



Uji Aktivitas Antioksidan N-Metil Kitosan Berkelarutan Tinggi

Mardiyah Kurniasih^{a*}, Purwati Purwati^a, Ratna Stia Dewi^b, Susi Fatimah^a

^aJurusan Kimia, Fakultas MIPA, Universitas Jenderal Soedirman, Jl. Dr. Soeparno 61 Purwokerto, Jawa-Tengah, Indonesia

^bLaboratorium Mikologi & Patologi, Fakultas Biologi, Universitas Jenderal Soedirman Jl. Dr. Soeparno 63 Purwokerto, Jawa Tengah, Indonesia

* Corresponding author

E-mail: m_kurniasih@yahoo.com

DOI: 10.20961/alchemy.14.1.15100.107-118

Received..., Accepted 19 December 2017, Published 1 March 2018

ABSTRAK

Telah dilakukan uji aktivitas antioksidan dari N-metil kitosan yang memiliki kelarutan tinggi. Uji aktivitas antioksidan dilakukan dengan menggunakan metode DPPH (1,1-diphenyl-2-pikrilhidrazil) dan metode FTC (*ferric thiocyanate*). Optimasi sintesis dilakukan untuk memperoleh N-metil kitosan dengan kelarutan tinggi. Hasil penelitian menunjukkan bahwa N-metil kitosan yang berkelarutan paling tinggi adalah N-metil kitosan yang disintesis dengan 1,7 mL formaldehid 10%. Berdasarkan hasil uji aktivitas antioksidan menggunakan metode DPPH dapat diketahui bahwa N-metil kitosan merupakan antioksidan sedang dengan nilai IC₅₀ sebesar 145,398 ppm. Hasil pengujian antioksidan metode FTC menunjukkan bahwa N-metil kitosan memiliki kemampuan menghambat terbentuknya senyawa radikal bebas yang disebabkan oleh oksidasi asam lemak.

Kata kunci: aktivitas antioksidan, DPPH, *ferric thiocyanate*, N-metil kitosan, sintesis

ABSTRACT

An Antioxidant Activity Test of High Solubility N-Methyl Chitosan. An antioxidant activity test of high solubility N-methyl chitosan has been performed. The antioxidant activity test was performed using DPPH (1,1-diphenyl-2-pikrilhidrazil) and FTC method (*ferric thiocyanate*). The synthesis optimization was performed to obtain high N-methyl chitosan solubility. The results showed that N-methyl chitosan with the highest solubility in 1% acetic acid solvent was N-methyl chitosan which was synthesized with 1.7 mL formaldehyde 10%. Based on the results of antioxidant activity test using DPPH method can be seen that N-methyl chitosan is a medium antioxidant with IC₅₀ value of 145.398 ppm. The result of antioxidant test of FTC method showed that N-methyl chitosan has antioxidant activity with tendency to increase along with the increase of N-methyl chitosan concentration.

Keywords: antioxidant activity, DPPH, *ferric thiocyanate*, N-methyl chitosan, synthesis

PENDAHULUAN

Kitosan banyak diaplikasikan dalam bidang industri maupun kesehatan. Permasalahan terbatasnya tingkat kelarutan kitosan ini merupakan suatu hambatan utama

pada aplikasi kitosan di berbagai bidang. Oleh karena itu, kitosan perlu diderivatisasi sehingga didapatkan turunan kitosan yang berkelarutan tinggi. Beberapa derivat kitosan memiliki kelarutan dalam air yang lebih tinggi dibanding kitosan, diantaranya karboksimetil kitosan (Nada *et al.*, 2006; Kurniasih *et al.*, 2014), N-alkil kitosan (Ma *et al.*, 2008; Tan *et al.*, 2013) dan N-metil kitosan (Kurniasih *et al.*, 2017a). Kitosan memiliki dua gugus reaktif, yaitu gugus amino dan gugus hidroksil, sehingga memungkinkan untuk memodifikasi kitosan secara kimia. Salah satu proses derivatisasi melalui gugus amino adalah pembentukan basa *Schiff* atau imina (Kim and Choi, 2002). Gugus amino kitosan pada posisi C2 dapat mengalami reaksi *Schiff* dengan aldehid dan keton, yang masing-masing menghasilkan aldimin dan ketimin (Aranaz *et al.*, 2010).

Lin and Chou (2004) membuktikan bahwa larutan kitosan mengandung antioksidan yang dibuktikan dengan kemampuan larutan kitosan tersebut mengurangi aktivitas radikal bebas seperti hidrogen peroksida, anion superoksida dan ion Cu^{2+} dengan cara mengikat ion radikal bebas tersebut. Radikal bebas merupakan spesies yang relatif tidak stabil, memiliki elektron yang tidak berpasangan di orbital luarnya sehingga bersifat reaktif dalam mencari pasangan elektron (Kothari *et al.*, 2010). Tubuh manusia secara alami memiliki sistem antioksidan untuk menangkal radikal bebas secara berkelanjutan, namun jika jumlah radikal bebas dalam tubuh berlebih maka dibutuhkan antioksidan tambahan yang diperoleh dari asupan bahan makanan (Erguder *et al.*, 2007). Berdasarkan uraian di atas maka dilakukan optimasi sintesis N-metil kitosan untuk mendapatkan derivat kitosan dengan kelarutan tertinggi. Mengingat pentingnya antioksidan bagi tubuh manusia, maka pada penelitian ini juga dilakukan penentuan aktivitas antioksidan pada N-metil kitosan.

METODE PENELITIAN

Bahan kimia yang digunakan adalah Kitosan (hasil sintesis berdasarkan prosedur yang dilaporkan oleh Kurniasih *et al.*, (2017b) dengan DD=94,32), CH_3COOH (merck), formaldehid (merck), NaBH_4 (merck), 1,1-difenil-2-pikrilhidrazil (merck), metanol (merck), asam linoleat (merck), NH_4CNS (merck), etanol absolut (merck), BHT (merck), α -tokoferol (merck), $\text{FeCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ (merck), dan akuades. Alat yang digunakan antara lain timbangan analitik, oven Memmert, pHmeter hanna, *Fourier Transform Infra-Red Spectrophotometer* (FTIR) 8201 Shimadzu, dan spektrofotometer UV-Vis Shimadzu 1800.

Sintesis N-Metil Kitosan

Larutan kitosan 1% (b/v) ditambahkan formaldehid 10% dengan volume yang divariasikan (0,17; 1,7; 3,4; dan 5 mL) pada temperatur kamar dan dilakukan pengadukan. Setelah satu jam pH larutan dikondisikan pada 4,5 dengan ditambahkan larutan NaOH 1 M. Kemudian ke dalam campuran ini ditambahkan larutan NaBH₄ 10% dan campuran larutan diaduk selama 1,5 jam. Produk N-metil kitosan yang dihasilkan kemudian diendapkan dengan mengkondisikan pH sampai 10. Endapan yang diperoleh kemudian dicuci dengan akuades untuk menetralkan produk dan menghilangkan kelebihan formaldehid yang tidak bereaksi dan dilakukan uji Fehling. Kemudian endapan N-metil kitosan dikeringkan pada temperatur 35 °C. N-metil kitosan yang dihasilkan diberi kode NMK-a, NMK-b, NMK-c, dan NMK-d, secara berurutan sesuai dengan urutan volume formaldehid yang digunakan.

Karakterisasi N-Metil Kitosan

N-metil kitosan hasil sintesis diidentifikasi dengan *Fourier Transform Infrared* (FTIR) untuk mengetahui serapan-serapan karakteristik dari N-metil kitosan. Kemudian dilakukan uji kelarutan dalam pelarut asam asetat 1% (Kurniasih *et al.*, 2014). N-metil kitosan hasil sintesis dihitung derajat substitusinya (DS) menggunakan Persamaan (1) yang dikutip dari Bobu *et al.* (2011).

$$DS = \frac{DDA_1 - DDA_2}{100} \quad (1)$$

Keterangan:

DS = Derajat Substitusi

DDA₁ = Derajat Deasetilasi Kitosan

DDA₂ = Derajat Deasetilasi N-metil Kitosan

Uji Aktivitas Antioksidan N-Metil Kitosan

Uji aktivitas antioksidan dengan metode DPPH

Uji aktivitas antioksidan dengan metode DPPH mengacu pada penelitian Lin *and* Chou (2004). Larutan DPPH 50 µM dalam metanol sebanyak 4,0 mL ditambahkan ke dalam 1,0 mL sampel uji dengan variasi konsentrasi 20; 40; 60; 80; dan 100 ppm. Setelah diinkubasi selama 30 menit pada suhu kamar, larutan diukur absorbansinya pada panjang gelombang 515,6 nm. *Operating time* dan panjang gelombang diperoleh dari pengukuran sebelumnya (Kurniasih *et al.*, 2017b). Persentase penghambatan DPPH dihitung menurut Persamaan (2):

$$\% \text{Penghambatan} = \left[1 - \frac{\text{absorbansi}_{\text{sampel}}}{\text{absorbansi}_{\text{kontrol}}} \right] \times 100\% \quad (2)$$

Uji aktivitas antioksidan N-metil kitosan metode FTC (ferric thiocyanate).

Uji aktivitas antioksidan metode FTC mengacu pada penelitian Boer (2000). Sampel yang akan diuji dibuat dengan cara menambahkan 8 mL buffer fosfat 0,1 M pH 7 dan 10 mL asam linoleat 0,05 % (b/v) ke dalam 2 mL sampel dengan variasi konsentrasi 20; 40; 60; 80; dan 100 ppm. Sebagai kontrol adalah asam linoleat dengan perlakuan sama tanpa penambahan sampel. Sebagai pembanding terhadap sampel digunakan antioksidan BHT 500 ppm. Larutan ini kemudian disimpan dalam oven dengan suhu 60 °C selama 7 hari. Perlakuan ini dilakukan juga untuk BHT 0,05% sebagai kontrol positif.

Sampel yang telah disimpan dalam oven dikeluarkan, dibiarkan suhunya sama dengan suhu kamar. Sebanyak 2 mL dimasukkan ke dalam tabung reaksi, lalu ditambahkan 4,7 mL etanol 75%, 0,2 mL NH₄CNS 30 % dan 0,02 M FeCl₂.4H₂O dalam HCl 3,5% sebanyak 0,2 mL. Setelah dicampur sampel dibiarkan selama 35 menit, kemudian diukur absorbansinya dengan spektrofotometer UV-Vis pada panjang gelombang 481 nm. Pengukuran dilakukan setiap 24 jam selama 7 hari. Berdasarkan pengukuran absorbansi kemudian dihitung persentase penghambatan dari sampel dengan Persamaan (3).

$$\% \text{ Penghambatan} = \frac{\text{Absorbansi kontrol} - \text{Absorbansi sampel}}{\text{Absorbansi kontrol}} \times 100\% \quad (3)$$

PEMBAHASAN

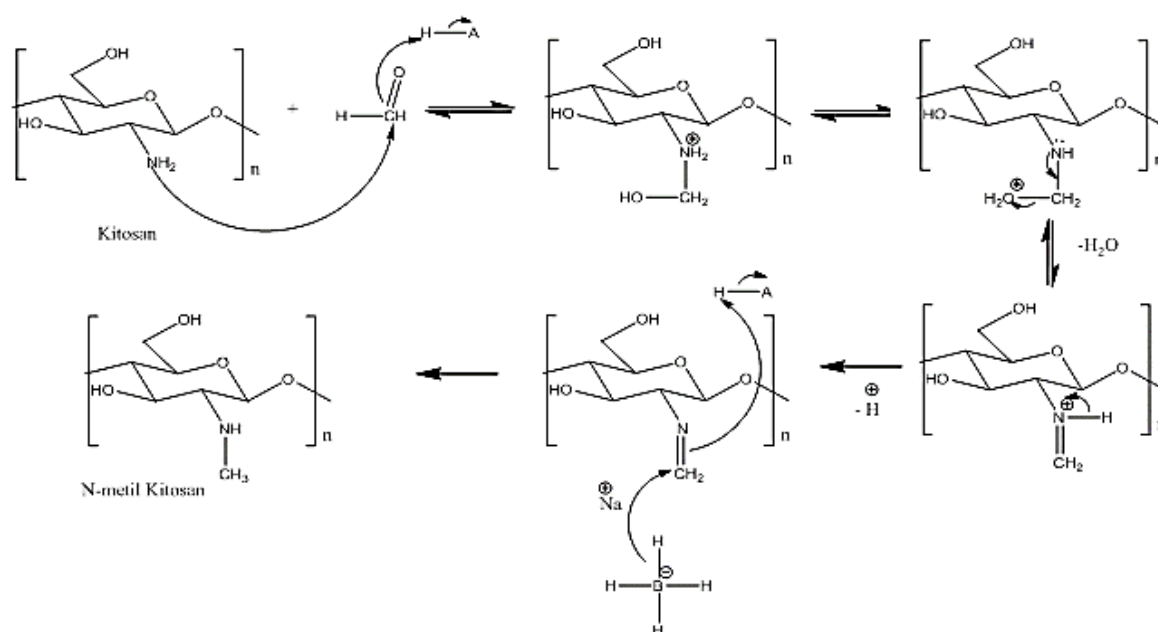
N-Metil Kitosan

Substitusi suatu gugus ke dalam struktur kitosan dapat meningkatkan kelarutan kitosan pada nilai pH netral dan basa, tanpa memberikan dampak signifikan terhadap karakter kationik dari kitosan itu sendiri (Alves *and* Mano, 2008). Kitosan hanya larut dalam larutan dengan pH dibawah 7 dikarenakan struktur kristalinnya yang kaku (*rigid*) sehingga membatasi penggunaannya (Ma *et al.*, 2008). N-metil kitosan disintesis melalui suatu prosedur reduktif aminasi. Gugus amino primer pada kitosan membentuk basa *Schiff* dengan aldehid kemudian membentuk imin sekunder setelah mengalami reduksi oleh natrium borohidrida (Nikmawahda *et al.*, 2015).

Larutan kitosan direaksikan dengan formaldehid. Pada penelitian ini dilakukan 4 variasi volume formaldehid yang digunakan. pH campuran dikondisikan menjadi 4,5 untuk mengontrol pH sistem. Menurut Solomons *and* Fryhle (2011), kontrol pH sangat diperlukan dalam pembentukan imin. Asam dapat memprotonasi gugus karbonil sehingga

atom C karbonil dari formaldehid menjadi lebih elektrofilik untuk menyerang NH_2 . Oleh karena itu, umumnya imin dapat terbentuk pada pH antara 4-5. Jika pH terlalu rendah atau terlalu tinggi, maka pembentukan imin seperti yang ditunjukkan pada Gambar 1 akan berjalan lebih lambat. Selain itu, Nikmawahda *et al.* (2015) menjelaskan bahwa pada kondisi terlalu asam, NH_2 akan terprotonasi menjadi NH_3^+ sehingga akan kehilangan nukleofilitas pada penambahan formaldehid pada reaksi awal. Sedangkan apabila pH terlalu basa, gugus $-\text{OH}$ akan sulit terprotonasi menjadi $-\text{OH}_2^+$ sehingga reaksi eliminasi air untuk membentuk iminium pada tahap selanjutnya tidak akan berjalan.

Tahap selanjutnya, campuran ditambahkan dengan larutan NaBH_4 . NaBH_4 berfungsi sebagai agen pereduksi yang dapat mengubah ikatan $\text{C}=\text{N}$ menjadi ikatan $\text{C}-\text{N}$ sehingga terbentuk N-metil kitosan. N-metil kitosan yang diperoleh kemudian diendapkan dengan mengubah pH larutan menjadi 10. Endapan yang diperoleh disaring dan dikeringkan. Berdasarkan hasil penelitian, diperoleh nilai rendemen N-metil kitosan berkisar antara 52,48 sampai 76,66%. Mekanisme sintesis N-metil kitosan ditunjukkan pada Gambar 1.



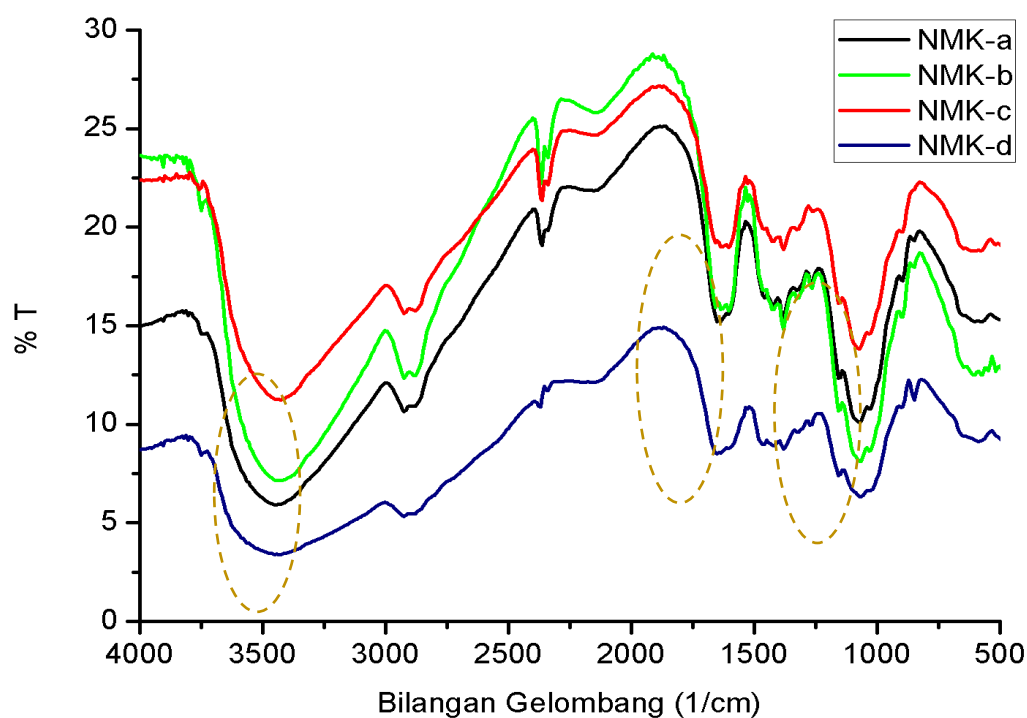
Gambar 1. Mekanisme reaksi N-metil kitosan

Karakteristik N-Metil Kitosan

Spektra-spektra IR N-metil kitosan hasil sintesis ditunjukkan pada Gambar 2. Berdasarkan gambar spektra tersebut, didapat pita serapan gugus metilen, pita serapan gugus metil, pita serapan gugus hidroksil dan pita serapan gugus amina, yang disajikan pada Tabel 2.

Tabel 2. Pita serapan IR N-metil kitosan

Gugus fungsi	Frekuensi (cm ⁻¹)			
-OH	3448,72	3425,58	3425,58	3425,58
-NH	1635,64	1635,64	1604,77	1651,07
-NH ₂	1072,42	1064,71	1072,43	1064,71
-CH ₃	1381,03	1381,03	1381,03	1381,07
kode sampel	NMK-a	NMK-b	NMK-c	NMK-d

**Gambar 2.** Spektra IR N-metil kitosan hasil sintesis

Selain dari spektra IR, variasi N-metil kitosan yang dihasilkan juga diukur kelarutannya dalam asam asetat 1%. Hasil uji kelarutan ditunjukkan pada Tabel 3. Berdasarkan Tabel 3 didapat N-metil kitosan yang berkelarutan paling tinggi dalam pelarut asam asetat 1% adalah N-metil kitosan yang disintesis dengan 1,7 mL formaldehid 10% (NMK-b). Hal ini kemungkinan dikarenakan pada NMK-b memiliki DS yang paling besar dibandingkan N-metil kitosan lainnya, yaitu sebesar 4,88%.

Tabel 3. Hasil uji kelarutan

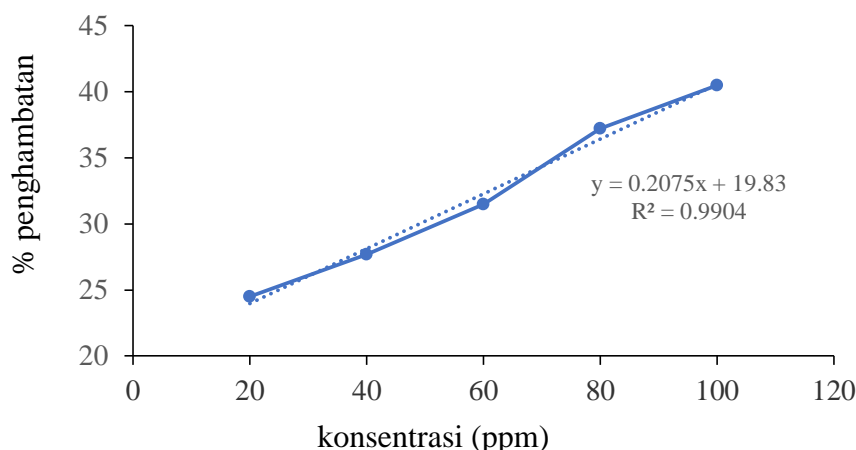
Sampel	Kelarutan dalam asam asetat 1% (mg/mL)
NMK-a	4,46
NMK-b	10,62
NMK-c	7,00
NMK-d	5,99

Aktivitas Antioksidan N-Metil Kitosan

Aktivitas antioksidan dalam penelitian ini ditentukan dengan menggunakan metode DPPH dan metode FTC (*ferric thiocyanate*).

Metode DPPH

Penggunaan metode ini memiliki beberapa keuntungan seperti mudah digunakan, mempunyai tingkat sensitivitas yang tinggi dan dapat menganalisis sampel dalam jangka waktu yang singkat. Metode DPPH adalah suatu metode pengujian antioksidan dengan mengukur radikal sintetik yang telah dilarutkan dalam metanol (Sari *et al.*, 2013). Aktivitas antioksidan diukur dengan menghitung jumlah pengurangan intensitas warna ungu DPPH yang sebanding dengan pengurangan konsentrasi larutan DPPH akibat adanya penambahan sampel. Peredaman tersebut dihasilkan oleh bereaksinya molekul radikal DPPH dengan atom hidrogen yang dilepaskan satu molekul komponen sampel sehingga terbentuk senyawa DPPH nonradikal (Zuhra *et al.*, 2008). Grafik hubungan variasi konsentrasi larutan uji N-metil kitosan dengan persentase penghambatan radikal bebas DPPH disajikan pada Gambar 3.



Gambar 3. Persentase penghambatan radikal bebas DPPH

Berdasarkan Gambar 3 dapat dilihat bahwa semakin besar konsentrasi larutan uji N-metil kitosan maka persentase penghambatan radikal bebas DPPH oleh larutan uji semakin meningkat. Selanjutnya persamaan regresi yang diperoleh dari grafik hubungan antara konsentrasi N-metil kitosan dengan persen penghambatan DPPH digunakan untuk mencari nilai IC_{50} . Besarnya aktivitas antioksidan ditandai dengan nilai IC_{50} , yaitu konsentrasi larutan uji yang dibutuhkan untuk menghambat 50% radikal bebas DPPH (Andayani *et al.*, 2008). Semakin kecil nilai IC_{50} artinya semakin aktif atau semakin tinggi aktivitas antioksidan suatu sampel yang diuji untuk menjadi senyawa antioksidan (Molyneux, 2004). Secara spesifik suatu senyawa dapat dikatakan sebagai antioksidan

sangat kuat jika nilai IC_{50} kurang dari 50 ppm, kuat untuk IC_{50} bernilai 50-100 ppm, sedang jika bernilai 100-150 ppm, dan lemah jika nilai IC_{50} bernilai 151-200 ppm (Zuhra *et al.*, 2008). Nilai IC_{50} untuk sampel uji N-metil kitosan dalam penelitian ini adalah sebesar 145,40 ppm. Oleh karena itu, dapat disimpulkan bahwa N-metil kitosan merupakan antioksidan yang mempunyai aktivitas sedang.

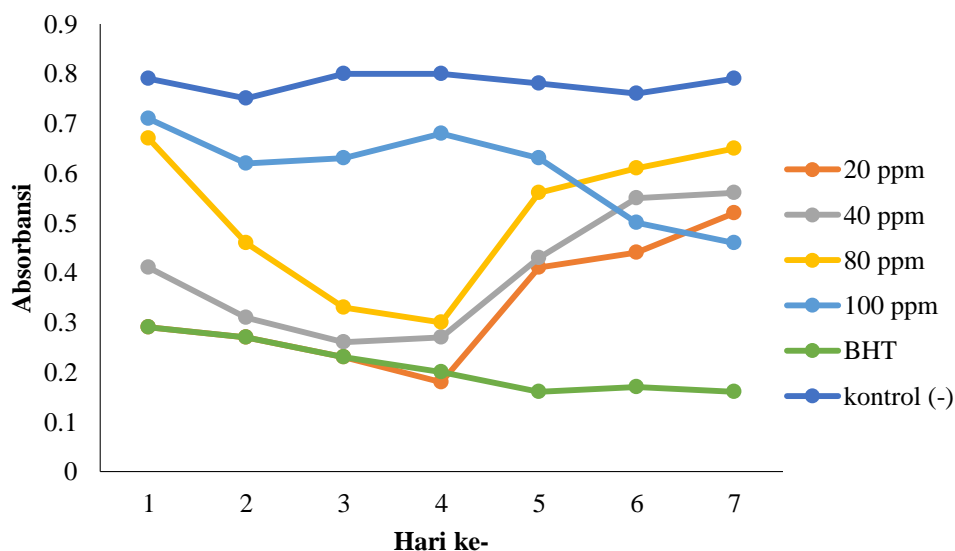
Metode FTC (*ferric thiocyanate*)

Penentuan aktivitas antioksidan menggunakan metode FTC adalah suatu mekanisme pengukuran aktivitas antioksidan dalam menghambat terbentuknya senyawa radikal bebas yang disebabkan oleh oksidasi asam lemak setelah diinkubasi pada suhu tertentu. Oksidasi lipid sering disebut autooksidasi karena reaksi tetap berlangsung walaupun tidak ada zat pengoksidasi. Asam lemak yang digunakan adalah asam linoleat. Hasil oksidasi asam linoleat adalah malonaldehid dan radikal peroksida yang reaktif. Radikal bebas yang terbentuk akan berubah menjadi senyawa karbonil, yaitu aldehida dan keton. Oksidasi asam linoleat membentuk malonaldehid merupakan indikasi adanya oksidasi lemak (Fardiaz, 1996). Selain itu, asam linoleat yang mengalami kerusakan akan menghasilkan senyawa peroksida yang sangat reaktif dan bersifat radikal bebas. Penambahan antioksidan menyebabkan oksidasi asam linoleat terhenti. Berbeda dengan metode DPPH yang digunakan untuk menentukan nilai IC_{50} dari N-metil kitosan, pada metode FTC dihitung persen penghambatan oksidasi asam linoleat selama 7 hari berturut-turut. Pada metode FTC N-metil kitosan dibandingkan dengan kontrol positif (senyawa yang digunakan sebagai antioksidan) yaitu BHT 0,05%. BHT merupakan antioksidan sintetik yang sering digunakan untuk menghambat ketengikan minyak (Rahmatiyah, 2012).

Metode Tiosianat menggunakan larutan amonium thiosianat dan besi ferro dalam larutan asam. Radikal merupakan senyawa oksidator. Radikal ini akan mengoksidasi ion ferro (Fe^{2+}) (dari feroklorida) menjadi ion ferri (Fe^{3+}). Uji ini diharapkan mampu memberikan hasil positif terhadap senyawa peroksida yang terbentuk dari hasil reaksi asam lemak tidak jenuh dengan oksigen. Selanjutnya ion ferri (Fe^{3+}) akan membentuk senyawa kompleks dengan ion thiosianat (CNS^-) yang akan menghasilkan kompleks ferri-thiosianat yang berwarna merah dan dapat diukur intensitasnya pada panjang gelombang 481 nm (Rohman *and* Riyanto, 2005).

Semakin banyak peroksida yang terbentuk, maka semakin merah intensitas warna yang dihasilkan. Berdasarkan Gambar 4 dapat dilihat serapan untuk asam linoleat yang ditambahkan N-metil kitosan dengan variasi konsentrasi 20; 40; 80; dan 100 ppm mempunyai serapan lebih kecil dibandingkan dengan serapan kontrol negatif (asam

linoleat tanpa penambahan N-metil kitosan). Kemampuan antioksidan pada metode tiosianat dilihat dari rendahnya nilai absorbansi yang terbentuk dibandingkan dengan absorbansi kontrol. Menurut Hadisusilo *et al.* (1999), semakin rendah absorbansi berarti semakin sedikit peroksida yang dihasilkan. Hal ini menunjukkan bahwa penambahan larutan uji ke dalam asam linoleat mampu menurunkan pembentukan peroksida, dengan demikian dapat dikatakan bahwa larutan uji N-metil kitosan dapat berfungsi sebagai antioksidan.

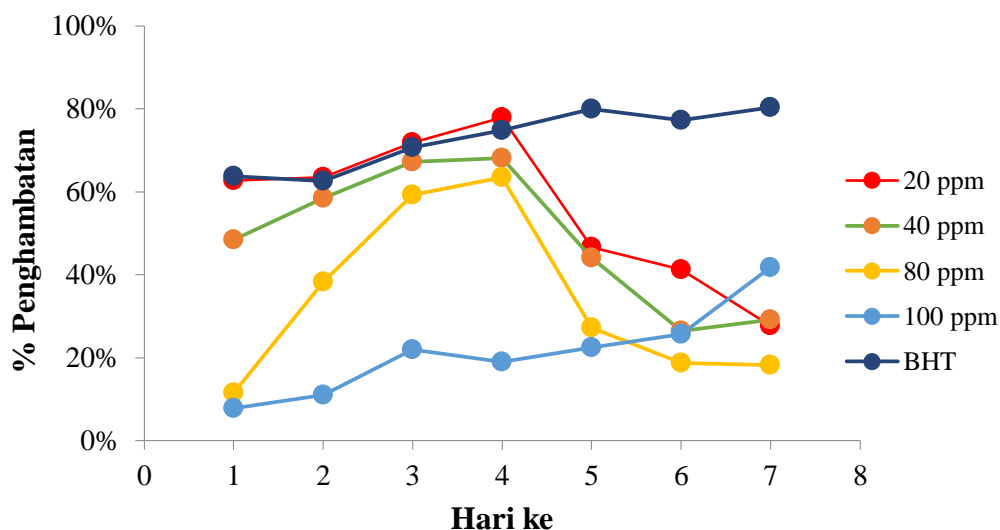


Gambar 4. Hubungan absorbansi dengan lama waktu penyimpanan

Persentase penghambatan yang tidak beraturan dikarenakan proses reaksi yang tidak sempurna yang disebabkan karena oksidasi berlangsung tidak stabil (Suparmi, 2012). Asam linoleat yang teroksidasi oleh oksigen pada tahap awal akan membentuk hidroperoksida. Kadar hidroperoksida ini akan semakin meningkat dan setelah mencapai kadar maksimum, hidroperoksida akan mengalami dekomposisi membentuk malondialdehida yang merupakan produk akhir dari reaksi peroksida lipid. Penggunaan BHT bertujuan sebagai pembanding positif untuk mengetahui apakah N-metil kitosan dapat digunakan sebagai antioksidan. Apabila N-metil kitosan mempunyai nilai serapan seperti BHT yang mempunyai serapan lebih kecil dibandingkan dengan kontrol negatif, maka dapat dipastikan bahwa N-metil kitosan dapat berfungsi sebagai antioksidan (Hanani *et al.*, 2005).

Berdasarkan data absorbansi yang diperoleh kemudian dihitung persentase penghambatan uji aktivitas antioksidan yang disajikan pada Gambar 5. Gambar 5 menunjukkan persen penghambatan N-metil kitosan mengalami kenaikan pada hari ke 1, 2, dan 3. Pada hari berikutnya, yaitu hari ke 4; 5; 6; dan 7 mempunyai persen penghambatan

yang tidak teratur (naik-turun). Hal ini dapat disebabkan karena terjadinya reaksi oksidasi yang tidak teratur atau tidak terkendali sehingga mempengaruhi terbentuknya kompleks ferri-tiosianat (Suparmi *et al.*, 2012). Persen penghambatan radikal bebas pada metode FTC cenderung lebih besar dibandingkan pada metode DPPH karena pada metode FTC dihitung selama 7 hari berturut-turut dan pada variasi konsentrasi.



Gambar 5. Persen penghambatan radikal bebas

KESIMPULAN

N-metil kitosan dengan kelarutan tinggi dapat disintesis dengan menggunakan 1,7 mL formaldehid 10%. Uji aktivitas antioksidan N-metil kitosan menunjukkan nilai IC_{50} sebesar 145,40 ppm sehingga tergolong antioksidan yang mempunyai aktivitas sedang.

UCAPAN TERIMA KASIH

Terima kasih kepada LPPM Universitas Jenderal Soedirman dan Kementerian Riset, Teknologi, dan Pendidikan Tinggi yang telah membiayai penelitian ini dengan kontrak penelitian Nomor: 11001/UN23.14/PN/2017.

DAFTAR PUSTAKA

- Alves, N.M., dan Mano, J.F., 2008. Chitosan Derivatives Obtained by Chemical Modifications for Biomedical and Environmental Applications. *International Journal of Biological Macromolecules* 43, 401-414.
- Aranaz, I., Harris, R., dan Heras, 2010. Chitosan Amphiphilic Derivatives, Chemistry, and Applications. *Current Organic Chemistry* 14, 308-330.
- Bobu, E., Nicu, R., Lupei, M., Ciolacu, F.L., dan Desbrieres, J., 2011. Synthesis and Characterization of N-Alkyl Chitosan for Papermaking Applications. *Cellulose Chemistry and Technology* 45 (9-10), 619-625.

- Boer, Y., 2000. Uji Aktivitas Antioksidan Kulit Buah Kandis (*Garcinia parvivolvia* (Miq.) Miq). *Jurnal MIPA UNJ* 1.
- Erguder, B., Avci, A., Devrim, E., dan Durak, I., 2007. Effects of cooking techniques on antioxidant enzyme activities of some fruits and vegetables. *Turkish Journal Medical Science* 37 (3), 151-156.
- Fardiaz S., 1996. *Prinsip HACCP dalam industri pangan*. Pengantar Antar Universitas Pangan dan Gizi, IPB, Bogor.
- Hadisusilo, S., Lala, K., dan Saleh, K., 1999. Uji Aktivitas Antioksidan Biji Kluwek (*Pangium Edule Reinw*). *Prossiding Seminar Nasional Kimia Bahan Alam*. Universitas Indonesia, Jakarta.
- Hanani, E., Mun'im, A., dan Sekarini, R., 2005. Identifikasi Senyawa Antioksidan dalam Spons *Callyspongia sp.* dari Kepulauan Seribu. *Majalah Ilmu Kefarmasian* 2 (3), 127-133.
- Kim, C.H. dan Choi, K.S., 2002. Synthesis and Antibacterial Activity of Quaternized Chitosan Derivatives having Different Methylene Spacers. *Journal of Industrial and Engineering Chemistry* 8 (1), 71-76.
- Kothari, S., Thompson, A., Agarwal, A., dan Plessis, S.S., 2010. Free Radicals: Their Beneficial and Detrimental Effects on Sperm Function. *Indian Journal of Experimental Biology* 48.
- Kurniasih, M., Purwati, Hermawan, D., dan Zaki M., 2014. Optimum Conditions for The Synthesis of High Solubility Carboxymethyl Chitosan. *Malaysian Journal of Fundamental and Applied Sciences* 10 (4), 189-195.
- Kurniasih, M., Dewi, R.S., Purwati, Hermawan, D., dan Aboul-Enein, H.Y., 2017b. Synthesis, Characterization and Antifungal Activity of N-Methyl Chitosan and Its Application on the Gauze. *Current Bioactive Compounds* 13.
- Kurniasih, M., Purwati, and Dewi, R.S., 2017b. Toxicity tests, antioxidant activity, and antimicrobial activity of chitosan. *Proceeding the 12th Joint Conference on Chemistry*. Semarang.
- Lin, H., dan Chou, C., 2004. Antioxidative Activities of Water-Soluble Disaccharide Chitosan Derivatives. *Food Research International* 37, 883–889.
- Molyneux, P., 2004. The use of the stable free radical diphenylpicrylhydrazyl (DPPH) for estimating antioxidant activity. *Songklanakarin Journal of Science and Technology* 26.
- Ma, G., Yang, D., Zhou, Y., Xiao, M., Kennedy, J.F., dan Jun N., 2008. Preparation and Characterization of Water-Soluble N-Alkylated Chitosan. *Carbohydrate Polymers* 74 (1), 121-126.
- Nada, A.M.A., El-Sakhawy, M., Kamel, S., Eid, M.A.M., dan Adel, A.M., 2006. Mechanical and Electrical Properties of Paper Sheets Treated with Chitosan and Its Derivatives. *Carbohydrate Polymers* 63, 113–12.
- Nikmawahda, H. T., Sugita, P., dan Arifin, B., 2015. Synthesis and Characterization of N-alkylchitosan as well as its Potency as a Paper Coating Material. *Advances in Applied Sciences Research* 6 (2), 141-149.

- Rahmatiyah, 2012. Penggunaan Butil Hidroksi Toluen untuk Menghambat Ketengikan Minyak Kelapa Hasil Olahan Petani. *Jurnal Matematika, Sains, dan Teknologi* 13 (2).
- Rohman, A., dan Riyanto S., 2005. Daya antioksidan ekstrak etanol Daun Kemuning (*Murraya paniculata (L) Jack*) secara in vitro. *Majalah Farmasi Indonesia* 16 (3).
- Solomons T. G. dan Fryhle C. B., 2011. *Organic Chemistry 10th Edition*. J Wiley, New Jersey (US).
- Suparmi, Hady. A., dan Niche, D., 2012. Uji Aktivitas Antioksidan Ekstrak Etanol Kulit Buah Rambutan (*Nephelium Lapaceum, L.*) dengan Metode Linoleat-Tiosianat. *Jurnal Ilmiah Farmasi* 9 (1).
- Tan, H., Ma, R., Lin, C., Liu, Z., dan Tang, T. 2013. Quaternized Chitosan as an Antimicrobial Agent: Antimicrobial Activity, Mechanism of Action and Biomedical Applications in Orthopedics. *International Journal Molecule Science* 14 (1).
- Zuhra, C. F., Tarigan, J. B., dan Sihotang, H., 2008. Aktivitas Antioksidan Senyawa Flavonoid dari Daun Katuk (*Sauropus androgynus (L) Merr.*). *Jurnal Biologi Sumatera* 3 (1), 7-10.