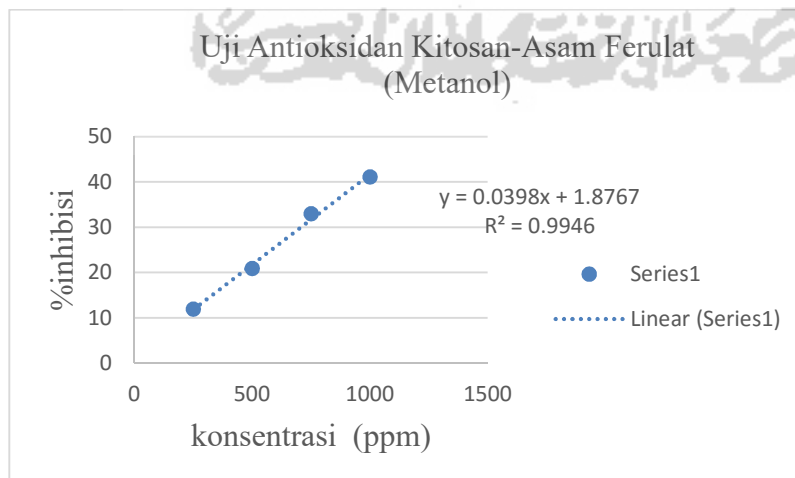
- 2-butanol

$$\text{Rendemen} = \frac{0,9666}{0,55} \times 100\% = 175,42\%$$

- t-butanol

$$\text{Rendemen} = \frac{0,7084}{0,555} \times 100\% = 127,63\%$$

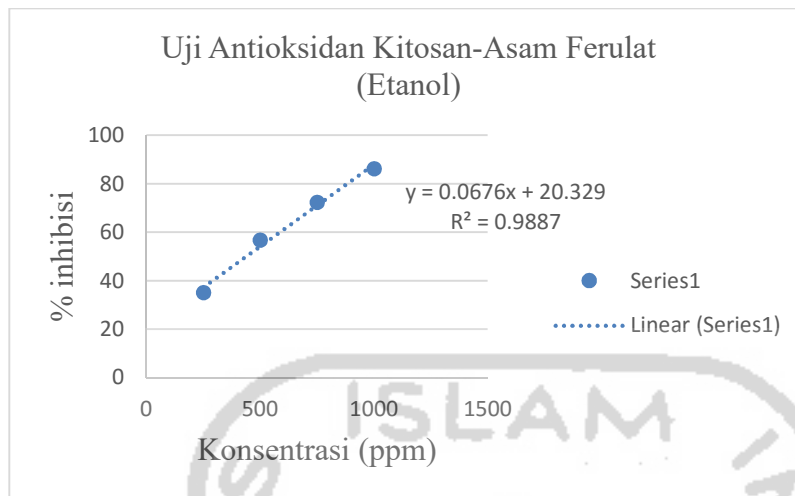
2. Perhitungan konsentrasi sampel yang diperlukan untuk menghambat setengah jumlah radikal ABTS



$$\text{IC } 50 = 0,0398x + 1,8767$$

$$50 = 0,0398x + 1,8767$$

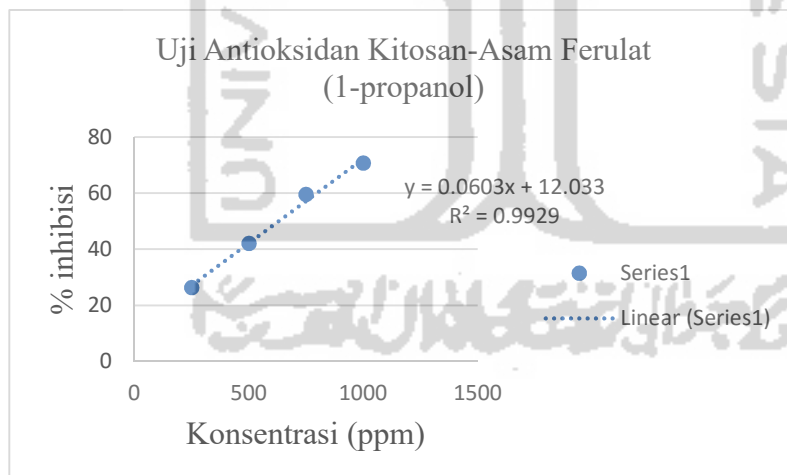
$$x = 1209$$



$$IC\ 50 = 0,0676x + 20,329$$

$$50 = 0,0676x + 20,329$$

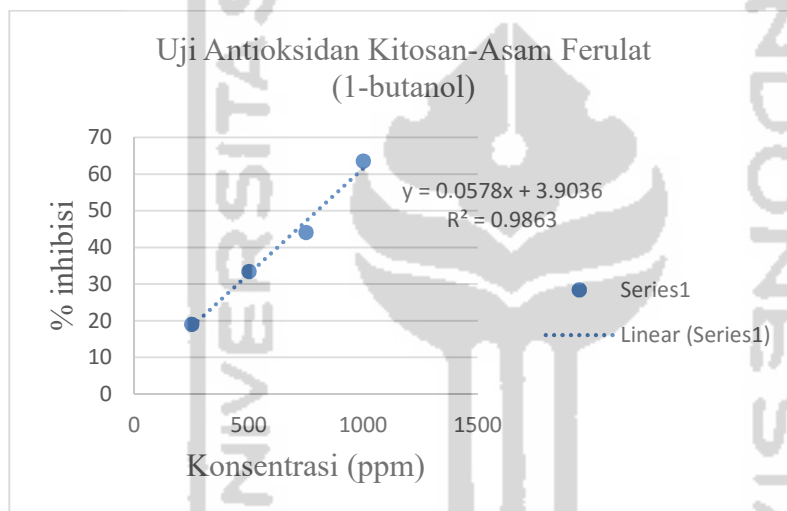
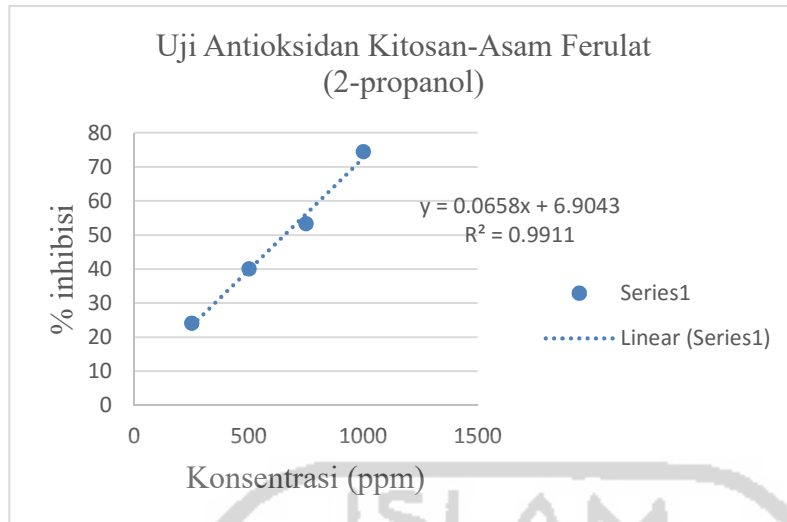
$$x = 438,92$$



$$IC\ 50 = 0,0603x + 12,033$$

$$50 = 0,0603x + 12,033$$

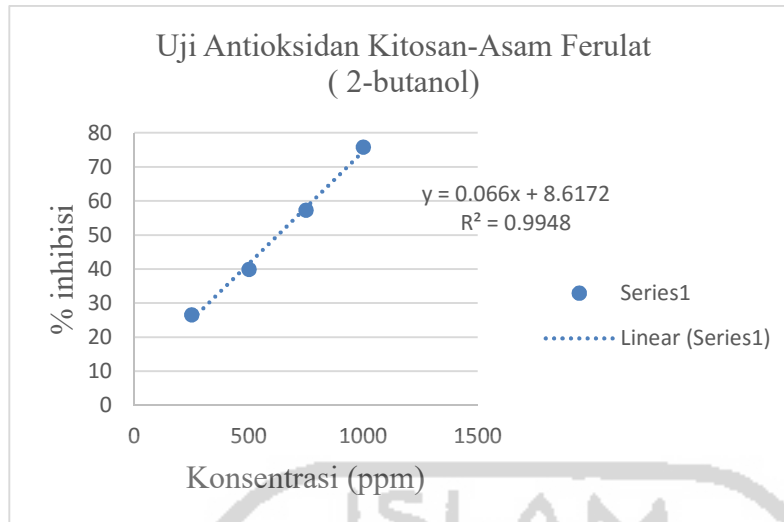
$$x = 629,63$$



$$IC_{50} = 0,0578x + 3,9036$$

$$50 = 0,0578x + 3,9036$$

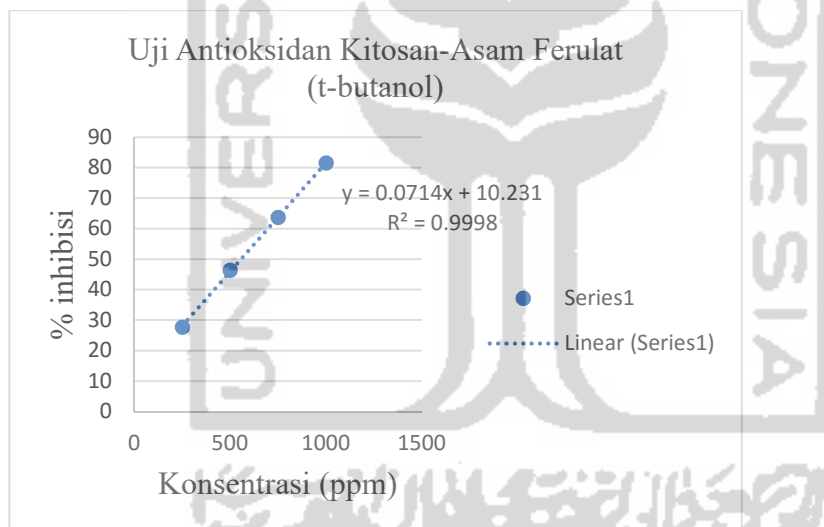
$$x = 797,51$$



$$IC_{50} = 0,066x + 8,6172$$

$$50 = 0,0398x + 8,6172$$

$$x = 627,12$$



$$IC_{50} = 0,0714x + 10,231$$

$$50 = 0,0714x + 10,231$$

$$x = 557,36$$