

## *Sintesis dan Uji Aktivitas Antibakteri Senyawa N-fenil-4-klorobenzamida (Synthesis and Antibacterial Activity Assay of N-phenyl-4-chlorobenzamide)*

Elok Dea Orens Ubung Wisnu, Indah Purnama Sary, Dwi Koko Pratoko  
Fakultas Farmasi Universitas Jember  
Jln. Kalimantan 37, Jember 68121  
e-mail korespondensi: indahpurnamasary.farmasi@unej.ac.id

### **Abstract**

*N-phenylbenzamide is benzamide derivatives, which is potential as an antibacterial agent. N-phenyl-4-chlorobenzamide is N-phenylbenzamide derivative that substituted by chloro to the para position and it was expected to enhance the antibacterial activity. N-phenyl-4-chlorobenzamide was synthesized by reacting 1,3-diphenylthiourea and 4-chlorobenzoil chloride. This compound has been purified and provided 53% of product with crystal shape, white color, and melting point of 195-197 °C. The purification of this compound was confirmed by TLC and the structure was identified by <sup>1</sup>H-NMR, <sup>13</sup>C-NMR, and FTIR spectroscopy. This compound was tested for its activity against gram positive bacteria *Staphylococcus aureus* and gram negative bacteria *Pseudomonas aeruginosa*, evaluated by well diffusion method and the result showed no activity against both *Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas aeruginosa*.*

**Keywords:** *N-phenyl-4-chlorobenzamide, synthesis, antibacterial activity*

### **Abstrak**

*N-fenilbenzamida merupakan satu turunan benzamida yang berpotensi sebagai agen antibakteri. N-fenil-4-klorobenzamida merupakan senyawa N-fenilbenzamida yang tersubstitusi gugus kloro pada posisi para dan diharapkan dapat meningkatkan aktivitas antibakterinya. N-fenil-4-klorobenzamida disintesis dengan merekasikan 1,3-difeniltiourea dan 4-klorobenzoil klorida. Senyawa ini dimurnikan dan memberikan rendemen produk 53% dan menunjukkan bentuk kristal, berwarna putih dan titik lebur 195-197 °C. Kemurnian senyawa diuji dengan KLT dan struktur senyawa ini dikonfirmasi dengan spektroskopi <sup>1</sup>H-NMR, <sup>13</sup>C-NMR dan FTIR. Senyawa dievaluasi aktivitasnya terhadap bakteri gram positif *Staphylococcus aureus* dan bakteri gram negatif *Pseudomonas aeruginosa* dengan metode difusi sumuran. Hasil tidak menunjukkan adanya aktivitas hambatan terhadap *Staphylococcus aureus* dan *Pseudomonas aeruginosa*.*

**Kata kunci:** *N-fenil-4-klorobenzamida, sintesis, aktivitas antibakteri*

### **Pendahuluan**

Infeksi adalah salah satu jenis penyakit yang dapat menular dan dapat disebabkan oleh mikroorganisme patogenik, seperti jamur, bakteri, virus [1]. Terapi bagi infeksi kerap dilakukan penggunaan antibiotik di antaranya adalah golongan penisilin, sefalosporin, karbapenem, beta laktam, kuinolon, tetrasiklin, aminoglikosida, makrolida, klindamisin, fusidat, sulfonamida, glikopeptida [2]. Penelitian

terhadap pengembangan antibiotik terus dilakukan dan diharapkan dapat ditemukan senyawa yang efektif melawan bakteri resisten-antibiotik, salah satunya dengan metode sintesis. Menurut Vogel [3], proses sintesis merupakan reaksi kimia yang ditujukan untuk menghasilkan sebuah produk ataupun beberapa produk.

Penelitian terhadap turunan benzamida yaitu *N-fenilbenzamida*, sebelumnya telah dilakukan oleh [4-7] dan menunjukkan senyawa

terbukti memiliki aktivitas antibakteri. Menurut skema Topliss menggunakan senyawa analog 4-kloro, akan meningkatkan sifat sterik senyawa, sehingga dapat meningkatkan afinitas senyawa terhadap reseptor [8].

Tujuan penelitian adalah mengetahui apakah N-fenil-4-klorobenzamida dapat sintesis dari senyawa 1,3-difeniltiourea dan turunan benzoil klorida yaitu 4-klorobenzoil klorida yang kemudian akan dilakukan karakterisasi senyawa, penentuan struktur dan uji aktivitas antibakterinya.

## Metode Penelitian

Sintesis senyawa N-fenil-4-klorobenzamida dilakukan dengan mereaksikan 0,01 mol 1,3-difeniltiourea dengan 0,01 mol 4-klorobenzoil klorida. Mekanisme reaksi pembentukan N-fenil-4-klorobenzamida melibatkan reaksi substitusi  $S_N2$ . Optimasi waktu sintesis dilakukan dengan mengambil cuplikan secara sampling dengan menotolkan pada lempeng KLT dan dibandingkan dengan bahan awal 1,3-difeniltiourea dan 4-klorobenzoil klorida yang dieluasi dengan eluen heksana:kloroform (1:2). Rekrystalisasi dilakukan produk dilakukan dengan campuran etanol-air (1:1) panas. Kristal yang terbentuk kemudian dihitung berat rendemennya [9].

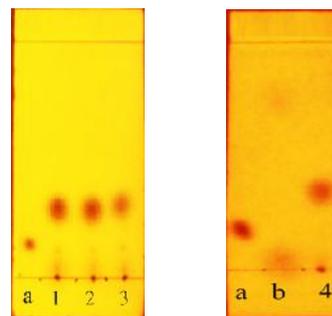
Karakterisasi senyawa N-fenil-4-klorobenzamida meliputi organoleptis(warna dan bentuk), titik lebur dan kelarutan (di dalam aseton p.a, metanol p.a, kloroform p.a, heksana p.a, etil asetat p.a, etanol p.a, DMSO p.a, dan aquadest). Konfirmasi struktur menggunakan  $^1H$ -NMR,  $^{13}C$ -NMR, FTIR, dan mengecek spektrum UV untuk memastikan senyawa hasil sintesis yang didapatkan merupakan senyawa N-fenil-4-klorobenzamida

Uji aktivitas antibakteri dilakukan terhadap bakteri gram positif *S. aureus* dan bakteri gram negatif *P. aeruginosa* menggunakan metode sumuran dengan media agar *Mueller Hinton* (MH). Konsentrasi uji yang digunakan adalah 31,5; 62,5; 125; 250 dan 500  $\mu g/ml$ . Kontrol positif yang digunakan yaitu siprofloksasin dengan rentang konsentrasi yang sama seperti larutan uji dan DMSO sebagai kontrol negatif.

## Hasil Penelitian

Hasil optimasi waktu sintesis dan dieluasi dengan menggunakan eluen heksana:kloroform = 1:2. Lempeng yang sudah dieluasi kemudian

diamati di bawah sinar UV seperti pada Gambar 1.



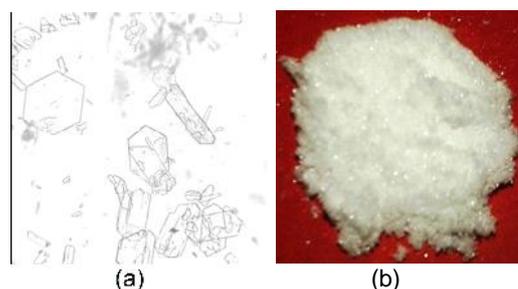
Gambar 1. Hasil eluasi cuplikan sintesis pada jam ke 1-4

Keterangan:

- a = senyawa asal 1,3-difeniltiourea
- b = senyawa 4-klorobenzoil klorida
- 1-4 =culipkan pada jam ke-1 sampai jam ke-4

## Karakterisasi senyawa

Organoleptis senyawa hasil sintesis diamati secara visual dan menggunakan mikroskop. Organoleptis senyawa hasil sintesis dapat dilihat pada Gambar 2.



Gambar 2. Hasil organoleptis senyawa hasil sintesis

Keterangan: (a) senyawa hasil sintesis pada perbesaran mikroskop 500x, (b) senyawa hasil sintesis organoleptis secara visual

Kelarutan senyawa hasil sintesis dapat dilihat pada Tabel 1. Uji kemurnian senyawa dilakukan dengan memeriksa titik lebur dan KLT. Hasil uji titik lebur dapat dilihat pada Tabel 2 dan uji KLT dapat dilihat pada Gambar 3 dan Rf nya pada Tabel 3.

## Konfirmasi Struktur

Senyawa hasil sintesis dikonfirmasi dengan spektroskopi FTIR. Hasil konfirmasi struktur menggunakan FTIR dapat dilihat pada Tabel 4. Konfirmasi dengan menggunakan  $^{13}C$ -

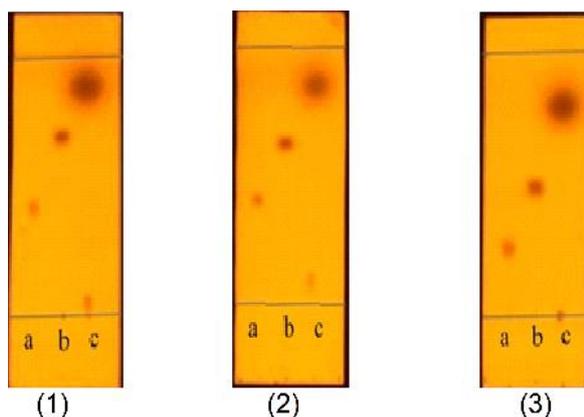
NMR, menggunakan pelarut aseton- $d_6$  dengan standar internal TMS (tetrametilsilana). Spektrum senyawa target dapat dilihat pada Gambar 5 dan interpretasi spektrum  $^{13}C$ -NMR dapat dilihat pada Tabel 6.

Tabel 1. Hasil uji kelarutan senyawa hasil sintesis

Pelarut	Istilah kelarutan
Metanol p.a	Sukar larut
Aseton p.a	Agak sukar larut
heksana p.a	Sukar larut
Aquades	Praktis tidak larut
Kloroform p.a	Sukar larut
Etil asetat p.a	Agar sukar larut
Etanol p.a	Sukar larut
DMSO p.a	Agak sukar larut

Tabel 2. Titik lebur senyawa hasil sintesis

Replikasi	Titik lebur ( $^{\circ}C$ )
1	195-197
2	195-197
3	196-197



Gambar 3. Lempong hasil eluasi senyawa hasil sintesis dengan tiga sistem eluen dibawah sinar UV

Keterangan:

- 1 = sistem eluen heksana:kloroform (1:2)
- 2 = sistem eluen heksana:kloroform:etil asetat (4:2:1)
- 3 = sistem eluen heksana:kloroform:aseton (4:1:1)
- a = bahan awal 1,3-difenil tiourea
- b = senyawa hasil sintesis
- c = bahan awal 4-klorobenzoil klori

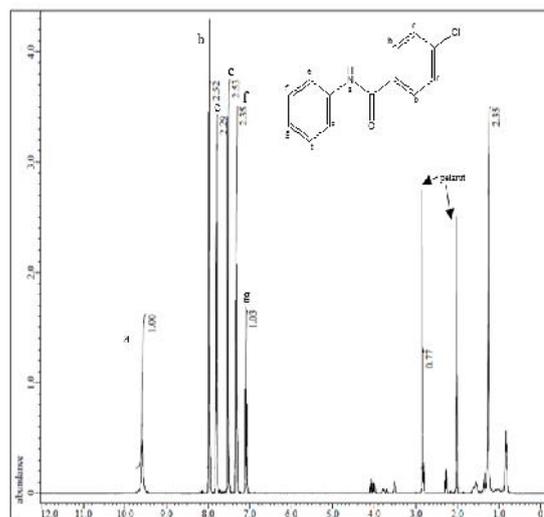
Tabel 3. Hasil KLT senyawa hasil sintesis

Eluen	Rf		
	1,3-difenil tiourea	4-kloro benzoilklorida	Senyawa hasil sintesis
1	0,4	0,83	0,63
2	0,43	0,86	0,69
3	0,26	0,83	0,49

Tabel 4. Interpretasi spektra IR hasil produk berdasarkan literatur

Tipe vibrasi	Frekuensi( $cm^{-1}$ ) menurut [10]	Frekuensi( $cm^{-1}$ ) produk
C-Cl	1110-1035	1091,94
C=C aromatis	1600 dan 1475	1597,55 dan 1487,31
C=O amida	1680-1630	1653,27
-N-H amida sekunder	3500-3100	3252,53
C-N	1350-1000	1324,78

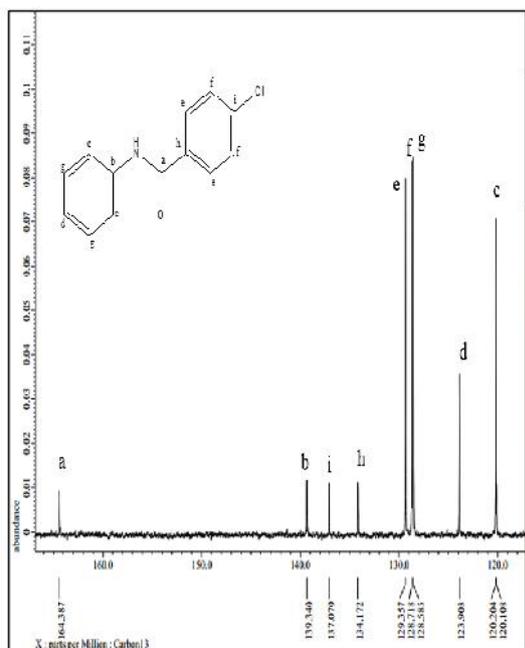
Konfirmasi dengan menggunakan spektroskopi  $^1H$ -NMR, menggunakan pelarut aseton- $d_6$  dengan standar internal TMS (tetrametilsilana). Struktur senyawa target dapat dilihat pada Gambar 4 dan interpretasi spektrum  $^1H$ -NMR dapat dilihat pada Tabel 5.



Gambar 4. Spektrum  $^1H$ -NMR senyawa hasil sintesis

Tabel 5. Interpretasi spektrum  $^1H$ -NMR senyawa hasil sintesis

Pergeseran kimia (ppm)	Jumlah H	Pembelahan	Posisi H
7,11	1	triplet	g
7,33	2	triplet	f
7,53	2	doblet	c
7,81	2	doblet	e
7,98	2	doblet	b
9,58	1	singlet	a
2,85	-	singlet	pelarut
2,09	-	singlet	pelarut



Gambar 5. Spektrum <sup>13</sup>C-NMR senyawa hasil sintesis

Tabel 6. Interpretasi spektrum <sup>13</sup>C-NMR senyawa hasil sintesis

Pergeseran kimia (ppm)	Jenis C	Posisi C
120,2	C aromatis	c
123,9	C aromatis	d
128,59	C aromatis	e
128,72	C aromatis	f
129,36	C aromatis	g
134,17	C aromatis	h
137,07	C aromatis	b
139,34	C C-Cl	i
164,39	C C=O	a
29,9	C pada pelarut	-
206,7	C pada pelarut	-

### Uji Aktivitas antibakteri

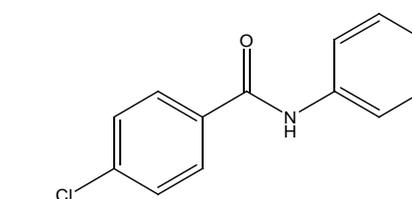
Hasil uji antibakteri senyawa hasil sintesis pada bakteri *S. aureus* dan *P. aeruginosa* dilakukan pada konsentrasi 31,25-10000 µg/ml dapat dilihat pada Tabel 7. Pada pengujian aktivitas antibakteri *P. aeruginosa* menunjukkan adanya hambatan pada konsentrasi 8000 µg/ml dan 10000 µg/ml µg/ml dan kemudian diuji secara statistik. Hasil uji statistik menunjukkan konsentrasi uji 31,25; 62,5; 125; 250; 500; 1000; 2000; 4000 µg/ml masing masing memiliki perbedaan signifikan terhadap konsentrasi 8000 µg/ml (Asym sig. =0,34) dan terhadap konsentrasi 10000 µg/ml (Asym sig. =0,37) (p<0,05).

Tabel 7. Diameter hambat senyawa hasil sintesis pada bakteri *S. aureus* dan *P. aeruginosa* dengan 3 replikasi.

Konsentrasi uji (µg/ml)	Diameter hambat (mm)					
	<i>S. aureus</i>			<i>P. aeruginosa</i>		
	1	2	3	1	2	3
31,25	0	0	0	0	0	0
62,5	0	0	0	0	0	0
125	0	0	0	0	0	0
250	0	0	0	0	0	0
500	0	0	0	0	0	0
1000	0	0	0	0	0	0
2000	0	0	0	0	0	0
4000	0	0	0	0	0	0
8000	0	0	0	2,5	3,5	2,5
10000	0	0	0	4	5	3

### Pembahasan

Sintesis senyawa diawali dengan melarutkan 4-klorobenzoil klorida dalam THF dan diteteskan perlahan ke dalam 1,3-difeniltiourea yang juga dilarutkan dalam THF agar reaksi berlangsung dengan sempurna, dengan memeriksa noda KLT pada setiap jam berlangsungnya proses sintesis. Hasil optimasi waktu reaksi pada jam ke-4 sudah tidak menunjukkan noda bahan awal yang nampak pada lempeng dan reaksi sintesis dapat dihentikan pada jam ke empat. Pasta yang terbentuk dari hasil sintesis di rekristalisasi sebanyak tiga kali dengan menggunakan etanol:air panas (1:1). Hasil rekristalisasi ini menghasilkan rendemen produk sebesar 53% yang kemudian dilakukan uji kemurnian. Organolepis senyawa hasil sintesis menunjukkan bentuk kristal dan warna putih. Struktur senyawa target yang disintesis ditunjukkan pada Gambar 6.



Gambar 6. Struktur senyawa hasil sintesis

Hasil uji kelarutan diketahui senyawa agak sukar larut dalam aseton p.a, etil asetat p.a, DMSO p.a, sukar larut dalam metanol p.a,

heksana p.a, kloroform p.a, etanol p.a dan praktis tidak larut dalam aquadest.

Menurut Ritmaleni dan Nurcahyani [11], senyawa murni memiliki jarak lebur  $2^{\circ}\text{C}$  dan senyawa hasil sintesis menunjukkan titik lebur  $195-197^{\circ}\text{C}$ . Uji KLT dengan tiga sistem eluen yang berbeda menunjukkan hanya satu noda yang berbeda dengan noda bahan awal. Berdasarkan noda tunggal pada 3 fase gerak tersebut, maka senyawa produk sintesis dapat dikategorikan murni secara KLT dan tidak mengandung bahan awal 1,3-difeniltiourea dan 4-klorobenzoil klorida. Pada pemeriksaan spektrum UV, bahan awal 1,3-difeniltiourea berada pada panjang gelombang  $331,8\text{ nm}$  dan senyawa hasil sintesis memiliki panjang gelombang di  $327,8\text{ nm}$ . Pergeseran hipsokromik terjadi karena struktur senyawa bahan awal memiliki gugus auksokrom berupa 2 gugus amino dan terdapat gugus  $\text{C}=\text{S}$  sedangkan senyawa hasil sintesis memiliki satu gugus amino dan gugus  $\text{C}=\text{O}$ . Senyawa awal mengandung gugus amino lebih banyak dibandingkan dengan senyawa hasil sintesis dan terdapat perbedaan struktur  $\text{C}=\text{S}$  menjadi  $\text{C}=\text{O}$  yang menyebabkan panjang gelombang senyawa hasil akan berada daerah lebih rendah.

Konfirmasi sktruktur dengan FTIR pada spektrum  $3252,53\text{ cm}^{-1}$  muncul serapan pita yang menunjukkan N-H pada senyawa hasil. Gugus N-H amida yang berupa N-H sekunder memiliki serapan puncak tunggal yang menunjukkan proses sintesis telah terjadi dengan sempurna. Spektrum  $^1\text{H-NMR}$  menunjukkan amina sekunder yang telah terbentuk pada struktur produk muncul pada pergeseran  $9,582\text{ ppm}$  sebagai penentu keberhasilan sintesis. Berdasarkan spektrum  $^{13}\text{C-NMR}$  menunjukkan adanya 9 yang mewakili spektrum C pada cincin aromatis yang berada pada daerah  $100-150\text{ ppm}$ , dan  $\text{C}=\text{O}$  pada  $164,378\text{ ppm}$ . Pada spektrum muncul respon terhadap adanya pelarut aseton- $d_6$  pada  $29,9$  dan  $206,7\text{ ppm}$  yang menunjukkan produk target telah terbentuk.

Uji aktivitas antibakteri senyawa hasil sintesis pada *S. aureus* tidak menunjukkan adanya hambatan pada rentang konsentrasi  $31,25\text{ }\mu\text{g/ml}$  hingga  $10000\text{ }\mu\text{g/ml}$  menandakan bahwa senyawa hasil sintesis tidak memiliki aktivitas terhadap *S. aureus*. Berdasarkan uji aktivitas antibakteri pada *P. aeruginosa*, terdapat aktivitas hambat pada konsentrasi  $8000$  dan  $10000\text{ }\mu\text{g/ml}$  yang kemungkinan dapat disebabkan oleh struktur dinding bakteri gram

negatif yang terdiri lipopolisakarida yang tebal dibanding bakteri gram negatif. Faktor yang dapat menyebabkan senyawa hasil sintesis tidak memiliki daya hambat diantaranya senyawa hasil sintesis yang memiliki ClogP (prediksi ChemDraw Ultra 12) sebesar  $3,56$  cenderung bersifat nonpolar, sedangkan menurut Cos et al. [12], metode difusi agar kurang sesuai bagi senyawa yang bersifat nonpolar.

## Simpulan dan Saran

Berdasarkan penelitian yang telah dilakukan dapat ditarik beberapa kesimpulan, senyawa N-fenil-4-klorobenzamida dapat disintesis dari 1,3-difeniltiourea dan 4-klorobenzoil klorida. Organoleptis dari produk hasil sintesis merupakan kristal yang berwarna putih. Titik lebur senyawa tersebut yaitu  $195-197^{\circ}\text{C}$ . Senyawa dapat dikatakan murni dari pemeriksaan titik lebur, KLT dan panjang gelombang dengan UV. Dari hasil uji kelarutan diketahui senyawa agak sukar larut dalam aseton p.a, etil asetat p.a, DMSO p.a, sukar larut dalam metanol p.a, heksana p.a, kloroform p.a, etanol p.a dan praktis tidak larut dalam aquadest. Berdasarkan spektrum  $^1\text{H-NMR}$ ,  $^{13}\text{C-NMR}$ , dan FTIR yang dihasilkan, menunjukkan senyawa hasil sintesis yang didapatkan merupakan N-fenil-4-klorobenzamida. Senyawa N-fenil-4-klorobenzamida tidak memiliki aktivitas terhadap *S. aureus* dan *P. aeruginosa*. Untuk penelitian lebih lanjut penulis menyarankan perlu dilakukan uji antibakteri pada bakteri yang lainya dan melakukan uji aktivitas lain selain antibakteri.

## Daftar Pustaka

- [1] World Health Organization. [Internet]. [Geneva]: World Health Organization; 2016 [cited 2016 September]. Available from : [http://www.who.int/topics/infectious\\_disease\\_s/en/](http://www.who.int/topics/infectious_disease_s/en/)
- [2] British National Formulary 70. Bacterial infection. London: BMJ Group and the Royal Pharmaceutical Society of Great Britain; 2006.
- [3] Vogel AI, Tatchell AR, Furnis BS, Hannaford AJ, Smith PWG. Vogel's textbook of practical organic chemistry. 5<sup>th</sup> ed. New York : John Wiley & Sons, Inc.; 1989.
- [4] Kubicova L, Dostal H, Kunes J, Kralova K, Buchta V, Kaustova J, et al. Synthesis and biological activity of 2-Amino-N-phenylbenzamide and 3-Phenyl-1,2,3-

- benzotriazin-4(3H)-ones.[Internet]. 2000 [cited 2016 Jul]. Available from: <http://www.mdpi.org/ecsoc-4.htm>
- [5] Talukdar J, Kachroo M. Synthesis, characterization, antibacterial and antitubercular activity of some substituted N-[4-(3-phenyl-acryloyl)-phenyl]-benzamide. WJPR. 2014; 3(1): 900-909.
- [6] 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.
- [7] Pasha FA, Muddassar M, Lee C, Cho SJ. Mechanism based QSAR studies of N-phenylbenzamide as antimicrobial agents. Environ Toxicol Pharmacol. 2008; 26: 128-135.
- [8] Topliss JG. Utilization of operational schemes for analog synthesis in drug design. New Jersey : Department of Medicinal Chemistry, Schering Corporation; 1972.
- [9] 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.
- [10] Pavia DL, Lampman GM, Kriz GS, Vyvyan JA. Introduction of spectroscopy. 4<sup>th</sup> ed. USA: Brooks/Cole, Cengage Learning; 2009.
- [11] Ritmaleni, Nurcahyani W. Sintesis. 4-fenil-3,4-tetrahidro-indeno[2,1]-pirimidin-2-on (LR-1). Majalah Farmasi Indonesia. 2006, 17(3):149-155.
- [12] 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.