Jurnal Biologi Tropis

Original Research Paper

Dracaena angustifolia Ethanolic Extract and Sperm Morphology in Cigarette Smoke-Exposed Mice

Syamsul Bahri*, Dadi Setiadi, Tri Ayu Lestari, Heru Setiawan, Muhammad Alfianul Hakim, Lalu Zidan Cahyadi

Program Studi Pendidikan Biologi, Fakultas Keguruan dan Ilmu Pendidikan, Universitas Mataram, Mataram, Indonesia;

Article History

Received : September 22th, 2026

Revised : September 31th, 2026

Accepted : October 05th, 2026

*Corresponding Author: **Syamsul Bahri**, Program Studi Pendidikan Biologi, Fakultas Keguruan dan Ilmu Pendidikan Universitas Mataram, Mataram, Indonesia;

Email: syamsulsalihu@gmail.com

Abstract: Exposure to cigarette smoke induces oxidative stress, which can cause abnormalities in sperm morphology. *Dracaena angustifolia* contains natural antioxidants such as flavonoids and chlorophyll that have the potential to protect spermatozoa. This study aimed to determine the effect of Dracaena angustifolia leaves ethanolic extract on sperm morphology of mice exposed to cigarette smoke. Forty-eight healthy male BALB/c mice were randomly divided into 16 groups (n = 3 per group) using a factorial Completely Randomized Design (CRD). We combined two factors: cigarette smoke exposure duration (0, 5, 15, and 30 minutes) and the dose of *Dracaena angustifolia* leaf ethanolic extract (0, 500, 1000, and 1500 ppm). Sperm morphology was observed by eosin-nigrosin staining. The results of Two-Way ANOVA showed that cigarette smoke exposure had a highly significant effect on sperm morphology ($p = 0.000$; $F = 30.112$), increasing the percentage of abnormal spermatozoa. The dose of *Dracaena angustifolia* leaf ethanolic extract also had a highly significant effect ($p = 0.000$; $F = 34.942$), indicating its protective role in maintaining normal sperm morphology. There was a significant interaction between smoke exposure and extract dose ($p = 0.047$; $F = 2.225$). The flavonoid content, as a free radical scavenger, is thought to prevent lipid peroxidation of the sperm plasma membrane. It can be concluded that the ethanolic extract of *Dracaena angustifolia* leaves has potential as a protective agent against sperm morphology damage due to cigarette smoke exposure.

Keywords: *Dracaena angustifolia;* Cigarette smoke; Flavonoid; Sperm morphology; Oxidative stress.

Pendahuluan

Asap yang terbentuk dari pembakaran tembakau membentuk partikel yang bermuatan ringan dan sangat pekat (Dube & Green, 1982). Hasil analisis menunjukkan bahwa asap sampingan memiliki kadar racun yang lebih tinggi dibandingkan dengan asap utama. Senyawa yang terbukti berkadar lebih tinggi diantaranya PAH (Grimmer *et al*., 1987; Evans, *et al*. 1993), nikotin (Pakhale *et al*., 1997); amonia (Brunnemann & Hoffmann 1975); piridin (Sakuma *et al*., 1984); dan komponen fase gas 1,3-butadiena, akrolein, isoprena, benzena, dan toluena (Brunnemann *et al*., 1990). Hasil penelitian tersebut menunjukkan bahwa perokok pasif lebih rentan terpapar racun yang terkandung dalam asap samping tembakau dibandingkan dengan perokok aktif.

Alam Indonesia menyediakan berbagai jenis tanaman yang kaya dengan antioksidan, seperti polifenol, karotenoid, dan vitamin. Senyawa-senyawa tersebut berperan penting baik dalam pengobatan, tradisional maupun pengobatan modern karena terbukti mampu mengobati berbagai jenis masalah kesehatan. Oleh karena itu identifikasi dan pengembangan tanaman-tanaman yang berkhasiat obat perlu terus dilakukan untuk mengatasi masalah kesehatan yang terkait dengan antioksidan. Hasil penelitian *in vivo* maupun *in vitro* menunjukkan bahwa bahan alam terbukti mampu memperbaiki kondisi patologis yang disebabkan oleh stres oksidatif, inflamasi, dan apoptosis. Hasil penelitian Hu *et al*. (2023) misalnya, menunjukkan bahwa curcumin yang diisolasi dari rimpang kunyit (*Curcuma longa*) membuktikan klaim tersebut.

This article is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License.

© 2026 The Author(s). This article is open access

Stres oksidatif terjadi akibat ketidakseimbangan produksi Reactive Oxygen Species (ROS) dengan antioksidan alami tubuh. Kondisi ini mengakibatkan disfungsi dan kerusakan sel, Inflamasi yang merupakan salah satu respon sistem imun tubuh ditandai dengan terjadinya mobilisasi sel-sel immun dan pelepasan mediator inflamasi (Hu *et al*., 2023). Oleh karena itu kerusakan seluler dapat dihindari dengan menjaga keseimbangan ROS dan senyawa reaktif lainnya dengan kadar antioksidan di dalam tubuh. Tubuh manusia memiliki antioksidan alami berupa vitamin C, vitamin E, SOD, thioredoxin, dan glutathione. Antioksidan ini mampu menetralkan radikal bebas dan melindungi sperma dari ROS (Tremellen, 2008; Symeonidis *et al*., 2021). Meskipun demikian bila kapasitas antioksidan alami tubuh tidak memadai akibat jumlah radikal bebas di dalam tubuh berlebih maka tubuh memerlukan antioksidan tambahan.

Flavonoid adalah salah satu metabolit sekunder yang memiliki struktur fenolik yang banyak ditemukan di dalam buah, sayuran, dan minuman tertentu. Senyawa ini berkhasiat sebagai antioksidan dan terbukti mampu mengobati berbagai jenis penyakit seperti kanker, Alzheimer, dan aterosklerosis (Parashar *et al*., 2023; Burak & Imen, 1999). Oleh karena itu flavonoid merupakan komponen penting dalam produk farmasi, obat-obatan, dan kosmetik.

Dracaena angustifolia [Syn. *Pleomele angustifolia* N.E Brown) adalah salah satu spesies tanaman tropis yang biasa digunakan sebagai pewarna dan pengharum jajanan tradisional. Di Indonesia spesies ini dikenal dengan nama *Suji* atau *Daun Suji*. Hasil penelitian Bahri *et al.* (2025a) menemukan bahwa ekstrak etanol spesies ini positif mengandung senyawa alkaloid, flavonoid dan terpenoid. Hasil uji DPPH menunjukkan bahwa nilai IC_{50} ekstrak etanol daun suji sebesar 49,14 ppm (Bahri *et al*., 2025b), dan tergolong dalam kategori sangat kuat (Molyneux, 2004). Oleh karena itu aktivitas antioksidan tersebut perlu diuji pada level *in vivo* dengan menggunakan sperma dari mencit yang telah dipapar asap rokok.

Bahan dan Metode

Penelitian ini dirancang menggunakan Rancangan Acak Lengkap (RAL) pola faktorial dengan dua faktor perlakuan, yaitu durasi paparan asap rokok dan konsentrasi ekstrak etanol daun suji. Variabel bebas dalam penelitian ini meliputi durasi paparan asap rokok dan konsentrasi ekstrak etanol daun suji, sedangkan variabel terikat yang diamati adalah konsentrasi spermatozoa mencit. Penelitian melibatkan 16 kombinasi perlakuan dengan tiga ekor mencit sebagai ulangan pada setiap kombinasi, sehingga jumlah keseluruhan hewan coba yang digunakan adalah 48 ekor mencit.

Faktor pertama (R) merupakan durasi paparan asap rokok yang terdiri atas empat taraf, yaitu 0, 5, 15, dan 30 menit. Faktor kedua (S) adalah konsentrasi ekstrak etanol daun suji yang diberikan, dengan empat taraf perlakuan, yaitu 0, 500, 1.000, dan 1.500 ppm. Kombinasi kedua faktor tersebut menghasilkan 16 kelompok perlakuan sebagai berikut:

Kelompok	Perlakuan
E0F0	Tanpa paparan asap rokok dan tanpa pemberian ekstrak (kontrol)
E0F1	Tanpa paparan asap rokok, diberi ekstrak 500 ppm
E0F2	Tanpa paparan asap rokok, diberi ekstrak 1.000 ppm
E0F3	Tanpa paparan asap rokok, diberi ekstrak 1.500 ppm
E1F0	Paparan asap rokok selama 5 menit
E1F1	Paparan asap rokok 5 menit dan pemberian ekstrak 500 ppm
E1F2	Paparan asap rokok 5 menit dan pemberian ekstrak 1.000 ppm
E1F3	Paparan asap rokok 5 menit dan pemberian ekstrak 1.500 ppm
E2F0	Paparan asap rokok selama 15 menit
E2F1	Paparan asap rokok 15 menit dan pemberian ekstrak 500 ppm
E2F2	Paparan asap rokok 15 menit dan pemberian ekstrak 1.000 ppm
E2F3	Paparan asap rokok 15 menit dan pemberian ekstrak 1.500 ppm
E3F0	Paparan asap rokok selama 30 menit
E3F1	Paparan asap rokok 30 menit dan pemberian ekstrak 500 ppm
E3F2	Paparan asap rokok 30 menit dan pemberian ekstrak 1.000 ppm
E3F3	Paparan asap rokok 30 menit dan pemberian ekstrak 1.500 ppm

Prosedur Penelitian

Prosedur pada penelitian ini terdiri dari beberapa tahapan, yaitu preparasi sampel, ekstraksi, persiapan hewan uji, perlakuan, pembedahan, dan pembuatan preparat sel sperma.

Preparasi Sampel

Daun suji yang telah disiapkan dipotong kecil-kecil kemudian dikeringkan pada suhu ruang hingga kadar air berkurang. Setelah kering, daun suji diblender lalu diayak untuk memperoleh serbuk halus daun suji.

Ekstraksi

Daun suji diperoleh dari kebun salah seorang warga di Kota Madya Mataram. Sampel daun suji yang terkumpul dibersihkan dengan air mengalir, dipotong ukuran 1 x 1 cm, dikeringkan pada suhu ruang, diblender, lalu diayak sehingga berbentuk bubuk. Ekstraksi dilakukan dengan metode maserasi menggunakan etanol 96% dengan rasio 1:4. Proses maserasi dilakukan selama 72 jam dalam botol tertutup dan disimpan di tempat gelap. Setelah itu, rendaman disaring dan dipekatkan menggunakan *rotary evaporator* pada suhu 40°C hingga diperoleh ekstrak kental.

Persiapan Hewan Uji

Hewan percobaan yang digunakan dalam penelitian ini adalah mencit jantan galur BALB/c berusia 8–10 minggu dengan bobot badan berkisar antara 20–25 gram. Mencit diperoleh dari Bio Mice and Rat, Denpasar, Bali. Sebelum perlakuan diberikan, seluruh hewan coba menjalani masa aklimatisasi selama tujuh hari untuk memungkinkan proses adaptasi terhadap kondisi lingkungan penelitian. Selama periode aklimatisasi hingga pelaksanaan penelitian, mencit dipelihara dalam kandang plastik berukuran 25 × 20 × 12 cm (panjang × lebar × tinggi) dengan alas berupa sekam. Pakan berupa pakan anak babi (CP 551) dan air minum disediakan secara ad libitum. Setiap kandang ditempati oleh satu ekor mencit.

Perlakuan Hewan Uji

Rokok yang digunakan mengandung nikotin 2,2 – 2,5 mg/ batang, kadar tar 38 -39 mg/ batang. Perlakuan diberikan selama 14 hari berturut-turut yang diawali dengan menginduksi kerusakan sperma dengan cara memberi paparan asap rokok pada hewan uji yang ditempatkan di dalam kotak plastik tertutup berukuran P x L x T = 75 x 50 x 25 cm yang terhubung dengan aerator. Tiga puluh menit setelah paparan, hewan uji diberi ekstrak etanol daun suji secara oral.

Pembedahan dan Pembuatan Preparat

Pengamatan morfologi sperma pada epidimis kauda dilakukan pada hari ke-15. Langkah ini dimulai dengan membunuh hewan secara etis dengan teknik dislokasi leher, mengisolasi sperma epididimis kauda kemudian mewarnainya dengan Eosin-Nigrosin. Morfologi sperma diamati menggunakan mikroskop cahaya dengan perbesaran 400×. Jumlah spermatozoa yang diamati sebanyak 100/slide. Penentuan morfologi sperma mengacu pada World Health Organization (2010), Breed (2004), dan Wyroberk & Bruce (1975).

Analisis Data

Data yang terkumpul dianalisis dengan uji ANOVA dua arah (Two-Way ANOVA) pada taraf kepercayaan 95%, dilanjutkan dengan uji Tukey HSD dengan menggunakan aplikasi SPSS.

Hasil dan Pembahasan

Hasil uji Two-Way ANOVA pada morfologi sperma mencit, diperoleh hasil bahwa faktor paparan asap rokok, dosis ekstrak etanol daun suji, serta interaksi keduanya memberikan pengaruh yang signifikan terhadap morfologi sperma. Paparan asap rokok memiliki nilai signifikansi 0,000 dan nilai F sebesar 30,112. Dengan demikian, paparan asap rokok terbukti meningkatkan persentase sperma abnormal secara nyata.

Paparan asap rokok dapat meningkatkan persentase sperma abnormal yang diduga disebabkan oleh terjadinya stres oksidatif pada hewan uji yang berdampak pada rusaknya struktur kepala, leher, maupun ekor spermatozoa. Menurut Wyrobek & Bruce (1975), bahan toksik dapat menginduksi abnormalitas sperma. Asap rokok mengandung nikotin, tar, dan radikal bebas yang memicu stres oksidatif dalam tubulus seminiferus. Stres oksidatif menyebabkan peroksidasi lipid pada membran plasma spermatozoa dan fragmentasi DNA, sehingga merusak struktur kepala (amorphous, pinhead), leher bengkok, dan ekor melingkar atau patah.

Hasil penelitian La Maestra *et al.* (2015) menunjukkan bahwa paparan asap rokok pada mencit neonatal selama 70 hari menyebabkan peningkatan persentase sperma abnormal pada epididimis akibat induksi stres oksidatif melalui peningkatan ROS dan produk peroksidasi lipid

pada sel sperma. Pada penelitian ini juga dilaporkan terjadinya peningkatan single- dan double-strand breaks pada DNA. Sutanto *et al.* (2017) juga menjelaskan bahwa membran plasma spermatozoa yang kaya PUFA sangat rentan terhadap ROS sehingga menyebabkan kebocoran membran dan kerusakan aksonema.

Ekstrak etanol daun suji memiliki nilai signifikansi 0,000 dan nilai F sebesar 34,942, menunjukkan ekstrak daun suji memiliki peran protektif yang kuat. Daun suji kaya akan antioksidan alami seperti flavonoid, klorofil, saponin, dan polifenol. Flavonoid bekerja sebagai scavenger radikal bebas dengan mendonorkan atom hidrogen sehingga menghentikan reaksi berantai peroksidasi lipid. Hal ini melindungi integritas membran dan sitoskeleton spermatozoa sehingga bentuk normal (falciform dengan apical hook) dapat dipertahankan.

Kandungan flavonoid dan klorofil daun suji (*Dracaena angustifolia*) telah terbukti memiliki aktivitas antioksidan (Indrasti *et al*., 2018). Flavonoid bekerja sebagai antioksidan nonenzimatik yang menetralkan ROS secara langsung dan menghentikan reaksi berantai stres oksidatif (Gungor *et al*., 2024), serta mampu menembus membran lipid untuk melindungi membran spermatozoa dan akrosom (Mishra *et al*.,2024).

Tabel 1. Hasil Uji Two-Way ANOVA Morfologi Sperma Mencit

Sumber Variansi	db	Mean Square	F	Sig.
PAPARAN	3	217.764	30.112	.000
DOSIS	3	252.696	34.942	.000
PAPARAN x DOSIS	9	16.087	2.225	.047
Error	32	7.232		
Total	48			

Interaksi Paparan dan Dosis menunjukkan nilai signifikansi sebesar 0,047 dan nilai F sebesar 2,225 yang menunjukkan adanya efek sinergis antar kedua faktor tersebut. Artinya, efektivitas ekstrak daun suji dalam mempertahankan morfologi normal akan berbeda pada kelompok tanpa paparan dan dengan paparan asap rokok. Pada kondisi stres oksidatif akibat rokok, kebutuhan antioksidan meningkat sehingga dosis ekstrak yang lebih tinggi diperlukan untuk mencapai persentase morfologi normal yang optimal. Interaksi yang signifikan menunjukkan kebutuhan antioksidan meningkat pada kondisi paparan. Miranda *et al*. (2025) menyatakan bahwa toksin rokok seperti nikotin dan kadmium menginduksi stres oksidatif sehingga sistem pertahanan antioksidan endogen tidak cukup dan memerlukan suplementasi antioksidan eksogen seperti flavonoid daun suji.

Hasil analisis statistik menunjukkan bahwa nilai F Dosis (34,942) > F Rokok (30,112). Hal tersebut berarti bahwa efek perlakuan ekstrak suji lebih dominan dalam menentukan morfologi sperma, sehingga daun suji potensial sebagai agen protektif.

Tabel 2. Hasil Uji *Post Hoc Tukey* HSD Interaksi Antara Durasi Paparan Asap Rokok dan Dosis Ekstrak Etanol Daun Suji

Interaksi	% Sperma normal	Notasi**
E0F0	80.4767	de
E0F1	81.4367	def
E0F2	83.5967	ef
E0F3	89.0667	f
E1F0	75.4167	bcd
E1F1	76.5867	bcde
E1F2	79.1800	de
E1F3	82.9300	def
E2F0	70.8400	abc
E2F1	77.5367	bcde
E2F2	78.2267	cde
E2F3	81.3733	def
E3F0	65.0367	a
E3F1	69.5400	ab
E3F2	77.7233	cde
E3F3	81.2100	def

***Tukey* HSD = 8.1420**

Keterangan: Kelompok E0F0 berperan sebagai kontrol tanpa paparan asap rokok maupun pemberian ekstrak. Kelompok E0F1, E0F2, dan E0F3 merupakan kelompok yang hanya memperoleh ekstrak etanol daun suji dengan konsentrasi masing-masing 500, 1.000, dan 1.500 ppm tanpa paparan asap rokok.
Kelompok E1, mencit diberikan paparan asap rokok selama 5 menit. E1F0 hanya menerima paparan asap rokok, sedangkan E1F1, E1F2, dan E1F3 masing-masing memperoleh tambahan ekstrak etanol daun suji dengan konsentrasi 500, 1.000, dan 1.500 ppm. Kelompok E2 mendapatkan paparan asap rokok selama 15 menit. E2F0 hanya diberikan paparan asap rokok, sementara E2F1, E2F2, dan E2F3 mendapatkan ekstrak etanol daun suji dengan konsentrasi berturut-turut 500, 1.000, dan 1.500 ppm.
Selanjutnya, kelompok E3 diberikan paparan asap rokok selama 30 menit. E3F0 hanya menerima paparan asap rokok, sedangkan E3F1, E3F2, dan E3F3 masing-masing diberikan ekstrak etanol daun suji dengan konsentrasi 500, 1.000, dan 1.500 ppm.

**= Angka-angka yang diikuti dengan notasi yang berbeda menunjukkan perbedaan yang signifikan.

Hasil uji lanjut *Post Hoc Tukey* HSD pada interaksi antara durasi paparan asap rokok dan dosis ekstrak etanol daun suji menunjukkan adanya perbedaan persentase morfologi sperma antarkelompok perlakuan yang ditandai dengan perbedaan notasi huruf. Persentase sperma normal terendah terdapat pada kelompok E3F0 sebesar 65,04% dengan notasi a, sedangkan persentase sperma normal tertinggi diperoleh pada kelompok E0F3 sebesar 89,07% dengan notasi f. Perbedaan notasi tersebut menunjukkan bahwa persentase sperma abnormal pada kedua kelompok berbeda nyata. Rendahnya persentase sperma normal pada kelompok E3F0 mengindikasikan bahwa paparan asap rokok tanpa pemberian ekstrak etanol daun suji signifikan merusak morfologi sperma. Sebaliknya, tingginya persentase sperma normal pada kelompok E0F3 menunjukkan bahwa pemberian ekstrak etanol daun suji dosis tertinggi mampu mencegah kerusakan morfologi sperma.

Peningkatan persentase sperma normal juga terlihat pada kelompok yang dipaparkan dengan asap rokok tetapi diberikan ekstrak etanol daun suji. Persentase sperma normal meningkat secara bertahap dari 69,54% pada E3F1, menjadi 77,72% pada E3F2, dan mencapai 81,37% pada E3F3. Hasil tersebut menunjukkan bahwa peningkatan dosis ekstrak perlakuan diikuti dengan peningkatan persentase sperma normal. Efek tersebut diduga berkaitan dengan kandungan antioksidan seperti flavonoid yang mampu menetralkan radikal bebas dan melindungi struktur spermatozoa dari kerusakan akibat stres oksidatif yang disebabkan oleh paparan asap rokok. Pada mencit dengan paparan asap rokok yang lebih tinggi, kerusakan morfologi sperma cenderung lebih besar, namun pemberian ekstrak etanol daun suji mampu membantu menurunkan tingkat abnormalitas sperma.

Semakin tinggi dosis ekstrak yang diberikan, morfologi sperma normal cenderung meningkat meskipun mencit tetap terpapar asap rokok. Hal ini menunjukkan bahwa ekstrak etanol daun suji memiliki efek protektif terhadap kerusakan struktur spermatozoa akibat stres oksidatif yang ditimbulkan oleh asap rokok. Meskipun demikian, mekanisme efek proteksi ekstrak daun suji terhadap morfologi sperma masih perlu diverifikasi dengan mengukur kadar enzim-enzim yang diduga terlibat dalam proses tersebut, seperti SOD, GPx, dan katalase.

Beberapa peneliti, seperti Liu *et al.* (2010), telah mengamati kaitan antara kadar seng dengan kualitas semen pada 147 pria dan menemukan bahwa kadar seng pada perokok lebih rendah dibandingkan dengan yang bukan perokok. Yang menarik adalah bahwa parameter fertilitas perokok yang kadar seng semennya normal tidak berbeda dengan yang bukan perokok. Hal tersebut menunjukkan bahwa seng berperan dalam memelihara parameter-parameter fertilitas. Meskipun demikian, ditemukan bukti yang mengesankan bahwa dampak buruk rokok tidak semata-mata disebabkan oleh racun yang terdapat di dalam asap rokok.

Penelitian lain tentang efek nikotin yang diberikan secara oral pada tikus menunjukkan terjadinya penurunan motilitas dan jumlah sperma secara signifikan (Oyeyipo *et al*., 2011). Oleh karena itu kemungkinan peran nikotin dalam hal ini tidak dipengaruhi oleh toksin lain yang terdapat dalam asap rokok. Tiga puluh hari setelah berhenti merokok, parameter-parameter fertilitas yang tadinya rusak mulai membaik. Hal ini menunjukkan bahwa efek nikotin bersifat reversibel. Penelitian pada 210 pria menunjukkan bahwa semakin tinggi kadar cotinine semen, semakin tinggi pula persentase sperma abnormal (Wong *et al*., 2000). Karena cotinine adalah hasil metabolisme nikotin maka temuan tersebut menunjukkan bahwa nikotinlah yang kemungkinan mengarahkan memburuknya parameter fertilitas. Meskipun demikian, penelitian lain diperlukan untuk memastikan patogenesis nikotin terhadap kerusakan morfologi sperma.

Kesimpulan

Ekstrak etanol *Dracaena angustifolia* mampu mempertahankan persentase morfologi normal sperma mencit yang dipapar asap rokok.

Ucapan Terima Kasih

Penulis menyampaikan penghargaan dan terima kasih kepada Kepala beserta seluruh staf Laboratorium Imunologi serta Kepala dan staf Laboratorium Pendidikan Kimia FKIP Universitas Mataram atas dukungan teknis dan kerja sama yang telah diberikan selama pelaksanaan penelitian.

Referensi

Bahri, S., Setiadi, D., Lestari, T. A., Setiawan, H., Hakim, M.A., Cahyadi, L.M. (2025[a]). Phytochemical Screening of Suji (*Pleomele angustifolia*) Extract. *Jurnal Biologi Tropis*, 25(2), 2395 – 2402. DOI: 10.29303/jbt.v25i2.9560

Bahri, S., Setiadi, D., Lesrtari, T.A., Setiawan, H., Hakim, M.A., Cahyadi, L.M. (2025[b]). The comparison of IC_{50} of Suji (*Pleomele angustifolia*) which is extracted by different solvents. *Jurnal Biologi Tropis,* 25(2), 2403-2409, DOI: 10.29303/jbt.v25i2.9559

Breed, W. G. (2004). The spermatozoon of Eurasian murine rodents: its morphological diversity and evolution. *Journal of Morphology*, 261(1), 52 -69. https://doi.org/10.1002/jmor.10228

Brunnemann KD, Hoffmann D. (1975). Chemical studies on tobacco smoke. XXXIV. Gas chromatographic determination of ammonia in cigarette and cigar smoke. *Journal of Chromatographic Science*. 13(4):159–63. DOI: 10.1093/chromsci/13.4.159

Brunnemann KD, Kagan MR, Cox JE, Hoffmann D. (1990). Analysis of 1,3-butadiene and other selected gas-phase components in mainstream and sidestream smoke of cigarettes by gas chromatography-mass selective detection. *Carcinogenesis*; 11 (10):1863–8. Doi: 10.1093/carcin/11.10.1863

Burak M & Imen Y (1999) Flavonoids and their antioxidant properties. Turkiye Klin Tip Bil Derg 19, 296–304.

Parashar D, Meena AJ, Sharma M. (2023). Flavonoid-A Review on Antioxidants. *Research Journal of Pharmacy and Technology*, 16(10). DOI: 10.52711/0974-360X.2023.00802

Dube MF, Green CR. Methods of smoke collection for analytical purposes. (1982). *Tobacco Chemists' Research Conference* (TCRC); 8 :42–102.

Evans WH, Thomas NC, Boardman MC, Nash SJ. (1993). Relationships of polycyclic aromatic hydrocarbon yields with particulate matter (water and nicotine free) yields in mainstream and sidestream cigarette smoke. S*cience of The Total Environment*.; 136 (1–2):101–9. https://doi.org/10.1016/0048-9697(93)90300-U.

Grimmer G, Naujack KW, Dettbarn G. (1987). Determination of polycyclic aromatic hydrocarbons, aza-arenes, and aromatic amines in the particle and vapor phase of mainstream and sidestream smoke of cigarettes by gas chromatography. *Toxicology Letters*. 35 (1):117–24. https://doi.org/10.1016/0378-4274(87)90095-6

Gungor S, Kırıkkulak M, Denk B, Mehmet Fuat Gulhan MF, Güleş O, Budak D, Inanç ME, Avdatek F, Yeni D, Taşdemir U. (2024). Potential Protective Effect of Hesperidin (Vitamin P) against Glyphosate-Induced Spermatogenesis Damage in Male Rats: Biochemical and Histopathological Findings on Reproductive Parameters. *Life*; *14*(9), 1190; https://doi.org/10.3390/life14091190

Hu, P.; Li, K.; Peng, X.-X.; Kan, Y.; Yao, T.-J.; Wang, Z.-Y.; Li, Z.; Liu, H.-Y.; Cai, D. (2023). Curcumin Derived from Medicinal Homologous Foods: Its Main Signals in Immunoregulation of Oxidative Stress, Inflammation, and Apoptosis. *Front. Immunol*. 14, 1233652. DOI:10.3389/fimmu.2023.1233652

Indrasti W, Ardarwulan N, Purnomo E. H, Wulandari N. (2018). Stability of Chlorophyll as Natural Colorant: A Review for Suji (Dracaena angustifolia (Medik.) Roxb.) Leaves' Case. *Current Research in Nutrition and Food Science Journal;* 6(3):609-625. DOI:10.12944/CRNFSJ.6.3.04

La Maestra S, De Flora S, Rosanna, Micale (2015). Effect of cigarette smoke on DNA damage, oxidative stress, and morphological alterations in mouse testis and spermatozoa. *International Journal of Hygiene and Environmental Health;* 218(1) 10.1016/j.ijheh.2014.08.006

Liu RZ, Gao JC, Zhang HG, Wang RX, Zhang ZH, Liu XY. (2010). Seminal plasma zinc level may be associated with the effect of cigarette smoking on sperm parameters. J *Int Med Res*. 2010; 38(3): 923–923. doi: 10.1177/147323001003800318.

Miranda NG, Gajeiro A, Martin-Bessa A, Gaivao I. (2025). Impact of Tobacco Smoke

Exposure on Male Fertility: An In Vivo Study Using Drosophila melanogaster. *Cells,* 14, 1689.; https://doi.org/10.3390/cells14211689

Mishra R, Nikam A, Hiwarkar J, Nandgude TA. (2024). Flavonoids as potential therapeutics in male reproductive disorders: Excellence through Moderation. Future Journal of Pharmaceutical Sciences 10(1). DOI:10.1186/s43094-024-00677-3

Molyneux, P. (2004). The use of the stable free radical diphenylpicryl-hydrazyl (DPPH) for estimating antioxidant activity. Songklanakarin *J. Sci. Technol*

Oyeyipo IP, Raji Y, Emikpe BO, Bolarinwa AF. (2011). Effects of nicotine on sperm characteristics and fertility profile in adult male rats: a possible role of cessation. *J Reprod Infertil.* 12(3):201– 201. PMCID: PMC3719292

Pakhale, S. S., Dolas, S. S., & Maru, G. B. (1997). The distribution of total particulate matter (TPM) and nicotine between mainstream and sidestream smoke of bidi and cigarettes. *Analytical Letters*, *30*(2), 383–394. DOI: 10.1080/00032719708002810

Sakuma H, Kusama M, Yamaguchi K, Sugawara S. (1984). The distribution of cigarette smoke components between mainstream and sidestream smoke. III: middle and higher boiling compounds. *Beiträge zur Tabakforschung International* 12(5):251–8. DOI:10.2478/cttr-2013-0541

Sutanto EB, Nasihun TR, Isradji I. (2017). The effect of vitamin C and E combination on sperm quality and cement 8-OHdG level of smoke-exposed rats. *World Nutrition Journal.* https://doi.org/10.25220/WNJ.V01i1.0007

Symeonidis, E.N., Evgeni, E., Palapelas, V., Koumasi, D., Pyrgidis, N., Sokolakis, I., Hatzichristodoulou, G., Tsiampali, C., Mykoniatis, I., Zachariou, A. (2021). Redox Balance in Male Infertility. *Antioxidants (Basel*); 10(10):1534. DOI: 10.3390/antiox10101534.

Tremellen, K. (2008). Oxidative Stress and Male Infertility—A Clinical Perspective. *Hum. Reprod. Updat*, 14: 243–258. https://doi.org/10.1093/humupd/dmn004

Wong WY, Thomas CM, Merkus HM, Zielhuis GA, Doesburg WH, Steegers-Theunissen RP. (2000). Cigarette smoking and the risk of male factor subfertility: minor association between cotinine in seminal plasma and semen morphology. *Fertil Steril,* 74(5):930–930. doi: 10.1016/s0015-0282(00)01567-3.

World Health Organization. (2010). WHO laboratory manual for the examination and processing of human semen (5th edition). World Health Organization

Wyroberk, A.J., Bruce, W.R. (1975). Chemical induction of sperm abnormality in mice. Proceedings of the National Academy of Sciences, 72(11), 4425-4429. https://doi.org/10.1073/pnas/72.11.4425