

Sintesis dan Uji Aktivitas Antibakteri Senyawa N-Fenil-4-Bromobenzamida (*Synthesis and Antibacterial Activity Assay of N-Phenyl-4-Bromobenzamide*)

Nazilatul Maghfiroh, Indah Purnama Sary, Dwi Koko Pratoko
Fakultas Farmasi Universitas Jember
Jln. Kalimantan no. 37, Jember 68121
e-mail korespondensi: indahpurnamasary.farmasi@unej.ac.id

Abstract

*Infectious diseases are contagious disease caused by pathogenic microorganisms and can be spread directly or indirectly from one person to another. The aim of this research was to synthesized N-phenyl-4-bromobenzamide as a new antibacterial agent. The reaction was carried out by reacting 1,3-diphenylthiourea with 4-bromobenzoyl chloride by nucleophilic substitution. The purification of this compound was confirmed by TLC and the structure was identified by UV, IR, ¹H-NMR and ¹³C-NMR. The newly synthesized compound was screened for its antibacterial activity against gram-positive and gram-negative bacteria, *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 and *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 using well diffusion method. The concentration of the test solution used were 31.25; 62.5; 125; 250; 500; 1,000; 2,000; 4,000; 8,000; and 10,000 µg/ml with levofloxacin as positive control. The synthesized product did not show any antibacterial activity which characterized by the absence of inhibition zone.*

Keywords: 1,3-diphenylthiourea, N-phenyl-4-bromobenzamide, nucleophilic substitution, antibacterial activity.

Abstrak

Infeksi adalah penyakit menular disebabkan oleh mikroorganisme patogen yang dapat menyebar secara langsung ataupun tidak langsung dari satu orang ke orang lain. Penelitian ini bertujuan untuk mensintesis senyawa N-fenil-4-bromobenzamida dan melakukan uji aktivitas antibakterinya. Sintesis dilakukan dengan mereaksikan 1,3-difeniltiourea dengan 4-bromobenzoil klorida melalui reaksi substitusi nukleofilik. Pemurnian produk sintesis dilakukan dengan KLT dan struktur diidentifikasi dengan spektrofotometer UV, spektrofotometer IR, spektroskopi ¹H-NMR dan ¹³C-NMR. Uji aktivitas antibakteri dilakukan dengan metode difusi sumuran terhadap *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 dan *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853. Konsentrasi larutan uji yang digunakan yaitu 31,25; 62,5; 125; 250; 500; 1.000; 2.000; 4.000; 8.000; dan 10.000 µg/ml dengan levofloksasin sebagai kontrol positif. Produk sintesis tidak menunjukkan adanya aktivitas yang ditandai dengan tidak adanya zona hambat.

Kata kunci: 1,3-difeniltiourea, N-fenil-4-bromobenzamida, substitusi nukleofilik, aktivitas antibakteri.

Pendahuluan

Infeksi merupakan penyakit menular disebabkan oleh mikroorganisme patogen yang dapat menyebar secara langsung atau tidak langsung dari satu orang ke orang lain [1]. Sampai pada awal abad ke-20, kasus infeksi

masih menjadi masalah kesehatan yang paling serius di dunia bahkan ketika penyakit degeneratif kronis mulai mendominasi di negara maju [2]. Hal yang sama juga terjadi di Indonesia, ditunjukkan dengan data *World Health Organization* (WHO) tahun 2012 yaitu infeksi menjadi penyebab kematian terbesar

kedua (9,5%) setelah stroke yang terbagi atas infeksi saluran pernapasan bawah (5,2%) dan tuberkulosis (4,3%) [3].

Pengembangan agen-agen antibakteri telah banyak dilakukan sebagai upaya dalam mengatasi semakin meningkatnya kasus infeksi, salah satunya adalah benzamida. Inti benzamida dilaporkan berperan penting dalam memberikan aktivitas antibakteri [4], selain itu N-fenilbenzamida juga dilaporkan sebagai agen antibakteri yang poten dan aktif terhadap gram positif maupun gram negatif [5].

N-fenilbenzamida dapat disintesis dengan beberapa rute, salah satunya yaitu melalui jalur langsung reaksi substitusi nukleofilik dengan mereaksikan turunan benzoil klorida dan 1,3-difeniltiourea. Jalur sintesis ini memiliki beberapa kelebihan, selain merupakan rute yang baru, rute ini juga cukup sederhana, terisolasi produk tunggal dan hasil rendemen yang diperoleh tinggi (40-90%) [6].

Penelitian ini dilakukan sintesis N-fenil-4-bromobenzamida melalui reaksi substitusi nukleofilik dan uji aktivitas antibakterinya. Sintesis dilakukan seperti pada penelitian [6] yaitu dengan mereaksikan 1,3-difeniltiourea dengan 4-bromobenzoil klorida. Produk sintesis selanjutnya dilakukan karakterisasi (pengamatan organoleptis dan uji kelarutan), uji kemurnian (kromatografi lapis tipis (KLT) dan penentuan titik lebur), identifikasi struktur senyawa (spektrofotometri UV, spektrofotometri IR, spektroskopi $^1\text{H-NMR}$ dan $^{13}\text{C-NMR}$) serta uji aktivitas antibakteri.

Metode Penelitian

Penelitian dilakukan secara eksperimental laboratorik. Tahapan yang dilakukan pada penelitian ini meliputi sintesis senyawa N-fenil-4-bromobenzamida dan uji aktivitas antibakteri produk sintesis.

Bahan yang digunakan dalam sintesis antara lain: 1,3-difeniltiourea (Merck), 4-bromobenzoil klorida (TCI), tetrahidrofur (THF) (Merck), dan trietilamin (TEA) (Merck), sedangkan pada uji aktivitas antibakteri bahan yang digunakan antara lain: bakteri *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 dan *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, media Mueller Hinton Agar (MHA) (Himedia), DMSO (Merck), antibiotik levofloksasin (PT. Guardian Pharmatama).

Instrumen yang digunakan pada penelitian ini meliputi *electrothermal melting point apparatus* (Stuart SMP 10), spektrofotometer

UV-Vis (HITACHI U-1800), spektrofotometer FTIR (BRUKER ALPHA), spektroskopi $^1\text{H-NMR}$ dan $^{13}\text{C-NMR}$ (Jeol Resonance 400 MHz).

Sintesis senyawa N-fenil-4-bromobenzamida

Sintesis dilakukan dengan mereaksikan 1,3-difeniltiourea (0,01 mol) dengan THF 15 ml dan TEA 1,5 ml (0,01 mol), kemudian 4-bromobenzoil klorida (0,03 mol) dalam THF 10 ml ditambahkan ke dalam campuran tersebut setetes demi setetes sampai habis pada *ice bath*, sambil diaduk menggunakan pengaduk magnetik selama 30 menit. Campuran direfluks selama 5 jam di atas penangas air pada suhu 67°C , selanjutnya campuran dicuci dengan larutan natrium bikarbonat jenuh dan akuadestilata sebanyak tiga kali, kemudian disaring dengan corong buchner.

Pemurnian hasil sintesis dilakukan dengan metode rekristalisasi menggunakan etanol panas. Residu pada kertas saring dipindahkan ke dalam gelas beker, kemudian ditambahkan etanol secukupnya dan diletakkan di atas pemanas dengan pengaduk magnetik, suhu diatur $70-80^\circ\text{C}$ dan diaduk perlahan, pelarut ditambahkan sedikit demi sedikit sampai tepat larut. Larutan kemudian disaring dalam keadaan panas dan filtrat didinginkan pada *ice bath*. Kristal yang terbentuk disaring dengan corong buchner, dicuci dengan etanol:air (1:1) sebanyak tiga kali. Kristal dipindahkan ke dalam cawan petri yang telah diketahui beratnya, dikeringkan dalam oven pada suhu 50°C hingga beratnya tetap, selanjutnya ditimbang untuk mengetahui rendemen hasil sintesis [6]. Produk sintesis yang dihasilkan selanjutnya diuji kemurnian dengan KLT dan penentuan titik lebur, karakterisasi yang meliputi pengamatan organoleptis dan uji kelarutan, serta identifikasi struktur dengan spektrofotometri UV, spektrofotometri IR, spektroskopi $^1\text{H-NMR}$ dan $^{13}\text{C-NMR}$.

Uji aktivitas antibakteri senyawa N-fenil-4-bromobenzamida

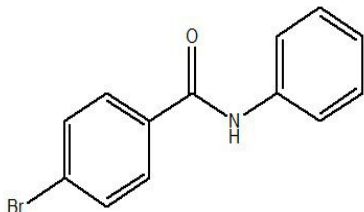
Uji aktivitas antibakteri senyawa N-fenil-4-bromobenzamida dilakukan secara *in vitro* dengan metode difusi sumuran terhadap bakteri gram positif *S. aureus* ATCC 6538 dan gram negatif *P. aeruginosa* ATCC 27853. Konsentrasi larutan uji yang digunakan ialah 31,25; 62,5; 125; 250; 500; 1.000; 2.000; 4.000; 8.000; dan 10.000 $\mu\text{g/ml}$ dengan media uji MHA. Kontrol positif dan negatif yang digunakan adalah antibiotik levofloksasin 10 $\mu\text{g/ml}$ dan DMSO.

Hasil Penelitian

Sintesis senyawa N-fenil-4-bromobenzamida

Senyawa target yang disintesis pada penelitian ini adalah N-fenil-4-bromobenzamida. Hasil sintesis, karakterisasi, uji kemurnian dan identifikasi struktur adalah sebagai berikut: kristal putih (2,150 g, 78%); waktu reaksi 5 jam; titik lebur 195-197°C; Rf= 0,54 (heksana: kloroform= 1:2), Rf= 0,80 (heksana: kloroform: etil asetat= 4:2:1), Rf= 0,74 (heksana: kloroform: aseton= 4:1:1); UV-Vis (aseton): λ maks 328,2 nm; FTIR, ν (cm^{-1}): 3348,49 (N-H ulur), 3093,17 (C-H aromatik), 1654,91 (C=O amida), 1485,59 (N-H tekuk), 1586,29 dan 1440,80 (C=C aromatik), 1323,34 (C-N), 1070,83 (C-Br aril bromida); $^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, aseton- d_6) δ (ppm): 7,09 (t, 1H, $J = 7,1$ Hz, H aromatis), 7,32 (t, 2H, $J = 7,3$ Hz, H aromatis), 7,68 (d, 2H, $J = 7,7$ Hz, H aromatis), 7,80 (d, 2H, $J = 7,8$ Hz, H aromatis), 7,91 (d, 2H, $J = 7,9$ Hz, H aromatis), 9,55 (s, 1H, N-H); $^{13}\text{C-NMR}$ (400 MHz, aseton- d_6) δ (ppm): 120,23 (C aromatik), 123,90 (C aromatik), 125,54 (C aromatik), 128,69 (C aromatik), 129,52 (C aromatik), 131,59 (C aromatik), 134,61 (C aromatik), 139,32 (C aromatik), 164,49 (C=O amida).

Berdasarkan hasil spektra pada identifikasi struktur, dapat dinyatakan bahwa produk sintesis merupakan senyawa target yang diharapkan yaitu N-fenil-4-bromobenzamida (Gambar 1). Uji kelarutan dilakukan pada beberapa macam pelarut antara lain: akuadestilata, aseton p.a, DMSO p.a, etanol p.a, etil asetat p.a, kloroform p.a, metanol p.a, dan heksana p.a. Hasil uji kelarutan ditunjukkan pada Tabel 1.



Gambar 1. Senyawa N-fenil-4-bromobenzamida

Uji aktivitas antibakteri senyawa N-fenil-4-bromobenzamida

Uji aktivitas antibakteri senyawa N-fenil-4-bromobenzamida tidak menunjukkan adanya zona hambat terhadap bakteri *S. aureus* ATCC 6538 dan *P. aeruginosa* ATCC 27853, sedangkan pada kontrol positif menunjukkan zona hambat (Tabel 2).

Tabel 1 Kelarutan produk sintesis dalam beberapa pelarut

Pelarut	Kelarutan	Keterangan
Akuadestilata	Praktis tidak larut	1 : >10.000
Aseton p.a	Agak sukar larut	1 : 100
DMSO p.a	Agak sukar larut	1 : 50
Etil Asetat p.a	Agak sukar larut	1 : 100
Etanol p.a	Sukar larut	1 : 500
Kloroform p.a	Sukar larut	1 : 350
Metanol p.a	Sukar larut	1 : 150
Heksana p.a	Sukar larut	1 : 1000

Tabel 2 Zona hambat kontrol positif

Replikasi	Zona hambat pada konsentrasi 10 $\mu\text{g/ml}$ (mm)	
	<i>S. aureus</i>	<i>P. aeruginosa</i>
1	19	5
2	20	5
3	18	4
Rata-rata	19	4,7

Pembahasan

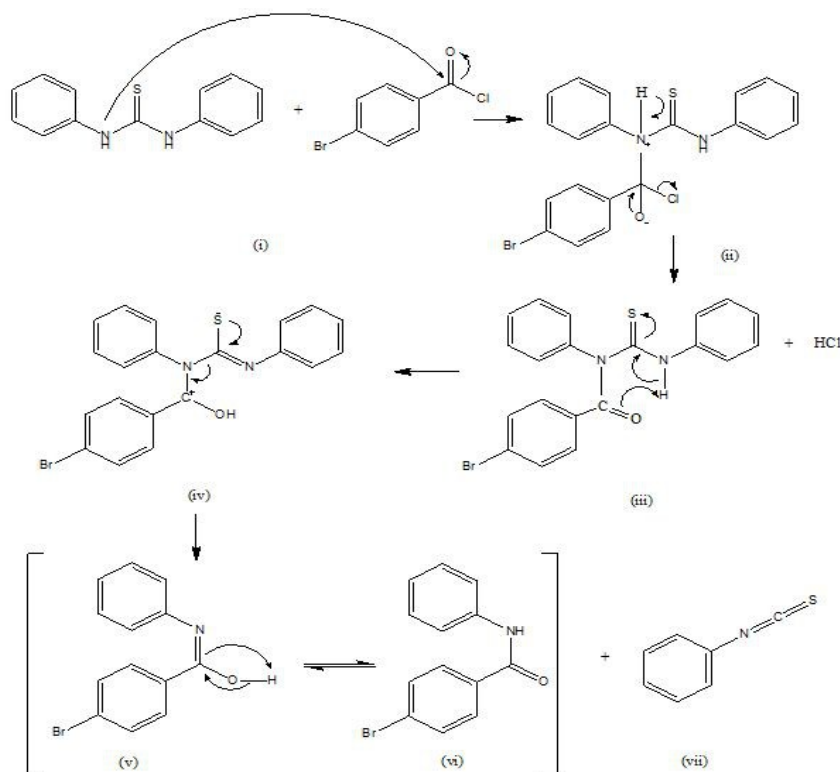
Reaksi substitusi nukleofilik ($\text{S}_{\text{N}}2$) antara senyawa 1,3-difeniltiourea dan 4-bromobenzoil klorida menyebabkan masuknya satu gugus amina dari 1,3-difeniltiourea yang bertindak sebagai nukleofil menyerang karbokation gugus karbonil pada 4-bromobenzoil klorida (i). Sterik yang meruah dari struktur 1,3-difeniltiourea menghalangi serangan gugus nukleofilik N terhadap gugus karbonil benzoil sehingga hanya satu amina yang tersubstitusi pada gugus benzoil sehingga akan diperoleh struktur (iii) yang menggambarkan dekatnya jarak antara karbonil dengan proton dari amina yang tidak beraksi dengan gugus benzoil. Dekatnya jarak ini memungkinkan elektron ikatan O karbonil untuk mengambil proton dari amina tersebut, sehingga terjadi penataulangan yang menghasilkan tautomer imino alkohol-amida (v, vi) dan terlepasnya fenil isotiosianat (vii). Secara umum, imino alkohol memiliki sifat kurang stabil dibanding tautomer amidanya, sehingga dari hasil sintesis diperoleh bentuk tautomer amida (vi). N-fenil-4-bromobenzamida (vi) menjadi hasil sintesis yang berbentuk padatan kristal, sedangkan fenil isotiosianat (vii) tidak dapat diisolasi karena bersifat tidak stabil dan mudah larut dalam etanol [6]. Mekanisme reaksi sintesis senyawa N-fenil-4-bromobenzamida ditunjukkan pada Gambar 2.

Produk sintesis tidak menunjukkan adanya aktivitas pada uji aktivitas antibakteri, ditandai dengan tidak adanya zona hambat

bahkan ketika konsentrasi uji telah ditingkatkan hingga 10.000 µg/ml. Beberapa faktor yang dapat mempengaruhi hasil uji aktivitas antibakteri, di antaranya: pH media, bakteri, yang meliputi jumlah inokulum dan kemampuan bakteri tumbuh [7], serta faktor dari senyawa uji [8]. Faktor eror akibat media telah diminimalisir dengan penggunaan media MHA yang telah memenuhi persyaratan pH yaitu 7,2 [9], begitu pula dengan faktor jumlah inokulum bakteri yang telah dibandingkan dengan standar Mc Farland 0,5 serta bakteri mampu tumbuh ditandai dengan berubahnya warna agar menjadi keruh setelah proses inkubasi selama 24 jam pada suhu 37±1°C. Faktor eror yang memungkinkan tidak munculnya aktivitas produk sintesis adalah dari faktor senyawa uji.

Parameter yang mempengaruhi hubungan struktur dan aktivitas biologis di antaranya: parameter lipofilik (log P, π), parameter elektronik (σ), dan parameter sterik (E_s) [10]. Produk sintesis pada penelitian ini tersubstitusi gugus bromo pada posisi para. Menurut [11], nilai tetapan substituen 4-Br pada substitusi aromatik yaitu $\pi=1,19$; $\sigma= 0,23$; dan $E_s= 0,08$. Penelitian sebelumnya [12] yang juga melakukan penelitian serupa yaitu sintesis dan

uji aktivitas antibakteri dengan metode difusi pada turunan benzamida (N-fenil-4-nitrobenzamida), produk sintesisnya memberikan aktivitas antibakteri pada *S. aureus* maupun *P. aeruginosa*. Nilai tetapan substituen 4-NO₂ pada substitusi aromatik yaitu $\pi= 0,24$; $\sigma= 0,78$; dan $E_s= -1,28$ [11]. Perbedaan nilai yang cukup signifikan pada ketiga parameter ini menjadi penyebab tidak munculnya aktivitas antibakteri pada produk sintesis dalam penelitian ini. Produk sintesis pada penelitian ini bersifat lebih lipofilik (C log P prediksi (*software* Chemdraw Ultra 8.0 versi trial) = 3,71) jika dibandingkan dengan produk sintesis pada penelitian [12] (C log P prediksi = 2,83) sehingga menyebabkan senyawa uji tidak mudah berdifusi melalui agar karena lebih non polar. Metode difusi agar tidak sesuai untuk senyawa-senyawa yang non polar [8]. Parameter lain seperti nilai elektronik yang rendah pada gugus substituen produk sintesis (0,23) dan pengaruh sterik gugus substituen yang lebih besar (0,08) juga menjadi faktor yang menyebabkan tidak terjadinya ikatan antara produk sintesis dengan reseptor bakteri sehingga membuat senyawa tidak menimbulkan aktivitas biologis.



Gambar 2 Mekanisme reaksi sintesis senyawa N-fenil-4-bromobenzamida [6]

Simpulan dan Saran

Senyawa N-fenil-4-bromobenzamida dapat disintesis melalui reaksi S_N2 antara 1,3-difeniltiourea dengan 4-bromobenzoil klorida ditunjukkan dengan spektra UV, IR, 1H -NMR, dan ^{13}C -NMR yang dihasilkan. Produk sintesis berupa kristal putih yang murni dengan rendemen sebesar 78%. Senyawa N-fenil-4-bromobenzamida tidak menunjukkan aktivitas antibakteri terhadap *S. aureus* ATCC 6538 dan *P. aeruginosa* ATCC 27853 yang ditunjukkan dengan tidak adanya zona hambat pada rentang konsentrasi 31,25 hingga 10.000 μ g/ml.

Perlu dilakukan modifikasi struktur yang lain terhadap produk sintesis sehingga dapat dihasilkan senyawa turunan sebagai agen antibakteri yang poten.

Daftar Pustaka

- [1] World Health Organization [internet]. [Geneva]: World Health Organization; 2016 [cited 2016 August 3]. Available from :http://www.who.int/topics/infectious_diseases/en/
- [2] Barreto ML, Teixeira MG, Carmo EH. Infectious diseases epidemiology. J Epidemiol Commun H. 2006; 60: 192-195.
- [3] World Health Organization [internet]. [Geneva]: World Health Organization; 2015 [cited 2016 August 3]. Available from : <http://www.who.int/gho/countries/idn.pdf?ua=1>
- [4] Rai D, Singh RK. Synthesis and antibacterial activity of benzamides and sulfonamide derived from 2-amino-5-bromo/nitropyridine against bacterial strains isolated from clinical patients. Indian J Chem. 2011; 50: 931-936.
- [5] Pasha FA, Muddassar M, Lee C, Cho SJ. Mechanism based QSAR studies of N-phenylbenzamides as antimicrobial agents. Environ Toxicol Pharmacol. 2008; 26: 128-135.
- [6] Sary IP, Siswandono, Budiati T. N-phenylbenzamide synthesis by nucleophilic substitution with 1,3-diphenylthiourea. Int J Pharm Pharm Sci. 2015; 7(3): 481-482.
- [7] British Society for Antimicrobial Chemotherapy. BSAC methods for antimicrobial susceptibility testing. Manchester: Ms Phillipa J Burns; 2013.
- [8] Cos P, Vlietinck AJ, Berghe DV, Maes L. Anti-infective potential of natural product: how to develop a stronger in vitro 'proof-of-concept'. J Ethnopharmacol. 2006; 106: 290-302.
- [9] Aryal S. Online microbiology notes [internet]. [Nepal]: Online microbiology notes ; 2015 [updated: 2016 Oct 11]. Available from: <http://www.microbiologyinfo.com/mueller-hinton-agar-mha-composition-principle-uses-and-preparation/>
- [10] Siswandono, Soekardjo B. Kimia medisinal. Surabaya: Airlangga University Press; 2000.
- [11] Topliss JG. Utilization of operational schemes for analog synthesis in drug design. J. Med Chem. 1972; 15(10): 1006-1011.
- [12] Krishna SM, Padmalatha Y, Ravindranath LK, Chandrakala S. Synthesis characterization and biological evaluation of 4-nitro-N-phenylbenzamide and (4-nitrophenyl) (piperidin-1-yl) methanone. Int. J. Chem Pharm Sci. 2015; 3(1): 1471-1475.