

Synthesis and Antibacterial Testing of Imina Derivative Compounds from Piperonal and Anilin

Dimas Syamsudin ^a, Ismiyanto ^{a*}, Ngadiwiyanana ^a

^a Organic Chemistry Laboratory, Chemistry Department, Faculty of Sciences and Mathematics, Diponegoro University, Jalan Prof. Soedarto, Tembalang, Semarang

* Corresponding author: ismiyarto@live.undip.ac.id

Article Info

Keywords:
 synthesis, imine,
 piperonal, aniline,
 antibacterial

Kata kunci:
 sintesis, imina,
 piperonal, anilin,
 antibakter

Abstract

Synthesis of Imine derivatives used as antibacterial activity has been done. Synthesis was conducted by condensation reaction between piperonal and aniline. The product synthesis was characterized by melting point, LC-MS, FTIR and ¹H-NMR, then application of the product as antibacterial towards bacteria *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*. The product of synthesis was pale-brown solid, and had melting point at 56-61 °C. Identification by LC-MS showed the compound molecular weight was 225.30 gram/mol, identification by FTIR showed a compound contained imine C=N at 1620.21 cm⁻¹, C-H aromatic at 1581.63 cm⁻¹, C_{sp3}-H at 2962.37 cm⁻¹ from CH₂, and C-O at 1265.30 cm⁻¹, Identification by ¹H-NMR showed a compound had a singlet peak at δ=6 ppm that proton was from the CH₂, multiplet peak at δ=6.9-7.7 ppm proton from two aromatics and singlet peak at δ=8.4 ppm from proton imine. The minimum inhibitory concentration of the product towards *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* was 1 mg/mL with diameter inhibition zone 2 mm and 3 mm. From these data it could be concluded that the compound 3,4-methylenedioxybenzylimine was formed and it had ability as an antibacterial agent.

Abstrak

Telah dilakukan penelitian tentang sintesis dan uji antibakteri senyawa turunan imina. Sintesis dilakukan melalui reaksi kondensasi antara piperonal dan anilin. Hasil sintesis dikarakterisasi dengan uji titik leleh, LCMS, spektroskopi FTIR dan ¹H-NMR, hasil sintesis diaplikasikan sebagai antibakteri terhadap bakteri *Staphylococcus aureus* dan *Escherichia coli*. Hasil sintesis berbentuk padatan, berwarna coklat pucat dan mempunyai titik leleh 56-61°C. Identifikasi menggunakan LC-MS menunjukkan bahwa senyawa mempunyai berat molekul 225,30 gram/mol, identifikasi menggunakan FTIR menunjukkan bahwa senyawa hasil sintesis mengandung gugus fungsi imina C=N pada bilangan gelombang 1620,21 cm⁻¹, serapan C-H aromatik pada bilangan gelombang 1581,63 cm⁻¹, serapan pada bilangan gelombang 2962,37 cm⁻¹ menunjukkan vibrasi C_{sp3}-H dari CH₂ dan serapan C-O pada bilangan gelombang 1265,30 cm⁻¹, sedangkan identifikasi dengan ¹H-NMR diketahui bahwa senyawa mempunyai puncak singlet pada δ=6 ppm merupakan proton dari CH₂, puncak multiplet pada δ=6,9-7,7 ppm dari proton dua cincin aromatik dan puncak singlet pada δ=8,4 ppm dari proton imina. Nilai KHM produk sintesis turunan imina terhadap bakteri *Staphylococcus aureus* dan *Escherichia coli* adalah pada konsentrasi 1 mg/mL dengan diameter zona hambat masing-masing adalah 2 mm dan 3 mm. Dari data tersebut dapat disimpulkan bahwa produk sintesis turunan imina 3,4-metilendioksibenzilimina telah terbentuk dan mempunyai kemampuan sebagai antibakteri.

1. Pendahuluan

Penyakit infeksi merupakan salah satu masalah dalam bidang kesehatan yang dari waktu ke waktu terus berkembang, disebabkan oleh berbagai mikroorganisme seperti bakteri, virus, jamur, dan protozoa [1]. Imina merupakan senyawa dengan gugus fungsi C=N yang mempunyai potensi sebagai antibakteri [2], antikanker [3], antijamur, antitumor dan antimalaria [4]. Sintesis turunan imina dari vanilin dan 4-aminoantipirin yang mempunyai aktivitas sebagai antibakteri. Melihat potensinya yang besar, maka penelitian tentang imina perlu dikembangkan, sehingga dapat mempunyai aktivitas yang tinggi dan lebih stabil [5].

Schmeyers *dkk.* [6], telah melakukan penelitian sintesis imina, dimana reaksi dilakukan pada suhu kamar selama 30 menit. Hania [7] berhasil mensintesis senyawa imina menggunakan bahan dasar anilin dan benzaldehid, reaksi dilakukan dengan pemanasan selama dua jam dan dihasilkan produk dengan titik leleh 50-52 °C dan randemen 60%. Secara umum, imina merupakan hasil reaksi kondensasi antara aldehida dan amina. Aldehid aromatik seperti piperonal dengan amina primer akan menghasilkan imina yang stabil [8], karena akan menghasilkan produk dengan cincin aromatik dan ikatan rangkap yang terkonjugasi. Konsep reaksi tersebut dapat digunakan untuk sintesis imina dari piperonal dan anilin.

Piperonal merupakan suatu aldehida aromatik tanpa H α yang memiliki kemiripan struktur dengan benzaldehid. Sedangkan anilin merupakan amina primer yang merupakan suatu nukleofil yang dapat menyerang gugus karbonil suatu aldehid atau keton, sehingga pada penelitian dapat digunakan sebagai alternatif pembuatan senyawa turunan imina. Piperonal mempunyai gugus metilendioksi (-O-CH₂-O-), dimana menurut Alam [9] senyawa yang mengikat gugus metilendioksi(-O-CH₂-O-) berpotensi mampu meningkatkan aktivitas antibakteri.

Reaksi imina (imina) dipengaruhi oleh beberapa faktor, antara lain suhu, pH, dan waktu reaksi yang digunakan. Salah satu keberhasilan reaksi imina adalah waktu reaksi. Dalam penelitian ini dilakukan variasi waktu reaksi yang digunakan. Berdasarkan uraian tersebut, untuk menghasilkan produk sintesis imina yang optimal perlu ditentukan waktu reaksi, sehingga memperoleh randemen yang optimal dan mempunyai kemampuan sebagai antibakteri.

2. Metode Penelitian

Alat dan Bahan

Alat yang digunakan adalah seperangkat alat gelas untuk sintesis, lempeng KLT silika gel, *spectronic 20*, seperangkat alat untuk uji antibakteri, LCMS (*liquid chromatography mass spectroscopy*), spektrometer FTIR (Shimadzu) dan spektrometer ¹H-NMR. Bahan yang dipergunakan adalah anilina p.a., piperonal p.a., etanol 96%, asam klorida, kloroform, magnesium sulfat anhidrat, *tween 20*, seperangkat bahan uji antibakteri, bakteri *Staphylococcus aureus* dan *Escherihia coli*.

Pengaruh waktu reaksi sintesis turunan imina dari piperonal dan anilin.

Piperonal 3,006 g (0,02 mol) dilarutkan dalam 20 mL etanol. Pelarutan dilakukan dalam labu leher tiga volume 250 mL yang dilengkapi dengan pendingin, pengaduk magnetik dan termometer. Setelah piperonal larut, ditambahkan 0,03 mol larutan anilin berlebih sampai larutan homogen kemudian ditambahkan HCl 1 M. Reaksi dilakukan pada suhu kamar dengan variasi waktu 50, 70, 90, 110, 130 dan 150 menit. Campuran kemudian diekstraksi, fraksi yang terbentuk dipisahkan dan dikeringkan. Filtratnya diuapkan dengan *rotary evaporator*. Kemudian hasil yang terbentuk dikeringkan dan diukur titik lelehnya. Analisis dengan LC-MS, spektroskopi FTIR dan ¹H-NMR.

Pembuatan suspensi bakteri

Pembuatan stok bakteri, bakteri uji dibiakkan pada media cair selama 24 jam pada suhu 35-37 °C, kemudian diambil dengan ose dan disuspensikan dengan cara memasukkan kedalam 10 mL air suling steril. Suspensi yang terbentuk disetarakan pada transmitans 25% dengan panjang gelombang 580 nm.

Pengujian antibakteri

Sebanyak 0,1 mL inokulum bakteri dimasukkan kedalam cawan petri steril, setelah itu dituang media *Nutrient Agar* sebanyak 20 mL dengan suhu 40-50°C. Selanjutnya cawan digoyang diatas permukaan meja, agar media dan suspensi tercampur rata. Cakram kertas berdiameter 6 mm dicelupkan ke dalam produk sintesis dengan konsentrasi 100 mg/mL, 50 mg/mL, 10 mg/mL, 5 mg/mL, 1 mg/ mL dan 0,5 mg/mL. Kontrol yang digunakan *tween-20* 55mg/mL (kontrol negatif) dan tetrasiklin 0,1 mg/mL (kontrol positif) dibiarkan 15 menit. Cakram kertas diletakkan diatas permukaan media agar yang telah diinokulasikan dengan suspensi bakteri, kemudian diinkubasi dalam inkubator pada suhu 36 ± 1°C selama 18-24 jam, setelah itu diukur diameter daerah hambatan (zona jernih) pertumbuhan disekitar cakram kertas

3. Hasil dan Pembahasan

Pada penelitian ini, perlu dilakukan uji kemurnian turunan imina sebagai starting material yang dilihat dari pengukuran profil KLT. Harga R_f ditunjukkan pada tabel 1.

Tabel 1 : Harga R_f senyawa turunan imina

No	Jenis pelarut	R _f sintesis imina
1	Kloroform	0,62
2	benzena	0,48

Dari hasil uji kemurnian senyawa turunan imina, dapat disimpulkan bahwa senyawa turunan imina cukup murni.

Dalam penelitian ini, senyawa turunan imina ini disintesis melalui reaksi kondensasi antara piperonal dan aniline dengan reaksi adisi dan eliminasi. Dalam sintesis ini menggunakan katalis asam, yaitu HCl,

karena reaksi pembentukan imina dipengaruhi oleh kondisi pH 3-4. Apabila pH terlalu asam akan mempengaruhi tahap eliminasi berjalan lebih cepat sedangkan apabila pH kurang asam tahap eliminasi menjadi lambat karena konsentrasi asam mempengaruhi protonasi gugus OH. Sehingga akan mempengaruhi turunan imina yang dihasilkan. Sintesis ini dilakukan pada suhu kamar dengan variasi waktu reaksi seperti pada tabel 2.

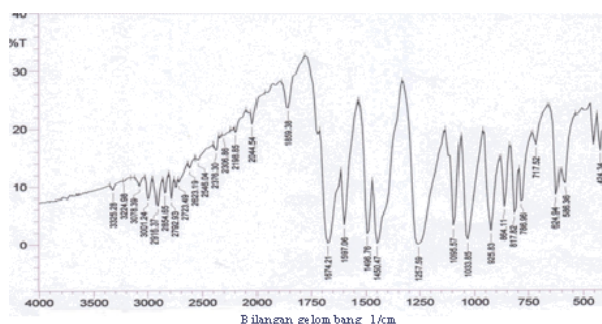
Pengaruh waktu reaksi terhadap produk sintesis (tabel 2) menunjukkan bahwa waktu optimal terjadi pada waktu reaksi 130 menit dengan randemen sebesar 62,53%. Pada waktu reaksi di bawah 130 menit imina belum memberikan hasil yang maksimal, karena reaksi belum berlangsung secara sempurna. Sedangkan pada waktu reaksi setelah 130 menit terjadi penurunan produk sintesis. Fenomena ini disebabkan imina yang telah terbentuk dapat bereaksi kembali, dengan terjadinya protonasi oleh H⁺, sehingga menghasilkan karbon parsial positif yang dapat diserang oleh nukleofil yang ada dalam campuran produknya, antara lain ion (OH)⁻, air dan sisa anilin, sehingga akan mengurangi produk yang dihasilkan [8].

Tabel 2: Pengaruh waktu reaksi terhadap produk sintesis

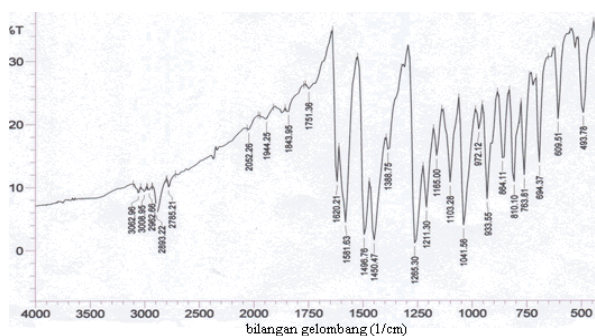
No	Waktu reaksi (menit)	Titik leleh (°C)	Produk (gram)	Randemen (%)
1	50	60	1,310	29,07
2	70	60	1,371	30,43
3	90	61	2,596	57,62
4	110	56	2,778	61,88
5	130	59	2,817	62,53
6	150	59	2,396	53,18

Hasil Spektra FTIR

Spektra FTIR dari piperonal ditunjukkan pada gambar 1 dan hasil spektra FTIR dari turunan imina ditunjukkan pada gambar 2.



Gambar 1. FTIR Piperonal



Gambar 2. FTIR 3,4-metilendioksibenzilimina

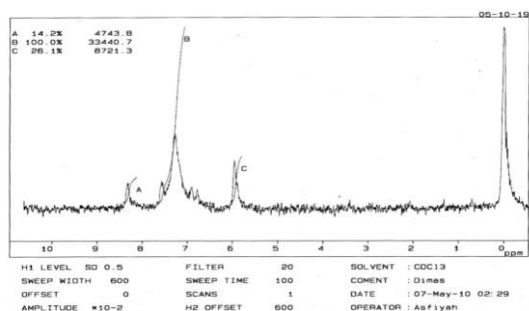
Tabel 3 : Data FTIR antara piperonal dan produk hasil sintesis

No	Gugus	Bilangan gelombang (cm ⁻¹)	
		Piperonal	Produk sintesis
1	C=O aldehyd	1674,21; 2792,93; 2854,65	-
2	imina	-	1620,21; 2893,22
3	C-H aromatik	1597,06 786,86; 817,2; 864,11	1581,63 694,37; 763,81; 810,10 ; 884,11
4	C-O	1257,59	1265,30
5	C(sp ³)-H (CH ₂)	2916,37; 1450,47	2962,37; 1450,47
6	C(sp ²)-H	3078, 39	3062,96

Berdasarkan data spektra FTIR tersebut, terjadi perbedaan serapan yang dihasilkan sebelum maupun sesudah reaksi, dimana sebelum reaksi terdapat gugus karbonil (C=O) sedangkan sesudah reaksi terdapat penambahan gugus imina (C=N) dan pengurangan gugus karbonil (C=O) pada produk sintesis. Dengan adanya gugus-gugus tersebut, berarti senyawa imina yang diharapkan telah terbentuk.

Hasil Spektra ¹H-NMR

Karakterisasi menggunakan spektroskopi ¹H-NMR. Pengujian menggunakan ¹H-NMR dilakukan untuk mengetahui jumlah proton yang dimiliki oleh senyawa produk sintesis berdasarkan lingkungan elektroniknya. Hasil ¹H-NMR ditunjukkan pada gambar 3 dan tabel 4.



Gambar 3. Spektra ¹H-NMR 3,4-metilendioksibenzilimina

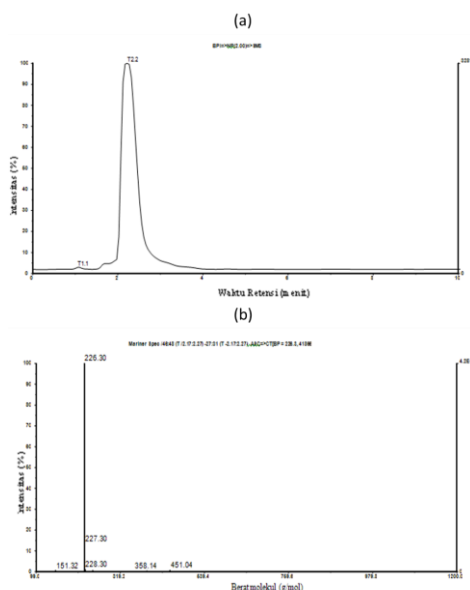
Spektra ¹H-NMR 3,4-metilendioksibenzilimina terlihat bahwa senyawa hasil sintesis yang diperoleh menunjukkan tiga buah signal yang terpisah. Hal ini disebabkan adanya tiga proton yang memiliki tiga lingkungan elektronik yang berbeda dengan perbandingan proton 1:8:2. Perbandingan ini diinterpretasikan sebagai perbandingan jumlah proton yang terdapat dalam senyawa hasil sintesis. Adanya puncak multiplet pada δ = 6,9-7,7 ppm merupakan ciri khas dari proton hidrogen aromatik. Munculnya puncak singlet sekitar δ = 8,4 ppm merupakan proton yang berasal dari gugus imina (1H, -CH=N) sedangkan adanya puncak singlet pada δ = 6 ppm merupakan proton dari gugus metilen (CH₂). Data ¹H-NMR 3,4-metilendioksibenzilimina dapat dilihat pada tabel 4.

Tabel 4: Data ¹H-NMR 3,4-metilendioksibenzilimina

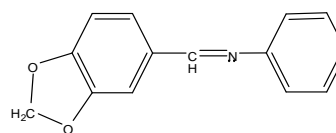
No	Sinyal	Pergeseran Kimia δ (ppm)	Jumlah dan Kedudukan atom H
A	Singlet	8,4	1 H dari CH=N
B	Multiplet	6,9-7,7	8 H dari C-H aromatik
C	Singlet	6	2 H dari CH ₂

Kromatogram dan spektrogram turunan imina ditunjukkan pada gambar 4.

Kromatogram (A) menunjukkan adanya 2 puncak dengan waktu retensi (R_t) dan luas puncak (%) berturut-turut: puncak 1, R_t 1,05 menit (3%) dan puncak 2, t_R 2,22 menit (97%), berarti senyawa hasil sintesis tersebut dapat dianggap telah murni. Spektra massa (B) yang diperoleh memperlihatkan adanya berat molekul pada m/z 226.30 [M+H]⁺, yang merupakan puncak dengan intensitas tertinggi (97%). Berarti berat molekul senyawa hasil sintesis adalah 226,30-1=225,30 mengindikasikan berat molekul m/z 225,30 [M⁺] yang identik dengan struktur 3,4-metilendioksibenzilimina (C₁₄H₁₁O₂N) seperti pada gambar 5.



Gambar 4. Kromatogram (A) dan spektrogram (B) 3,4-metilendioksibenzilimina



Gambar 5. 3,4-metilendioksibenzilimina

Hasil Uji Antibakteri

Tabel 5: Hasil Uji Aktivitas Antibakteri

No	Konsentrasi (mg/mL)	Diameter Hambat (mm)	
		<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Escherichia coli</i>
1	100	11,67	12,67
2	50	9,67	10,67
3	10	6	7,33
4	5	3	3,67
5	1	2	3
6	0,5	-	-
7	Tetrasiklin 0,1	10,33	10,67
8	kontrol negatif	-	-

Keterangan:

(-) : tidak memberikan hambatan

Kontrol positif : tetrasiklin 0,1 mg/ml

Kontrol negatif : tween-20 55 mg/m

Hasil uji antibakteri turunan senyawa imina terhadap bakteri *Staphylococcus aureus* dan *Escherichia coli* ditunjukkan pada tabel 5. Pada Tabel 5, terlihat bahwa produk sintesis turunan imina memberikan batas daerah hambatan dengan diameter 2 mm pada konsentrasi 1 mg/mL untuk bakteri *Staphylococcus aureus* dan diameter 3 mm pada konsentrasi 1 mg/mL pada konsentrasi 1 mg/mL untuk bakteri *Escherichia coli*. Dari tabel diatas terlihat bahwa diameter zona hambat semakin meningkat seiring dengan peningkatan konsentrasi produk sintesis 3,4 metilendioksibenzilimina, sehingga dapat diketahui Konsentrasi Hambat Minimum (KHM). Hasil uji antibakteri menunjukkan bahwa Produk sintesis 3,4-metilendioksibenzilimina memiliki KHM pada konsentrasi 1 mg/mL terhadap bakteri *Staphylococcus aureus* dan *Escherichia coli*.

4. Kesimpulan

Senyawa turunan imina dari piperonal dan anilin dapat disintesis melalui reaksi imina dan pengaruh waktu reaksi selama 130 menit menghasilkan produk optimal yaitu 62,53%. Senyawa turunan imina mempunyai aktivitas sebagai antibakteri terhadap bakteri *Staphylococcus aureus* dan *Escherichia coli*.

5. Daftar Pustaka

[1] JM Gibson, Mikrobiologi dan Patologi Modern untuk perawat, Terjemahan dan Modern Microbiology and Pathology for Nurses, oleh Soma Prasada. EGC, Jakarta, (1996)

- [2] Neeraj Kumar Fuloria, Vijender Singh, M. Shaharyar, Mohammed Ali, Synthesis, characterization and antimicrobial evaluation of novel imines and thiazolidinones, *Acta Poloniae Pharmaceutica & Drug Research*, 66, 1, (2009) 141-146
- [3] Amjid Iqbal, Hamid Latif Siddiqui, CM Ashraf, Matloob Ahmad, George W Weaver, Synthesis, Characterization and Antibacterial Activity of Azomethine Derivatives Derived from 2-Formylphenoxyacetic Acid, *Molecules*, 12, 2, (2007) 245-254 <http://dx.doi.org/10.3390/12020245>
- [4] Sandra S Konstantinović, Budimir V Konstantinović, Jasmina M Jovanović, Synthesis and structure of vanillin azomethines, *Chemical Industry and Chemical Engineering Quarterly/CICEQ*, 15, 4, (2009) 279-281 <http://dx.doi.org/10.2298/CICEQ0904279K>
- [5] B Soekardjo, S Hardjono, R Sondakh, Hubungan struktur-aktivitas obat antibiotika. Dalam: Siswandono & Soekardjo. B, *Kimia Medisinal*, 2, (2000)
- [6] Jens Schmeyers, Fumio Toda, Juergen Boy, Gerd Kaupp, Quantitative solid-solid synthesis of azomethines, *Journal of the Chemical Society, Perkin Transactions 2*, 4, (1998) 989-994
- [7] Majed M Hania, Synthesis of some imines and investigation of their biological activity, *Journal of Chemistry*, 6, 3, (2009) 629-632
- [8] RJ Fessenden, JS Fessenden, *Kimia Organik*, diterjemahkan oleh Pudjaatmaka, AH, jilid, 1, (1994) 209-210
- [9] Sayed Alam, Synthesis, antibacterial and antifungal activity of some derivatives of 2-phenyl-chromen-4-one, *Journal of Chemical Sciences*, 116, 6, (2004) 325-331