

LAPORAN AKHIR

PENELITIAN UNGGULAN UNSYIAH



**PENGEMBANGAN POTENSI EKSTRAK BIJI PINANG (*Areca catechu* Linn.) ACEH SEBAGAI OBAT HERBAL ALAMI
ANTIANKER UNTUK KARSINOMA SEL SKUAMOSA MULUT
(Uji imunomodulatori secara *In Vivo* serta Antiinflamasi dan
Antimetastasis secara *In Vitro*)**

TIM PENELITIAN

Ketua: Dr. Liza Meutia Sari, drg., SpPM, 19731221 2006042 001

Anggota: Rachmi Fanani Hakim, drg., M.Si, 19770526 2008012 012

Dibiayai oleh:

Universitas Syiah Kuala,

Kementerian Riset, Teknologi dan Pendidikan Tinggi,

Sesuai dengan Surat Perjanjian Penugasan

Pelaksanaan Penelitian Unggulan Universitas Syiah Kuala Tahun Anggaran 2019

Nomor: 581/UN11/SPK/PNBP/2019

FAKULTAS KEDOKTERAN GIGI

UNIVERSITAS SYIAH KUALA

DESEMBER, 2019

HALAMAN PENGESAHAN LAPORAN AKHIR
PENELITIAN UNGGULAN UNSYIAH

Judul penelitian : Pengembangan potensi ekstrak biji pinang (*Areca catechu* Linn.) Aceh sebagai obat herbal alami antikanker untuk karsinoma sel skuamosa mulut. (Uji imunomodulatori secara *in vivo* serta antiinflamasi dan antimetastasis secara *in vitro*)

Ketua peneliti

a. Nama lengkap : Dr. Liza Meutia Sari, drg., SpPM

b. NIP : 19731221 2006042 001

c. Jabatan fungsional : Lektor

d. Program studi : Ilmu Penyakit Mulut

e. Nomor HP : 087886497414

f. Alamat surel (e-mail) : lizameutiasari@gmail.com; lizameutiasari@unsyiah.ac.id

Anggota peneliti (1)

a. Nama lengkap : Rachmi Fanani Hakim, drg., M. Si

b. NIP : 19770526 2008012 012

c. Program studi : Biologi Oral

Biaya penelitian : Rp. 80.000.000

Mengetahui,
Dekan
(Dr. Cui Soraya, drg., M.Pd., Sp.KG)
NIP 196612281993122001

Menyetujui,
Ketua PPM Unsyiah
(Dr. Pabuk Hjadi Andin, S.Si., M.Tech)
NIP 197009081994031002

Banda Aceh, 30 Oktober 2019
Ketua Peneliti,

(Dr. Liza Meutia Sari, drg., SpPM)
NIP 197312212006042001

RINGKASAN

Salah satu tanaman yang berpotensi untuk dikembangkan dalam perawatan herbal adalah tanaman pinang (*Areca catechu* Linn., *Palmaceae*). Penggunaan biji pinang di Indonesia hingga saat ini belum memperoleh perhatian serius. Biji pinang Aceh sudah menjadi komoditas ekspor karena memiliki kualitas yang sangat baik. Beberapa penelitian sebelumnya telah menjelaskan tentang hubungan antara ekstrak biji pinang dengan ekspresi fenotip proliferasi karsinoma sel skuamosa mulut dan memberikan hasil yang sangat menjanjikan sebagai salah satu kandidat (KSSM) obat antikanker herbal terstandar. Penelitian lain juga menunjukkan bahwa ekstrak biji pinang memiliki aktivitas antioksidan yang kuat.

Karsinoma sel skuamosa mulut merupakan kasus keganasan yang paling sering terjadi yakni mencapai 94% dari seluruh kasus dalam rongga mulut serta menempati urutan kelima dari kejadian kanker diseluruh dunia. Rerata angka keselamatan selama lima tahun untuk kanker tipe ini menunjukkan angka yang paling rendah yakni kurang dari 50% jika dibandingkan dengan jenis kanker lain dan kondisi ini tidak berubah selama empat puluh tahun terakhir. Perkembangan teknologi kemoradioterapi dalam pengobatan kanker menimbulkan masalah baru yakni resistensi bertahap sel-sel kanker terhadap perawatan serta efek samping yang cukup parah yang dapat menimbulkan kematian pada pasien. Saat ini, masyarakat memiliki kecenderungan untuk menggunakan pengobatan alternatif dengan menggunakan bahan-bahan alami tumbuhan, sehingga temuan obat herbal alami terbaru sangat dibutuhkan untuk mengatasi masalah ini.

Biji pinang mampu menimbulkan sitotoksitas, apoptosis, menghambat siklus sel, meningkatkan enzim caspase-3, dan menurunkan aktivitas Ki-67 pada galur sel KSSM yakni HSC-2 dan HSC-3, serta bersifat aman pada sel normal (sel HaCat). Biji pinang juga terbukti aman setelah melalui uji toksisitas akut oral dan dermal pada tikus. Saat ini penelitian telah selesai dilakukan. Penelitian yang telah dilakukan adalah uji skrining fitokimia katekin dan kuersetin dalam ekstrak biji pinang serta aktivitas imunomodulatori secara *in vivo*. Aktivitas antiinflamasi dan antimetastasis secara *in vitro* tidak dapat dilakukan dalam tahun 2019 karena keterbatasan dana dan direncanakan akan dilakukan pada tahap kedua (2020). Penelitian ini bertujuan untuk mengkaji dan meneliti kemampuan ekstrak biji pinang terhadap sel kanker dan normal sehingga dapat dihasilkan suatu obat anti kanker.

Berdasarkan uraian diatas, peneliti akan melaporkan hasil akhir dari rangkaian penelitian potensi ekstrak biji pinang dalam aktivitas imunomodulasi secara *in vivo* sebagai salah satu upaya untuk mengembangkan senyawa aktif baru antikanker yang berasal dari sumber herbal alami.

PRAKATA

Bismillahirrahmanirrohiim. Puji dan syukur kami panjatkan kehadiran Allah SWT, berkat rahmat dan karuniaNya, maka penelitian ini dapat diselesaikan.

Ini adalah penelitian tentang manfaat aktivitas antioksidan biji pinang terhadap sel kanker mulut, yakni karsinoma sel skuamosa mulut. Penelitian ini bertujuan untuk meneliti kemampuan biji pinang secara *in vivo* dengan menggunakan hewan coba tikus *Sprague Dawley* sehingga dapat dihasilkan suatu obat yang bersifat imunomodulator.

Berdasarkan uraian diatas, peneliti telah menyelesaikan uji kandungan fitokimia yakni senyawa fenolik katekin dan kuersetin melalui uji *High Performance Liquid Chromatography* (HPLC), dilanjutkan dengan uji imunomodulatori pada tikus coba. Penelitian ini membutuhkan waktu 2 bulan dan telah diselesaikan dengan hasil yang baik. Penelitian ini dilakukan sebagai salah satu upaya untuk mengembangkan senyawa aktif baru antikanker yang berasal dari sumber herbal alami.

Penelitian ini diharapkan sebagai langkah awal untuk menguak tabir ilmu pengetahuan herbal alami di bidang Ilmu Kedokteran gigi khususnya Ilmu Penyakit Mulut. Penulis mengucapkan banyak terima kasih kepada para guru, pembimbing, dan Unsyiah sebagai penyanggah dana. Semoga penelitian ini bermanfaat bagi dunia akademik dan menjadi ladang pahala bagi penulis.

Penulis,

Dr. Drg. Liza Meutia Sari, Sp.PM

DAFTAR ISI

HALAMAN SAMPUL	
HALAMAN PENGESAHAN.....	ii
RINGKASAN.....	iii
PRAKATA.....	iv
DAFTAR ISI.....	V
DAFTAR TABEL.....	vi
DAFTAR GAMBAR.....	vii
DAFTAR LAMPIRAN.....	viii
BAB 1. PENDAHULUAN.....	9
1.1 Latar Belakang.....	9
1.2 Indikator Keberhasilan Penelitian.....	11
BAB 2. TINJAUAN PUSTAKA.....	12
BAB 3. TUJUAN DAN MANFAAT PENELITIAN.....	15
BAB 4. METODE PENELITIAN	17
4.1 Rancangan Penelitian.....	17
4.2 Tempat dan Waktu Penelitian.....	17
4.3 Bahan Penelitian.....	17
4.4 Besar sampel.....	17
BAB 5. HASIL DAN LUARAN YANG DICAPAI.....	21
5.1 Analisis katekin dan kuersetin hasil uji HPLC.....	21
5.2 Hasil uji imunomodulatori pada tikus.....	22
5.3 Luaran yang dicapai.....	22
BAB 6. SIMPULAN DAN SARAN.....	25
DAFTAR PUSTAKA.....	26
LAMPIRAN.....	28

DAFTAR TABEL

Tabel 5.1	Pemeriksaan gambaran darah merah dan putih pada tikus percobaan sebelum pemberian ekstrak biji pinang.....	22
Tabel 5.2	Pemeriksaan gambaran darah merah dan putih dan aktivitas makrofag pada tikus percobaan sesudah pemberian ekstrak biji pinang.....	22
Tabel 5.3	Pemeriksaan biokimia darah sebelum pemberian ekstrak biji pinang.....	23
Tabel 5.4	Pemeriksaan biokimia darah sesudah pemberian ekstrak biji pinang.....	23

DAFTAR GAMBAR

Gambar 5.1	Hasil uji HPLC ekstrak biji pinang.....	21
------------	---	----

DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran 1	Dokumentasi kegiatan.....	28
Lampiran 2	Hasil uji fenolik katekin dan kuersetin melalui uji HPLC.....	33
Lampiran 3	Lolos kaji etik IPB.....	39
Lampiran 4	E-mail penerimaan presentasi oral di KPPIKG 2019.....	40
Lampiran 5	Draft artikel dan <i>Acceptance letter Veterinary World</i>	42
Lampiran 6	Artikel yang telah dipublikasikan di <i>Dentika Dental Journal</i> TALENTA USU.....	56
Lampiran 7	Peneliti dan kualifikasinya.....	63

BAB 1

PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Karsinoma sel skuamosa mulut (KSSM) merupakan kasus keganasan yang paling sering terjadi yakni mencapai 94% dari seluruh kasus dalam rongga mulut serta menempati urutan kelima dari kejadian kanker diseluruh dunia.^{1,2} Insidensi geografis menunjukkan 3%-6% kasus KSSM terjadi di negara-negara barat dan 30% di negara bagian timur, termasuk di Indonesia.³ Rerata angka keselamatan selama lima tahun untuk kanker tipe ini menunjukkan angka yang paling rendah yakni kurang dari 50% jika dibandingkan dengan jenis kanker yang lain dan kondisi ini tidak mengalami perubahan selama empat puluh tahun terakhir terakhir.^{4,5}

Saat ini, masyarakat memiliki kecenderungan untuk menggunakan pengobatan alternatif dengan menggunakan bahan-bahan alami tumbuhan. Hal ini disebabkan karena adanya kekhawatiran terhadap efek samping yang tidak diinginkan dari pengobatan modern dan harganya lebih terjangkau.⁴ Salah satu tanaman yang berpotensi untuk dikembangkan dalam perawatan herbal adalah tanaman pinang. Bijinya dipercaya mampu menghasilkan efek euforia, penenang, penghangat, menimbulkan rasa nyaman, palpitasi, meningkatkan kewaspadaan serta pereda amarah.⁷ Berdasarkan berbagai pengalaman yang bersifat empiris inilah maka diperlukan penelitian untuk mengembangkan biji pinang sebagai salah satu komponen bahan obat herbal. Beberapa manfaat biji pinang yang telah diteliti antara lain biji tersebut memiliki aktivitas antihelmintik, batangnya digunakan sebagai antibakteri dan antifungal.^{10,11} Bijinya digunakan sebagai antibakteri, antiinflamasi^{6,7} toksisitas rongga mulut⁶, serta antioksidan.^{5,7,8,12,13} Landasan ilmiah berdasarkan penelitian-penelitian ini dibutuhkan untuk mengembangkan pemanfaatan biji pinang lebih lanjut.

Peneliti telah melakukan penelitian pendahuluan yang menunjukkan bahwa biji pinang memiliki kandungan fenolik, flavonoid, (+)-katekin, dan kuersetin sehingga biji pinang memiliki aktivitas antioksidan yang kuat dengan nilai EC₅₀ yang kecil. Biji pinang memiliki sifat toksisitas selektif terhadap galur sel kanker yakni sel HSC-2 dan HSC-3. Indikator karsinogenesis yakni enzim caspase 3, dan Ki-67 telah menunjukkan peran yang cukup signifikan dalam karsinogenesis KSSM. Peran ini sangat penting terutama dalam proliferasi sel-sel karsinoma (Ki-67) dan apoptosis (caspase). Penelitian tentang aktivitas ekstrak biji pinang dalam penghambatan fenotip proliferaatif KSSM terutama pada ekspresi protein

caspase-3 dan Ki-67 telah dilakukan dan menunjukkan hasil yang sangat baik. Uji toksisitas akut oral dan dermal menunjukkan bahwa ekstrak biji pinang aman dikonsumsi selama 14 hari.

Penelitian ini akan menguji kemampuan ekstrak biji pinang dalam mengukur efeknya terhadap respons imun sel hewan uji (imunomodulasi), menghambat inflamasi, menghambat metastasis. Penelitian tahap awal akan dilakukan identifikasi, pemilihan jenis biji pinang, dan ekstraksi biji. Penelitian tahap selanjutnya akan dilakukan uji aktivitas proinflamasi COX-2, antiinflamasi IL-10 dan TGF- β , Anti MMP-2. Uji aktivitas imunomodulasi dilakukan secara *in vivo* dengan menggunakan hewan coba tikus, hal ini dilakukan untuk mengetahui apakah ekstrak biji pinang mampu memodulasi sistem kekebalan tubuh sehingga mampu meningkatkan imunitas tubuh. Walaupun beberapa penelitian sebelumnya menunjukkan bahwa biji pinang adalah suatu bahan karsinogen dan dapat menimbulkan karsinogenesis pada manusia,^{20,21} namun, biji pinang ternyata juga memiliki kadar polifenol dan flavonoid yang cukup tinggi sebagai antioksidan.

Hasil yang diperoleh dalam penelitian ini diharapkan akan dapat memberikan kontribusi dan menambah informasi dalam upaya pengembangan obat-obat yang mengandung bahan herbal. Penelitian ini juga diharapkan dapat menghasilkan produk yang berupa obat yang memiliki kadar antioksidan yang tinggi sehingga dapat digunakan sebagai terapi adjuvan pada penderita KSSM yang sedang menjalani kemo atau radioterapi. Selain itu, produk ini juga dapat digunakan sebagai suplemen untuk meningkatkan sistem imun tubuh. Penelitian ini merupakan lanjutan penelitian sebelumnya yang telah membuktikan bahwa ekstrak biji pinang mampu menyebabkan apoptosis dan hambatan siklus sel pada galur sel kanker mulut dengan hasil yang signifikan. Hasil penelitian ini diharapkan dapat memberikan kualitas hidup yang lebih baik khususnya pada pasien kanker mulut, baik pada tahap lesi pre kanker maupun pada pasien tahap lanjut. Hasil penelitian ini diharapkan dapat menghasilkan produk obat antikanker herbal terstandar sehingga dapat menjadi terapi adjuvan pada pasien kanker mulut. Pemberian obat ini dapat mengurangi efek samping kemoradioterapi karena bersifat aman pada sel-sel normal.

1.2 Indikator Keberhasilan Penelitian

No	Jenis Luaran		Capaian yang ditargetkan		
			Tahun ke-1	Tahun ke-2	Tahun ke-3
1.	Produk teknologi atau rekayasa				Obat herbal alami terstandar
2.	Produk <i>market-acceptance</i>				Obat herbal terstandar dengan harga terjangkau dan aman di masyarakat
3.	<i>Spin-off</i>				Kerjasama Unsyiah dengan perusahaan farmasi untuk menghasilkan produk obat baru
4.	<i>Income generating</i>				Masyarakat mendapatkan obat dari bahan alami dengan harga terjangkau, penghematan pendapatan
5.	Tingkat kesiapan teknologi (TKT)		-	5	6
6.	<i>Teknologi tepat guna (TTG)</i>		-	-	Obat herbal alami terstandar
7.	<i>Mini plant</i>				Penelitian dilanjutkan dengan uji klinis oleh perusahaan farmasi dan pembuatan sediaan obat dalam bentuk oral atau topikal
8.	HKI		Draft	Terdaftar	
9.	Buku ajar		-	-	
10.	Buku referensi		Draft	Terbit	

BAB 2

TINJAUAN PUSTAKA

Karsinoma Sel Skuamosa Mulut (KSSM) merupakan kasus keganasan yang paling sering terjadi yakni mencapai 94% dari seluruh kasus dalam rongga mulut serta menempati urutan kelima dari kejadian kanker diseluruh dunia.^{8,9} Insidensi geografis menunjukkan 3%-6% kasus karsinoma sel skuamosa terjadi di negara-negara barat dan 30% di negara bagian timur, termasuk di Indonesia.³ Amerika Serikat merupakan salah satu negara yang memiliki 35.000 kasus baru KSSM sepanjang tahun 2008, dan menimbulkan lebih dari 7500 kematian setiap tahun.⁴ Rerata angka keselamatan selama lima tahun untuk kanker tipe ini menunjukkan angka yang paling rendah yakni kurang dari 50% jika dibandingkan dengan jenis kanker yang lain dan kondisi ini tidak mengalami perubahan selama empat puluh tahun terakhir.^{4, 5}

Perkembangan ilmu pengetahuan tentang diagnosis dan perawatan kanker mulut semakin maju. Selama ini, terapi yang dilakukan adalah pembedahan, radio dan kemoterapi. Pembedahan tanpa atau disertai pembedahan leher atau radioterapi saja merupakan terapi pilihan untuk karsinoma in situ, KSSM tahap 1 dan 2.^{10, 11} Terapi pilihan untuk KSSM tahap tiga dan empat, berupa pembedahan yang disertai pembedahan leher disertai radioterapi, atau pembedahan dengan kombinasi kemo dan radioterapi, atau hanya perawatan paliatif yang disertai radioterapi saja.¹¹ Angka rekurensi terbukti menurun, namun beberapa efek samping terapi juga menimbulkan morbiditas yang cukup serius terutama pada KSSM tahap akhir. Efek samping kemoradioterapi diantaranya peningkatan toksisitas, penurunan status imun tubuh, dan kerusakan rongga mulut seperti serostomia, mukositis, dan osteoradionekrosis.¹² Masalah lain yang timbul dalam perawatan kanker adalah meningkatnya resistensi bertahap sel-sel kanker terhadap perawatan sehingga penelitian untuk mendapatkan pengobatan yang optimal masih terus dikembangkan.

Perkembangan obat herbal di dunia internasional semakin pesat dengan pemasok terbesar adalah Cina, Eropa, dan Amerika Serikat. Persentase populasi pengguna obat herbal di Etiopia mencapai 90%, India 70%, Cina dan Kolombia 40%, serta Chili 70%.¹³ Salah satu penelitian menunjukkan bahwa empat dari sepuluh orang dewasa di Amerika Serikat saat ini menggunakan pengobatan alternatif tradisional.¹⁴ Enam puluh persen obat yang telah disetujui oleh *Food and Drug Administration* (FDA) dari tahun 1984-1994 diisolasi dari sumber alami tanaman.¹⁵ Diantara 121 jenis obat yang diresepkan untuk pengobatan kanker, 90 diantaranya

berasal dari obat herbal.¹⁵ Salah satu penelitian melaporkan bahwa diantara 65 obat baru yang didaftarkan untuk pengobatan kanker dari tahun 1981-2002, 48 jenis obat berasal dari produk alami tanaman.¹⁶ Penelitian dan pengembangan obat herbal dibutuhkan untuk menghasilkan obat yang dapat diterima dalam pelayanan kesehatan formal terutama kualitas, keamanan, dan efikasinya.¹⁷

Beberapa potensi tumbuhan asli Indonesia yang sudah menunjukkan kontribusi penting dalam produksi obat dunia diantaranya adalah Tapak dara (*Chataranthus rosseus*) yang mengandung senyawa aktif vinblastin dan vincristin yang digunakan sebagai anti kanker serta Pule pandak (*Rauwolfia serpentine*) untuk anti hipertensi.¹⁸ Kedua jenis tanaman obat tropika ini sudah diproduksi sebagai bahan baku obat di Amerika Serikat diantara 14 jenis tanaman herbal lainnya yang berasal dari Indonesia.¹⁹ Mekanisme kerja obat herbal dalam terapi kanker berasal dari dua efek, yakni efek imunomodulatori dan kemoterapi.¹⁷ Sel-sel kanker merusak sistem imun sehingga menurunkan kemampuan imunogenisitas terhadap tumor. Efek imunomodulatori obat herbal mampu menginduksi peningkatan imunitas bawaan tubuh.¹⁷ Efek kemoterapi berasal dari hambatan sintesis *Deoxyribose Nucleic Acid* (DNA) dan *Ribonucleic Acid* (RNA), apoptosis sel kanker serta *scavenging* rangkaian reaksi berantai radikal bebas.¹⁷

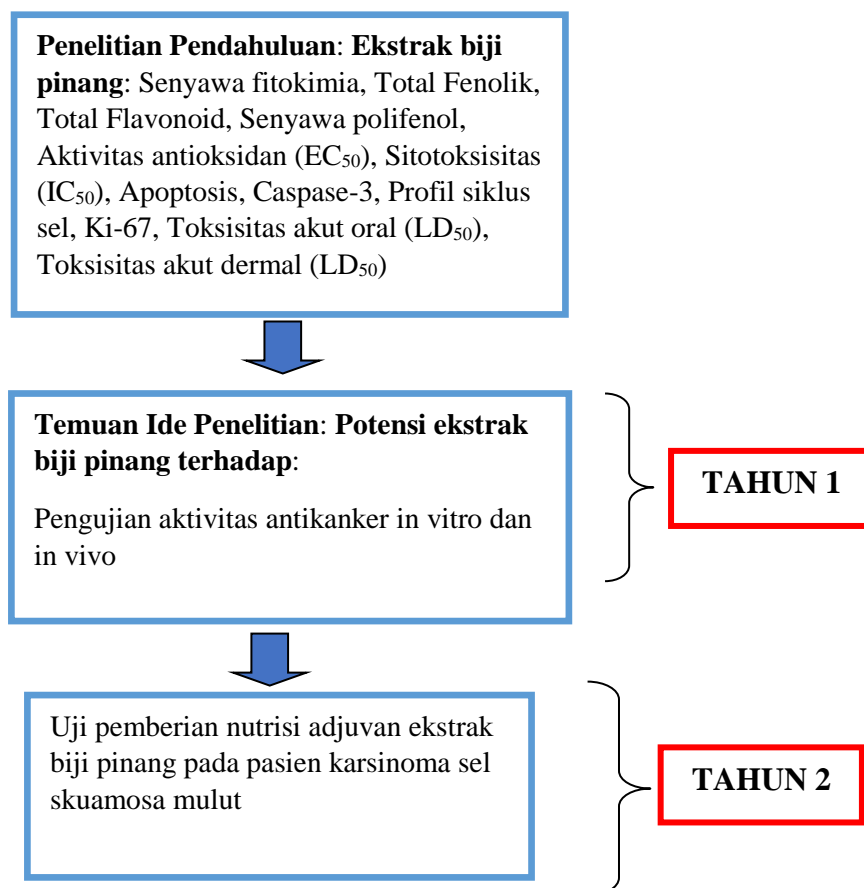
20

Salah satu tanaman yang berpotensi untuk dikembangkan sebagai obat herbal adalah tanaman pinang (*Areca catechu* Linn; *Palmaceae*). Biji pinang merupakan obat herbal tradisional yang cukup populer di India, Thailand, dan Taiwan. Walaupun beberapa penelitian menunjukkan adanya efek karsinogen biji, pinang, namun banyak literatur lain yang membuktikan adanya aktivitas antioksidan yang tinggi dalam biji tersebut.²¹⁻²³ Penggunaan biji pinang di Indonesia hingga saat ini belum memperoleh perhatian serius dibandingkan jenis tanaman palma lain. Biji pinang merupakan biji tanaman yang paling sering digunakan karena menimbulkan sifat adiktif selain tembakau, alkohol, dan kafein oleh masyarakat pinggiran.²⁴ Orang India dan Malaysia mengunyah biji ini untuk menyegarkan nafas, melancarkan pencernaan, meningkatkan gairah seksual, obat cacing, dan menjaga stamina.^{24, 25} Biji pinang dipercaya mampu menimbulkan efek euforia, penenang, penghangat, dan rasa nyaman.²⁴ Berdasarkan berbagai pengalaman yang bersifat empiris inilah maka diperlukan penelitian untuk mengembangkan biji pinang sebagai salah satu komponen obat herbal. Beberapa manfaat tanaman pinang yang telah diteliti antara lain batangnya digunakan sebagai antibakteri dan antifungal.²⁶ Bijinya digunakan sebagai antioksidan, anti penuaan, antihelminik,

antimikrobal, dan antiinflamasi.²⁶⁻²⁹ Landasan ilmiah berdasarkan penelitian ini dibutuhkan untuk mengembangkan manfaat biji pinang lebih lanjut.

Berdasarkan uraian diatas, diketahui bahwa aktivitas antioksidan ekstrak biji pinang terhadap beberapa galur sel kanker sudah pernah diteliti, namun menunjukkan hasil yang bervariasi. Hal ini kemungkinan berhubungan dengan perbedaan jenis galur sel dan biji pinang yang digunakan. Walaupun penelitian kandungan fitokimia dan aktivitas antioksidan biji *pinang* sudah pernah dilakukan di Indonesia, namun penelitian yang menyelidiki pengaruh biji pinang yang berasal dari Aceh terhadap aktivitas imunomodulasi, antiinflamasi, dan antimetastasis terhadap sel-sel KSSM serta efek patogennya terhadap bakteri rongga mulut belum pernah dilakukan.

Peta jalan penelitian:



BAB 3

TUJUAN DAN MANFAAT PENELITIAN

Strategi ialah perencanaan, arah dan pengelolaan untuk mencapai suatu tujuan. Strategi ialah formulasi, manufaktur, dan distribusi obat. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui apakah ekstrak biji pinang mampu memiliki efek antiinflamasi, anti metastasis, dan imunomodulasi. Bila hipotesis diterima dalam penelitian ini, maka akan disusun formulasi dosis yang tepat untuk membuat sediaan oral dan topikal. Setelah itu kerjasama dengan pabrik farmasi untuk pembuatan obat. Bila uji klinis telah dilakukan, maka obat ini bisa didistribusikan setelah melalui ijin kementerian kesehatan RI. Produk akan dipasarkan bila telah melalui uji klinis dan melalui kemitraan bisnis. Ekstrak pinang dengan bahan baku herbal alami akan diterima oleh masyarakat lokal atau daerah lainnya karena bahan baku murah sehingga harga terjangkau oleh masyarakat.

Perkembangan obat herbal di dunia internasional semakin pesat dengan pemasok terbesar adalah Cina, Eropa, dan Amerika Serikat. Persentase populasi pengguna obat herbal di Etiopia mencapai 90%, India 70%, Cina dan Kolombia 40%, serta Chilli 70%.¹³ Salah satu penelitian menunjukkan bahwa empat dari sepuluh orang dewasa di Amerika Serikat saat ini menggunakan pengobatan alternatif tradisional.¹⁴ Enam puluh persen obat yang telah disetujui oleh *Food and Drug Administration (FDA)* dari tahun 1984-1994 diisolasi dari sumber alami tanaman.¹⁵ Diantara 121 jenis obat yang diresepkan untuk pengobatan kanker, 90 diantaranya berasal dari obat herbal.¹⁵ Salah satu penelitian melaporkan bahwa diantara 65 obat baru yang didaftarkan untuk pengobatan kanker dari tahun 1981-2002, 48 jenis obat berasal dari produk alami tanaman.¹⁶ Penelitian dan pengembangan obat herbal dibutuhkan untuk menghasilkan obat yang dapat diterima dalam pelayanan kesehatan formal terutama kualitas, keamanan, dan efikasinya.¹⁷

Beberapa potensi tumbuhan asli Indonesia yang sudah menunjukkan kontribusi penting dalam produksi obat dunia diantaranya adalah Tapak dara (*Chataranthus rosseus*) yang mengandung senyawa aktif vinblastin dan vincristin yang digunakan sebagai anti kanker serta Pule pandak (*Rauwolfia serpentine*) untuk anti hipertensi.¹⁸ Kedua jenis tanaman obat tropika ini sudah diproduksi sebagai bahan baku obat di Amerika Serikat diantara 14 jenis tanaman herbal lainnya yang berasal dari Indonesia.¹⁹ Bisnis produk obat herbal ini akan terus diminati dan dapat membuka peluang untuk diekspor ke luar negeri. Produk biji pinang diharapkan

dapat menembus pasaran internasional sebagai sediaan untuk terapi adjuvan dalam pengobatan kanker mulut.

BAB 4

METODE PENELITIAN

4.1. Rancangan Penelitian

Penelitian **tahap pertama** adalah identifikasi tanaman dan ekstraksi biji pinang , uji HPLC dengan standar katekin dan kuersetin. Uji ini dilakukan di LIPI Bogor. Uji imunomodulatori pada tikus *Sprague Dawley* melalui perhitungan kapasitas dan aktivitas makrofag, jumlah hitung darah putih beserta sel diferensialnya, jumlah hitung darah merah beserta sel diferensialnya, serta penilaian fungsi hati dan ginjal. Uji ini dilakukan di RSHP IPB Bogor. Penelitian **tahap kedua** dilanjutkan dengan uji toksisitas subkronis dan kronis, uji antiinflamasi, dan antimetastasis pada galur sel KSSM. Penelitian tahap kedua meliputi pembuatan sediaan nutrisi obat.

4.2. Tempat dan Waktu Penelitian

Tempat penelitian adalah LIPI Bogor dan RSHP IPB, Bogor. Penelitian ini dijalankan setelah mendapat persetujuan dari Komisi Etik Penelitian dan Kesehatan IPB. Waktu penelitian adalah bulan Maret 2019 sampai dengan Mei 2019

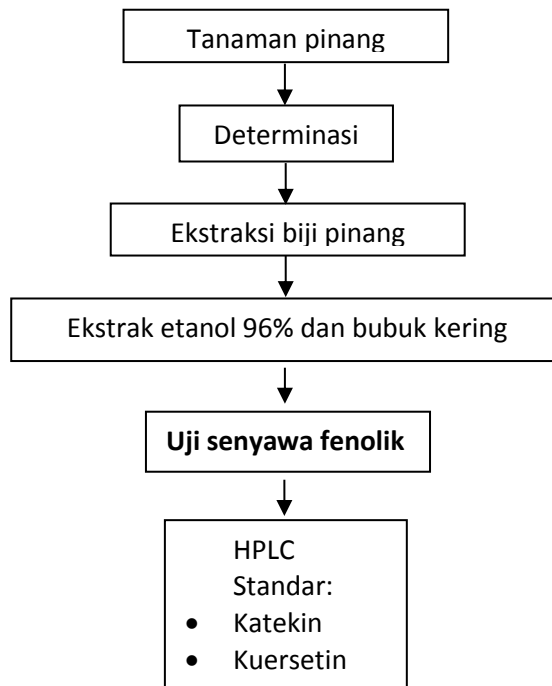
4.3. Bahan Penelitian

Penelitian ini merupakan uji eksperimental laboratorium secara *in vivo* yakni pada tikus Sprague-Dawley dan *in vitro* yang dilakukan galur sel kanker mulut, HSC-3 dan HSC-2. Tahap pertama penelitian adalah uji kandungan senyawa kimia fenolik katekin dan kuersetin, dilanjutkan dengan uji imunomodulatori pada tikus.

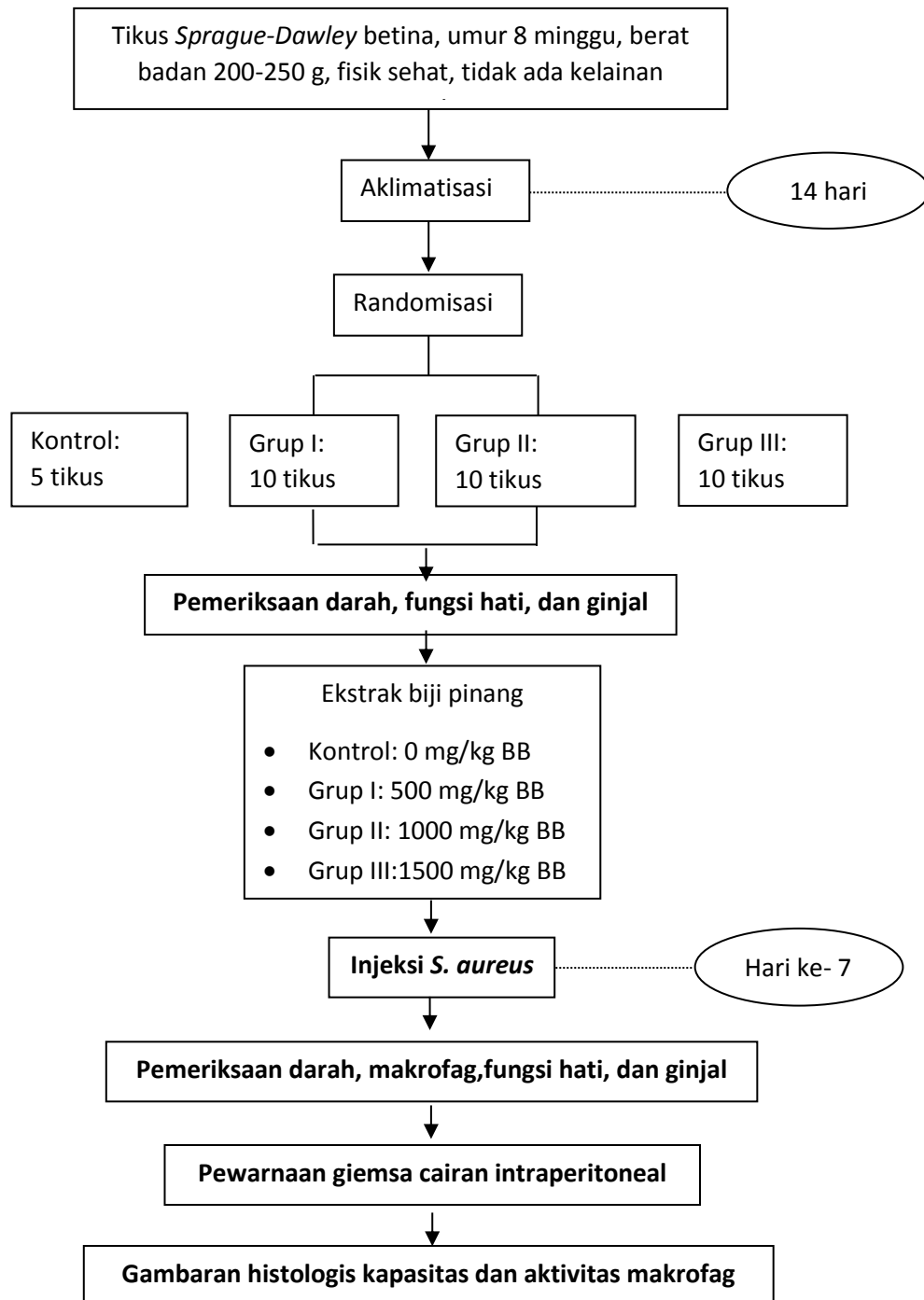
4.4. Besar Sampel Penelitian

Besar sampel minimal dihitung berdasarkan rumus Federer, dimana besar sampel adalah 10 subjek penelitian tiap kelompok untuk uji *in vivo*.

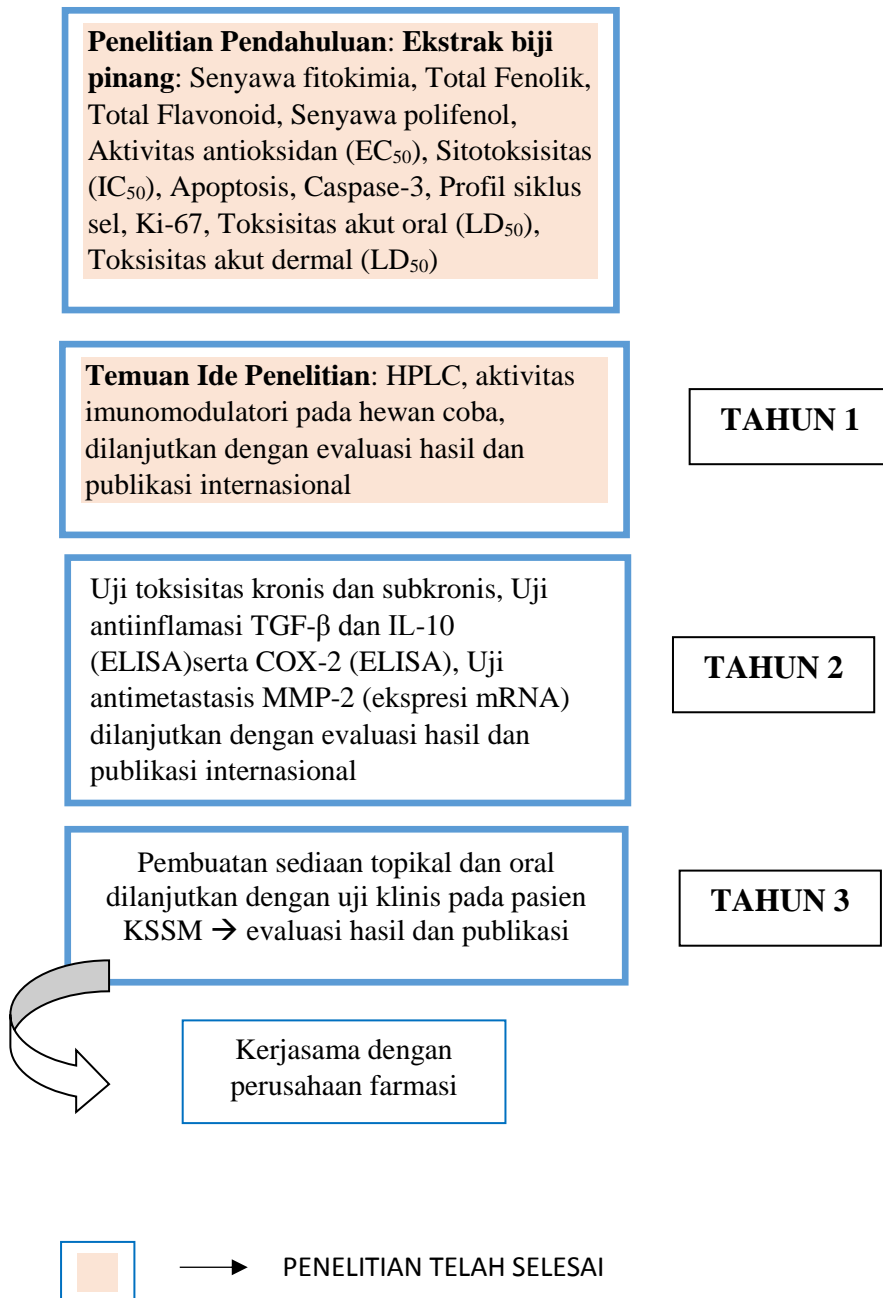
Alir penelitian tahap 1



Alir penelitian tahap 2



Peta jalan penelitian:

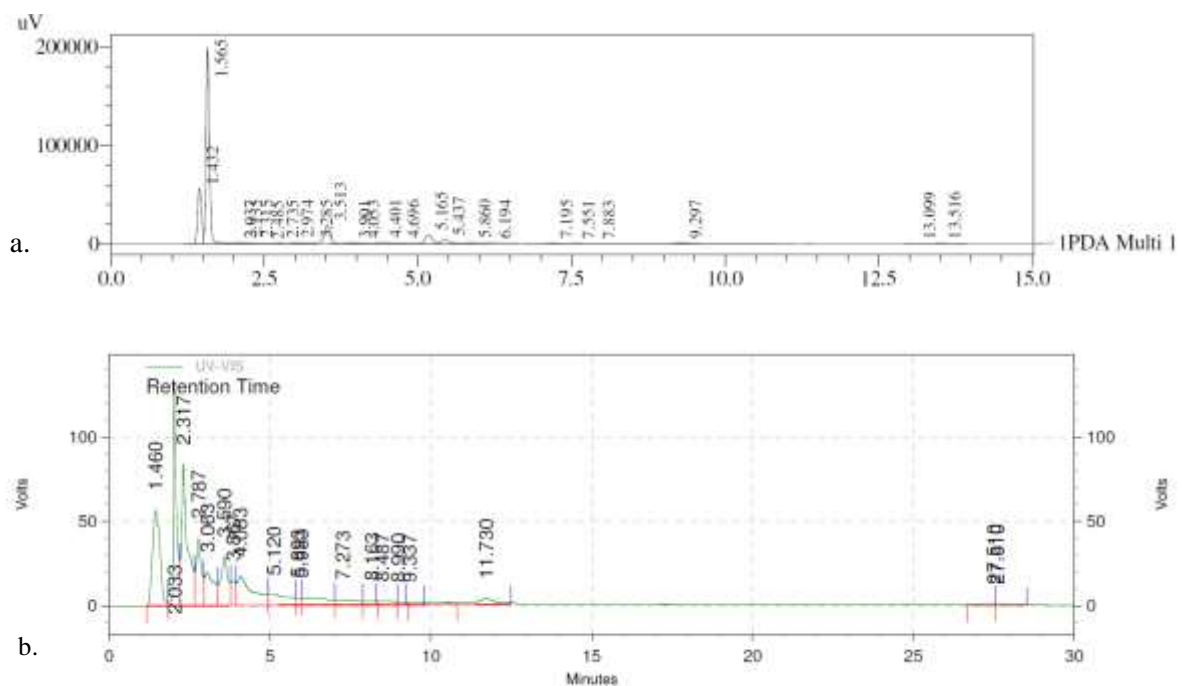


BAB 5

HASIL DAN LUARAN YANG DICAPAI

5.1 Analisis katekin dan kuersetin hasil uji HPLC

Kami menemukan bahwa katekin merupakan senyawa fenolik yang paling tinggi dalam ekstrak biji pinang (2.79 mg/g). Kuersetin juga ditemukan dalam ekstrak, namun dalam jumlah yang lebih kecil (0.14 mg/g). Gambar 1a and b menunjukkan hasil uji HPLC ekstrak biji pinang. Hasil HPLC terdapat dalam lampiran.



Gambar 5.1. Hasil uji *HPLC* ekstrak biji pinang. (a) Catechin, (b) Quercetin.

5.2 Hasil uji imunomodulatori pada tikus

Tabel 5.1 Pemeriksaan terhadap gambaran darah merah dan putih tikus percobaan sebelum pemberian ekstrak biji pinang

	Dosis (g/kgBB)			
	0	0,5	1	1,5
Gambaran darah merah				
Jumlah sel darah merah ($10^6/\text{mm}^3$)	7,78 \pm 0,22 ^a	7,64 \pm 0,61 ^a	7,52 \pm 0,51 ^a	7,22 \pm 0,41 ^a
Hematokrit (%)	42,94 \pm 1,07 ^a	42,18 \pm 2,33 ^a	43,46 \pm 2,29 ^a	41,14 \pm 1,13 ^a
Hemoglobin (g%)	15,48 \pm 0,33 ^a	14,80 \pm 0,82 ^a	15,42 \pm 0,47 ^a	15,06 \pm 0,54 ^a
Gambaran darah putih				
Jumlah sel darah putih ($10^3/\text{mm}^3$)	9,98 \pm 0,70 ^a	10,48 \pm 1,78 ^a	9,86 \pm 1,47 ^a	10,76 \pm 2,35 ^a
Limfosit (%)	68,38 \pm 6,63 ^a	71,00 \pm 7,98 ^a	70,68 \pm 5,99 ^a	67,02 \pm 2,86 ^a
Monosit (%)	9,94 \pm 1,59 ^a	8,72 \pm 4,06 ^a	8,14 \pm 4,66 ^a	9,66 \pm 1,36 ^a
Neutrofil (%)	22,42 \pm 4,34 ^a	20,60 \pm 6,65 ^a	19,84 \pm 1,68 ^a	21,64 \pm 3,77 ^a
Basofil (%)	0,18 \pm 0,13 ^a	0,06 \pm 0,05 ^a	0,08 \pm 0,08 ^a	0,06 \pm 0,05 ^a
Eosinofil (%)	1,08 \pm 0,45 ^a	0,82 \pm 0,46 ^a	1,26 \pm 0,36 ^a	1,02 \pm 0,34 ^a

Keterangan: huruf yang berbeda pada baris yang sama menunjukkan perbedaan yang nyata ($P < 0,05$).

Tabel 5.2 Pemeriksaan terhadap gambaran darah merah, darah putih, dan aktivitas makrofag tikus percobaan pascapemberian ekstrak biji pinang

	Dosis (g/kgBB)			
	0	0,5	1	1,5
Gambaran darah merah				
Jumlah sel darah merah ($10^6/\text{mm}^3$)	7,66 \pm 0,15 ^a	7,64 \pm 0,61 ^a	7,80 \pm 0,27 ^a	7,62 \pm 0,44 ^a
Hematokrit (%)	42,54 \pm 1,17 ^a	43,04 \pm 1,90 ^a	44,40 \pm 0,93 ^a	42,00 \pm 1,38 ^a
Hemoglobin (g/dl)	15,54 \pm 0,79 ^a	14,80 \pm 0,82 ^a	15,28 \pm 0,28 ^a	14,78 \pm 0,58 ^a
Gambaran darah putih				
Jumlah sel darah putih ($10^3/\text{mm}^3$)	9,26 \pm 1,37 ^a	10,88 \pm 1,83 ^{ab}	11,76 \pm 0,63 ^b	11,74 \pm 0,59 ^b
Limfosit (%)	65,98 \pm 4,12 ^a	68,20 \pm 2,35 ^a	71,18 \pm 5,81 ^a	72,16 \pm 3,59 ^a
Monosit (%)	8,32 \pm 0,99 ^a	8,72 \pm 1,43 ^a	8,62 \pm 1,59 ^a	9,12 \pm 1,69 ^a
Neutrofil (%)	24,48 \pm 4,63 ^a	19,40 \pm 5,03 ^a	18,62 \pm 4,56 ^a	17,16 \pm 2,80 ^a
Basofil (%)	0,16 \pm 0,13 ^a	0,06 \pm 0,05 ^a	0,12 \pm 0,04 ^a	0,04 \pm 0,05 ^a
Eosinofil (%)	1,06 \pm 0,46 ^a	1,62 \pm 1,04 ^a	1,46 \pm 0,76 ^a	1,52 \pm 1,13 ^a
Aktivitas makrofag				
Makrofag/100 sel	43,86 \pm 7,06 ^c	71,86 \pm 2,61 ^b	77,14 \pm 5,34 ^{ab}	80,71 \pm 3,35 ^a
	13,71 \pm 2,93 ^b	16,14 \pm 4,41 ^{ab}	19,43 \pm 4,20 ^{ab}	20,57 \pm 4,50 ^a

Keterangan: huruf yang berbeda pada baris yang sama menunjukkan perbedaan yang nyata ($P < 0,05$).

Tabel 5.3 Pemeriksaan biokimia darah tikus percobaan sebelum pemberian ekstrak biji pinang

	Dosis (g/kgBB)			
	0	0,5	1	1,5
SGPT (IU/L)	41,10±7,05 ^a	41,18±5,69 ^a	44,54±7,01 ^a	42,12±8,65 ^a
SGOT (IU/L)	121,70±10,10 ^a	115,72±11,75 ^a	123,98±9,21 ^a	131,48±12,64 ^a
Ureum (mg/dL)	23,21±3,35 ^a	18,78±4,11 ^a	22,77±4,66 ^a	22,85±1,55 ^a
Kreatinin (mg/dL)	0,59±0,07 ^a	0,57±0,02 ^a	0,61±0,07 ^a	0,59±0,03 ^a

Keterangan: huruf yang berbeda pada baris yang sama menunjukkan perbedaan yang nyata (P<0,05).

Tabel 5.4 Pemeriksaan biokimia darah tikus percobaan pascapemberian ekstrak biji pinang

	Dosis (g/kgBB)			
	0	0,5	1	1,5
SGPT (IU/L)	47,76±19,11 ^a	45,18±12,69 ^a	49,72±15,25 ^a	49,80±11,68 ^a
SGOT (IU/L)	137,02±17,08 ^a	140,92±15,45 ^a	142,14±13,89 ^a	142,78±13,31 ^a
Ureum (mg/dL)	22,55±2,54 ^a	18,78±4,11 ^a	22,02±3,44 ^a	22,91±1,06 ^a
Kreatinin (mg/dL)	0,62±0,08 ^a	0,57±0,02 ^a	0,65±0,05 ^a	0,63±0,06 ^a

Keterangan: huruf yang berbeda pada baris yang sama menunjukkan perbedaan yang nyata (P<0,05).

5.3 Luaran yang dicapai

Luaran yang direncanakan dan yang telah dicapai, tertulis pada proposal awal:

- 1 HKI berupa paten (sedang dalam proses)
- 2 Publikasi artikel ilmiah terindeks scopus (*Acceptance* di Veterinary World)
- 3 Buku referensi (sedang dalam pengurusan isbn)
- 4 Sediaan obat (Tahun kedua)
- 5 Publikasi artikel ilmiah di Jurnal Sinta 2 (sudah dipublikasikan)

Luaran yang dicapai:

Artikel jurnal	Jurnal bereputasi internasional
Nama jurnal yang dituju	Veterinary World
Impact factor	0,45 Scopus Q2
Judul artikel	Analysis of phenolic compounds and immunomodulatory activity of areca nut extract from Aceh, Indonesia against <i>Staphylococcus aureus</i> infection in Sprague-Dawley rats
Status naskah	<i>Acceptance</i>

Artikel jurnal	Jurnal bereputasi Nasional terakreditasi
Nama jurnal yang dituju	Dentika Dental Journal USU
Impact factor	Sinta 2
Judul artikel	Sari, L. M. (2019). Catechin: Molecular mechanism of Anti-Cancer Effect.
Status naskah	<i>Published 2019. Dentika Dental Journal, 22(1), 20-25.</i>

Pembicara	Pertemuan ilmiah internasional (seminar)
Judul makalah	Immunomodulatory activity of areca nut extract againsts <i>Staphylococcus aureus</i> infection in Sprague Dawley rats
Nama pertemuan ilmiah	KPPIKG 2019
Tempat pelaksanaan	JCC, Jakarta
Waktu pelaksanaan	10-13 Oktober 2019

BAB 6

SIMPULAN DAN SARAN

Penelitian tahap pertama ini menunjukkan bahwa biji pinang mengandung senyawa fenolik katekin dan kuersetin sebagai penyumbang aktivitas antioksidan. Uji imunomodulatori menunjukkan bahwa ekstrak biji pinang mampu meningkatkan jumlah sel darah putih yang bertindak sebagai respons imun selular terhadap invasi bakteri *S. aureus*. Ekstrak biji pinang juga mampu meningkatkan aktivitas dan kapasitas makrofag dalam menghadapi invasi bakteri *S. aureus*. Selanjutnya, penelitian ini menunjukkan bahwa ekstrak biji pinang bersifat aman karena tidak menimbulkan toksisitas pada hati dan ginjal

DAFTAR PUSTAKA

1. Neville BW, Allen CM, Bouquot JE Squamous cell carcinoma in Oral and maxillofacial pathology. 2nd ed. Philadelphia: WB Saunders; 2002.
2. Khan MA, Saleem S, Shahid SM, Hameed A, Qureshi NR et al. Prevalence of oral squamous cell carcinoma (OSCC) in relation to different chewing habits in Karachi. Pak. J. Biochem. Mol. Biol 2012;45(2):59-63.
3. Ascani G, Messi M, Lupi G, Filosa A, et al. Angiogenesis in oral squamous cell carcinoma. Acts Otorhinolaringol Ital 2003;13-17.
4. Jemal A, Siegel R, Ward E, Hao Y, Xu J, Murray T, et al. Cancer statistic. CA Cancer J Clin 2008;58:71-96.
5. Siegel RL, Miller KD, Jemal A. Cancer statistic. CA Cancer J Clin 2015;65:5-29.
6. Bhandare AM, Kshirsagar AD, Vyawahare NS, et al. Potential analgesic, anti-inflammatory and antioxidant activities of hydroalcoholic extract of *Areca catechu* L. nut. Food Chem. Toxicol 2010;48:3412-17.
7. Jaiswal P, Kumar P, Singh V.K., Singh D.K. *Areca catechu* L.: A valuable herbal medicine againsts different health problems. Res. J. Med. Plant 2011;5(2):145-52.
8. Neville BW, Damm DD, Allen CM, et al. Squamous cell carcinoma in Oral and maxillofacial pathology. 2nd ed. Philadelphia, Pennsylvania: Saunders; 2002.
9. Khan MA, Saleem S, Shahid SM, Hameed A, Qureshi NR, et al. Prevalence of oral squamous cell carcinoma (OSCC) in relation to different chewing habits in Karachi. Pak J Biochem Mol Biol 2012;45(2):59-63.
10. Forastiere A, Koch W, Trotti A, Sidransky D. Head and neck cancer. N Engl J Med 2001;346:1890-900.
11. Deng H, Sambrook PJ, Logan RM. The treatment of oral cancer: an overview for dental professionals Aust Dent J 2011;56:244-52.
12. Tarlovsky V. Role of antioxidant in cancer therapy. Nutrition 2013;29:15-21.
13. Abbot R. Documenting traditional medicine knowledge. Los Angeles: WIPO; 2014.
14. Barnes P. Complementary and alternative medicine use among children: United States 2007. Nat'l Health Stat Rep 2008;1:1-24.
15. Naveen Kumar DR, Cijo George V, Suresh PK, Ashok Kumar R. Cytotoxicity, apoptosis induction and anti-metastatic potential of *Oroxylum indicum* in human breast cancer cells. Asian Pac J Cancer Prev 2012;13(6):2729-34.
16. Mukherjee AK, Basu S, Sarkar N, Ghosh AC. Advances in cancer therapy with plant based natural products. Curr Med Chem 2001;8(12):1467-86.
17. Safarzadeh E, Sandoghchian SS, Baradaran B. Herbal Medicine as Inducers of Apoptosis in Cancer Treatment. Adv Pharm Bull 2014;4(Suppl 1):421-27.
18. Hernani. Pengembangan biofarmaka sebagai obat herbal untuk kesehatan. Buletin Teknologi Pasca Panen Pertanian 2011;7(1):20-30.
19. Fansworth NR, Arkele O, Bingel AS. Medicinal plants in therapy. Bull World Organy 1985;63:456-81.
20. Pal SK, Shukla Y. Herbal medicine: current status and the future. Asian Pac J Cancer Prev 2003;4(4):281-88.
21. Xing Z, Jiao W, Zhuang H, et al. Antioxidant and cytotoxic phenolic compounds of areca nut (*Areca catechu* L.). Chem Res Chinese Universities 2010;26(1):161-64.

22. Hannan A, Karan S, Chatterjee TP. A comparative study of invitro antioxidant capacity of different extract of *areca* seed collected from *Areca catechu* L plant grown in Assam. Int J Pharm Pharm 2012;4(2):420-27.
23. Sazwi NN, Nalina T, Rahim AZH. Antioxidant and cytoprotective activities of *Piper betle*, *Areca catechu*, *Uncaria gambir* and betel quid with and without Calcium hydroxide. BMC Complem Altern M 2013;13(351):1-12.
24. Hamsar MN, Ismail S, Mordi M, et al. Antioxidant capacity and the effect of different parts of *Areca catechu* extracts on glutathione-S-Transferase activity invitro. Free Rad Antiox 2011;1(1):28-33.
25. Bradley B. Arecaidinism: Betel chewing in transcultural perspective. Can J Psychiat 1979;24:481-84.
26. Jaiswal P, Kumar P, Singh VK, et al. *Areca catechu* L.: A valuable herbal medicine againts different health problems. Res J Med Plant 2011;5(2):145-52.
27. Kim BJ, Kim JH, Kim HP, Heo MY. Biological screening of 100 plant extracts for cosmetic use (II): Anti-oxidative activity and free radical scavenging activity. Int J Cosmetic Sci 1997;19:299-307.
28. Kook K, Lee JJ, Cho J, Park, Choi JD. The effects of *Areca Catechu* L Extract on Anti-Inflammation and AntiMelanogenesis. Int J Cosmetic Sci 1999;21(4):275-80.
29. Lee KK, Choi JD. The effects of *Areca catechu* L extract on antiaging. Int J Cosmetic Sci 1999;21(4):285-95.

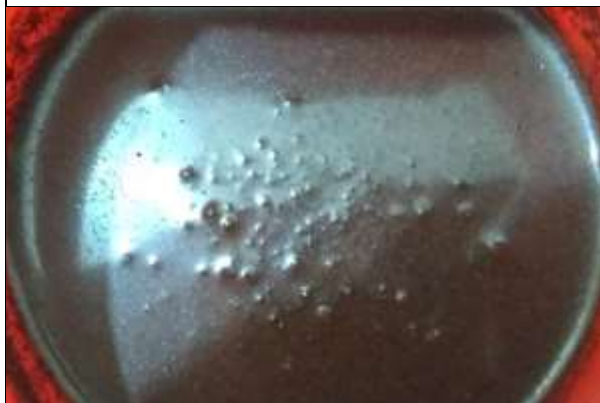
Lampiran 1. Dokumentasi Kegiatan



Penimbangan Pinang



Penimbangan Pinang



Sediaan Pinang Cair



Kelompok Tikus Percobaan



Penimbangan Tikus



Handling Tikus



Pemberian Pinang Secara Oral



Pemberian Pinang Secara Oral



Pemanasan Tikus



Pengambilan Darah



Pengambilan Darah



Pengambilan Darah



Staphylococcus aureus



Penyuntikan SA



Penyuntikan SA



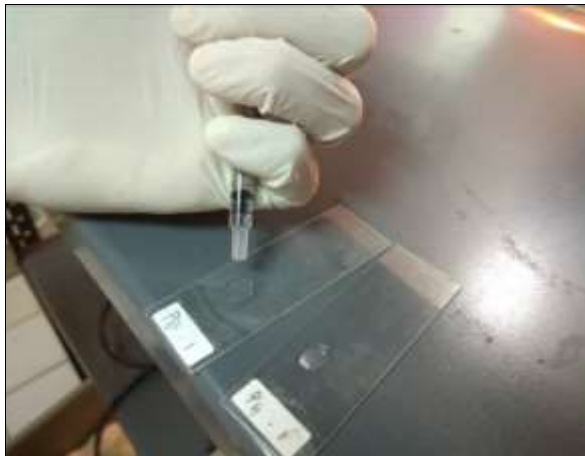
Anestesi



Pengambilan Cairan Peritoneum



Cairan Peritoneum



Pembuatan Preparat Ulas



Penyuntikan SA



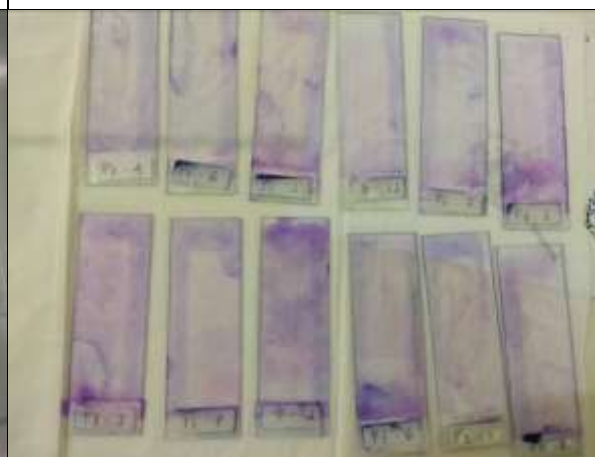
Proses Pewarnaan



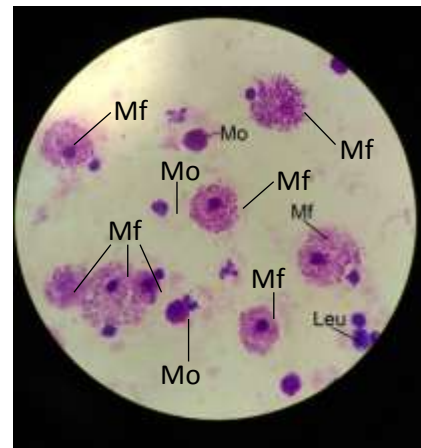
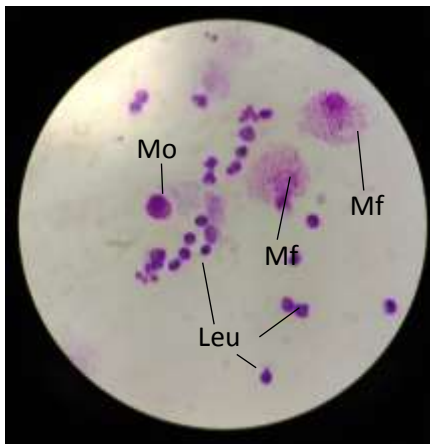
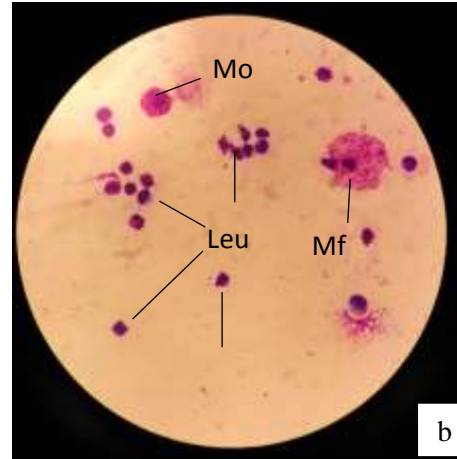
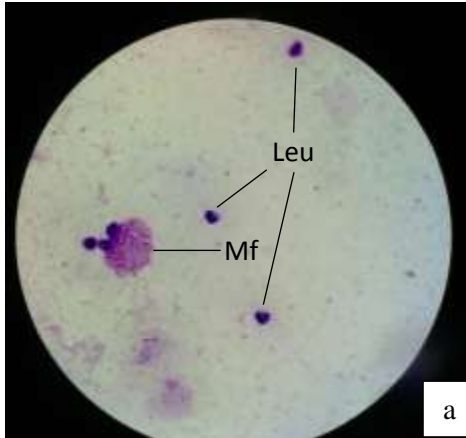
Proses Pewarnaan



Proses Pewarnaan



Proses Pewarnaan



Lampiran 2. Hasil uji kandungan fenolik katekin dan kuersetin melalui uji HPLC



LABORATORIUM PUSAT STUDI BIOFARMAKA

LPPM - INSTITUT PERTANIAN BOGOR

Jl. Taman Kencana No. 03 Bogor 16151

Telp/Fax: +62-251-8373561/ +62-251-8347525;

website: www.biofarmaka.or.id; Email: bfarmaka.lub@gmail.com

No : 739/I3.11.7/LPSB/18

Bogor, 17 Januari 2019

Lampiran : 1 halaman

Perihal : Laporan Hasil Uji

Kepada Yth.

drg. Liza MS

FKG Unsyiah

Aceh

Dengan hormat,

Berdasarkan formulir permohonan analisis order no 024/XII, maka bersama ini kami sampaikan hasil uji analisis laboratorium untuk sampel:

Nama sampel : Biji Pinang

Jenis analisis : Quersetin dan Katekin (HPLC)

Demikian surat ini kami sampaikan semoga dapat dipergunakan sebagaimana mestinya.

Atas kerjasamanya diucapkan terima kasih.

Hormat kami,

Laboratorium Pusat Studi Biofarmaka

LPPM IPB

PUSAT STUDI
BIOFARMAKA
LPPM IPB

Rudi Heryanto, MSi

Manajer Teknis

Hasil pengukuran/pengujian hanya berhubungan dengan barang yang diuji
Dilarang memperbanyak Laporan hasil uji tanpa persetujuan tertulis dari Laboratorium Pusat Studi Biofarmaka, LPPM IPB

**LABORATORIUM PUSAT STUDI BIOFARMAKA**

LPPM - INSTITUT PERTANIAN BOGOR

Jl. Taman Kencana No. 03 Bogor 16151

Telp/Fax: +62-251-8373561/ +62-251-8347525;

website: www.biofarmaka.or.id; Email: bfarmaka.lub@gmail.com**LAPORAN HASIL UJI****No. (sertifikat) 405.020/LPSB IPB/XII/18**

No Order : 024/XII
Nama / Instansi : **drg. Liza MS / FKG Unsyiah**
Alamat : Aceh
Jenis analisis : Quercetin dan Katekin (HPLC)
Tanggal Terima : 17 Desember 2018
Tanggal pengujian : 10 Januari 2019

Nama Sampel	Identitas & keadaan sampel	Parameter	Hasil	Satuan	Teknik Analisis
Biji Pinang	Ekstrak - Padatan	Quercetin	0.14	mg/g	HPLC
		Katekin	2.79	mg/g	HPLC
Keterangan:					

Bogor, 17 Januari 2019

Manajer Teknis,



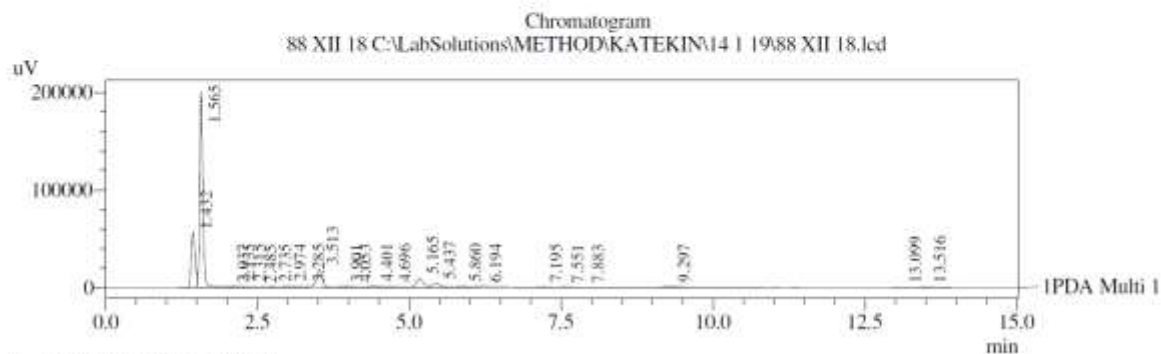
PUSAT STUDI
BIOFARMAKA
LPPM IPB

Rudi Heryanto, MSI

NIP. 19760428 200501 1002

Acquired by : Admin
Sample Name : 88 XII 18
Sample ID : 88 XII 18
Vial# :
Injection Volume : 10 uL
Data Filename : 88 XII 18.lcd
Method Filename : ISO 15 menit modifikasi.lcm
Date Acquired : 1/14/2019 4:05:58 PM
Data Processed : 1/14/2019 4:21:25 PM

Sample Information



1 PDA Multi 1 / 278nm 4nm

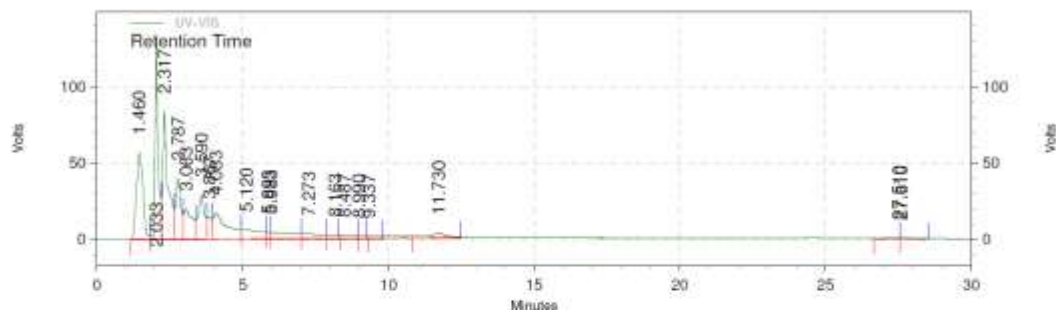
PeakTable

PDA Ch1 278nm 4nm

Peak#	Ret. Time	Area	Height	Area %	Height %
1	1.432	258326	56922	18.350	18.639
2	1.565	736121	201046	52.291	65.831
3	2.037	8344	1044	0.593	0.342
4	2.135	11705	1558	0.831	0.510
5	2.315	6985	787	0.496	0.258
6	2.485	7354	601	0.522	0.197
7	2.735	10225	1271	0.726	0.416
8	2.974	14123	1418	1.003	0.464
9	3.285	9204	750	0.654	0.246
10	3.513	124743	18764	8.861	6.144
11	3.901	11573	1025	0.822	0.335
12	4.053	8626	797	0.613	0.261
13	4.401	15997	1394	1.136	0.457
14	4.696	10584	754	0.752	0.247
15	5.165	77102	8896	5.477	2.913
16	5.437	37696	4101	2.678	1.343
17	5.860	10727	1144	0.762	0.374
18	6.194	11564	782	0.821	0.256
19	7.195	5048	418	0.359	0.137
20	7.551	2671	202	0.190	0.066
21	7.883	1883	143	0.134	0.047
22	9.297	14734	945	1.047	0.309
23	13.099	2298	132	0.163	0.043
24	13.516	10106	502	0.718	0.164
Total		1407739	305398	100.000	100.000

Area % Report

Data File: C:\EZStart\Projects\Default\Data\QUERCETIN\2019\11 1 19\88 XII 18.dat
 Method: C:\EZStart\Projects\Default\Method\QUERCETIN\acn kh2po4 0.025 M 25 75.met
 Acquired: 1/11/2019 3:02:00 PM
 Printed: 1/15/2019 12:13:15 PM



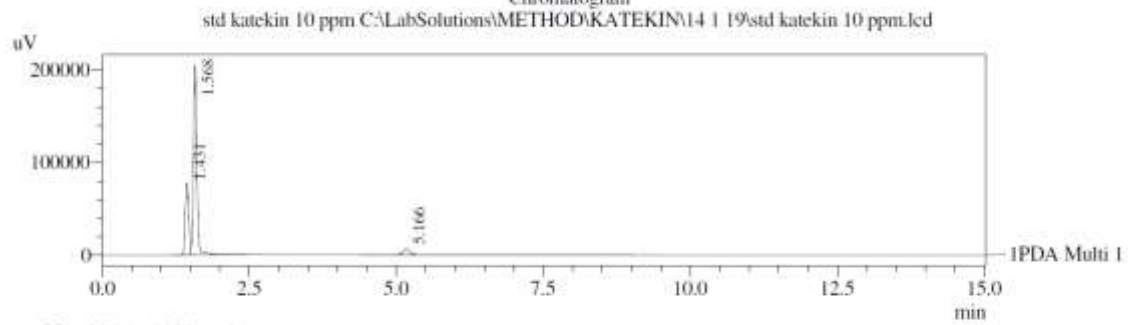
UV-VIS Results

Retention Time	Area	Area %	Height	Height %
1.460	3611666	15.08	226615	13.37
2.033	3543955	14.80	530393	31.30
2.317	4302000	17.96	336511	19.86
2.787	1874363	7.83	158952	9.38
3.063	1593452	6.65	78438	4.63
3.590	1770356	7.39	114822	6.78
3.867	638862	2.67	56805	3.35
4.083	2303217	9.62	68128	4.02
5.120	1066362	4.45	25364	1.50
5.893	163259	0.68	17434	1.03
5.983	885556	3.70	17341	1.02
7.273	575894	2.40	12808	0.76
8.163	215929	0.90	9069	0.54
8.487	284212	1.19	8886	0.52
8.990	103365	0.43	6666	0.39
9.337	161406	0.67	6091	0.36
11.730	613686	2.56	13011	0.77
27.510	120924	0.50	3726	0.22
27.610	118473	0.49	3623	0.21
Totals	23946937	100.00	1694683	100.00

Sample Information

Acquired by : Admin
 Sample Name : std katekin 10 ppm
 Sample ID : std katekin 10 ppm
 Vial# :
 Injection Volume : 10 uL
 Data Filename : std katekin 10 ppm.lcd
 Method Filename : ISO 15 menit modifikasi.lcm
 Date Acquired : 1/14/2019 4:23:39 PM
 Data Processed : 1/14/2019 4:38:44 PM

Chromatogram



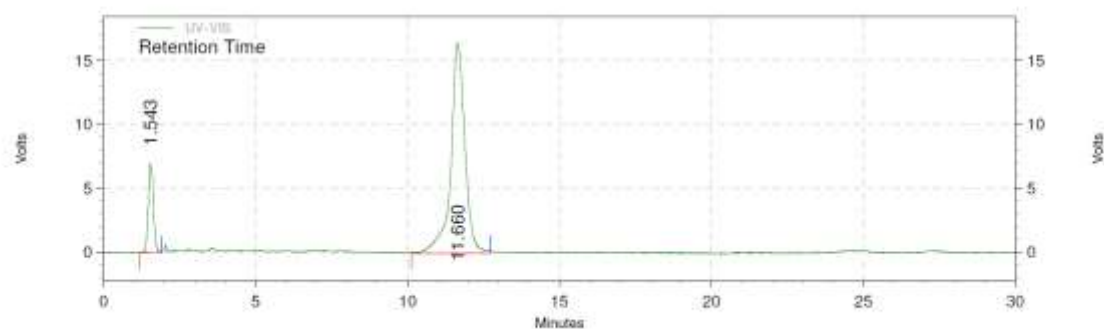
PeakTable

PDA Ch1 278nm 4nm

Peak#	Ret. Time	Area	Height	Area %	Height %
1	1.431	341305	77803	28.326	26.897
2	1.568	808978	204797	67.140	70.799
3	5.166	54632	6666	4.534	2.305
Total		1204915	289266	100.000	100.000

Area % Report

Data File: C:\EZStart\Projects\Default\Data\QUERCETIN\2019\11 1 19\std quercetin 10 ppm.dat
 Method: C:\EZStart\Projects\Default\Method\QUERCETIN\acn kh2po4 0.025 M 25 75.met
 Acquired: 1/11/2019 1:01:20 PM
 Printed: 1/15/2019 12:09:47 PM

**UV-VIS Results**

Retention Time	Area	Area %	Height	Height %
1.543	336437	13.55	27876	29.70
11.660	2146551	86.45	65988	70.30
Totals	2482988	100.00	93864	100.00

Lampiran 3. Lolos kaji etik IPB



KOMISI ETIK HEWAN FAKULTAS KEDOKTERAN HEWAN
(Animal Ethics Committee Faculty of Veterinary Medicine)
INSTITUT PERTANIAN BOGOR
(Bogor Agricultural University)

PERSETUJUAN ETIK
=====

(ETHICAL APPROVAL)

Nomor: 092/KEH/SKE/VIII/2018

Komisi Etik Hewan Fakultas Kedokteran Hewan Institut Pertanian Bogor, telah mengkaji dengan teliti proposal penelitian yang menggunakan subjek Hewan Coba dalam penelitian yang berjudul:
(The Animal Ethics Committee Faculty of Veterinary Medicine Bogor Agricultural University, has been thoroughly reviewed proposal for research with animal subjects in research entitled):

Aktivitas Imunomodulatori Ekstrak Biji Pinang (*Areca Catechu Linn*) Pada Tikus Sprague Dawley.
(Immunomodulatory Activity of Areca Nut Extract (*Areca Catechu Linn*) in Sprague Dawley Rats)

Nama Peneliti Utama
(Principal Researcher)

Pembimbing
(Supervisor)

Nama Institusi
(Institution)

: Dr. Liza Meutia Sari, drg., Sp.PM

: Dr. Drh. Andriyanto, M.Si

: Fakultas Kedokteran Gigi
Universitas Syiah Kuala

proposal tersebut dapat disetujui pelaksanaannya.
(hereby declare that the proposal is approved).

Ditetapkan di (Issued in) : Bogor

Tanggal (Date) : 31 Agustus 2018

Ketua,
Chairman,



Prof Drh Arief Boediono, PhD, PAVet(K)
NIP 19640305 198803 1 002

Keterangan (Notes):

Persetujuan etik ini berlaku selama satu tahun sejak tanggal ditetapkan.
(This ethical clearance is effective for one year from the due date).

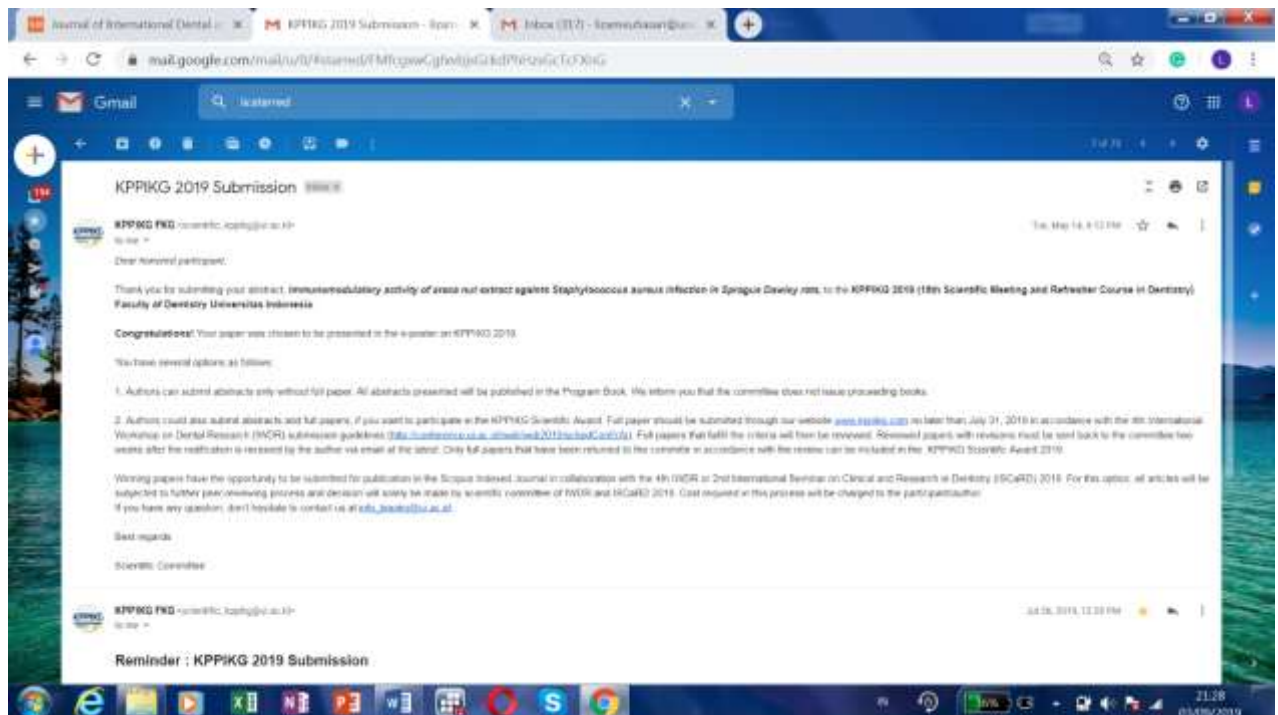
Pada akhir penelitian, laporan pelaksanaan penelitian harus diserahkan ke komisi etik hewan.
(In the end of research, progress and final summary report should be submitted to the animal ethics committee).

Jika ada perubahan atau penyimpangan protokol dan/atau perpanjangan penelitian, harus mengajukan kembali permohonan kajian etik hewan.
(If there be any protocol modification of deviation and/or extension of the study, the principal investigator is required to resubmit to protocol for approval).

Jika ada kejadian serius yang tidak diinginkan harus segera dilaporkan ke komisi etik hewan.
(If there serious adverse events should be immediately reported to the animal ethics committee).



Lampiran 4. Tanda terima presentasi oral di KPPIKG 2019



KPPIKG FKUI <scientific_kppikg@ui.ac.id>

May 14,
2019,
9:12 PM

to me

Dear honored participant,

Thank you for submitting your abstract, ***Immunomodulatory activity of areca nut extract againsts Staphylococcus aureus infection in Sprague Dawley rats***, to the **KPPIKG 2019 (18th Scientific Meeting and Refresher Course in Dentistry) Faculty of Dentistry Universitas Indonesia**.

Congratulations! Your paper was chosen to be presented in the e-poster on KPPIKG 2019.

You have several options as follows:

1. Authors can submit abstracts only without full paper. All abstracts presented will be published in the Program Book. We inform you that the committee does not issue proceeding books.

2. Authors could also submit abstracts and full papers, if you want to participate in the KPPIKG Scientific Award. Full paper should be submitted through our website www.kppikg.com no later than July 31, 2019 in accordance with the 4th International Workshop on Dental Research (IWDR) submission guidelines (<http://conference.ui.ac.id/iwdr/iwdr2019/schedConf/cfp>). Full papers that fulfill the criteria will then be reviewed. Reviewed papers with revisions must be sent back to the committee two weeks after the notification is received by the author via email at the latest. Only full papers that have been returned to the committee in accordance with the review can be included in the KPPIKG Scientific Award 2019.

Winning papers have the opportunity to be submitted for publication in the Scopus Indexed Journal in collaboration with the 4th IWDR or 2nd International Seminar on Clinical and Research in Dentistry (ISCaRD) 2019. For this option, all articles will be subjected to further peer-reviewing process and decision will solely be made by scientific committee of IWDR and ISCaRD 2019. Cost required in this process will be charged to the participant/author.

If you have any question, don't hesitate to contact us at info_kppikg@ui.ac.id.

Best regards

Scientific Committee

Analysis of phenolic compounds and immunomodulatory activity of areca nut extract from Aceh, Indonesia against *Staphylococcus aureus* infection in Sprague-Dawley rats

Liza Meutia Sari¹, Rachmi Fanani Hakim², Zaki Mubarak², Andriyanto Andriyanto³

1. Department of Oral Medicine, Faculty of Dentistry, University of Syiah Kuala, Banda Aceh, Indonesia;
2. Department of Oral Biology, Faculty of Dentistry, University of Syiah Kuala, Banda Aceh, Indonesia;
3. Veterinary Teaching Hospital, Faculty of Veterinary Medicine, Bogor Agricultural University.

Corresponding Author: Liza Meutia Sari, e-mail: lizameutiasari@unsyiah.ac.id

Co-Authors: RFH: rachmifananihakim@gmail.com; ZM: zakimubarak54@yahoo.com;

AA: andrifartok@gmail.com

INTRODUCTION

Currently, worldwide, there is an increase in disease especially infectious diseases that require efficient body defense mechanisms to control them through the process of immunomodulation. Modulation of the immune system denotes to any change in the immune response that can involve induction, expression, amplification or inhibition of any part or phase of the immune response.¹ The importance of a properly functioning and well balanced immune system for maintaining health has become strikingly evident over the past few decades.² The suppression of the immune system is also the cause of many types of disease, like autoimmune diseases, cancer, bacterial and virus infections, and allergies.³ The oral health of medically and immunologically compromised patients is fundamental to the overall care of these patients.⁴ It has become increasingly clear that the oral cavity can act as the site of origin for dissemination of pathogenic organisms to distant body sites, especially in immunocompromised hosts such as patients suffering from malignancies, diabetes, rheumatoid arthritis, having corticosteroid or other immunosuppressive treatment.⁴

The majority of people in developing countries still rely on herbal medicines to meet their health needs, especially in cases where synthetic medicines might have adverse effects to the body health.⁵ Furthermore, a few people especially in developing country rated the natural drug as safer than the synthetic drug. Immunomodulatory drugs modify the response of the immune system by increasing

(immunostimulators) or decreasing (immunosuppressives) the production of serum antibodies.⁶ Immunomodulator drugs have been developed to selectively inhibit or intensify the specific populations and subpopulations of immune responsive cells, i.e. lymphocytes, macrophages, neutrophils, natural killer cells, and cytotoxic T lymphocytes.⁷ Many extract plants have been proved to have immunomodulatory activity in many regions worldwide.⁸⁻¹² Areca nut is one of the palm plants found in almost all regions of Indonesia, especially in Sumatra, Kalimantan, and Sulawesi.¹³ At present, its use as an immunomodulatory drug has not yet been explored. The current study aimed at exploring phytochemical screening, levels of catechin and quercetin compounds using the high-performance liquid chromatography (HPLC), and the immunomodulatory potential of the areca nut in experimental animals.

MATERIALS AND METHODS

Sample preparation

The study materials were obtained from areca nuts of *pinang* plant from Aceh Besar, Indonesia, which was determined and documented by the Botanical Division of Biological Research Center LIPI Cibinong, complete with its roots, stems, leaves, flowers, and seeds in 2018.

Extraction

The sample used was two kilograms of areca nut (gross weight). Areca nut was collected and cleansed from dirt (wet sortation), then washed with running water until clean and drained. Those seeds were dried in the open air and covered from direct sunlight then continued with drying using an oven at 50°C. Dried *simplicia* was crushed using a blender so it became powder and sifted with 20 mesh sieve. The powder was macerated with 96% ethanol solvent. Around 500 grams *simplicia* was put into a container then poured with 96% ethanol, closed and left for three days covered from sunlight, while repeatedly

stirred. After three days the extract was strained, and the remaining extract then was dried. The dried extract was added to 500 mL of 96% ethanol and stirred, after acquiring all extract. The container was closed, left in a cool place and covered from sunlight for two days. The sediment was separated and the liquid extract was obtained. Then the extract was evaporated using rotary evaporator at 30–40°C then concentrated again using water bath so a dense dried extract of areca nut would be obtained. The extract was stored in -20°C. The sample used was two kilograms of areca nut (gross weight). Areca nut was collected and cleansed from dirt (wet sortation), then washed with running water until clean and drained. Those nuts were dried in the open air and covered from direct sunlight then continued with drying using an oven at 50°C. Dried *simplicia* (unprocessed natural ingredient) was crushed using a blender producing a powdered *simplicia* and sifted with 20 mesh sieves. The powder was macerated with 96% ethanol solvent. Around 500 grams of powdered *simplicia* was put into a container, then 1 L of 96% ethanol was added, closed, and until further use.

Preliminary phytochemical screening

The areca nut extract was subjected to preliminary phytochemical screening following standard methods for detection of the following constituents such as alkaloids, tannins, and flavonoids.

Alkaloids

Approximately 20 mL of extract was added to 10 mL of 10% HCl and ammonia until it reached pH 8-9 and heated for 20 min. The mixture was then cooled and added to 5 mL HCl 2% and then used to perform the following tests:

Mayer's test. To the filtrate in test tube I, 1 mL of Mayer's reagent was added drop by drop. The formation of white colored or cream precipitate indicated the presence of alkaloids.

Dragendoff's test. To filtrate in test tube II, 1 mL of Dragendoff's reagent was added drop by drop. The formation of a reddish-brown or orange precipitate indicated the presence of alkaloids.

Tannins

The ethanol extract of areca nut 0,5–1 mL was added to 1-2 ml $\text{Fe}(\text{Cl})_3$ 3%. The formation of blackish-blue precipitate indicated gallate tannin and blackish green indicated catechol tannin. If both are visible, they can be separated by Stiasni reagent, reflux for 30 min, if red deposits occur then this indicates the presence of catechol tannin. A drop of $\text{Fe}(\text{Cl})_3$ was added to the deposits with Natrium acetate. Dark blue indicates gallate tannin.

Flavonoids

The ethanol extract of areca nut 5 mL was evaporated until residue is obtained. Add 1-2 mL of methanol, then heat it at 50°C, then add magnesium and 4-5 mL concentrated hydrochloric acid. The red color indicates the presence of flavonoids.

Analysis of phenolic compounds using HPLC

Separation and purification catechins

HPLC mobile phases. The areca nut extract in 96% ethanol, was separated using Agilent 1100 HPLC system with Phenomenex Luna 5 μm HPLC 250 x 4.6 mm column (Torrance.CA) according to the published modification method.¹⁴ Reverse-phase separation was performed at 30°C using a Waters C18 column (3.9 X 150 nm) (Waters, USA). The mobile phase consisted of (A) 9% acetonitrile:2% acetic acid with 20 $\mu\text{g}/\text{ml}$ EDTA and (B) 80% acetonitrile:2% acetic acid with 20 $\mu\text{g}/\text{ml}$ EDTA. The gradient was programmed at 100% mobile phase A (4.9.1) 10 min, then over 15 min a linear gradient to 68% mobile phase A, 32% mobile phase B (4.9.2) 10 min. The flow rate of the mobile phase: 1.0 mL. The binary gradient conditions are: 100% mobile phase A for 10 min, then over 15 min a linear gradient to 68% mobile phase A, 32% mobile phase B for 10 min. Reset to 100% mobile phase A and allow to equilibrate for 10 min before next injection. The temperature of the column: 35°C. The UV detector was 278 nm.

HPLC analysis. Once the flow rate of the mobile phase and temperature are stable, condition the column with a blank gradient run then inject onto the column 10 μL of each of the mix standard solutions

A, B, and C, followed by an equal volume of diluted areca nut extract. Repeat the injection of the mixed standard solutions at regular intervals. Data collection for all peaks in the mixed standards and test extract solution. Data acquisition and processing were performed using a Lab Solution chromatography manager. The 200 µL of the sample was injected into the HPLC. All samples were analyzed in triplicate.

Separation and purification quercetins

The mobile phase consisted 25% acetonitrile in 0.025 M KH_2PO_4 (pH 2.4) with a flow rate of 0.9 mL/min (eluent). Detector output was sampled using a Nelson (PE Nelson, Cupertino, CA) Series 900 interface and Nelson integrator software (Model 2600, rev. 5.0). Quantification was based on peak area determined by Nelson. A Hewlett-Packard (Palo Alto, CA) model 1040 A photodiode array UV-vis detector was used to record UV spectra of the quercetin. Spectra was recorded at 220-450 nm, 2-nm steps, sampling interval 1280 ms.

Experimental animals

Thirty-five adult male Sprague-Dawley rats of 200-250 g body weight were purchased from the Animal House at Veterinary Medical Teaching Hospital. The animals were housed at 23°-25°C in a well-ventilated animal house under 12/12 h light /dark cycle and fed with standard pellet diet and tap water *ad libitum*. Bedding material was removed and replaced with fresh paddy husk as often as necessary to keep the animals clean and dry. This study was carried out according to guidelines for animal experimentation and approved by the institutional ethical committee of Veterinary Medical Teaching Hospital, Bogor Agricultural University (092/KEH/SKE/VIII/2018). The rats were quarantined for 14 days before being entered into the experiment.

Bacteria

Staphylococcus aureus (*S. aureus*) was planted in the media and suspended in a peptone broth solution.

Determination of the effect of areca nut extract on the hematological and biochemical parameters

The plant extract was suspended in normal saline and administered orally for 7 days. The dose-volume was 10 mL. Rats were divided into four equal groups, the control group (n=10) received the same volume of normal saline and left untreated respectively. Animals were divided into four groups. Each group comprised a minimum of five animals. Group I (control) received normal saline; group II, areca nut extract 500 mg/ body weight; group III, areca nut extract 1000 mg/ body weight; group IV, areca nut extract 1500 mg/ body weight. Two blood samples were taken from all rats at the beginning and end of the experiment by retro-orbital venous plexus puncture. The first blood sample collected with anticoagulant ethylenediaminetetraacetic acid tripotassium (EDTA) for erythrogram hematocryte (Hct), hemoglobin concentration (Hb), red blood count (RBCs), total leucocytic count (TLC), and its differential cell. Previous tests were done using an automatic cell counter. The second blood sample was collected without anticoagulants and processed for serum biochemical analyses. Serum samples were stored at -20°C until further biochemical analysis. This analysis includes determination of serum glutamate oxalate transaminase (SGOT), serum glutamate pyruvate transaminase (SGPT), ureum, and creatinin. Test kits were supplied by BiouMerieux-France. After blood was taken, the rats were challenged by one dose intraperitoneal injection of isolated strain of 2 mL *S. aureus* strain (1×10^6 CFU/mL) and kept under observation for one hour. The experimental rats were anesthetized using ketamine (25 mg/kg BW) and Xylazine (10 mg/kg BW) injection intramuscular. All rats were euthanized by the end.

Phagocytosis Assay

On the fourteenth day, each rat was injected intraperitoneally with 0.5 mL of *S. aureus* suspension and left for one hour. The rats were euthanized with ether and then dissected its stomach. Peritoneal fluid was taken using a micropipette and daubed on an object glass and fixed with methanol for 5 minutes, then stained with giemsa staining and rinsed. Phagocytic activity is determined based on the number of phagocytic cells that actively carry out the phagocytic process in 100 cells. Phagocytic capacity is determined based on the number of *S. aureus* which was phagocytosis by 50 active phagocytic cells.¹⁵

Statistical analysis

Qualitative data analysis for HPLC was determined by comparing the catechin and quercetin compounds in areca nut extract and their standards at the same retention time. Quantitative data is calculated based on the level of the regression equation $Y = a + bx$, then the ratio of the total area of concentration and the total content of the polyphenol compounds are calculated in grams of extract. All data in the immunomodulatory analysis were subjected to statistical analysis including the calculation of the mean and standard error (Mean \pm SE). Significance between hematological, biochemical, and phagocytosis assay parameters in control and treated groups were evaluated by one way ANOVA at level $p < 0.05$ using SPSS for windows version 15.

RESULTS

Qualitative phytochemical analysis

The phytochemical screening indicated the presence of alkaloids, tannin, and flavonoid. Positive tannin compounds produce black-green filtrate, ie catechol-tannin compounds. Flavonoid compounds showed a brownish-red color. Alkaloid compounds showed the presence of white-yellowish deposits with Mayer reagents and orange deposits with Dragendorff which indicated the formation of alkaloid salts. The precipitate arose due to alkaloids which are nitrogenous base-reacting compounds with hydrochloric acid to form insoluble salts.

Analysis of catechin and quercetin using HPLC

The crude extract from areca nut was investigated for the presence of catechin and quercetin. In this study, we found that catechin is the highest phenolic compound in the areca nut extract (2.79 mg/g). In comparison with catechin, quercetin is found in much smaller amounts in the areca nut extract (0.14 mg/g). **Figure 1a** and **b** show the HPLC traces of the areca nut. The phenolic compounds in the extract were detected by comparing the retention times of the peaks with the standards. Several peaks did not

correspond to the standards used in the HPLC analysis were observed in the chromatogram of the extract, between retention times 15-25 min.

Figure 1. High performance liquid chromatogram of the areca nut extract. (a) Catechin, (b) Quercetin.

Analysis of hematology profile

This research is the first study to investigate the ability of areca nut extract in affecting the immune cells *in vivo*. The hemogram (**Table 1**) showed that after 2 weeks post areca nut extract administration and after 1-hour post-challenge with *S. aureus* didn't show the significant changes in RBCs count in all groups. The significant changes were only found in the WBCs of all group with treatment. The areca nut increased WBCs in G2, G3, and G4 (17.49%, 26.99%, and 26.78%, respectively).

Analysis of macrophage activity and capacity

Our study found that areca nut increased the activity and capacity of macrophage. The significant increases were found in all treatment group (**Table 2**). The histopathological findings showed the monocytes, macrophages, and leukocytes which increase in number with increasing dose treatment (**Fig 2**).

Figure 2. Intraperitoneal fluid in giemsa staining. a. The control group showing leukocytes and monocytes, b. Group 2 (500 mg/kg BW) showing an increase in the number of leukocytes, and monocytes, c. Group 3 (1000 mg/kg BW) showing leukocytes, monocytes, and macrophages, d. Group 4 showing macrophages. Mf = Macrophage Fagocyte, Mo = Monocyte, Leu = Leukocyte.

Analysis of serum biochemistry

Serum SGPT, SGOT, ureum, and creatinin showed non-significant change in all groups after one hour of challenge (**Table 3**). These results showed that areca nut extract didn't cause impaired liver and kidney function after 14 days treatment and 1-hour post-challenge with *S. aureus*.

DISCUSSION

To our knowledge, our study is the first to examine the ability of areca nut extract to modulate the immune system, both in stimulating or suppressing the immune system that aims to maintain disease-free state in the body. The basic strategy underlying immunomodulation is to identify aspects of the host response that can be enhanced or suppressed in such a way as to augment or complement a desired immune response.¹⁶ There is a decline in the functional capacity to elicit generalized and specific immune responses with increasing age, and regulatory cells show a decrease in production and response to regulatory signals.¹⁷ Immunomodulators have therefore been used globally to control disease conditions.

The phytochemical content in the areca nut extract is the phenolic content such as flavonoids, tannins, and alkaloids. We identified the presence of catechin and quercetin through HPLC analysis. These two compounds are well-known antioxidants and could have contributed to the observed antioxidant activity.¹⁸ Previous studies have identified several phenolic compounds in the areca nuts including trimer procyanidin, dimer procyanidin (B1 dan B2), catechin, and isorhamnetin 3-O-rutinoside.¹⁹ Many of these compounds have antioxidants activities.^{20, 21} Catechin was proved to have strong antioxidant activity which could contribute towards the anti-cancer effects.²²⁻²⁵ It has also been shown that polymerized catechin suppresses the activity of *Staphylococcus aureus* α -toxin and as an effective urease inhibitor in *Staphylococcus saprophyticus* strains.²⁶⁻²⁸ Further study is needed to determine the types of catechins in areca nut. Although the level of quercetin is not much in areca nut extract, it also has been proved as an antioxidant. It possesses an anti-inflammatory potential that can be expressed in different cell types, both in animal and human models.²⁹ Quercetin is also able to inhibit the growth of cancer cells through induction of apoptosis and inhibitory proliferation in gastrointestinal, breast, esophagus, and ovary cancer.³⁰

In the present study, areca nut extract was found to increase the white blood cell count post-challenge with *S. aureus* induction significantly indicating that the extract could stimulate the hemopoetic system. Other study found that areca nut extract can induce calcium signals in at least three immune cell lines and human primary immune cells (PBMCs), inducing the production of pro-inflammatory cytokines. Further separation of the PBMCs into T cells, B cells, and monocytes would potentially be of interest in elucidating specific responses to each cell subtype.³¹ However, areca nut extract can also induce antigen-specific immune responses and promote inflammatory reactions *in vivo*, which may contribute to immune deregulation associated with areca-related diseases.³² In our opinion, the study of areca nut as an immunomodulatory drug still cause various results. It depends on the content of polyphenolic compound in the areca nut extract which greatly affects the efficacy of the nut.

The result of the activity and capacity of macrophage assay showed the increase in all groups including the control group. We noted that increasing the dose, the activity and the number of macrophages also increases. The areca nut extract probably stimulates the proliferation of macrophages, which in turn leads to the activation of macrophage activity. Further study is needed to find out how extract can increase macrophage activity and capacity. However, not only is the effect of the treatment given, but the increase in macrophage activity against *S. aureus* infection might also be caused by the internal factor of the macrophage itself. The previous study reported the role of macrophage transmembrane expression that suppressed the *S. aureus*-induced production of nitric oxide and proinflammatory cytokines in mouse macrophages.³³ Moreover, it has been reported by several groups that this bacterium can invade and survive within a variety of cells such as neutrophils, macrophages, T-lymphocytes, epithelial cells, endothelial cells, fibroblasts, and osteoblasts which may be related to the intracellular persistence of bacteria within host cells.³⁴⁻³⁶

Next, the markers of biochemical examination did not show changes in liver and kidney in all groups after two weeks treatment and one hour before and post-challenge with *S. aureus*. This study is in line with previous studies which revealed that the areca nut consumed in the long term in humans does not cause hepatotoxicity.^{37,38} However, another study showed that raw areca nut given for 28 days caused

mild hepatotoxicity and nephrotoxicity in mice.³⁹ Further research is needed to determine the safety limit of areca nut extract for liver and kidney function.

CONCLUSION

Based on the findings from the study, the areca nut extract increased the white blood cell count and macrophages in rats. This could be attributed to the phytochemicals present in the areca nut. Further studies are required to confirm these preliminary findings, to develop an effective immunomodulatory drug with no adverse side effects.

Conflict of interests

None.

REFERENCES

1. Nagarathna PKM, Reena K, Reddy S, Wesley J. Review on immunomodulation and immunomodulatory activity of some herbal plants. *Int J Pharm Sci Rev Res* 2013;22(1):223-30.
2. Wichers H. Immunomodulation by food: promising concept for mitigating allergic disease? *Anal Bioanal Chem* 2009;395:37-45.
3. Stromberg SP, Carlson JM. The suppression of immune system disorders by passive attrition. *PLoS ONE* 2010;5(3):e9648.
4. Rautemaa R, Lauhio A, Cullinan MP, Seymour GJ. Oral infections and systemic disease-an emerging problem in medicine. *Clin Microbiol Infect* 2007;13:1041-47.
5. Meier BP, Lappas CM. The influence of safety, efficacy, and medical condition severity on natural v.synthetic drug preference. *Med Decis Making* 2015;XXXX(X):1-11.
6. Avorn J. Learning about the safety of drugs. A half-century of evolution. *N Engl J Med* 2011;365:2151-53.
7. Martinez AB, Mattila R, Font RG, Meurman JH. Immunomodulatory drugs: Oral and systemic adverse effects. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal* 2014;1(19):e24-31.
8. Sunil MA, Sunitha VS, Radhakrishnan EK, Jyothis M. Immunomodulatory activities of *Acacia catechu*, a traditional thirst quencher of South India. *J Ayurveda Integr Med* 2018;xxx:1-8.
9. Davis L, Kuttan G. Immunomodulatory activity of *Withania somnifera*. *J Ethnopharmacol* 2000;71:193-200.
10. Nassar SA, Mohamed AM, Sedky D, Shemy AE, Allam AM. Oral and intraperitoneal administration of B-Glucan and its immunomodulatory effect against *Staphylococcus aureus* infection in rats. *eIJPPR* 2018;8(2):1-7.

11. Attard E, Cuschieri A. *In vitro* immunomodulatory activity of various extracts of Maltese plants from the Asteraceae family. J Med Plants Res 2009;3(6):457-61.
12. Sharififar F, Pournourmohammadi S, Arabnejad M, Rastegarianzadeh R, Ranjbaran O, et al. Immunomodulatory activity of aqueous extract of *Heracleum persicum* Desf. in mice. IJPR 2009;8(4):287-92.
13. Barlina R. Peluang pemanfaatan buah pinang untuk pangan. Buletin Palma 2007;33:96-105.
14. Zuo Y, Chen H, Deng Y. Simultaneous determination of catechins, caffeine, and gallic acids in green, oolong, black, and pu-erh teas using HPLC with a photodiode array detector. Talanta 2002;57(2):307-16.
15. Atlas RM. Phagocytosis in Microbiolog Fundamentals and Application. New York: Macmillan Company; 1984. p. 476-88.
16. Ahirwal L, Singh S, Dubey MK, Bharti V, Mehta A, Shukla S. In vivo immunomodulatory effects of the methanolic leaf extract of *Gymnema sylvestre* in Swiss albino mice. Arch Biol Sci 2015;67(2):561-70.
17. Nfambi J, Bbosa GS, Sembajwe LF, Gakunga J, Kasolo JN. Immunomodulatory activity of methanolic leaf extract of *Moringa oleifera* in Wistar albino rats. J Basic Clin Physiol Pharmacol 2015;26(6):603-11.
18. Wolfe KL, Liu RH. Structure-activity relationships of flavonoids in the cellular antioxidant activity assay J Agric Food Chem 2008;56:8404-11.
19. Sazwi NN, Nalina T, Rahim AZH. Antioxidant and cytoprotective activities of *Piper betle*, *Areca catechu*, *Uncaria gambir* and betel quid with and without calcium hydroxide. BMC Complement Altern M 2013;13(351):1-12.
20. Lambert JD, and Elias RJ. The antioxidant and pro-oxidant activities of green tea polyphenols: A role in cancer prevention. Arch Biochem Biophys 2010;501:65-72.
21. Wetwitayaklung P, Paechamud T, Limmatvapirat C, et al. The study of antioxidant capacity in various parts of *Areca catechu* L. Naresuan Univ J 2006;14(1):1-14.
22. Khiewkamrop P, Phunsomboon P, Richert L, Pekthong D, Srisawang P. Epistuctured catechins, EGCG, and EC facilitate apoptosis induction through targeting de novo lipogenesis pathway in HepG2 cells. Cancer Cell Int 2018;18(46):1-13.
23. Zaveri NT. Green tea and its polyphenolic catechins: medicinal uses in cancer and noncancer applications. Life Sci 2006;78:2073-80.
24. Singh BN, Shankar S, Srivastava RK. Green tea catechin, epigallocatechin-3-gallate (EGCG): mechanisms, perspectives, and clinical applications. Biochem Pharmacol 2011;82(12):1807-21.
25. Mayr C, Wagner A, Neureiter D, Pichler M, Jakab M, et al. The green tea catechin epigallocatechin gallate induces cell cycle arrest and shows potential synergism with cisplatin in biliary tract cancer cells. BMC Complement Altern Med 2015;15(194):1-7.
26. Choi O, Yahiro K, Morinaga N, Miyazaki M, Noda M. Inhibitory effects of various plant polyphenols on the toxicity of Staphylococcal alpha-toxin. Microb Pathog 2007;42:215–24.
27. Loes AN, Ruyle L, Arvizu M, Gresko KE, Wilson AL, et al. Inhibition of urease activity in the urinary tract pathogen *Staphylococcus saprophyticus*. Lett Appl Microbiol 2014;58:31-41.
28. Elkirdasyi A, Shousha S, Alrohaimi AH, Arshad MF. Hematological and immunobiochemical study of green tea and ginger extracts in experimentally induced diabetic rabbits. Acta Pol Pharm Drug Rese 2015;72(3):497-506.
29. Gerates L, Moonen HJJ, Brauers K, Wouters EFM, Bast A, et al. Dietary flavones and flavonols are inhibitor of poly (ADP-ribose) polymerase-1 in pulmonary epithelial cells J Nutr 2007;137: 2190–95.
30. Ramamoorthy P, Bono A. Antioxidant activity, total phenolic, and flavonoid content of *Morinda citrifolia* fruit extracts from various extraction processes. IJEST 2007;2(1):70-80.
31. Faouzi M, Neupane RP, Yang J, Williams P, Penner R. Areca nut extracts mobilize calcium and release pro-inflammatory cytokines from various immune cells. Sci Rep 2018;1075:1-13.

32. Wang CC, Lin HL, Wey SP, Jan TR. Areca nut extract modulates antigen-specific immunity and augments inflammation in ovalbumin-sensitized mice. *Immunopharmacol Immunotoxicol* 2011;33(2):15-22.
33. Zhu B, Yu Y, Liu X, Han Q, Kang Y, et al. CD200 Modulates *S. aureus*-Induced Innate Immune Responses Through Suppressing p38 Signaling. *Int J Mol Sci* 2019;20(659):1-15.
34. Hamza T, Li B. Differential responses of osteoblasts and macrophages upon *Staphylococcus aureus* infection. *BMC Microbiol* 2014;14(207):1-11.
35. Kubica M, Guzik K, Koziel J, Zarebski M, Richter W, et al. A potential new pathway for *Staphylococcus aureus* dissemination: the silent survival of *S. aureus* phagocytosed by human monocyte-derived macrophages. *PLoS One* 2008;3(1):e1409.
36. Gresham HD, Lowrance JH, Caver TE, Wilson BS, Cheung AL, Lindberg FP. Survival of *Staphylococcus aureus* inside neutrophils contributes to infection *J Immunol* 2000;164(7):3713–22.
37. Singroha K, Kamath VV. Liver function tests as a measure of hepatotoxicity in areca nut chewers. *J Dent Res Rev* 2016;3(2):1-5.
38. Pai SR, Shirke AJ, Gothoskar SV. Longterm feeding study in C17 mice administered saccharin coated betel nut and 1,4dinitrosopiperazine in combination. *Carcinogenesis* 1981;2:175-77.
39. Lohith TS, Shridhar NB, Dilip SM, Jayashree P, Suhasini K. Repeated dose 28-day oral toxicity study of raw areca nut extract in rats. *Int Res J Pharm* 2013;4(5):238-40.

Table 1. Hematology profile of rats pre and post-treated with areca nut extract and post-challenge with *S. aureus* (Mean±SE)

Parameter	Interval (Days)	Group (mg/kg BW)				Significance
		G1 (Control)	G2 (500)	G3 (1000)	G4 (1500)	
Red blood cell count (x10 ⁶ /mm ³)	0	7.78±0.22	7.64±0.61	7.52±0.51	7.22±0.41	NS
	14	7.66±0.15	7.64±0.61	7.80±0.27	7.62±0.44	NS
Hematocrite (%)	0	42.94±1.07	42.18±2.33	43.46±2.29	41.14±1.13	NS
	14	42.54±1.17	43.04±1.90	44.40±0.93	42.00±1.38	NS
Hemoglobin (g%)	0	15.48±0.33	14.80±0.82	15.42±0.47	15.06±0.54	NS
	14	15.54±0.79	14.80±0.82	15.28±0.28	14.78±0.58	NS
White blood count cell (x10 ³ /mm ³)	0	9.98±0.70	10.48±1.78	9.86±1.47	10.76±2.35	NS
	14	9.26±1.37	10.88±1.83	11.76±0.63	11.74±0.59	*
Lymphocyte (%)	0	68.38±6.63 ^a	71.00±7.98 ^a	70.68±5.99 ^a	67.02±2.86 ^a	NS
	14	65.98±4.12 ^a	68.20±2.35 ^a	71.18±5.81 ^a	72.16±3.59 ^a	NS
Monocyte (%)	0	9.94±1.59 ^a	8.72±4.06 ^a	8.14±4.66 ^a	9.66±1.36 ^a	NS
	14	8.32±0.99 ^a	8.72±1.43 ^a	8.62±1.59 ^a	9.12±1.69 ^a	NS
Neutrophyl (%)	0	22.42±4.34 ^a	20.60±6.65 ^a	19.84±1.68 ^a	21.64±3.77 ^a	NS
	14	24.48±4.63 ^a	19.40±5.03 ^a	18.62±4.56 ^a	17.16±2.80 ^a	NS
Basophyl (%)	0	0.18±0.13 ^a	0.06±0.05 ^a	0.08±0.08 ^a	0.06±0.05 ^a	NS
	14	0.16±0.13 ^a	0.06±0.05 ^a	0.12±0.04 ^a	0.04±0.05 ^a	NS

Eusinophyl (%)	0	1.08±0.45 ^a	0.82±0.46 ^a	1.26±0.36 ^a	1.02±0.34 ^a	NS
	14	1.06±0.46 ^a	1.62±1.04 ^a	1.46±0.76 ^a	1.52±1.13 ^a	NS

Means with different superscripts in the same rows are significantly different at P<0.05.
NS = Non significant. * = P<0.05

Table 2. Macrophage profile from the intraperitoneal fluid of rats pre and post-treated with areca nut extract and after one-hour post-challenge with *S. aureus* (Mean±SE)

Parameter	Interval (Days)	Group (mg/kg BW)				Signifi cance
		G1 (Control)	G2 (500)	G3 (1000)	G4 (1500)	
Macrophage activity	14	43.86±7.06 ^c	71.86±2.61 ^b	77.14±5.34 ^{ab}	80.71±3.35 ^{ab}	*
Macrophage/ 100 cells	14	13.71±2.93 ^b	16.14±4.41 ^{ab}	19.43±4.20 ^{ab}	20.57±4.50 ^b	*

Means with different superscripts in the same rows are significantly different at P<0.05.
NS = Non significant. * = P<0.05

Table 3. Serum biochemistry of rats pre and post-treated with areca nut extract and post-challenge with *S. aureus* (Mean±SD)

Parameter	Inter val (Day s)	Group (g/kg BW)				Significance
		G1 (Control)	G2 (0.5)	G3 (1)	G4 (1.5)	
SGPT	0	41.10±7.05 ^a	41.18±5.69 ^a	44.54±7.01 ^a	42.12±8.65 ^a	NS
(IU/L)	14	47.76±19.11 ^a	45.18±12.69 ^a	49.72±15.25 ^a	49.80±11.68 ^a	NS
SGOT	0	121.70±10.10 ^a	115.72±11.75 ^a	123.98±9.21 ^a	131.48±12.64 ^a	NS
(IU/L)	14	137.02±17.08 ^a	140.92±15.45 ^a	142.14±13.89 ^a	142.78±13.31 ^a	NS
Ureum	0	23.21±3.35 ^a	18.78±4.11 ^a	22.77±4.66 ^a	22.85±1.55 ^a	NS
(mg/dL)	14	22.55±2.54 ^a	18.78±4.11 ^a	22.02±3.44 ^a	22.91±1.06 ^a	NS
Creatinin	0	0.59±0.07 ^a	0.57±0.02 ^a	0.61±0.07 ^a	0.59±0.03 ^a	NS
(mg/dL)	14	0.62±0.08 ^a	0.57±0.02 ^a	0.65±0.05 ^a	0.63±0.06 ^a	NS

Means with different superscripts in the same rows are significantly different at P<0.05.
NS = Non significant. * = P<0.05

Lampiran 7. Personalia tenaga peneliti dan kualifikasinya

No	Nama/NIP	Instansi asal	Kualifikasi
1	Dr. Liza Meutia Sari, drg., SpPM /19731221 2006042 001	FKG Unsyiah	Ilmu Penyakit Mulut
2	Rachmi Fanani Hakim, drg., M.Si/197705262008012012	FKG Unsyiah	Biologi oral
3	Prof. Dr. Zaki Mubarak, drg., M.Si	FKG Unsyiah	Mikrobiologi
4	Dr. Andriyanto, drh	IPB	Farmakologi

