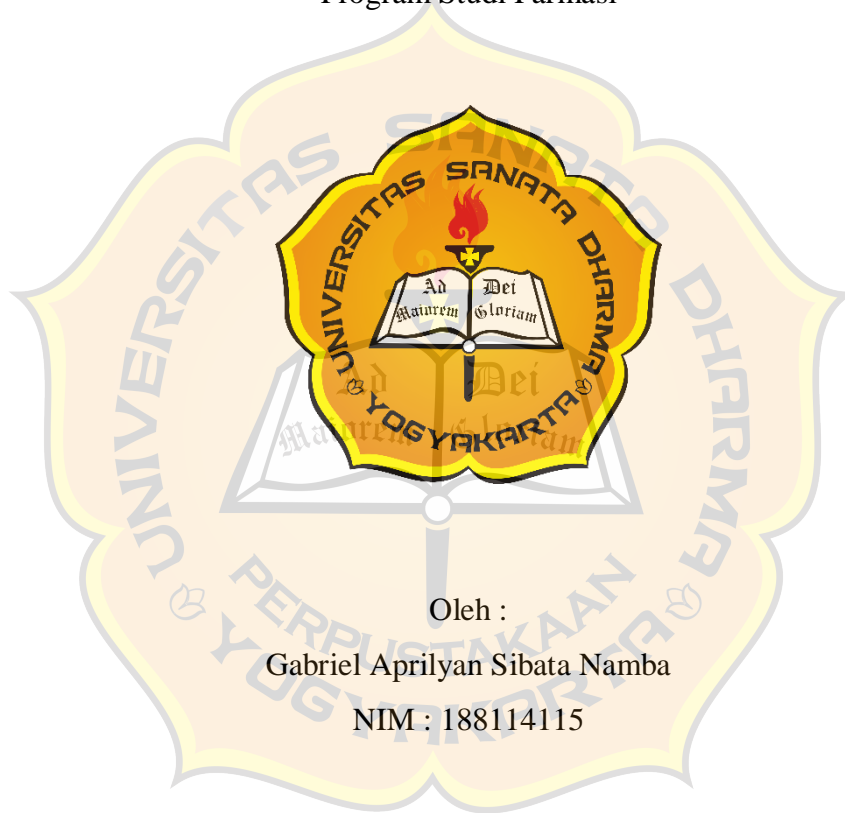


**UJI HAMBATAN EKSTRAK METANOL KULIT BATANG SIRSAK
(*Annona muricata* L.) TERHADAP 3CLpro SARS-CoV-2**

SKRIPSI

Diajukan untuk Memenuhi Salah Satu Syarat
Memperoleh Gelar Sarjana Farmasi (S.Farm.)
Program Studi Farmasi



Oleh :

Gabriel Aprilyan Sibata Namba

NIM : 188114115

**FAKULTAS FARMASI
UNIVERSITAS SANATA DHARMA
YOGYAKARTA**

2021

Persetujuan Pembimbing

UJI HAMBATAN EKSTRAK METANOL KULIT BATANG SIRSAK

(*Annona muricata* L.) TERHADAP 3CLpro SARS-CoV-2

Skripsi yang diajukan oleh :

Gabriel Aprilyan Sibata Namba

NIM : 188114115

telah disetujui oleh

Pembimbing



(Dr. Jeffry Julianus, M.Si.)

Tanggal 26 Januari 2022

Pengesahan Skripsi Berjudul

**UJI HAMBATAN EKSTRAK METANOL KULIT BATANG SIRSAK
(*Annona muricata* L.) TERHADAP 3CLpro SARS-CoV-2**

Oleh:

Gabriel Aprilyan Sibata Namba

NIM : 188114115

Dipertahankan dihadapan Panitia Penguji Skripsi

Fakultas Farmasi

Universitas Sanata Dharma

pada tanggal :

Mengetahui

Fakultas Farmasi

Universitas Sanata Dharma

Dekan

Dr. apt. Yustina Sri Hartini

Panitia Penguji:

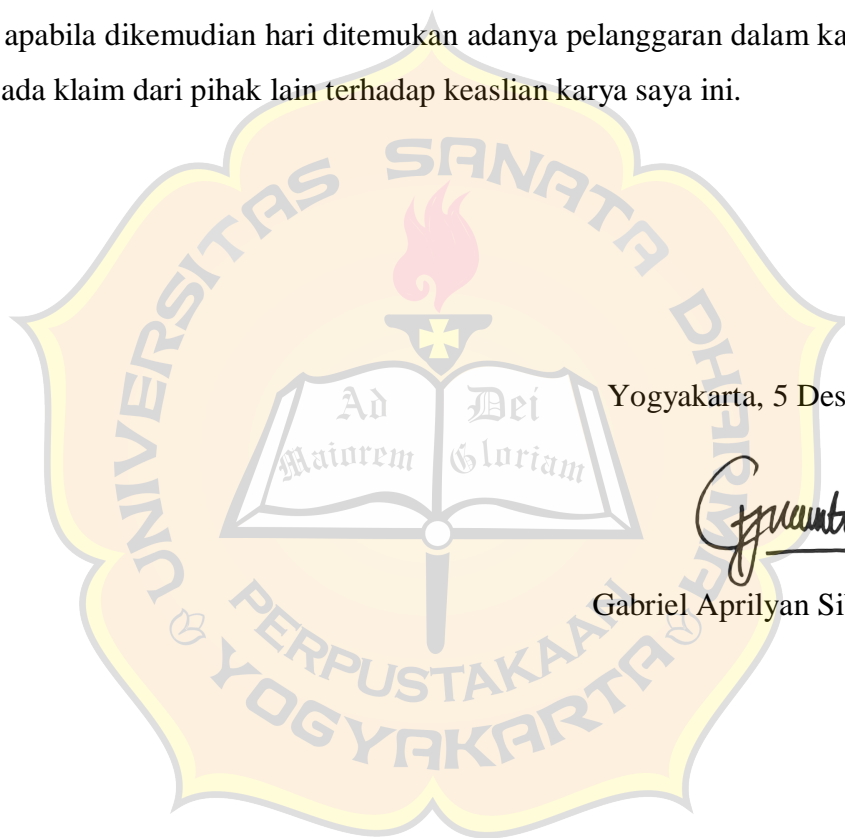
1. Dr. Jeffry Julianus, M.Si.
2. Damiana Sapta Candrasari, S.Si., M.Sc.
3. apt. Phebe Hendra M.Si., Ph.D.

Tanda tangan



PERNYATAAN KEASLIAN KARYA

Saya menyatakan bahwa skripsi saya yang berjudul “Uji Hambatan Ekstrak Metanol Kulit Batang Sirsak (*Annona muricata* L.) Terhadap 3CLpro SARS-CoV-2” ini sepenuhnya karya saya sendiri. Tidak ada bagian didalamnya yang merupakan plagiat dari karya orang lain dan saya tidak melakukan pengutipan dengan cara-cara yang tidak sesuai dengan etika keilmuan yang berlaku. Atas pernyataan ini saya siap menanggung resiko atau sanksi yang dijatuhkan kepada saya apabila dikemudian hari ditemukan adanya pelanggaran dalam karya saya ini atau ada klaim dari pihak lain terhadap keaslian karya saya ini.



Yogyakarta, 5 Desember 2021

Penulis

Gabriel Aprilyan Sibata Namba

**LEMBAR PERNYATAAN PERSETUJUAN
PUBLIKASI KARYA ILMIAH UNTUK KEPENTINGAN AKADEMIS**

Yang bertanda tangan di bawah ini, saya mahasiswa Universitas Sanata Dharma :

Nama : Gabriel Aprilyan Sibata Namba

Nomor Mahasiswa : 188114115

Demi pengembangan ilmu pengetahuan, saya memberikan kepada Perpustakaan Universitas Sanata Dharma karya ilmiah saya yang berjudul :

Uji Hambatan Ekstrak Metanol Kulit Batang Sirsak (*Annona Muricata L.*) Terhadap 3CLpro SARS-CoV-2

beserta perangkat yang diperlukan (bila ada). Dengan demikian saya memberikan kepada Perpustakaan Universitas Sanata Dharma hak untuk menyimpan, mengalihkan dalam bentuk media lain, mengelolanya dalam bentuk pangkalan data, mendistribusikan secara terbatas, dan mempublikasikannya di Internet atau media lain untuk kepentingan akademis tanpa perlu meminta ijin dari saya maupun memberikan royalti kepada saya selama tetap mencantumkan nama saya sebagai penulis.

Atas kemajuan teknologi informasi, saya tidak berkeberatan jika nama, tanda tangan, gambar atau *image* yang ada di dalam karya ilmiah saya terindeks oleh mesin pencari (*search engine*), misalnya *google*.

Demikian pernyataan ini yang saya buat dengan sebenarnya.

Dibuat di Yogyakarta

Pada tanggal : 14 Juni 2022

Yang menyatakan



(Gabriel Aprilyan Sibata Namba)

ABSTRAK

Wabah virus corona baru yang disebut sebagai COVID-19 pertama kali terjadi pada Desember 2019 di Wuhan, Provinsi Hubei, Tiongkok. COVID-19 diakibatkan oleh virus *severe acute respiratory syndrome 2* (SARS-CoV-2). 3-Chymotrypsine-Like Protease (3CLPro) merupakan protein yang bertanggung jawab untuk menghidrolisis ikatan peptida pada polipeptida yang berperan dalam pembentukan RNA virus baru. Penelitian ini bertujuan untuk menguji aktivitas penghambatan ekstrak metanol kulit batang sirsak terhadap 3CLpro SARS-CoV-2 secara *in vitro*. Penelitian dimulai dengan pemanenan dan determinasi kulit batang sirsak. Kulit batang tersebut diekstraksi dengan metode refluks menggunakan pelarut metanol. Ekstrak metanol dilakukan analisis kandungan kimia dengan metode kromatografi lapis tipis (KLT) untuk mengetahui kandungan ekstrak tersebut. Uji aktivitas penghambatan enzim 3CLpro oleh ekstrak metanol kulit batang sirsak dilakukan secara *in vitro*. Pada penelitian ini diperoleh rendemen ekstrak metanol sebesar 3,12 % dan diketahui ekstrak metanol tersebut mengandung alkaloid dengan nilai R_f 8,8 dan 8,1. Hasil uji *in vitro* menunjukkan ekstrak metanol kulit batang sirsak tidak mempunyai aktivitas penghambatan enzim 3CLpro.

Kata Kunci: 3CLpro, Covid-19, SARS-CoV-2, dan *Annona muricata* L.



ABSTRACT

The outbreak of the new coronavirus known as COVID-19 first occurred in December 2019 in Wuhan, Hubei Province, China. COVID-19 is caused by the severe acute respiratory syndrome 2 virus (SARS-CoV-2). 3-Chymotrypsine-Like Protease (3CLPro) is a protein that is responsible for hydrolyzing peptide bonds in polypeptides that play a role in the formation of new viral RNA. This study aimed to test the inhibitory activity of methanol extract of soursop bark against 3CLpro SARS-CoV-2 in vitro. The research started with harvesting and determining soursop bark. The bark was extracted by reflux method using methanol as solvent. The methanol extract was analyzed for its chemical content using the thin layer chromatography (TLC) method to determine the content of the extract. Assay of 3CLpro enzyme inhibitory activity by methanol extract of soursop bark was carried out in vitro. In this study, the yield of methanol extract was 3.12% and it was known that the methanol extract contained alkaloids with R_f values of 8.8 and 8.1. The results of the in vitro test showed that the methanol extract of soursop bark had no inhibitory activity of the 3CLpro enzyme.

Keywords: 3CLpro, Covid-19, SARS-CoV-2, dan *Annona muricata* L.



DAFTAR ISI

HALAMAN JUDUL	i
PERSETUJUAN PEMBIMBING	ii
HALAMAN PENGESAHAN	iii
PERNYATAAN KEASLIAN KARYA	iv
ABSTRAK	vi
<i>ABSTRACT</i>	vii
DAFTAR ISI	viii
DAFTAR TABEL	x
DAFTAR GAMBAR	xi
BAB I PENDAHULUAN	1
A. Latar Belakang	1
B. Rumusan Masalah	3
C. Keaslian Penelitian	3
D. Tujuan Penelitian	4
E. Manfaat Penelitian	4
BAB II	5
A. Virus Corona	5
B. 3- <i>Chymotrypsine-Like Protease</i> (3CLpro)	7
C. Sirsak	10
D. Refluks	12
E. Uji Kromatografi Lapis Tipis (KLT)	13
F. Uji <i>in vitro</i> FRET- based assay	13
G. Landasan Teori	14
H. Hipotesis	14
BAB III	16
A. Jenis dan Rancangan Penelitian	16
B. Variabel Penelitian	16
C. Definisi Operasional Variabel	16
D. Bahan Penelitian	17
E. Alat Penelitian	17

F. Tata Cara Penelitian	17
G. Analisis Hasil	20
BAB IV	21
A. Pemanenan dan Determinasi Tanaman.....	21
B. Ekstraksi Sampel	21
C. Uji Kandungan Alkaloid dan Kromatografi Lapis Tipis (KLT)	22
D. Uji <i>In Vitro</i> Aktivitas Penghambatan 3CLpro	25
BAB V.....	30
DAFTAR PUSTAKA	31



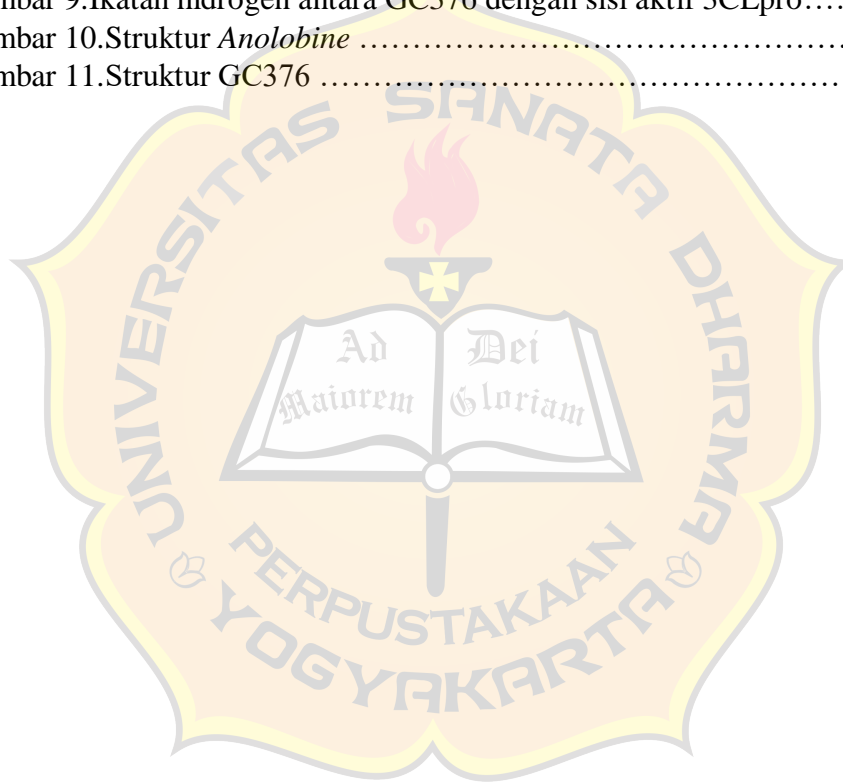
DAFTAR TABEL

Tabel I. Desain 96 wellplate yang akan digunakan.....	19
Tabel II. Hasil uji kandungan alkaloid dengan pereaksi mayer dan dragendorff.....	22
Tabel III. Hasil data uji hambatan terhadap enzim 3CLpro.....	26



DAFTAR GAMBAR

Gambar 1. Protein struktural utama pada struktur virus corona.....	6
Gambar 2. Siklus hidup virus SARS-CoV-2.....	6
Gambar 3. Genom virus corona, ekspresi gen replikasi dan pemrosesan poliprotein.....	7
Gambar 4. Struktur 3D 3CLpro dengan tampilan dua sisi yang berbeda.....	8
Gambar 5. Struktur protomer 3D 3CLpro SARS-CoV-2 dan SARS-CoV...	9
Gambar 6. Pohon sirsak.....	10
Gambar 7. Dugaan reaksi alkaloid dengan pereaksi Dragendorff.....	23
Gambar 8. Hasil pengamatan plat KLT dibawah sinar UV.....	24
Gambar 9. Ikatan hidrogen antara GC376 dengan sisi aktif 3CLpro.....	28
Gambar 10. Struktur <i>Anolobine</i>	29
Gambar 11. Struktur GC376	29



BAB I

PENDAHULUAN

A. Latar Belakang

Wabah virus corona baru yang dinamakan COVID-19, dilaporkan terjadi pertama kali pada Desember 2019 di Wuhan, Provinsi Hubei, Tiongkok. Berdasarkan data dari *World Health Organization* (WHO) pada 31 Mei 2021, sebanyak 170.051.718 orang terinfeksi COVID-19 dengan jumlah kematian mencapai 3.540.437 jiwa. Pada akhir Mei 2021 di Indonesia, dilaporkan sebanyak 1.816.041 kasus infeksi COVID-19 dengan angka kematian sebesar 50.404 jiwa (WHO, 2021). Penyebab dari COVID-19 adalah virus SARS-CoV-2 yang merupakan famili dari *coronaviridae* dengan subfamily *coronavirinae* yang diklasifikasikan dalam genus *betacoronavirus Lineage B*. Virus ini dapat menyebar antar manusia melalui droplet yang dikeluarkan saat batuk, bersin atau berbicara dan menginfeksi sel silia dan paru-paru manusia (Yan *et al.*, 2020). SARS-CoV-2 merupakan virus tipe RNA dengan masa inkubasi selama 3-7 hari hingga 14 hari (Xu *et al.*, 2020). Gejala yang terjadi berupa: batuk, dahak, dispnea, nyeri dada hingga sesak nafas yang dapat menyebabkan pingsan hingga hipoksia dan meninggal dunia. Gejala lainnya berupa: demam, sakit kepala, kebingungan, diare, mual dan muntah, hipotermia, malaise, dan gejala mirip flu (Kolditz and Ewig, 2017; Yan *et al.*, 2020).

Untuk saat ini, penanganan virus corona masih menjadi kendala dikarenakan belum adanya antivirus yang spesifik. Terapi yang dapat diberikan berupa pemberian obat *chloroquine phosphate* dan lopinavir/ritonavir/remdesivir masih menuai pro dan kontra terkait rasio manfaat dan keamanan (Xu *et al.*, 2020; Gao, Tian, and Yang., 2020). Pengembangan vaksin terus dilakukan dengan sumber berasal dari rekombinan subunit, *inactivated*, dan *adenovirus-based vector* (Dong *et al.*, 2020). Pengembangan vaksin dimulai pada awal bulan Januari 2020, pada bulan Maret 2020 telah dilakukan uji coba fase 1 dan terdapat sekitar lebih dari 180 kandidat vaksin. Beberapa kandidat vaksin telah memperoleh data uji coba fase 1 dan 2, dan banyak di antaranya dilanjutkan pada uji coba fase 3. Berdasarkan data

yang diperoleh sejauh ini, vaksin yang memiliki efektivitas baik dan aman akan tersedia dalam beberapa bulan (Krammer, 2020). Terdapat beberapa vaksin yang sudah diizinkan untuk digunakan yaitu, Vaksin mRNA-1273 (Moderna) vaksin tipe *mRNA*, Vaksin BNT162b62 (Pfizer-BioNTech) vaksin tipe *mRNA*, Vaksin Ad26.CoV2.S (Janssen/Jhonson & Jhonson) vaksin tipe *viral vector*, Vaksin ChAdOx1 atau AZS1222 (AstraZeneca/Oxford) vaksin tipe *viral vector*, Vaksin NVX-Cov2373 (Novavax, Inc) vaksin tipe *protein subunit*, vaksin CVnCoV (CureVac/GalxoSmithKline) vaksin tipe *mRNA*, vaksin Gam-COVID-Vac atau Sputnik V (Gamaleya National Research Centre for Epidemiology and Microbiology) vaksin tipe *viral vector*, vaksin CoronaVac (Sinovac Biotech) vaksin tipe *inactivated virus*, dan BBIBP-CorV (Sinopharm 1/2) vaksin tipe *inactivated virus* (Creech, Walker, and Samuels., 2021).

Siklus hidup virus corona didukung oleh keberadaan protein-protein serta genom yang ada di dalamnya. Di antara protein-protein tersebut, salah satu yang bertanggung jawab atas siklus hidup virus corona adalah *3-Chymotrypsine-Like Protease* (3CLpro). Protein ini merupakan enzim yang berperan dalam menghidrolisis ikatan peptida pada polipeptida dalam pembentukan RNA virus yang baru. Kemudian, RNA virus yang baru terbentuk akan ditranslasikan menjadi protein struktural maupun nonstruktural baru dari virus tersebut (Gyebi *et al.*, 2020). Dengan penghambatan protein 3CLpro, maka diprediksi proses replikasi virus akan terhenti.

Perkembangan teknologi yang semakin maju memudahkan dilakukannya simulasi penghambatan protein 3CLpro dengan data bioinformatika. Simulasi ini dapat memprediksi senyawa yang memiliki daya hambat yang baik terhadap protein dan berpotensi menjadikan senyawa tersebut sebagai obat antivirus SARS-CoV-2 sebelum memasuki tahap pengujian *in vitro* dan *in vivo*. Terkait hal ini, telah dilakukan pengujian secara *in silico* oleh *Drug Discovery Student Club* Fakultas Farmasi Universitas Sanata Dharma terhadap protein target yakni 3CLpro SARS-CoV-2 menggunakan pangkalan data tanaman lokal Indonesia. Berdasarkan uji tersebut, didapatkan 10 senyawa *hits* yang berpotensi sebagai obat antivirus

berdasarkan energi bebas ikatan (kkal/mol). Salah satu di antaranya yaitu senyawa *anolobine* dengan nilai ΔG -7,9 Kka/mol. Senyawa tersebut terdapat pada kulit batang sirsak. Oleh karena itu, pada penelitian ini akan dilakukan pengujian *in vitro* terhadap ekstrak metanol kulit batang sirsak untuk menentukan aktivitas penghambatan terhadap protein 3CLpro SARS-CoV-2.

B. Rumusan Masalah

1. Apakah ekstrak metanol kulit batang sirsak memiliki aktivitas penghambatan terhadap protein 3CLpro SARS-CoV-2?
2. Bagaimanakah profil kromatografi lapis tipis (KLT) ekstrak metanol kulit batang sirsak?

C. Keaslian Penelitian

Kandungan alkaloid pada batang sirsak memiliki potensi sebagai antivirus, sebab beberapa alkaloid memiliki aktivitas antivirus antara lain, virus chikungunya, *human cytomegalovirus* (HCMV), virus hepatitis C, virus dengue, *human immunodeficiency virus* (HIV), virus influenza A, virus zika dan telah digunakan sebagai prototipe dalam pengembangan obat antivirus sintesis (Fielding *et al.*, 2020). Beberapa penelitian dengan menggunakan ekstrak metanol kulit batang sirsak pernah dilakukan sebelumnya., Penelitian yang dilakukan untuk melihat toksisitas ekstrak metanol kulit batang sirsak terhadap *Artemia salina* dengan *Uji Brine Shrimp Lethality Test* (BLST) dan diperoleh nilai LC_{50} dari ekstrak sebesar $3.98 \times 10^{-7} \mu\text{g mL}^{-1}$ (Salempa, Muharram, and Dini, 2015). Pada penelitian kali akan dilakukan pengujian *in vitro* terhadap ekstrak metanol tanaman tadi untuk melihat aktivitas hambatannya terhadap protein 3CLpro SARS-CoV-2, ekstrak diperoleh menggunakan metode refluks dengan pelarut metanol kemudian dipreparasi dan dilakukan pengujian menggunakan kits 3CLpro SARS-CoV-2 yang sejauh penelusuran pustaka belum pernah dilakukan pengujian menggunakan ekstrak ini terhadap protein target 3CLpro SARS-CoV-2.

D. Tujuan Penelitian

1. Mengetahui aktivitas penghambatan ekstrak metanol kulit batang sirsak pada protein 3CLpro SARS-CoV-2
2. Mengetahui profil KLT ekstrak metanol kulit batang sirsak.

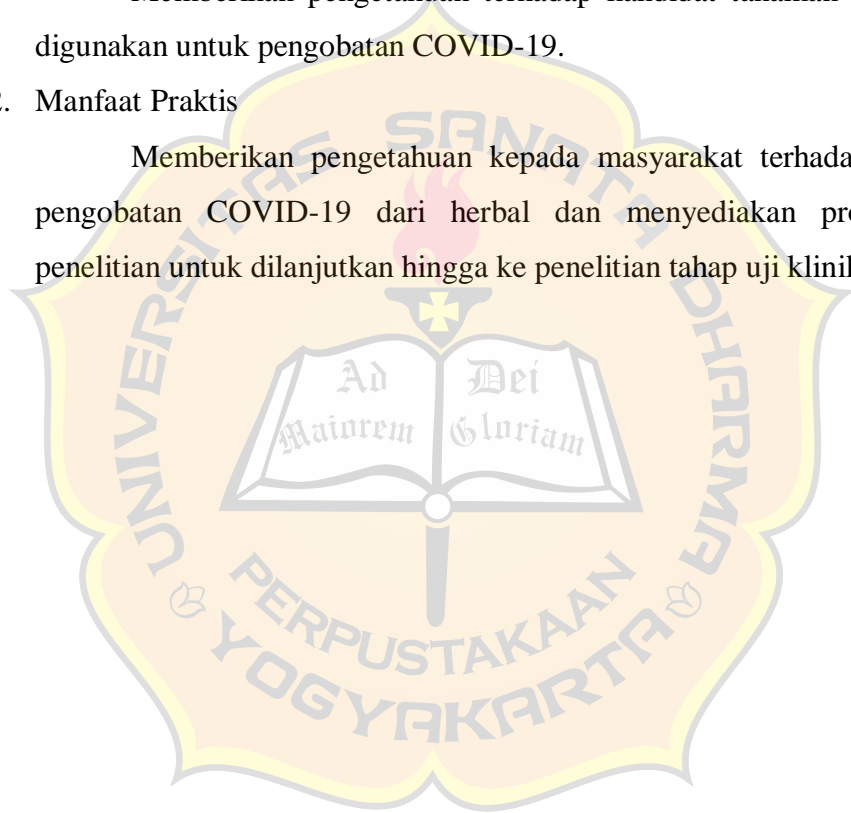
E. Manfaat Penelitian

1. Manfaat Teoritis

Memberikan pengetahuan terhadap kandidat tanaman yang dapat digunakan untuk pengobatan COVID-19.

2. Manfaat Praktis

Memberikan pengetahuan kepada masyarakat terhadap kandidat pengobatan COVID-19 dari herbal dan menyediakan produk hasil penelitian untuk dilanjutkan hingga ke penelitian tahap uji klinik.

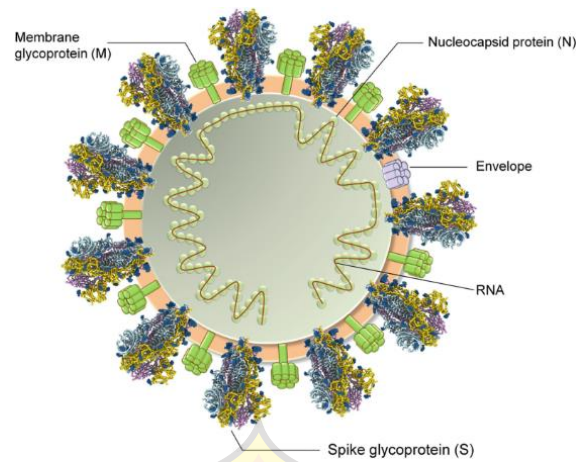


BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

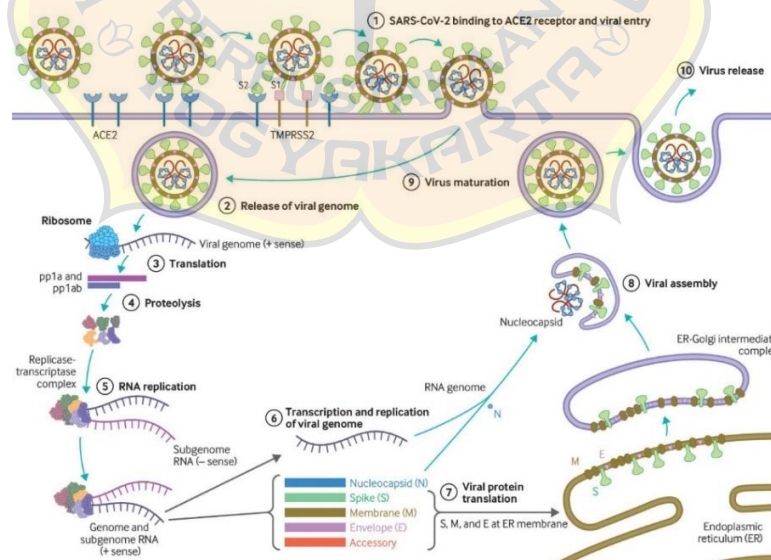
A. Virus Corona

Virus corona ditemukan pertama kali sekitar tahun 1960, merupakan virus RNA yang diklasifikasikan dalam ordo *Nidovirales*, famili *Coronaviridae*, dan subfamili *Coronavirinae*. Virus ini dapat menginfeksi sel inang pada vertebrata tertentu dan memiliki ciri tonjolan paku seperti tongkat pada permukaannya. Subfamili *Coronavirinae* berdasarkan sifat serologis dan genomiknya dibagi kedalam empat genus utama yaitu, *Alphacoronavirus*, *Betacoronavirus*, *Gammacoronavirus*, dan *Deltacoronavirus*. *Betacoronavirus* dibagi lagi menjadi empat *lineage* yaitu A, B, C, dan D. Virus penyebab COVID-19 diberi nama SARS-CoV-2 karena memiliki kemiripan lebih dari 82% dengan genom RNA SARS-CoV. SARS-Cov-2 diklasifikasikan kedalam subgenus *Sarbecovirus* dari genus *betacoronavirus lineage B* (Yan *et al.*, 2020; Zhang *et al.*, 2020). Struktur dari virus corona berbentuk pleomorfik dengan untai tunggal RNA dan terkait dengan nukleoprotein dalam kapsid yang di dalamnya terkandung protein matriks (Greenwood *et al.*, 2012). Genom virus corona berukuran kurang lebih dari 30 kb, sehingga dikategorikan sebagai genom RNA virus terbesar yang sejauh ini diketahui. Dalam virion virus corona, RNA virus dikomplekskan dengan nukleoprotein dalam nukleokapsid heliks. RNA ini tertutup dalam selaput membran bilayer lipid dengan protein transmembran yang merupakan protein struktural dari virus dalam jumlah melimpah. Virus corona juga memiliki spike glikoprotein ber-*envelope* (Aggarwal, 2010). Protein struktural utama virus corona terdiri dari protein N (*nukleokapsid*), E (*envelope*), M (*membrane*) dan S (*spike*), sedangkan protein non-struktural terdiri dari enam belas non-struktural protein (nsp 1-16), seperti tersaji pada **Gambar 1** (Hartini *et al.*, 2020; Hariyono *et al.*, 2020; Wang *et al.*, 2020). *Spike protein* (S) akan menempel pada sel inang dan *envelope protein* (E) yang berfungsi membentuk *viral envelope*. Membran protein (M) berfungsi untuk menyatukan bentuk virus dan menjaga bentuk dari virus (Seah *et al.*, 2020).



Gambar 1. Protein struktural utama pada struktur virus corona (Kumar *et al.*, 2020).

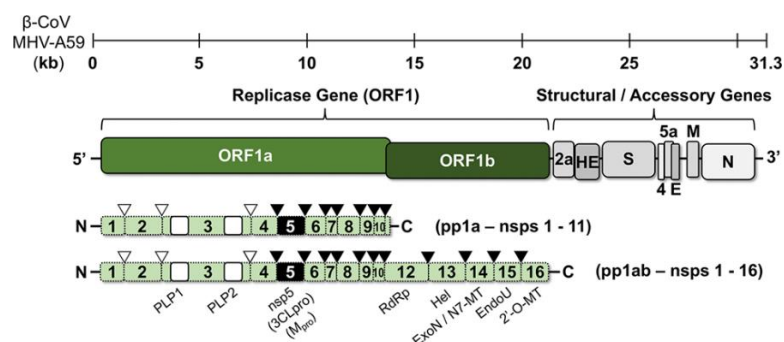
Siklus hidup virus corona diawali dengan penempelan virus pada reseptor *Angiotensin Converting Enzyme-2* (ACE-2) pada permukaan sel inang sehingga virus dapat masuk melalui proses endositosis, seperti tersaji pada **Gambar 2**. Setelah itu, virus akan melepaskan materi genetik untuk diekspresikan dalam sel inang dengan tujuan memperbanyak jumlah virus. Proses replikasi dan transkripsi virus corona terjadi pada retikulum endoplasma. Setelah diekspresikan, virus akan keluar dari dalam sel melalui proses eksositosis (MacLachlan and Dubovi, 2010).



Gambar 2. Siklus hidup virus SARS-CoV-2 (Diadaptasi dari Cevik *et al.*, 2020)

B. 3-Chymotrypsine-Like Protease (3CLpro)

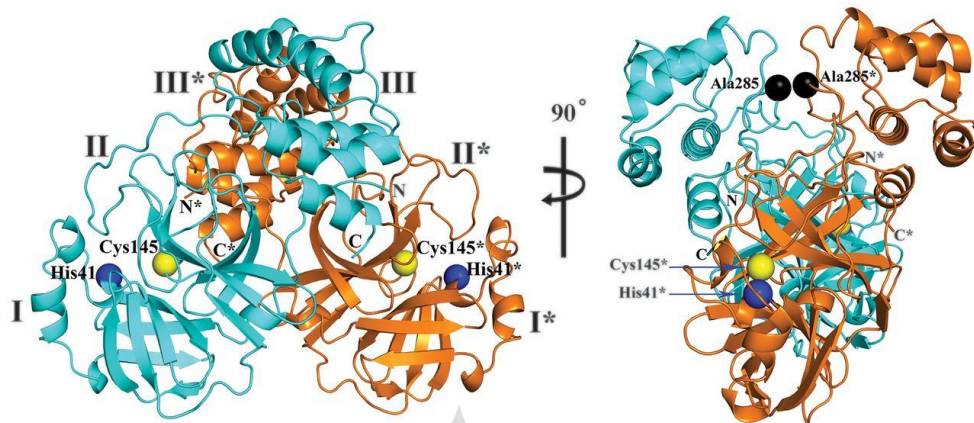
Severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 (SARS-Cov-2) mirip dengan SARS-CoV dan *Middle East respiratory syndrome coronavirus* (MERS-CoV). Analisis terhadap *sequence genome* tiga virus ini menunjukkan SARS-CoV-2 memiliki kemiripan yang lebih tinggi terhadap SARS-CoV dengan persentase (89,1% kemiripan nukleotida) dibandingkan dengan MERS-CoV. Pada SARS-CoV, 3CLpro yang merupakan *non-structural protein 5* (nsp5) membelah 11 *sites* di poliprotein termasuk *N-terminal* dan *C-terminal autoprocessing sites* untuk menghasilkan berbagai protein non-struktural yang penting bagi replikasi virus (He *et al.*, 2020; Qamar *et al.*, 2020). Pada proses replikasi, virus mentranslasikan gen replikasi (ORF1) yang terdiri dari ORF1a dan ORF1b seperti tersaji pada **Gambar 3**. *Ribosome frame-shifting sequences* yang terletak di ujung ORF1 yang terdiri dari pseudoknot RNA menyebabkan translasi pada dua prekursor poliprotein yang besar dengan panjang yang berbeda yaitu poliprotein 1a (pp1a) dan poliprotein 1ab (pp1ab). Pada pp1a terdapat protein non-struktural (nsp) 1-11 dan pada pp1ab terdiri dari kode translasi lengkap protein non-struktural (nsp) 1-16. Proses penting dalam replikasi virus ini adalah pemrosesan proteolitik dari poliprotein yang akan dilakukan oleh protease yang dikode oleh virus sehingga menghasilkan mesin replikasi virus yang matang dan aktif secara fungsional. Tiga protease yang memiliki peran memediasi pemrosesan proteolitik dari poliprotein replikasi yaitu PLP1, PLP2, dan Nsp 5 (3CLpro), seperti terlihat pada **Gambar 3** (Roe *et al.*, 2021).



Gambar 3. Genom virus corona, ekspresi gen replikasi dan pemrosesan poliprotein (Roe *et al.*, 2021)

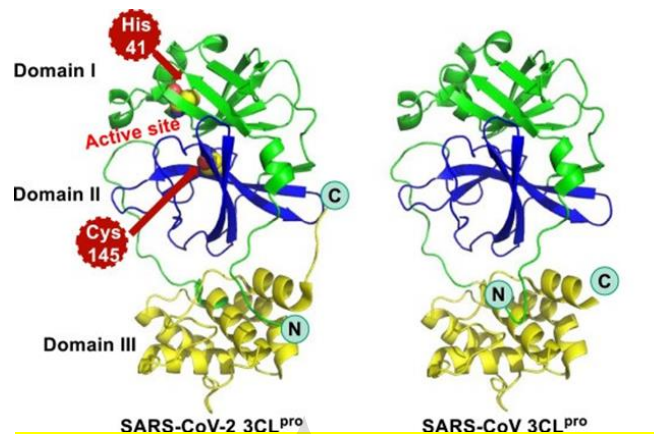
Virus corona biasanya menyandi dua atau tiga protease untuk memproses poliprotein replikase, dengan salah satu atau dua merupakan *papain-like protease* (PLP) yang disandi dalam nsp3 dan satu protease utama yaitu 3CLpro (nsp5). *Papain-like protease* (PLP) bertanggung jawab atas peristiwa pembelahan antara nsp1 dan ujung N pada nsp4, sedangkan semua peristiwa pembelahan pp1a / pp1ab yang tersisa dimediasi oleh nsp 5 (3CLpro). Karena pemrosesan proteolitik bertindak sebagai mekanisme pengaturan kunci dalam ekspresi protein replikase virus corona, pemblokiran pada proses ini (pemblokiran 3CLpro) dapat menghentikan replikasi virus seluruhnya (Roe *et al.*, 2021).

Pada SARS-CoV dan SARS-CoV-2, tiap protomer 3CLpro, seperti terlihat pada **Gambar 4** terdapat tiga domain, yaitu: domain I (residu 10–99), domain II (residu 100–182) yang mengandung residu *N-terminal*, dan domain III (residu 198–303). Pada *N-terminal*, residunya membentuk lipatan *chymotrypsin* yang khas, sedangkan pada *C-terminal* residunya membentuk domain ekstra. Celah antara domain I dan domain II terdapat residu aktif yang dapat dibagi menjadi *subsites* S1–S6. Pada *subsites* S1 terdapat katalis *dyad* His41–Cys145. *Subsites* S1 berperan dalam menstabilkan transisi selama proteolisis. Pada *subsites* S2 dan S4 terdapat rantai samping asam amino yang bersifat hidrofobik. *Subsites* S5 dan S6 terletak dekat dengan permukaan struktur enzim namun jauh dari katalitik *dyad* sehingga memiliki peran yang sedikit pada pengikatan substrat. Antara domain II dan III monomer induk dan domain II monomer lainnya terdapat *N-terminus*, pada *N-terminus* (biasa disebut *N-finger*) terdapat interaksi yang berperan penting pada proses dimerisasi enzim. Hal ini terjadi karena terdapat tujuh residu asam amino yang terhimpit di antara protomer A dan B sehingga berinteraksi dengan dua domain terminal dari protomer A dan B. Dimerisasi enzim diperlukan untuk aktivitas katalitik (He *et al.*, 2020; Zhang *et al.*, 2020).



Gambar 4. Struktur 3D 3CLpro dengan tampilan dua sisi yang berbeda, dengan salah satu protomer diberi warna biru cerah dan yang satunya berwarna orange (Zhang *et al.*, 2020)

Sequences 3CLpro dari SARS-CoV-2 memiliki kemiripan sebesar 96% dengan SARS-CoV, seperti terlihat pada **Gambar 5**, dengan perbedaan hanya pada 12 residu asam amino dari 306 residu asam amino yang ada. Residu asam amino pada sisi aktif SARS-CoV dan SARS-CoV-2 berorientasi pada arah yang hampir sama tetapi ala-46 di *subsiste* S2 SARS-CoV-2 terletak dekat dengan permukaan struktur. Terdapat interaksi polar pada dimer 3CLpro SARS-CoV yang dibentuk oleh gugus hidroksil pada residu asam amino thr-285 di domain III pada masing-masing protomer. Hal ini disebabkan oleh interaksi hidrofobik antara thr-285 dan ile-286. Namun pada dimer 3CLpro SARS-CoV-2, thr-285 dan ile-286 digantikan dengan ala-285 dan leu-286 (ditunjukkan oleh bola hitam pada **Gambar 4**, pengantian ini menyebabkan peningkatan aktivitas katalitik protease (He *et al.*, 2020; Zhang *et al.*, 2020).



Gambar 5. Struktur protomer 3D 3CLpro SARS-CoV-2 dan SARS-CoV (He *et al.*, 2020)

C. Sirsak

Sirsak (*Annona muricata* L.) merupakan tanaman buah dari famili *annonaceae* yang tersebar luas di daerah yang beriklim tropis dan subtropis di dunia. Tanaman ini memiliki manfaat sebagai antikanker, antikonvulsan, antirematik, antiparasit, antimalaria, hepatoprotektif, dan antidiabetes (Pertiwi *et al.*, 2020). Pada sirsak terkandung banyak senyawa kimia, yaitu: asetaldehida, amiloid, annonain, *annomuricine*, asam sitrat, etanol, kalium klorida, glukosa, sukrosa, fruktosa, tanin, asam kumariat, dan metil heksanoat. Metabolit sekunder dari tanaman ini, yaitu: alkaloid, steroid, triterpenoid, fenolik, kumarin, dan flavonoid. Kandungan dari kulit batang sirsak, antara lain: tanin, fitosteroid, kalsium-oksalat, murisine, alkaloid dan flavonoid (Juwita *et al.*, 2015).



Gambar 6. Pohon Sirsak (NParks Flora & Fauna, 2022)

Klasifikasi sirsak (United States Department of Agriculture, 2021) yaitu :

Kingdom : Plantae
Super Divisi : Spermatophyta
Divisi : Magnoliophyta
Kelas : Magnoliopsida
Ordo : Magnoliales
Famili : Annonaceae
Genus : *Annona* L.
Spesies : *Annona muricata* L.

Morfologi sirsak yaitu memiliki warna daun hijau muda dan tua dengan panjang 6-18 cm, lebar 3-7 cm, berbentuk seperti bulat telur, memiliki ujung yang lancip dan ada juga yang tumpul, daun bagian atasnya mengkilap dan gundul kusam pada bagian bawahnya (Arfianto, 2018). Baunya sangat menyengat dengan tangkai 3-10 mm. Bunga sirsak memiliki bungkal tunggal dan berbagai macam putik sehingga disebut berpistil majemuk. Mahkota bunga berjumlah 6 sepalum yang terdiri dari 2 lingkaran, berbentuk segitiga, tebal dan kaku, warna kuning keputihan dan setelah tua akan mekar menjadi buah. Buah sirsak berwarna hijau, jika matang akan berwarna hijau kekuningan, dan jika belum matang akan berwarna hijau muda. Bentuknya oval dan lonjong, struktur kulit buahnya berduri kehitaman dan tidak tajam. Bagian dalam dari buah ini berwarna putih, lembek, dan memiliki biji berwarna hitam. Biji sirsak berwarna hitam atau coklat yang berbentuk bulat dan lonjong dengan panjang 16,8 mm dan lebar 9,6 mm. Secara normal terdapat 20-70 butir biji, namun jumlahnya sangat bervariasi. Jika biji berwarna putih kecoklatan, maka biji tersebut tidaklah normal.

Daun, kulit batang, buah dan biji dari tanaman sirsak dilaporkan telah banyak digunakan sebagai obat tradisional. Pemanfaatan tanaman ini secara tradisional dilakukan dengan merebus bagian tertentu pada tanaman dan bagian yang paling sering digunakan dalam pengobatan tradisional, yaitu: kulit batang, akar, biji atau daun. Secara tradisional kulit batang sirsak digunakan untuk mengobati beberapa penyakit, antara lain: insomnia, penyakit selesema, demam,

menggigil, flu, gangguan pencernaan, kegugupan, palpitasi, ruam, kejang, penyakit kulit, dan sebagai penenang. Berdasarkan uji *in vitro*, kulit batang sirsak memiliki efek farmakologi meliputi antiprotozoal, dan antivirus terhadap virus Herpes simpleks. Hasil uji *in vivo* kulit batang sirsak memiliki aktivitas hipoglikemik dan penyembuhan luka (Coria-Te´llez *et al.*, 2018). Beberapa studi juga menunjukkan jika ekstrak kulit batang sirsak memiliki aktivitas hepatoprotektif, antikolestasis, antisinusoidal yang signifikan dan antikanker prostat (Gavamukulya *et al.*, 2017; Foster *et al.*, 2020).

Anolobine merupakan salah satu alkaloid yang memiliki beberapa aktivitas farmakologi, yaitu: antibakteri, antileishmanial, *trypanocidal*, antiplasmodial dan anti-asetilkolinesterase. Senyawa tersebut terdapat pada beberapa bagian tanaman antara lain kulit batang, daun, akar, batang, dan ranting (Claude *et al.*, 2018). Pada strukturnya terdapat 2 atom yang dapat berperan sebagai donor ikatan hidrogen dan 4 atom yang dapat berperan sebagai akseptor ikatan hidrogen (PubChem, 2022). Terdapat juga gugus hidroksi (-OH) yang membuat *anolobine* cenderung bersifat polar, sehingga proses ekstraksi dilakukan menggunakan pelarut metanol yang dapat melarutkan senyawa ini karena pada metanol terdapat juga gugus hidroksi (-OH).

D. Refluks

Refluks merupakan metode ekstraksi yang dilakukan dengan pemanasan pada temperatur titik didih pelarutnya dalam selang waktu tertentu dengan menggunakan pelarut dalam jumlah terbatas yang relatif konstan dengan adanya pendingin balik dan metode ini digunakan untuk mengekstraksi sampel yang tahan terhadap panas (Susanty and Bachmid, 2016). Metode refluks dilakukan dengan cara merebus sampel dalam pelarut dengan temperature titik didih pelarutnya, menggunakan wadah yang telah dilengkapi kondensor dengan jangka waktu yang biasa digunakan yaitu 3-7 jam (Kiswandono, 2011).

Pemanasan pada metode refluks mempermudah cairan penyari untuk menembus dinding sel simplisia. Sel pada simplisia akan mengembang yang

menyebabkan rongga-rongga pada sel terbuka, sehingga pelarut dengan mudah menjangkau zat aktif di dalam sel dan akan mempersingkat waktu ekstraksi (Nugraheni *et al.*, 2017). Kelebihan dari metode ini yaitu waktu yang diperlukan relatif singkat dikarenakan terjadi kontak dengan pelarut secara terus-menerus dan cukup efektif serta efisien sebab pelarut yang digunakan lebih sedikit (Kiswando, 2011).

E. Kromatografi Lapis Tipis (KLT)

Kromatografi lapis tipis (KLT) merupakan suatu metode analisis paling sederhana untuk menentukan senyawa yang terkandung dalam tumbuhan. Peralatan dan bahan yang digunakan untuk menganalisis sampel dengan metode KLT cukup sederhana yaitu sebuah bejana tertutup (*chamber*) yang didalamnya berisi pelarut dan lempeng KLT. Identitas senyawa yang terkandung dalam tanaman pada uji KLT menggunakan nilai R_f dan warna noda yang diperoleh (Forestryana and Arnida, 2020; Wulandari, 2011).

Prinsip dari KLT yaitu memisahkan senyawa yang mengandung multi komponen dengan menggunakan fase diam dan fase gerak sehingga menyebabkan terjadinya perbedaan migrasi dari tiap komponen (Oktaviantri, Feladita, and Agustin., 2019). Perbedaan migrasi disebabkan oleh perbedaan tingkat afinitas tiap-tiap komponen dalam fase diam dan fase gerak. Sifat fisika dan kimia dari masing-masing senyawa menentukan afinitas senyawa dalam fase diam dan fase gerak. Terdapat faktor yang menyebabkan perbedaan migrasi komponen pada sampel, yaitu: faktor pendorong migrasi analit yang meliputi gravitasi, elektrokinetik, dan hidrodinamik, sedangkan faktor penghambat migrasi analit meliputi friksi molekul, elektrostatik, adsorpsi, kelarutan, ikatan kimia dan interaksi ion (Wulandari, 2011).

F. Uji *in vitro* FRET- based assay

Fluorescence Resonance Energy Transfer (FRET) merupakan proses transfer energi antara 2 molekul pendonor energi dan akseptor energi. Terjadinya transfer energi disebabkan oleh interaksi muatan-muatan antara donor yang

bersilasi dengan dipol akseptor dalam jarak yang dekat (1-10 nm). Selain jarak yang dekat, momen dipol transisi dari donor dan akseptor harus memiliki orientasi yang tepat antara keduanya. *Enzyme assays* merupakan salah satu implementasi tes FRET yang paling populer dan beberapa di antaranya telah dikembangkan untuk mengkaji proses aktivitas proteolitik protease, nuklease serta kinase dan fosfatase.

Protease berfungsi mengkatalisis proses hidrolisis ikatan kimia antara asam amino dan memiliki peranan penting dalam mempertahankan homeostasis seluler melalui regulasi aktivitas berbagai protein (enzim, antibodi, dan hormon lainnya). Banyak tes FRET telah digunakan untuk mengukur aktivitas enzim dari berbagai jenis protease, seperti: caspase, kolagenase, tripsin dan kimotripsin, trombin, dan metalloproteinase. Cara melihat aktivitas protease dengan FRET adalah menggunakan donor dan akseptor yang terkait dengan peptida yang memiliki urutan asam amino tertentu. Peptida tersebut dibelah oleh protease yang diinginkan sehingga memisahkan antara donor dan akseptor. Dengan demikian, sinyal FRET yang menurun akan menjadi fungsi dari aktivitas enzim (Santos *et al.*, 2020).

G. Landasan Teori

Pada SARS-CoV-2, 3CLpro memegang peranan penting dalam proses replikasi virus. Enzim ini bertugas menghidrolisis ikatan peptida pada polipeptida yang berperan penting dalam pembentukan RNA virus baru. Penghambatan terhadap aktivitas enzim 3CLpro merupakan cara untuk mengobati SARS-CoV-2. Tahap pertama dalam penemuan obat baru sebagai penghambat 3CLpro secara *in silico* menunjukkan senyawa *anolobine* dapat menghambat 3CLpro. Berdasarkan hasil tersebut, *anolobine* diduga secara *in vitro* dapat menghambat aktivitas 3CLpro. *Anolobine* yang terdapat pada kulit batang sirsak dapat diekstraksi dengan menggunakan metanol karena mempunyai kepolaran yang mirip dengan metanol.

H. Hipotesis

1. Ekstrak metanol kulit batang sirsak dapat menghambat aktivitas dari 3-*Chymotrypsine-Like protease* (3CLpro) SARS-CoV-2.

2. Ekstrak metanol kulit batang sirsak mengandung senyawa golongan alkaloid.



BAB III

METODE PENELITIAN

A. Jenis dan Rancangan Penelitian

Jenis penelitian yang dilakukan adalah eksperimental murni dengan *post-test only control group design*. *Post-test only control group design* merupakan jenis pengujian yang terdiri atas 4 kelompok uji yaitu kontrol negatif, sampel, kontrol inhibitor, dan blanko. Keempat kelompok tersebut diukur fluoresensi bersamaan setelah kelompok sampel mendapat perlakuan (*post test*), sedangkan sebelum perlakuan tidak dilakukan pengukuran fluoresensi.

B. Variabel Penelitian

1. Variabel bebas : Konsentrasi ekstrak metanol kulit batang sirsak.
2. Variabel tergantung : Persentase penghambatan *3-Chymotrypsine-Like protease* (3CLpro) pada uji penghambatan enzim.
3. Variabel pengacau terkendali : Suhu inkubasi, waktu inkubasi, dan kebersihan (sterilitas).

C. Definisi Operasional Variabel

1. Konsentrasi ekstrak merupakan berat sampel dalam mikrogram atau miligram yang dilarutkan dalam 1 mL DMSO 10%.
2. Persentase penghambatan 3CLpro merupakan persentase penghambatan 3CLpro oleh sampel yang telah dikurangi persentase penghambatan 3CLpro oleh blanko, dibagi dengan persentase penghambatan 3CLpro oleh kontrol inhibitor yang telah dikurangi persentase penghambatan 3CLpro oleh blanko.
3. Suhu inkubasi pada pengujian *in vitro* penghambatan 3CLpro menggunakan suhu ruang dengan waktu inkubasi 24 jam.

D. Bahan Penelitian

Kulit batang sirsak, metanol pro analisis, plat KLT (Silica Gel G₆₀ F₂₄). Kit 3CLpro (BPS Bioscience) yang terdiri dari *Recombinant 3CL Protease*, *MBP-tag*, *3CL Protease Substrate*, *3CL Protease Assay Buffer*, GC376 (MW=507.5 Dalton) dengan DTT 0.5 M, *Black, low binding microtiter plate*, dan *Plate sealing film*, Dimetilsulfoksida (*pa.*, E-merck), pereaksi dragendorf, pereaksi Mayer dan *water for injection*.

E. Alat Penelitian

Alat-alat gelas pada umumnya, timbangan analitik (Ohaus), seperangkat alat refluks, vortex, oven, kertas saring, corong, cawan petri, bejana tertutup (*chamber*), mikropipet (Socorex), *96-well microplate*, tips pipet, Synergy™ HTX *Multi-Mode Microplate Reader* (BioTech).

F. Tata Cara Penelitian

1. Pemanenan dan Determinasi Tanaman

Tanaman sirsak diperoleh di sekitar daerah Yogyakarta. Kulit batang yang dipilih berasal dari batang tanaman segar dewasa dengan diameter ± 20 cm dan 1 M di atas tanah. Batang, daun, dan bunga tanaman sirsak dibuat herbarium untuk dideterminasi di Laboratorium Kebun Obat Fakultas Farmasi, Universitas Sanata Dharma, Daerah Istimewa Yogyakarta. Determinasi dilakukan untuk memastikan kebenaran identitas dari tanaman yang diteliti dan menghindari kesalahan dalam pengumpulan bahan utama dalam penelitian.

2. Penyiapan Ekstrak Metanol Kulit Batang Sirsak

Simplisia dari kulit batang sirsak, dibersihkan dengan cara bagian luar yang sangat kasar atau beralur dibuang, dirajang lalu dikeringkan dengan menggunakan sinar matahari dan ditutup menggunakan kain hitam. Setelah kering, simplisia diserbuk dengan mesin penyerbuk, disimpan pada wadah yang kering dan tertutup rapat. Serbuk ditimbang sebanyak 20 g lalu diekstraksi dengan metode refluks menggunakan pelarut metanol dengan perbandingan simplisia dan metanol (1:3). Refluks dilakukan pada suhu 45 °C

selama 6 jam. Filtrat didiamkan dan diuapkan menggunakan oven dengan suhu 40°C sampai diperoleh ekstrak kental.

3. Identifikasi Kandungan Alkaloid dan Uji KLT

Ekstrak metanol kulit batang sirsak ditimbang sebanyak 10 mg, ditambah 1 mL HCl 2N dan 9 mL air kemudian dipanaskan diatas penangas air selama 2 menit, didinginkan dan disaring. Filtrat diambil 3 tetes dan dimasukkan ke tabung reaksi 1 dan 2, kemudian ditambahkan 2 tetes pereaksi mayer ke tabung 1 dan 2 tetes pereaksi dragendorf ke tabung 2. Hasil positif pada tabung 1 ditandai dengan terbentuknya endapan putih pada dasar tabung 1 dan terbentuk endapan merah jingga pada tabung 2 (Izzah *et al.*, 2015).

Uji KLT dilakukan dengan menggunakan Silika Gel GF₂₅₄ sebagai fase diam (plat KLT) lalu dicuci menggunakan metanol, diaktivasi menggunakan oven pada suhu 100°C selama 10 menit. Fase gerak yang digunakan n-heksana: etil asetat (7:3). Setelah elusi, plat KLT disemprot dengan reagen dragendorf. Jarak elusi yang digunakan yaitu 10 cm, dan akan diidentifikasi pada lampu UV 254 nm lalu dihitung nilai RF nya. Hasil positif apabila memberikan fluoresensi biru atau kuning (La., 2020; Izzah *et al.*, 2015).

4. Uji *In Vitro* Aktivitas Penghambatan 3CLpro

Preparasi larutan sampel uji dilakukan dengan menimbang 100.000 µg (100 mg) ekstrak metanol kulit batang sirsak, dilarutkan dalam 1 mL DMSO 10% sehingga diperoleh baku sampel dengan kadar 100.000 µg/mL (100.000 ppm). Konsentrasi DMSO pada *wellplate* tidak boleh lebih dari 1%. Dibuat PAB *Working* dengan menambahkan 0,5 M DTT ke 3CLpro *assay buffer* sehingga konsentrasi akhirnya mengandung 1 mM DTT, 3CLpro *assay buffer* yang tersisa disimpan pada suhu -20 °C. Enzim 3CLpro dicairkan di atas es. Setelah pencairan pertama, tabung yang berisi enzim divortex sebentar untuk menghomogenkan seluruh isi tabung. Enzim 3CLpro diencerkan dengan PAB *working* sehingga diperoleh kadar 5 ng/µL. Enzim 3CLpro diambil sebanyak 30 µL yang telah diencerkan dan dimasukkan ke dalam *well* kontrol negatif, kontrol inhibitor, dan sampel. Diambil PAB *working* sebanyak 30 µL dan dimasukkan ke dalam well blanko. GC376 sebanyak 50 µg di encerkan ke

dalam 200 μL *water for injection* (WFI) untuk memperoleh konsentrasi 500 μM . GC376 diambil 10 μL dengan konsentrasi 500 μM ke dalam *well* kontrol inhibitor dan sisanya disimpan pada suhu -80°C . Sampel diambil 0,5 μL yang telah dilarutkan dan dimasukkan ke dalam *well* sampel dan ditambah WFI sebanyak 9,5 μL (konsentrasi akhir sampel dalam *well-plate* menjadi 1000 ppm). Sampel diambil 1 μL yang telah dilarutkan dan dimasukkan ke dalam *well sampel* dan ditambah WFI sebanyak 9 μL (konsentrasi akhir sampel dalam *well-plate* menjadi 2000 ppm). *Water ForInjection* (WFI) diambil 10 μL dan dimasukkan ke dalam *well* blanko dan kontrol negatif. Inkubasi dilakukan selama 30 menit dengan sedikit guncangan. Setelah itu, 3CLpro substrat dengan konsentrasi 10 mM diencerkan sebanyak 25 μL ke dalam 1 mL PAB *working* sehingga diperoleh konsentrasi 250 μM . Reaksi dimulai ketika 10 μL 3CLpro substrat konsentrasi 250 μM ditambahkan ke dalam semua *well*. Setelah itu, *well* di tutup menggunakan *plate sealer* dan dilakukan inkubasi selama 24 jam pada suhu ruang. Intensitas fluoresensi diukur dengan menggunakan *microtiter plate-reading* yang mampu melakukan pembacaan dengan panjang gelombang eksitasi 360 nm dan panjang gelombang emisi 460 nm. Semua nilai hasil pembacaan intensitas dikurangi dengan hasil pembacaan intensitas blanko.

Tabel I. Desain 96 *wellplate* yang akan digunakan

	Blanko			Kontrol Inhibitor			Kontrol Negatif		
	1	2	3	4	5	6	7	8	9
A	AB IB Substrat	AB IB Substrat	AB IB Substrat	3CLpro GC Substrat	3CLpro GC Substrat	3CLpro GC Substrat	3CLpro IB Substrat	3CLpro IB Substrat	3CLpro IB Substrat
B	Konsentrasi 1000 ppm			Konsentrasi 2000 ppm					
	3CLpro S 1 IB 1 Substrat	3CLpro S 1 IB 1 Substrat	3CLpro S 1 IB 1 Substrat	3CLpro S 2 IB 2 Substrat	3CLpro S 2 IB 2 Substrat	3CLpro S 2 IB 2 Substrat			

C									
D									
E									
F									
G									

Keterangan

3CLpro = Enzim 3CLpro 5 ng/μL sebanyak 30 μL

AB = PAB *Working* sebanyak 30 μL

GC = GC376 500 μM sebanyak 10 μL

S 1 = Ekstrak metanol kulit batang sirsak 100.000 μg/mL sebanyak 0,5 μL

S 2 = Ekstrak metanol kulit batang sirsak 100.000 μg/mL sebanyak 1 μL

IB = WFI sebanyak 10 μL

IB 1 = WFI sebanyak 9,5 μL

IB 2 = WFI sebanyak 9 μL

Substrat = 3CLpro substrat 250 μM sebanyak 10 μL

G. Analisis Hasil

1. Persentase rendemen

$$\text{Rendemen} = \left(\frac{\text{Berat ekstrak}}{\text{Berat serbuk simplisia}} \right) \times 100\%$$

2. Persentase penghambatan 3CLpro

$$\% \text{ penghambatan} = \left(1 - \frac{\text{Bacaan fluoresensi senyawa hasil uji in vitro} - \text{blangko}}{\text{Bacaan fluoresensi kontrol negatif} - \text{blangko}} \right) \times 100\%$$

3. Perhitungan R_f pada Uji KLT

$$R_f = \left(\frac{\text{Jarak yang ditempuh zat terlarut}}{\text{Jarak yang ditempuh fase gerak}} \right)$$

BAB IV

HASIL DAN PEMBAHASAN

A. Pemanenan dan Determinasi Tanaman

Penelitian ini menggunakan kulit batang sirsak yang di peroleh dari Daerah Istimewa Yogyakarta. Kulit batang sirsak diperoleh dalam keadaan segar dengan mengambil bagian pada batang utama pohon dewasa yang memiliki diameter ± 20 cm dan berjarak 1 meter dari atas tanah. Herbarium dari kulit batang dideterminasi di Fakultas Farmasi, Universitas Sanata Dharma berdasarkan acuan (GBIF Backbone Taxonomy, 2021; Encyclopedia of Life, 2021) dan didapatkan hasil bahwa kulit batang tanaman yang digunakan merupakan kulit batang tanaman sirsak (*Annona muricata* L.).

Tujuan dilakukan determinasi tanaman untuk mendapatkan kebenaran identitas dari kulit batang tanaman sirsak (*Annona muricata* L.) yang diteliti. Berdasarkan hasil determinasi yang diperoleh, kulit batang yang digunakan merupakan kulit batang sirsak (*Annona muricata* L.).

B. Ekstraksi Sampel

Ekstraksi kulit batang sirsak dilakukan menggunakan metode refluks dengan metanol sebagai pelarut. Perbandingan pelarut dan simplisia yang digunakan yaitu (1:3) dan dilakukan selama 6 jam dengan menggunakan suhu 45°C . Refluks merupakan metode ekstraksi yang dilakukan dengan pemanasan pada temperatur titik didih pelarutnya dalam selang waktu tertentu dengan menggunakan pelarut dalam jumlah terbatas yang relatif konstan dengan adanya pendingin balik (Susanty and Bachmid, 2016). Penggunaan metode refluks pada ekstraksi kulit batang sirsak memiliki keuntungan yaitu dapat mempersingkat waktu dari ekstraksi. Suhu yang digunakan pada ekstraksi ini dikurangi kurang lebih sebesar 20°C dari titik didih metanol hal ini bertujuan untuk menghindari senyawa yang tidak tahan panas menjadi rusak saat proses ekstraksi berlangsung.

Ekstraksi dilakukan dengan menimbang serbuk simplisia sebanyak 20 g kemudian ditambah metanol sebanyak 60 mL. Metanol dipilih sebagai pelarut

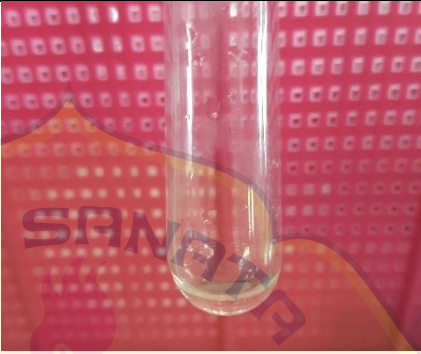
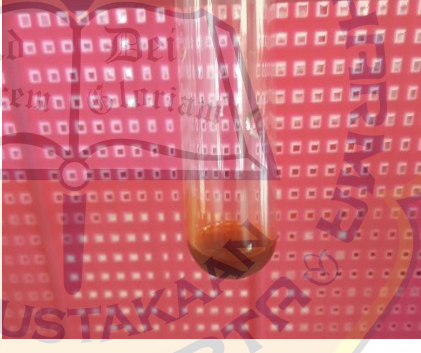
karena terdapat gugus hidroksi (-OH) dan metil (-CH₃) yang memberikan kecenderungan menarik analit-analit yang bersifat polar maupun non polar. *Anolobine* memiliki gugus hidroksi (-OH) seperti metanol yang membuat *anolobine* cenderung bersifat polar. Setelah itu dilakukan pemanasan menggunakan *heating mantle* pada suhu ekstraksi 45°C. Pemanasan pada metode refluks akan mempermudah cairan penyari untuk menembus dinding sel simplisia. Sel simplisia akan mengembang sehingga rongga-rongga pada sel terbuka. Hal ini mempermudah pelarut menjangkau zat aktif di dalam sel dan mempersingkat waktu ekstraksi (Nugraheni *et al.*, 2017).

Proses ekstraksi menghasilkan ekstrak kental berwarna coklat tua dengan rendemen sebesar 3,119 %. Nilai rendemen ekstrak dihitung berdasarkan perbandingan berat ekstrak yang dihasilkan dengan berat awal (berat serbuk simplisia) dikalikan 100%, persen rendemen yang baik untuk tanaman sirsak adalah >11,4% (Farmakope Hebal Indonesia, 2017). Berdasarkan hasil yang diperoleh, persen rendemen pada penelitian ini dapat dikatakan kurang bagus sebab persentase rendemen yang diperoleh pada penelitian ini kurang dari 10%. Persentase rendemen yang rendah ini kemungkinan disebabkan oleh waktu kontak antara pelarut dan simplisia yang kurang lama, karena waktu ekstraksi merupakan salah satu faktor yang mempengaruhi ekstraksi (Laksmiani *et al.*, 2015). Perbedaan nilai polaritas yang besar antara *anolobine* (Log P = 2,64) dengan metanol (Log P = -0,52) menurunkan kemampuan dari metanol untuk menyari *anolobine* dari kulit batang sirsak.

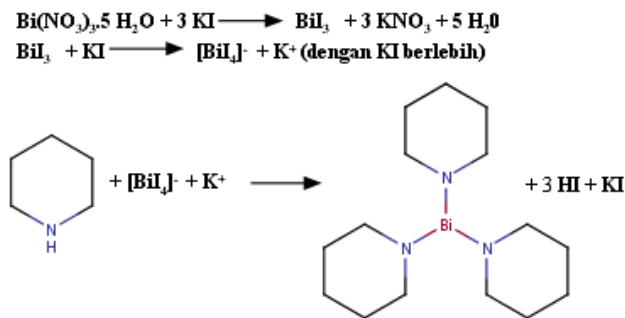
C. Uji Kandungan Alkaloid dan Kromatografi Lapis Tipis (KLT)

Uji kandungan alkaloid yang dilakukan adalah uji kualitatif untuk mengidentifikasi keberadaan alkaloid pada ekstrak kulit batang sirsak. Pada uji ini digunakan 2 pereaksi yaitu pereaksi Mayer dan Dragendorff. Hasil uji kandungan alkaloid ditampilkan pada tabel II.

Tabel II. Hasil uji kandungan alkaloid dengan pereaksi Mayer dan Dragendorff

Pemeriksaan Senyawa	Pereaksi	Hasil	Keterangan
Alkaloid	Mayer	 <p>Tidak ada endapan</p>	Negatif
	Dragendorff	 <p>Terbentuk endapan merah jingga</p>	Positif

Pada pereaksi Mayer tidak terjadi reaksi yang menghasilkan endapan putih atau kekuningan pada tabung 1, sedangkan pada pereaksi Dragendorff terbentuk endapan merah jingga pada tabung 2 yang menandakan hasil positif. Endapan oleh pereaksi Dragendorff terbentuk oleh kompleks antara ion logam pada reagen dengan senyawa alkaloid (Mufadal, 2015). Reaksi yang terjadi seperti tersaji pada gambar 7.

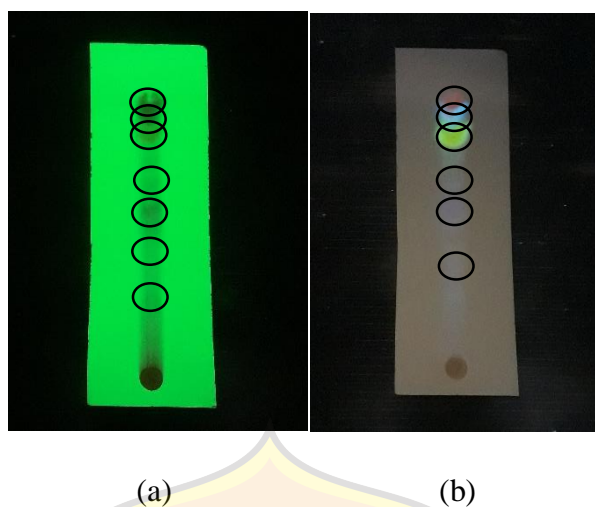


Kompleks Logam dengan Alkaloid (Endapan Oranye)

Gambar 7. Dugaan reaksi alkaloid dengan pereaksi Dragendorff (Mufadal, 2015)

Setelah dilakukan uji kandungan alkaloid dan diperoleh hasil positif pada salah satu reagen yaitu reagen Dragendorff, selanjutnya dilakukan uji kromatografi lapis tipis (KLT) untuk memperkuat hasil yang diperoleh. Kromatografi Lapis Tipis merupakan suatu metode analisis yang digunakan untuk menentukan senyawa yang terkandung dalam tumbuhan dengan prinsip memisahkan senyawa yang mengandung multi komponen menggunakan fase diam dan fase gerak, sehingga terjadi perbedaan migrasi dari tiap komponen. Perbedaan migrasi disebabkan oleh perbedaan tingkat afinitas tiap-tiap komponen dalam fase diam dan fase gerak. Sifat fisika dan kimia dari masing-masing senyawa menentukan afinitas senyawa dalam fase diam dan fase gerak (Forestryana and Arnida, 2020; Oktaviantari *et al.*, 2019).

Uji KLT diawali dengan mencuci Silika Gel G₆₀ F₂₅₄ (plat KLT) sebagai fase diam menggunakan methanol. Plat KLT diaktivasi menggunakan oven pada suhu 100°C selama 10 menit. Fase gerak menggunakan kombinasi n-heksan dan etil asetat (7:3) dengan volume total 10 mL. Plat KLT yang telah diaktivasi diberi tanda pada bagian atas dan bawah, kemudian ekstrak metanol kulit batang sirsak ditotolkan pada plat KLT dan dielusi dengan eluen (fase gerak). Setelah selesai elusi, plat disemprot dengan menggunakan reagen dragendorff, kemudian diamati dibawah sinar UV dengan gelombang 254 nm. Hasil pengamatan dibawah sinar UV disajikan pada **Gambar 8**.



Gambar 8. Hasil pengamatan plat KLT dibawah sinar UV, (a) UV 254 nm dan (b) UV 366 nm

Pada sinar UV dengan panjang gelombang 254 nm, terlihat 7 bercak noda dimana 4 berupa noda hitam dan 3 berupa noda hitam pudar. Identifikasi dengan sinar UV pada panjang gelombang 366 nm, terlihat 6 bercak noda dimana 1 berfluoresensi menghasilkan warna merah jingga, 1 berfluoresensi biru, 1 berfluoresensi hijau, dan 3 berfluoresensi ungu pudar. Bercak noda yang berwarna merah jingga dan fluoresensi biru pada sinar UV 366 nm menandakan bahwa ekstrak metanol kulit batang sirsak mengandung alkaloid (La *et al.*, 2020; Izzah *et al.*, 2015). Nilai R_f yang diperoleh untuk bercak merah jingga adalah 8,8 dan bercak biru 8,1. Berdasarkan hasil uji kandungan kimia dan kromatografi lapis tipis (KLT) disimpulkan bahwa ekstrak kulit batang sirsak mengandung alkaloid.

D. Uji *In vitro* Aktivitas Penghambatan 3CLpro

Uji hambatan ekstrak metanol kulit batang sirsak terhadap 3CLpro SARS-CoV-2 dilakukan dengan menggunakan metode *FRET-based assay*. Metode ini berdasarkan proses transfer energi antara 2 molekul, yang berfungsi sebagai pendonor energi dan akseptor energi. Terjadinya transfer energi disebabkan oleh interaksi muatan-muatan antara donor yang berosilasi dengan dipol akseptor dalam jarak yang dekat (1-10 nm). Selain jarak yang dekat, momen dipol transisi dari donor dan akseptor harus memiliki orientasi yang tepat antara keduanya (Santos *et*

al., 2020). Pada pengujian ini, enzim 3CLpro akan menghidrolisis ikatan peptida yang ada pada substrat *L- α -Glutamine*, N²-[4-[[4-(dimetilamino)fenil]azo]benzoi]-L-lisil-L-treonil-L-seril-L-alanil-L-valil-L-leusil-L-glutaminil-L-serilglisil-L-fenilalanil-L-arginil-L-lisil-L-metionil-N-[2-[(5-sulfo-1-naptalenil)amino]etil]-(TFA), dan merupakan *fluorogenic substrate* yang akan menghasilkan komponen yang berfluoresensi apabila dikatalisis oleh enzim (Nguyen *et al.*, 2012). Nilai fluorosensi yang diperoleh berbanding lurus dengan aktivitas enzim. Nilai fluorosensi tinggi menandakan bahwa enzim aktif mengkatalisis substrat sehingga substrat menghasilkan fluorosensi, namun nilai fluoresensi rendah menandakan bahwa aktivitas enzim dalam mengkatalisis substrat rendah.

Pada uji hambatan 3CLpro ini, digunakan 5 kelompok uji, yaitu: kelompok kelompok blanko, kontrol inhibitor, kontrol negatif, sampel dengan konsentrasi 1000 ppm dan sampel dengan konsentrasi 2000 ppm. Blanko pada penelitian ini terdiri dari *PAB Working (buffer)*, WFI dan substrat enzim 3CLpro, digunakan untuk melihat nilai fluorosensi tanpa adanya aktivitas dari enzim. Kontrol negatif terdiri dari enzim 3CLpro, WFI, dan substrat, digunakan untuk melihat nilai fluoresensi dari aktivitas enzim 3CLpro tanpa adanya hambatan atau inhibisi. GC376 ((2S)-2-((S)-2-(((benziloksi)karbonil)amino)-4-metilpentanamido)-1-hidroksi-3-(2-oxopirolidin-3-il)propana-1-sulfonat) digunakan sebagai inhibitor pada kontrol inhibitor untuk memastikan bahwa pengujian sudah sesuai dengan prosedur yang benar dan juga digunakan sebagai pembanding dengan kelompok sampel. Sampel uji hambatan 3CLpro pada penelitian ini menggunakan ekstrak metanol kulit batang sirsak dengan 2 konsentrasi yaitu 1000 ppm dan 2000 ppm.

Hasil uji hambatan terhadap 3CLpro yang tersaji pada Tabel III menunjukkan bahwa kontrol negatif memiliki bacaan fluoresensi sebesar 63,33 dengan persen hambatan terhadap enzim sebesar 0%. Kontrol inhibitor memiliki bacaan fluoresensi sebesar 59,89 dengan persen hambatan terhadap enzim sebesar 70,33%. Persen hambatan ini termasuk kategori tinggi sehingga dapat dikatakan prosedur pengujian sudah sesuai dan benar. Sampel uji ekstrak metanol kulit batang

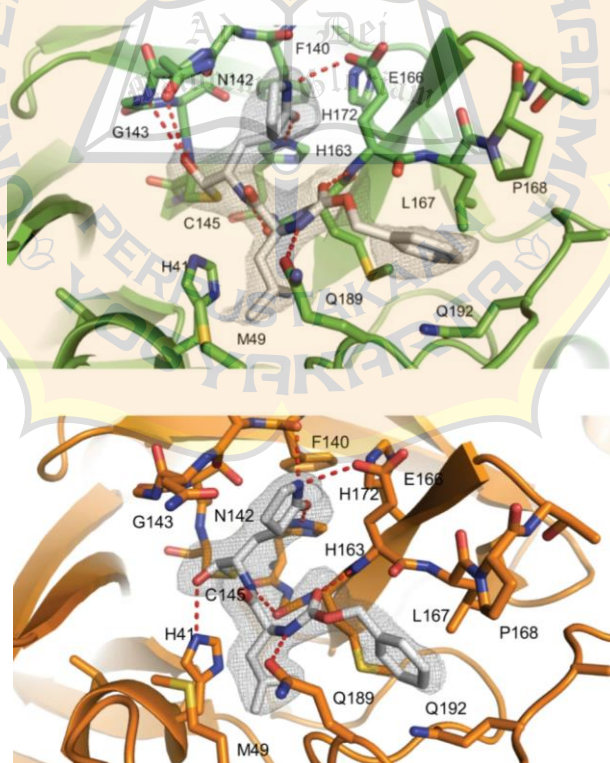
sirsak konsentrasi 1000 ppm diperoleh bacaan fluoresensi sebesar 66 dengan persen hambatan enzim sebesar -31,5%. Konsentrasi 2000 ppm ekstrak metanol tersebut menunjukkan bacaan fluoresensi 68,78 dengan persen hambatan enzim sebesar -77,83%. Aktivitas penghambatan enzim dikelompokkan dalam beberapa kategori, yaitu kategori rendah apabila persen hambatan enzim bernilai <40%, kategori sedang apabila kategori persen hambatan enzim bernilai 40%-70%, dan kategori tinggi apabila persen hambatan enzim bernilai 70%-100% (Aderogba *et al.*, 2013). Persen hambatan ekstrak metanol kulit batang sirsak untuk kedua konsentrasi (1000 ppm dan 2000 ppm) dikatakan tidak memiliki aktivitas hambatan dikarenakan bernilai negatif. Hal ini menunjukkan bahwa metabolit sekunder (dalam hal ini yaitu *anolobie* yang merupakan golongan alkaloid) yang terkandung dalam ekstrak metanol tersebut tidak dapat bersaing dengan substrat L- α -Glutamin untuk berikatan dengan sisi aktif dari enzim 3CLpro.

Tabel III. Hasil data uji hambatan terhadap enzim 3CLpro

	Bacaan Fluoresensi			\bar{X}	Aktivitas Enzim (%)	Hambatan Terhadap Enzim (%)
	I	II	III			
Blanko	58,33	58	58	58,11	-	-
Kontrol Negatif	65	64	63,33	64,11	100	-
Kontrol Inhibitor	62,67	57,67	59,33	59,89	29,67	70,33
Ekstrak 1000 ppm	64	65	69	66	131,5	-31,5
Ekstrak 2000 ppm	73,33	65	68	68,78	177,83	-77,83

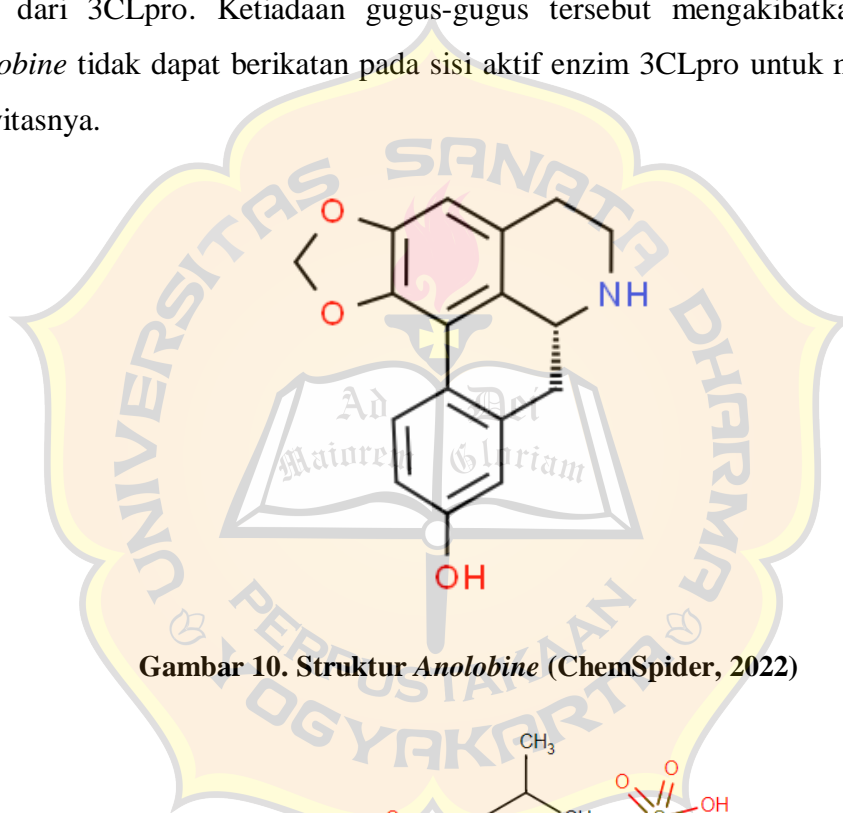
Kontrol inhibitor yang digunakan pada penelitian ini yaitu GC376 memiliki mekanisme membentuk ikatan hidrogen pada sisi aktif dari enzim 3CLpro, serta

menunjukkan komplementaris geometris yang baik. Dengan adanya pembentukan adisi kovalen antara aldehid bisulfida dan Cys-145 dari 3CLpro, menjadikan GC376 sebagai salah satu penghambat 3CLpro SARS-CoV-2 yang poten dan baik secara *in vitro*. Cincin laktam pada struktur GC376 membentuk ikatan hidrogen dengan rantai samping His-163 dan Glu-166 serta rantai utama Phe-140 seperti yang tersaji pada **Gambar 9**. Kompleks rantai samping-laktam dihubungkan oleh ikatan amida ke bagian isobutil yang melekat pada situs S2 hidrofobik yang dibentuk oleh His-41, Met-49, dan Met-149. Ikatan karbamat pada GC376 yang membentuk ikatan hidrogen dengan rantai utama Glu-166 dan rantai samping Gln-189 menghubungkan gugus isobutil P2 dengan ester fenilmetil yang berinteraksi dengan situs S4 alifatik. Ester fenilmetil pada GC376 menunjukkan komplementaris yang tinggi dengan situs S4 serta interaksi non-polar yang berkontribusi signifikan terhadap potensi inhibitor 3CLpro SARS-CoV-2 (Ma *et al.*, 2020).

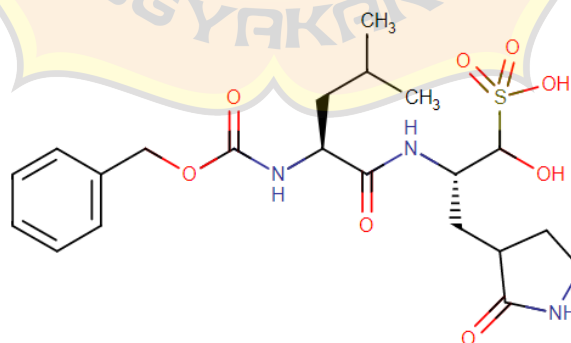


Gambar 9. Ikatan Hidrogen Antara GC376 Dengan Sisi Aktif 3CLpro (Diadaptasi dari Ma *et al.*, 2020)

Hasil pengujian ekstrak metanol kulit batang sirsak terhadap 3CLpro SARS-CoV-2 memberikan hasil yang negatif. Hal ini menandakan bahwa ekstrak tidak berpotensi sebagai inhibitor 3CLpro. Senyawa dominan pada kulit batang sirsak yaitu *anolobine* tidak mampu berikatan pada sisi aktif enzim 3CLpro. Hal ini karena pada struktur *anolobine* yang tersaji pada **Gambar 10** tidak terdapat gugus aldehid bisulfida, cincin laktam dan ester fenilmetil seperti yang terdapat pada GC376 (**Gambar 11**). Gugus-gugus tersebut berperan penting dalam berikatan dengan sisi aktif dari 3CLpro. Ketiadaan gugus-gugus tersebut mengakibatkan senyawa *anolobine* tidak dapat berikatan pada sisi aktif enzim 3CLpro untuk menghambat aktivitasnya.



Gambar 10. Struktur *Anolobine* (ChemSpider, 2022)



Gambar 11. Struktur GC376 (Drugbank, 2022)

BAB V

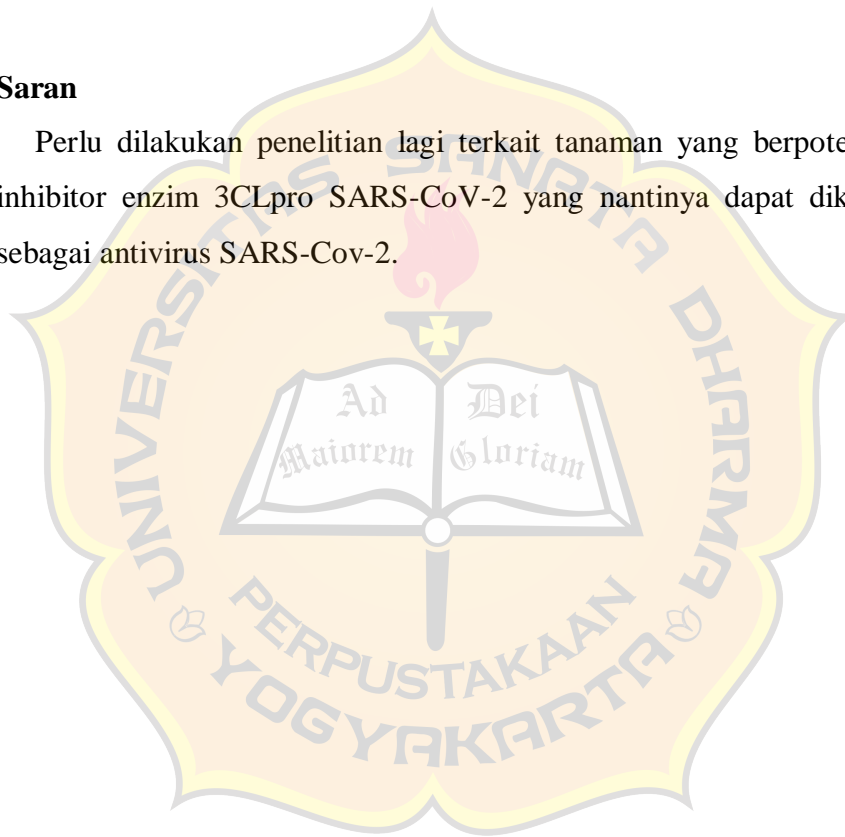
KESIMPULAN DAN SARAN

A. Kesimpulan

1. Ekstrak metanol kulit batang sirsak tidak memiliki aktivitas sebagai penghambat enzim 3CLpro pada SARS-CoV-2.
2. Ekstrak metanol kulit batang sirsak mengandung senyawa golongan alkaloid dengan nilai R_f dari noda merah jingga dan biru yaitu 8,8 dan 8,1.

B. Saran

Perlu dilakukan penelitian lagi terkait tanaman yang berpotensi sebagai inhibitor enzim 3CLpro SARS-CoV-2 yang nantinya dapat dikembangkan sebagai antivirus SARS-Cov-2.



DAFTAR PUSTAKA

- Aggarwal, A., 2010. *Medical Microbiology*. Edisi X, Mittal Publication. India. p. 68.
- Arfianto, Fahrudin., 2018. Pengendalian Hama Kutu Putih (*Bemisa tabaci*) Pada Buah Sirsak Dengan Menggunakan Pestisida Nabati Ekstrak Serai (*Cymbopogon nardus L.*). *Jurnal Daun*. 5(1), 17-26.
- Cevik, Muge., Kuppalli, Krutika., Kindrachuk, Jason., and Peiris, Malik., 2020. Virology, transmission, and pathogenesis of SARS-CoV-2. *British Medical Journal(BMJ)*, 371(3862), 1-6.
- ChemSpider, 2022. *Anolobine*. <http://www.chemspider.com/Chemical-Structure.144393.html?rid=cb8ab971-765e-437e-942a-77c28726f5f7> , diakses 19 Januari 2022.
- Claude, Kablan, Ahmont, Landry., Aminata, Akoubet, Ouayogodé., Marcelline, Adiko, N'dri., Faustin, Kabran, Aka., Sandrine, Aka, Any-Grah., Nakognon, Tuo, Awa., Leopold, Atoli, Adjougoua., Jacques, Konan, Dibi., Abdoulaye, Touré., Barthélemy, Attioua, Koffi., Fandia, Konaté., and Nahossé, Ziao., 2018. Source and Pharmacological Activities Of (-)-Anolobine and (+)-Anolobine. *International Journal of Pharmaceutical Science Invention*, 7(4), 66-68.
- Coria-Te´llez, Ana V., Montalvo-Go´nzalez, Efigenia., Yahia, Elhadi M., Obledo-Va´zquez, Eva N., 2018. *Annona muricata*: A comprehensive review on its traditional medicinal uses, phytochemicals, pharmacological activities, mechanisms of action and toxicity. *Arabian Journal of Chemistry*, 11, 662-691.
- Creech, C. Buddy, MD, MPH., Walker, Shannon C. MD., and Samuels, Robert J. MBChB., 2021. SARS-CoV-2 Vaccines. *JAMA Insights*. 325(13), 1318-1320.
- Dong, Y., Dai, T., Wei, Y., Zhang, L., Zheng, M. and Zhou, F., 2020. A systematic review of SARS-CoV-2 vaccine candidates. *Signal transduction and targeted therapy*. 5(1), 1-14.
- DrugBank, 2022. GC-376. <https://go.drugbank.com/drugs/DB15796> , diakses 19 Januari 2022.
- Forestryana, Dyera., Arnida., 2020. Skrining Fitokimia Dan Analisis Kromatografi Lapis Tipis Ekstrak Etanol Daun Jeruju (*Hydrolea spinosa L.*). *Jurnal Ilmiah Farmako Bahari*, 11(2), 113-124.
- Foster, Kimberley., Oyenih, Omolola., Rademan, Sunelle., Erhabor, Joseph., Matsabisa, Motlalepula., Barker, James., Langat, Moses K., Kendal-Smith, Amy., Asemota, Helen., Delgoda, Rupika., 2020. Selective cytotoxic and anti-metastatic activity in DU-145 prostate cancer cells induced by *Annona*

- muricata L. bark extract and phytochemical, annonacin. *BMC Complementary Medicine and Therapies*, 20(375), 1-15.
- Gao, J., Tian, Z., and Yang, X., 2020. Breakthrough: Chloroquine phosphate has shown apparent efficacy in treatment of COVID-19 associated pneumonia in clinical studies. *Bioscience trends*. 14(1), 72-73.
- Gavamukulya, Yahaya., Wamunyokoli, Fred., and El-Shemy, Hany A., 2017. *Annona muricata*: Is the natural therapy to most disease conditions including cancer growing in our backyard ? A systematic review of its research history and future prospects. *Asian Pacific Journal of Tropical Medicine*, 10(9), 835-848.
- Greenwood, D., Barer, M. R., Slack, R. C. B., Irving, W. L., 2012. *Medical Microbiology*. Edisi XVIII, Churchill Livingstone Elsevier. UK. p. 587.
- Gyebi, G. A., Ogunro, O. B., Adegunloye, A. P., Ogunyemi, O. M., and Afolabi, S. O., 2020. Potential Inhibitors of Coronavirus 3-chymotrypsin-like Protease (3CLpro): an in Silico Screening of Alkaloids and Terpenoids from African Medicinal Plants. *Journal of Biomolecular Structure and Dynamics*. P. 1-2.
- Hariyono, Pandu., Patramurti, Christine., Candrasari, Damiana S., Hariono, Maywan., 2021. An integrated virtual screening of compounds from Carica papaya leaves against multiple protein targets of SARS-Coronavirus-2. *Results in Chemistry*, 1-11.
- Hartini, Yustina., Saputra, Bakti., Wahono, Bryan., Auw, Zerlinda., Indayani, Friska., Adelya, Lintang., Namba, Gabriel., Hariono, Maywan., 2021. Biflavonoid as potential 3-chymotrypsin-like protease (3CLpro) inhibitor of SARS-Coronavirus. *Results in Chemistry*, 1-14.
- He, Jun., Hu, Lijun., Huang, Xiaojun., Wang, Chenran., Zhang, Zhimin., Wang, Ying., Zhang, Dongmei., and Ye, Wencai., 2020. Potential of coronavirus 3C-like protease inhibitors for the development of new anti-SARS-CoV-2 drugs: Insights from structures of protease and inhibitors. *International Journal of Antimicrobial Agents*. 56(2).
- Juwita, Dian Ayu., Muchtar, Husni., and Martha, Dolly., 2015. Efek Ekstrak Etanol Kulit Batang Sirsak Terhadap Penurunan Kadar Gula Darah dan Kolesterol. *Jurnal Sains Farmasi dan Klinis*, 2(1), 36-39.
- Kementrian Kesehatan RI, 2017. *Farmakope Herbal Indonesia*, Edisi II. Kementrian Kesehatan Republik Indonesia, Jakarta.
- Kiswandono, Agung Abadi., 2011. Skrining Senyawa Kimia Dan Pengaruh Metode Maserasi Dan Refluks Pada Biji Kelor (*Moringa oleifera*, Lamk) Terhadap Rendemen Ekstrak Yang Dihasilkan. *Jurnal Sains Natural Universitas Nusa Bangsa*, 1(2), 126-134
- Kolditz, M., and Ewig, S., 2017. Community-Acquired Pneumonia in Adults. *Dtsch Arztebl Int*. 114, p. 838–48.

- Krammer, Florian., 2020. SARS-CoV-2 vaccines in development. *Nature*. 586, 516-527.
- Kumar, Swatantra., Nyodu, Rajni., Maurya, Vimal K., and Saxena, Shailendra K., 2020. Coronavirus Disease 2019 (COVID-19), Medical Virology: from Pathogenesis to Disease Control. Springer Nature Singapore Pte Ltd, Singapore, pp. 25.
- La, Elisabeth Oriana Jawa., Sawiji, Repining Tiyas., and Yuliawati, Agustina Nila., 2020. Skrining Fitokimia Dan Analisis Kromatografi Lapis Tipis Ekstrak Etanol Kulit Buah Naga Merah (*Hylocereus polyrhizus*). *Indonesian Journal of Pharmacy and Natural Product*, 3(1), 45-58.
- Ma, Chunlong., Sacco, Michael D. ., Hurst, Brett., Townsend, Julia A. ., Hu, Yanmei., Szeto, Tommy., Zhang, Xiujun., Tarbet, Bart., Marty, Michael T. ., Chen, Yu., Wang, Jun., 2020. Boceprevir, GC-376, and calpain inhibitors II, XII inhibit SARS-CoV-2 viral replication by targeting the viral main protease. *Cell Research (CR)*, 30, 678-692.
- MacLachlan, N. J., and Dubovi, E. J., 2010. *Fenner's Veterinary Virology*. Edisi 4, Elsevier. London.
- Mufadal, 2015. "Isolasi Senyawa Alkaloid Dari Alga Merah (*Eucheuma cottonii*) Menggunakan Kromatografi Lapis Tipis (KLT) Serta Analisa Dengan Spektrofotometer UV-Vis dan FITR". Fakultas Sains dan Teknologi, Universitas Islam Negeri (UIN) Maulana Malik Ibrahim, Malang, Indonesia.
- NParks Flora & Fauna Web, 2022. *Annona muricata*. <https://www.nparks.gov.sg/florafaunaweb/flora/3/2/3258>, diakses 20 Februari 2022.
- N. P. L. Laksmiani., N. M. P. Susanti., I. N. K. Widjaja., A. A. M. I. Rismayanti., IM.A.G. Wirasuta., 2015. Pengembangan Metode Refluks Untuk Ekstraksi Andrografolid Dari Herba Sambiloto (*Andrographis paniculata* (Burm.f.) Nees). *Jurnal Farmasi Udayana*, 4(2), 82-90.
- Nguyen, Thi Thanh Hanh., Woo, Hye-Jin., Kang, Hee-Kyoung., Nguyen, Van Dao., Kim, Young-Min., Kim, Do-Won., Ahn, Sul-Ah., Xia, Yongmei., and Kim, Doman., 2012. Flavonoid-mediated inhibition of SARS coronavirus 3C-like protease expressed in *Pichia pastoris*. *Biotechnol Lett*, 34, 381-388.
- Nugraheni, Fatma Tsalis., Dewi, Melani., and Septiyana, Ria., 2017. Perbandingan Rendemen Kristal Kafein pada Biji Kopi (*Coffea arabica l.*) dan Coklat (*Theobroma cacao l.*) dengan Menggunakan Metode Refluks. *Cendekia Journal of Pharmacy*, 1(1), 41-48.
- Oktaviantari, Destiana Eka., Feladita, Niken., and Agustin, Risna., 2019. Identifikasi Hidrokuinon Dalam Sabun Pemutih Pembersih Wajah Pada Tiga Klinik Kecantikan Di Bandar Lampung Dengan Metode Kromatografi Lapis Tipis Dan Spektrofotometri UV-Vis. *Jurnal Analis Farmasi*, 4(2), 91-97.

- Pertiwi, Wiwi., Arisanty, Dessy., and Linosefa., 2020. Pengaruh Ekstrak Daun Sirsak (*Annona muricata* lin) Terhadap Viabilitas Cell Line Kanker Payudara T47D Secara In Vitro. *Jurnal Kesehatan Andalas*, 9(1), 165-170.
- Pubchem, 2022. *Anolobine*.
<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Anolobine#section=2D-Structure>, diakses 19 Januari 2022.
- Qamar, Muhammad Tahir ul., Alqahtani, Safar M., Alamri, Mubarak A., Chen, Ling-Ling., 2020. Structural basis of SARS-CoV-2 3CLpro and anti-COVID-19 drug discovery from medicinal plants. *Journal of Pharmaceutical Analysis*, 10, 313-319.
- Roe, Molly K., Junod, Nathan A., Young, Audrey R., Beachboard, Dia C., and Stobart, Christopher C., 2021. Targeting novel structural and functional features of coronavirus protease nsp5 (3CLpro, Mpro) in the age of COVID-19. *Journal of General Virology*. 102 (3), 1-16.
- Salempa, Pince., Muharram., and Dini, Iwan., 2015. Toksisitas Ekstrak Metanol Kulit Batang Tumbuhan Sirsak (*Annona muricata* Linn) terhadap *Artemia salina*. *Jurnal Chemica*. 1(16), 56-60.
- Santos, Marcelina C. D., Algar, W. Russ., Medintz, Igor L., Hildebrandt, Niko., 2020. Quantum dots for Förster Resonance Energy Transfer (FRET). *Trends in Analytical Chemistry*, 125, 1-18.
- Seah, I., Su, X., and Lingam, G., 2020. Revisiting the Dangers of the Coronavirus In the Ophthalmology Practice. Springer Nature. p 2.
- Susanty., and Bachmid, Fairus., 2016. Perbandingan Metode Ekstraksi Maserasi Dan Refluks Terhadap Kadar Fenolik Dari Ekstrak Tongkol Jagung (*Zea mays L.*). *KONVERSI*, 5(2), 87-93.
- United States Department of Agriculture, 2021. *Classification*,
<https://plants.sc.egov.usda.gov/home/plantProfile?symbol=ANMU2>, diakses tanggal 7 Mei 2021.
- Wang, Mei-Yue., Zhao, Rong., Gao, Li-Juang., Gao, Xue-Fei., Wang, De-Ping., Cao, Ji-Min., 2020. SARS-CoV-2: Structure, Biology, and Structure-Based Therapeutics Development. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*. 10(587269), 1-17.
- World Health Organization. 2020. *Coronavirus Disease (COVID-19)*. URL :
<https://covid19.who.int/> . Diakses tanggal 1 Juni 2021.
- Wulandari, Lesty., 2011. Kromatografi Lapis Tipis. PT. Taman Kampus Presindo, Jember, pp. 8-9.
- Xu, J., Zhao, S., Teng, T., Abdalla, A.E., Zhu, W., Xie, L., Wang, Y. and Guo, X., 2020. Systematic comparison of two animal-to-human transmitted human coronaviruses: SARS-CoV-2 and SARS-CoV. *Viruses*. 12(2), 244.

Yan, Yuxin., Shin, Woo In., Pang, Yoong Xin., Meng, Yang., Lai, Jianchen., You, Chong., Zhao, Haitao., Lester, Edward., Wu, Tao., and Pang, Cheng Heng., 2020. The First 75 Days of Novel Coronavirus (SARS-CoV-2) Outbreak: Recent Advances, Prevention, and Treatment. *International Journal of Environmental Research and Public Health*. 17 (2323), 1-23.

Zhang, Linlin., Lin, Daizong., Sun, Xinyuanyuan., Curth, Ute., Drosten, Christian., Sauerhering, Lucie., Becker, Stephan., Rox, Katharina., and Hilgenfeld, Rolf., 2020. Crystal structure of SARS-CoV-2 main protease provides a basis for design of improved a-ketoamide inhibitors. *Science*. 368, 409-412.



LAMPIRAN

Lampiran 1.

Surat Pengesahan Determinasi Tanaman Departemen Biologi Farmasi
Fakultas Farmasi Universitas Sanata Dharma



FAKULTAS FARMASI
UNIVERSITAS SANATA DHARMA
FACULTY OF PHARMACY
SANATA DHARMA UNIVERSITY

Akreditasi : Prodi S-1 Farmasi : A; Prodi Pendidikan Profesi Apoteker : A; Prodi S-2 Farmasi : B

SURAT PENGESAHAN DETERMINASI

No: /LKTO/Far-USD/II/2022

Laboratorium Kebun Tanaman Obat Fakultas Farmasi Universitas Sanata Dharma,
menyatakan bahwa telah melakukan determinasi terhadap satu contoh tanaman, dengan
nama:

Annona muricata L.
(Sirsak)

Determinasi telah dilakukan secara benar sesuai dengan:

1. GBIF Backbone Taxonomy. <https://doi.org/10.15468/39omei> Accessed via <https://www.gbif.org/species/5407273>, accessed 16 September 2021.
2. Encyclopedia of Life. Available from <https://eol.org/pages/1054863/names>, accessed 16 September 2021

Hingga kategori: Jenis (spesies)

Tanaman tersebut dipakai dalam penelitian:

Uji Hambatan Ekstrak Metanol Kulit Batang Sirsak (*Annona muricata L.*)
Terhadap 3CLpro SARS-CoV-2

Oleh : Gabriel Aprilyan Sibata Namba (NIM: 188114115)

Dari : Fakultas Farmasi, Universitas Sanata Dharma

Herbarium disimpan di Laboratorium Kebun Tanaman Obat, Fakultas Farmasi Universitas
Sanata Dharma, dengan nomor katalog:

Demikian surat pengesahan determinasi ini dibuat untuk dapat dipergunakan
sebagaimana mestinya.

Mengesahkan,
Kepala Laboratorium Farmasi

Damiana Sapta Candrasari, S.Si., M.Sc.

Yogyakarta, 21 Februari 2021
Determinator

Yohanes Dwiatmaka, S.Si., M.Si

Excellent in Quality, Competitiveness, and Care (e-QCC)

Campus III Paingan, Maguwoharjo, Depok, Sleman, Yogyakarta 55282, Indonesia
(P): +62(274) 883037, 883968 ext Fakultas: 52334, Prodi S-1 Farmasi: 52325, 52326; Prodi Pendidikan Profesi Apoteker: 52354; Prodi S-2 Farmasi: 52333
(W): www.usd.ac.id/fakultas/farmasi; (E): Fakultas Farmasi: farmasi@usd.ac.id
(E): Prodi S-1 Farmasi: prodifar@usd.ac.id; Prodi Pendidikan Profesi Apoteker: profapt@usd.ac.id; Prodi S-2 Farmasi: prodis2far@usd.ac.id

Lampiran 2. Dokumentasi Proses Ekstraksi



Proses penyerbukan pimplisia



Proses ekstraksi



Ekstrak kental hasil ekstraksi

Lampiran 3. Perhitungan % rendemen ekstrak

$$\% \text{ Rendemen} = \left(\frac{\text{Berat ekstrak}}{\text{Berat serbuk simplisia}} \right) \times 100\%$$

$$\% \text{ Rendemen} = \left(\frac{0,627 \text{ g}}{20,102 \text{ g}} \right) \times 100\%$$

$$\% \text{ Rendemen} = 3,119 \%$$



Lampiran 4. Perhitungan nilai R_f

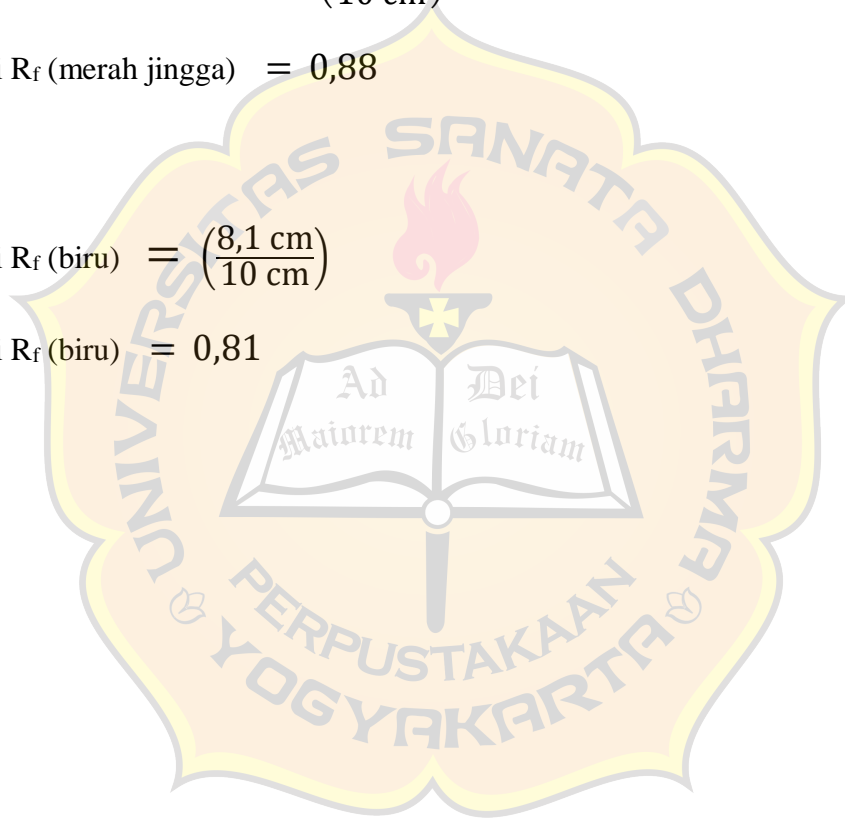
$$\text{Nilai R}_f = \left(\frac{\text{Jarak yang ditempuh zat terlarut}}{\text{Jarak yang ditempuh fase gerak}} \right)$$

- Nilai R_f (merah jingga) = $\left(\frac{8,8 \text{ cm}}{10 \text{ cm}} \right)$

$$\text{Nilai R}_f \text{ (merah jingga)} = 0,88$$

- Nilai R_f (biru) = $\left(\frac{8,1 \text{ cm}}{10 \text{ cm}} \right)$

$$\text{Nilai R}_f \text{ (biru)} = 0,81$$



Lampiran 5. Volume pengujian *in vitro* penghambatan 3CLpro.

No	Bahan	Volume (μL)				
		Blanko	Kontrol Inhibitor	Kontrol Negatif	Sampel Konsentrasi 1000 ppm	Sampel Konsentrasi 2000 ppm
1	<i>PAB working (buffer)</i>	30	-	-	-	-
2	<i>Water For Injection (WFI)</i>	10	-	10	9,5	9
3	Enzim 3CLpro	-	30	30	30	30
4	GC376	-	10	-	-	-
5	Sampel	-	-	-	0,5	1
Ingkubasi pada suhu 25°C selama 30 menit						
6	Substrat	10	10	10	10	10
	Total	50	50	50	50	50
Ingkubasi pada suhu 25 °C selama 24 jam						

BIOGRAFI PENULIS



Penulus skripsi dengan judul “Uji Hambatan Ekstrak Metanol Kulit Batang Sirsak (*Annona muricata* L.) terhadap 3CLpro SARS-CoV-2” memiliki nama lengkap Gabriel Aprilyan Sibata Namba, lahir di Abepura pada tanggal 21 April 2001. Penulis merupakan anak dari pasangan Paulus Namba dan Elisabet Pasamman. Riwayat pendidikan formal yang telah ditempuh penulis yakni tingkat Sekolah Dasar di SD YPPK Gembala Baik Jayapura (2007-2013), Sekolah Menengah Pertama di SMP Negeri 2 Jayapura (2013-2016), Sekolah Menengah Akhir di SMA Negeri 4 Jayapura (2016-2018). Pada tahun 2018, penulis melanjutkan pendidikan sarjana di Fakultas Farmasi, Universitas Sanata Dharma, Yogyakarta. Selama masa perkuliahan, penulis aktif mengikuti berbagai kegiatan organisasi dan kemahasiswaan, yaitu penulis tergabung dalam anggota aktif *Drug Discovery Student Club* (DDSC) (2019-2021) dan *Cosmetic Student Club* (CSC) (2017-2018), Koordinator divisi Pertolongan Pertama Pada Kecelakaan (P3K) Latihan Kepemimpinan (2019), Anggota divisi Pertolongan Pertama Pada Kecelakaan (P3K) *Pharmacy Performance* (2018 dan 2019), dan Anggota divisi Perlengkapan Pelepasan Wisuda 1 (2019). Penulis juga mengikuti perlombaan yang diadakan oleh Kementerian Pendidikan dan Budaya, yaitu sebagai pemenang Program Kompetisi Kampus Merdeka 2021. Penulis juga pernah menjadi asisten dosen Kimia Organik pada tahun 2019.