

UJI EFEKTIVITAS ANTIVIRUS EKSTRAK KULIT BIJI KAKAO (*Theobroma cacao* L.) TERHADAP REPLIKASI VIRUS *DENGUE* SEROTIPE 2 NEW GUINEA C

Elisvia Rahmania¹, Amanah², Hikmah Fitriani²

¹Mahasiswa Fakultas Kedokteran Universitas Swadaya Gunung Jati

²Dosen Fakultas Kedokteran Universitas Swadaya Gunung Jati

Email : elisviarahmania@gmail.com

ABSTRAK

Latar Belakang Virus *Dengue* serotipe 2 (DENV-2) merupakan serotipe paling banyak ditemukan sebanyak 80% dengan kasus infeksi sekunder yang dapat menyebabkan keparahan yang fatal seperti Demam Berdarah *Dengue* (DBD), dan Sindrom Syok *Dengue* (SSD). Kasus infeksi *Dengue* di beberapa wilayah Indonesia meningkat sejak Januari 2020, dan ditengah pandemi COVID-19. Terapi hanya terdiri dari perawatan suportif, dan diperlukan perawatan khusus antivirus. Beberapa penelitian mengatakan bahwa kandungan zat kakao memiliki peran sebagai antivirus. Sehingga perlu penanggulangan virus *Dengue* dengan alternatif antivirus seperti kakao. **Tujuan** Membuktikan efektivitas ekstrak biji kakao terhadap penghambatan replikasi virus *Dengue* Serotipe 2 New Guinea C. **Metode** Penelitian ini merupakan penelitian eksperimental dengan desain *post-test only control group design*. Penelitian ini menggunakan 6 kelompok, 2 kelompok kontrol dan 4 kelompok perlakuan. Kelompok perlakuan terdiri dari pemberian ekstrak dari kulit biji kakao (*Theobroma cacao* L.) dengan konsentrasi bertingkat 10 µg/ml, 20 µg/ml, 40 µg/ml, 80 µg/ml, kelompok kontrol yaitu kelompok kontrol negatif pemberian *Dimethyl sulfoxide* (DMSO) 0,1%, sedangkan kontrol positif pemberian *Cylophosphorin A* (CsA). Data diuji menggunakan uji *Kruskal Wallis* dengan uji *Mann-Whitney*. **Hasil** Konsentrasi 10 µg/ml memiliki efektivitas daya hambat paling tinggi sebesar 54%, dan pada uji *Kruskal Wallis* terdapat nilai $P=0,007$ dan pada uji *post hoc* didapatkan perbedaan daya hambat pada masing-masing konsentrasi. **Kesimpulan** Ekstrak kulit biji kakao (*Theobroma cacao* L.) memiliki daya hambat terhadap virus *dengue*. **Kata Kunci** *Theobroma cacao* L., virus *dengue*, ekstrak kulit biji kakao

ABSTRACT

Background *Dengue virus serotype 2* (DENV-2) is the most prevalent serotype of *Dengue virus* up to 80% with secondary infection cases can cause severity like *Dengue Hemorrhagic Fever* (DHF), and *Dengue Shock Syndrome* (SSD). *Dengue infection cases* in several parts of Indonesia had increased since January 2022, and in the COVID-19 pandemic. Therapy only of supportive care, and special antiviral treatment is required. Some studies said cocoa substances contains as an antiviral. So it is necessary to overcome the *Dengue virus* alternative antivirus such as cocoa. **Aim** To tested the effectiveness of cocoa seed skin extract against the replication inhibition of *Dengue Virus Serotype 2 New Guinea C*. **Methods** This study is an experimental with a *post-test only control group design* research design. This study uses 6 groups, namely 2 control groups and 4 treatment groups. The treatment group consisted of extracting cocoa seed skin (*Theobroma cacao* L.) with a concentration of 10 µg /ml, 20 µg /ml, 40 µg /ml, and 80 µg /ml. The control group was a negative control is giving *Dimethyl sulfoxide* (DMSO) 0.1%, while positive control is giving *Cylophosphorin A* (CyA). Data were tested using the *Kruskal Wallis Post hoc Mann-Whitney*. **Result** Concentration of 10 µg /ml has the highest inhibition effectiveness of 54%, *Kruskal Wallis* test there were $P\text{-value} = 0,007$, and the *Post Hoc* test there were difference between concentrations. **Conclusion** Cocoa seed skin extract (*Theobroma cacao* L.) has inhibitory power against *dengue virus*.

Keywords *Theobroma cacao L., dengue virus, cocoa seed skin extract*

PENDAHULUAN

Hasil serotipe menunjukkan bahwa DENV-2 merupakan serotipe virus yang paling banyak ditemukan yaitu 80%, diikuti infeksi ganda DENV-2 dan DENV-3 (15%) serta DENV-3 (5%).⁽⁴⁾ Pada penelitian sebelumnya serotipe DENV-2 merupakan kasus dengan infeksi sekunder yang dapat menyebabkan tingkat keparahan yang fatal seperti demam berdarah dan syok sindrom *Dengue*, serta menimbulkan manifestasi yang berat.⁽⁵⁾ Manifestasi klinis infeksi DENV berkisar dari infeksi asimtomatik ataupun sindrom seperti flu ringan, juga dikenal sebagai Demam *Dengue* (DD), hingga bentuk yang lebih parah dan mengancam jiwa, yaitu Demam Berdarah *Dengue* (DBD) dan Sindrom Syok *Dengue* (SSD).⁽⁵⁾⁽⁶⁾

Pada tahun 2017, terdapat 59.047 kasus DBD dan 444 kematian akibat DBD di Indonesia dengan masing-masing 22,55 per100.000 orang-tahun dan masing-masing 0,75% dari IR dan CFR (*Case Fatality Rate*).⁽⁷⁾ Dirjen P2P (Pencegahan dan Pengendalian Penyakit) memlalui surat edaran nomor HK.02.02/IV/2360/2020 menyampaikan bahwa ada peningkatan kasus infeksi *Dengue* di beberapa wilayah indonesia sejak Januari 2020 dan di tengah pandemi COVID-19.⁽⁸⁾

Saat ini belum ada perawatan anti-virus khusus dan terapi hanya terdiri dari perawatan suportif. Selama tiga dekade terakhir, beberapa upaya untuk mengembangkan vaksin yang efektif telah dilakukan,⁽⁹⁾ faktor pencegahan lainnya yaitu hanya dengan pemberantasan vektor, penyuluhan, dan lain-lain.

Pada sebuah penelitian diketahui kulit biji kakao memiliki kandungan kimia flavonoid, alkaloid, tanin, saponin, serta triterpenoid.⁽¹⁵⁾ Tanin dan flavonoid

(kompleks lignin-karbohidrat) telah diketahui memiliki efek antivirus terutama terhadap HIV dan Virus Influenza.⁽¹⁶⁾ Selain efek antivirus, ekstrak kulit biji kakao memiliki efek antibakteri dalam menghambat pertumbuhan bakteri *Streptococcus mutans* serta efek antioksidan alami.⁽¹⁷⁾⁽¹⁸⁾

METODE

Penelitian ini adalah penelitian eksperimental murni (*true experiment design*) dengan rancangan penelitian *post-test only control group design* dan teknik simple random sampling. Objek yang digunakan pada penelitian ini adalah virus *dengue* dan dilakukan secara *in vitro*.

Penelitian ini menggunakan 6 kelompok, yaitu 2 kelompok kontrol dan 4 kelompok perlakuan dengan tujuan untuk mengetahui efektivitas daya hambat dari ekstrak kulit biji kakao (*Theobroma cacao L.*) terhadap kelompok tersebut. Virus *dengue* yang digunakan sebagai sampel penelitian ini adalah virus *dengue* serotipe 2 *strain New Guinea C* (DENV-2 NGC) yang diinfeksi ke dalam *Vero Cell Line*.

Kriteria inklusi pada penelitian ini adalah sel vero yang terinfeksi virus *dengue* dengan jumlah 2×10^5 *cell/well* atau persumur, dan virus *dengue* dengan *multiplicity of infection* (MOI) 0,1%. Kriteria eksklusi dalam penelitian ini adalah medium pertumbuhan virus yang dilakukan studi *in vitro* terkontaminan.

Dalam penelitian ini, pembuatan ekstraksi dilakukan dengan metode maserasi, serta penelitian terhadap virus dengan melakukan tahap uji ekstrak terhadap virus kemudian dilanjutkan dengan uji daya hambat, hasil uji daya hambat dapat ditandai dengan adanya *focus* cokelat yang dilihat

menggunakan mikroskop cahaya. Analisis statistik dilakukan dengan menggunakan uji *kruskal wallis* dan dilanjutkan dengan uji *mann-whitney*.

HASIL

Hasil penelitian ini didapatkan dengan mencari daya hambat (**Tabel 1**), dan tes toksisitas terhadap sel vero (**Tabel 2**). Menentukan daya hambat dapat dilakukan dengan menggunakan metode *Focu Forming Unit Assay*, dan untuk menentukan toksisitas sel vero dapat dilakukan dengan metode MTT Assay.

Berdasarkan penelitian yang dilakukan didapatkan hasil presentase daya hambat replikasi virus dengue pada (**Tabel 1**),

Berdasarkan **Tabel 1**, diketahui bahwa ekstrak *Theobroma cacao* L. Pada setiap konsentrasinya memiliki persentase hambatan >50%. Konsentrasi 10 µg/ml memiliki efektivitas daya hambat sebesar 54%, konsentrasi 20 µg/ml memiliki persentase

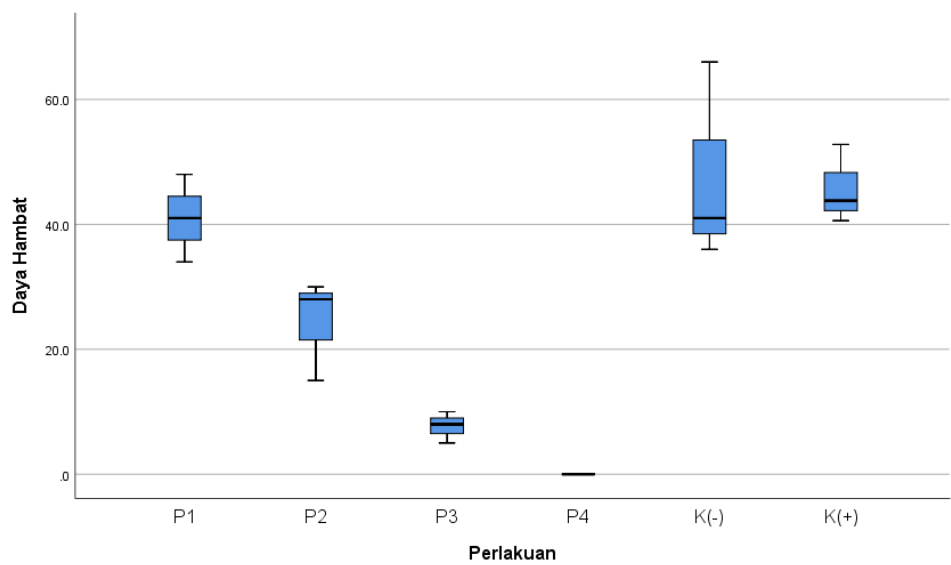
daya hambat sebesar 72%, sedangkan konsentrasi 40 µg/ml memiliki persentase daya hambat sebesar 90%, dan pada konsentrasi 80 µg/ml persentase daya hambat sebesar 100%. Konsentrasi yang memiliki efektivitas daya hambat tertinggi dalam menghambat replikasi virus DENV-2 pada **Tabel 1** adalah konsentrasi 10 µg/ml, sama seperti pada **Gambar 1** dimana tampak daya hambat pada P1 (10 µg/ml) lebih tinggi dibandingkan dengan perlakuan konsentrasi yang lain. Hal ini menjelaskan bahwa hanya dengan konsentrasi 10 µg/ml dapat menghambat replikasi virus dengan persentase daya hambat sebesar 54% dan rata-rata infektivitas sebesar 46,1%.

Penentuan toksisitas ekstrak *Theobroma cacao* L. dapat dinilai melalui persentase viabilitas sel dengan metode MTT Assay. Hasil uji toksisitas pada setiap konsentrasi ekstrak *Theobroma cacao* L terhadap sel vero dapat dilihat pada **Tabel 2**, :

Tabel 1. Presentase daya hambat replikasi virus *dengue*

Perlakuan (µg/ml)	Rata-Rata Infektivitas (%)	Persentase Hambatan (%)
P1 (10)	46,1	54
P2 (20)	28,0	72
P3 (40)	10,5	90
P4 (80)	0,0	100
K(-) DMSO	99,9	0
K(+) CsA	45,4	55

***Prosedur Focus forming unit Assay**



Gambar 1. Nilai presentase daya hambat dari setiap perlakuan

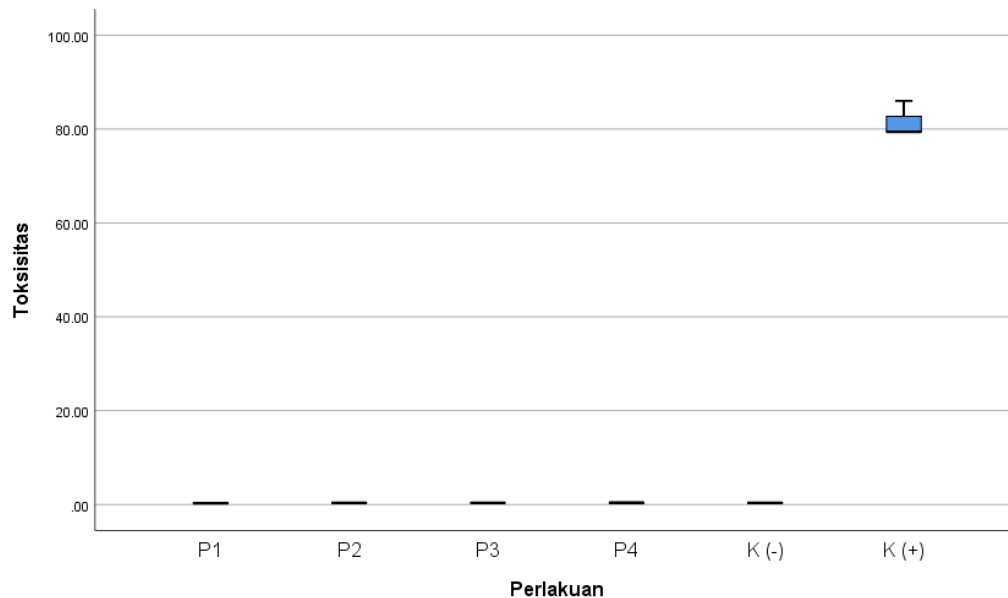
Keterangan:

- K(-) : DMSO 0,1% (kontrol negatif)
K(+) : CsA 200 µl (kontrol positif)
P1 : Ekstrak kulit biji kakao (*Theobroma cacao* L.) dengan konsentrasi 10 µg/ml
P2 : Ekstrak kulit biji kakao (*Theobroma cacao* L.) dengan konsentrasi 20 µg/ml
P3 : Ekstrak kulit biji kakao (*Theobroma cacao* L.) dengan konsentrasi 40 µg/ml
P4 : Ekstrak kulit biji kakao (*Theobroma cacao* L.) dengan konsentrasi 80 µg/ml

Tabel 2. Persentase viabilitas sel

Perlakuan (µg/ml)	Rata-Rata Viabilitas (%)
P1 (10)	100
P2 (20)	91,9
P3 (40)	100
P4 (80)	79,4
K(-) DMSO	100
K(+) CsA	100

*Prosedur MTT Assay



Gambar 2. Nilai toksisitas yang diamati dari setiap perlakuan

Berdasarkan **Tabel 2** didapatkan hasil toksisitas ekstrak *Theobroma cacao* L. dari konsentrasi terendah sampai tertinggi tidak memiliki toksisitas terhadap sel vero, dengan hasil rata-rata viabilitas sebesar $>50\%$, sama seperti pada **Gambar 2** yaitu menjelaskan bahwa nilai dari hasil toksisitas pada setiap konsentrasinya sama dan tidak bersifat toksik. Semakin tinggi persentase viabilitas sel, maka semakin rendah toksisitas terhadap sel vero.

Persentase infektivitas dan viabilitas diatas, didapatkan bahwa konsentrasi ekstrak kulit biji kakao $10\ \mu\text{g/ml}$ memiliki daya hambat yang efektif terhadap replikasi DENV-2, yaitu dengan nilai persentase hambatan sebesar 54% dan rata-rata infektivitasnya sebesar $\leq 20\%$. Semua konsentrasi bersifat tidak iritan terhadap sel vero, diketahui bahwa rata-rata viabilitas sel vero yang dipaparkan oleh konsentrasi penelitian ini sebesar $>60\%$. Sehingga hal ini menunjukkan bahwa ekstrak kulit biji kakao (*Theobroma cacao* L.) pada

konsentrasi $10\ \mu\text{g/ml}$, $20\ \mu\text{g/ml}$, $40\ \mu\text{g/ml}$, dan $80\ \mu\text{g/ml}$ tergolong efektif sebagai antivirus *dengue* secara in vitro.⁽¹⁹⁾

Uji normalitas digunakan untuk menguji apakah data berdistribusi normal atau tidak. Uji normalitas menggunakan uji Shapiro-Wilk karena data yang digunakan kurang dari 50. Pada hasil uji normalitas Shapiro-Wilk didapatkan hasil signifikansi kelompok P1 ($10\ \mu\text{g/ml}$), P2 ($20\ \mu\text{g/ml}$), P3 ($40\ \mu\text{g/ml}$), K(-), dan K(+) yaitu menunjukkan nilai ($p > 0,05$) yang artinya data berdistribusi normal, namun pada kelompok P4 ($80\ \mu\text{g/ml}$) mendapatkan hasil signifikansi $< 0,05$, sehingga data berdistribusi tidak normal. Maka disimpulkan bahwa data uji normalitas berdistribusi tidak normal.

Uji homogenitas levene diperoleh nilai signifikansi sebesar $0,007$. Berdasarkan hasil dari uji homogenitas ini disimpulkan bahwa data tidak homogen ($p < 0,05$), sehingga dilanjutkan dengan analisis Kruskal-Wallis.

Tabel 3. Analisis efektifitas ekstrak kulit biji kakao (*Theobroma cacao* L.) terhadap virus *dengue*

Variabel Kelompok Konsentrasi	P1	P2	P3	P4	K (-)	K (+)
P1 (10)		0,050	0,050	0,037	0,658	0,050
P2 (20)	0,050		0,050	0,037	0,050	0,513
P3 (40)	0,050	0,050		0,037	0,050	0,050
P4 (80)	0,037	0,037	0,037		0,037	0,037
K (-)	0,658	0,050	0,050	0,037		0,050
K (+)	0,050	0,513	0,050	0,037	0,050	

* Uji *Post Hoc Mann-Whitney*

Hasil uji Kruskal-Wallis menunjukkan nilai signifikansi sebesar 0,007 ($p < 0,05$), sehingga dapat disimpulkan bahwa terdapat perbedaan pengaruh efektivitas daya hambat anantara pemberian ekstrak *Theobroma cacao* L. konsentrasi 10 µg/ml, 20 µg/ml, 40 µg/ml, 80 µg/ml, K(-), dan K(+). Selanjutnya untuk mengetahui signifikansi perbedaan pada setiap konsentrasinya dilakukan uji post hoc mann-whitney, dengan didapatkan hasil pada **Tabel 3**

Berdasarkan **Tabel 3**, terdapat perbedaan pada hasil signifikansinya, kelompok perlakuan dengan pemberian ekstrak *Theobroma cacao* L. memiliki nilai $P = 0,050$, dan $P = 0,037$ pada setiap konsentrasi 10 µg/ml, 20 µg/ml, 40 µg/ml, dan 80 µg/ml, yang artinya terdapat perbedaan yang signifikan pada daya hambat antar kelompok, namun pada perbandingan antara P1 (10 µg/ml) dan K (-) memiliki nilai $P = 0,658$, dan pada P2 (20 µg/ml) dengan K (+) memiliki nilai $P = 0,512$, sehingga disimpulkan bahwa tidak terdapat perbedaan yang signifikan pada daya hambat antar kelompok P1 (10 µg/ml) dengan K (-), dan P2 (20 µg/ml) dengan K (+).

PEMBAHASAN

Penelitian ini menguji efektivitas antivirus ekstrak kulit biji kakao (*Theobroma cacao* L.) terhadap penghambatan virus *dengue* serotipe 2 new guinea c, dengan kontrol positif yaitu Cyclophosphorin A, dan kontrol negatif yaitu Dms0 0,1%. Uji daya hambat ekstrak *Theobroma cacao* L. dinilai dengan melihat efektivitasnya pada persentase infektivitas atau daya hambat replikasi virus *dengue*, sedangkan daya toksik ekstrak terhadap sel vero dilihat melalui persentase viabilitas pada ekstrak kakao.

Uji daya hambat ekstrak *Theobroma cacao* L. dilakukan dengan menggunakan metode *Focus forming unit Assay*, yang dimana merupakan metode dengan tujuan untuk melihat dan menghitung jumlah virus *dengue* yang menginfeksi sel vero. Persentase infektivitas adalah jumlah virus *dengue* dalam satuan persen yang menginfeksi sel vero dengan kriteria yang harus dipenuhi yaitu rata-rata infektivitas $\leq 20\%$.⁽²⁰⁾ Berdasarkan hasil uji hambat ekstrak terhadap DENV-2 pada **Tabel 1** menunjukkan bahwa konsentrasi 10 µg/ml ekstrak *Theobroma cacao* L.

memiliki efektivitas yang cukup tinggi dalam menghambat DENV-2 yaitu sebesar 54%. Penelitian terkait antivirus dari ekstrak kulit biji kakao terhadap replikasi virus *dengue* serotipe 2 new guinea C saat ini masih sangat terbatas, namun terdapat beberapa penelitian terkait daya hambat kakao (*Theobroma cacao* L.) terhadap virus lain seperti pada penelitian Osvaldo Yanez et al, mengenai efek kakao (*Theobroma cacao* L.) terhadap virus SarsCov-2. Osvaldo Yanez et al, dalam penelitiannya menjelaskan bahwa kakao (*Theobroma cacao* L.) memiliki efek signifikan dalam menghambat virus SarsCov-2, hal ini disebabkan karena kandungan *Isorhoifolin* dan *Rutin* flavanoid pada kakao dapat menghambatan secara kuat terhadap SARS-CoV-2.⁽²¹⁾⁽²²⁾

Ekstrak *Theobroma cacao* L. memiliki kandungan flavanoid paling besar, dimana senyawa dominan yang terdapat pada turunan flavanoid pada kakao yaitu *Quarccetin*, *Epicatechin*, dan *Catechin*. Kandungan tersebut dapat menghambat infeksi virus *Dengue* dengan menghambat NS3 helicase, dan menghambat endositosis, transkripsi genom, dan sintesis pada virus.⁽²³⁾ Selain kandungan yang dijelaskan diatas, terdapat turunan flavanoid lain yaitu *Baicalein*, yaitu memiliki afinitas pengikatan yang kuat dengan protein DENV NS3/NS2B. Kandungan selain flavanoid, yang terdapat pada kulit biji kakao adalah, kandungan alkaloid. Alkaloid pada kakao dapat sebagai antivirus alami terhadap beberapa virus, diantaranya virus Hepatitis, menghambat transkriptase virus pada HIV.⁽²²⁾⁽²⁴⁾⁽²⁵⁾

Uji toksisitas ekstrak terhadap sel vero dilakukan dengan metode MTT Assay. Metode MTT Assay dilakukan untuk melihat viabilitas sel dengan mengukur kemampuan

sel yang hidup berdasarkan efektivitas mitokondria dari kultur sel. Presentasi viabilitas sel diperoleh dari perhitungan dengan rumus seperti yang tercantum pada metode penelitian. Persentase viabilitas adalah jumlah sel sehat dan tidak toksik dalam satuan persen dengan kriteria yang harus dipenuhi yaitu viabilitas >50%.⁽²⁶⁾

Berdasarkan penelitian toksisitas, yang tertera pada **Tabel 2** dan gambar grafik rata-rata viabilitas sel menunjukkan bahwa seluruh konsentrasi ekstrak *Theobroma cacao* L. 10 µg/ml, 20 µg/ml, 40 µg/ml, dan 80 µg/ml tidak toksik terhadap sel vero. Karena rata-rata viabilitas sudah dari sel yang terpapar masing-masing konsentrasi >50%. Penelitian sebelumnya oleh Mokra D, et al, menunjukkan kandungan berupa *Methylxanthines* dan *Polifenol* memiliki efek sebagai anti-inflamasi, anti-kanker, antidiabetik, dan efek antioksidan.⁽²⁷⁾ Turunan *Polifenol* pada kakao adalah tanin, dimana memiliki efek mencegah radikal bebas. Berdasarkan penelitian Fitriani F, dkk, menunjukkan bahwa kandungan triterpenoid memiliki senyawa yang dapat berinteraksi dengan protein membran dan biomembran sehingga dapat menyebabkan ketidakstabilan ion dan metabolit dalam sel.⁽²⁶⁾ Penelitian pada saponin yang dilakukan oleh Yang H, et al, menunjukkan bahwa saponin dapat digunakan sebagai regimen terapi imunienhancement yaitu memiliki efek terhadap imunomodulator dan terkait sindrom yang disebabkan oleh infeksi virus.⁽²⁸⁾

SIMPULAN

Ekstrak kulit biji kakao (*Theobroma cacao* L.) dengan konsentrasi 10 µg/ml, 20 µg/ml, 40 µg/ml, dan 80 µg/ml masing-masing memiliki efektivitas daya hambat replikasi virus yang berbeda-beda, dengan persentase hambatan sebesar 54%, 72%, 90%, dan 100%.

Serta memiliki perbedaan yang signifikan dalam menghambat replikasi virus dengan nilai $P=0,007$ ($P\leq 0,05$).

Ekstrak kulit biji kakao (*Theobroma cacao* L.) yang memiliki daya hambat yang

paling tinggi adalah konsentrasi 10 $\mu\text{g/ml}$ dengan persentase hambatan sebesar 54% dan rata-rata infektivitasnya $\leq 20\%$.

DAFTAR PUSTAKA

1. Jing Q, Wang M. Dengue Epidemiology. J Glob Health [Internet]. 2019;3(2):37–45.
2. Widhidewi Nw. Epidemiologi Dan Pencegahan Transmisi Virus Dengue. Wicaksana J Lingkung Dan Pembang. 2019;3(1):54–9.
3. Hardani M, Ramadhian Mr, Wahyudo R. Denv-5: Ancaman Serotipe Baru Virus Dengue Denv-5: New Emerging Dengue Virus Serotype. Majority [Internet]. 2018; 7(1): 243–8.
4. Fajarani Rini, Martini Ams. Gambaran Variasi Serotipe Virus Dengue Pada Pasien Infeksi Dengue Di Kota Semarang Tahun 2019 (Penelitian Di Rumah Sakit Dan Puskesmas Kota Semarang). J Kesehat Masy [Internet]. 2020;8(Januari):169–76.
5. Kurniati A, Fandi A, Sariyanti M, Febrianti E, Rizqoh D. Perbandingan Tingkat Keparahan Infeksi Sekunder Virus Dengue Pada Keempat Serotipe Di Indonesia: Systematic Review. J Kesehat Andalas [Internet]. 10(1):49.
6. Sariyanti M, Fitri N, Febrianti E, Kurniati A, Rizqoh D. Perbandingan Tingkat Keparahan Infeksi Primer Virus Dengue Serotipe 1, 2, 3 Dan 4 Di Indonesia: Systematic Review (1). Jumanantik (Jurnal Ilm Penelit Kesehatan) [Internet]. 6(1):38.
7. Harapan H, Michie A, Mudatsir M, Sasmono Rt, Imrie A. Epidemiology Of Dengue Hemorrhagic Fever In Indonesia: Analysis Of Five Decades Data From The National Disease Surveillance. BMC Res Notes [Internet]. 2019;12(1):4–9.
8. Dirjen P2pt. Surat Edaran Nomor: Hk.02.02/Iv/2360/2020 Tentang Pelaksanaan Pencegahan Dan Pengendalian Dbd Dalam Situasi Pandemi Covid-19. 2020. P. 1–2.
9. Cucunawangsih, Lugito Nph. Trends Of Dengue Disease Epidemiology. Virol Res Treat. 2017;8.
10. Redoni M, Yacoub S, Rivino L, Giacobbe Dr, Luzzati R, Di Bella S. Dengue: Status Of Current And Under-Development Vaccines [Internet]. Vol. 30, Reviews In Medical Virology. 2020.
11. Satari Hi, Adilla Sf. Keamanan Vaksin Dengue Pada Anak. Sari Pediatr. 2019;21(2):129.
12. Wirawan Dn. Masalah Demam Berdarah Dengue (Dbd) Dan Ketersediaan Vaksin. Public Heal Prev Med Arch. 2016;4(2):94.
13. Wickramasuriya Am, Dunwell Jm. Cacao Biotechnology: Current Status And Future Prospects. Plant Biotechnol J. 2018;16(1):4–17.
14. Yumas M. Pemanfaatan Limbah Kulit Ari Biji Kakao (*Theobroma cacao* L) Sebagai Sumber Antibakteri Streptococcus Mutans. J Ind Has Perkeb. 2017;12(2):7–20.
15. Septriayanti I, Ramadhani Tr, Ade P, Yulis R, Putra Y. Sebagai Bahan Baku Berpotensi Obat. 2020;2(2):57–61.
16. Petrilli Aa, Souza Sj, Teixeira Am, Pontilho Pm, Souza Jmp, Luzia La, Et Al. Effect Of Chocolate And Yerba Mate Phenolic Compounds On Inflammatory And Oxidative Biomarkers In Hiv/Aids Individuals. Nutrients. 2016;8(5).

17. - S-, - Yy, - Rh, Putra Rt, - Rp. Kajian Manfaat Senyawa Aktif Dalam Ekstrak Kulit Buah Coklat (*Theobroma cacao*). J Ilm Poli Rekayasa. 2020;15(2):13.
18. Cádiz-Gurrea Mdll, Borrás-Linares I, Lozano-Sánchez J, Joven J, Fernández-Arroyo S, Segura-Carretero A. Cocoa And Grape Seed Byproducts As A Source Of Antioxidant And Anti-Inflammatory Proanthocyanidins. Int J Mol Sci. 2017;18(2).
19. Dewi B, Angelina M, Meilawati L, Hartati S, Dewijanti I, Santi M, Et Al. Antiviral Effect Of *Pterocarpus Indicus* Willd Leaves Extract Against Replication Of Dengue Virus (Denv) In Vitro. J Trop Life Sci. 2018;8(1):55–61.
20. Keiser Pt, Anantpadma M, Staples H, Carrion R, Davey Ra. Automation Of Infectious Focus Assay For Determination Of Filovirus Titers And Direct Comparison To Plaque And Tcid50 Assays. Microorganisms. 2021;9(1):1–13.
21. Yañez O, Osorio Mi, Areche C, Vasquez-Espinal A, Bravo J, Sandoval-Aldana A, Et Al. *Theobroma cacao* L. Compounds: Theoretical Study And Molecular Modeling As Inhibitors Of Main Sars-Cov-2 Protease. Biomed Pharmacother. 2021;140(March).
22. Zakaryan H, Arabyan E, Oo A, Zandi K. Flavonoids: Promising Natural Compounds Against Viral Infections. Arch Virol. 2017;162(9):2539–51.
23. Thagriki Ds. Quercetin And Its Derivatives Are Potent Inhibitors Of The Dengue Virus. Trends Phytochem Res. 2022;6(1):70–85.
24. Majnooni Mb, Fakhri S, Bahrami G, Naseri M, Farzaei Mh, Echeverría J. Alkaloids As Potential Phytochemicals Against Sars-Cov-2: Approaches To The Associated Pivotal Mechanisms. Evidence-Based Complement Altern Med. 2021;2021.
25. Hall A, Troupin A, Londono-Renteria B, Colpitts Tm. Garlic Organosulfur Compounds Reduce Inflammation And Oxidative Stress During Dengue Virus Infection. Viruses. 2017;9(7).
26. Fitriani F, Soetojo A, Subiwahjudi A, Yuanita T. Sitotoksisitas Ekstrak Kulit Kakao (*Theobroma cacao*) Terhadap Kultur Sel Fibroblas Bhk-21. Conserv Dent J. 2019;9(1):54.
27. Mokra D, Adamcakova J, Mokry J. Green Tea Polyphenol (-) -Epigallocatechin-3-Gallate (Egcg): A Time For A New Player In The Treatment Of Respiratory Diseases ? 2022;1–30.
28. Yang H, Chen X, Jiang C, He K, Hu Y. Antiviral And Immunoregulatory Role Against Pcv2 In Vivo Of Chinese Herbal Medicinal Ingredients. J Vet Res. 2017;61(4):405–10.