



Pengaruh Pemberian Ekstrak Daun Kola (*Cola nitida*) Pada Kualitas Sperma Manusia *In Vitro*

Effect of Kola (Cola Nitida) Leaf Extract on Human Sperm Quality In Vitro

T. Susmiarsih¹ dan Susi Endrini²

¹Department of Biology, Faculty of Medicine, YARSI UNIVERSITY, Jakarta

²Department of Biochemistry, Faculty of Medicine, YARSI UNIVERSITY, Jakarta

KATA KUNCI Kola; kualitas sperma; motilitas; integritas membrane
KEYWORDS Cola nitida; sperm quality; motility; membrane integrity

ABSTRAK Studi terhadap tanaman yang berpengaruh terhadap proses reproduksi masih menjadi skala prioritas. Salah satunya adalah Kola (*Cola nitida*), yang dikenal mempunyai efek stimulan. Telah dilakukan studi untuk mengetahui pengaruh ekstrak daun Kola terhadap viabilitas, motilitas dan integritas membran spermatozoa manusia *in vitro*. Sampel sperma diperoleh dari 20 orang pria dengan kategori normozoospermia. Sampel semen dibagi menjadi 1 kelompok kontrol (kontrol negatif) dan 2 kelompok perlakuan dengan ekstrak daun Kola (0.05% dan 0.025%). Hasil penelitian menunjukkan bahwa ekstrak daun Kola tidak berpengaruh terhadap viabilitas spermatozoa tetapi secara bermakna meningkatkan motilitas dan integritas membran spermatozoa ($p < 0.05$). Hasil ini mengindikasikan bahwa ekstrak daun Kola berpengaruh terhadap kualitas spermatozoa manusia *in vitro*.

ABSTRACT Study on medicinal plants that have potential effect on reproductive process is still important to be done. One of the plant is Kola (*Cola nitida*) that has a stimulant effect. This study evaluated the effects of Kola leaf extract toward viability, motility and membrane integrity on human sperm *in vitro*. Normozoospermia semens from twenty volunteers were taken and divided into 3 groups: 1 group was treated as control and 2 groups were treated with Kola leaf extracts (0.05% dan 0.025%). The results showed that Kola leaf extract had no significant effect in viability but increased significantly ($p < 0.05$) the motility and membrane integrity. It indicates that Kola leaf extract influences human semen quality *in vitro*.

Kola merupakan tanaman asli Afrika Barat dan Sudan yang sejak dulu banyak dikonsumsi untuk stimulan. Ekstrak biji kola digunakan dalam industri makanan sebagai bahan penambah rasa. Dua spesies tanaman yang banyak dipakai dalam industri makanan adalah *Cola nitida* (Vent.) Schott et

Endl. dan *Cola acuminata* (Beauv.) Schott et Endl. dari famili Sterculiaceae.

Correspondence:

T. Susmiarsih, Department of Biology, Faculty of Medicine, YARSI University, Jakarta, Jalan Letjen. Suprpto, Cempaka Putih, Jakarta Pusat 10510, Telephone 021-4206674-76, Facksimile: 021-4244574, email: tri.panjiasih@yarsi.ac.id

Tanaman Kola banyak mengandung metabolit sekunder antara lain alkaloid, saponin, tanin dan cardenolida. Tanaman ini mengandung banyak kafein, proantosianidin dan katecin. Kandungan senyawa yang banyak terdapat dalam biji Kola adalah metilxantin (yaitu kafein dan theobromin), flavanoid, antosianin dan tanin (Harborne *et al.*, 1999a,b,c; Burdock, 2005). Penelitian membuktikan bahwa metabolit sekunder pada daun Kola (*Cola nitida* (Vent.) Schott & Endl., *Cola millenii* and *Cola gigantea* A. Chev.) dapat berfungsi sebagai anti mikroba (Sonibare *et al.*, 2009). Proantosianidin Kola secara aktif dapat menghambat *reactive oxygen species* (ROS) (Daels-Rakotoarison *et al.*, 2003), ekstrak biji Kola dapat menginduksi perubahan bifasik aktivitas lokomotor mencit pada dosis dan durasi tertentu, meningkatkan aktivitas lokomotorik pada dosis 5 mg/kg dan berefek depresif pada dosis 10 mg/kg (Ajarem, 1990).

Kafein, merupakan senyawa alkaloid purin (1, 3, 7-trimethylxanthine), yang dapat ditemukan dalam beberapa minuman populer seperti kopi, teh, coklat dan kola. Pada anak-anak dan orang dewasa, konsumsi kafein tertinggi berasal dari industri yang mengolah kola. Beberapa penelitian kafein pada organ reproduksi antara lain kafein dihubungkan dengan peningkatan aborsi secara spontan, menurunkan kesuburan wanita namun tidak berpengaruh pada kesuburan pria (Nawrot *et al.*, 2003 dan Dlugosz *et al.*, 1992). Pengaruh Kola pada organ reproduksi masih kontroversi dan belum banyak dipelajari, informasi tentang farmakologi dan toksikologi kafein dalam Kola masih sedikit karena data biologik yang ada sangat terbatas dan diyakini efek toksikologi kafein berbanding lurus dengan dosis pemakaiannya. Kafein dapat dimetabolisme menjadi paraxantin (1,7-dimethylxanthin), theofilin (1,3-dimethylxantin) dan theobromin (3,7-dimethylxantin). Pada

manusia, kafein lebih banyak dimetabolisme menjadi paraxantin dalam sistem mikrosomal oksidatif P-450 hati. Metabolisme kafein dipengaruhi antara lain oleh genetik, merokok, kehamilan, gangguan hati dan umur (Dlugosz dan Bracken, 1992). Konsumsi kafein dalam jumlah tinggi dapat menurunkan konsentrasi, jumlah dan morfologi sperma (Jensen *et al.*, 2009).

Sehubungan masih belum banyaknya penelitian tentang Kola pada organ reproduksi dan bahan ini sering digunakan dalam industri makanan maka perlu dilakukan penelitian pengaruh ekstrak daun Kola terhadap beberapa parameter spermatozoa. Tujuan penelitian ini adalah mengetahui pengaruh ekstrak daun Kola terhadap motilitas, viabilitas dan integritas membran sperma *in vitro*. Hasil penelitian ini diharapkan dapat menyumbangkan referensi mengenai peran Kola terhadap fungsi reproduksi pria.

BAHAN DAN CARA KERJA

Bahan

Serbuk simplisia daun Kola 500 gram dimasukkan dalam wadah labu erlenmeyer dan ditambahkan pelarut etanol 70% sebanyak 1 liter, kemudian dilakukan perendaman selama 48 jam sambil dikocok sesekali dan ditutup rapat. Ekstrak etanol yang didapat dengan penyaringan kemudian diuapkan menggunakan rotari evaporator hingga didapat ekstrak pekat.

Sampel semen sebanyak 20 orang berasal dari pria yang telah memiliki anak atau istrinya sedang hamil. Semen diperoleh secara masturbasi dengan abstenensia paling sedikit tiga hari dari pengeluaran semen terakhir. Kriteria semen yang diambil sebagai sampel adalah semen yang tergolong normozoospermia, yaitu jumlah sperma minimal 20 juta/ml, volume semen minimal 2 ml dan kecepatan gerak sperma 12 detik/0.05 mm.

Cara Kerja

Sperma kategori normozoospermia dikoleksi dengan metode *percoll-density gradient centrifugation* 90% dan 45%. Secara berurutan, 1 ml larutan *percoll* 90% dimasukkan ke dalam tabung falcon 15 ml, kemudian 1 ml larutan *percoll* 45% dimasukkan secara perlahan ke dalam tabung agar tidak tercampur dengan larutan *percoll* sebelumnya, selanjutnya 1 ml sampel semen manusia dimasukkan secara perlahan ke dalam tabung sehingga terbentuk tiga lapisan. Tabung falcon disentrifugasi dengan kecepatan 1500 rpm selama 30 menit. Supernatan dibuang dan *pellet* yang ter-sedimentasi di bagian bawah tabung disuspensikan dengan 3 ml medium Cramer. Suspensi di bagi menjadi 3 kelompok, masing-masing sejumlah 1 ml dan diinkubasi pada suhu 37° C selama 0.5 jam. Ketiga kelompok tersebut adalah kontrol negatif/PI (*pellet* dalam medium cramer), perlakuan 0.05% ekstrak Kola/PII (*pellet* dalam medium cramer ditambah 0.05% ekstrak Kola) dan perlakuan 0.025% ekstrak Kola/PIII (*pellet* dalam medium cramer ditambah 0.025% ekstrak Kola). Setelah

diinkubasi, dilakukan uji motilitas (dihitung jumlah sperma motil dalam prosentase), uji viabilitas (dihitung jumlah sperma hidup yang telah diwarnai dengan Eosin Nigrosin, dalam prosentase) dan integritas membran sperma (dengan uji *Hypoosmotic Swelling/HOS*, dalam prosentase).

Data yang diperoleh dari setiap kelompok dievaluasi secara statistika. Jika data berdistribusi normal dan homogen, dilakukan uji anova satu arah. Jika data berdistribusi tidak normal, dilakukan uji Friedman dan dilanjutkan dengan uji perbandingan multipel.

HASIL

1. Motilitas sperma

Nilai rata-rata motilitas sperma pada kelompok PI, PII dan PIII adalah 72.5%, 89.07% dan 82.13% (Tabel 1). Setelah dilakukan analisis statistik, PII berbeda secara bermakna dengan PI ($p=0.002$). Hasil ini menunjukkan bahwa ekstrak daun Kola 0.05% dapat meningkatkan motilitas spermatozoa.

Tabel 1. Nilai rata-rata ± SD parameter kualitas sperma yang diukur dari masing-masing kelompok

Perlakuan	Motilitas sperma (% sp motil)	Viabilitas sperma (% sp hidup)	Integritas membran (% sp HOS positif)
Kontrol negatif/PI	72.50 ± 4.57	74.00 ± 10.85	69.57 ± 6.11
Ekstrak Kola 0.05%/PII	89.07 ± 6.43*	78.33 ± 11.91	85.27 ± 8.31*
Ekstrak Kola 0.025%/PIII	82.13 ± 7.43 (* $p=0.002$, $p<0.05$)	75.73 ± 14.22 ($p=0.77$, $p>0.05$)	77.67 ± 6.79 (* $p=0.005$, $p<0.05$)

2. Viabilitas sperma

Nilai rata-rata viabilitas sperma pada kelompok PI, PII dan PIII adalah 74.0%, 78.33% dan 75.33% (Tabel 1). Setelah dilakukan analisis statistik, PI dan PII tidak berbeda

bermakna dengan nilai $p>0.05$. Hasil ini menunjukkan bahwa ekstrak daun Kola 0.05% dan 0.025% tidak berpengaruh terhadap viabilitas spermatozoa.

3. Integritas membran sperma

Nilai rata-rata viabilitas sperma pada kelompok PI, PII dan PIII adalah 69.57%, 85.27% dan 77.67% (Tabel 1). Analisis statistik menunjukkan bahwa PII berbeda bermakna dengan PI dengan nilai $p=0.005$. Hasil ini menunjukkan bahwa ekstrak daun Kola 0.05% dan 0.025% berpengaruh terhadap integritas spermatozoa.

PEMBAHASAN

Hasil penelitian menunjukkan bahwa ekstrak daun Kola 0.05% mempunyai pengaruh terhadap motilitas dan integritas membran spermatozoa. Referensi ini penting sebagai acuan untuk menggali lebih jauh pengaruh Kola pada reproduksi karena ekstrak biji Kola sering kali digunakan dalam industri makanan sebagai penambah rasa. Ekstrak Kola biasanya diambil dari dua spesies Cola yaitu species *Cola nitida* (Vent.) Schott et Endl. dan *Cola acuminata* (Beauv.) Schott et Endl. *Food and Drug Administration* (FDA) Amerika Serikat melaporkan bahwa konsumsi ekstrak biji Kola saat ini sekitar 0.69 mg/kg/day. Kafein dan theobromida merupakan komponen utama dalam biji Kola, namun informasi tentang farmakologi dan toksikologi bahan tersebut masih sedikit karena data biologik yang ada sangat terbatas. Sementara ini diyakini efek toksikologi kafein berbanding lurus dengan dosis pemakaiannya (Burbock *et al.*, 2009).

Ekstrak daun Kola (0.05%) mempunyai pengaruh meningkatkan motilitas spermatozoa. Pengaruh ini dapat disebabkan oleh aktivitas kafein yang banyak terkandung dalam ekstrak daun. Dijelaskan oleh Burbock *et al.*, (2009), kafein yang merupakan komponen utama dalam Kola berpengaruh bagi kesuburan laki-laki. Zat ini ditimbun dalam jaringan gonad dan disekresikan melalui cairan seminal. Penambahan 2 mM kafein dan 5 mM theofilin pada sperma kambing

yang *dithawing* dari hasil simpan beku mempunyai efek stimulator bagi motilitas spermatozoa, dimana kafein lebih efektif memperbaiki motilitas sperma hasil simpan beku dibanding theofilin (Sinha *et al.*, 1995). Peran kafein terhadap sperma juga dibuktikan oleh Khazei *et al.*, (2012) yang meneliti efek protektif kafein terhadap sperma. Pemberian cisplatin pada semen menyebabkan motilitas sperma menurun, selanjutnya dengan penambahan kafein pada semen menyebabkan motilitas sperma meningkat. Pemberian kafein berfungsi memperbaiki toksisitas yang diinduksi oleh cisplatin melalui mekanisme sebagai antioksidan, aktivitas diuretik dan blokade transporter kation. Kafein secara bermakna mampu membersihkan radikal bebas reaktif tinggi (Devasagayam *et al.*, 2000). Demirtas *et al.*, (2012) telah membuktikan bahwa kafein mempunyai aktivitas antioksidan pada dosis 30 mg/kg dan 100 mg/kg. Kafein juga dapat menurunkan peroksidasi lipida dan meningkatkan aktivitas enzim antioksidan pada hati tikus yaitu superoxide dismutase (SOD), katalase, glutathione peroxidase (GPx) dan glutathione S transferase (GST).

Metilxantin, senyawa penyusun kafein dan theofilin, dapat meningkatkan motilitas spermatozoa melalui peningkatan adenosine 3'5'-cyclic monophosphate (cAMP) karena aksi metilxantin sebagai inhibitor fosfodiesterase (Jian *et al.*, 1984). Hambatan pada fosfodiesterase dapat meningkatkan level cAMP dan mengaktifasi fungsi sel cAMP *dependent*. Peningkatan level cAMP menyebabkan disosiasi protein kinase A (PKA) yang semula tidak aktif menjadi aktif. Aktifasi PKA menyebabkan fosforilasi berbagai macam protein yang terlibat dalam ekspresi gen, inflamasi dan migrasi (Krymskaya dan Panettieri. 2007). PKA meningkatkan kontraksi tubulin dengan cara meningkatkan aktifitas ion Ca^{2+} dan *calcium binding calmodulin* (Feneck, 2007). Mekanisme

molekular pergerakan dinein mikrotubula spermatozoa dimulai dengan adanya ion Ca^{2+} yang berikatan dengan lengan dinein, ikatan ini menyebabkan perubahan konformasi dan mengaktifasi motor dinein untuk melakukan fosforilasi dan defosforilasi dengan bantuan *cAMP-dependent protein kinase* dan *type-1 phosphatase* (Sakato *et al.*, 2007). Kafein sebagai inhibitor fosfodiesterase memicu fosforilasi protein untuk fungsi gen atau fungsi sel lainnya sehingga aktivitas metabolisme sel terpacu dan motilitas terstimulasi.

Ekstrak daun Kola 0.05% mempunyai pengaruh meningkatkan integritas membran spermatozoa. Diduga zat yang berperan besar dalam ekstrak daun Kola ini adalah kafein yang merupakan komponen terbesar. Integritas membran sangat diperlukan untuk proses reaksi akrosom saat kapasitas dan fertilisasi. Kafein dapat memodulasi dan mempercepat terjadinya reaksi akrosom (Martecikova *et al.*, 2010). Kafein berperan dalam menciptakan permeabilitas membran terhadap kanal kation dan aliran ion (Guerrero *et al.*, 1994). Aliran ion ini penting bagi akrosom karena kapasitas akrosom membutuhkan ion Ca^{2+} , K^+ , Na^+ dan Cl^- (Baldi *et al.*, 2000).

SIMPULAN

Ekstrak daun Kola (*Cola nitida*) dapat meningkatkan motilitas dan integritas membran akrosom spermatozoa pada dosis 0.05%. Pengaruh ini diduga karena adanya kafein yang bertanggungjawab terhadap pembentukan *cAMP* yang diperlukan untuk fungsi sel, fasilitasi ion Ca^{2+} yang diperlukan untuk pergerakan mikrotubula spermatozoa, peningkatkan permeabilitas membran akrosom dan fasilitasi aliran ion yang diperlukan untuk kapasitas.

KEPUSTAKAAN

- Azam S, Hadi N, Khan NU, Hadi SM. 2003. Antioxidant and prooxidant properties of caffeine, theobromine and xanthine. *Med Sci Monit.* 9: 330-5.
- Baldi E, Luconi M, Bonaccorsi L, Muratori M, Forti G. 2000. Intracellular events and signaling pathways involved in sperma acquisition of fertilizing capacity and acrosome reaction . *Frontiers in Bioscience* 5, e110-123.
- Burdock, G.A., 2005. Kola nut (cola nut). In: Fenaroli's Handbook of Flavor Ingredients, fifth ed. CRC Press, Boca Raton, FL, pp. 993-994.
- Burdock GA, Carabin LG, Crincoli CM. 2009. Safety assessment of kola nut extract as a food ingredient. *Food and Chemical Toxicology* 47 :1725-1732.
- Daly JW .2007. Caffeine analogs: biomedical impact. *Cell Mol Life Sci* 64, 2153-2169.
- Demirtas C, Ebru Ofluoglu E, Hussein A, Paşaoğlu H. 2012. Effects of Caffeine on Oxidant-Antioxidant Mechanisms in the Rat Liver. *Gazi Med J* 23: 13-8
- Devasagayam TP, Kamat JP, Mohan H, Kesavan PC. 1996. Caffeine as an antioxidant; inhibition of lipid peroxidation induced by ROS. *Biochim et Biophys Acta* 1282: 63-70.
- Devasagayam TP, Kesavan PC. 2000. Radioprotective and antioxidant action of caffeine:mechanistic considerations. *Clin Chim Acta.* 295:141
- Dlugosz L, BrackenMB. 1992. Reproductive Effects of Caffeine: A Review and Theoretical Analysis. *Epidemiologic Reviews* 14:82-100.
- Guerrero A, Fay FS, Singer J. 1994. Caffeine activates a Ca^{2+} permeable nonselective cation channel in smooth muscle cells. *Gen Physiol* 104:375-394.
- FDA, 2008. Inactive Ingredients Database. Kola nut extract. US Food and Drug Administration. Center for Drug Evaluation and Research. <<http://www.accessdata.fda.gov/scripts/cder/iig/index.cfm>>.
- Feneck R. 2007. Phosphodiesterase inhibitors and the cardiovascular system *Critical Care & Pain.* 7:203-207.
- Jian CS, Kilfeather SA, Pearson RM, Turner P. 1984. The stimulatory effects of caffeine, theophylline, Iysinetheophylline and 3-isobutyl-1-methylxanthine on human sperm motility. *Br. J. clin. Pharmac.* 18: 258-262.
- Khazaei M, Bayat PD, Ghanbari A, Khazaei S, Feizian M, Khodaei A, Alian HAS. 2012. Protective effect of subchronic caffeine administration on cisplatin induced urogenital toxicity in male mice. *Indian J Exp Biol.* 50:638-644.

- Lee C. 2000. Antioxidant ability of caffeine and its metabolites based on the study of oxygen radical absorbing capacity and inhibition of LDL peroxidation. *Clin Chim Acta* 295: 141-54.
- Mandel HG. 2002. Update on caffeine consumption, disposition and action. *Food and Chemical Toxicology* 40, 1231-1234.
- Martecikova S, Hulinska P, Reckova Z, Pavlik A, eseta M, Machatkova M. 2010. Effect of acrosome reaction progress in frozen-thawed boar spermatozoa on the efficiency of in vitro oocyte fertilization. *Veterinari Medicina*, 55 (9): 429-437
- Nawrot, P., Jordan, S., Eastwood, J., Rotstein, J., Hugenholtz, A., Feeley, M., 2003. Effects of caffeine on human health. *Food Additives and Contaminants* 20, 1-30.
- Ribeiro JA, Sebastião AM. 2010. Caffeine and Adenosine. *Journal of Alzheimer's Disease* 20: S3-S15 S3.
- Sakato M, Sakakibara H, King SM. *Chlamydomonas* Outer Arm Dynein Alters Conformation in Response to Ca²⁺. *Molecular Biology of the Cell*. Sept 2007. Vol. 18:3620-3634.
- Sinha MP, Sinha AK, Singh BK. 1995. Effect of methylxanthines on motility and fertility of frozen-thawed goat semen. *Theriogenology*. 44(6):907-14.
- Stavric, B., 1988. Methylxanthines: toxicity to humans 2. Caffeine. *Food and Chemical Toxicology* 26, 645-662.