

## STUDI IN VITRO ANTIVIRUS EKSTRAK DAUN SINGKONG (*Manihot esculenta* C.) TERHADAP REPLIKASI VIRUS DENGUE

Alvien Chaerul Umam<sup>1</sup>, Dadan Ramadhan Apriyanto<sup>1</sup>, Kati Sriwiyati<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Fakultas Kedokteran Universitas Swadaya Gunung Jati

### ABSTRAK

**Latar Belakang:** Demam dengue dan Demam Berdarah Dengue (DBD) disebabkan oleh virus dengue, yang termasuk dalam genus *Flavivirus*, keluarga *Flaviviridae*. Angka kematian atau *Case Fatality Rate* (CFR) akibat DBD lebih dari 1% dikategorikan tinggi. Terapi untuk DBD yang digunakan saat ini tidak ada yang spesifik, prinsip utama adalah terapi suportif. Oleh karena itu dibutuhkan alternatif pengobatan. Beberapa penelitian menyatakan bahwa beberapa senyawa alam (*polyphenol*) dalam daun singkong memiliki peran sebagai antivirus sehingga penelitian ini bertujuan untuk mengetahui daya hambat ekstrak daun singkong terhadap replikasi virus dengue. **Metode:** Penelitian yang dilakukan bersifat eksperimental dengan rancangan penelitian *post test control group design*. Penelitian ini menggunakan 6 kelompok, yaitu 2 kelompok kontrol dan 4 kelompok perlakuan. Kelompok perlakuan terdiri dari pemberian ekstrak dari daun singkong (*Manihot esculenta* C.) dengan konsentrasi bertingkat 10 µg/ml, 20 µg/ml, 40 µg/ml, dan 80 µg/ml. Kelompok kontrol yaitu kontrol negatif (K(-)) dan kontrol positif (K(+)), kontrol negatif yaitu pemberian *Dimethyl sulfoxide* (DMSO) 0,1%, sedangkan kontrol positif yaitu pemberian *Cylosporin A* (CyA). Data diuji menggunakan uji *Kruskal Wallis*. **Hasil:** Pada uji *Kruskal Wallis* terdapat perbedaan daya hambat ekstrak daun singkong dengan konsentrasi 10 µg/ml, 20 µg/ml, 40 µg/ml, dan 80 µg/ml (nilai  $p = 0,005$ ). **Simpulan:** Ekstrak daun singkong (*Manihot esculenta* C.) memiliki daya hambat terhadap replikasi virus dengue.

**Kata Kunci:** *Manihot esculenta* C., Virus Dengue, Ekstrak daun singkong.

### ABSTRACT

**Background:** Dengue fever and Dengue Hemorrhagic Fever (DHF) are caused by dengue virus, which belongs to the genus *Flavivirus* and family *Flaviviridae*. *Case Fatality Rate* (CFR) due to DHF more than 1% is categorized high. There is no specific therapy for DHF currently used, the main principle is supportive therapy. Therefore an alternative treatment is needed. Some research states that some natural compounds (*polyphenols*) in cassava leaves have an antiviral role so the objective of this research is to find out the inhibition of cassava leaves extract against dengue virus replication. **Method:** The study was experimental with a *post-test control group design* research design. This study uses 6 groups, namely 2 control groups and 4 treatment groups. The treatment group consisted of cassava leaves (*Manihot esculenta* C.) extract with a concentration of 10 µg/ml, 20 µg/ml, 40 µg/ml, and 80 µg/ml. The control group was negative control (K (-)) and positive control (K (+)), a negative control is giving *Dimethyl sulfoxide* (DMSO) 0.1%, while positive control is giving *Cylosporin A* (CyA). Data were tested using the *Kruskal Wallis* test. **Result:** In the *Kruskal Wallis* test there were differences in inhibition of cassava leaves extract concentrations of 10 µg/ml, 20 µg/ml, 40 µg/ml, and 80 µg/ml ( $p$  value = 0,005). **Conclusion:** Cassava leaves extract (*Manihot esculenta* C.) has inhibitory power against dengue virus replication.

**Keyword:** *Manihot esculenta* C., Dengue Virus, Cassava leaves extract

### Latar Belakang

Demam dengue dan Demam Berdarah Dengue (DBD) disebabkan oleh virus dengue, yang termasuk dalam genus *Flavivirus*, keluarga *Flaviviridae*. Virus dengue dalam penyebarannya terdapat 4 serotipe yaitu DENV-1, DENV-2, DENV-3, dan DENV-4 yang semuanya dapat menyebabkan demam dengue atau demam berdarah dengue.<sup>1</sup>

Penularan infeksi virus dengue terjadi melalui vektor nyamuk genus *Aedes* terutama dari spesies *Aedes aegypti* dan *Aedes albopictus*. Peningkatan kasus setiap tahunnya berkaitan dengan sanitasi

lingkungan dengan tersedianya tempat perlindungan bagi nyamuk betina yaitu bejana yang berisi air jernih seperti air dalam bak mandi, kaleng bekas dan tempat penampungan air lainnya.<sup>1,2</sup>

Demam berdarah dengue tersebar di wilayah Asia Tenggara, Pasifik Barat dan Karibia. Indonesia merupakan wilayah endemis dengan sebaran di seluruh wilayah tanah air. Angka kematian atau *Case Fatality Rate* (CFR) akibat DBD lebih dari 1% dikategorikan tinggi. Kasus DBD pada tahun 2017 di Indonesia berjumlah 68.407 kasus, dengan jumlah kematian sebanyak 493 orang. Pada tahun sebelumnya, jumlah kasus DBD tercatat 204.171

---

Penulis Korespondensi:

Dadan Ramadhan Apriyanto

Dadanramadhanapriyanto95@gmail.com

kasus dan jumlah kematiannya sebanyak 1.598 orang.<sup>3</sup>

Terapi untuk DBD yang digunakan saat ini tidak ada yang spesifik, prinsip utama adalah terapi suportif. Pengobatan dengan terapi suportif yang adekuat, angka kematian dapat diturunkan hingga kurang dari 1%. Pemeliharaan volume cairan sirkulasi merupakan tindakan yang paling penting dalam penanganan kasus DBD.<sup>1,4</sup>

Singkong atau Ubi Kayu (*Mahinot esculenta* C.) merupakan tanaman yang tergolong dalam *family euphorbiaceae* yang ditemukan pertama kali di Amerika Serikat dan kemudian dibudidayakan secara luas termasuk di Indonesia. Daun singkong banyak digunakan untuk mengobati diare, demam, sakit kepala,<sup>5</sup> sebagai antioksidan, antiradikal,<sup>6</sup> analgesik,<sup>7</sup> antiinflamasi dan antidiabetes.<sup>8</sup> Hal itu dikarenakan pada daun singkong mengandung berbagai metabolit sekunder yaitu flavonoid, saponin, fenolik, tannin, katekin, flavans, proantosianidol, triterpenoid dan sterol.<sup>8,9</sup>

Kandungan quersetin pada daun singkong mungkin berpotensi sebagai antivirus dengue. Hal ini didukung oleh penelitian Leli Saptawati dkk, bahwa kandungan quersetin yang merupakan derivat flavonoid dari ekstrak jambu biji dan pepaya terbukti efektif sebagai antiviral untuk virus dengue secara *in vitro* yang berfungsi untuk menghambat aktivitas transkripsi enzim.<sup>10</sup> Pada penelitian tersebut, belum disebutkan bahwa kandungan quersetin pada daun singkong dapat menjadi antiviral dengue. Oleh karena itu, penulis tertarik untuk meneliti uji aktivitas ekstrak daun singkong sebagai antivirus dengue.

#### Metode

Penelitian ini termasuk dalam ruang lingkup Farmakologi dan Mikrobiologi. Penelitian yang dilakukan bersifat eksperimental dengan rancangan penelitian *post test control group design* menggunakan virus dengue secara *in vitro* sebagai objek penelitian dengan menggunakan 6 kelompok, yaitu 2 kelompok kontrol dan 4 kelompok perlakuan. Sampel penelitian ini adalah virus dengue serotipe 2 strain *New Guinea C* (DENV2 strain NGC) yang diinfeksi ke dalam *cell line vero cell* yang didapatkan dari Departemen Mikrobiologi FK UI dan Daun singkong (*Manihot esculenta* C.) yang diperoleh dari daerah pertanian di Kabupaten Kuningan Provinsi Jawa Barat.

#### Pembuatan Ekstrak Daun Singkong

Ekstrak daun singkong (*Manihot esculenta* C) adalah zat yang dihasilkan dari proses ekstraksi dengan menggunakan pelarut etanol 96% melalui metode maserasi.<sup>11</sup> Ekstrak diencerkan dalam DMSO hingga konsentrasinya menjadi 100 mg/ml

dan dapat disimpan dalam *freezer* dengan suhu  $-80^{\circ}$  C. Ekstrak dikeluarkan dari suhu  $-80^{\circ}$  C lalu dibiarkan dalam ruangan hingga mencair. Ekstrak lalu dihomogenisasi dengan *vortex* dan dimasukkan sebanyak 1,52  $\mu$ l ke dalam 1998,48  $\mu$ l medium, sehingga didapatkan konsentrasi 80  $\mu$ g/ml. Kemudian di *vortex* lagi hingga homogen. Kemudian dilakukan pengenceran kembali dengan cara memasukkan DMEM medium sebanyak 1000  $\mu$ l ke dalam *tube* kosong. Setelah itu ekstrak diambil dengan menggunakan mikropipet sebanyak 0,4  $\mu$ l dan dimasukkan ke dalam *tube* yang berisi DMEM. Masukkan DMSO sebesar 0,1  $\mu$ l dan CyA sebesar 200  $\mu$ l ke dalam *tube* yang berisi DMEM. Dan isi dalam *tube* tersebut akan didapatkan konsentrasi ekstrak 20  $\mu$ g/ml.<sup>10</sup>

#### Persiapan Sel

Sel vero yang dapat digunakan untuk uji antivirus jika saat diamati, konfluensinya sudah mencapai 90%. sel lalu diinkubasi selama 24 jam suhu  $37^{\circ}$ C dan konsentrasi  $\text{CO}_2$  5%.<sup>10</sup>

#### Perbanyak Virus Dengue

Perbanyak virus dengue dengan menggunakan sel vero pada tabung kultur T-75 di bagian Mikrobiologi UI. Sel vero yang *monolayer* pada tabung kultur T-75 diinfeksi dengue virus dengan *multiple of infection* (MOI) 0,5 FFU/sel dan diinkubasi pada suhu  $37^{\circ}$ C dengan 5%  $\text{CO}_2$  selama 7 hari. Selanjutnya disaring menggunakan *syringe driven millex GV with 0,2 um filter unit* (Millipore, Co. Bedford MA USA). Kultur supernatan selanjutnya disimpan dalam suhu  $-80^{\circ}$ C.<sup>10</sup>

#### Uji Antiviral Ekstrak Daun Singkong dengan Multidose

Sel vero dengan jumlah  $2 \times 10^5$  sel/*well* diinkubasi pada suhu  $37^{\circ}$ C, 5%  $\text{CO}_2$ . Dalam kondisi dingin, siapkan ekstrak dan virus dengue dengan jumlah 2 kali lebih tinggi dari dosis dan MOI 0,1%. Campuran ekstrak dan virus dengan perbandingan 1:1. Sel di 48 *well plate* yang telah diinkubasi diambil dan dibuang mediumnya. Setelah itu sel ditambah dengan 100  $\mu$ l campuran ekstrak-virus dan diinkubasi selama 2 jam. Selama diinkubasi, campuran ekstrak dan virus dibuang dan dicuci dengan medium tanpa serum sebanyak 2 kali dengan volume masing-masing 200  $\mu$ l/*well*. Setelah dicuci, masukkan 400  $\mu$ l/*well* medium lengkap yang mengandung ekstrak dengan konsentrasi 20  $\mu$ g/ml dan inkubasi selama 48 jam. Setelah inkubasi selama 48 jam, supernatan dipanen untuk uji *focus assay* untuk mengetahui titer virus.<sup>10</sup> Persentase infektivitas dengan *focus assay* dapat dihitung dengan persamaan berikut:

$$\% \text{ daya hambat} = \frac{\text{Focus forming unit per well}}{\text{rata - rata titer focus forming unit DMSO}} \times 100\%$$

## Uji Toksisitas Ekstrak Daun Singkong Terhadap Sel Vero

Toksisitas ekstrak dinilai melalui presentasi viabilitas dengan metode MTT Assay. Ekstrak dilarutkan pada medium pertumbuhan sel dengan control DMSO 0,1%. Sel ditaman di plate 96 well dengan kepadatan  $2 \times 10^4$  sel/sumur. Viabilitas yang didapat menggunakan persamaan persentase viabilitas dan dibandingkan dengan kontrol dengan perhitungan:

Persen viabilitas sel (%) =  $(A_{490 \text{ nm}} - A_{\text{blank}}) \times 100 / \text{rata-rata kontrol}$ .

## Hasil dan Pembahasan

### Analisis Data

Data hasil penelitian yang diperoleh, diolah datanya secara statistik dengan menggunakan program komputer. Data diuji dengan uji normalitas yang digunakan yaitu *Shapiro – Wilk* karena sampel yang digunakan kurang dari 50. Karena pada penelitian ini data tidak normal maka uji hipotesis menggunakan uji *Kruskal-Wallis*.

### Hasil Analisis Data

Hasil uji normalitas pada tabel 1, daya hambat K(-), K(+), P2, dan P4 menunjukkan nilai p berada di atas 0,05. Artinya daya hambat K(-), K(+), P2, dan P4 berdistribusi normal. Sedangkan pada P1, dan P3 berdistribusi data tidak normal karena nilai p lebih kecil dari 0,05.

Berdasarkan hasil uji normalitas menunjukkan data yang tidak normal, maka selanjutnya untuk menguji hipotesis menggunakan uji non-parametrik yaitu dilakukan uji *Kruskal Wallis*. Hasil analisis uji *Kruskal Wallis* menunjukkan nilai p sebesar 0,005 sehingga  $H_0$  ditolak dan  $H_1$  diterima. Karena nilai p lebih kecil dari 0,05 artinya terdapat perbedaan daya hambat antara pemberian ekstrak daun singkong (*Manihot esculenta C.*) konsentrasi 10 µg/ml, 20 µg/ml, 40 µg/ml, 80 µg/ml, K(-) dan K(+).

### Daya Hambat Ekstrak Daun Singkong

Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui daya hambat ekstrak daun singkong terhadap replikasi DENV 2 secara *in vitro*. Daya hambat tersebut dapat dilihat dari dua kriteria, yaitu daya hambat ekstrak terhadap DENV 2 dan toksisitas ekstrak terhadap sel vero. Uji daya hambat ekstrak daun singkong (*Manihot esculenta C.*) dilakukan dengan metode

*Focus Forming Unit assay*. *Focus Forming Unit assay* adalah metode dengan menggunakan penanda peroksidase untuk melihat dan menghitung jumlah virus dengue yang menginfeksi sel vero sehingga dapat mengetahui persentase infektivitas.<sup>10,12</sup>

Berdasarkan tabel 2, dapat diketahui bahwa ekstrak daun singkong dengan konsentrasi tertinggi sampai konsentrasi terendah dapat menghambat replikasi DENV 2 hingga lebih dari 98% dengan rata-rata infektivitas  $\leq 20\%$ . DMSO memiliki daya hambat terendah terhadap DENV 2 sebesar 0% dengan rata-rata infektivitas sebesar 100%.

Ekstrak daun singkong (*Manihot esculenta C.*) yang disebut pada tabel 2 dengan konsentrasi 40 µg/ml memiliki rata-rata infektivitas sebesar 0,3% dengan daya hambat 99,7%. Hal ini menunjukkan bahwa daya hambat ekstrak daun singkong terhadap DENV 2 cukup tinggi karena persentase infektivitas dari seluruh konsentrasi ekstrak yang diuji  $\leq 20\%$ . Saat ini penelitian terkait antivirus dari ekstrak daun singkong terhadap DENV 2 maupun virus lain masih terbatas, namun daun singkong memiliki kandungan flavonoid yang salah satu senyawanya merupakan rutin yang mudah terdegradasi menjadi quersetin.<sup>8</sup> Dalam penelitian sebelumnya terkait studi *in vitro* pada ekstrak delapan tanaman sebagai antivirus dengue, quersetin dipercaya berperan penting dalam menghambat enzim *reverse transcriptase* dan menghambat NS2B-NS3 protease yang sangat penting untuk pemrosesan *polyprotein* virus.<sup>10</sup>

Flavonoid merupakan salah satu kandungan paling banyak yang terdapat pada daun singkong dan yang mungkin berpotensi sebagai antivirus dengue adalah quersetin.<sup>8</sup> Carolina et al pada penelitiannya menguji senyawa alam (*polyphenol*) pada makrofag yang terinfeksi DENV serotipe 2 dan 3 menyatakan bahwa infeksi yang terjadi dapat dihambat oleh senyawa quersetin dan fisetin.<sup>13</sup> Pada beberapa penelitian lain, quersetin dilaporkan memiliki daya hambat terhadap beberapa virus lainnya. Cheng et al dalam penelitiannya melaporkan bahwa quersetin memiliki kemampuan sebagai antivirus terhadap *Hepatitis B Virus* (HBV) dengan menghambat replikasi genom HBV secara *in vitro*.<sup>14</sup> Selain itu, Lee et al juga dalam penelitiannya menyebutkan bahwa quersetin dapat menghambat aktivitas dari *Epsstein-Barr Virus* (EBV).<sup>15</sup>

**Tabel 1.** Uji Normalitas Ekstrak Daun Singkong (*Manihot esculenta* C.)

Kelompok subjek	Kelompok perlakuan	N	P	Keterangan
Daya hambat daun singkong	K(-)	4	0,318	Normal
	K(+)	4	0,542	Normal
	P1	4	0,001	Tidak Normal
	P2	4	0,212	Normal
	P3	4	0,044	Tidak Normal
	P4	4	0,212	Normal

**Tabel 2.** Persentase Infektivitas

Perlakuan ( $\mu\text{g/ml}$ )	Pengulangan Infektivitas(%)				Rata-rata infektivitas (%)	Daya Hambat (%)
	I	II	III	IV		
10 (P1)	1,3	1,3	3,2	1,9	1,9	98,1
20 (P2)	0,6	0	0	1,9	0,6	99,4
40 (P3)	1,3	0	0	0	0,3	99,7
80 (P4)	1,3	1,9	0,6	0,6	1,1	98,9
DMSO (K-)	88,9	106,3	105,0	99,8	100	0
CyA (K+)	52,8	43,8	40,6	45,1	45,6	54,4

**Tabel 3** Persentase viabilitas

Perlakuan ( $\mu\text{g/ml}$ )	Pengulangan Viabilitas (%)			Rata-rata viabilitas (%)
	I	II	III	
10 (P1)	105,8	105,5	104,7	105,3
20 (P2)	113,4	110,3	116,5	113,4
40 (P3)	124,8	113,7	116,4	118,3
80 (P4)	135,9	144,5	136,3	138,9
DMSO (K-)	105,6	96,6	98,0	100,1
CyA (K+)	79,4	86,0	79,4	81,6

### Toksistas Ekstrak Daun Singkong terhadap Sel Vero

Berdasarkan tabel 3, didapatkan bahwa ekstrak daun singkong dengan konsentrasi tertinggi sampai terendah tidak memiliki toksistas terhadap sel vero. Semakin tinggi persentase viabilitas sel, semakin rendah toksistas terhadap sel vero.

Uji toksistas ekstrak terhadap sel vero dilakukan dengan metode MTT *assay*. MTT *assay* adalah metode untuk melihat viabilitas sel dengan mengukur kemampuan sel hidup berdasarkan aktivitas mitokondria dari kultur sel.<sup>16</sup> Persentase viabilitas sel didapatkan dari perhitungan dengan rumus seperti yang tercantum pada metode penelitian. Persentase viabilitas adalah jumlah sel sehat dan tidak toksik dalam satuan persen. Ekstrak bersifat tidak iritan terhadap sel apabila rata-rata viabilitas >50%, sedangkan apabila rata-rata persentase viabilitas <50%, ekstrak bersifat iritan terhadap sel.<sup>10</sup>

Berdasarkan penelitian yang sudah saya lakukan ini, seluruh konsentrasi ekstrak daun singkong (*Manihot esculenta* C.) tergolong tidak toksik terhadap sel vero, karena sel yang terpapar ekstrak daun singkong memiliki rata-rata viabilitas >50%, dengan konsentrasi 10  $\mu\text{g/ml}$  memiliki rata-rata viabilitas 104,7%; 20  $\mu\text{g/ml}$  memiliki rata-rata viabilitas 113,4%; 40  $\mu\text{g/ml}$  memiliki rata-rata viabilitas 118,4%; dan 80  $\mu\text{g/ml}$  memiliki rata-rata viabilitas 138,9%.

### Simpulan

Dari hasil penelitian yang telah dilakukan didapatkan kesimpulan bahwa ekstrak daun singkong (*Manihot esculenta* C.) dengan konsentrasi 10  $\mu\text{g/ml}$ , 20  $\mu\text{g/ml}$ , 40  $\mu\text{g/ml}$ , dan 80  $\mu\text{g/ml}$  masing – masing memiliki potensi dalam menghambat replikasi virus dengue sehingga perlu dilakukan isolasi lebih lanjut untuk menemukan senyawa dari ekstrak daun singkong sebagai antivirus dengue

**Daftar Pustaka**

1. Sudoyo AW, Setiyohadi B, Alwi I, Simadibrata M, Setiadi S. *Buku Ajar Ilmu Penyakit Dalam Edisis VI.*; 2014. doi:10.1111/j.1365-2958.2011.07583.x
2. Brooks GF, Carroll KC, Butel JS, Morse SA, Mietzner TA. *Mikrobiologi Kedokteran Jawetz, Melnick, & Adelberg.*; 2013. doi:10.1017/CBO9781107415324.004
3. Kementerian Kesehatan Republik Indonesia. *Profile Kesehatan Indonesia Tahun 2017.*; 2018. doi:10.1002/qj
4. Dewi B, Angelina M, Meilawati L, 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. doi:10.11594/jtls.08.01.10
5. Anderson G, Coee F. Ethnobotany of the Garifuna of East Nicaragua. *Econ Bot.* Published online 1996.
6. Tsumbu CN, Deby-Dupont G, Tits M, et al. Antioxidant and Antiradical Activities of *Manihot esculenta* Crantz (Euphorbiaceae) Leaves and Other Selected Tropical Green Vegetables Investigated on lipoperoxidation and phorbol-12-myristate-13-acetate (PMA) activated monocytes. *Nutrients.* Published online 2015. doi:10.3390/nu3090818
7. Miladiyah I. Analgesic Activity of Ethanolic Extract of *Manihot Esculenta* Crantz Leaves in Mice. *Universa Med.* Published online 2016. doi:10.18051/univmed.2011.v30.3-10
8. Hilmy Nur Hichmah, Rise Desnita SL. Karakteristik Kelarutan Rutin dari Ekstrak Air Daun Singkong (*Manihot esculenta* Crantz). 2017;91:399-404. <http://jurnal.untan.ac.id/index.php/jmfarmasi/article/view/30069>
9. Ifिता FA. Uji Efektivitas Rendaman Daun Singkong (*Manihot esculenta*) Sebagai Insektisida Terhadap Nyamuk *Aedes aegypti* Dengan Metode Elektrik Cair. 2016;4(April):20-29.
10. Saptawati L, Puspita Febrinasari R, Dewi Yudhani R, et al. In vitro study of eight Indonesian plants extracts as anti Dengue virus. *Heal Sci J Indones Saptawati al.* 2017;8(1):12-18. doi:10.22435/hsji.v8i1.6601.Leli
11. Meilawaty Z. Efek Ekstrak Daun Singkong (*Manihot esculenta* C ) Terhadap Ekspresi COX-2 pada Monosit yang Dipapar LPS E.coli. 2014;46(4):196-201.
12. Zandi K, Teoh BT, Sam SS, Wong PF, Mustafa M, Abubakar S. Antiviral Activity of Four Types of Bioflavonoid Against Dengue Virus Type-2. *Virol J.* Published online 2016. doi:10.1186/1743-422X-8-560
13. Jasso-Miranda C, Herrera-Camacho I, Flores-Mendoza LK, et al. Antiviral and Immunomodulatory Effects of Polyphenols on Macrophages Infected with Dengue Virus Serotypes 2 and 3 Enhanced or Not With Antibodies. *Infect Drug Resist.* 2019;12:1833-1852. doi:10.2147/IDR.S210890
14. Cheng Z, Sun G, Guo W, et al. Inhibition of Hepatitis B Virus Replication by Quercetin in Human Hepatoma Cell Lines. *Virol Sin.* Published online 2015. doi:10.1007/s12250-015-3584-5
15. Lee M, Son M, Ryu E, et al. Quercetin-induced Apoptosis Prevents EBV Infection. *Oncotarget.* Published online 2015. doi:10.18632/oncotarget.3687
16. Van Meerloo J, Kaspers GJL, Cloos J. Cell Sensitivity Assays: The MTT Assay. *Methods Mol Biol.* Published online 2015. doi:10.1007/978-1-61779-80-5\_20