

SINTESIS DAN UJI AKTIVITAS ANTIMIKROBA PRODUK IMINA MELALUI REAKSI 7-ACA DAN VANILIN DENGAN VARIASI PELARUT

M. Kuswandi¹, Broto Santoso^{2*}, Anik Rahmawati²

¹Fakultas Farmasi, Universitas Gadjah Mada, Sekip Utara Yogyakarta

²Fakultas Farmasi, Universitas Muhammadiyah Surakarta, Jl A Yani Tromol Pos I,
Pabelan Kartasura

*Email: Broto.Santoso@ums.ac.id

Abstrak

Dewasa ini, kasus resistensi antibiotik menjadi masalah klinik yang serius di se seluruh penjuru dunia. Hal ini dikarenakan penyalahgunaan antibiotik pada bidang pertanian, peternakan, perikanan dan terapi yang irrasional di unit-unit pelayanan kesehatan. Selain itu, penelitian mengenai antibiotik baru tidak menunjukkan peningkatan yang berarti. Percobaan dilakukan dengan mensintesis senyawa imina dari 7-ACA dan vanilin dengan berbagai pelarut untuk mendapatkan rendemen terbanyak. Pelarut yang digunakan adalah DMSO, etanol dan air. Produk juga diuji aktivitas antibakterinya terhadap *S. aureus* menggunakan metode sumuran Kirby Bauer dan profil kromatogramnya menggunakan KLT dengan fase gerak etil asetat dan asetonitril (7:3). Kromatogram menunjukkan bercak baru dengan *R_f* 0,750 dan 0,778; berbeda dengan *R_f starting material*. Nilai titik lebur juga memberikan hasil yang berbeda dibandingkan dengan 7-ACA dan vanilin. Zona hambat bakteri produk lebih baik dibandingkan dengan starting material tetapi masih di bawah nilai dari ceftriaxone.

Kata Kunci: 7-ACA, vanilin, sintesis, aktivitas antimikroba, imina, *Staphylococcus aureus*

I. PENDAHULUAN

Resistensi antibiotik adalah masalah global yang serius di setiap negara. *Center for Disease Control and Prevention of United State of America* (CDCP USA) atau Pusat Kontrol dan Pencegahan Penyakit Amerika menyatakan paling sedikitnya 2 juta orang terkena infeksi serius karena bakteri setiap tahun dengan satu atau lebih mengalami resistensi terhadap antibiotik yang diberikan untuk pengobatan infeksi. Di Amerika Serikat terdapat sedikitnya 23.000 orang mati setiap tahun sebagai hasil langsung infeksi yang mengalami resistensi antibiotik. Chinedum (2005) menyatakan terdapat beberapa pencetus terjadinya resistensi antibiotik antara lain tuntutan pasien, penulis resep, promosi antibiotik, pemberian antibiotik oleh dokter, dan penggunaan antibiotik

*Prosiding Seminar Nasional Current Challenges in Drug Use and Development
Tantangan Terkini Perkembangan Obat dan Aplikasi Klinis*

untuk pertanian. Badan CDC-P USA (2013) menyatakan lebih dari 50% antibiotik yang diresepkan tidak diperlukan atau kurang efektif. Di sisi lain antibiotik juga digunakan untuk hewan ternak sebagai pencegahan, kontrol, dan pengobatan penyakit dan digunakan untuk meningkatkan perkembangbiakan dan produksi hewan ternak. Penggunaan ini juga merupakan salah satu pemicu terjadinya resistensi antibiotik. Mereka menyatakan pula bahwa terdapat 4 kunci pengatasan resistensi antibiotik salah satunya adalah penemuan antibiotik baru.

Senyawa 7-ACA merupakan *intermedietstarting material* untuk pengembangan semisintesis turunan sefalosporin. Telah dilakukan banyak penelitian sintesis antimikrobia dengan modifikasi cincin nomor tujuh pada struktur 7-ACA yang telah terbukti dapat meningkatkan aktivitas antimikrobia senyawa tersebut (Siddarth, 2005). Penelitian ini dilakukan untuk sintesis senyawa imina dari 7-ACA yang telah dimodifikasi pada cincin sephem C7 dengan vanilin menggunakan metode sintesis Schiff base yang telah dilakukan Bonsignore *et al.* (1998) yang potensial sebagai antibiotik baru dengan katalis asam dan variasi pelarut. Vanilin merupakan salah satu senyawa fenolik dengan gugus aldehid yang mempunyai aktivitas antioksidan dan antimikroba yang potensial digunakan sebagai bahan pengawet (Burri *et al.*, 1989; Davidson and Naidu, 2000) *cit.* (Walton *et al.*, 2003). Dengan penggabungan dua molekul dengan farmakopor yang berbeda ini diharapkan dapat meningkatkan aktivitasnya. Satu molekul yang mempunyai lebih dari satu farmakopor akan memiliki sisi aktif yang berbeda sehingga aktivitasnya dapat meningkat.

Penelitian ini menggunakan variasi jenis pelarut untuk mengetahui pelarut terbaik yang dapat digunakan untuk mensintesis senyawa imina baru. Pembentukan senyawa imina (Schiff base) merupakan reaksi yang tergantung pada pH. Oleh karenanya selama proses reaksi, pelarut yang digunakan harus dapat melarutkan reaktan serta diperlukan pula pelarut yang dapat menjaga pH optimum (sekitar pH 3-4) (Fessenden and Fessenden, 1986). Hasil produk yang dihasilkan kemudian dilakukan uji aktivitas antibakteri pada *S. aureus* menggunakan metode difusi sumuran Kirby-Bauer.

II. METODE PENELITIAN

A. Bahan

Penelitian telah dilakukan dengan menggunakan vanillin (Merck), 7-ACA (Sigma Aldrich), HCl 2N (Merck), etanol (Merck), DMSO pro analysis (Merck), asetonitril pro analysis (Merck), etil asetat pro analysis (Merck), Silica GF 254 (Merck), *Staphilococcus aureus* ATCC (Fakultas Kedokteran UNS Surakarta), ceftriaxone (Hexpram Jaya), MH (Mueller Hinton) agar media, BHI (Brain Heart Infusion) media dan larutan saline steril. Melting points (Electrothermal) tester, FTIR KBr Disc (PRESTIGE-21 Shimadzu), Silica Gel Plate GF 254 (E.Merck), Lamp UV 254 nm, inkubator (Memmert), Laminar Air Flow (LAF) (CV. Srikandi Laboratory), inkubator shaker (New Brunswick Scientific), autoclave (My Life) dan oven (Memmert) juga telah digunakan sebagai pendukung.

B. Prosedur sintesis senyawa imina

Sebanyak kurang lebih 30,0 mg 7-ACA (1 mmol) dilarutkan dengan pelarut yaitu DMSO *pro analysis*, etanol 96% *pro analysis*, dan air kemudian digojog menggunakan *vortex* selama 10 menit kemudian ditambah HCl 2N (pH 3). Campuran tersebut diaduk menggunakan *magnetic stirrer* pada suhu ruang kemudian ditambahkan kurang lebih 18,0 mg vanilin (1 mmol) yang telah dilarutkan dengan variasi pelarut DMSO *pro analysis*, etanol 96% *pro analysis*, dan air secara perlahan-lahan. Kemudian dilanjutkan diaduk dengan suhu 50°C selama 24 jam. Hasil produk kemudian diletakkan pada cawan porselen dan didiamkan dalam lemari asam selama 2 hari (evaporasi) kemudian dipindahkan pada cawan petri lainnya dan dikeringkan dalam eksikator selama 3 hari. Produk dianalisis secara KLT menggunakan fase gerak etil asetat-asetonitril (7:3) dan asetonitril-heksan (7:3) (Bonsignore *et al.*, 1998).

C. Uji Antibakteri

Uji aktivitas antibakteri yang dilakukan menggunakan metode difusi sumuran Kirby-Bauer. Sebanyak 3-5 koloni *S. aureus* diambil menggunakan ose steril dari kultur kemudian dimasukkan ke dalam 5 mL BHI steril dan ditempatkan dalam *incubator shaker* selama 2 jam. Hasil suspensi bakteri dilakukan standarisasi kekeruhan dengan standart McFarland 0,5 (10^8 CFU/mL) menggunakan larutan salin steril. Sebanyak 100 μ L suspensi diambil bakteri *S. aureus* menggunakan mikropipet dan dituangkan pada media MH padat kemudian diratakan dengan *spreader glass* steril dan ditunggu sampai

*Prosiding Seminar Nasional Current Challenges in Drug Use and Development
Tantangan Terkini Perkembangan Obat dan Aplikasi Klinis*

15 menit atau sampai bakteri terserap. Setelah bakteri terserap dibuat sumuran dengan menggunakan *cork borer* 10 mm pada media MH yang telah diinokulasi dengan bakteri. Tiga koma tujuh lima (3,75) µg produk, ceftriaakson, 7-ACA, dan vanilin ditimbang seksama kemudian dilarutkan dengan DMSO sampai 1 mL. Sebanyak 100 µL produk, ceftriaakson, 7-ACA, vanilin dan DMSO (konsentrasi 0,0375%) dimasukkan ke dalam sumuran pada media MH yang telah diinokulasi dengan bakteri dan diinkubasi dengan suhu 37°C selama 24 jam. Zona hambatan yang terbentuk diukur dari masing-masing sumuran.

III. HASIL DAN PEMBAHASAN

Mekanisme reaksi terbentuknya senyawa imina adalah melalui reaksi adisi eliminasi dalam suasana asam. Kelarutan merupakan faktor penting dalam sintesis senyawa organik. Dalam kondisi terlarut, *starting material* akan mudah bertumbukan antar partikel sehingga dapat bereaksi secara optimal. Kelarutan *starting material* yang baik dapat meningkatkan kecepatan reaksi kimia dalam sintesis. Dalam penelitian ini, sintesis senyawa imina ini digunakan variasi jenis pelarut yaitu DMSO, etanol, dan air. Hasil sintesis diperoleh rendemen *crude* dengan pelarut DMSO, etanol dan air secara berurutan adalah 100, 100 dan 93% dengan titik lebur 195-265°C, 161-177°C dan 204-238°C. Ketiga produk menghasilkan titik lebur yang berbeda dengan titik lebur *starting material* yaitu 7-ACA (lebih dari 300°C) dan vanilin (81-83°C) sehingga diduga produk menghasilkan senyawa baru (Tabel 1).

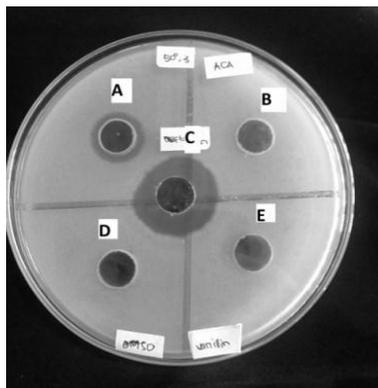
Tabel 1. Hasil sintesis dalam beberapa pelarut DMSO, etanol dan air

Pelarut	Warna	Melting point	Crude Yield
DMSO	Coklat	195-265 °C	100%
Etanol	Coklat	161-177°C	100%
Air	Putih	204-238 °C	93%

Produk akhir dianalisis menggunakan KLT fase normal dengan asetonitril-heksan (7:3) sebagai fase gerak. Produk dengan pelarut DMSO menunjukkan adanya spot yang berbeda (*Rf* 0,750) dengan spot 7-ACA dan vanilin sehingga diindikasikan terbentuk senyawa baru yang diduga merupakan senyawa target. Sedangkan hasil produk dengan pelarut etanol dan produk dengan pelarut air terbentuk spot dengan nilai *Rf* 0,625 yang sama dengan spot 7-ACA sehingga diduga tidak terbentuk senyawa baru.

Produk dianalisis menggunakan spektroskopi IR untuk mengetahui gugus fungsional dalam senyawa. Hasil spektra IR produk pelarut DMSO dibandingkan dengan spektra IR secara teori dengan 7-ACA dan vanilin. Hasil spektra IR menunjukkan puncak-puncak (cm^{-1}): 1026,13; 1126,43 dan 1234,44 (C-N); 1381,03(C-H); 1527,62 (N-O); 1735,93 (C=O); 1805,37 (C=O); 2623,19; 2684,91; dan 2808,36(H-C=O); 2893,22 dan 2939,5 (C-H); 3008,95 dan 3132,4 (C-H); dan 3425,58(OH). Bilangan gelombang 3425,58 cm^{-1} diindikasikan merupakan puncak dari gugus fungsional hidroksil (OH) yang terdapat pada senyawa karboksil 7-ACA dan fenolik vanilin. Spektra IR menunjukkan pada bilangan gelombang 3400-3200 cm^{-1} tidak terdapat puncak. Hal ini menunjukkan bahwa gugus amina primer dari 7-ACA telah tersubstitusi menjadi amina tersier. Berdasarkan hasil spektra IR dapat diprediksi bahwa sintesis yang dilakukan berhasil menghasilkan senyawa target.

Hasil uji aktivitas antimikroba menunjukkan bahwa produk dengan pelarut DMSO memiliki zona hambat 15 mm. Hasil uji aktivitas ini jika dibandingkan dengan ceftriakson, DMSO, vanilin dan 7-ACA berurutan adalah 24 mm, 10 mm, 10 mm dan 10 mm. Senyawa 7-ACA merupakan *intermediet* yang disintesis dari sefalosporin C yang memiliki cincin beta laktam sehingga memiliki aktivitas antimikroba dan vanilin yang merupakan bahan pengawet juga memiliki aktivitas antimikroba namun pada percobaan ini dengan konsentrasi 0,0375%, kedua senyawa ini tidak menunjukkan adanya aktivitas antimikroba. Sedangkan produk imina (Gambar 2) menunjukkan zona hambat yang lebih besar daripada 7-ACA dan vanilin namun masih kurang dari ceftriakson. Oleh karena itu aktivitas antimikroba produk dengan pelarut 7-ACA lebih baik daripada 7-ACA dan vanilin namun masih kurang dari ceftriakson. Hal tersebut menunjukkan dengan adanya penggabungan dua molekul senyawa yang memiliki aktivitas sama namun memiliki sisi aktif (farmakofor) yang berbeda dapat meningkatkan aktivitasnya.



Gambar 2. Hasil pengujian aktivitas antibakteri untuk konsentrasi 0,0375% dari produk (A), 7-ACA (B), ceftriaxone (C), DMSO (D), and vanilin (E) menggunakan bakteri *S. aureus*.

IV. KESIMPULAN

Dimetilsulfoksida merupakan pelarut yang direkomendasikan untuk sintesis senyawa imina. Senyawa 3-[(asetiloksi)metil]-7-[(Z)-[(4-hidroksi-3-metoksifenil)metilidene] amino]-8-okso-5-tia-1-azabi-siklo-[4.2.0]ok-2-en-2-karboksilat memiliki potensi sebagai antibiotik baru.

DAFTAR PUSTAKA

- Bonsignore, L., Cottiglia, F., Elkhaili, H., Jehl, F., Lavagna, S. M., Loy, G., Manna, F., Monteil, H., Pompei, D., and Secci, D., 1998, Synthesis and Antimicrobial Activity of Coumarin 7-substituted Cephalosporins and Sulfones, *Il Farmaco*, 53(6): 425–430
- Center of Disease Control and Prevention (CDC-P), 2013, Antibiotic Resistance Threats in the United States, USA
- Chinedum, I. E., 2005, Microbial Resistance to Antibiotics, *African Journal of Biotechnology*, 4(13): 1606-1611
- Fessenden, R. J. and Fessenden, J. S., 1986, *Kimia Organik Jilid II Edisi Ketiga*, diterjemahkan oleh Aloysius Hadyana Pudjaatmaka, Jakarta: Penerbit Erlangga
- Siddharth, O. F., 2005, Design, Synthesis and Antimicrobial Evaluation of Amino acid and Peptide Dervatives of 7-Aminocephalosporanic Acid, *Thesis*, Pharmaceutical Chemistry, Rajiv Gandhi University of Health Sciences
- Walton, N. J., Mayer, M. J., and Narbad, A., 2003, Vanillin. *Phytochemistry*, 63(5): 505–515