

**UJI AKTIVITAS PENGHAMBATAN 3CLpro SARS-CoV-2 EKSTRAK
METANOL DAUN SIRSAK (*Annona muricata* L.)**

SKRIPSI

Diajukan Untuk Memenuhi Salah Satu Syarat

Memperoleh Gelar Sarjana Farmasi (S.Farm.)

Program Studi Farmasi



Zerlinda Clara Auw

NIM : 188114061

FAKULTAS FARMASI

UNIVERSITAS SANATA DHARMA

YOGYAKARTA

2022

**UJI AKTIVITAS PENGHAMBATAN 3CLpro SARS-CoV-2 EKSTRAK
METANOL DAUN SIRSAK (*Annona muricata* L.)**

SKRIPSI

Diajukan Untuk Memenuhi Salah Satu Syarat

Memperoleh Gelar Sarjana Farmasi (S.Farm.)

Program Studi Farmasi



Zerlinda Clara Auw

NIM : 188114061

FAKULTAS FARMASI

UNIVERSITAS SANATA DHARMA

YOGYAKARTA

2022

Persetujuan Pembimbing

**UJI AKTIVITAS PENGHAMBATAN 3CL^{pro} SARS-CoV-2 EKSTRAK
METANOL DAUN SIRSAK (*Annona muricata* L.)**

Skripsi yang diajukan oleh :

Zerlinda Clara Auw

NIM : 188114061

telah disetujui oleh

Pembimbing utama



(Dr. Jeffry Julianus, M.Si.)

Selasa, 4 Mei 2022

Pengesahan Skripsi Berjudul

**UJI AKTIVITAS PENGHAMBATAN 3CL_{pro} SARS-CoV-2 EKSTRAK
METANOL DAUN SIRSAK (*Annona muricata* L.)**

Oleh :

Zerlinda Clara Auw

NIM : 188114061

Dipertahankan di hadapan Panitia Penguji Skripsi

Fakultas Farmasi

Universitas Sanata Dharma

pada tanggal: 10 Juni 2022

Mengetahui :

Fakultas Farmasi

Universitas Sanata Dharma


Dekan

Dr. apt. Yustina Sri Hartini

Panitia Penguji

1. Dr. Jeffry Julianus, M.Si.
2. Dr. apt. Erna Tri Wulandari
3. apt. Agustina Setiawati, M.Sc.

Tanda tangan



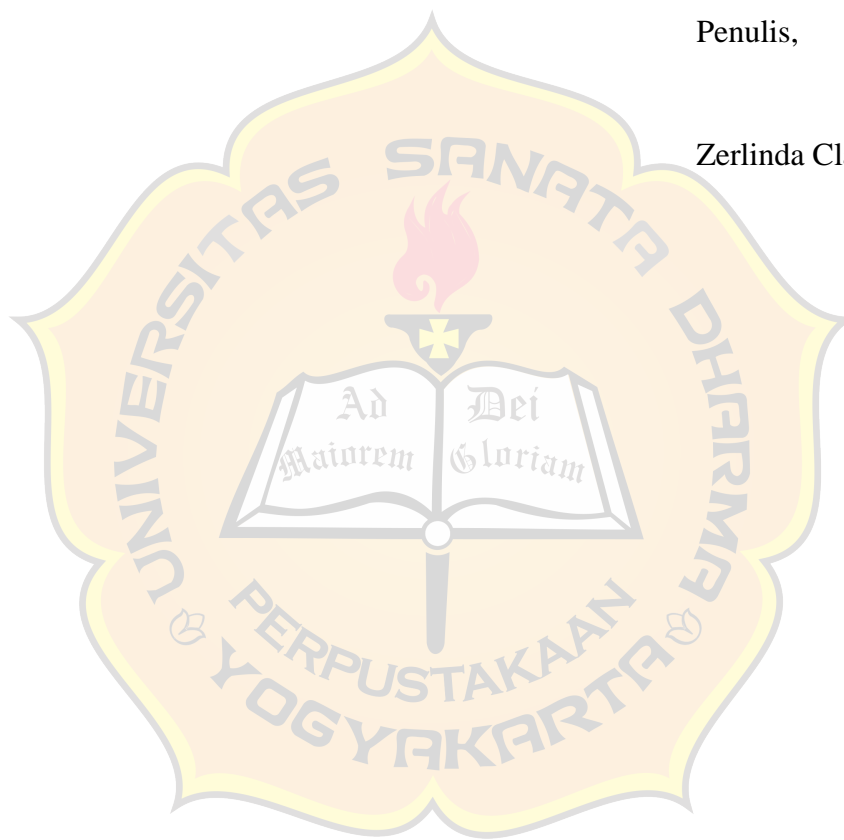
PERNYATAAN KEASLIAN KARYA

Saya menyatakan dengan sesungguhnya bahwa skripsi yang saya tulis ini tidak memuat karya atau bagian karya orang lain, kecuali yang telah disebutkan dalam kutipan dan daftar pustaka, dengan mengikuti ketentuan sebagaimana layaknya karya ilmiah. Apabila di kemudian hari ditemukan indikasi plagiarisme dalam naskah ini, maka saya bersedia menanggung segala sanksi sesuai peraturan perundang-undangan yang berlaku.

Yogyakarta, 2 Maret 2021

Penulis,

Zerlinda Clara Auw



LEMBAR PERNYATAAN PERSETUJUAN

PUBLIKASI KARYA ILMIAH UNTUK KEPENTINGAN AKADEMIS

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

Nama : Zerlinda Clara Auw

Nomor Mahasiswa : 188114061

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

UJI AKTIVITAS PENGHAMBATAN 3CL^{pro} SARS-CoV-2 EKSTRAK METANOL DAUN SIRSAK (*Annona muricata* L.)

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 keberatan 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 : 13 Juli 2022

Yang menyatakan

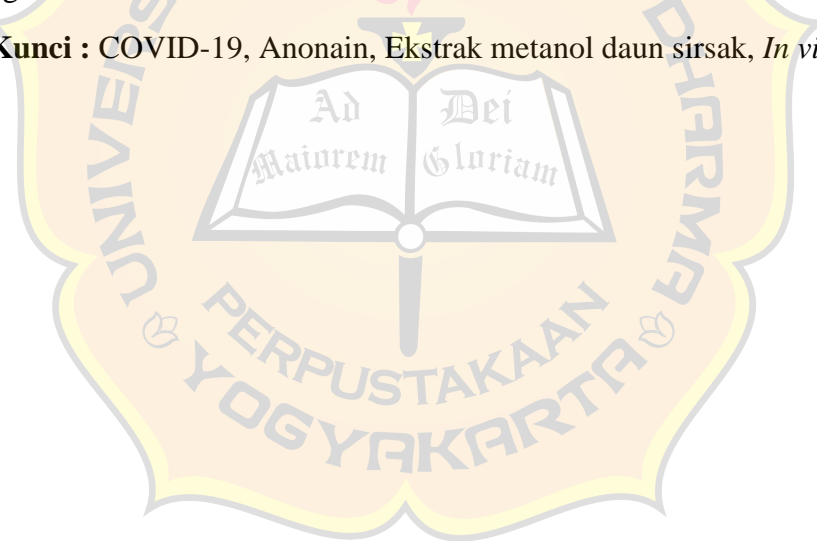


(Zerlinda Clara Auw)

ABSTRAK

Jumlah kasus terkonfirmasi COVID-19 di dunia 458.479.635 dengan angka kematian sebanyak 6.047.653 jiwa pada Maret 2022. Beberapa antivirus telah digunakan dalam penanganan sementara COVID-19, yaitu klorokuin, lopinavir-ritonavir, dan remdesivir, tetapi antivirus tersebut bersifat tidak spesifik terhadap SARS-CoV-2, sehingga perlu adanya suatu antivirus baru yang spesifik. Pada penelitian ini telah dilakukan pengujian penghambatan aktivitas 3CLpro oleh ekstrak metanol daun sirsak secara *in vitro* dan mengidentifikasi kandungan alkaloid yang merupakan senyawa *hits* berdasarkan pengujian *in silico* terdahulu. Pengujian *in silico* dilakukan menggunakan *software Discovery Studio* dan *AutodockTools 4.2* menunjukkan senyawa *hits*, yaitu anonain dengan energi bebas ikatan terendah sebesar -7,9 kkal/mol. Uji KLT dengan fase diam GF₂₅₄, fase gerak etil asetat:n-heksana dengan perbandingan 2:2 (v/v) dan pereaksi semprot dragendorff menunjukkan keberadaan senyawa alkaloid pada ekstrak metanol daun sirsak dengan R_f 0,2 dan 0,325. Pengujian aktivitas penghambatan ekstrak metanol daun sirsak terhadap enzim 3CLpro dilakukan dengan metode *FRET-based assay*. Hasil pengujian menunjukkan ekstrak metanol daun sirsak dapat menghambat aktivitas enzim sebesar 19,23% pada konsentrasi 1000 µg/mL dan 48,08% pada konsentrasi 2000 µg/mL.

Kata Kunci : COVID-19, Anonain, Ekstrak metanol daun sirsak, *In vitro*



ABSTRACT

The number of confirmed cases of COVID-19 in the world is 458,479,635 with a death toll of 6,047,653 in March 2022. Several antivirals have been used in the temporary treatment of COVID-19, namely chloroquine, lopinavir-ritonavir, and remdesivir, but these antivirals are non-specific. against SARS-CoV-2, so the need for a specific new antiviral. In this study, *in vitro* testing of the 3CLpro activity inhibition by soursop leaf extract was carried out and identified the alkaloid content which is a hit compound based on previous *in silico* testing. The *in silico* test using Discovery Studio and AutodockTools 4.2 software showed the hits compound, namely anonaine with the lowest bond free energy of -7.9 kcal/mol. TLC test with stationary phase GF254, mobile phase ethyl acetate:n-hexane with a ratio of 2:2 (v/v) and Dragendorff spray reagent showed the presence of alkaloid compounds in the methanol extract of soursop leaves with Rf 0.2 and 0.325. Testing the inhibitory activity of soursop leaf methanol extract against the 3CLpro enzyme was carried out using the FRET-based assay method. The test results showed that soursop leaf methanol extract could inhibit enzyme activity by 19.23% at a concentration of 1000 g/mL and 48.08% at a concentration of 2000 g/mL.

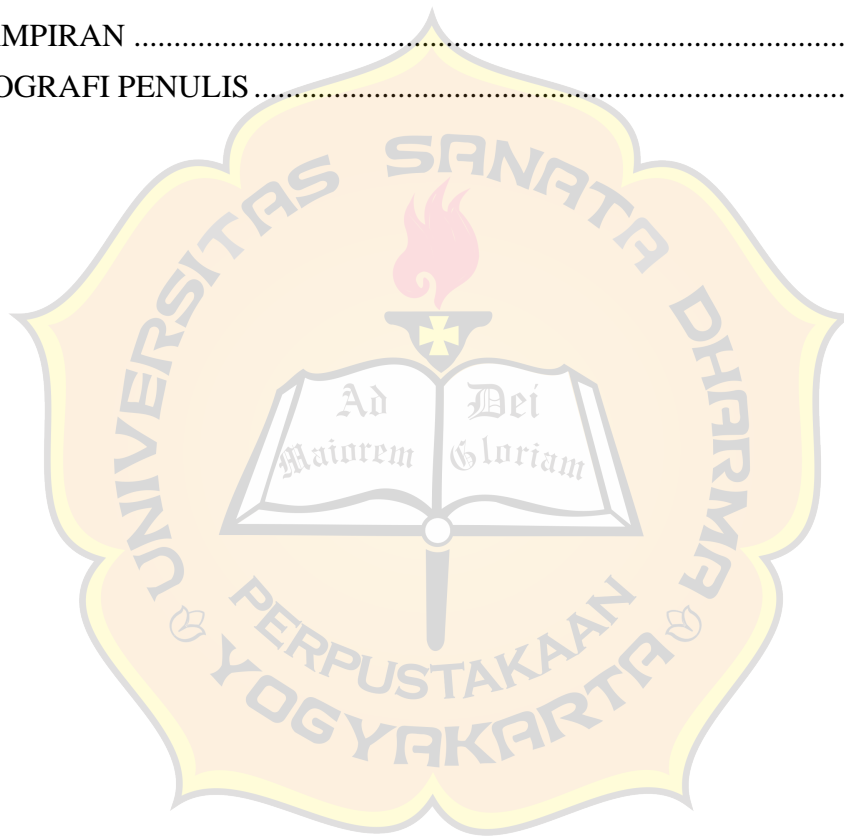
Keywords : COVID-19, anonaine, Soursop leaf methanol extract, *In vitro*



DAFTAR ISI

HALAMAN SAMPUL.....	i
HALAMAN JUDUL	ii
HALAMAN PERSETUJUAN PEMBIMBING.....	iii
HALAMAN PENGESAHAN	iv
PERNYATAAN KEASLIAN KARYA.....	v
LEMBAR PERNYATAAN PERSETUJUAN	vi
ABSTRAK.....	vii
ABSTRACT	viii
DAFTAR ISI	ix
DAFTAR TABEL	xi
DAFTAR GAMBAR.....	xii
DAFTAR LAMPIRAN	xiii
BAB I.....	1
A. Latar Belakang	1
B. Rumusan Masalah	2
C. Keaslian Penelitian.....	3
D. Tujuan Penelitian	3
E. Manfaat Penelitian	3
BAB II	4
A. Tanaman Sirsak (<i>Annona muricata</i> L.).....	4
B. SARS-CoV-2	5
C. 3-Chymotrypsin-like Protease (3CLpro).....	7
D. Uji <i>In Vitro</i> Penghambatan 3CLpro	8
E. Maserasi	9
F. Kromatografi Lapis Tipis	9
G. Landasan Teori.....	9
H. Hipotesis	10
BAB III.....	11
A. Jenis dan Rancangan Penelitian	11
B. Variabel dan Definisi Operasional Variabel	11
C. Bahan Penelitian.....	11
D. Alat Penelitian.....	11
E. Tata Cara Penelitian	12

F. Analisis Hasil	14
BAB IV	15
A. Determinasi Tanaman	15
B. Ekstrak metanol daun sirsak	15
C. Profil KLT ekstrak	16
D. Aktivitas Penghambatan 3CLpro SARS-CoV-2.....	17
BAB V	21
A. Kesimpulan	21
B. Saran	21
DAFTAR PUSTAKA.....	22
LAMPIRAN	25
BIOGRAFI PENULIS	27



DAFTAR TABEL

Tabel I. Hasil pengujian penghambatan enzim 3CLpro18
Tabel II. Hasil uji T kontrol positif dan sampel.....19



DAFTAR GAMBAR

Gambar 1. Tanaman sirsak yang dikoleksi di daerah Godean, Yogyakarta.....	5
Gambar 2. Struktur SARS-CoV-2	6
Gambar 3. Proses replikasi SARS-CoV-2	7
Gambar 4. Struktur 3CLpro SARS-CoV-2 dan domain katalitiknya.....	8
Gambar 5. Serbuk simplisia dan ekstrak kental daun sirsak.....	16
Gambar 6. Profil KLT ekstrak	16
Gambar 7. Interaksi molekular pada uji <i>in silico</i>	19



DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran 1. Surat pengesahan determinasi tanaman.....	25
Lampiran 2. Volume bahan pengujian <i>in vitro</i>	26



BAB I

PENDAHULUAN

A. Latar Belakang

Saat ini dunia masih dilanda pandemi *coronavirus disease 2019* (COVID-19). Pada awalnya, Tiongkok melaporkan kasus pneumonia baru yang berasal dari pasar makanan laut Wuhan pada 31 Desember 2019 (Zheng, 2020). Virus tersebut kemudian dianalisis dan diidentifikasi sebagai 2019 *novel coronavirus* (2019-nCoV) dan dideklarasikan sebagai pandemi oleh *World Health Organization* (WHO) pada Maret 2020 (Wang *et al.*, 2020). Pada bulan yang sama, Indonesia melaporkan kasus terkonfirmasi COVID-19 pertama (Susilo dkk, 2020). Berdasarkan data WHO, kasus COVID-19 yang terkonfirmasi mencapai 458.479.635 dengan angka kematian sebanyak 6.047.653 jiwa. Indonesia sendiri memiliki jumlah kasus terkonfirmasi sebanyak 5.900.124 dengan angka kematian sebanyak 152.437 jiwa pada Maret 2022 (WHO, 2022).

COVID-19 disebabkan oleh virus SARS-CoV-2 yang menyebar antar manusia melalui droplet ketika batuk atau bersin, serta ada kemungkinan terjadinya transmisi aerosol dalam ruangan tertutup (Casella *et al.*, 2021). Virus ini memiliki kemiripan dengan SARS-CoV yang pernah merebak di Tiongkok pada November 2002 sampai Juli 2003 silam (Xu *et al.*, 2020). Kedua virus tersebut diklasifikasikan sebagai beta-virus corona dan merupakan tipe virus RNA, namun gen SARS-CoV-2 dan SARS-CoV memiliki kemiripan nukleotida sebesar 89,10% (Qamar *et al.*, 2020). Secara umum, beta-virus corona memproduksi polipeptida 800 kDa untuk transkripsi genom. Polipeptida tersebut akan mengalami proteolisis dan membelah menjadi berbagai protein. Proses proteolisis dimediasi oleh *papain-like protease* (PLpro) dan *3-chymotrypsin-like protease* (3CLpro). *3-chymotrypsin-like protease* membelah poliprotein pada 11 situs untuk memproduksi berbagai protein non-struktural yang penting dalam replikasi virus. Oleh karena itu, 3CLpro merupakan target potensial untuk skrining antivirus corona (Qamar *et al.*, 2020).

Beberapa antivirus yang digunakan dalam penanganan sementara COVID-19 adalah klorokuin (antimalaria), lopinavir/ritonavir (anti-HIV), serta remdesivir (anti-ebola) (Solnier and Fladerer, 2020). Hal ini dikarenakan belum tersedia antivirus spesifik COVID-19. Selain itu, sebagai tindakan preventif dilakukan

vaksinasi dan penanganan suportif dengan oksigen supplemental dan ventilator (CDC, 2020). Penanganan COVID-19 di Tiongkok melibatkan penggunaan herbal tradisional. Berdasarkan studi oleh Hong-Zhi *et al.*, (*cit.*, Benarba and Pandiella, 2020), tingkat kesembuhan pasien COVID-19 yang menggunakan herbal tradisional adalah 90% dari 214 pasien. Selain itu, herbal tradisional juga mencegah infeksi SARS-CoV-2 dan meningkatkan status kesehatan pasien dengan gejala ringan dan berat. Beberapa ahli dari Rumah Sakit Zhongnan Universitas Wuhan memasukkan penggunaan obat tradisional dalam tatalaksana penanganan dan pencegahan COVID-19 (Benarba and Pandiella, 2020). Oleh karena itu, penggunaan produk herbal dapat digunakan sebagai pendekatan alternatif dalam penanganan suportif dan profilaksis COVID-19.

Drug Discovery Student Club (DDSC) Fakultas Farmasi Universitas Sanata Dharma telah melakukan studi pendahuluan berupa penapisan tanaman Indonesia yang berpotensi sebagai penghambat 3CLpro. Penapisan ini dilakukan dengan uji *in silico* (komputasi) berupa *docking* molekular struktur kristal enzim 3CLpro terhadap 300 senyawa dari *in-house database* yang dikoleksi DDSC menggunakan *software* AutoDock Vina (www.scripps.edu.my). Dua puluh senyawa yang terpilih (*hits*), diketahui terkandung dalam 16 tanaman lokal berdasarkan energi bebas ikatan dengan nilai terendah. Salah satu tanaman yang didapatkan adalah tanaman sirsak dengan senyawa yang diduga aktif, yaitu anonain dengan energi bebas ikatan sebesar -7,2 kkal/mol.

Prasad *et al.* (2021) juga telah melakukan uji hambatan terhadap protein *spike* SARS-CoV-2 dengan metode *in silico* pada 10 *acetogenin* tanaman sirsak dan menunjukkan afinitas yang baik terhadap protein *spike* dengan rentang energi bebas berikatan sebesar -5,3 hingga -7,7 kkal/mol. Hasil penelitian *in silico* tersebut digunakan sebagai dasar untuk membuktikan aktivitas tanaman sirsak dalam terapi COVID-19. Pada penelitian ini dilakukan uji aktivitas penghambatan enzim 3CLpro oleh ekstrak metanol daun sirsak secara *in vitro* dengan metode FRET-based assay. Hasil pengujian menunjukkan ekstrak metanol daun sirsak dapat menghambat aktivitas enzim 3CLpro sebesar 19,23% pada konsentrasi 1000 µg/mL dan 48,08% pada konsentrasi 2000 µg/mL.

B. Rumusan Masalah

1. Apakah ekstrak metanol daun sirsak memiliki aktivitas sebagai penghambat

enzim 3CLpro SARS-CoV-2?

2. Bagaimana profil kromatografi lapis tipis (KLT) ekstrak metanol daun sirsak?

C. Keaslian Penelitian

Keaslian penelitian ini berdasarkan atas penelitian terkait yang telah dilakukan sebelumnya, yaitu:

Prasad *et al.*, (2020) melakukan penelitian *in silico* yang menunjukkan bahwa kandungan *acetogenin* tanaman sirsak memiliki afinitas yang baik terhadap protein *spike* SARS-CoV-2 dengan rentang energi bebas berikatan sebesar - 5,3 hingga 7,7 kkal/mol.

Sejauh penelusuran pustaka yang dilakukan, penelitian mengenai aktivitas hambatan ekstrak metanol daun sirsak terhadap enzim 3CLproSARS-CoV-2 secara *in vitro* belum pernah dilakukan.

D. Tujuan Penelitian

1. Menguji aktivitas penghambatan ekstrak metanol daun sirsak terhadap enzim 3CLpro SARS-CoV-2 secara *in vitro*.
2. Mengetahui profil kromatografi lapis tipis (KLT) ekstrak metanol daun sirsak.

E. Manfaat Penelitian

1. Manfaat Teoretis
Penelitian ini dapat menyediakan informasi terkait proses penemuan antivirus corona terkhususnya pada uji *in vitro* tingkat molekuler dari sampel herbal.
2. Manfaat Metodologis
Penelitian ini dapat membantu dalam pengembangan ilmu kefarmasian terkait proses penemuan antivirus corona terkhususnya pada uji *in vitro* tingkat molekuler dari sampel herbal.
3. Manfaat Praktis
Penelitian ini dapat memberikan informasi kepada masyarakat mengenai penemuan kandidat antivirus corona dari herbal, serta menyediakan produk hasil penelitian sebagai antivirus corona yang siap dilanjutkan sampai tahap uji klinik.

BAB II

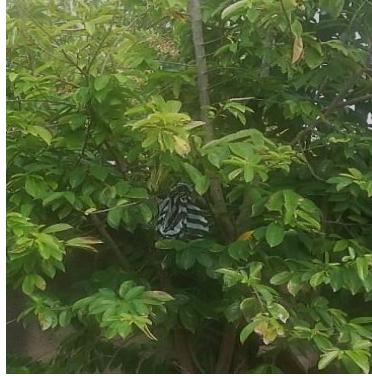
TINJAUAN PUSTAKA

A. Tanaman Sirsak (*Annona muricata* L.)

Tanaman sirsak berasal dari daerah tropis dan subtropis, seperti Amerika Selatan dan Utara, India, Malaysia dan Nigeria. Sirsak merupakan tanaman *evergreen* dan *terrestrial*, dengan ketinggian 5-8 meter dan karakteristik seperti kanopi, seperti tersaji pada **Gambar 1**. Daun sirsak berbentuk lonjong, ujung berbentuk lancip, permukaan mengkilap dan halus, berwarna hijau tua dengan permukaan bawah berwarna hijau muda, serta berbau tajam dan khas ketika diremas. Batang sirsak berwarna cokelat gelap dan beranting. Tanaman sirsak memiliki bunga berwarna kuning kehijauan dan berbentuk seperti kerucut. Kelopak bunga sirsak tebal dan kaku, serta tumbuh pada cabang, ranting maupun batang. Buah tanaman sirsak berbentuk mirip kerucut, berwarna hijau saat muda dan menjadi hijau kekuningan saat masak dan memiliki duri lunak yang menyelubungi seluruh buah (Warisno dan Dahana, 2012). Berikut merupakan klasifikasi taksonomi tanaman sirsak.

Kerajaan	: Plantae
Sub-kerajaan	: Viridiplantae
Super divisi	: Embryophyta
Divisi	: Tracheophyta
Kelas	: Magnoliopsida
Ordo	: Magnoliales
Famili	: Annonaceae
Genus	: <i>Annona</i>
Spesies	: <i>Annona muricata</i>

(Integrated Taxonomic Information System, 2021)



Gambar 1. Tanaman sirsak yang dikoleksi di daerah Godean, Yogyakarta

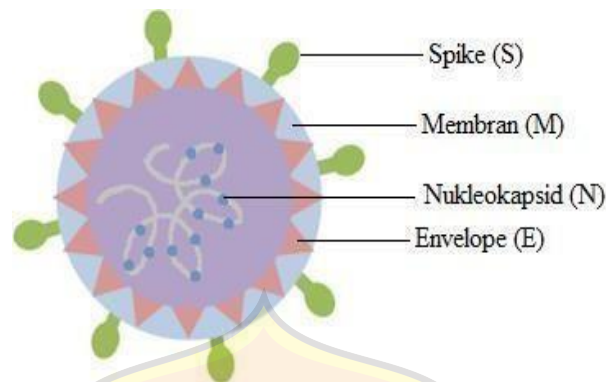
Secara tradisional, bagian tanaman sirsak yang sering digunakan sebagai obat adalah batang, akar, benih dan daun. Tanaman sirsak digunakan untuk mengobati penyakit kulit, analgesik oral dan topikal, obat demam, flu dan asma. Selain itu, tanaman ini juga digunakan untuk menangani parasit, malaria, diare, penyakit jantung serta hepar. Sirsak juga digunakan untuk mengobati hipertensi, diabetes dan kanker, serta dapat digunakan sebagai insektisida (Coria-Tellez *et al.*, 2016).

Beberapa studi ilmiah menyatakan bahwa tanaman sirsak terbukti memiliki efek farmakologi, seperti aktivitas sitotoksik yang selektif terhadap sel kanker (George *et al.*, 2012), anti-protozoa (Ferreira *et al.*, 2013), antioksidan (Almeida *et al.*, 2011; Correa-Gordillo *et al.*, 2012), antimikroba (Bento *et al.*, 2013), antivirus (Usha *et al.*, 2019), aktivitas hipoglikemik (Hardoko *et al.*, 2015), anti-tumorigenik (Hamizah *et al.*, 2012), hepatoprotektif dan gastroprotektif (Moghadamtousi *et al.*, 2014), dan anti-hipotensif (Nwokocha *et al.*, 2012). Berdasarkan studi fitokimia, tanaman sirsak diketahui mengandung senyawa alkaloid, triglikosida flavonol, megastigmane, fenolik, siklopeptida dan minyak atsiri. Ekstrak metanol daun sirsak mengandung senyawa tanin, flavonoid, saponin, terpenoid, alkaloid, steroid dan fenolik (Agu and Okolie, 2017).

B. SARS-CoV-2

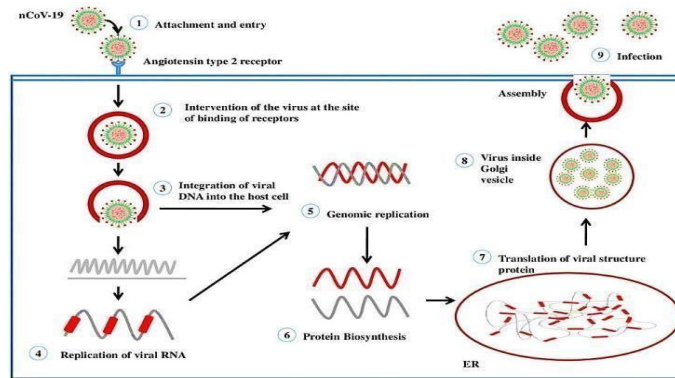
Berdasarkan studi bioinformatika, SARS-CoV-2 memiliki karakteristik umumvirus corona dan termasuk dalam kelompok beta-virus corona. Virus SARS-CoV-2 memiliki 79,5% kemiripan sekuen genom dengan SARS-CoV. Berdasarkan perbandingan genom SARS-CoV-2 dengan beta virus corona lainnya, SARS-CoV-2 diperkirakan berevolusi dari virus corona kelelawar RaTG13 dengan kemiripan sebesar 96% (Wang *et al.*, 2020). Struktur SARS-CoV-2 tersusun atas 4 protein

struktural, yaitu glikoprotein *spike* (S), glikoprotein *envelope* (E), glikoprotein membran (M) dan protein nukleokapsid (N), seperti tersaji pada **Gambar 2** (Wang *et al.*, 2020).



Gambar 2. Struktur SARS-CoV-2

Infeksi virus corona dapat ditularkan dari hewan ke manusia atau antar manusia. Virus SARS-CoV-2 akan masuk ke dalam sel inang melalui reseptor *angiotensin-converting enzyme 2* (ACE2) yang terdapat pada organ hati, paru-paru, ginjal dan saluran gastrointestinal. Hal tersebut terjadi karena glikoprotein S SARS-CoV-2 mampu melekat pada reseptor ACE2, menyebabkan penyatuan antara membran virus dan sel inang. Setelah mengalami endositosis, SARS-CoV-2 akan melepas materi genetik berupa mRNA ke dalam sitoplasma yang kemudian akan ditranslasikan. Struktur genom SARS-CoV-2 terdiri atas 14 *open reading frames* (ORF) yang masing-masing mengkode protein struktural dan non-struktural. Pada awalnya, ORF1a dan ORF1b akan mengkode dua poliprotein (pp) replikasi, yaitu pp1a dan pp1ab yang akan dihidrolisis oleh enzim protease, yaitu *papain-like protease* (PLpro) dan Mpro (*main protease*) atau 3CLpro menjadi protein non-struktural (nsp). Protein non-struktural akan bergabung dan membentuk kompleks replikasi-transkripsi yang berpartisipasi dalam pembentukan vesikel membran ganda pada retikulum endoplasma. Kompleks tersebut akan disusun oleh protein M, S, dan E untuk membentuk nukleokapsid yang akan dikeluarkan dari sel melalui proses eksositosis, seperti tersaji pada **Gambar 3** (Li *et al.*, 2020; Astuti and Ysrafil, 2020).

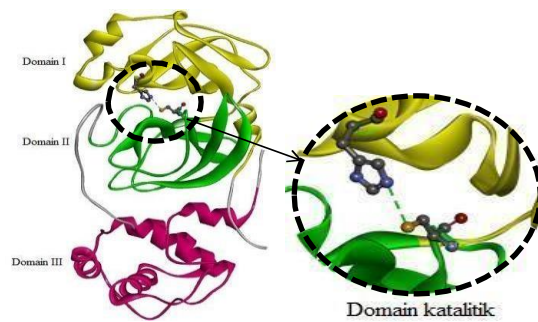


Gambar 3. Proses replikasi SARS-CoV-2 (Bala and Kumar, 2020)

Transmisi SARS-CoV-2 terjadi melalui droplet antar manusia ketika berada dalam jarak yang dekat. Transmisi melalui droplet ini terjadi secara langsung saat bersin atau batuk, sehingga infeksi dapat terjadi ketika droplet mengenai membran mukosa (mulut dan hidung) dan mata. Transmisi juga dapat terjadi ketika individu melakukan kontak dengan benda yang terpapar droplet (Bala and Kumar, 2020; Zheng, 2020). Masa inkubasi COVID-19 adalah 14 hari setelah paparan dan ditunjukkan dengan gejala pneumonia ringan hingga berat. Secara umum, gejala yang ditimbulkan adalah demam, batuk berdahak, sesak napas, sakit tenggorokan, sakit kepala dan myalgia. Selain gejala tersebut, beberapa kasus jugamenunjukkan adanya gejala sistem gastrointestinal, yaitu mual, muntah dan diare. Berdasarkan hasil laboratorium, pasien COVID-19 mengalami limfositopenia, trombositopenia, kenaikan CRP dan D-dimer, serta serum ALT (Saxena, 2020).

C. 3-Chymotrypsin-like Protease (3CLpro)

Setelah proses endositosis, genom RNA akan digunakan sebagai cetakan untuk translasi poliprotein pp1a dan pp1ab yang mengkode berbagai nsp termasuk enzim protease, yaitu 3CLpro dan PLpro. *3-chymotripsine-like protease* disebut juga Mpro (*main protease*) dikarenakan peran penting dalam ekspresi gen dan proses replikasi. *3-chymotripsine-like protease* ini berperan dalam proses proteolitik poliprotein replikasi menghasilkan protein fungsional untuk kepentingan replikasi, transkripsi dan rekombinasi virus (Kumar *et al.*, 2020; Suarez and Diaz, 2020).



Gambar 4. Struktur 3CLpro SARS-CoV-2 dan domain katalitiknya

Struktur kristal 3CLpro SARS-CoV-2 mirip dengan virus corona lainnya. 3-chymotripsine-like protease tersusun atas tiga domain, yaitu domain I (residu 8-101) dan domain II (residu 102-184) dengan struktur β -barrel antiparalel, sedangkan domain III (residu 201-303) membentuk α -heliks yang terhubung dengan domain II (Hartini *et al.*, 2021). Domain katalitik SARS-CoV-2 berada di antara domain I dan II yang dimediasi oleh interaksi hidrogen antara sistein dan histidin. Sistein akan berfungsi sebagai nukleofil dengan bantuan histidin sebagai katalis dalam reaksi hidrolisis sistein. Setelahnya, sistein akan melakukan penyerangan nukleofilik pada gugus karbonil substrat P1. Domain III sendiri berfungsi untuk dimerisasi protease menjadi bentuk enzim homodimer yang aktif, seperti tersaji pada **Gambar 4** (Roe *et al.*, 2021; Ferreira and Rabeh, 2020).

D. Uji *In Vitro* Penghambatan 3CLpro

Uji *in vitro* aktivitas penghambatan enzim 3CLpro yang digunakan adalah FRET (*Fluorescence Energy Transfer*) assay. *Fluorescence Energy Transfer* merupakan transfer energi dari donor berfluoresensi ke suatu molekul akseptor yang bergantung pada jarak. Transfer energi antara molekul berwarna terjadi ketika spektrum emisi fluoresensi donor tumpang tindih dengan spektrum eksitasi akseptor. Ketika fluoresensi molekul pendonor tereksitasi secara langsung, sebagian energi eksitasi akan dilewatkan pada molekul akseptor, sehingga tidak hanya diikuti dengan emisi molekul pendonor (Rogers *et al.*, 2012).

Dalam hal ini, penurunan energi emisi donor yang diikuti dengan peningkatan emisi akseptor merupakan objek observasi. Transfer energi ini hanya terjadi ketika dua molekul berdekatan dengan jarak kurang dari 100 Angstrom. Hal tersebut menjadikan FRET sebagai objek yang sensitif untuk analisis asosiasi makromolekul (Rogers *et al.*, 2012).

E. Maserasi

Maserasi merupakan metode ekstraksi sederhana yang digunakan untuk mengekstraksi sampel baik dalam jumlah kecil maupun besar. Metode maserasi dilakukan dengan merendam sampel dalam wadah tertutup dengan pelarut pada suhu ruang setidaknya selama 3 hari sambil diaduk. Setelah proses ekstraksi selesai, maserat akan dipisahkan melalui penyaringan atau dekantasi, kemudian diuapkan dengan *evaporator*, oven maupun *water bath* (Azwanida, 2015; Abubakar and Haque, 2020).

Prinsip maserasi adalah penetrasi pelarut ke dalam sel tanaman sehingga terjadi perpindahan senyawa menuju pelarut. Pelarut yang digunakan harus selektif dan mampu mengekstraksi senyawa target, tidak bereaksi dengan senyawa target maupun matriks lain, mudah menguap, tidak berbahaya atau toksik, dan murah serta mudah didapatkan (Azwanida, 2015; Abubakar and Haque, 2020).

F. Kromatografi Lapis Tipis

Kromatografi lapis tipis merupakan jenis kromatografi cair dengan fase gerak berupa cairan dan fase diamnya berupa adsorben yang diletakkan pada sebuah lempeng. Fase gerak yang digunakan berupa pelarut yang akan memfasilitasi gerak senyawa pada fase diam. Kecepatan pergerakan senyawa bergantung pada kemampuan pelarut untuk melarutkan senyawa dan kemampuan adsorben untuk menarik senyawa dari pelarut (Santiago and Strobel, 2013)..

Senyawa yang berinteraksi kuat dengan adsorben akan bergerak lebih lambat dan senyawa yang bergerak lebih cepat pada fase diam menunjukkan interaksi senyawa yang lebih kuat dengan fase gerak. Pada metode KLT, fase diam berupa senyawa polar, sehingga senyawa yang bersifat polar akan bergerak lebih lambat pada fase diam bila fase gerak yang digunakan bersifat non-polar (Santiago and Strobel, 2013).

G. Landasan Teori

Enzim 3CLpro memegang peranan penting dalam siklus hidup virus SARS-CoV-2. *3-chymotrypsine-like protease* berperan dalam menghasilkan protein fungsional dari proses proteolitik poliprotein replikasi agar virus dapat melakukan proses replikasi, transkripsi dan rekombinasi virus. Oleh karena itu, 3CLpro merupakan target potensial untuk penapisan antivirus corona terkhususnya dari herbal. Proses penapisan dilakukan secara *in silico* dengan metode *molecular*

docking. Senyawa yang terkandung dalam tanaman asli Indonesia dilakukan *docking* terhadap struktur kristal enzim 3CLpro menggunakan *software* AutoDock Vina. Penapisan dilakukan berdasarkan nilai energi bebas ikatan antara senyawa dalam tanaman dan enzim 3CLpro. Senyawa yang memiliki nilai energi bebas ikatan yang rendah diduga mampu menghambat enzim 3CLpro.

Anonain diduga mampu menghambat enzim 3CLpro karena hasil *molecular docking* menunjukkan nilai energi bebas ikatan yang rendah terhadap enzim 3CLpro, yaitu -7,2 kkal/mol. Senyawa ini merupakan senyawa golongan alkaloid yang diketahui terkandung dalam daun tanaman sirsak. Alkaloid bersifat kurang polar, sehingga dapat diekstraksi dengan pelarut metanol. Pelarut metanol memiliki gugus non-polar pada bagian metil dan gugus polar pada bagian hidroksil sehingga mampu meningkatkan permeabilitas sel. Oleh karena itu, metanol mudah berpenetrasi ke dalam sel tanaman untuk mengekstraksi anonain.

H. Hipotesis

1. Ekstrak metanol daun sirsak mengandung senyawa alkaloid.
2. Ekstrak metanol daun sirsak menghambat aktivitas enzim 3CLpro SARS-CoV-2 secara *in vitro*.

BAB III METODE PENELITIAN

A. Jenis dan Rancangan Penelitian

Jenis penelitian yang dilakukan adalah eksperimental murni dan rancangan penelitian yang dilakukan adalah *post-test only control group design* dengan teknik *simple random sampling*.

B. Variabel dan Definisi Operasional Variabel

Variabel bebas : konsentrasi ekstrak metanol daun sirsak

Variabel terikat : persentase (%) penghambatan enzim 3CLPro

Variabel pengacau terkendali : tahapan ekstraksi, suhu dan waktu inkubasi

Definisi operasional variabel :

1. Konsentrasi ekstrak metanol daun sirsak adalah 20 mg ekstrak metanol daun sirsak di dalam 0,2 mL DMSO.
2. Ekstrak metanol daun sirsak adalah hasil ekstraksi daun sirsak menggunakan pelarut metanol.
3. Persentase penghambatan enzim 3CLpro adalah persen penghambatan sampel uji yang sudah dikurangi blanko dibagi persen penghambatan kontrol negatif yang sudah dikurangi blanko.
4. Tahapan ekstraksi terdiri dari pemanenan daun, penyucian, sortasi basah dan kering, pengeringan daun, penyerbukan, maserasi dan pengentalan ekstrak.
5. Suhu inkubasi pada uji *in vitro* penghambatan enzim 3CLpro, yaitu 25°C dengan waktu inkubasi 24 jam.

C. Bahan Penelitian

Daun sirsak, metanol teknis, kertas, aluminium foil, plat KLT *silica gel* 60 GF₂₅₄ (*p.a.*, Merck®), *n*- heksana (*p.a.*, Merck®), etil asetat (*p.a.*, Merck®), pereaksi dragendorff (Merck®), kit enzim 3CLpro (BPS Bioscience), DMSO, air untuk injeksi.

D. Alat Penelitian

Alat-alat gelas pada umumnya, timbangan analitik (Ohaus), mortar dan stamper, mikropipet (Socorex), 96-well microplate, vortex, *white and blue tips*, lampu Bunsen, lemari pendingin, *freezer*, Synergy™ HTX Multi-Mode microplate reader

(BioTek), lampu UV 254 nm, pH meter, dan *chamber* KLT.

E. Tata Cara Penelitian

1. Determinasi tanaman

Herbarium tanaman daun sirsak dibuat dengan mengambil bagian ranting serta daun segar yang tidak rusak secara fisik dan bebas dari serangan hama. Bagian ranting dan daun dikeringkan pada kertas koran yang ditangkupkan dengan papan yang diberi pemberat. Kertas koran diganti bila basah dan tahap pengeringan dilakukan secara berulang hingga tanaman kering. Tanaman yang sudah kering dipindahkan dan ditempelkan pada kertas manila putih. Penempelan dilakukan dengan mengikat tanaman menggunakan tali rami dan herbarium diberi label. Herbarium kemudian dikirimkan untuk dideterminasi ke Fakultas Farmasi Universitas Sanata Dharma, Yogyakarta.

2. Ekstraksi daun sirsak

Pemanenan daun sirsak dilakukan dengan mengambil bagian daun dari tanaman di daerah Godean, Yogyakarta. Daun sirsak dipanen pada musim kemarau dan dipilih daun keempat dari pucuk hingga ke pangkal ranting, segar, tidak rusak secara fisik dan bebas dari serangan hama. Daun tersebut disortasi, lalu dicuci dengan air bersih dan dikeringkan dengan menggunakan panas matahari sambil ditutupi kain hitam. Pengeringan dilakukan hingga daun sirsak kering. Daun tersebut disortasi kembali dan diserbuk dengan mortar dan stamper.

Ekstraksi daun sirsak dilakukan dengan metode maserasi menggunakan pelarut metanol. Maserasi dilakukan dengan merendam 20 g serbuk simplisia menggunakan pelarut metanol dengan perbandingan 1:5 dan diaduk pada suhu ruangan hingga 24 jam. Setelah pengadukan 24 jam, maserat disaring dengan kertas saring, residu maserasi dimaserasi kembali dengan volume pelarut dan waktu pengadukan yang sama. Remaserasi residu dilakukan sebanyak 2 kali. Maserat yang diperoleh diuapkan menggunakan oven dengan suhu 40°C hingga didapatkan ekstrak metanol kental dari daun sirsak.

3. Uji KLT ekstrak metanol daun jarak pagar dan daun sirsak

Uji KLT dilakukan dengan menotolkan ekstrak metanol daun sirsak pada plat *silica gel* KLT dan dielusi dengan fase gerak berupa *n*-heksana:etil asetat 2:2 yang telah dijenuhkan dalam *chamber* KLT terlebih dahulu. Setelah elusi, plat *silica* dibiarkan kering terlebih dahulu, kemudian dianalisis di bawah sinar UV 254 nm. Plat KLT kemudian disemprot dengan pereaksi semprot dragendorff untuk identifikasi senyawa-alkaloid yang terkandung. Plat KLT yang telah disemprot kemudian dikeringkan dan diamati warna pada totolan noda. Nilai Rf totolan noda yang diduga alkaloid kemudian diukur.

4. Uji aktivitas penghambatan 3CLpro *in vitro*

Larutan *assay buffer* dibuat dengan mengambil larutan *buffer* sebanyak 5 mL ditambah 10 μ L larutan DTT 0,5 M, sehingga konsentrasi akhir DTT menjadi 1 mM. Enzim 3CLpro direkonstitusi dengan melarutkan 20 μ g enzim dalam 4000 μ L larutan *assay buffer*. GC376 sebagai kontrol positif disiapkan dengan melarutkan 50 μ g GC376 dalam 200 μ L air untuk injeksi. Sampel disiapkan dengan cara menimbang ekstrak metanol daun sirsak sebanyak 20 mg dan dilarutkan dengan 200 μ L DMSO sehingga didapatkan konsentrasi stok 100.000 ppm. Substrat disiapkan dengan mengencerkan 25 μ L substrat dalam 1 mL larutan *assay buffer*. Larutan blanko dibuat dengan memipet 30 μ L larutan *assay buffer* ke dalam *well*. Air untuk injeksi 10 μ L dan 30 μ L enzim 3CLpro dimasukkan ke dalam 96 *well* sebagai kontrol negatif. Kontrol positif disiapkan dengan cara memipet 10 μ L GC376 dan 30 μ L enzim 3CLpro ke dalam 96 *well*. Sampel dengan konsentrasi 1000 ppm disiapkan dengan cara memipet 0,5 μ L ekstrak metanol daun sirsak, 9,5 μ L air untuk injeksi, dan 30 μ L enzim 3CLpro ke dalam 96 *well*. Sampel dengan konsentrasi 2000 ppm disiapkan dengan cara memipet 1 μ L ekstrak metanol daun sirsak, 9 μ L air untuk injeksi, dan 30 μ L enzim 3CLpro ke dalam 96 *well*. 96 *well* diinkubasi pada suhu 25°C selama 30 menit. Setelah itu, 10 μ L substrat 3CLpro ditambahkan pada blanko, sampel, kontrol negatif dan kontrol positif kemudian diinkubasi pada suhu 25°C selama 24 jam. 96 *well* dibaca fluoresensinya dibaca menggunakan Synergy™ HTX Multi-Mode Microplate Reader dengan panjang gelombang 360/460 nm.

F. Analisis Hasil

1. Organoleptis

Diamati bentuk, warna dan bau dari ekstrak metanol daun sirsak.

2. Analisis rendemen ekstrak

$$\text{Rendemen} = \frac{\text{bobot ekstrak metanol}}{\text{bobot simplisia}} \times 100\%$$

3. Analisis hasil uji penghambatan enzim 3CLpro

Ekstrak metanol daun sirsak diukur aktivitas penghambatannya dengan menghitung nilai persentase penghambatan menggunakan rumus:

$$\% \text{aktivitas} = \left(\left(\frac{\text{Bacaan fluorosensi sampel-blanko}}{\text{Bacaan fluoroensi kontrol negatif-blanko}} \right) \right) \times 100\%$$

$$\% \text{hambatan} = 100\% - \% \text{aktivitas}$$

4. Analisis profil KLT

$$R_f = \frac{\text{jarak yang ditempuh solut}}{\text{jarak yang ditempuh fase gerak}}$$

Warna totalan noda setelah dilakukan penyemprotan dan pengeringan diamati.

5. Analisis statistik

Analisis statistik berupa perhitungan SD dan uji-T dengan *software* Microsoft Excel.

BAB IV

HASIL DAN PEMBAHASAN

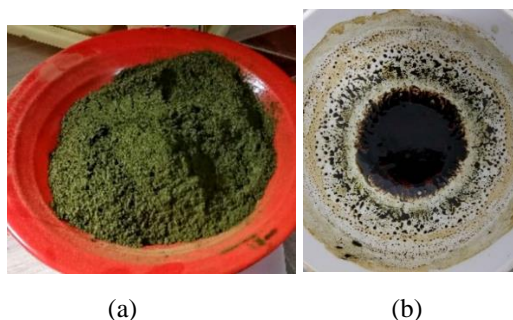
A. Determinasi Tanaman

Daun sirsak yang digunakan dalam penelitian ini didapatkan dari daerah Godean, Yogyakarta. Tanaman tersebut telah dideterminasi di Fakultas Farmasi Universitas Sanata Dharma. Hasil determinasi menunjukkan bahwa tanaman yang digunakan adalah daun sirsak dengan nama latin *Annona muricata* L. seperti tertera pada surat keterangan hasil determinasi tanaman yang tersaji pada **Lampiran 1**.

B. Ekstrak metanol daun sirsak

Pada penelitian ini, daun sirsak dikeringkan dengan menjemur daun sirsak yang telah ditutupi kain hitam di bawah matahari, lalu dihaluskan menjadi serbuk. Serbuk tersebut memiliki organoleptis berupa serbuk halus berwarna hijau seperti pada **Gambar 5a** dengan bau yang khas. Sebanyak 20 gram serbuk daun sirsak diekstraksi dengan menggunakan 100 mL pelarut metanol. Ekstraksi dilakukan dengan metode maserasi selama 1 x 24 jam dan dilakukan remaserasi sebanyak 2 kali, kemudian maserat dikentalkan dengan cara diuapkan menggunakan oven dengan suhu 40° C. Metode maserasi digunakan karena metode ini merupakan metode yang sederhana serta dapat mencegah kerusakan senyawa yang bersifat termolabil. Pelarut yang digunakan dalam metode ekstraksi adalah metanol karena metanol memiliki indeks polaritas sebesar 5,1 sehingga dapat menarik senyawa yang bersifat polar dan non polar, serta memiliki titik didih sebesar 64,7° C yang mudah diuapkan (*Department of Chemistry, 2005; International Centre for Science and High Technology, 2008*). Ciri organoleptis ekstrak kental daun sirsak berupa cairan kental berwarna coklat kehitaman dan berbau khas, seperti tersaji pada **Gambar 5b**.

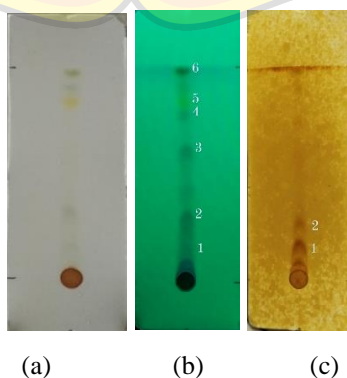
Ekstrak kental yang diperoleh sebesar 2,252 gram dengan persentase rendemen ekstrak sebesar 11,25%. Rendemen menunjukkan perbandingan berat ekstrak yang didapatkan dengan berat simplisia. Semakin tinggi nilai rendemen menunjukkan bahwa ekstrak yang didapatkan semakin besar. Nilai rendemen ekstrak yang didapatkan dapat dikatakan cukup baik.



Gambar 5. (a) serbuk simplisia (b) ekstrak kental daun sirsak

C. Profil KLT ekstrak

Ekstrak daun sirsak dianalisis menggunakan metode KLT. Sistem KLT menggunakan fase gerak etil asetat dan n-heksana dengan perbandingan 2:2 dan fase diam plat silica GF₂₅₄. Profil KLT ekstrak metanol daun sirsak yang diperoleh seperti pada **Gambar 6a**, menunjukkan adanya enam bercak yang diamati secara visibel. Warna bercak yang terdeteksi pada ekstrak di bawah lampu UV 254 nm adalah bercak berwarna abu-abu, bercak berwarna kuning dan bercak berwarna hijau, seperti tersaji pada **Gambar 6b**. Plat KLT kemudian disemprot dengan reagen Dragendorff's untuk mengidentifikasi kandungan senyawa alkaloid. Keberadaan alkaloid dalam ekstrak ditunjukkan dengan kemunculan bercak berwarna coklat gelap setelah penyemprotan, seperti pada **Gambar 6c**. Kedua bercak coklat yang didapatkan memiliki nilai R_{f1} sebesar 0,2 dan R_{f2} sebesar 0,325. Anonain yang termasuk dalam golongan alkaloid diketahui memiliki nilai R_f sebesar 0,32 berdasarkan studi yang dilakukan oleh Galarce-Bustos *et al.* (2019). Berdasarkan hasil kromatogram KLT tersebut, kami menduga di dalam ekstrak metanol daun sirsak terdapat senyawa alkaloid anonain.



Gambar 6. Profil KLT ekstrak menggunakan fase gerak n-heksana : etil asetat (2:2) pada plat silica gel GF₂₅₄ : (a) secara visible (b) di bawah UV 254 nm (c) setelah penyemprotan reagen Dragendorff

D. Aktivitas Penghambatan 3CLpro SARS-CoV-2

Pengujian penghambatan 3CLpro SARS-CoV-2 dilakukan secara *in vitro* dengan menggunakan metode *FRET-based assay*. *3-chymotrypsine-like protease* adalah enzim protease yang memiliki aktivitas proteolitik sehingga dapat memotong ikatan peptida pada substratnya. Substrat yang digunakan dalam pengujian ini berupa peptida yang terikat dengan gugus fluorofor sehingga gugus fluorofor akan terlepas ketika dipotong oleh 3CLpro dan fluoresensinya dapat terbaca. Besarnya aktivitas enzim 3CLpro *in vitro* sebanding dengan nilai fluoresensi yang dihasilkan oleh produk hidrolisis substrat peptida oleh 3CLpro (Nicolotti, 2012). Oleh karena itu, nilai fluoresensi yang menurun menunjukkan bahwa terjadi penghambatan aktivitas enzim (Hariono *et al.*, 2021).

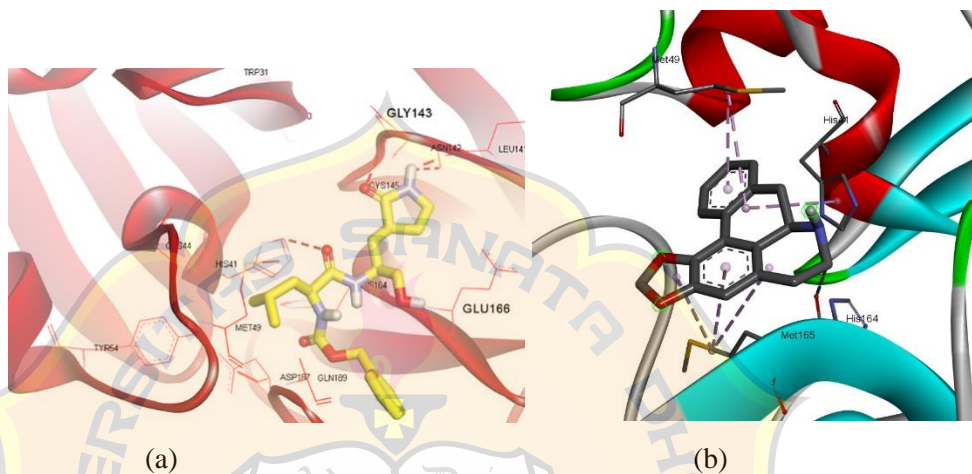
Pada penelitian ini, kelompok pengujian dibagi menjadi blanko, kontrol negatif, kontrol positif dan kelompok perlakuan. Blanko yang terdiri dari *assay buffer*, WFI dan substrat digunakan sebagai *baseline* bacaan fluoresensi tanpa adanya aktivitas enzim. Kontrol negatif yang terdiri dari WFI, enzim dan substrat digunakan untuk mengetahui nilai bacaan fluoresensi enzim 3CLpro tanpa adanya penghambatan, sedangkan kontrol positif yang terdiri dari GC376, enzim dan substrat digunakan sebagai pembanding aktivitas penghambatan enzim 3CLpro serta memastikan bahwa prosedur dan kits enzim sesuai untuk pengujian. GC376 digunakan sebagai inhibitor 3CLpro dikarenakan senyawa peptidomimetik ini menghambat secara aktif 3CLpro SARS-CoV-2 (Fu *et al.*, 2020). Sampel ekstrak daun sirsak yang digunakan dalam kelompok perlakuan dibuat dalam dua konsentrasi, yaitu 1000 ppm dan 2000 ppm. Kontrol pelarut berupa DMSO 10% tidak dilakukan pada penelitian ini dikarenakan DMSO dengan konsentrasi 10% tidak menyebabkan adanya perubahan aktivitas enzimatis berdasarkan studi oleh Ferreira *et al.* (2021) yang menyatakan $\text{DMSO} \leq 20\%$ tidak meningkatkan efisiensi katalitik dan afinitas pengikatan peptida 3CLpro, sehingga digunakan sebagai konsentrasi minimum untuk melarutkan inhibitor 3CLpro. Hasil pengujian penghambatan aktivitas 3CLpro oleh ekstrak metanol daun sirsak tersaji pada **Tabel I**.

Tabel I. Hasil pengujian penghambatan enzim 3CLpro

	Rata-rata % penghambatan \pm SD
Kontrol negatif	0
Kontrol positif 250 μ g/mL	75 \pm 0,84
Sirsak 1000 μ g/mL	19,23 \pm 0,33
Sirsak 2000 μ g/mL	48,08 \pm 0,67

Pada penelitian ini, kontrol positif menunjukkan aktivitas penghambatan yang rendah, yaitu 75%. Aktivitas penghambatan kontrol positif yang didapatkan berbeda dengan yang tertera dalam brosur kits, yaitu 100%. Penurunan aktivitas penghambatan kontrol positif mungkin disebabkan oleh perubahan stabilitas kits selama proses pengiriman (Hariono *et al.*, 2021). Pemilihan konsentrasi sampel pada pengujian ini didasarkan pada penelitian terdahulu yang dilakukan oleh *Drug Discovery Student Club*. Berdasarkan pengujian, sampel ekstrak daun sirsak dengan konsentrasi 1000 μ g/mL menunjukkan aktivitas penghambatan sebesar 19,23%, sedangkan sampel dengan konsentrasi 2000 μ g/mL menunjukkan adanya peningkatan aktivitas penghambatan sebesar 48,08%. Data tersebut menunjukkan bahwa aktivitas penghambatan ekstrak daun sirsak lebih rendah dibandingkan dengan kontrol positif (GC376). Hasil pengujian ini didukung dari hasil *molecular docking* yang dilakukan oleh Hariono *et al.* (2021), dimana nilai energi bebas ikatan kontrol positif (GC376) dengan 3CLpro adalah -9,41 kkal/mol, sedangkan nilai energi bebas ikatan ekstrak daun sirsak adalah -7,9 kkal/mol. Nilai energi bebas ikatan ekstrak tersebut jauh lebih besar dibandingkan dengan GC376 dan menandakan bahwa afinitas anonain yang diduga sebagai senyawa aktif untuk berikatan dengan sisi aktif 3CLpro jauh lebih rendah bila dibandingkan dengan GC376.. Senyawa anonain bukan merupakan senyawa peptida, seperti kontrol positif (GC376) yang secara kompetitif mampu menghambat substrat peptida untuk berikatan dengan sisi aktif enzim 3CLpro, sehingga aktivitas penghambatan ekstrak terhadap enzim 3CLpro lebih rendah (Hariono *et al.*, 2021). Kontrol positif (GC376) membentuk ikatan kovalen dengan residu Cys-145 pada sisi aktif enzim 3CLpro (Fu *et al.*, 2020).

Senyawa GC376 membentuk interaksi hydrogen dengan residu Gly-143, Ser-144, dan Glu-166 pada enzim 3CLpro yang menyebabkan terhambatnya proses proteolisis protein seperti tersaji pada **Gambar 7a**. Berdasarkan hasil *molecular docking*, anonain membentuk interaksi hidrogen dengan residu His-164 dan interaksi hidrofobik dengan residu Met-49, His-41 dan Met-165, seperti tersaji pada **Gambar 7b**. Perbedaan interaksi tersebut dapat menjelaskan aktivitas penghambatan enzim 3CLpro secara *in vitro* oleh ekstrak metanol daun sirsak yang rendah.



Gambar 7. Interaksi molekular pada uji *in silico* : (a) GC376 (Hariono *et al.*, 2021) (b) anonain

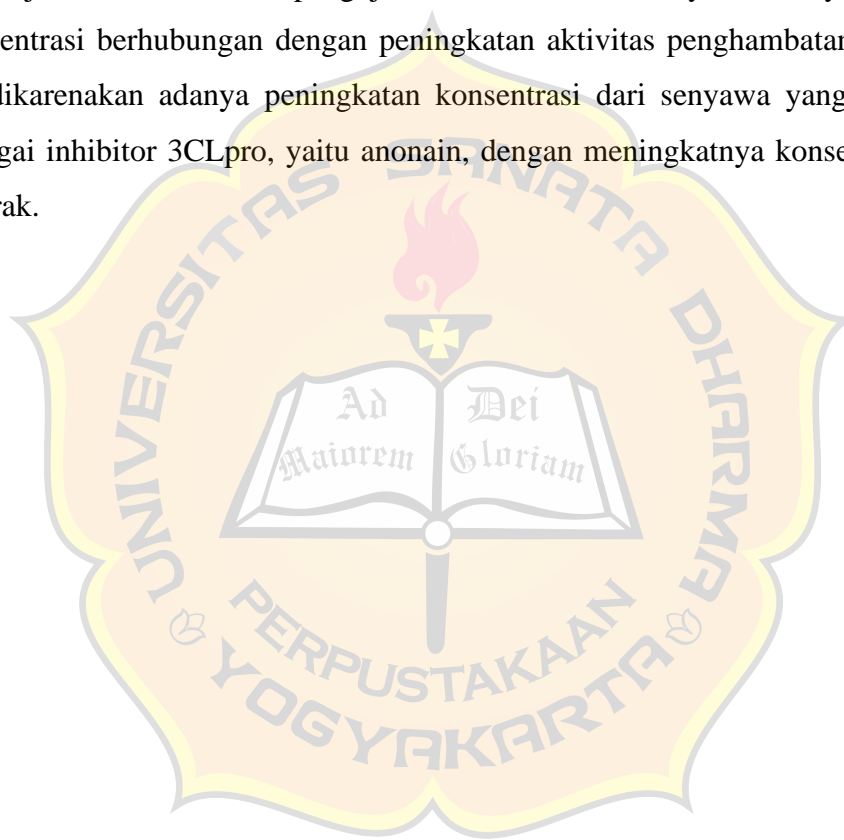
Uji T tidak berpasangan dilakukan untuk melihat signifikansi perbedaan aktivitas penghambatan kontrol positif dan ekstrak metanol daun sirsak pada konsentrasi 1000 µg/mL dan 2000 µg/mL. Uji T dilakukan dengan taraf kepercayaan 95% dan signifikansi perbedaan aktivitas hambatan kontrol positif dengan ekstrak ditunjukkan dengan nilai p-value. Nilai p-value <0,05 menunjukkan bahwa terdapat perbedaan yang signifikan, sedangkan nilai p-value >0,05 menunjukkan bahwa tidak terdapat perbedaan yang signifikan antara kontrol positif dengan ekstrak. Hasil uji T tersaji pada **Tabel II**.

Tabel II. Hasil uji T kontrol positif dan sampel

	P-value	Keterangan
Ekstrak 1000 µg/mL vs kontrol positif	0,00173	Berbeda bermakna
Ekstrak 2000 µg/mL vs kontrol positif	0,03287	

Ekstrak 1000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ vs Ekstrak 2000 $\mu\text{g}/\text{mL}$	0,00897	
---	---------	--

Berdasarkan hasil uji T menunjukkan perbedaan yang signifikan antara aktivitas penghambatan ekstrak daun sirsak dengan konsentrasi 1000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ dan 2000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ dengan kontrol positif. Berdasarkan hasil pengujian, kontrol positif memiliki aktivitas penghambatan terbesar, diikuti ekstrak dengan konsentrasi 2000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ dan 1000 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Perbedaan bermakna antara kedua konsentrasi ekstrak menunjukkan bahwa hasil pengujian sudah sesuai teori, yaitu adanya peningkatan konsentrasi berhubungan dengan peningkatan aktivitas penghambatan ekstrak. Hal ini dikarenakan adanya peningkatan konsentrasi dari senyawa yang diduga aktif sebagai inhibitor 3CLpro, yaitu anonain, dengan meningkatnya konsentrasi sampel ekstrak.



BAB V PENUTUP

A. Kesimpulan

Adapun kesimpulan yang didapatkan dari penelitian tersebut sebagai berikut.

1. Ekstrak metanol daun sirsak mampu menghambat enzim 3CLpro SARS-CoV-2 sebesar 19,23% pada konsentrasi 1000 $\mu\text{g/mL}$ dan 48,08% pada konsentrasi 2000 $\mu\text{g/mL}$.
2. Kromatogram KLT menunjukkan keberadaan senyawa alkaloid yang kemungkinan merupakan anonain dalam ekstrak metanol daun sirsak dengan nilai R_f sebesar 0,325.

B. Saran

Berdasarkan hasil uji aktivitas penghambatan enzim 3CLpro secara *in vitro* oleh ekstrak metanol daun sirsak, dapat dilakukan isolasi senyawa anonain dan melakukan pengujian aktivitas penghambatan terhadap enzim 3CLpro SARS-CoV-2 dalam beberapa konsentrasi.

DAFTAR PUSTAKA

- Abubakar, A.R., Haque, M., 2020. Preparation of Medicinal Plants: Basic Extraction and Fractionation Procedures for Experimental Purposes. *J Pharm Bioallied Sci.* 12(1): 1-10.
- Agu, K.C., Okolie, P.N., 2017. Proximate composition, phytochemical analysis, and in vitro antioxidant potentials of extracts of *Annona muricata* (Soursoup). *Food Sci Nutr.* 5(5): 1029-1036.
- Astuti, I., Ysrafil., 2020. Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2 (SARS-CoV-2): An overview of viral structure and host response. *Diabetes Metab Syndr.* 14: 407-412.
- Azwanida, N.N., 2015. A Review on the Extraction Methods Use in Medicinal Plants, Principle, Strength and Limitation. *J Med Aromat Plants.* 4(3): 1-6.
- Bala, V.C., Kumar, P., 2020. Review on COVID-19: Rise of SARS-CoV-2 Pandemic Outbreak. *Borneo Journal of Pharmacy.* 3(1): 103-120. <https://creativecommons.org/licenses/by-sa/4.0/>.
- Benarba, B., Pandiella, A., 2020. Medicinal Plants as Sources of Active Molecules Against COVID-19. *Front. pharmacol.* 11(1189).
- Bento, E.B., Matias, E.F., Brito Jr, F.E., Oliveira, D.R., Coutinho, H.D., Costa, J.G., Kerntopf, M.R. and Menezes, I.R., 2013. Association Between Food And Drugs: Antimicrobial And Synergistic Activity Of *Annona muricata* L. *Int. J. Food Prop.* 16(4): 738-744.
- Cascella, M., Rajnik, M., Cuomo, A., Dulebohn, S.C., Di Napoli, R., 2021, *Features, Evaluation, and Treatment of Coronavirus (COVID-19)*. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK554776/>, diakses tanggal 17 Februari 2021.
- CDC, 2021. *Interim Clinical Guidance for Management of Patients with Confirmed Coronavirus Disease (COVID-19)*, <https://www.cdc.gov/coronavirus/2019-ncov/hcp/clinical-guidance-management-patients.html>, diakses tanggal 22 Februari 2021.
- Coria-Tellez, A.V., Montalvo-Gonzalez, E., Yahia, E.M. and Obledo-Vázquez, E.N., 2016. *Annona muricata*: A Comprehensive Review On Its Traditional Medicinal Uses, Phytochemicals, Pharmacological Activities, Mechanisms Of Action And Toxicity. *Arab. J. Chem.* 11(5): 1-30.
- Correa-Gordillo, J., Ortiz, J., Sanchez-Mejia, M., and Pachon, H., 2012. Actividad Antioxidante en Guanabana (*Annona muricata* L.) una Revision Bibliografica. *Bol. Latinoam. Caribe Plant. Met. Aromat.* 11: 111-126.
- Department of Chemistry, U. of M.A., 2005. Solvent Physical Properties [WWW Document], [Solvent Physical Properties \(umass.edu\)](http://solvent.physicalproperties.umass.edu), diakses pada 28 Februari 2022.
- Dong, Y., et al., 2020. A systematic review of SARS-CoV-2 vaccine candidates. *Signal Transduct. Target. Ther.* 5 (237).
- Ferreira, L.E., Castro, P.M.N., Chagas, A.C.S., Franca, S.C., and Belebony, R.O., 2013. *In Vitro* Anthelmintic Activity Of Aqueous Leaf Extract Of *Annona muricata* L. (Annonaceae) Against *Haemonchus contortus* From Sheep. *Exp. Parasitol.* 134(3): 327-332.
- Ferreira, J.C., Rabeh, W.M., 2020. Biochemical And Biophysical Characterization Of The Main Protease, 3-Chymotrypsin-Like Protease (3CLpro) From The Novel Coronavirus SARS-CoV 2. *Sci. Rep.* 10: 1-10.
- Ferreira, J.C., Fadl, S., Ilter, M., Pekel, H., Rezgui, R., Sensoy, O., Rabeh, W.M.,

2021. Dimethyl sulfoxide reduces the stability but enhances catalytic activity of the main SARS-CoV-2 protease 3CLpro. *FASEB J.*, 35 (8), e21774.
- Fu, L., Ye, F., Feng, Y., Yu, F., Wang, Q., Wu, Y., Zhao, C., Sun, H., Huang, B., Niu, P., Song, H., Shi, Y., Li, X., Tan, W., Qi, J., Gao, G.F., 2020. Both Boceprevir and GC376 efficaciously inhibit SARS-CoV-2 by targeting its main protease. *Nat. Commun.*, 11 (1).
- Galarce-Bustos, O., Pavón, J., Henríquez-Aedo, K., Aranda, M., 2019. Detection and identification of acetylcholinesterase inhibitors in *Annona cherimola* Mill. by effect-directed analysis using thin-layer chromatography-bioassay-mass spectrometry. *Phytochem. Anal.* 30(6): 679-686.
- Hamizah, S., Roslida, A.H., Fezah, O., Tan, K.L., Tor, Y.S., Tan, C.I., 2012. Chemopreventive Potential Of *Annona Muricata* L Leaves On Chemically-Induced Skin Papillomagenesis In Mice. *Asian Pac J Cancer Prev.* 13(6): 2533-2539.
- Hardoko, Y.H., Wijoyo, S., Halim, Y., 2015. In Vitro Antidiabetic Activity Of "Green Tea" Soursop Leaves Brew Through A-Glucosidase Inhibition. *Int. J. Pharmtech Res.* 8(1): 30-37.
- Hariono, M., Hariyono, P., Dwiastuti, R., Setyani, W., Yusuf, M., Salin, N., Wahab, H., 2021. Potential SARS-CoV-2 3CLpro inhibitors from chromene, flavonoid and hydroxamic acid compound based on FRET assay, docking and pharmacophore studies. *Result in Chemistry*, 3, 100195.
- Hartini, Y., Saputra, B., Wahono, B., Auw, Z., Indayani, F., Adelya, L., Namba, G., Hariono, M., 2021. Biflavonoid As Potential 3-Chymotrypsin-like Protease (3CLpro) Inhibitor Of SARS-Coronavirus. *Results in Chemistry*. 3: 1-14.
- International Centre for Science and High Technology, 2008. Extraction Technologies for Medicinal and Aromatic Plants. United Nations Industrial Development Organization and the International Centre for Science and High Technology, 103, 106.
- Integrated Taxonomic Information System, 2021, *Annona muricata* L. https://www.itis.gov/servlet/SingleRpt/SingleRpt?search_topic=TSN&search_value=18098#null, diakses tanggal 23 Maret 2021.
- Kumar, Y., Singh, H., Patel, C.N., In Silico Prediction Of Potential Inhibitors For The Main Protease Of SARS-Cov-2 Using Molecular Docking And Dynamics Simulation Based Drug-Repurposing. *J. Infect. Public Health.* 13(9): 1210-1223.
- Li, M., Ye, G., Si, Y., Shen, Z., Liu, Z., Shi, Y., Xiao, S., Fu, Z.F., Peng, G., 2021. Structure Of The Multiple Functional Domains From Coronavirus Nonstructural Protein 3. *Emerg. microbes & infect.* 10: 65-80.
- Moghadamtousi, S.Z., Rouhollahi, E., Karimian, H., Fadaeinasab, M., Abdulla, M.A., Kadir, H.A., 2014. Gastroprotective Activity Of *Annona muricata* Leaves Against Ethanol-Induced Gastric Injury In Rats Via Hsp70/Bax Involvement. *Drug Des. Dev. Ther.* 8: 2099-2111.
- Moghadamtousi, S.Z., Fadaeinasab, M., Nikzad, S., Mohan, G., Ali, H.M., Kadir, H.A., 2015. *Annona muricata* (Annonaceae): A Review of Its Traditional Uses, Isolated Acetogenins and Biological Activities. *Int. J. Mol. Sci.* 16: 15625-15658.
- Nicolotti, O., Catto, M., Giangreco, I., Barletta, M., Leonetti, F., Stefanachi, A., *et al.*, 2012. Design, synthesis and biological evaluation of 5-hydroxy, 5-

- substituted pyrimidine-2,4,6-triones as potent inhibitors of gelatinases MMP-2 and MMP-9. *Eur. J. Med. Chem.*, 58, 368-376.
- Nwokocha, C.R., Owu, D.U., Gordon, A., Thaxter, K., McCalla, G., Ozolua, R.I., Young, L., 2012. Possible Mechanisms Of Action Of The Hypotensive Effect Of *Annona muricata* (Soursop) In Normotensive Sprague–Dawley Rats. *Pharm. Biol.* 50(11): 1436-1441.
- Prasad, S.K., Pradeep, S., Shimavallu, C., Kollur, S.P., Syed, A., Marraiki, N., Egbuna, C., Gaman, M.A., Kosakowska, O., Cho, W.C., Patrick-Iwuanyanwu, K.C., 2021. Evaluation of *Annona muricata* Acetogenins as Potential Anti- SARS-CoV-2 Agents Through Computational Approaches. *Front. Chem.* 8(624716).
- Qamar, M.T., Alqahtani, S.M., Alamri, M.A., Chen, L.L., 2020. Structural Basis of SARS-CoV-2 3CL^{pro} and Anti-COVID-19 Drug Discovery from Medicinal Plants. *J. Pharm. Anal.* 10 (2020): 313-319.
- Roe, M.K., Junod, N.A., Young, A.R., Beachboard, D.C., Stobart, C.C., 2021. Targeting novel structural and functional features of coronavirus protease nsp5 (3CL^{pro}, M^{pro}) in the age of COVID-19. *J. Gen. Virol.* 102(3): 1-16.
- Rogers, M.S., Cryan, L.M., Habeshian, K.A., Bazinet, L., Caldwell, T.P., Ackroyd, P.C., Christensen, K.A., 2012. A FRET-Based High Throughput Screening Assay to Identify Inhibitors of Anthrax Protective Antigen Binding to Capillary Morphogenesis Gene 2 Protein. *Plos One.* 7(6): 1-10.
- Santiago, M., Strobel, S., 2013. Methods in Enzymology, volume 533. Elsevier Inc., New Haven, pp. 304-305.
- Saxena, S.K., 2020. Coronavirus Disease 2019 (COVID-19) Epidemiology, Pathogenesis, Diagnosis, and Therapeutics. Springer, Singapore, pp. 23-31.
- Solnier, J., Fladerer J.P., 2020. Flavonoids: A Complementary Approach To Conventional Therapy Of COVID-19?. *Phytochemistry Review.* 1-23.
- Suarez, D., Diaz, N., 2020. SARS-CoV-2 Main Protease: A Molecular Dynamics Study. *J. Chem. Inf. Model.* 60: 5815-5831.
- Susilo, A., Rumende, C.M., Pitoyo, C.W., Santoso, W.D., Yulianti, M., Herikurniawan, H., Sinto, R., Singh, G., Nainggolan, L., Nelwan, E.J., Chen, L.K., 2020. Coronavirus Disease 2019: Tinjauan Literatur Terkini. *Jurnal Penyakit Dalam Indonesia.* 7(1): 45-67.
- Usha, K., Sherly, D., Dhanalekshmi, U., 2019. A Review on the Pharmacological Activities of *Annona muricata* Linn. *IJRPS 2019.* 9(2) : 1-14.
- Wang, M.Y., Zhao, R., Gao, L.J., Gao, X.F., Wang, D.P., Cao, J.M., 2020. SARS-CoV-2: Structure, Biology, and Structure-Based Therapeutics Development. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* 10: 1-17.
- Warisno, Dahana, K., 2012. Daun Sirsak Langkah Alternatif Menggempur Penyakit. PT Gramedia Pustaka Utama, Jakarta, pp. 21-23.
- WHO, 2022, *WHO Coronavirus (COVID-19) Dashboard*, <https://covid19.who.int/>, diakses tanggal 3 Maret 2022.
- WHO, 2022, *Indonesia*, <https://covid19.who.int/region/searo/country/id>, diakses tanggal 3 Maret 2022.
- Xu, J., Zhao, S., Teng, T., Abdalla, A.E., Zhu, W., Xie, L., Wang, Y., Guo, X., 2020. Systematic Comparison Of Two Animal-To-Human Transmitted Human Coronaviruses: SARS-CoV-2 and SARS CoV. *Viruses.* 12(2):244.
- Zheng, J., 2020. SARS-CoV-2: an Emerging Coronavirus that Causes a Global Threat. *Int. J. Biol. Sci.* 16: 1678-1685.

LAMPIRAN

Lampiran 1. Surat pengesahan determinasi tanaman dari 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: 641 /LKTO/Far-USD/XII/2021

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

Oleh : Zerlinda Clara Auw (NIM: 188114061)

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, 2 Desember 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. Volume bahan pengujian *in vitro*

Komponen	Blanko	Kontrol Positif	Kontrol Negatif	Sampel 1000 ppm	Sampel 2000 ppm
Enzim 3CL Protease	-	30 μ L	30 μ L	30 μ L	30 μ L
Assay Buffer	30 μ L	-	-	-	-
GC376	-	10 μ L	-	-	-
Air untuk injeksi	10 μ L	-	10 μ L	9,5 μ L	9 μ L
Ekstrak metanol daun sirsak	-	-	-	0,5 μ L	1 μ L
Inkubasi 30 menit					
Substrat	10 μ L	10 μ L	10 μ L	10 μ L	10 μ L
Total	50 μ L	50 μ L	50 μ L	50 μ L	50 μ L
Inkubasi 24 jam					



BIOGRAFI PENULIS



Penulis skripsi berjudul “Uji Hambatan Ekstrak Metanol Daun Sirsak (*Annona Muricata* L.) Terhadap 3CLpro SARS-CoV-2” bernama Zerlinda Clara Auw, lahir di Sorong, 06 Agustus 2001. Penulis merupakan anak ketiga dari tiga bersaudara dari pasangan Hendrik Auw dan Anna Yohana Maria. Penulis menempuh pendidikannya di TK St. Theresia Sorong (2005-2006), SD YPPK Kristus Raja I Sorong (2006-2012), SMP YPPK St. Don Bosco Sorong (2012-2015), dan SMA YPPK St. Agustinus Sorong (2015-2018). Pada tahun 2018, penulis melanjutkan Pendidikan Strata-1 di Fakultas Farmasi Universitas Sanata Dharma Yogyakarta. Selama masa perkuliahan, penulis terlibat aktif dalam organisasi kemahasiswaan, kegiatan kepanitiaan, dan asisten praktikum. Penulis menjabat sebagai anggota *Cosmetic Student Club* periode 2018/2019, *Herbal Garden Team* periode 2018/2019, dan *Drug Discovery Student Club* periode 2018-2021. Penulis juga terlibat dalam Kepanitiaan *Student Exchange Programme* sebagai anggota divisi acara dan pernah menjadi asisten praktikum Kimia Dasar (2019), serta pembicara dalam Acara *Student Exchange Programme* tahun 2021. Penulis juga pernah mengikuti Program Penelitian Produk Inovatif Kampus Merdeka pada tahun 2021 dan turut serta dalam publikasi jurnal dengan judul “*Biflavonoid as potential 3-chymotrypsin-like protease (3CLpro) inhibitor of SARS-Coronavirus*” di Elsevier dan “*The Future of Carica papaya Leaf Extract as an Herbal Medicine Product*” di MDPI.