



TESIS - SK142502

**TURUNAN ISONIAZID: SINTESIS DAN UJI
BIOAKTIVITAS TERHADAP *Mycobacterium*
*tuberculosis H₃₇Rv***

M. RIZA GHULAM FAHMI
NRP 1415 201 006

DOSEN PEMBIMBING
Prof. Mardi Santoso, Ph. D.

PROGRAM MAGISTER
BIDANG KEAHlian KIMIA ORGANIK
DEPARTEMEN KIMIA
FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM
INSTITUT TEKNOLOGI SEPULUH NOPEMBER
SURABAYA
2017



THESIS - SK142502

**ISONIAZID DERIVATIVES: SYNTHESIS AND
BIOACTIVITY TEST AGAINSTS *Mycobacterium*
*tuberculosis H₃₇Rv***

M. RIZA GHULAM FAHMI
NRP 1415 201 006

SUPERVISOR
Prof. Mardi Santoso, Ph. D

MAGISTER PROGRAM
ORGANIC CHEMISTRY
CHEMISTRY DEPARTMENT
FACULTY OF MATHEMATICS AND NATURAL SCIENCES
INSTITUT TEKNOLOGI SEPULUH NOPEMBER
SURABAYA
2017

Tesis disusun untuk memenuhi salah satu syarat memperoleh gelar
Magister Sains (M.Si)
di
Institut Teknologi Sepuluh Nopember

Oleh :

M. Riza ghulam fahmi

NRP. 1415201006

Tanggal ujian : 28 Juli 2017

Periode wisuda : September 2017

Disetujui oleh

1. Prof. Mardi Santoso, Ph.D.

NIP. 19650131 198910 1 001

(Pembimbing)

2. Sri Fatmawati, M.Sc., Ph.D.

NIP. 19801103 200212 2 001

(Penguji)

3. Dra. Ratna Ediati, M.S., Ph.D.

NIP. 19600622 198603 2 002

(Penguji)

Dekan



Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam

Prof. Dr. Basuki Widodo, M.Sc.

NIP. 19650605 198903 1 002

TURUNAN ISONIAZID: SINTESIS DAN UJI BIOAKTIVITAS TERHADAP *Mycobacterium tuberculosis* H₃₇Rv

Nama Mahasiswa : M. Riza Ghulam Fahmi
NRP : 1415 201 006
Pembimbing : Prof. Mardi Santoso, Ph. D

ABSTRAK

Tuberkulosis (TBC atau TB) merupakan penyakit infeksi yang disebabkan oleh bakteri *Mycobacterium tuberculosis* yang menyerang terutama paru-paru, dan termasuk sepuluh besar penyebab kematian di dunia. Resistensi terhadap obat-obat anti-TB dalam bentuk *multi drug-resistant* (MDR) dan *extensively drug-resistant* (XDR) serta belum adanya obat TB baru merupakan permasalahan yang krusial dalam pengobatan TB. Penelitian yang dilakukan berhasil mensintesis dan menguji bioaktivitas terhadap bakteri *Mycobacterium tuberculosis* H₃₇Rv tiga turunan isoniazid. *N*-benzil-5,7-dibromoisatin dan *N*-4-bromobenzil-5,7-dibromoisatin masing-masing disintesis dari reaksi benzil bromida atau 4-bromobenzil bromida dengan 5,7-dibromoisatin dan natrium hidrida dengan rendemen masing-masing sebesar 94% dan 91%. Sintesis turunan isatin (5,7-dibromoisatin, (*N*-benzil)-5,7-dibromoisatin, dan (*N*-4-bromobenzil)-5,7-dibromoisatin) masing-masing dengan isoniazid dan asam sulfat sebagai katalis sehingga dihasilkan 2-isonikotinohidazon-5,7-dibromoisatin, 2-isonikotinohidazon-(*N*-benzil)-5,7-dibromoisatin, dan 2-isonikotinohidazon-(*N*-4-bromobenzil)-5,7-dibromoisatin dengan rendemen masing-masing sebesar 92%, 81% dan 84%. Hasil uji tiga turunan isoniazid terhadap bakteri *Mycobacterium tuberculosis* H₃₇Rv mendapatkan bahwa tiga turunan isoniazid aktif. Senyawa 2-isonikotinohidazon-3-(*N*-4-bromobenzil)-5,7-dibromoisatin paling aktif dengan nilai MIC (kosentrasi hambat minimum) sebesar 10 µg/mL.

Kata kunci : tuberkulosis, isatin, hidazon, isoniazid

ISONIAZID DERIVATIVES: SYNTHESIS AND BIOACTIVITY TEST AGAINST *Mycobacterium tuberculosis* H₃₇Rv

By : M. Riza Ghulam Fahmi
Student Identity Number : 1415 201 006
Supervisor : Prof. Mardi Santoso, Ph. D.

ABSTRACT

Tuberculosis (TBC or TB) is an infection disease caused by *Mycobacterium tuberculosis* bacteria that attacks lungs and became the big-ten death causes in the world. Due to the resistance problem in level I and II anti-TB drugs in the form multi drug-resistant (MDR) and extensively drug-resistant (XDR) and the lack of anti-TB drugs is a crucial problem in the treatment of TB. The research conducted successfully synthesize and bioactivity testing against *Mycobacterium tuberculosis* H₃₇Rv three isoniazid derivatives. *N*-benzyl-5,7-dibromoisatin, and *N*-4-bromobenzyl-5,7-dibromoisatin resulting from reaction of benzyl bromide or 4-bromobenzyl bromide with 5,7-dibromoisatin and sodium hydride to give yield 94% and 91% respectively. Synthesis of isoniazid derivatives were done by reacting isatin derivatives (5,7-dibromoisatin, (*N*-benzyl)-5,7-dibromoisatin, and (*N*-4-bromobenzyl)-5,7-dibromoisatin) with isoniazid and the presence of sulfuric acid as catalyst to give yield 92%, 81% and 84% respectively. The products were tested against tuberculosis bacteria *Mycobacterium tuberculosis* H₃₇Rv and three isoniazid derivatives showed good activity. 2-Isonicotinohidrazone-3-(*N*-4-bromobenzyl)-5,7-dibromoisatin active with MIC 10 ppm.

Keywords : tuberculosis, isatin, hydrazine, isoniazid

KATA PENGANTAR

Alhamdulillahirobbil' alamin. Puji syukur penulis panjatkan kepada Allah SWT karena berkat rahmat dan ridho-Nya penulis dapat menyelesaikan naskah tesis yang berjudul “**Turunan Isoniazid: Sintesis dan Uji Bioaktivitas terhadap *Mycobacterium tuberculosis H₃₇Rv***”. Penulis mengucapkan terima kasih kepada pihak-pihak yang telah membantu dan mendukung dalam penggerjaan tesis ini, yaitu:

1. Prof. Mardi Santoso, Ph.D selaku dosen pembimbing dan dosen wali yang telah sabar memberikan arahan dan bimbingan selama proses penggerjaan naskah tesis ini.
2. Prof. Dr. Didik Prasetyoko, M.Sc selaku Kepala Departemen Kimia yang telah memberikan fasilitas selama penyusunan naskah tesis
3. Bapak dan Ibu dosen yang telah mendidik dan menginspirasi penulis selama menempuh studi di kampus perjuangan ini.
4. Ayah, Ibu, indar dan seluruh keluarga, terima kasih atas doa, dukungan, dan motivasi yang selalu dialirkan sehingga penulis dapat menyelesaikan rancangan tesis ini.
5. Lidya Tumewu dari Lembaga Penyakit Tropis Universitas Airlangga dan Elvira dari Kimia ITB yang telah membantu dalam melakukan analisis menggunakan spektrometer massa dan NMR.
6. Linda Oktabriana dari Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Kedokteran UGM yang telah membantu dalam melakukan pengujian anti-tuberkular.
7. Teman-teman mahasiswa Program Magister Departemen Kimia FMIPA angkatan 2015 dan laboratorium kimia bahan alam dan sintesis (KIBAS) telah menemani penulis dalam penggerjaan rancangan tesis ini.
8. LPPM ITS atas dana penelitian yang diberikan melalui Dana Penelitian Hibah Hibah 903/PKS/ITS2017 ITS 2017.
9. Semua pihak yang mendukung terlaksananya penulisan naskah tesis ini.

Penulis menyadari bahwa naskah tesis ini masih terdapat kekurangan, oleh karena itu penulis menerima saran dan kritik yang membangun dari pembaca. Semoga Tesis ini memberikan manfaat bagi penulis dan pembaca.

Surabaya, Juli 2017

Penulis

DAFTAR ISI

LEMBAR PENGESAHAN	i
ABSTRAK	ii
ABSTRACT	iii
KATA PENGANTAR	iv
DAFTAR ISI	vi
DAFTAR GAMBAR	ix
DAFTAR TABEL	xi
DAFTAR LAMPIRAN	xii
BAB I PENDAHULUAN	1
1.1 Latar Belakang	1
1.2 Permasalahan	5
1.3 Tujuan Penelitian	6
1.4 Manfaat Penelitian	6
BAB II TINJAUAN PUSTAKA	7
2.1 Isatin (5)	7
2.2 Tuberkulosis	10
2.3 Bakteri <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	12
2.4 Kromatografi	15
2.5 Identifikasi Hasil Sintesis	16
2.5.1 Identifikasi Hasil Sintesis Dengan Spektroskopi Inframerah (IR)	16
2.5.2 Identifikasi Hasil Sintesis Dengan Spektroskopi Resonansi Magnetik Inti	17

2.5.3 Identifikasi Hasil Sintesis Dengan Spektroskopi Massa	19
BAB III METODOLOGI PENELITIAN	21
3.1 Alat dan Bahan	21
3.1.1 Alat	21
3.1.2 Bahan	21
3.2 Prosedur	21
3.2.1 Sintesis <i>N</i> -Benzil-5,7-dibromosatin (12b)	21
3.2.2 Sintesis <i>N</i> -4-Bromobenzil-5,7-dibromosatin (12c)	22
3.2.3 Sintesis 2-Isonikotinohidrazon-5,7-dibromoisatin (11a)	22
3.2.4 Sintesis 2-Isonikotinohidrazon-3-(<i>N</i> -benzil)-5,7-dibromoisatin (11b)	23
3.2.5 Sintesis 2-Isonikotinohidrazon-3-(<i>N</i> -4-bromobenzil)-5,7-dibromoisatin (11c)	23
3.2.6 Pengujian Hasil Sintesis (11a-c) terhadap <i>M. tuberculosis</i> Secara <i>in vitro</i>	24
BAB IV HASIL DAN PEMBAHASAN	25
4.1 Sintesis <i>N</i> -Benzil-5,7-dibromosatin (12b)	25
4.2 Sintesis <i>N</i> -4-bromobenzil-5,7-dibromoisatin (12c)	27
4.3 Sintesis 2-isonikotinohidrazon-5,7-dibromoisatin (11a)	31
4.4 Sintesis 2-isonikotinohidrazon-(<i>N</i> -benzil)-5,7-dibromoisatin (11b)	35
4.5 Sintesis 2-isonikotinohidrazon-(<i>N</i> -4-bromobenzil)-5,7-dibromoisatin (11c)	38
4.6 Pengujian Hasil Sintesis (11a-c) terhadap <i>M. tuberculosis</i> Secara <i>in vitro</i>	43

BAB V KESIMPULAN DAN SARAN	47
5.1 Kesimpulan	47
5.2 Saran	47
DAFTAR PUSTAKA	49
LAMPIRAN	55

DAFTAR GAMBAR

Gambar 1.1	Analisa retrosintesis turunan isoniazid (11a-c)	6
Gambar 2.1	Struktur dinding sel <i>M. tuberculosis</i>	13
Gambar 2.2	Data pergeseran kimia dalam ^1H NMR	19
Gambar 2.3	Data pergeseran kimia dalam ^{13}C NMR	19
Gambar 4.1	KLT sintesis <i>N</i> -benzil-5,7-dibromoisatin (12b)	25
Gambar 4.2	KLT <i>N</i> -benzil-5,7-dibromoisatin (12b) hasil sintesis	26
Gambar 4.3	Spektrum ^1H -NMR <i>N</i> -benzil-5,7-dibromoisatin (12b)	27
Gambar 4.4	Usulan mekanisme umum reaksi benzilasi 5,7-dibromoisatin (12b-c)	27
Gambar 4.5	KLT sintesis <i>N</i> -4-bromobenzil-5,7-dibromoisatin (12c)	28
Gambar 4.6	KLT <i>N</i> -4-bromobenzil-5,7-dibromoisatin (12c) hasil sintesis	29
Gambar 4.7	Spektrum ^1H -NMR <i>N</i> -4-bromobenzil-5,7-dibromoisatin (12c)	30
Gambar 4.8	Spektrum ^{13}C -NMR <i>N</i> -4-bromobenzil-5,7-dibromoisatin (12c)	31
Gambar 4.9	KLT sintesis 2-isonikotinohidazon-5,7-dibromoisatin (11a)	32
Gambar 4.10	Hasil uji kemurnian 2-isonikotinohidazon-5,7-dibromoisatin (11a) hasil intesis	32
Gambar 4.11	KLT 2-isonikotinohidazon-5,7-dibromoisatin (11a) hasil sintesis	32
Gambar 4.12	Spektrum HRMS padatan hasil sintesis 2-isonikotinohidazon-5,7-dibromoisatin (11a)	33
Gambar 4.13	Usulan mekanisme reaksi pembentukan turunan isoniazid (11a-c)	34
Gambar 4.14	Spektrum ^1H -NMR 2-isonikotinohidazon-5,7-dibromoisatin (11a)	35

Gambar 4.15	KLT Sintesis 2-isnikotinohidazon-(<i>N</i> -benzil)-5,7-dibromoisatin (11b)	36
Gambar 4.16	KLT 2-isnikotinohidazon-(<i>N</i> -benzil)-5,7-dibromoisatin (11b) hasil sintesis	36
Gambar 4.17	Spektrum HRMS 2-isnikotinohidazon-(<i>N</i> -benzil)-5,7-dibromoisatin (11b) hasil sintesis	37
Gambar 4.18	Spektrum 1H-NMR 2-isnikotinohidazon-(<i>N</i> -benzil)-5,7-dibromoisatin (11b)	38
Gambar 4.19	KLT sintesis 2-isnikotinohidazon-(<i>N</i> -4-bromobenzil)-5,7-dibromoisatin (11c)	39
Gambar 4.20	KLT 2-isnikotinohidazon-(<i>N</i> -4-bromobenzil)-5,7-dibromoisatin (11c) hasil sintesis	39
Gambar 4.21	Spektrum HRMS 2-isnikotinohidazon-(<i>N</i> -4-bromobenzil)-5,7-dibromoisatin (11c) hasil sintesis	40
Gambar 4.22	Spektrum ¹ H-NMR 2-isnikotinohidazon-(<i>N</i> -4-bromobenzil)-5,7-dibromoisatin (11c)	41
Gambar 4.23	Spektrum ¹³ C-NMR 2-isnikotinohidazon-(<i>N</i> -4-bromobenzil)-5,7-dibromoisatin (11c)	42
Gambar 4.24	Spektrum dept-135 2-isnikotinohidazon-(<i>N</i> -4-bromobenzil)-5,7-dibromoisatin (11c)	42

DAFTAR TABEL

Tabel 1.1	Data bioaktivitas hidrazona dari turunan isatin (7a-d) terhadap <i>Bacillus subtilis</i> ATCC6633	3
Tabel 1.2	Data aktivitas biologis turunan hidrazona (8a-c) terhadap <i>M. tuberculosis</i> H ₃₇ Rv	3
Tabel 1.3	Data aktivitas biologis turunan hidrazona (10a-f) terhadap bakteri <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	5
Tabel 2.1	Karakteristik serapan IR gugus fungsi	17
Tabel 4.1	Data perbandingan 1H-NMR hasil benzilasi 7,7-dibromoisatin (12b-c)	30
Tabel 4.2	Tabel perbandingan data 1H-NMR turunan isoniazid (11a-c) hasil sintesis	41
Tabel 4.3	Hasil pengujian anti-tuberkular senyawa (11a-c) terhadap M. tuberkulosis	44

DAFTAR LAMPIRAN

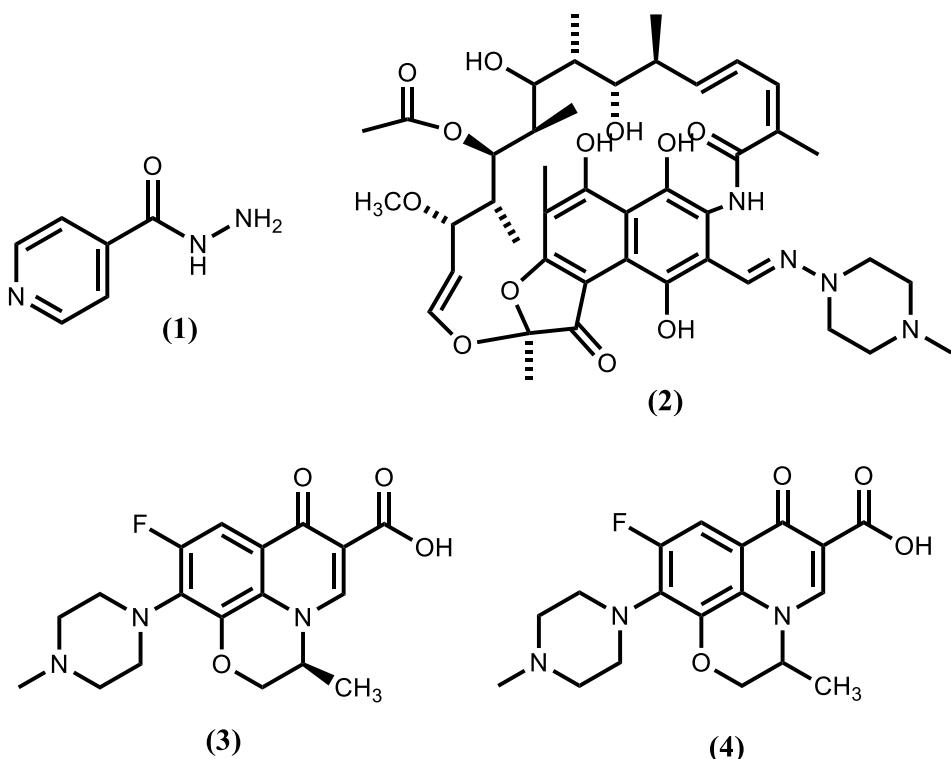
LAMPIRAN A SKEMA KERJA	55
A.1 Prosedur Sintesis <i>N</i> -benzil-5,7-dibromoisatin (12b)	55
A.2 Prosedur Sintesis (<i>N</i> -4-bromobenzil)-5,7-dibromoisatin (12c)	56
A.3 Prosedur Sintesis 2-Isonikotinohidazon-5,7-dibromoisatin (11a)	57
A.4 Prosedur Sintesis 2-Isonikotinohidazon-3-(<i>N</i> -benzil)-5,7-dibromoisatin (11b)	58
A.5 Prosedur Sintesis 2-Isonikotinohidazon-3-5-(<i>N</i> -4-bromobenzil)-5,7-dibromoisatin (11c)	59
A.6 Pengujian Hasil Sintesis (11-c) terhadap <i>M. tuberculosis</i> Secara <i>in vitro</i>	60
LAMPIRAN B PERHITUNGAN RENDEMEN	61
B.1 Perhitungan Rendemen Hasil <i>N</i> -benzil-5,7-Dibromoisatin (12b)	61
B.2 Perhitungan Rendemen Hasil <i>N</i> -4-bromobenzil-5,7-Dibromoisatin (12c)	62
B.3 Perhitungan Rendemen Hasil 2-isonikotinohidazon-5,7-dibromoisatin (11a)	63
B.4 Perhitungan Rendemen Hasil 2-isonikotinohidazon-(<i>N</i> -benzil)-5,7-dibromoisatin (11b)	64
B.5 Perhitungan Rendemen Hasil 2-isonikotinohidazon-(<i>N</i> -4-bromobenzil)-5,7-dibromoisatin (11c)	65

BAB I

PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

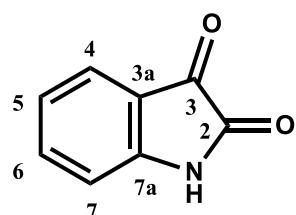
Tuberkulosis (TB) merupakan salah satu penyakit infeksi yang mengancam kesehatan di seluruh dunia. Penyakit TB disebabkan oleh bakteri gram positif *Mycobacterium tuberculosis* yang biasanya menyerang paru-paru (Aboul-Fadl *et al.*, 2010a). Organisasi kesehatan dunia (WHO) melaporkan bahwa pada tahun 2014 terdapat 6,3 juta orang terinfeksi penyakit tuberkulosis yang terdiri dari 6 juta merupakan kasus baru dan kambuh serta 260.715 orang merupakan kasus lama. Indonesia menempati posisi tiga besar sebagai negara dengan penderita tuberkulosis terbesar dengan jumlah 324.539 orang terinfeksi penyakit tuberkulosis yang terdiri dari 322.806 kasus baru dan kambuh serta 1.733 merupakan kasus lama (WHO, 2015).



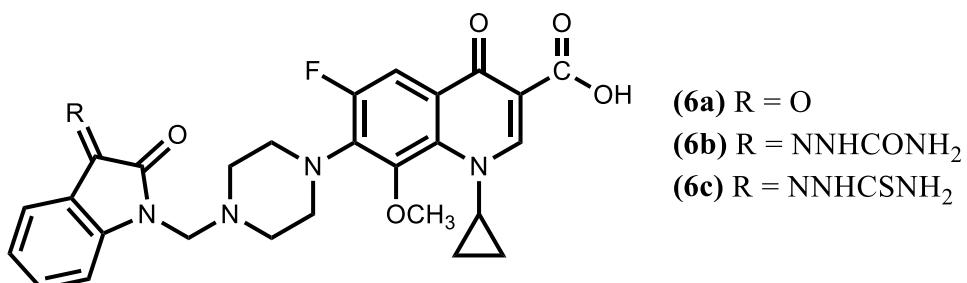
Resistansi muncul terhadap obat golongan utama antituberkulosis seperti isoniazid (1), dan rifampisin (2) yang dikenal sebagai *multi drug-resistant* (MDR), dan juga terdapat resistansi terhadap isoniazid (1), rifampisin (2), dan golongan

floroquinolona seperti lefloksin (3) dan oflakasin (4) yang disebut *extensively drug-resistant* (XDR). WHO melaporkan bahwa pada tahun 2014 penderita MDR-TB di Indonesia berjumlah 1.182 orang. Penyebab utama resistansi adalah mutasi gen secara alami, ketidakpatuhan terapi, dan penggunaan obat yang tidak teratur (Schneider *et al.*, 2005; Marriner *et al.*, 2011). Terlepas dari meningkatnya jumlah resistansi terhadap obat anti-TB, belum ada obat TB baru yang diluncurkan selama empat dekade. Pengembangan senyawa-senyawa baru anti-TB yang aman dan efektif sangat diperlukan untuk menangani penyakit yang diakibatkan *M. tuberculosis* (Dixit *et al.*, 2006).

Isatin atau 1*H*-indola-2,3-diona (5) tersusun atas cincin pirola dan cincin benzena dengan gugus fungsi karbonil dan amida (Pal *et al.*, 2011; Nain, 2014). Gugus karbonil isatin (5) dan turunannya pada posisi C-3 dapat mengalami reaksi kondensasi dengan nukleofil, dan hasil yang diperoleh dapat meningkatkan aktivitas biologis (Rehn, 2004; Maamari, 2013; Aboul-Fadl *et al.*, 2015). Feng *et al.* (2011) melaporkan bahwa hidrazona (6c) (MIC 6,75 μM) dan (6b) (MIC 6,93 μM) memiliki aktivitas biologis terhadap *M. tuberculosis* 09710 yang lebih baik dari pada senyawa (6a) (MIC 30,77 μM), isoniazid (1) (MIC 467 μM), dan rifampisin (2) (MIC >311 μM).

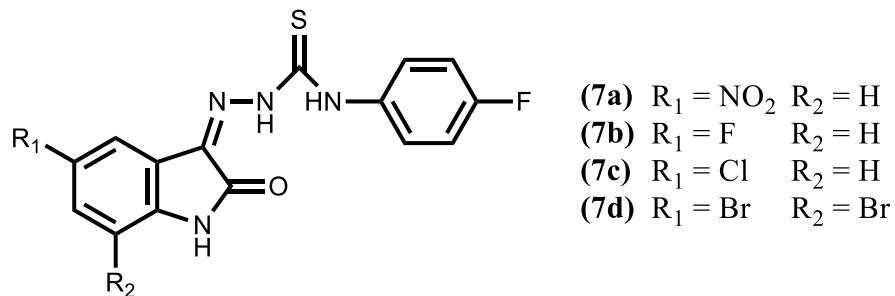


(5)



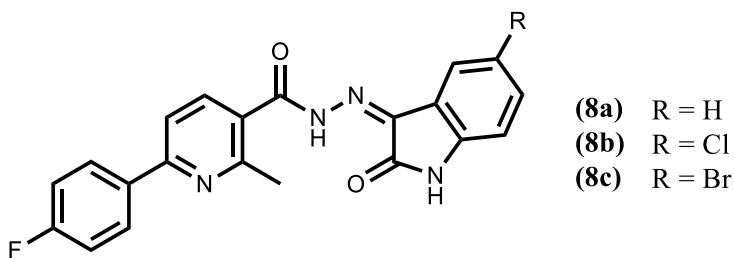
Zhang *et al.* (2015) melaporkan bahwa turunan isatin (7a-d) mempunyai bioaktivitas terhadap bakteri gram positif *Bacillus subtilis* dengan data sebagaimana

dapat dilihat pada Tabel 1.1. Data menunjukkan isatin (**7d**) dengan gugus pensubtitusi dibromo pada C-5 dan C-7 lebih aktif daripada isatin (**7a-c**). Eldehna *et al.* (2015) melaporkan bahwa hidrazone (**8a-c**) memiliki aktivitas biologis sebagai antituberkulosis terhadap bakteri *M. tuberculosis* H37Rv. Hidrazone (**8c**) dengan gugus pensubtitusi bromo lebih aktif daripada hidrazone (**8a-b**), sebagaimana dapat dilihat pada Tabel 1.2.



Tabel 1.1 Data bioaktivitas turunan isatin (**7a-d**) terhadap *Bacillus subtilis* ATCC6633

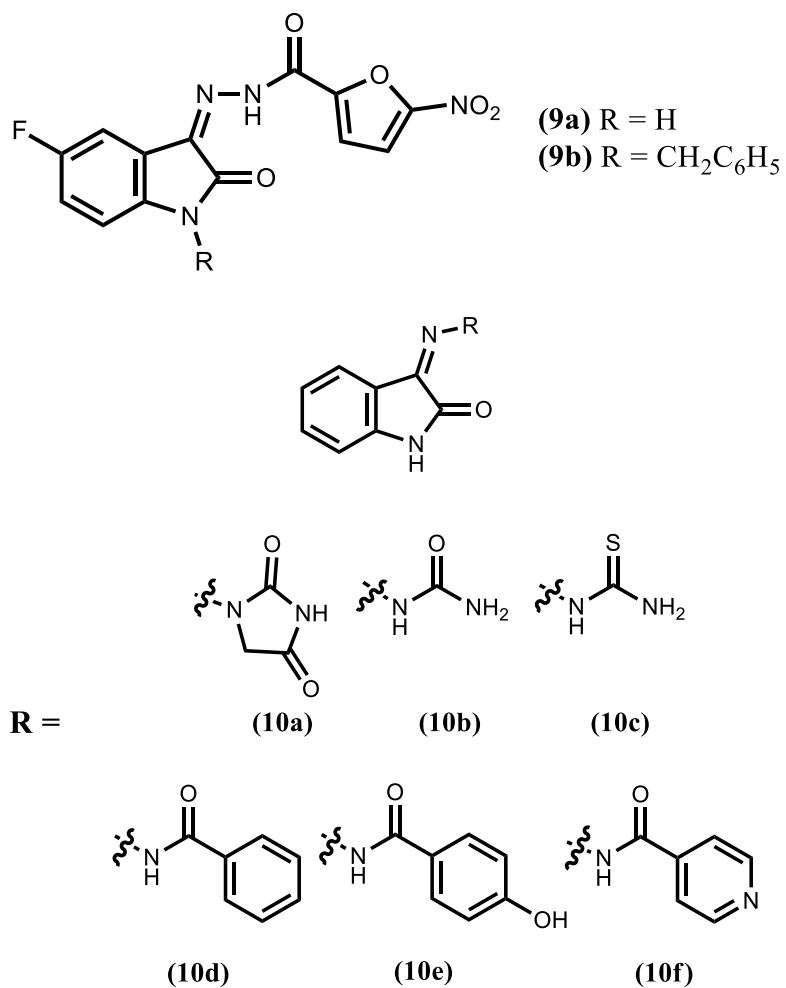
Senyawa	MIC (mg/L)
(7a)	25
(7b)	25
(7c)	6,25
(7d)	1,56



Tabel 1.2 Data aktivitas biologis turunan hidrazone (**8a-c**) terhadap *M. tuberculosis* H37Rv

Senyawa	MIC (μ g/mL)
(8a)	25
(8b)	12,5
(8c)	6,25

Aboul-Fadl *et al.* (2015) mendapatkan bahwa hidrazone dari 5-floroisatin (**9a-b**) memiliki aktivitas terhadap bakteri *M. tuberculosis* H₃₇Rv, hidrazone dengan gugus *N*-benzil (**9b**) menunjukkan MIC yang lebih rendah (MIC 0,156 µg/mL) daripada senyawa (**9a**) dengan MIC 5 µg/mL. Tehrani *et al.* (2016) berhasil mensintesis dan menguji aktivitas biologis hidrazone (**10**) terhadap bakteri gram negatif *Pseudomonas aeruginosa*. Hasil uji sebagaimana dapat dilihat pada Tabel 1.3 menunjukkan bahwa bioaktivitas hidrazone (**10f**) lebih baik dari pada senyawa lain (**10a-e**). Hal ini menunjukkan bahwa hidrazone hasil reaksi isatin (**5**) dengan nukleofil isoniazid (**1**) memiliki aktivitas biologis yang lebih baik daripada hidrazone hasil reaksi dengan nukleofil yang lain.

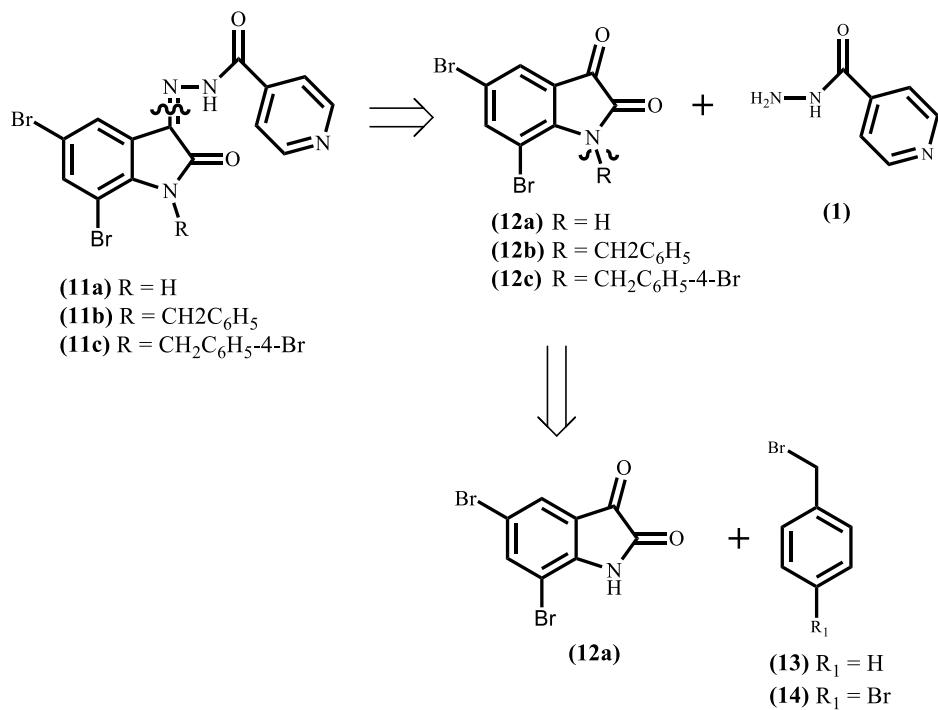


Tabel 1.3 Data bioaktivitas turunan hidrazona (**10a-f**) terhadap bakteri *Pseudomonas aeruginosa*

Senyawa	MIC ($\mu\text{g/mL}$)
(10a)	12,5
(10b)	25
(10c)	12,5
(10d)	>50
(10e)	>50
(10f)	6,25

1.2 Permasalahan

Studi literatur di atas menunjukkan bahwa bioaktivitas isatin (**5**) secara efektif dapat ditingkatkan dengan adanya gugus pensubstitusi dibromo pada posisi C-5, C-7, *N*-benzil dan isoniazid. Sehubungan dengan fakta tersebut, maka turunan isoniazid (**11a-c**) diperkirakan mempunyai bioaktivitas terhadap bakteri *M. tuberculosis* yang lebih baik, dan dapat disintesis dengan pendekatan analisis retrosintesis seperti dapat dilihat pada Gambar 1.1. Permasalahan yang diangkat dalam penelitian adalah bagaimana mensintesis turunan isoniazid (**11a-c**) yang mempunyai gugus *N*-benzil dan isoniazid dengan bahan dasar 5,7-dibromoisatin (**12a**).



Gambar 1.1. Analisis retrosintesis turunan isoniazid (**11a-c**)

1.3 Tujuan Penelitian

Penelitian bertujuan untuk mendapatkan (*N*-benzil)-5,7-dibromoisatin (**12b**), (*N*-4-bromobenzil)-5,7-dibromoisatin (**12c**), turunan isoniazid baru (**11a-c**), serta mendapatkan data bioaktivitas senyawa (**11a-c**) terhadap *M. tuberculosis*.

1.4 Manfaat Penelitian

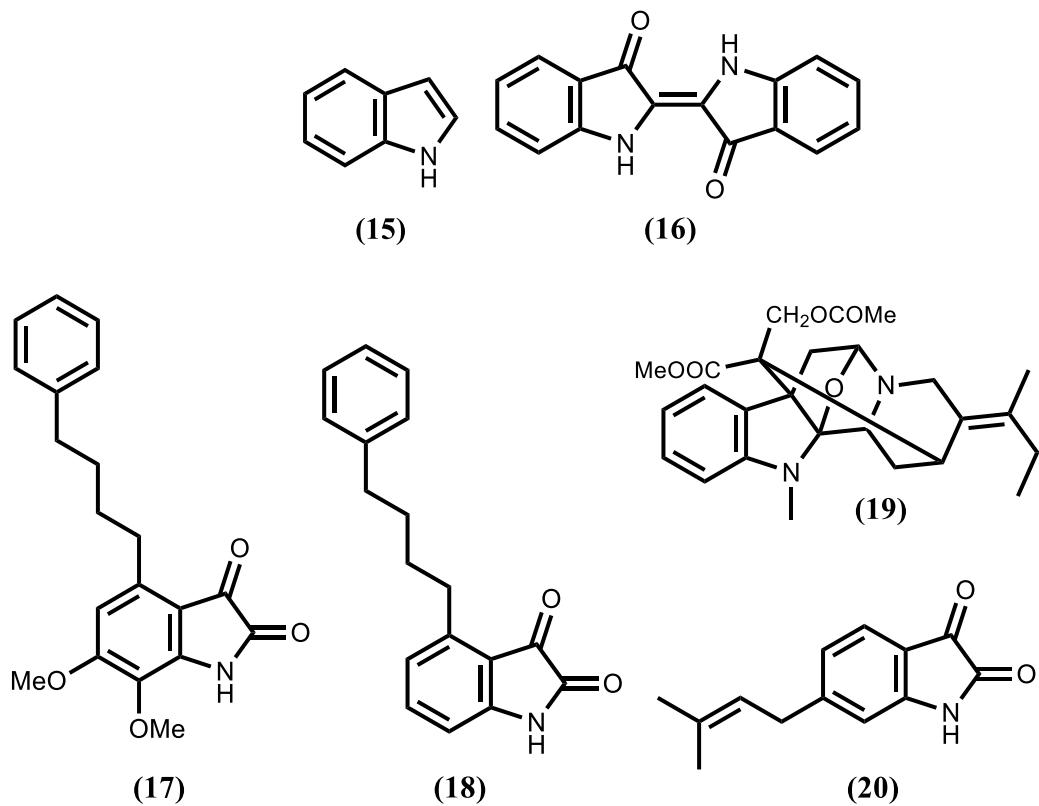
Penelitian yang dilakukan diharapkan mendapatkan senyawa turunan isoniazid (**11a-c**) yang aktif sebagai antituberkulosis baru.

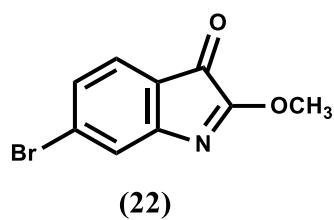
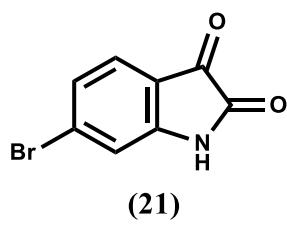
BAB 2

KAJIAN PUSTAKA DAN DASAR TEORI

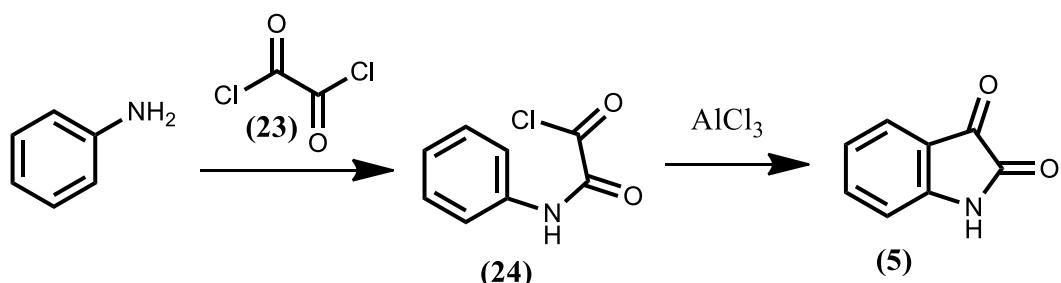
2.1 Isatin (5)

Isatin (*1H-indol-2,3-dion*) (5) merupakan senyawa dengan kerangka indola (15) yang mempunyai gugus fungsi karbonil dan amida (Nain, 2014). Isatin (5) pertama kali ditemukan oleh Erdman dan Laurent sebagai hasil oksidasi indigo (16) (Da Silva *et al.* 2001). Cincin isatin (5) antara lain dijumpai dalam senyawa bahan alam meloisatin A (17), meloisatin B (18) dan pikratidin (19) yang terdapat pada tanaman *Melochia tumentosa* dan *Picralima nitida*. 6-(3'-Metil-butien-2'-il)isatin (20), 6-bromoisatin (21) dan 6-bromo-2-metoksi-3*H*-indol-3-on (22) dijumpai pada bakteri *Streptomyces albus* dan telur dari kerang laut *Dicathais orbita* (Ansaa-Asamoah *et al.*, 2014; Beckman, 2005; Benkendorff *et al.*, 2001).

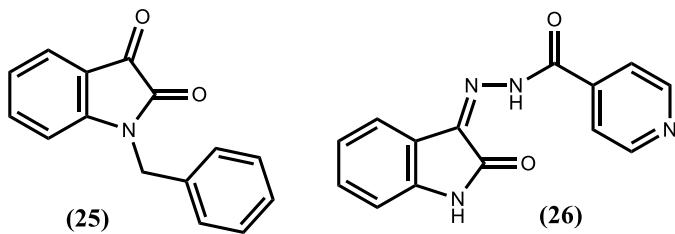




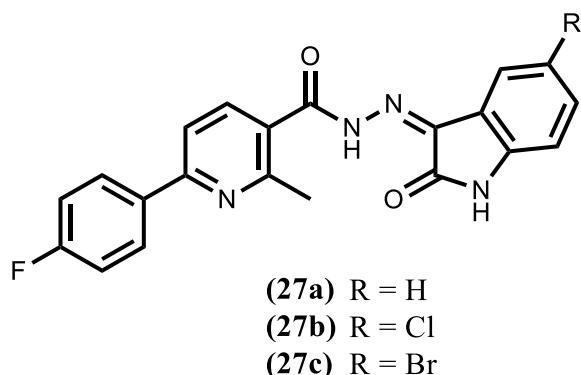
Isatin (**5**) juga dapat diperoleh dengan Metode Stolle yang melibatkan reaksi anilina dengan oksalil klorida (**23**) menjadi 2-okso-2-(fenilamino)asetil klorida (**24**) yang selanjutnya diikuti dengan asilasi Friedel-Craft intramolekular menggunakan katalis asam kuat lewis sehingga diperoleh isatin (**5**) (Beckman, 2005).

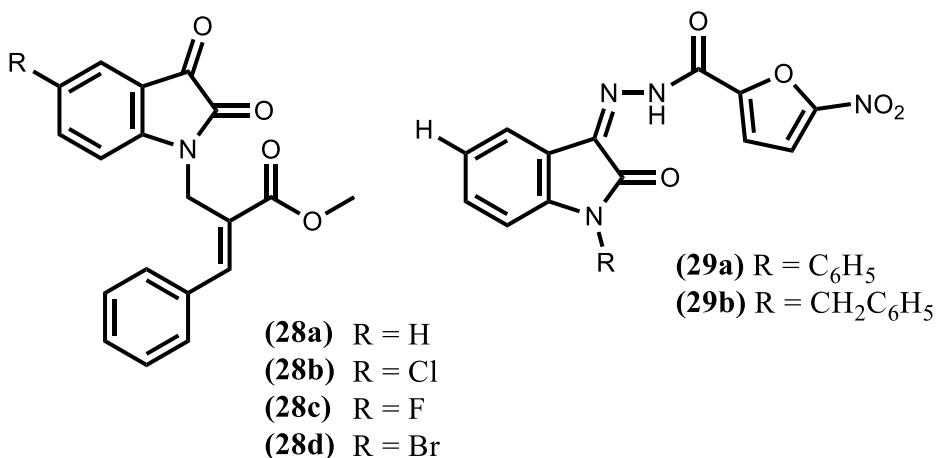


Isatin (**5**) dapat mengalami reaksi substitusi elektrofilik pada cincin benzen, reaksi substitusi nukleofilik pada gugus keton, reaksi *N*-alkilasi atau *N*-asilasi pada gugus nitrogen amida (Pal *et al.*, 2011). Nitrasi isatin (**5**) dilakukan dari mereaksikan isatin (**5**) dengan KNO₃ dalam asam sulfat pekat menghasilkan 5-nitroisatin (Vine *et al.*, 2007a). Alkilasi isatin (**5**) dapat dilakukan dengan reaksi isatin (**5**) dengan basa seperti natrium hidrida sehingga terbentuk garam natrium isatin yang selanjutnya direaksikan dengan alkil bromida (**13**) sehingga diperoleh *N*-alkil isatin (**25**) (Clay *et al.*, 2012). Isatin (**5**) bereaksi dengan isoniazid (**1**) dalam pelarut etanol dengan katalis asam asetat glasial menghasilkan isatin-3-isoniicotinohidazon (**26**). Reaksi tersebut menunjukkan bahwa gugus keton pada posisi C-3 dari isatin (**5**) sebagai elektrofil dapat bereaksi dengan nukleofil (Aboul-Fadl *et al.*, 2003).



Isatin (**5**) dan turunannya memiliki bioaktivitas sebagai antituberkular dan aktivitasnya dapat ditingkatkan dengan modifikasi gugus fungsi pada cincin isatin. Gugus halogen pada cincin benzena dari isatin (**5**) diketahui dapat meningkatkan aktivitas biologis dari isatin (**5**) dan turunannya (Pahlavani *et al.*, 2015; Vine *et al.*, 2013). Turunan isatin (**27b**) (MIC 12,5 $\mu\text{g/mL}$) dan (**27c**) (MIC 6,25 $\mu\text{g/mL}$) masing-masing dengan adanya gugus kloro dan bromo pada C-5 lebih aktif terhadap bakteri *M. tuberculosis* daripada senyawa (**27a**) (MIC 25 $\mu\text{g/mL}$) (Eldehna *et al.*, 2015). Kumar *et al.*, (2014) melaporkan bahwa turunan isatin (**28b-d**) (MIC 12,5 $\mu\text{g/mL}$) lebih aktif terhadap *M. tuberculosis* H₃₇Rv ATCC 27294 daripada senyawa (**28a**) (MIC 25 $\mu\text{g/mL}$) tanpa gugus halogen pada C-5. *N*-alkilasi juga dapat meningkatkan bioaktivitas, sebagai contoh bioaktivitas *N*-(fenil-2-oksoindolin-3-ilidena)-5-nitrofuran-2-karbohidrazida (**29a**) (MIC 5 $\mu\text{g/mL}$) terhadap bakteri *M. tuberculosis* H₃₇Rv lebih rendah daripada *N*-(benzil-2-oksoindolin-3-ilidena)-5-nitrofuran-2-karbohidrazida (**29b**) (MIC 0,156 $\mu\text{g/mL}$).



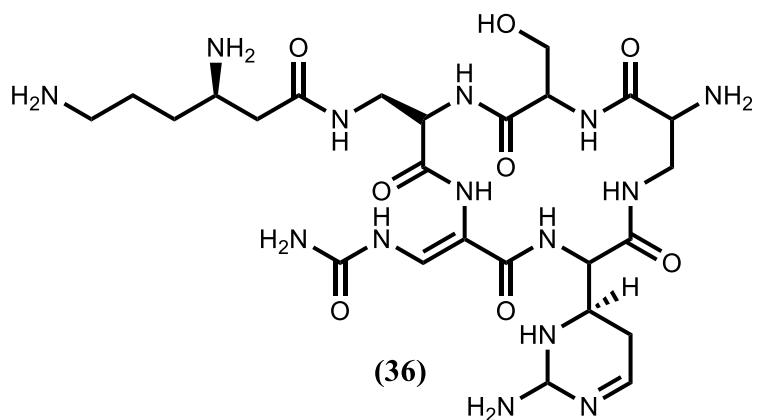
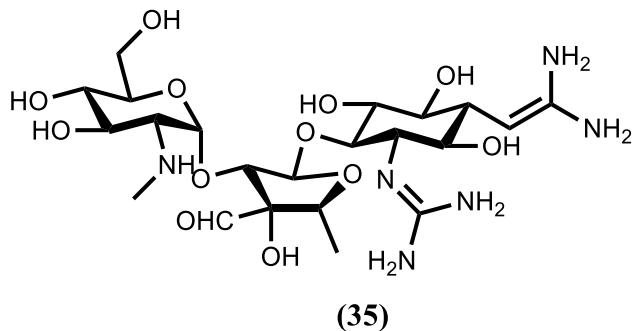
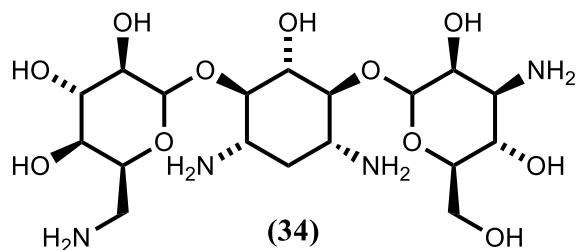
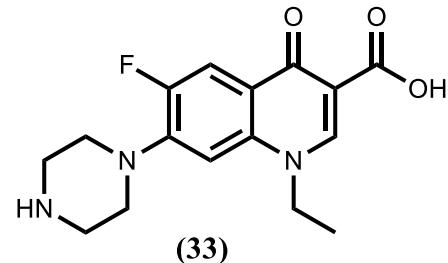
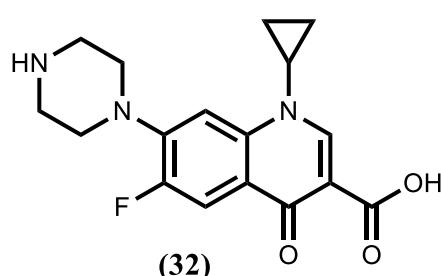
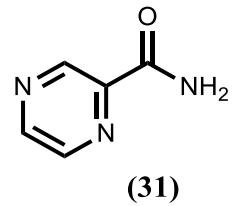
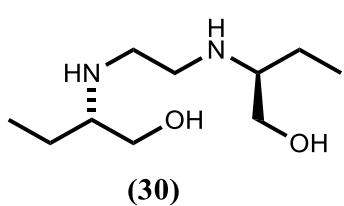


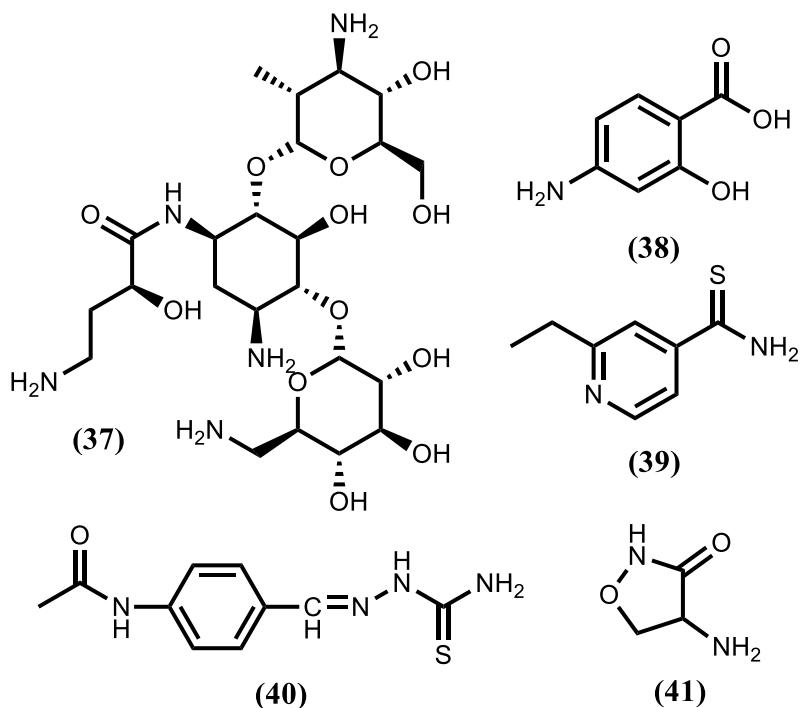
2.2 Tuberkulosis

Tuberkulosis (TBC atau TB) adalah penyakit infeksi yang termasuk sepuluh besar sebagai penyebab kematian. Tuberkulosis merupakan penyakit menular yang disebabkan oleh *Mycobacterium tuberculosis* dengan gejala yang bervariasi, dan dapat mengenai semua organ tubuh dengan lokasi terbanyak pada organ paru-paru (90%) (WHO, 2015; Mansjoer, 2000). Tuberkulosis paru adalah penyakit infeksi yang menyerang pada saluran pernafasan (Smeltzer *et al.*, 2010). Penyakit TB dapat ditularkan melalui udara. Penyakit TB dapat meningkatkan resiko terkena *Human Immunodeficiency Virus* (HIV) (Wells *et al.*, 2009).

Obat anti-TB (OAT) lini pertama (*first-line*) merupakan obat yang lebih efektif dan lebih aman digunakan daripada lini kedua (*second-line*). Isoniazid (**1**), rifampisin (**2**), etambutol (**30**) dan pirazinamida (**31**) termasuk obat yang paling penting dari lini pertama. Obat lini kedua digunakan ketika pasien resisten atau tidak dapat mentoleransi obat lini pertama. Obat lini kedua pada umumnya kurang efektif dan mempunyai efek samping yang lebih besar. Golongan florokuinolona seperti siproflaksin (**32**) dan norfloksasin (**33**) baru-baru ini diperkenalkan sebagai obat antituberkular berdasarkan aktivitas antibakteri yang baik. Obat suntik termasuk aminoglikosida kanamisin (**34**), streptomisin (**35**), polipeptida sapreomisin (**36**), dan amikasin (**37**) sangat efektif, tetapi efek samping yang besar membuat senyawa ini termasuk OAT lini kedua. Asam *p*-aminosalisilat (**38**), etionamida (**39**), tiasetazon (**40**), dan sikloserina (**41**) termasuk obat lini kedua yang banyak digunakan (Aboul-Fadl dan Bin-Jubair, 2010b; Chisholm-Burns *et al.*,

2013; Marriner *et al.*, 2011). Obat anti-TB (OAT) memiliki mekanisme kerja yang berbeda-beda.





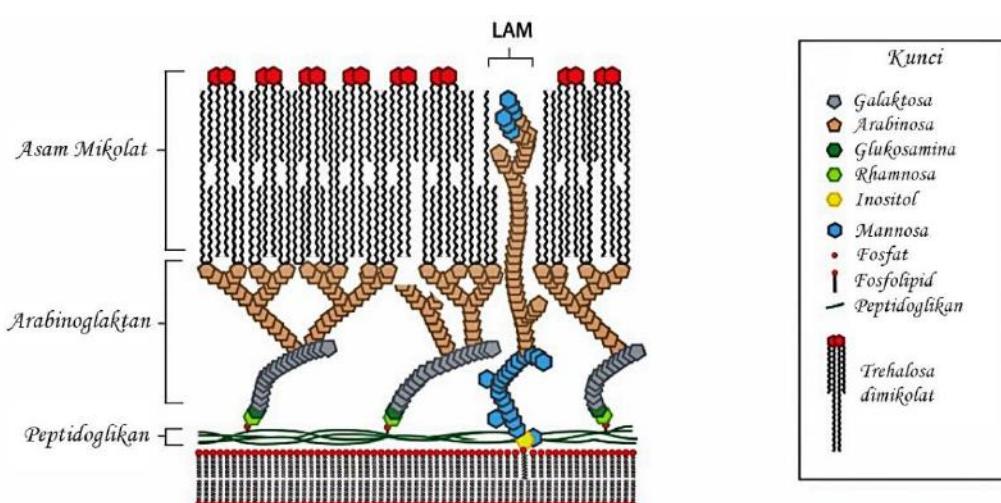
Resistensi obat anti-TB disebabkan bakteri *M. tuberculosis* telah mengalami kekebalan terhadap obat anti-TB, dan merupakan masalah yang sangat serius. Resistensi terhadap obat anti-TB terdapat dalam bentuk *multi-drug resistant tuberculosis* (MDR-TB) dan *extensively drug-resistant tuberculosis* (XDR-TB). MDR-TB merupakan kekebalan bakteri *M. tuberculosis* terhadap obat lini pertama seperti isoniazid (**1**) dan rifampisin (**2**), sedangkan XDR-TB adalah kekebalan bakteri *M. tuberculosis* terhadap isoniazid (**1**) dan rifampisin (**2**) serta salah satu obat lini kedua seperti golongan florokuinolona atau setidaknya salah satu dari obat suntik seperti amikasin (**37**) (Raviglione, 2010).

2.3 Bakteri *Mycobacterium tuberculosis*

M. tuberculosis atau “Basil Koch” pertama kali ditemukan oleh Robert Koch pada tahun 1882, bakteri ini penyebab penyakit tuberkulosis. *M. tuberculosis* termasuk jenis bakteri yang membutuhkan oksigen untuk pertumbuhannya (aerob), tidak membentuk spora dan tidak bergerak, berbentung batang, dan non motil. *M. tuberculosis* hidup dengan baik pada lingkungan yang lembab, pada tubuh manusia serta hewan. Bakteri ini tidak tahan terhadap sinar matahari (Kayser *et al.*, 2005; Pieters *et al.*, 2013).

Genus *mycobacterium* termasuk basil gram positif yang menunjukkan karakteristik pewarnaan tahan asam. Dinding sel terdiri dari peptidoglikan dan mirip dengan organisme gram positif lainnya yang banyak mengandung polisakarida dengan rantai bercabang, protein dan lipid (Ryan dan Ray, 2010).

M. tuberculosis berbentuk batang ramping dan melengkung dengan lebar 0,3–0,6 μm dan panjang 1–4 μm . Dinding sel *M. tuberculosis* mengandung peptidoglikan tebal, sehingga *M. tuberculosis* diklasifikasikan ke dalam bakteri gram positif (Kayser *et al.*, 2005). Penyusun utama dinding sel *M. tuberculosis* ialah asam mikolat, lilin kompleks (complex-waxes), trehalosa dimikolat yang disebut “cord factor”, dan *mycobacterial sulfolipids*. Unsur lain yang terdapat pada dinding sel bakteri tersebut adalah polisakarida seperti arabinogalaktan dan arabinomanan. Gambar 2.1 menggambarkan struktur dinding sel khas untuk *M. tuberculosis*. Asam mikolat yang memiliki rantai yang sangat panjang (C₆₀ sampai C₉₀) dihubungkan dengan arabinogalaktan oleh ikatan glikolipid dan peptidoglikan oleh jembatan fosfodiester. Struktur dinding sel yang kompleks menyebabkan bakteri *M. tuberculosis* bersifat tahan asam, yaitu apabila sekali diwarnai, tahan terhadap upaya penghilangan zat warna karbolfuchsin dengan larutan alkohol asam. Struktur dinding sel yang tidak biasa ini menyebabkan *mycobacterium* dengan ketahanan terhadap dehidrasi, asam, dan alkali (Parish *et al.*, 2001; Dangerfield *et al.*, 2010; Pieters *et al.*, 2013).



Gambar 2.1 Struktur dinding sel *M. tuberculosis*

Bakteri *M. tuberculosis* strain H₃₇ pertama kali didapatkan dari pasien TB pada tahun 1905 oleh Edward R. Baldwin. Strain H₃₇ memiliki dua varian yaitu varian "R" yang menunjukkan tahan terhadap lingkungan dan "S" yang menunjukkan peka terhadap lingkungan. Untuk menunjukkan virulensi atau avirulensi, ditambahkan huruf (v) atau (a) sehingga menjadi "Rv" dan "Ra". Varian "R" dan "S" diklasifikasikan kedalam gram positif dan *acid fast*. Varian "S" berbentuk batang padat, kadang-kadang sedikit melengkung dan panjangnya bervariasi dari 2 sampai 5 mikron. Varian "S" sangat stabil pada media alkali. Varian "R" adalah pleomorfik, ukuran bervariasi dari 3 sampai 10 mikron. Varian "R" sangat stabil pada media asam (Steenken *et al.*, 1943; Loerger *et al.*, 2010; Bouwman *et al.*, 2012).

Isoniazid (**1**) memiliki struktur yang terdiri dari cincin piridin dan gugus hidrazida yang memiliki peranan penting untuk melawan *M. tuberculosis*. Resistensi isoniazid (**1**) disebabkan oleh mutasi gen pada *oxyR-ahpc*, *furA*, *katG*, *kasA*, *iniA*, *iniB*, *iniC*, *ndh*, dan *inhA*. Mutasi gen terjadi pada gen *katG* sebesar 50-95%; gen *inhA* sebesar 8-43% dan sisanya pada gen lain. Mekanisme kerja isoniazid (**1**) adalah dengan menghambat biosintesis asam mikolat (Ramaswamy dan Musser, 1998; Zhang dan Yew, 2009).

Gen *InhA* merupakan gen pengkode enzim enoil reduktase yang berperan dalam biosintesis asam mikolat. Ikatan isoniazid (**1**) diaktifasi untuk membentuk kompleks terner INH-NADH sehingga menghasilkan penghambatan biosintesis asam mikolat. Gen *katG* merupakan gen pengkode enzim katalase peroksidase yang digunakan untuk mengaktifasi isoniazid (**1**). Enzim katalase peroksidase digunakan untuk mengaktifasi isoniazid (**1**) menjadi isonikotinat asil yang akan menghambat biosintesis asam mikolat dan terganggunya biosintesis asam mikolat mengakibatkan kematian bakteri. Hilangnya aktivitas enzim katalase peroksidase dan mutasi gen *katG* akan mengakibatkan resistensi isoniazid (**1**) (Ramaswamy dan Musser, 1998; Da Silva *et al.*, 2011)

Rifampin (RIF) (**2**) atau rifampisin (**2**) merupakan obat TB lini pertama. Tindakan bakterisida yang sangat efektif dari obat ini terhadap *M. tuberculosis* telah menjadikannya komponen kunci terapi. Mekanisme aktivitas RIF dan resistensi telah dipelajari secara ekstensif di *Escherichia coli*. RIF berikatan dengan gen *rpoB*

yang mengkode subunit β -polimerase asam ribonukleat (RNA) yang mengakibatkan penghambatan inisiasi transkripsi dari mRNA. (Da Silva *et al.*, 2011).

2.4 Kromatografi

Kromatografi merupakan metode pemisahan yang didasarkan atas perbedaan laju perpindahan dari komponen-komponen dalam campuran diantara fase diam (dapat berupa zat cair atau zat padat) dan fase gerak (dapat berupa gas atau zat cair) (Johnson and Stevenson, 1991). Kromatografi lapis tipis (KLT) yang pertama kali dikembangkan oleh Ismailoff dan Schraibar pada tahun 1938 adalah salah satu jenis kromatografi. Metode kromatografi ini sederhana, murah, dan waktu analisis yang relatif singkat. Fasa diam yang umum dipakai untuk kromatografi lapis tipis adalah silika gel (Gritter *et al.*, 1991). KLT dilakukan dengan menotolkan sampel pada plat KLT yang selanjutnya plat KLT dimasukkan ke dalam *chamber* yang berisi eluen atau fasa gerak. *Chamber* tersebut dijenuhi dengan uap eluen dengan bantuan kertas saring yang diletakkan berdiri di sekeliling permukaan bagian dalam *chamber*, sehingga dihasilkan pemisahan yang baik dan dapat diulang (*reproducible*) (Hostettmann *et al.*, 1995). Senyawa yang bersifat non polar akan terelusi dengan cepat dibandingkan senyawa yang bersifat polar, senyawa yang polar akan terikat pada plat silika yang mengandung silanol (SiOH₂) yang pada dasarnya memiliki afinitas yang kuat dengan senyawa polar. Penampakan noda dapat diamati langsung dengan lampu UV pada panjang gelombang pendek (254 nm) atau pada panjang gelombang (366 nm). Cara ini biasanya digunakan untuk senyawa-senyawa yang memiliki ikatan rangkap terkonjugasi, plat KLT dapat berflourosensi saat diletakkan di bawah lampu UV dengan tanda noda berwarna gelap (Sherma dan Fried, 2003). Iodina juga dapat digunakan sebagai penampak noda. Iodin bereaksi dengan sebagian besar senyawa organik membentuk warna kuning atau coklat (Kristanti, 2008). Nilai Rf (*Retention Factor*) pada KLT didefinisikan sebagai rasio jarak noda terhadap titik awal dibagi jarak eluen terhadap titik awal. Nilai Rf dapat memiliki nilai yang berbeda dalam uji KLT yang sama, akibat perbedaan kejenuhan eluen dalam *chamber*, komposisi eluen, dan suhu (Sherma dan Fried, 2003).

KLT dua arah atau dua dimensi digunakan untuk analisis sampel dengan komponen-komponen yang mempunyai sifat kimia dan nilai Rf yang hampir sama. KLT dua dimensi dilakukan dengan cara menotolkan noda plat KLT yang berbentuk persegi empat yang selanjutnya dimasukkan ke dalam chamber yang telah berisi eluen pertama. Plat KLT selanjutnya diputar 90° dan dimasukkan ke dalam chamber yang telah berisi eluen kedua (Rohman, 2007).

2.5 Identifikasi Hasil Sintesis

2.5.1 Identifikasi Hasil Sintesis dengan Spektroskopi Inframerah (IR)

Spektroskopi inframerah merupakan suatu metode identifikasi yang digunakan untuk mengetahui gugus fungsi. Identifikasi dengan spektroskopi inframerah didasarkan pada vibrasi internal atom suatu gugus fungsi. Radiasi inframerah yang dilewatkan melalui suatu cuplikan, menyebabkan inti-inti atom yang terikat secara kovalen dapat menyerap energi inframerah dan terjadilah transisi dari tingkat vibrasi dasar (*ground state*) menuju tingkat vibrasi tereksitasi (*excited state*). Tipe ikatan bersifat spesifik terhadap serapan panjang gelombang. Hal inilah yang menyebabkan tiap-tiap molekul akan memiliki karakteristik spektrum inframerah pada konsentrasi ukur tertentu, yang dapat dibedakan dari spektrum lain melalui posisi dan intensitas serapan. Ikatan yang mengalami relaksasi melepas foton yang kemudian ditangkap oleh detektor dan diubah menjadi spektrum IR yang merupakan plot jumlah radiasi inframerah yang diteruskan melalui cuplikan sebagai fungsi frekuensi atau panjang gelombang (Bruice, 2004; Silverstein *et al.*, 2005; Solomons dan Fryhle, 2011).

Spektrum IR memberikan informasi tentang panjang gelombang atau bilangan gelombang sebagai sumbu absis x dan intensitas absorpsi atau persen transmitan sebagai sumbu y. Transmitan merupakan perbandingan antara sinar yang diteruskan oleh sampel dengan sinar yang diserap oleh sampel. Sinar inframerah memiliki serapan pada bilangan gelombang 4000 cm^{-1} sampai 400 cm^{-1} dari spektrum gelombang elektromagnetik. Inframerah jauh pada bilangan gelombang $700\text{-}200\text{ cm}^{-1}$ bermanfaat untuk menganalisa senyawa anorganik, dan inframerah dekat pada bilangan gelombang $14.290\text{-}4000\text{ cm}^{-1}$. Nilai bilangan

gelombang berbanding terbalik terhadap frekuensi dan energi. Bilangan gelombang adalah kebalikan dari panjang gelombang. Semakin besar bilangan gelombang semakin tinggi frekuensi gelombang, sehingga menyebabkan semakin tinggi frekuensi penyerapan pada ikatan. Tabel 2.1 dibawah ini memberikan data karakteristik serapan IR gugus fungsi (Bruice, 2004; Silverstein *et al.*, 2005).

Tabel 2.1 Karakteristik serapan IR gugus fungsi

Gugus Fungsi	Bilangan Gelombang (cm ⁻¹)	Intensitas
CH sp ³	2853-2962	sedang-lemah
CH sp ²	3010-3095	sedang
CH sp	sekitar 3300	kuat
C-Br	515-690	sedang
C=C aromatik	1450-1600	sedang
-N=N	1429-1576	lemah
C=O keton	1680-1750	kuat
C=O amida	1630-1690	kuat
N-H amina	3300-3500	sedang
O-H	3800-2700	kuat, melebar

2.5.2 Identifikasi Hasil Sintesis dengan Spektroskopi Resonansi Magnetik Inti

Spektroskopi resonansi magnetik inti (*nuclear magnetic resonance*, NMR) merupakan spektroskopi utama yang digunakan untuk identifikasi atau konfirmasi struktur senyawa organik. Spektroskopi NMR berprinsip pada serapan gelombang radio oleh inti yang memiliki momen manget seperti ¹H, ³H, ¹³C, ¹⁵N, ¹⁹F dan ³¹P. Inti dari atom-atom tersebut memiliki momen magnet yang bergerak secara acak terhadap sumbu medan magnet, dan dengan adanya medan magnet dari luar menyebabkan inti bergerak searah dengan sumbu medan magnet. Inti atom yang bergerak searah medan magnet mendapat energi yang berasal dari frekuensi gelombang radio, sehingga energi level inti tereksitasi dari level energi dasar menuju level energi lebih tinggi yang selanjutnya dikuti dengan relaksasi sambil

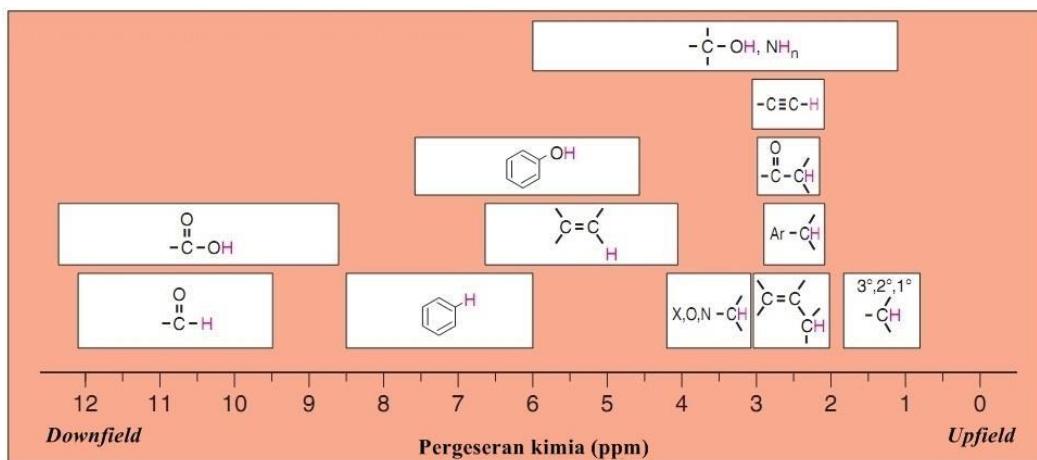
melepaskan foton atau energi. Foton atau energi ditangkap oleh detektor dan diubah menjadi sebuah spektrum (Jacobsen, 2007).

Spektroskopi NMR yang umum digunakan adalah spektroskopi ^1H dan ^{13}C NMR. Spektrum NMR berisi informasi tentang pergeseran kimia (*chemical shift*) yang merupakan perbedaan penyerapan radiasi gelombang radio antara proton atau karbon dengan senyawa pembanding tetrametilsilan (TMS) yang mengakibatkan perbedaan posisi dari proton maupun karbon. Senyawa pembanding yang umum digunakan adalah tetrametilsilan atau (TMS). TMS sulit bereaksi (*inert*), mudah menguap pada suhu 27 °C, mudah larut dalam pelarut organik, dan memberikan signal singlet tajam. TMS secara umum memiliki proton yang lebih terlindungi (*shielding*) dari pada proton lain dari senyawa organik, sehingga signal TMS berada pada posisi sebelah kanan spektrum NMR (*upfield*). Proton yang tidak terlindungi (*deshielding*) memiliki signal yang berada di sebelah kiri dari TMS (*downfield*) (Balci, 2005)

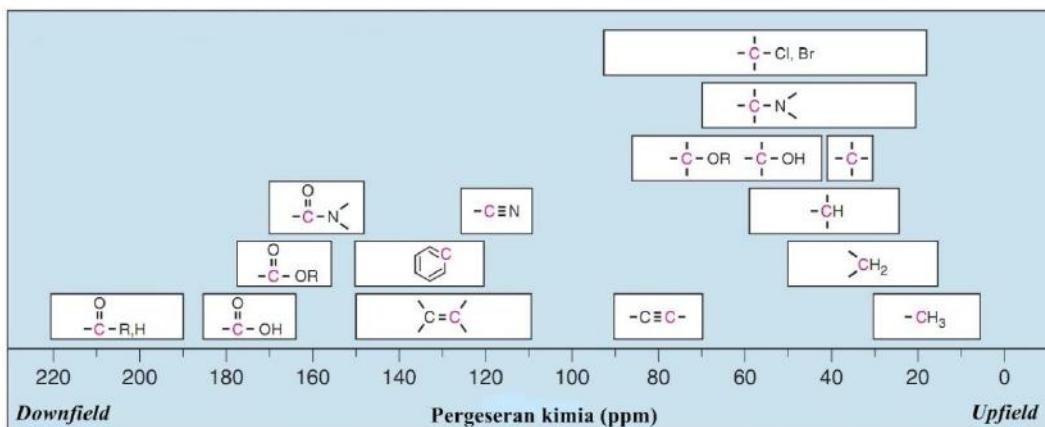
Spektroskopi ^1H NMR memberikan informasi tentang jumlah atom hidrogen, jenis atom hidrogen, pembelahan spin-spin, dan pergeseran kimia. Pembelahan spin-spin merupakan akibat dari interaksi spin proton dengan proton tetangga dalam satu lingkungan kimia. Pembelahan dapat mengikuti aturan $n+1$. Puncak singlet menunjukkan proton tersebut tidak memiliki proton tetangga ($n=0$), dan puncak doublet menunjukkan proton tersebut memiliki proton tetangga satu ($n=1$). Puncak triplet, multiplet dan seterusnya menunjukkan bahwa proton tersebut memiliki tetangga lebih dari 1 ($n=2$, $n=3$, dan seterusnya). Intensitas puncak pada spektrum NMR tersebut mengikuti aturan segitiga Pascal dimana puncak doublet memiliki perbandingan 1:1 untuk masing-masing puncak, puncak triplet 1:2:1, puncak kuartet 1:3:3:1, dan seterusnya (Silverstein *et al.*, 2005).

Spektroskopi ^{13}C NMR memberikan informasi tentang pergeseran kimia, posisi atom karbon, jenis atom karbon, dan jumlah atom karbon. Atom karbon yang terlindungi berada pada posisi *upfield*, dan atom karbon yang tidak terlindungi berada pada posisi *downfield*. Nilai pergeseran kimia dari ^1H dan ^{13}C NMR pada umumnya adalah 0-12 ppm untuk ^1H NMR sebagaimana dapat dilihat pada Gambar

2.2 dan 0-220 ppm untuk ^{13}C NMR sebagaimana dapat dilihat pada Gambar 2.3 (Hoffman, 2004).



Gambar 2.2 Data pergeseran kimia dalam ^1H NMR



Gambar 2.3 Data pergeseran kimia dalam ^{13}C NMR

2.5.3 Identifikasi Hasil Sintesis dengan Spektroskopi Massa

Spektroskopi massa merupakan metode penentuan massa relatif molekul yang didasarkan pada pemisahan campuran ion berdasarkan rasio massa terhadap muatan (m/z). Metode ini banyak digunakan untuk identifikasi senyawa organik baru atau yang sudah ada (de Hoffmann dan Stroobant, 2007). Spektrometer massa dalam menghasilkan spektrum massa melibatkan empat langkah: pemasukan sampel, konversi sampel molekul dari molekul netral menjadi ion dalam fase gas (*ionization*), pemisahan ion-ion fase gas yang dihasilkan berdasarkan rasio massa terhadap muatan (*ion separation*), dan ion yang telah dipisahkan tertangkap oleh detektor. Spektrum massa yang diperoleh adalah grafik yang pada sumbu x (garis

horizontal) memberikan informasi tentang massa ion molekul per muatan (m/z) dan pada sumbu y (garis vertikal) memberikan informasi tentang kelimpahan masing-masing ion-ion (*abundance*) (Silverstein *et al.*, 2005; Solomons dan Fryhle, 2011).

Electrospray ionization (ESI) merupakan salah satu jenis ionisasi pada spectrometer massa. ESI pertama kali dideskripsikan oleh Zeleny pada tahun 1917 sebagai energi potensial listrik yang diterapkan pada pipa kapiler untuk membuat pelarut menjadi tetesan kecil. Penggunaan ESI dengan spektroskopi massa pertama kali dilaporkan oleh Yamashita dan Fenn serta Aleksandrov *et al.* pada pertengahan tahun 1980. Keuntungan dari ESI adalah dapat dilaksanakan pada tekanan atmosfir, mudah dihubungkan dengan LC atau HPLC untuk molekul dengan berat molekul yang besar dan tidak mudah menguap. Peralatan dasar ESI terdiri dari jarum semprot dengan energi potensial listrik 4-5 kV, ruang desolvasi berupa panas atau berisi udara dan penghubung vakum. Cara kerja spektroskopi massa ESI adalah sampel memasuki sumber ion yang dilingkupi dengan aliran gas nitrogen (*nebulizing gas*) dan diubah menjadi tetesan berukuran mikro di bawah medan listrik yang tinggi sampai membentuk aerosol yang bermuatan (*taylor cone*). Aerosol mengalami desolvasi oleh gas pengering berupa gas nitrogen atau panas sampai terbentuk ion bermuatan positif yang selanjutnya mengalami pemisahan berdasarkan rasio massa terhadap muatan (m/z), dan di konversi menjadi spektrum massa oleh detektor. Spektrum massa yang dihasilkan oleh ESI-MS memiliki pola fragmentasi yang sedikit dengan bentuk spektrum yang sederhana. Puncak massa pada spectrum ESI tidak selalu sebagai puncak ion molekul, sebaliknya dalam bentuk ion pseudomolekular seperti $M+H$, $M+Na$, $M+K$, $M+Li$ dan lain-lain. Puncak ion molekul dalam bentuk $M+H$ menunjukkan bahwa M merupakan puncak dari ion molekul ditambah dengan massa atom hidrogen (de Hoffmann dan Stroobant, 2007; Kazakevich dan LoBrutto, 2007).

BAB III

METODOLOGI PENELITIAN

3.1 Alat dan Bahan

3.1.1 Alat

Penelitian menggunakan peralatan laboratorium berupa gelas piala, erlenmeyer, corong, labu alas bundar, labu leher dua, labu leher tiga, pipet tetes, pipet volume, pro pipet, pipet mikro, pengaduk, kertas whatman no. 41, *magnetic stirrer*, *rotatory evaporator*, plat KLT, alat refluks, alat ukur titik leleh *melting point apparatus* Fischer John, neraca analitik, kaca arloji, termometer, pipa kapiler, bejana KLT, lampu UV dengan λ 254 dan 366 nm, corong, corong pisah, spektrometer massa Waters LCT Premier XE, spektrometer NMR Agilent 500 MHz untuk ^1H NMR dan 125 MHz untuk ^{13}C .

3.1.2 Bahan

Penelitian menggunakan bahan-bahan berupa 5,7-dibromoisatin (**12a**) (Aldrich 750379), natrium hidrida (Merck 814552), asetonitril (Merck 100003), dimetilformamida (Merck 103053), isoniazid (**1**) (Aldrich 13377), etanol (Smart-Lab A-1035), etil asetat (ACS 6801-04), *n*-heksana (Merck 104367), kloroform (Merck 102445), aquades, asam sulfat (Merck 100731), aseton teknis, benzilbromida (**13**) (Aldrich B17905), 4-bromobenzilbromida (**14**) (Aldrich 112186), diklorometana (Merck 106050), magnesium sulfat heptahidrat (Merck 1005886).

3.2 Prosedur Penelitian

3.2.1 Sintesis *N*-Benzil-5,7-dibromosatin (12b**)**

Sintesis *N*-benzil-5,7-dibromoisatin (**12b**) dilakukan dengan mengadaptasi prosedur sintesis *N*-benzil-indola-2,3-dion (**28**) (Overman dan Peterson, 2003). Larutan 5,7-dibromoisatin (**12a**) (0,058 gram; 0,19 mmol) dalam DMF anhidrat 10 mL ditambah natrium hidrida (0,010 gram; 0,38 mmol), kemudian diaduk selama

10 menit pada suhu kamar. Campuran selanjutnya ditambahkan benzilbromida (**13**) (0,065 gram; 0,38 mmol) tetes demi tetes, dan diaduk lebih lanjut pada suhu kamar selama 22 jam (reaksi yang berjalan dipantau dengan KLT). Hasil reaksi ditambah air garam dingin (25 mL) setelah reaksi berjalan tuntas, dan diekstrak dengan diklorometana (3x20 mL). Fasa organik yang diperoleh digabung, dicuci dengan aquades, dikeringkan dengan magnesium sulfat heptahidrat, dan diuapkan dalam *rotary evaporator*. Hasil pemurnian diuji kemurniannya dengan KLT dan titik leleh. Hasil sintesis yang telah murni ditimbang, dan diidentifikasi dengan spektrometer MS, dan NMR.

3.2.2 Sintesis *N*-4-Bromobenzil-5,7-dibromosatin (**12c**)

Sintesis *N*-4-bromobenzil-5,7-dibromosatin (**12c**) dilakukan dengan prosedur sintesis *N*-benzil-5,7-dibromosatin (**12b**). Larutan 5,7-dibromoisatin (**12a**) (0,046 gram; 0,15 mmol) dalam pelarut DMF anhidrat (10 mL), ditambahkan natrium hidrida (0,007 gram; 0,30 mmol) dan diaduk selama 10 menit pada suhu kamar. 4-Bromobenzilbromida (**14**) (0,0375 gram; 0,15 mmol) selanjutnya ditambahkan tetes demi tetes, dan campuran diaduk pada suhu kamar selama 24 jam. Reaksi yang berjalan dipantau dengan KLT. Campuran hasil reaksi ditambah air garam dingin (25 mL) setelah reaksi berjalan tuntas, dan diekstrak dengan diklorometana (3x20 mL). Fasa organik yang diperoleh digabung, dicuci dengan aquades, dikeringkan dengan magnesium sulfat heptahidrat, dan diuapkan dalam *rotary evaporator*. Hasil pemurnian diuji dengan KLT dan titik leleh. Hasil sintesis yang telah murni ditimbang dan diidentifikasi dengan spektrometer MS, dan NMR.

3.2.3 Sintesis 2-Isonikotinohidazon-5,7-dibromoisatin (**11a**)

Sintesis 2-isonikotinohidazon-5,7-dibromoisatin (**12a**) dilakukan dengan mengadaptasi prosedur sintesis isatin-3-isonikotinohidazon (**26**) (Aboul-Fadl *et al.*, 2003). Larutan isoniazid (**1**) (0,033 gram; 0,24 mmol) dan 5,7-dibromoisatin (**12a**) (0,036 gram; 0,12 mmol) dalam etanol (25 mL) ditambahkan katalis asam sulfat pekat (1 tetes), kemudian direfluks selama 4 jam. Reaksi yang berjalan dipantau dengan KLT. Hasil reaksi didinginkan sehingga mencapai suhu kamar setelah reaksi berjalan tuntas dan diuapkan dalam *rotatory evaporator*. Hasil reaksi

dicuci dengan etanol dingin dan dikeringkan dalam desikator. Hasil sintesis diuji kemurnian hanya dengan KLT dan pengukuran titik leleh. Hasil sintesis yang telah murni ditimbang, dan diidentifikasi dengan spektrometer MS dan NMR.

3.2.4 Sintesis 2-Isonikotinohidazon-3-(*N*-benzil)-5,7-dibromoisatin (11b)

Sintesis 2-isonikotinohidazon-3-(*N*-benzil)-5,7-dibromoisatin (**11b**) dilakukan dengan mengikuti prosedur sintesis 2-isonikotinohidazon-5,7-dibromoisatin (**11a**). Larutan *N*-benzil-5,7-dibromoisatin (**12b**) (0,040 gram; 0,1 mmol) dan isoniazid (**1**) (0,027 gram; 0,2 mmol) dalam etanol (25 mL) ditambahkan katalis asam sulfat pekat (1 tetes), kemudian direfluks selama 30 menit. Reaksi yang berlangsung dipantau dengan KLT. Hasil reaksi didinginkan setelah reaksi berlangsung tuntas dan diuapkan dalam *rotatory evaporator*. Hasil reaksi dicuci dengan etanol dingin dan dikeringkan dalam desikator. Hasil sintesis diuji kemurnian hanya dengan KLT dan pengukuran titik leleh. Hasil sintesis yang telah murni ditimbang, dan diidentifikasi dengan spektrometer MS dan NMR.

3.2.5 Sintesis 2-Isonikotinohidazon-3-(*N*-4-bromobenzil)-5,7-dibromoisatin (11c**)**

Sintesis 2-Isonikotinohidazon-3-(*N*-4-bromobenzil)-5,7-dibromoisatin (**11c**) dilakukan dengan mengadaptasi prosedur sintesis 2-isonikotinohidazon-5,7-dibromoisatin (**11a**). Larutan isoniazid (**1**) (0,023 gram; 0,17 mmol) dan *N*-4-bromobenzil-5,7-dibromoisatin (**12c**) (0,04 gram; 0,085 mmol) dalam etanol (25 mL) ditempatkan dalam alat refluks, ditambahkan katalis asam sulfat (1 tetes), kemudian direfluks selama 2 jam. Reaksi yang berjalan dipantau dengan KLT sampai reaksi berjalan tuntas. Hasil reaksi didinginkan sehingga mencapai suhu kamar dan diuapkandalam *rotatory evaporator*. Hasil reaksi dicuci dengan etanol dingin dan dikeringkan dalam desikator. Hasil sintesis diuji kemurnian hanya dengan KLT dan pengukuran titik leleh. Hasil sintesis yang telah murni ditimbang, dan diidentifikasi dengan spektrometer MS dan NMR.

3.2.6 Pengujian Hasil Sintesis (11a-c) terhadap *M. tuberculosis* Secara *in vitro*

Senyawa hasil sintesis (**11a-c**) masing-masing disiapkan sebagai larutan stock dengan kosentrasi 10.000 ppm dalam DMSO. Larutan senyawa uji kemudian diencerkan secara berseri dengan kosentrasi 500, 125, dan 31,25 ppm dan dimasukkan dalam tabung screw cap 3 mL. Beberapa tabung screw cap 3 mL disiapkan sebagai senyawa kontrol, kontrol positif (+), kontrol media, kontrol pelarut, dan kontrol antibiotik.

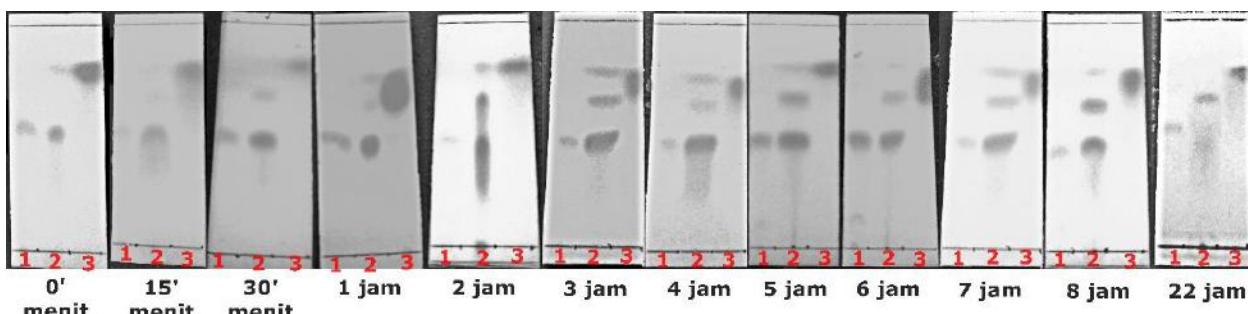
Suspensi bakteri MT 10^8 CFU/mL dibuat dengan cara 1 ose bakteri MT dimasukkan ke dalam tabung crew cap yang berisi 10 glassbeads dan 2 tetes Twen 0,05% steril serta akuades steril. Suspensi bakteri MT 10^6 CFU/mL dalam 80 mL MB DS disiapkan untuk masing-masing pengujian dibuat dengan cara diambil 0,8 mL suspensi bakteri 10^8 CFU/mL, dan dimasukkan ke dalam media MB DS. Suspensi bakteri 10^6 CFU/mL yang berisi senyawa uji, kontrol positif, kontrol pelarut, dan kontrol antibiotik diinokulasi pada suhu 37 °C selama 10 hari yang selanjutnya diinkubasi pada suhu 37 °C selama 3-4 minggu serta diamati pertumbuhannya. Setiap perlakuan dilakukan pengulangan tiga kali.

BAB IV

HASIL DAN PEMBAHASAN

4.1 Sintesis *N*-Benzil-5,7-dibromoisatin (12b)

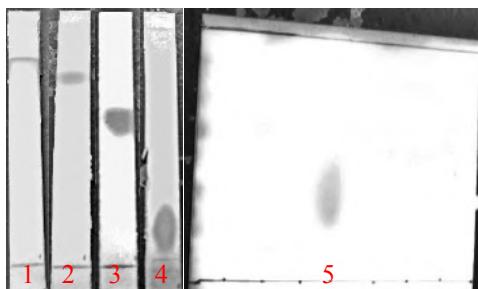
Sintesis *N*-benzil-5,7-dibromoisatin (**12b**) dilakukan dalam dua tahap. Tahap pertama adalah reaksi asam basa yang melibatkan reaksi 5,7-dibromoisatin (**12a**) dengan natrium hidrida dalam pelarut dimetilformamida pada suhu kamar selama 10 menit. Natrium hidrida sebagai basa bereaksi dengan gugus NH dari 5,7-dibromoisatin (**12a**) sebagai asam sehingga terbentuk garam natrium 5,7-dibromoisatin dengan hasil samping gas hidrogen. Anion dari garam natrium 5,7-dibromoisatin merupakan nukleofil yang lebih kuat daripada 5,7-dibromoisatin (**12a**) sehingga mempermudah reaksi dengan benzil bromida (**13**) pada tahap kedua dengan mekanisme reaksi S_N2 . Hasil pemantauan reaksi tahap kedua sebagaimana dapat dilihat pada Gambar 4.1 menunjukkan bahwa produk telah terbentuk pada menit 30 yang ditandai dengan adanya noda dengan nilai R_f yang berbeda dengan nilai R_f 5,7-dibromoisatin (**12a**) dan benzil bromida (**13**), tetapi masih terdapat noda kedua pereaksi yang mengindikasikan 5,7-dibromoisatin (**12a**) dan benzil bromida (**13**) yang belum bereaksi. Pemantauan reaksi yang berlangsung 8 jam menunjukkan masih terdapat 5,7-dibromoisatin yang belum bereaksi. Natrium hidrida dan benzil bromida (**13**) kemudian ditambahkan, dan campuran diaduk lebih lanjut pada suhu kamar. Reaksi berjalan tuntas setelah berlangsung 22 jam. Hasil reaksi selanjutnya ditambahkan air garam dingin, dan diekstrak dengan diklorometana. Fasa organik yang diperoleh digabung, dikeringkan dengan magnesium sulfat heptahidrat, dan diuapkan pelarutnya menggunakan *rotatory evaporator*, sehingga diperoleh padatan berwarna merah sebanyak 0,071 gram.



Keterangan : 1. 5,7-dibromoisatin (**12a**) 2. hasil reaksi 3. benzil bromida (**13**)
eluen = *n*-heksana : etil asetat (2:1)

Gambar 4.1 KLT sintesis *N*-benzil-5,7-dibromoisatin (**12b**)

Hasil sintesis selanjutnya diuji kemurniannya dengan KLT (Gambar 4.2) yang menunjukkan bahwa padatan hasil reaksi merupakan senyawa murni, yang ditandai dengan noda tunggal pada masing-masing plat KLT. Uji kemurnian dengan uji titik leleh menunjukkan rentang titik leleh sebesar 85-86 °C yang memperkuat hasil uji kemurnian dengan KLT bahwa hasil sintesis merupakan senyawa murni. Senyawa murni memiliki perbedaan titik leleh sebesar ± 1 °C (Juwita, 2008).



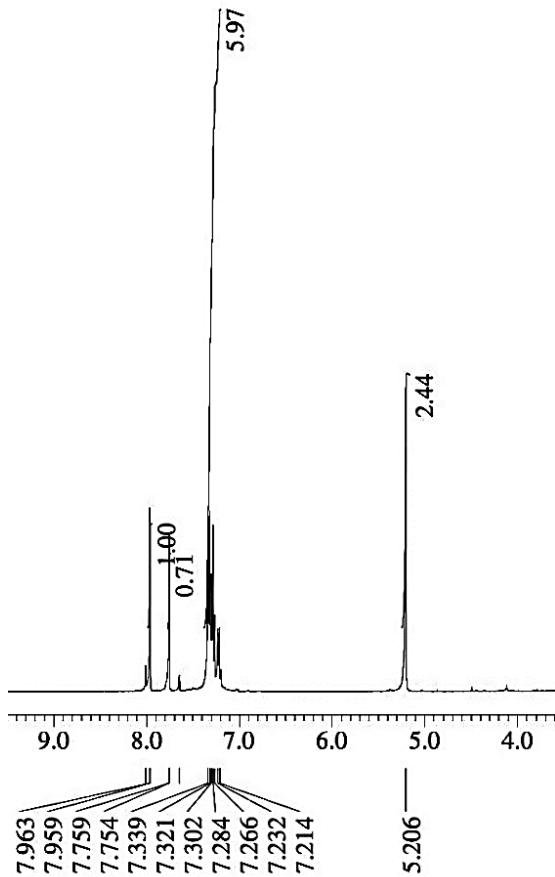
Keterangan eluen:

1. kloroform : etil asetat (4:1)
2. diklorometana
3. *n*-heksana : kloroform (1:1)
4. *n*-heksana : diklorometana (2:1)
5. *n*-heksana : kloroform (1:1)

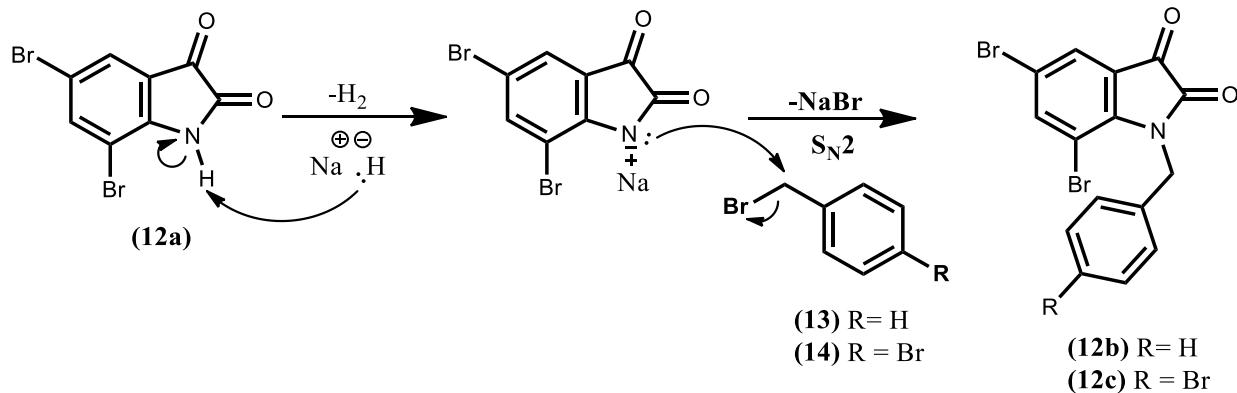
Gambar 4.2 KLT *N*-benzil-5,7-dibromoisatin (**12b**) hasil sintesis

Identifikasi padatan hasil sintesis dengan spektrometer NMR (dalam pelarut DMSO-*d*₆) memberikan spektrum ¹H-NMR sebagaimana dapat dilihat pada Gambar 4.3, yang sesuai dengan struktur *N*-benzil-5,7-dibromoisatin (**12b**). Spektrum ¹H-NMR dengan jelas menunjukkan sinyal singlet pada pergeseran kimia δ 5,21 ppm yang merupakan sinyal dua proton gugus metilena yang menunjukkan bahwa gugus benzil telah terikat pada 5,7-dibromoisatin. Spektrum juga menunjukkan dua sinyal singlet pada pergeseran kimia (δ) 7,75 dan 7,95 ppm yang merupakan sinyal dari dua proton unit 5,7-dibromoisatin (**12a**). Sinyal multiplet pada δ 7,21-7,34 ppm merupakan sinyal dari proton aromatik gugus benzil.

Reaksi 5,7-dibromoisatin (**12a**) (0,058 gram; 0,19 mmol), natrium hidrida (0,010 gram; 0,38 mmol), dan benzil bromida (**13**) (0,065 gram; 0,38 mmol) dalam pelarut DMF (15 mL) diperoleh *N*-benzil-5,7-dibromoisatin (**12b**) berupa padatan merah dengan massa 0,071 gram atau dengan rendemen 94% (perhitungan rendemen dapat dilihat pada lampiran). Mekanisme pembentukan *N*-benzil-5,7-dibromoisatin (**12b**) disarankan berlangsung sebagaimana dapat dilihat pada Gambar 4.4.



Gambar 4.3 Spektrum ^1H -NMR *N*-benzil-5,7-dibromoisoatrin (**12b**)

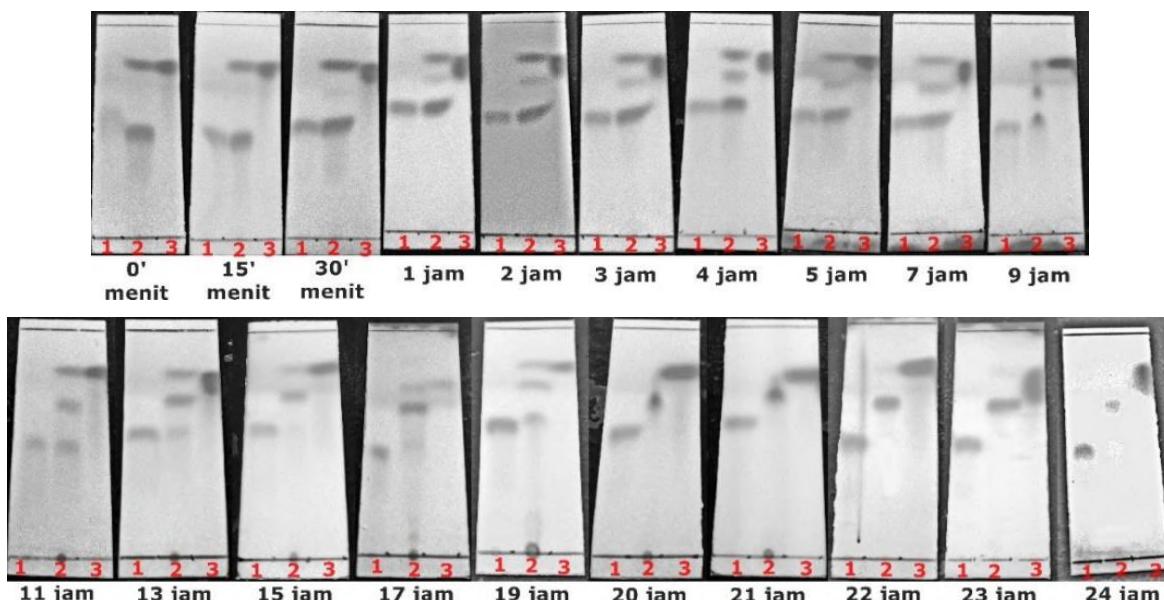


Gambar 4.4 Usulan mekanisme umum reaksi benzilasi 5,7-dibromoisoatrin (**12b-c**)

4.2 Sintesis *N*-4-bromobenzil-5,7-dibromoisoatrin (**12c**)

Sintesis *N*-4-bromobenzil-5,7-dibromoisoatrin (**12c**) dilakukan dengan mengikuti prosedur sintesis *N*-benzil-5,7-dibromoisoatrin (**12b**) yang dilakukan dalam dua tahap. Reaksi 5,7-

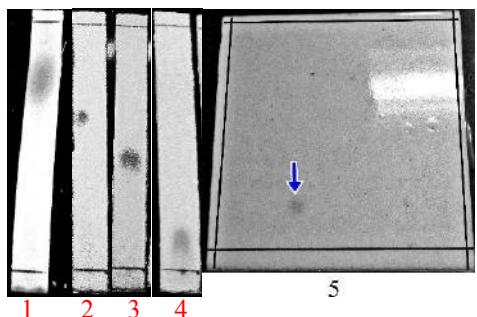
dibromoisatin (**12a**) dan natrium hidrida dalam DMF anhidrat pada suhu kamar selama 10 menit merupakan tahap pertama. Hasil reaksi pada tahap pertama selanjutnya ditambahkan 4-bromobenzil bromida (**14**), dan diaduk lebih lanjut pada suhu kamar (reaksi yang berjalan dipantau dengan KLT). Hasil pemantauan reaksi benzilasi 5,7-dibromoisatin (**12a**) tahap kedua sebagaimana dapat dilihat pada Gambar 4.5 menunjukkan bahwa hasil reaksi telah terbentuk dalam waktu reaksi 15 menit yang ditandai dengan adanya noda dengan nilai R_f yang berbeda dengan nilai R_f 5,7-dibromoisatin (**12a**), tetapi masih terdapat 5,7-dibromoisatin (**12a**) yang belum bereaksi. Hasil pemantauan pada waktu reaksi berlangsung 30 menit sampai 19 jam menunjukkan masih terdapat noda pereaksi yang belum bereaksi, sehingga pada jam ke 19 ditambahkan natrium hidrida. Noda hasil reaksi semakin menebal dalam kurun waktu reaksi 20-23 jam dan semakin menipisnya noda 5,7-dibromoisatin (**12a**), dan reaksi berjalan tuntas pada saat reaksi berlangsung 24 jam. Hasil reaksi selanjutnya ditambah air garam dingin (50 mL), dan diekstrak dengan diklorometana (5x50 mL). Fasa organik yang diperoleh digabung, dikeringkan menggunakan magnesium sulfat heptahidrat, diuapkan pelarutnya menggunakan *rotatory evaporator*, dan dikeringkan dalam desikator sehingga diperoleh padatan oranye sebanyak 0,068 gram.



Keterangan : 1. 5,7-dibromoisatin (**12a**) 2. hasil reaksi 3. 4-bromobenzil bromida (**14**)

eluen = *n*-heksana : etil asetat (2:1)

Gambar 4.5 KLT sintesis *N*-4-bromobenzil-5,7-dibromoisatin (**12c**)



Keterangan eluen:

1. kloroform : etil asetat (4:1)
2. diklorometana
3. *n*-heksana : kloroform (1:1)
4. *n*-heksana : diklorometana (2:1)
5. *n*-heksana : kloroform (1:1)

Gambar 4.6 KLT *N*-4-bromobenzil-5,7-dibromoisisatin (**12c**) hasil sintesis

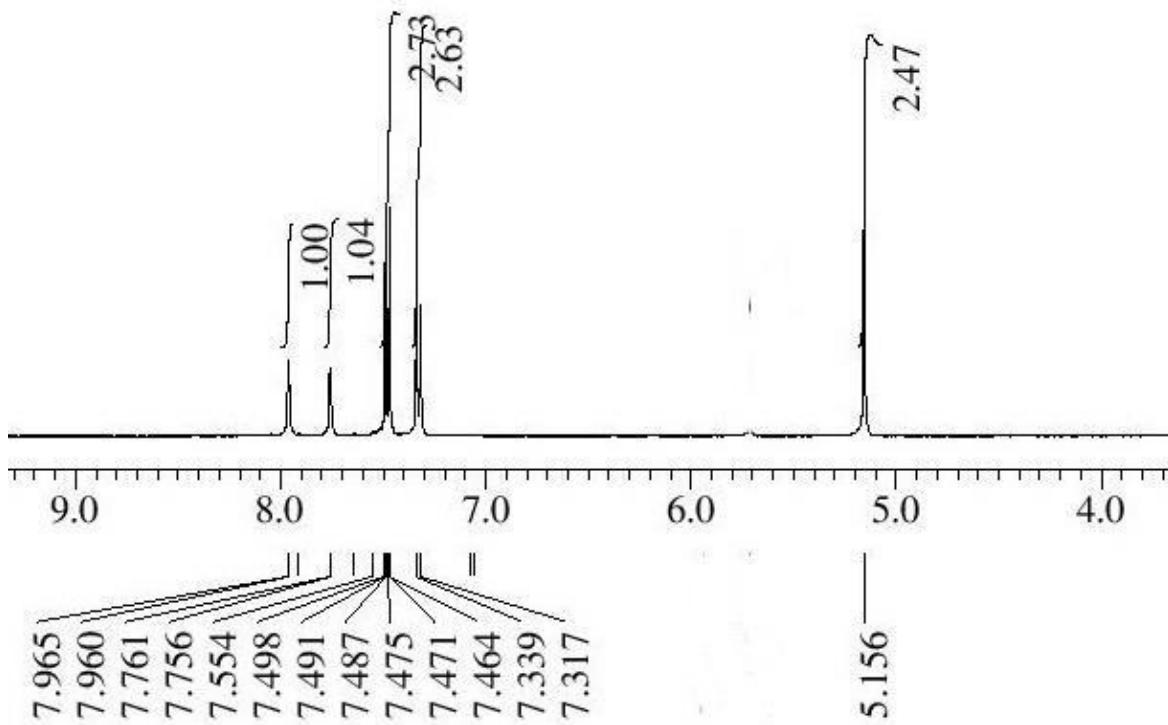
Hasil reaksi benzilasi 5,7-dibromoisisatin (**12c**) diuji kemurniannya dengan KLT (Gambar 4.6) yang menunjukkan bahwa padatan hasil reaksi merupakan senyawa murni, yang ditandai dengan adanya noda tunggal pada masing-masing plat KLT. Uji kemurnian dengan uji titik leleh menunjukkan rentang titik leleh sebesar 156-157 °C, yang memperkuat hasil uji kemurnian dengan KLT. Senyawa murni memiliki perbedaan titik leleh sebesar ± 1 °C (Juwita, 2008).

Identifikasi padatan hasil benzilasi 5,7-dibromoisisatin (**12c**) menggunakan spektrometer NMR dalam pelarut DMSO-*d*₆ memberikan spektrum ¹H NMR sebagaimana dapat dilihat pada Gambar 4.7. Spektrum ¹H NMR dengan jelas menunjukkan signal singlet pada pergeseran kimia (δ) 5,16 ppm yang merupakan signal dua proton gugus metilena. Proton-proton aromatik gugus 4-bromobenzil memberikan dua signal doublet pada (δ) 7,33 ppm dan 7,49 ppm. Proton-proton aromatic unit 5,7-dibromoisisatin (**12a**) memberikan dua sinyal singlet pada (δ) 7,76 dan 7,96 ppm. Spektrum ¹³C NMR (Gambar 4.8) dengan jelas menunjukkan signal pada δ 55,44 ppm yang merupakan signal karbon metilena, dua karbon karbonil memberikan signal pada δ 181,01 dan 159,69 ppm. Karbon-karbon aromatik memberikan 10 sinyal pada pergeseran kimia 104,62; 116,20; 120,63; 123,39; 126,76; 129,07; 131,77; 137,16; 143,69; dan 146,61 ppm. Perbandingan data ¹H-NMR dari *N*-benzil-5,7-dibromoisisatin (**12b**) dan *N*-4-bromobenzil-5,7-dibromoisisatin (**12c**) ditampilkan pada Tabel 4.1 dibawah ini.

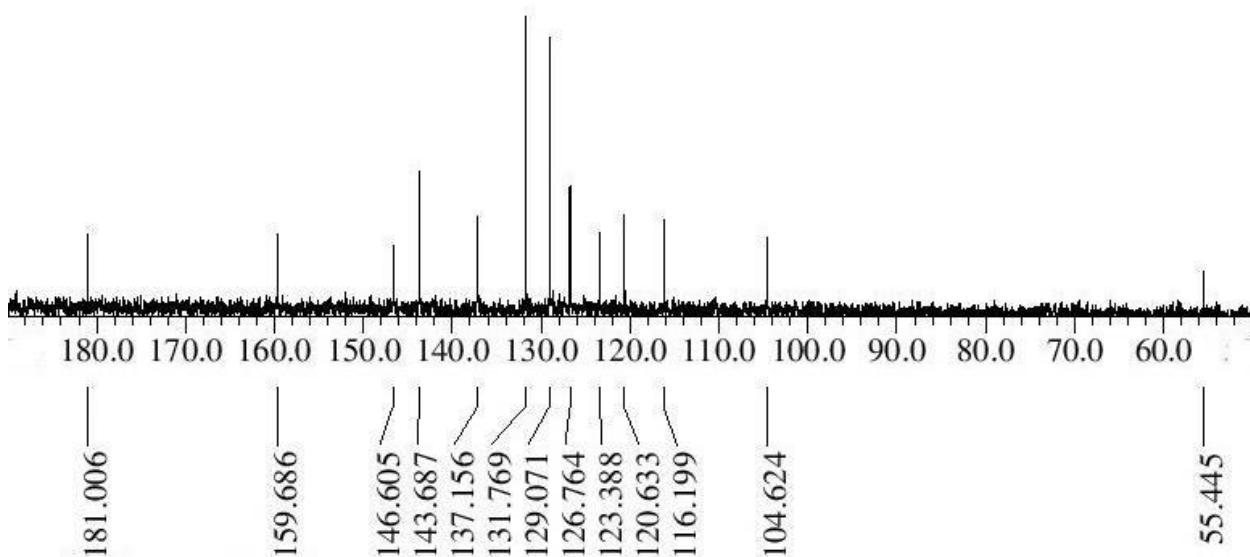
Reaksi 5,7-dibromoisisatin (**12a**) (0,046 gram; 0,15 mmol), natrium hidrida (0,007 gram; 0,30 mmol), dan 4-bromobenzil bromida (**14**) (0,0375 gram; 0,15 mmol) dalam pelarut DMF anhidrat (15 mL) menghasilkan *N*-4-bromobenzil-5,7-dibromoisisatin (**12c**) sebagai padatan oranye sebanyak 0,0681 gram atau dengan rendemen 91% (perhitungan rendemen dapat dilihat pada Lampiran). Mekanisme pembentukan *N*-4-bromobenzil-5,7-dibromoisisatin (**12c**) dapat dilihat pada Gambar 4.4.

Tabel 4.1 Data perbandingan $^1\text{H-NMR}$ hasil benzilasi 7,7-dibromoisatin (**12b-c**)

Proton	(12b)	(12c)
Metilena	5,21 (s, 2H)	5,16 (S, 2H)
ArH	7,21-7,34 (m, 5H) 7,75 (s, 1H, isatin ArH) 7,79 (s, 1H, isatin ArH)	7,33 (d, 2H) 7,49 (d, 2H) 7,76 (s, 1H) 7,96 (s, 1H)



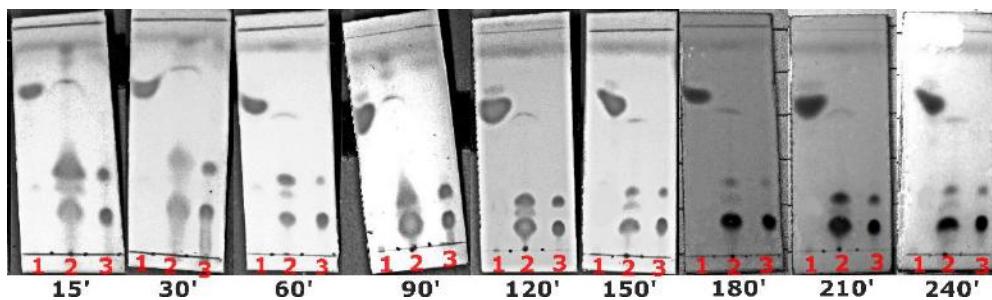
Gambar 4. 7 Spektrum $^1\text{H-NMR}$ *N*-4-bromobenzil-5,7-dibromoisatin (**12c**)



Gambar 4. 8 Spektrum ^{13}C -NMR *N*-4-bromobenzil-5,7-dibromoisatin (**12c**)

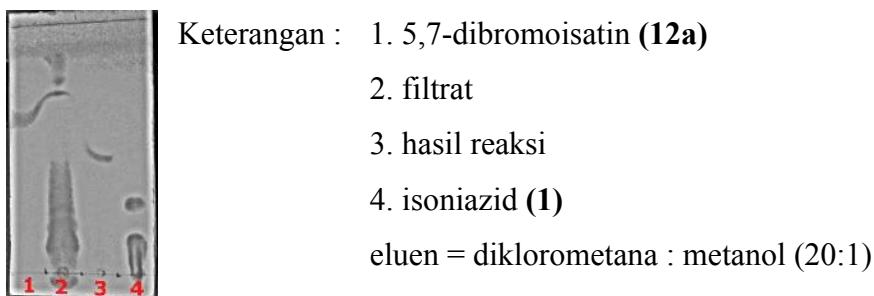
4.3 Sintesis 2-isonikotinohidazon-5,7-dibromoisatin (**11a**)

Sintesis 2-isonikotinohidazon-5,7-dibromoisatin (**11a**) dilakukan dengan merefluks 5,7-dibromoisatin (**12a**) dan isoniazid (**1**) dalam pelarut etanol dengan katalis asam sulfat reaksi yang berjalan dipantau dengan KLT. Hasil pemantauan reaksi sebagaimana dapat dilihat pada Gambar 4.9 menunjukkan bahwa hasil reaksi telah terbentuk dalam waktu reaksi 15 menit yang ditandai dengan adanya noda dengan nilai Rf yang berbeda dengan nilai Rf 5,7-dibromoisatin (**12a**) dan isoniazid (**1**). Hasil reaksi pada waktu reaksi 30-240 menit menunjukkan profil KLT yang relatif sama, sehingga reaksi dihentikan pada menit ke-240. Hasil reaksi selanjutnya didinginkan hingga mencapai suhu kamar, kemudian diuapkan pelarutnya. Padatan yang terbentuk dicuci dengan etanol dingin, dan dikeringkan dalam desikator sehingga diperoleh padatan berwarna kuning sebanyak 0,0456 gram. Uji KLT, padatan hasil sintesis maupun filtrat hasil reaksi serta pereaksi sebagaimana dapat dilihat pada Gambar 4.10 menunjukkan bahwa padatan hasil reaksi memiliki noda tunggal yang menandakan sebagai senyawa murni.



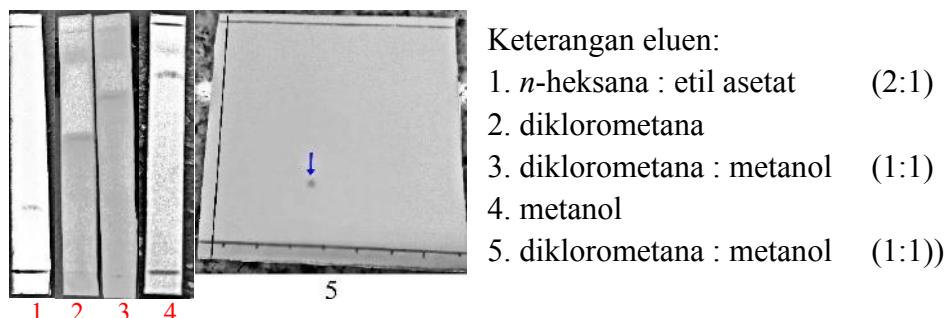
Keterangan :
 1. 5,7-dibromoisatin (**12a**)
 2. hasil reaksi eluen = diklorometana : metanol (20:1)
 3. isoniazid (**1**)

Gambar 4.9 KLT sintesis 2-isonikotinohidazon-5,7-dibromoisatin (**11a**)



Gambar 4.10 KLT uji kemurnian 2-isonikotinohidazon-5,7-dibromoisatin (**11a**) hasil intesis

Uji kemurnian hasil sintesis dengan KLT lebih lanjut sebagaimana dapat dilihat pada Gambar 4.11 menunjukkan bahwa padatan hasil reaksi merupakan senyawa murni, yang ditandai dengan adanya noda tunggal pada masing-masing plat KLT. Uji kemurnian dengan uji titik leleh menunjukkan rentang titik leleh sebesar 310-311 °C yang memperkuat hasil sintesis sebagai senyawa murni, senyawa murni memiliki perbedaan titik leleh sebesar ± 1 °C (Juwita, 2008).

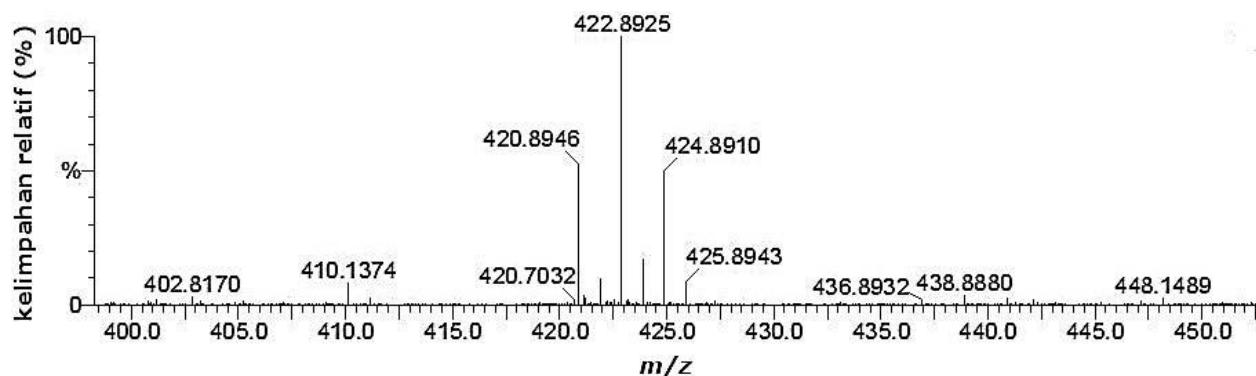


Gambar 4.11 KLT 2-isonikotinohidazon-5,7-dibromoisatin (**11a**) hasil sintesis

Identifikasi hasil sintesis dengan spektrometer NMR (dalam pelarut DMSO-*d*₆) memberikan spektrum ¹H NMR sebagaimana dapat dilihat pada Gambar 4.14, yang sama dengan

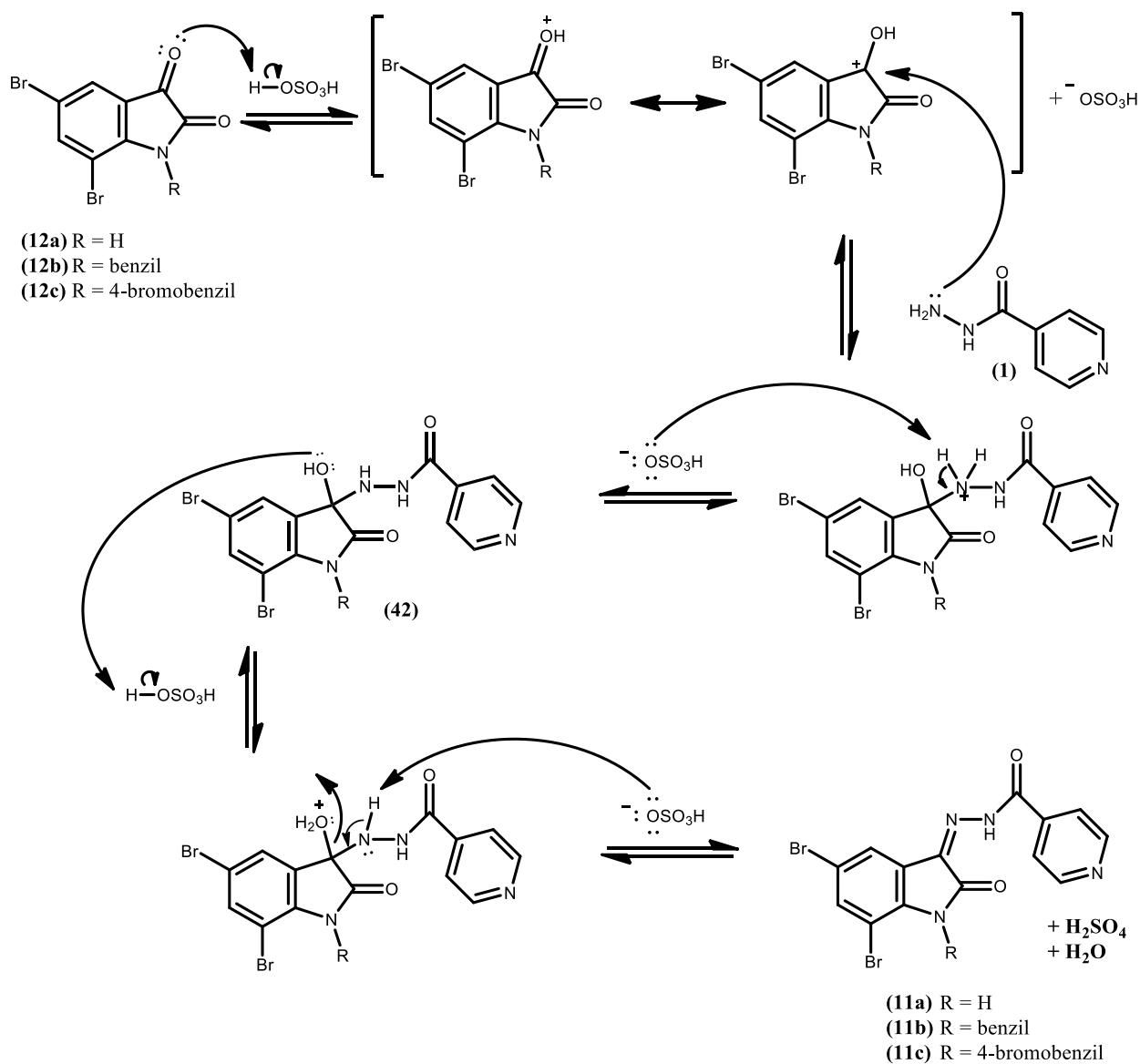
struktur 2-isonikotinohidazon-5,7-dibromoisatin (**11a**). Spektrum menunjukkan sinyal singlet proton NH hidrazida dan NH isatin masing-masing (δ) 11,84 ppm dan 7,71 ppm. Proton-proton aromatik cincin unit isatin memberikan sinyal singlet pada (δ) 7,72 dan 7,79 ppm. Proton-proton aromatik unit isoniazid memberikan dua signal doublet pada (δ) 8,80 dan 8,89 ppm yang masing-masing mewakili dua proton.

Identifikasi padatan hasil sintesis menggunakan spektroskopi massa resolusi tinggi (HRMS-ESI) memberikan spektrum massa (Gambar 4.12) yang menunjukkan puncak ion $[M-H]^-$ yang sekaligus sebagai puncak dasar pada m/z 420,896 sesuai untuk rumus molekul $C_{14}H_7N_4O_2Br_2$, sedangkan massa ion $[M-H]^-$ hasil perhitungan sebesar 420,8935.

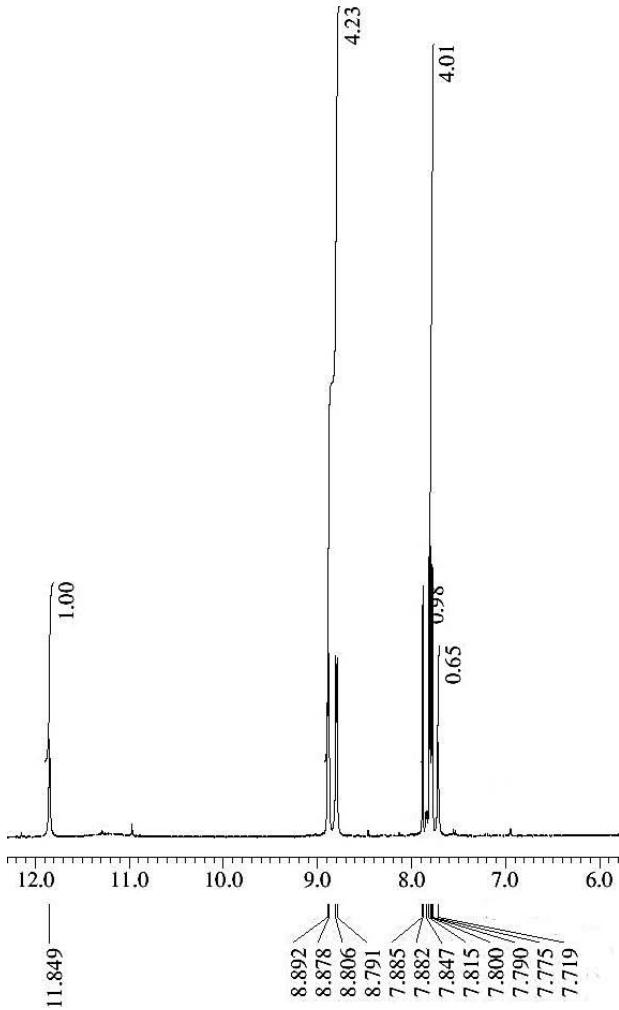


Gambar 4.12 Spektrum HRMS padatan hasil sintesis 2-isonikotinohidazon-5,7-dibromoisatin (**11a**)

Reaksi 5,7-dibromoisatin (**12a**) (0,036 gram; 0,12 mmol) dengan isoniazid (**1**) (0,033 gram; 0,24 mmol) dalam etanol (25 mL) pada kondisi asam diperoleh 2-isonikotinohidazon-5,7-dibromoisatin (**11a**) berupa padatan berwarna kuning dengan massa 0,0458 gram atau dengan rendemen 91,6% (perhitungan rendemen dapat dilihat pada Lampiran). Reaksi antara 5,7-dibromoisatin (**12a**) dengan isoniazid (**1**) disarankan merupakan reaksi adisi nukleofilik (Solomon, 2011) sebagai nukleofil adalah gugus amino dari isoniazid (**1**) dan sebagai elektrofil adalah gugus karbonil dari 5,7-dibromoisatin (**12a**). Sehingga mekanisme disarankan sebagaimana dapat dilihat pada Gambar 4.13. Reaksi diawali dengan protonasi oksigen gugus karbonil keton pada posisi C-3 dari 5,7-dibromoisatin (**12a**) sehingga karbon karbonil semakin elektrofilik. Isoniazid (**1**) yang berperan sebagai nukleofil selanjutnya menyerang karbon tersebut sehingga membentuk intermediet tetrahedral (**42**). Protonasi gugus hidroksi dari intermediet (**42**) dan disertai dengan dehidrasi selanjutnya berlangsung sehingga terbentuk 2-isonikotinohidazon-5,7-dibromoisatin.



Gambar 4.13 Usulan mekanisme reaksi pembentukan turunan isoniazid (11a-c)

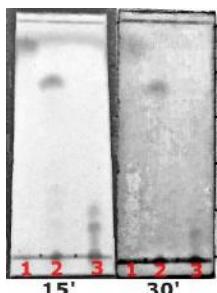


Gambar 4.14 Spektrum ^1H -NMR 2-isonicotinohidrazone-5,7-dibromoisatin (**11a**)

4.4 Sintesis 2-isonicotinohidrazone-(*N*-benzil)-5,7-dibromoisatin (**11b**)

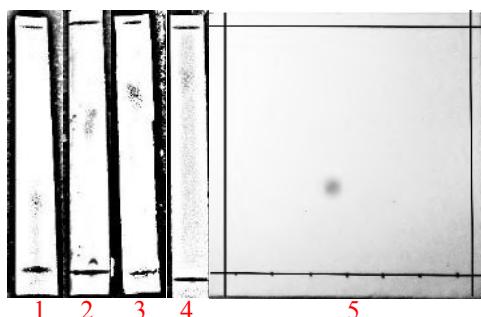
Sintesis 2-isonicotinohidrazone-(*N*-benzil)-5,7-dibromoisatin (**11b**) dilakukan dengan mengadaptasi prosedur sintesis 2-isonicotinohidrazone-5,7-dibromoisatin (**11a**). *N*-benzil-5,7-dibromoisatin (**12b**) dalam pelarut etanol dan direfluks selama 20 menit pada suhu 78°C. Selanjutnya, larutan ditambah katalis asam sulfat dan larutan isoniazid (**1**) dalam etanol, dua larutan direfluks lebih lanjut (reaksi yang berjalan dipantau dengan KLT). Hasil pemantauan reaksi sebagaimana dapat dilihat pada Gambar 4.15 menunjukkan bahwa hasil reaksi telah terbentuk dalam waktu reaksi 15 menit yang ditandai dengan adanya noda dengan nilai Rf yang berbeda dengan nilai Rf *N*-benzil-5,7-dibromoisatin (**12b**) dan isoniazid (**1**). Reaksi dihentikan pada menit 30. Hasil reaksi selanjutnya didinginkan sehingga mencapai suhu kamar, kemudian diuapkan

pelarutnya. Padatan yang terbentuk dicuci dengan etanol dingin dan dikeringkan dalam desikator sehingga diperoleh padatan berwarna oranye sebanyak 0,041 gram.



Keterangan :
1. *N*-benzil-5,7-dibromoisatin (**12b**)
2. hasil reaksi
3. isoniazid (**1**)
eluen = diklorometana : metanol (20:1)

Gambar 4.15 KLT Sintesis 2-isonikotinohidrazon-(*N*-benzil)-5,7-dibromoisatin (**11b**)



Keterangan eluen:
1. *n*-heksana : etil asetat (2:1)
2. diklorometana
3. diklorometana : metanol (1:1)
4. metanol
5. diklorometana : metanol (1:1))

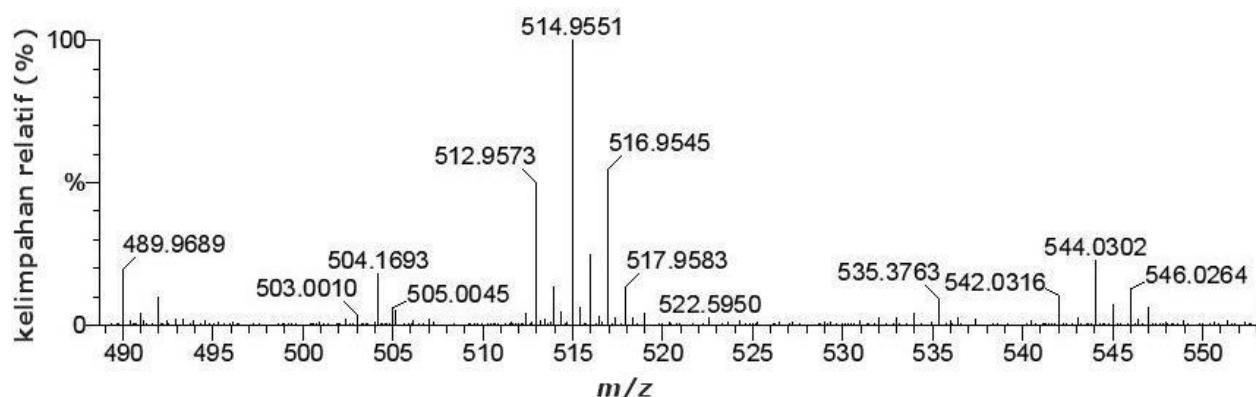
Gambar 4.16 KLT 2-isonikotinohidrazon-(*N*-benzil)-5,7-dibromoisatin (**11b**) hasil sintesis

Uji kemurnian hasil sintesis dengan KLT sebagaimana dapat dilihat pada Gambar 4.16 menunjukkan bahwa sebagai senyawa murni, yang ditandai dengan adanya noda tunggal pada masing-masing plat KLT. Uji kemurnian dengan uji titik leleh menunjukkan rentang titik leleh 325-326 °C yang memperkuat bahwa hasil sintesis sebagai senyawa murni, senyawa murni memiliki perbedaan titik leleh sebesar ± 1 °C (Juwita, 2008).

Identifikasi padatan hasil sintesis menggunakan spektrometer NMR (dalam pelarut DMSO-*d*₆) memberikan spektrum ¹H-NMR sebagaimana dapat dilihat pada Gambar 4.18 yang sesuai dengan struktur 2-isonikotinohidrazon-(*N*-benzil)-5,7-dibromoisatin (**11b**). Spektrum menunjukkan sinyal singlet pada (δ) 5,32 ppm yang merupakan sinyal dua proton dari gugus metilena. Proton-proton aromatik memberikan signal multiplet pada (δ) 7,24-7,30 (4H), multiplet pada (δ) 7,79-7,84 (2H), singlet pada pergeseran kimia (δ) 8,87 (1H), dan proton NH hidrazida pada pergeseran kimia (δ) 7,78 (1H) berupa sinyal singlet.

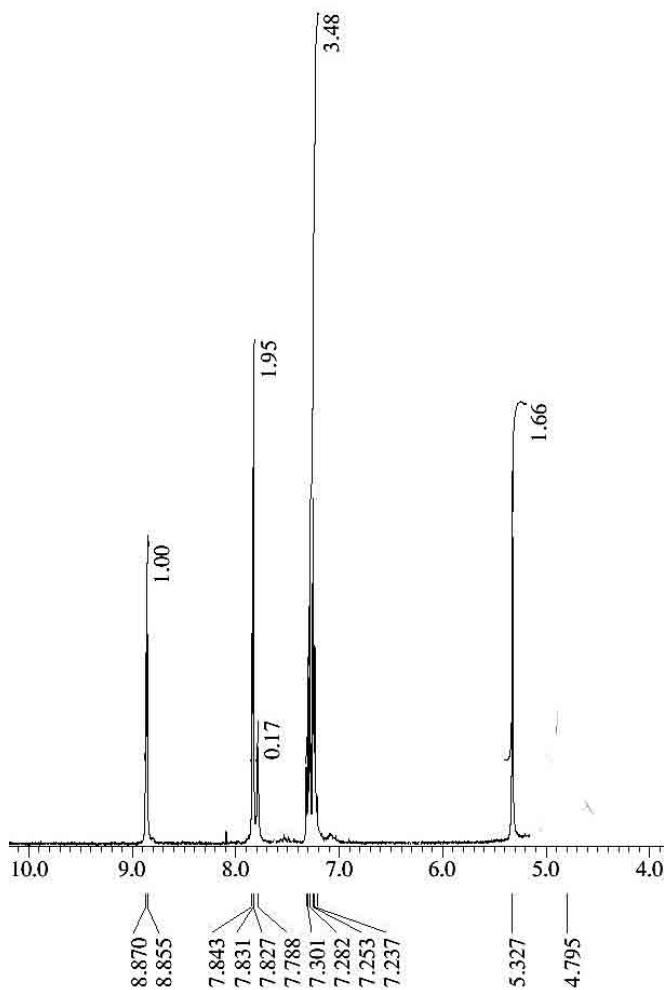
Identifikasi padatan hasil sintesis dengan spektrometer massa resolusi tinggi (HRMS-ESI) memberikan spektrum massa (Gambar 4.17) menunjukkan puncak ion [M+H]⁺ yang sekaligus

sebagai puncak dasar pada m/z 512,9573 untuk molekul dengan rumus molekul $C_{21}H_{15}N_4O_2Br_2$, yang hampir sama dengan hasil perhitungan sebesar 512,9563.



Gambar 4.17 Spektrum HRMS 2-isonikotinohidazon-(*N*-benzil)-5,7-dibromoisatin (**11b**) hasil sintesis

Reaksi *N*-benzil-5,7-dibromoisatin (**12b**) (0,040 gram; 0,1 mmol) dan isoniazid (**1**) (0,027 gram; 0,2 mmol) dalam etanol (25 mL) dengan katalis asam sulfat menghasilkan 2-isonikotinohidazon-(*N*-benzil)-5,7-dibromoisatin (**11b**) berupa padatan warna oranye kecoklatan dengan massa 0,041 gram atau dengan rendemen 81% (perhitungan rendemen dapat dilihat pada Lampiran). Mekanisme reaksi pembentukan 2-isonikotinohidazon-(*N*-benzil)-5,7-dibromoisatin (**11b**) disarankan sebagaimana dapat dilihat pada Gambar 4.13.

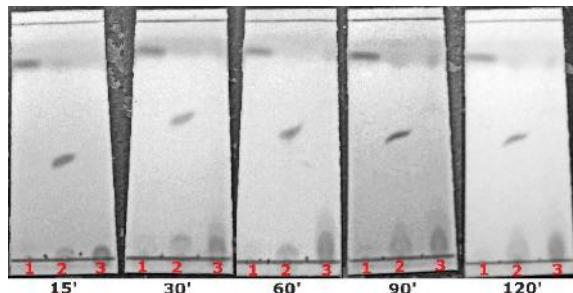


Gambar 4.18 Spektrum ^1H -NMR 2-isonicotinohidrazone-(*N*-benzil)-5,7-dibromoisatin (**11b**)

4.5 Sintesis 2-isonicotinohidrazone-(*N*-4-bromobenzil)-5,7-dibromoisatin (**11c**)

Sintesis 2-isonicotinohidrazone-(*N*-4-bromobenzil)-5,7-dibromoisatin (**11c**) dilakukan dengan mengadaptasi prosedur sintesis 2-isonicotinohidrazone-5,7-dibromoisatin (**11a**). Sintesis 2-isonicotinohidrazone-(*N*-4-bromobenzil)-5,7-dibromoisatin (**11c**) dilakukan dengan merefluks *N*-4-bromobenzil-5,7-dibromoisatin (**12c**) dan isoniazid (**1**) dalam pelarut etanol dengan katalis asam sulfat (reaksi yang berjalan dipantau dengan KLT). Hasil pemantauan reaksi sebagaimana dapat dilihat pada Gambar 4.19 menunjukkan bahwa hasil reaksi telah terbentuk pada menit ke-15 yang ditandai dengan adanya noda dengan nilai R_f yang berbeda dengan R_f *N*-4-bromobenzil-5,7-dibromoisatin (**12c**) dan isoniazid (**1**), tetapi kedua pereaksi belum tuntas bereaksi. Noda hasil reaksi semakin tebal dalam waktu reaksi 30-90 menit yang ditandai dengan semakin menipisnya noda pereaksi. Reaksi dihentikan pada menit 120. Hasil reaksi selanjutnya didinginkan sehingga

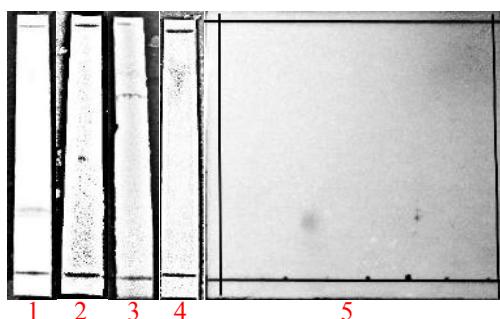
mencapai suhu kamar, dan pelarutnya diuapkan. Padatan yang diperoleh dicuci dengan etanol dingin (2x5mL), dan dikeringkan dalam desikator sehingga diperoleh padatan berwarna oranye kecoklatan sebanyak 0,14 gram.



Keterangan :
 1. *N*-4-bromobenzil-5,7-dibromoisatin (**12c**)
 2. hasil reaksi
 3. isoniazid (**1**)
 eluen = diklorometana : metanol (20:1)

Gambar 4.19 KLT sintesis 2-isonikotinohidazon-(*N*-4-bromobenzil)-5,7-dibromoisatin (**11c**)

Uji kemurnian hasil sintesis dengan KLT sebagaimana dapat dilihat pada Gambar 4.20 menunjukkan sebagai senyawa murni, yang ditandai dengan adanya noda tunggal pada masing-masing plat KLT. Uji kemurnian dengan uji titik leleh memberikan rentang titik leleh 227-228°C yang memperkuat hasil sintesis sebagai senyawa murni. Senyawa murni memiliki perbedaan titik leleh sebesar ± 1 °C (Juwita, 2008).

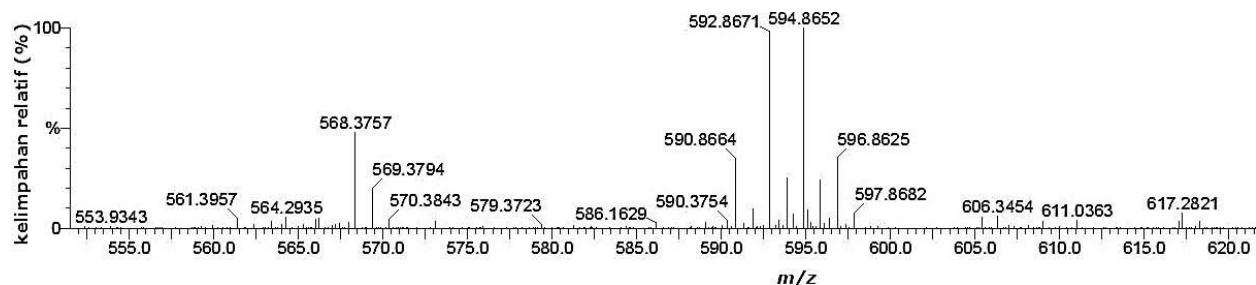


Keterangan eluen:
 1. *n*-heksana : etil asetat (2:1)
 2. diklorometana
 3. diklorometana : metanol (1:1)
 4. metanol
 5. diklorometana : metanol (1:1))

Gambar 4.20 KLT 2-isonikotinohidazon-(*N*-4-bromobenzil)-5,7-dibromoisatin (**11c**) hasil sintesis

Identifikasi padatan hasil sintesis 2-isonikotinohidazon-(*N*-4-bromobenzil)-5,7-dibromoisatin (**11c**) menggunakan spektrometer massa reolusi tinggi *electron spray-time of flight* (HRMS ESI-TOF) memberikan spectrum massa (Gambar 4.21) yang menunjukkan puncak ion

molekul yang sekaligus sebagai puncak dasar pada $[M+H]^+$ m/z 590,8667 yang sesuai dengan massa relatif $C_{21}H_{14}N_4O_2Br_3$ hasil perhitungan sebesar 590,8668.



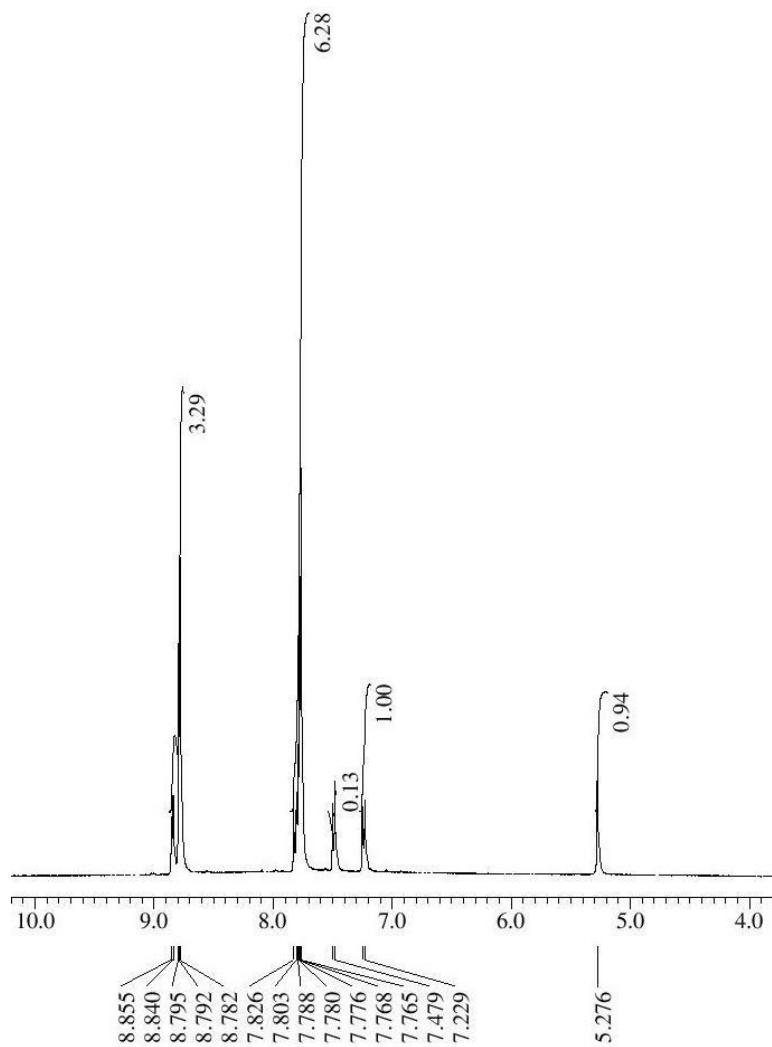
Gambar 4.21 Spektrum HRMS 2-isonikotinohidrazon-(*N*-4-bromobenzil)-5,7-dibromoisatin (**11c**) hasil sintesis

Identifikasi padatan hasil sintesis dengan analisa spektrometer NMR (dalam pelarut DMSO- d_6) memberikan spektrum 1H -NMR sebagaimana dapat dilihat pada Gambar 4.22 yang sama dengan struktur 2-isonikotinohidrazon-(*N*-4-bromobenzil)-5,7-dibromoisatin (**11c**) menunjukkan sinyal singlet pada (δ) 5,27 ppm yang merupakan signal dua proton gugus metilena, proton-proton aromatik memberikan signal-signal pada (δ) 7,47 (1H), 7,76-7,82 (6H), dan 8,78-8,85 (4H). Spektrum ^{13}C NMR (Gambar 4.23) dengan jelas menunjukkan signal karbon metilena pada δ 43,98, dan dua karbon karbonil memberikan signal pada δ 162,02 dan 164,85 ppm. Karbon-karbon aromatik pada pergeseran kimia 104,35; 116,47; 120,85; 122,00; 123,19; 124,87; 129,05; 131,94; 136,73; 138,59; 138,95; 139,61; 139,77; 150,76; dan 151,19. Data hasil analisa ^{13}C NMR diperkuat dengan spektrum Dept 135 (Gambar 4.24) yang menunjukkan bahwa pada pergeseran kimia 43,98 ppm merupakan puncak dari karbon metilena. Karbon-karbon aromatik memberikan δ pada 122,00; 123,19; 129,05; 131,94; 138,95; 150,76; dan 151,19 ppm. Perbandingan data 1H -NMR dari turunan isoniazid (**11a-c**) hasil sintesis ditampilkan pada Tabel 4.1 dibawah ini.

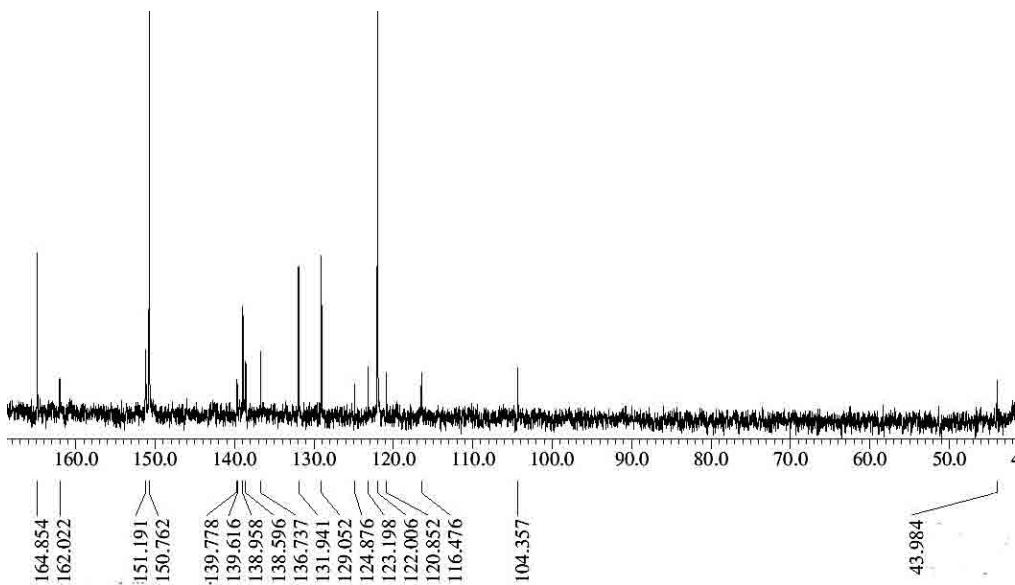
Reaksi *N*-4-bromobenzil-5,7-dibromoisatin (**12c**) (0,04 gram; 0,085 mmol) dan isoniazid (**1**) (0,023 gram; 0,17 mmol) dalam pelarut etanol (25 mL) dengan katalis asam sulfat pekat diperoleh 2-isonikotinohidrazon-(*N*-4-bromobenzil)-5,7-dibromoisatin (**11c**) sebagai padatan warna oranye dengan massa 0,042 gram atau dengan rendemen 84,4% (perhitungan rendemen dapat dilihat pada Lampiran). Mekanisme reaksi pembentukan 2-isonikotinohidrazon-(*N*-4-bromobenzil)-5,7-dibromoisatin (**11c**) disarankan sebagaimana dapat dilihat pada Gambar 4.13.

Tabel 4.2 Tabel perbandingan data $^1\text{H-NMR}$ turunan isoniazid (**11a-c**) hasil sintesis

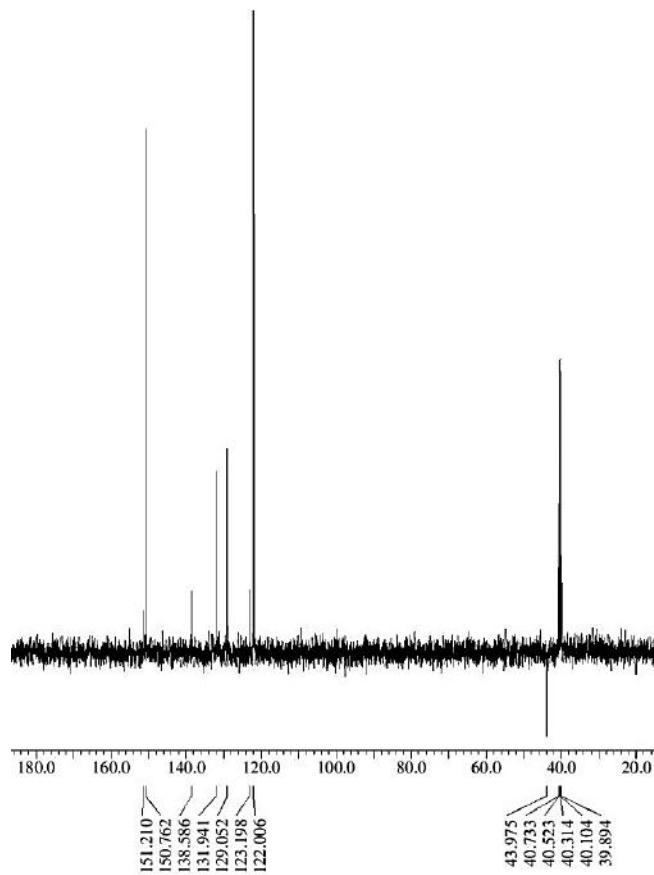
Proton	(11a)	(11b)	(11c)
CH ₂		5,32 (s, 2H)	5,27 (s, 2H)
ArH	7,72 (s, 1H) 7,79 (s, 1H) 8,80 (d, 2H) 8,89 (d, 2H)	7,24-7,30 (m, 4H) 7,79-7,84 (m, 2H) 8,87 (s, 1H),	7,47 (1H), 7,76-7,82 (6H), 8,78-8,85 (4H)
NH isatin	7,71 (s, 1H)		
NH Hidrazida	11,84 (s, 1H)		



Gambar 4.22 Spektrum $^1\text{H-NMR}$ 2-isonikotinohidazon-(*N*-4-bromobenzil)-5,7-dibromoisatin (**11c**)



Gambar 4.23 Spektrum ^{13}C -NMR 2-isonikotinohidrazen-(*N*-4-bromobenzil)-5,7-dibromoisatin **(11c)**



Gambar 4.24 Spektrum dept-135 2-isonikotinohidrazen-(*N*-4-bromobenzil)-5,7-dibromoisatin **(11c)**

4.6 Pengujian Hasil Sintesis (11a-c) terhadap *M. tuberculosis* Secara *in vitro*

Pengujian anti-tuberkulosis secara *in vitro* dilakukan dengan metode dilusi untuk mengetahui *minimum inhibitory concentration* (MIC) atau kadar hambat minimum (KHM) senyawa uji. Metode dilusi dilakukan dengan cara membuat pengenceran berseri dari sampel uji yang selanjutnya ditambahkan dengan bakteri uji. Sampel uji dengan kosentrasi terkecil yang tanpa adanya pertumbuhan yang ditandai dengan warna jernih pada media uji merupakan KHM. Larutan stock senyawa uji (**11a-c**) dibuat dengan kosentrasi 1000 ppm disiapkan dengan melarutkan 1 mg dalam 1 mL DMSO. Senyawa uji selanjutnya diencerkan dengan kosentrasi berseri sebesar 100, 10, dan 1 ppm. Selain itu, disiapkan kontrol media, kontrol positif, rifampisin (**2**) disiapkan sebagai kontrol abiotik, dan DMSO sebagai kontrol pelarut.

Pembuatan suspensi bakteri MT 10^8 CFU/mL dibuat dengan cara 1 ose bakteri MT dimasukkan ke dalam tabung screw cap yang berisi 10 glassbeads dan 2 tetes Twen 0,05% steril serta akuades steril. Suspensi bakteri MT 10^6 CFU/mL dalam 80 mL media middle brook double strength (MBDS) disiapkan untuk masing-masing pengujian yang dibuat dengan cara diambil 0,8 mL suspensi bakteri 10^8 CFU/mL, dan dimasukkan ke dalam media MBDS. Senyawa uji (**11a-c**), kontrol positif, kontrol pelarut, kontrol media dan kontrol antibiotik dimasukkan kedalam tabung crew cap yang berisi suspensi bakteri 10^6 CFU/mL dan diinkubasi pada suhu 37 °C selama 10 hari agar sampel uji kontak dengan bakteri. Tahap selanjutnya, masing-masing kontrol dan senyawa uji yang telah diinkubasi selama 10 hari diambil 100 μ L, diinokulasi ke dalam media Lowenstein-Jensen (LJ), diinkubasi pada suhu 37 °C selama 3-4 minggu, dan diamati pertumbuhannya. Setiap perlakuan dilakukan pengulangan tiga kali. Hasil pengujian dapat dilihat pada Tabel 4.1.

Tabel 4.3 Hasil pengujian anti-tuberkuluar senyawa (11a-c) terhadap *M. tuberkulosis*

Pengujian	Kontrol	Kontrol Media	Kontrol Positif	Senyawa Uji	Pengamatan sampel (kosentrasi dalam ppm)		
					100	10	1
I	Tumbuh	Tidak Tumbuh	Tidak Tumbuh	(11a)	Tidak Tumbuh	Tumbuh	Tumbuh
	Tumbuh	Tidak Tumbuh	Tidak Tumbuh	(11a)	Tidak Tumbuh	Tumbuh	Tumbuh
III	Tumbuh	Tidak Tumbuh	Tidak Tumbuh	(11a)	Tidak Tumbuh	Tumbuh	Tumbuh
	Tumbuh	Tidak Tumbuh	Tidak Tumbuh	(11b)	Tidak Tumbuh	Tumbuh	Tumbuh
II	Tumbuh	Tidak Tumbuh	Tidak Tumbuh	(11b)	Tumbuh	Tumbuh	Tumbuh
	Tumbuh	Tidak Tumbuh	Tidak Tumbuh	(11b)	Tidak Tumbuh	Tumbuh	Tumbuh
III	Tumbuh	Tidak Tumbuh	Tidak Tumbuh	(11c)	Tidak Tumbuh	Tidak Tumbuh	Tumbuh
	Tumbuh	Tidak Tumbuh	Tidak Tumbuh	(11c)	Tidak Tumbuh	Tidak Tumbuh	Tumbuh
I	Tumbuh	Tidak Tumbuh	Tidak Tumbuh	(11c)	Tidak Tumbuh	Tidak Tumbuh	Tumbuh
	Tumbuh	Tidak Tumbuh	Tidak Tumbuh	(11c)	Tidak Tumbuh	Tidak Tumbuh	Tumbuh

Hasil pengujian pengujian anti-tuberkular terhadap bakteri *M. tuberculosis* H₃₇Rv menggunakan metode dilusi padat menunjukkan bahwa bakteri tidak tumbuh pada kosentrasi 100 µg/mL senyawa uji (**11a-b**) dan kosentrasi 10 µg/mL pada senyawa uji (**11c**). Hal ini menunjukkan bahwa senyawa uji (**11a-b**) memiliki nilai KHM sebesar 100 µg/mL, sedangkan senyawa uji (**11b-c**) memiliki nilai KHM 10 ppm. Hasil pengujian anti-tuberkular menunjukkan hasil yang positif sebagaimana hipotesa ketiga senyawa uji aktiv sebagai anti-tuberkular. Keberadaan gugus benzil maupun 4-bromobenzil dapat meningkatkan bioaktivitas anti-tuberkular. Hasil pengujian anti-tuberkular menunjukkan bahwa senyawa (**11c**) dengan adanya gugus dibromo, gugus 4-bromobenzil, dan gugus isoniazid memiliki nilai KHM terbaik yaitu dengan nilai 10 µg/mL. Senyawa (**11c**) merupakan turunan dari isoniazid (**1**), sehingga mekanisme kerja obat senyawa (**11c**) diperkirakan sama dengan mekanisme isoniazid, yaitu dengan cara menghambat pertumbuhan asam mikolat dari dinding sel bakteri *M. tuberculosis*.

“Halaman ini sengaja dikosongkan”

BAB V

KESIMPULAN DAN SARAN

5.1 Kesimpulan

Benzilasi 5,7-dibromoisisatin (**12a**) dengan benzil bromida (**13**) dan 4-bromobenzil bromida (**14**) masing-masing selama 22 jam dan 24 jam diperoleh *N*-benzil-5,7-dibromosatin (**12b**) dan *N*-4-bromobenzil-5,7-dibromoisisatin (**12c**) dengan rendemen masing-masing sebesar 94% dan 91%. Turunan isoniazid baru berupa 2-isonikotinohidazon-5,7-dibromoisisatin (**11a**), 2-isonikotinohidazon-(*N*-benzil)-5,7-dibromoisisatin (**11b**), dan 2-isonikotinohidazon-(*N*-4-bromobenzil)-5,7-dibromoisisatin (**11c**) masing-masing berhasil disintesis dari reaksi 5,7-dibromoisisatin (**12a**), *N*-benzil-5,7-dibromosatin (**12b**) dan *N*-4-bromobenzil-5,7-dibromoisisatin (**12c**) dengan isoniazid (**1**) menggunakan katalis asam sulfat. Sintesis turunan isoniazid (**11a**), (**11b**) dan (**11c**) masing-masing membutuhkan waktu selama 240, 30 dan 120 menit dengan rendemen masing-masing sebesar 92%, 81% dan 84%. Hasil uji bioaktivitas terhadap *M. tuberculosis* menunjukkan bahwa senyawa 2-isonikotinohidazon-(*N*-4-bromobenzil)-5,7-dibromoisisatin (**11c**) merupakan senyawa yang paling aktif dengan nilai KHM 10 ppm.

5.2 Saran

Penelitian lanjutan untuk mengkaji bioaktivitas turunan isoniazid (**11c**) dengan konsentrasi yang lebih kecil, sehingga dapat diperoleh nilai KHM senyawa (**11c**) yang lebih maksimal.

“Halaman ini sengaja dikosongkan”

DAFTAR PUSTAKA

- Aboul-Fadl, T., Abdel-Hamid, M. K., Youssef A. F. (2015) Schiff bases of indoline-2,3-dione (isatin) derivatives as efficient agents against resistant strains of *Mycobacterium tuberculosis*. *Der Pharma Chem.* **7**, 217–225.
- Aboul-Fadl, T., Bin-Jubair F. A. S. (2010) Anti-tubercular activity of isatin derivatives. *Int. J. Res. Pharm. Sci.* **1**, 113–126.
- Aboul-Fadl, T., Bin-Jubair, F. A. S., Aboul-Wafa O. (2010) Schiff bases of indoline-2,3-dione (isatin) derivatives and nalidixic acid carbohydrazide, synthesis, antitubercular activity and pharmacophoric model building. *Eur. J. Med. Chem.* **45**, 4578–4586.
- Aboul-Fadl, T., Mohammed, F. A.-H., Hassan E. A.-S. (2003) Synthesis, antitubercular activity and pharmacokinetic studies of some Schiff bases derived from 1-alkylisatin and isonicotinic acid hydrazide (INH). *Arch. Pharm. Res.* **26**, 778–84.
- Al-Maamari, K. A. (2013) Isatin Derivatives: Synthesis, Reactivity and Anticorrosion Properties. Thesis, University of Mohammed-V-Agdal, Rabat.
- Ansa-Asamoah, R., Kapadia, G. J., Llyod, H., Sokoloski E. (2014) Picratidine, a new indole alkaloid from *Picralima nitida* seeds. *J. Nat. Prod.* **53**, 975–977.
- Balci, M. (2005) *Basic 1H-13C-NMR Spectroscopy.*, Elsevier B.V., Amsterdam.
- Beckman, K. L. (2005) Isatin derivatives as inhibitors of microtubule assembly. Thesis, The University of Kansas, Texas.

- Benkendorff, K., Bremner, J. B., Davis A. R. (2001) Indole derivatives from the egg masses of *Muricid molluscs*. *Molecules* **6**, 70–78.
- Bruice, P. (2004) *Organic Chemistry*. edisi keempat., Prentice Hall International, Inc, New Jersey.
- Chisholm-Burns, M. A., Wells, B. G., Schwinghammer, Terry, L. Malone, P. M., Kolesar, J. M., DiPiro J. T. (2013) *Pharmacotherapy Principles & Practice*. 3rd ed., McGraw-Hill Education, New York.
- Clay, C. M., Abdallah, H. M., Jordan, C., Knisley, K., Ketcha, D. M. (2012) N-alkylation of isatins utilizing KF/alumina. *Arkivoc* **4**, 317–325.
- Dixit, P. P., Patil V. J., Nair, P. S., Jain, S., Sinha, N., Arora S. K. (2006) Synthesis of 1-[3-(4-benzotriazol-1/2-yl-3-fluoro-phenyl)-2-oxo-oxazolidin-5-ylmethyl]-3-substituted-thiourea derivatives as antituberculosis agents. *Eur. J. Med. Chem.* **41**, 423–8.
- Eldehna, W., Fares, M., Abdel-Aziz, M., Abdel-Aziz H. (2015) Design, synthesis and antitubercular activity of certain nicotinic acid hydrazides. *Molecules* **20**, 8800–8815.
- Feng, L. S., Liu, M. L., Zhang, S., Chai, Y., Wang, B., Zhang, Y. Bin, Lv K., Guan, Y., Guo, H. Y., Xiao C. L. (2011) Synthesis and in vitro antimycobacterial activity of 8-OCH₃ ciprofloxacin methylene and ethylene isatin derivatives. *Eur. J. Med. Chem.* **46**, 341–348.
- Gritter, R. ., Bobbit, J., Swharting A. E. (1991) *Pengantar Kromatografi. Edisi Kedua*. 2nd ed., ITB, Bandung.
- Hoffman, R. V. (2004) *Organic Chemistry: An Intermediate Text, Second Edition*. edisi kedua., A John Wiley & Sons, Inc, Hoboken, New Jersey.

- de Hoffmann, E., Stroobant V. (2007) *Mass spectrometry: Principles and applications*. edisi ketiga., John Wiley & Sons, Inc, Hoboken, New Jersey.
- Hostettmann, K., Hostettmann, M., Marston A. (1995) *Cara Kromatografi Preparatif*, ITB, Bandung.
- Jacobsen, N. E. (2007) *NMR Spectroscopy Explained: Simplified Theory, Applications and Examples for Organic Chemistry and Structural Biology*., A John Wiley & Sons, Inc, Hoboken, New Jersey.
- Johnson, E. L., Stevenson R. (1991) *Dasar Kromatografi Cair*., Universitas Udayana, Bandung.
- Kazakevich, Y., LoBrutto R. (2007) *HPLC for Pharmaceutical Scientists*., John Wiley & Sons, Inc, Hoboken, New Jersey.
- Kristanti, A. N. (2008) *Buku Ajar Fitokimia*., Airlangga University Press, Surabaya.
- Kumar, S. B., Ravinder, M., Kishore, G., Jayathirtha, Rao V., Yogeeswari, P., Sriram, D. (2014) Synthesis, antitubercular and anticancer activity of new Baylis-Hillman adduct-derived N-cinnamyl-substituted isatin derivatives. *Med. Chem. Res.* **23**, 1934–1940.
- Mansjoer, A. (2000) *Kapita Selekta Kedokteran Edisi 3*. 3rd ed., Media Aesculapius, Jakarta.
- Marriner, G. A., Nayyar, A., Uh, E., Wong, S. Y., Mukherjee, T., Via, L. E., Carroll, M., Edwards, R. L., Gruber, T. D., Choi, I., Lee, J., Arora, K., England, K. D., Boshoff, H. I. M., Barry C. E. (2011) The medicinal chemistry of tuberculosis chemotherapy. *Top. Med. Chem.* **7**, 47–124.
- Nain, S. (2014) Recent advancement in synthesis of isatin as anticonvulsant

- agents: A Review. *Med. Chem. (Los Angeles)*. **4**, 417–427.
- Overman, L. E., Peterson E. A. (2003) Enantioselective synthesis of (-)-idiospermuline. *Tetrahedron* **59**, 6905–6919.
- Pahlavani, E., Hadi, K., Rad N. S. (2015) A study on antitubercular and antimicrobial activity of isoniazid derivative. *Zahedan J. Res. Med. Sci.* **17**, 7–10.
- Pal, M., Sharma, N. K., Priyanka, Jha, K.K. (2011) Synthetic and biological multiplicity of isatin: a Review. *J. Adv. Sci. Res.* **2**, 35–44.
- Raviglione, M. C. (2010) *Tuberculosis Fourth Edition The Essentials*. edisi keempat. ed. Lenfant Claude, New York.
- Rehn, S. (2004) Synthesis of indole and oxindole derivatives incorporating pyrrolidino, pyrrolo or imidazolo moieties. Thesis, Karolinska University Perss.
- Rohman ,A. (2007) *Kimia Farmasi Analisis*., Pustaka Pelajar, Yogyakarta.
- Schneider, E., Moore M., Castro K. G. (2005) Epidemiology of tuberculosis in the United States. *Clin Chest Med* **26**, 183–95, v.
- Sherma, J., Fried B. (2003) *Handbook of Thin-Layer Chromatography edited by*. edisi ketiga., Marcel Dekker, Inc, New York.
- da Silva, J. F. M., Garden, S. J., Pinto A. C. (2001) The chemistry of isatins: a review from 1975 to 1999. *J. Braz. Chem. Soc.* **12**, 273–324.
- Silverstein, R. M., Webster, F. X., Kiemle D. J. (2005) *Spectrometric identification of organic compounds*., John Wiley & Sons, Inc, New York.
- Smeltzer, S. C., Bare, B. G., Hinkle, J. L., Cheever K. H. (2010) *Brunner and suddarth's textbook of medical surgical nursing*. edisi kedua belas.,

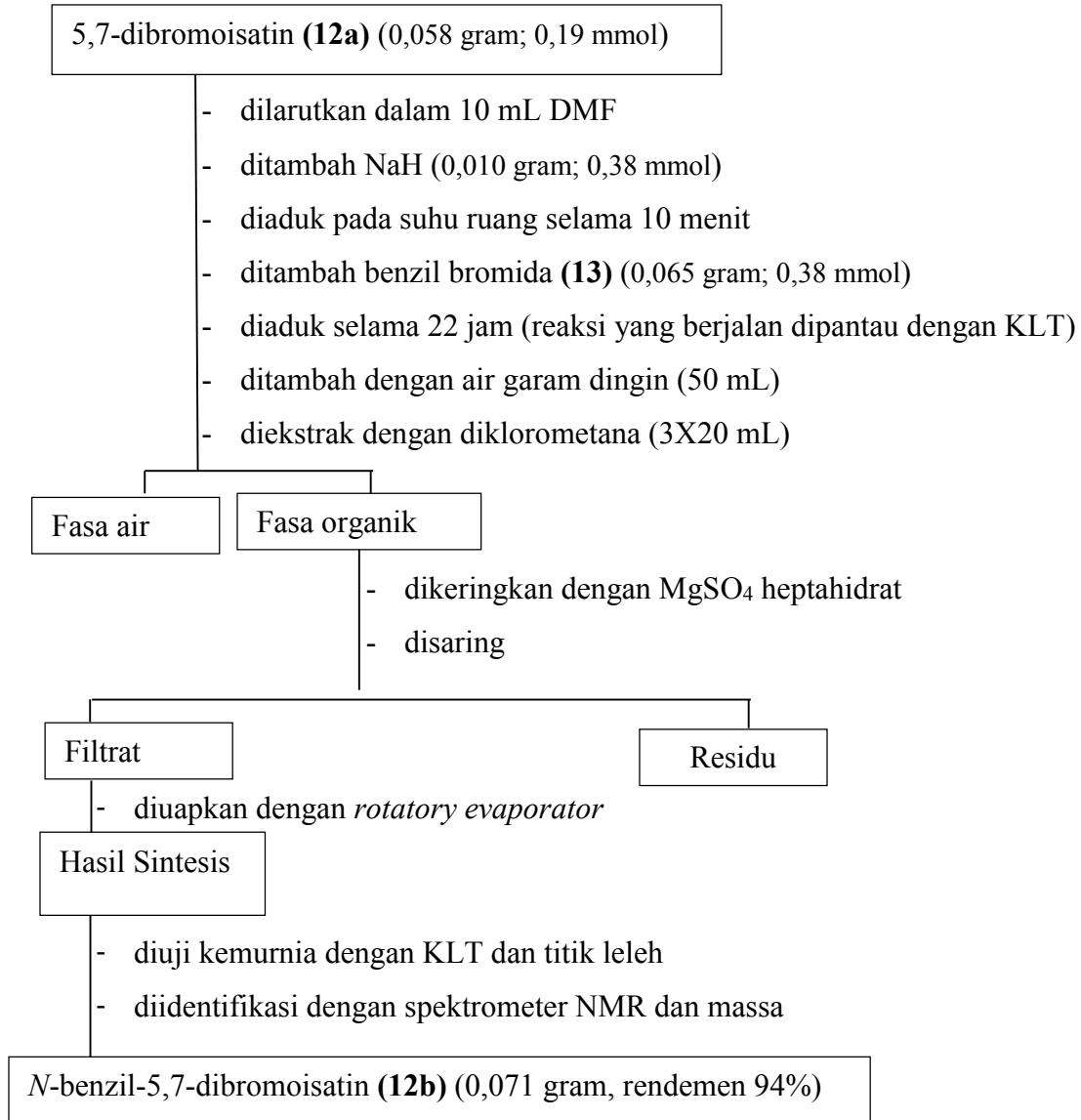
- Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia.
- Solomons, T. W. G., Fryhle C. B. (2011) *Organic Chemistry*. edisi kesepuluh., John Wiley & Sons, Inc, Hoboken, New Jersey.
- Tehrani, K. H. M. E., Maryam, H., Maryam, H., Kobarfard, F., Shohreh M. (2016) Synthesis and antibacterial activity of Schiff bases of 5-substituted isatins. *Chinese Chem. Lett.* **27**, 221–225.
- Vine, K. L., Locke, J. M., Ranson, M., Benkendorff, K., Pyne, S. G., Bremner, J. B. (2007a) In vitro cytotoxicity evaluation of some substituted isatin derivatives. *Bioorganic Med. Chem.* **15**, 931–938.
- Vine, K. L., Locke, J. M., Ranson, M., Pyne, S. G., Bremner J. B. (2007b) Cytotoxicity and mode of action of some novel n-alkyl-sub isatin. *J. Med. Chem.* **50**, 5109–5117.
- Vine, K. L., Matesic, L., Locke, J. M., Danielle S. (2013) Recent highlights in the development of isatin-based anticancer agents. *Advance in ANticer Agents in Medical Chemistry* (254–312). Bentham Science, Sharjah UAE.
- Wells, B., Dipiro, J., Schwinghammer, T., Dipiro C. (2009) *Pharmacotherapy handbook*., edisi ketujuh. McGraw-Hill, Inc., New York.
- WHO (2015) *Global Tuberculosis Report 2015.*, edisi kedua puluh. WHO Press, Geneva.
- Zhang, X. M., Guo, H., Li, Z. S., Song, F. H., Wang, W. M., Dai, H. Q., Zhang, L. X., Wang J. G. (2015) Synthesis and evaluation of isatin-??-thiosemicarbazones as novel agents against antibiotic-resistant Gram-positive bacterial species. *Eur. J. Med. Chem.* **101**, 419–430.

“Halaman ini sengaja dikosongkan”

LAMPIRAN A

SKEMA KERJA

A.1 Prosedur Sintesis *N*-benzil-5,7-dibromoisatin (12b)



A.2 Prosedur Sintesis (*N*-4-bromobenzil)-5,7-dibromoisatin (12c)

5,7-dibromoisatin (12a) (0,046 gram; 0,15 mmol)

- dilarutkan dalam 10 mL DMF
- ditambah NaH (0,07 gram; 0,30 mmol)
- diaduk pada suhu ruang selama 10 menit
- ditambah 4-bromobenzil bromide (14) (0,0375 gram; 0,15 mmol)
- diaduk selama 24 jam (reaksi yang berjalan dipantau dengan KLT)
- ditambah dengan air garam dingin (50 mL)
- diekstrak dengan diklorometana (3X20 mL)

Fasa air

Fasa organik

- dikeringkan dengan MgSO₄ heptahidrat
- disaring

Filtrat

Residu

diuapkan dengan *rotatory evaporator*

Hasil Sintesis

- diuji kemurnia dengan KLT dan titik leleh
- diidentifikasi dengan spektrometer NMR dan massa

(*N*-4-bromobenzil)-5,7-dibromoisatin (12c) (0,0681 gram, rendemen 91%)

A.3 Prosedur Sintesis 2-Isonikotinohidazon-5,7-dibromoisatin (11a)

5,7-dibromoisatin (**12a**) (0,036 gram; 0,12 mmol)

- dilarutkan dalam 20 mL etanol
- ditambah asam sulfat 1 tetes
- direfluks selama 20 menit pada suhu 78 °C
- ditambah isoniazid (**1**) (0,033 gram; 0,12 mmol) dalam etanol 10 mL
- direfluks pada suhu 78 °C selama 4 jam (reaksi yang berjalan dipantau dengan KLT)
- didinginkan dan diuapkan pelarutnya dalam *rotatory evaporator*
- dimurnikan dengan kromatografi kolom

Hasil Sintesis

- dicuci dengan etanol dingin (2x5 mL)
- dikeringkan dalam desikator

2-Isonikotinohidazon-5,7-dibromoisatin (**11a**) (0,0458 gram; rendemen 91,6%)

- diuji kemurnian dengan KLT dan titik leleh, dan diidentifikasi dengan spektrometer IR, massa, dan NMR
- diuji antituberkulosis terhadap bakteri *Mycobacterium tuberculosis* H₃₇Rv

Data

A.4 Prosedur Sintesis 2-Isonikotinohidazon-3-(*N*-benzil)-5,7-dibromoisatin (11b)

(*N*-benzil)-5,7-dibromoisatin (**12b**) (0,040 gram; 0,1 mmol)

- dilarutkan dalam 20 mL etanol
- ditambah asam sulfat 1 tetes
- direfluks selama 20 menit pada suhu 78 °C
- ditambah isoniazid (**1**) (0,027 gram; 0,2 mmol) dalam etanol 10 mL
- direfluks pada suhu 78 °C selama 30 menit (reaksi yang berjalan dipantau dengan KLT)
- didinginkan dan diuapkan pelarutnya dalam *rotatory evaporator*
- dimurnikan dengan kromatografi kolom

Hasil Sintesis

- dicuci dengan etanol dingin (2x5 mL)
- dikeringkan dalam desikator

2-Isonikotinohidazon-3-(*N*-benzil)-5,7-dibromoisatin (**11b**) (0,041 gram; rendemen 81%)

- diuji kemurnian dengan KLT dan titik leleh, dan diidentifikasi dengan spektrometer IR, massa, dan NMR
- diuji antituberkulosis terhadap bakteri *Mycobacterium tuberculosis* H₃₇Rv

Data

A.5 Prosedur Sintesis 2-Isonikotinohidazon-3-(*N*-4-bromobenzil)-5,7-dibromoisatin (**11c**)

(*N*-4-bromobenzil)-5,7-dibromoisatin (**12c**) (0,040 gram; 0,085 mmol)

- dilarutkan dalam 20 mL etanol
- ditambah asam sulfat 1 tetes
- direfluks selama 20 menit pada suhu 78 °C
- ditambah isoniazid (**1**) (0,023 gram; 0,17 mmol) dalam etanol 10 mL
- direfluks pada suhu 78 °C selama 2 jam (reaksi yang berjalan dipantau dengan KLT)
- didinginkan dan diuapkan pelarutnya dalam *rotatory evaporator*
- dimurnikan dengan kromatografi kolom

Hasil Sintesis

- dicuci dengan etanol dingin (2x5 mL)
- dikeringkan dalam desikator

2-Isonikotinohidazon-3-(*N*-4-bromobenzil)-5,7-dibromoisatin (**11c**) (0,042 gram; rendemen 84,4)

- diuji kemurnian dengan KLT dan titik leleh, dan diidentifikasi dengan spektrometer IR, massa, dan NMR
- diuji antituberkulosis terhadap bakteri *Mycobacterium tuberculosis* H₃₇Rv

Data

A.6 Pengujian Hasil Sintesis (11-c) terhadap *M. tuberculosis* Secara *in vitro*

Senyawa hasil sintesis (11a-c)

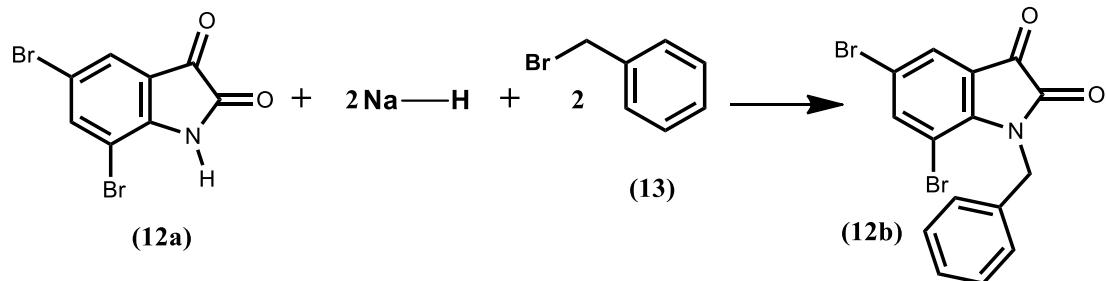
- disiapkan sebagai stock dengan kosentrasi 10.000 ppm dalam DMSO.
- diencerkan secara berseri dengan kosentrasi 500, 125, dan 31,25 ppm dan dimasukkan dalam tabung screw cap 3 mL
- disiapkan beberapa tabung screw cap 3 mL sebagai senyawa kontrol, kontrol positif (+), kontrol media, kontrol pelarut, dan kontrol antibiotik.
- dibuat suspensi bakteri MT 10^8 CFU/mL dengan cara 1 ose bakteri MT dimasukkan ke dalam tabung crew cap yang berisi 10 glassbeads dan 2 tetes Twen 0,05% steril serta akuades steril
- disiapkan suspensi bakteri MT 10^6 CFU/mL dalam 80 mL MB DS untuk masing-masing pengujian dibuat dengan cara diambil 0,8 mL suspensi bakteri 10^8 CFU/mL
- dimasukkan ke dalam media MB DS
- diinkubasi suspensi bakteri 10^6 CFU/mL yang berisi senyawa uji, kontrol positif, kontrol pelarut, dan kontrol antibiotik
- diinokulasi pada suhu 37 °C selama 10 hari yang selanjutnya pada suhu 37 °C selama 3-4 minggu
- diamati pertumbuhannya
- dilakukan pengulangan tiga kali

Data Bioaktivitas

LAMPIRAN B

PERHITUNGAN RENDEMEN

B.1. Perhitungan Rendemen Hasil *N*-benzil-5,7-Dibromoisatin (12b)



m	0,19 mmol	0,38 mmol	0,38 mmol
r	0,19 mmol	0,19 mmol	0,19 mmol
s	—	0,19 mmol	0,19 mmol

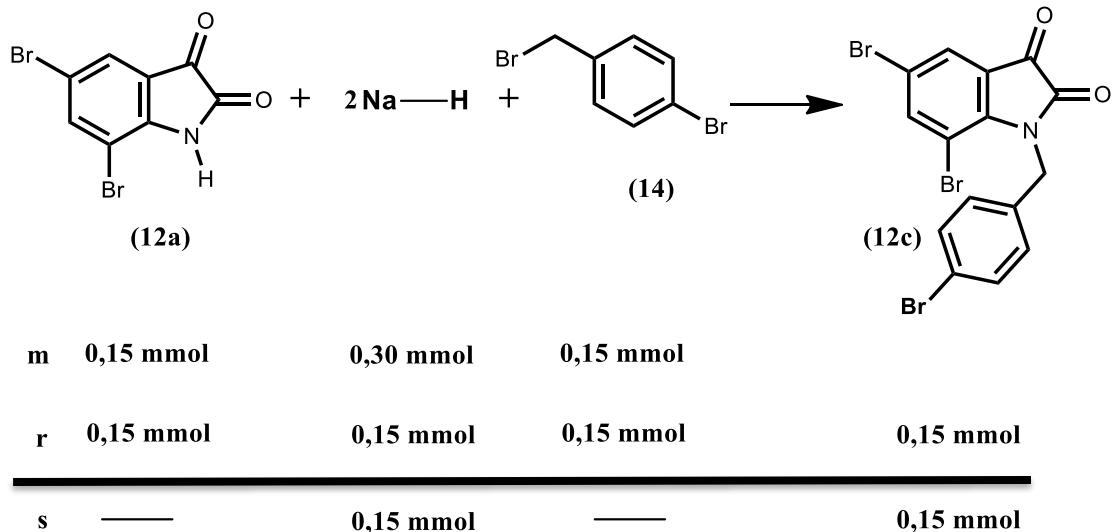
Mol *N*-benzil-5,7-dibromoisatin (**12b**) teoritis yang terbentuk = 0,19 mmol

Massa *N*-benzil-5,7-dibromoisatin (**12b**) teoritis yang terbentuk

$$= 0,19 \text{ mmol} \times 395,0455 \text{ g/mol} = 0,075 \text{ gram}$$

$$\begin{aligned} \text{Rendemen yang diperoleh} &= \frac{\text{Massa produk yang diperoleh}}{\text{Massa teori yang diperoleh}} \\ &= \frac{0,071 \text{ gram}}{0,075 \text{ gram}} = 94\% \end{aligned}$$

B.2. Perhitungan Rendemen Hasil N-4-bromobenzil-5,7-Dibromoisoatina (12c)



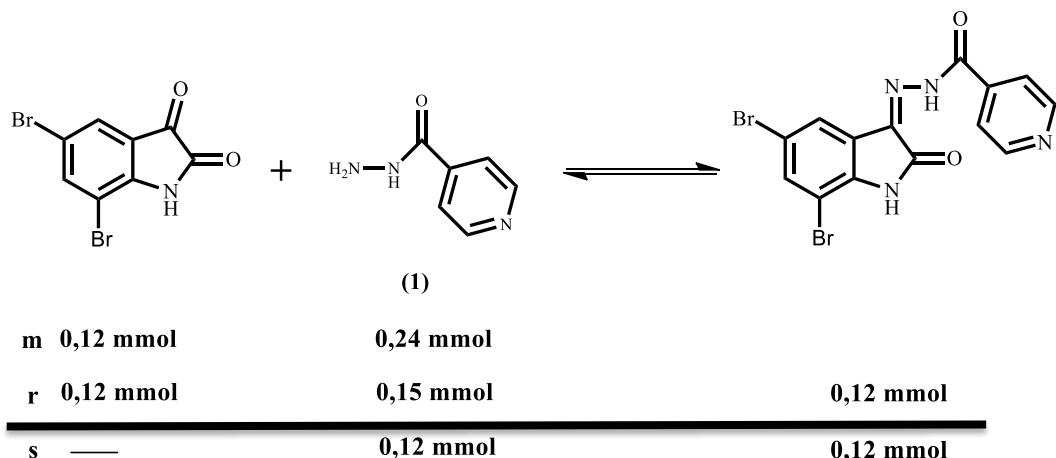
Mol N-4-bromobenzil-5,7-dibromoisoatina (12c) teoritis yang terbentuk = 0,15 mmol

Massa N-4-bromobenzil-5,7-dibromoisoatina (12c) teoritis yang terbentuk

$$= 0,15 \text{ mmol} \times 473,9415 \text{ g/mol} = 0,075 \text{ gram}$$

$$\begin{aligned} \text{Rendemen yang diperoleh} &= \frac{\text{Massa produk yang diperoleh}}{\text{Massa teori yang diperoleh}} \\ &= \frac{0,068 \text{ gram}}{0,075 \text{ gram}} = 91\% \end{aligned}$$

B.3. Perhitungan Rendemen Hasil 2-isosikotinohidrazone-5,7-dibromoisoatina (11a)



Mol 2-isonikotinohidazon-5,7-dibromoisatin (**11a**) teoritis yang terbentuk

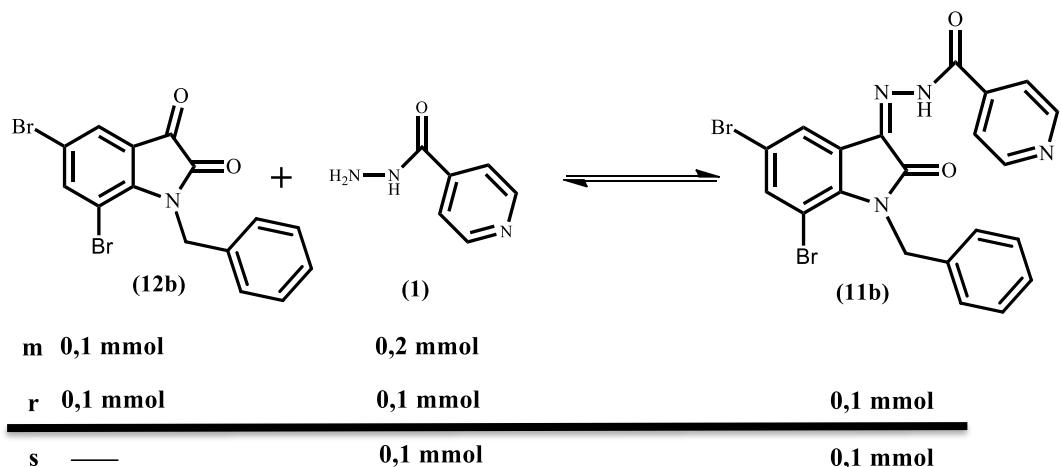
$$= 0,12 \text{ mmol}$$

Massa 2-isonikotinohidazon-5,7-dibromoisatin (**11a**) teoritis yang terbentuk

$$= 0,12 \text{ mmol} \times 424,0469 \text{ g/mol} = 0,050 \text{ gram}$$

$$\begin{aligned} \text{Rendemen yang diperoleh} &= \frac{\text{Massa produk yang diperoleh}}{\text{Massa teori yang diperoleh}} \\ &= \frac{0,0458 \text{ gram}}{0,050 \text{ gram}} = 91,6\% \end{aligned}$$

B.4. Perhitungan Rendemen Hasil 2-isonikotinohidazon-(N-benzil)-5,7-dibromoisatin (**11b**)



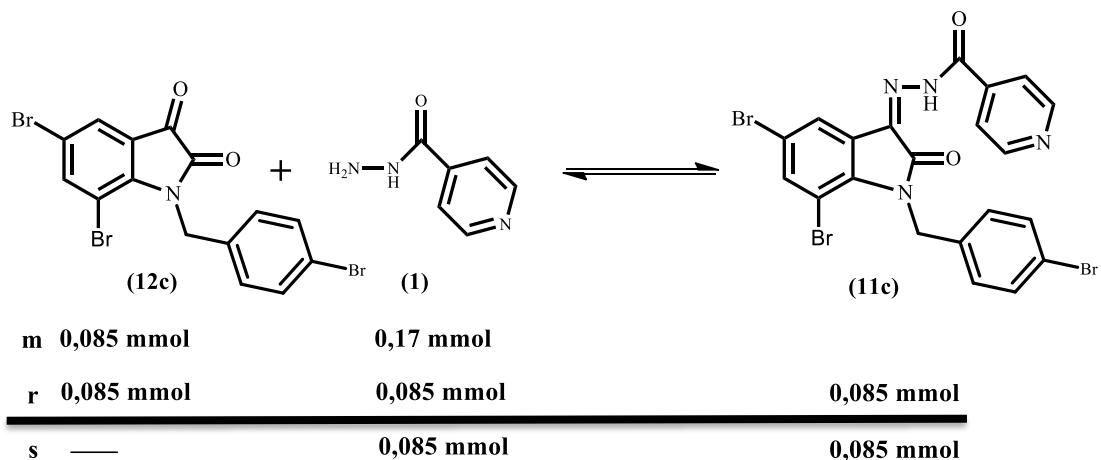
Mol 2-isonikotinohidrazone-(*N*-benzil)-5,7-dibromoisatin (**11b**) teoritis yang terbentuk

$$= 0,1 \text{ mmol}$$

Massa 2-isonikotinohidrazone-(*N*-benzil)-5,7-dibromoisatin (**11b**) teoritis yang terbentuk = $0,1 \text{ mmol} \times 511,9489 \text{ g/mol} = 0,05 \text{ gram}$

$$\begin{aligned} \text{Rendemen yang diperoleh} &= \frac{\text{Massa produk yang diperoleh}}{\text{Massa teori yang diperoleh}} \\ &= \frac{0,041 \text{ gram}}{0,050 \text{ gram}} = 81\% \end{aligned}$$

B.5. Perhitungan Rendemen Hasil 2-isonikotinohidrazone-(*N*-4-bromobenzil)-5,7-dibromoisatin (**11c**)



Mol 2-isonikotinohidrazen-(*N*-4-bromobenzil)-5,7-dibromo-1,3-dihydro-1,3-dioxo-2*H*-1,2-dihydroindole (**11c**) teoritis yang terbentuk = 0,085 mmol

Massa 2-isonikotinohidrazen-(*N*-4-bromobenzil)-5,7-dibromo-1,3-dihydro-1,3-dioxo-2*H*-1,2-dihydroindole (**11c**) teoritis yang terbentuk = 0,085 mmol x 589,8589 g/mol = 0,050 gram

$$\begin{aligned} \text{Rendemen yang diperoleh} &= \frac{\text{Massa produk yang diperoleh}}{\text{Massa teori yang diperoleh}} \\ &= \frac{0,042 \text{ gram}}{0,050 \text{ gram}} = 84,4\% \end{aligned}$$

“Halaman ini sengaja dikosongkan”

BIODATA PENULIS



Penulis dilahirkan di Malang, 10 Juni 1993 dengan nama lengkap M. Riza Ghulam Fahmi. Pendidikan formal yang telah ditempuh oleh penulis, yaitu di SDNU Bagorejo 1 Jember, SMPN 3 Peterongan Jombang, dan SMA Darul Ulum 1 Peterongan Jombang. Setelah lulus dari SMA Darul Ulum 1 Peterongan Jombang, penulis melanjutkan pendidikan di jurusan Kimia ITS Surabaya pada tahun 2011 dan terdaftar dengan NRP. 1411 100 127. Di Jurusan Kimia ini, Penulis mengambil bidang minat Kimia Organik dibawah bimbingan Prof. Mardi Santoso, Ph.D dan Arif Fadlan M.Si. Penulis pernah aktif dalam kegiatan sosial yang diadakan oleh Himpunan Mahasiswa Kimia (HIMKA), salah satunya yaitu HIMKA *FOR NATION*. Latihan Keterampilan Manajemen Mahasiswa (LKMM) yang pernah diikuti penulis selama kuliah di ITS adalah Pra-Tingkat Dasar (Pra-TD). Selain Latihan Keterampilan Manajemen Mahasiswa Pra-Tingkat Dasar (LKMM Pra-TD), penulis juga pernah mengikuti pelatihan Keamanan dan Keselamatan Kerja Laboratorium yang diadakan oleh Jurusan Kimia. Penulis diterima di program magister kimia ITS pada tahun 2015 dengan NRP 1415201006 dan menyelesaikan pendidikan magister selama 24 bulan. Penulis dapat dihubungi melalui

No HP : 085733133017
E-mail : riza.ghulam@gmail.com

“Halaman ini sengaja dikosongkan”