

## Method for Measuring Damage to Viability and Morphology of Spermatozoa in Experimental Animals After Exposure to Cigarette Smoke

Yufika Dewi Muksin<sup>1</sup>, Mahrus<sup>2</sup>, & Syamsul Bahri<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Laboratorium Imunobiologi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Mataram, Mataram, Nusa Tenggara Barat, Indonesia;

<sup>2</sup>Program Studi Pendidikan Biologi, Fakultas Keguruan dan Ilmu Pendidikan, Universitas Mataram, Mataram, Nusa Tenggara Barat, Indonesia;

### Article History

Received: April 25<sup>th</sup>, 2024

Revised : May 01<sup>th</sup>, 2024

Accepted : May 24<sup>th</sup>, 2024

\*Corresponding Author:

**Yufika Dewi Muksin**,  
Program Studi Biologi,  
Fakultas Matematika dan  
Ilmu Pengetahuan Alam,  
Universitas Mataram,  
Mataram, Nusa Tenggara  
Barat, Indonesia;  
Email:  
[yufikadewi@gmail.com](mailto:yufikadewi@gmail.com)

**Abstract:** Smokers in Indonesia are ranked first in the world and the biggest cause of death. Free radicals contained in cigarette smoke cause condensation of the structure of the genetic material of sperm cells and lead to sperm cell death (apoptosis). The aim of the research was to determine the effect of cigarette exposure and its interactions on the quality of spermatozoa in experimental animals. This research is a laboratory experiment with a Completely Randomized Factorial Design. The samples in this study were 60 males of the Balb/C strain which were divided into 5 treatment groups. Each treatment group was given concentrations of red dragon fruit peel extract including 0%, vitamin C, 50 µg/mL, 500 µg/mL, and 5000 µg/mL and were exposed to cigarette smoke. Analysis of research results used the Two Way ANOVA test at a significance level of 0.05. The results of the study showed that there was an effect of exposure to cigarettes and administration of red dragon fruit peel extract on the sperm quality of mice. The highest exposure to cigarette smoke was given to red dragon fruit peel extract in terms of viability of 89% and morphology of 93.33%. Administration of red dragon fruit peel extract reduced the effect of exposure to cigarette smoke on the viability and morphology of mice.

**Keyword:** Cigarette smoke, experimental, morphology, viability.

### Pendahuluan

Prevalensi perokok di Indonesia terus meningkat dari tahun ke tahun dengan peringkat pertama di dunia disusul Rusia, Tiongkok, dan Filipina (Kaufman et al., 2015). Lebih dari dua dari tiga laki-laki di Indonesia adalah perokok. Selain itu jumlah perokok pada kategori usia produktif di Indonesia mencapai lebih dari 30%. Jumlah ini tercatat mengalami peningkatan sejak tahun 2018 hingga tahun 2020 (Kementerian Kesehatan RI, 2018). Kondisi saat ini semakin mengkhawatirkan, karena rata-rata prevalensi perokok perempuan juga meningkat dari 4,2% pada tahun 1995 menjadi 6,7% pada tahun 2015 (Dinas Kesejahteraan Indonesia, 2015). Adanya kejadian ini, angka kematian meningkat dari tahun ke tahun.

Rokok salah satu penyebab kematian terbesar di Indonesia. 5.000.000 orang

meninggal karena mereka perokok aktif, sementara lebih dari 600.000 orang meninggal karena terpapar asap tembakau orang lain atau dianggap sebagai perokok penyendiri. (Kementerian Kesehatan RI, 2018). Buruknya kondisi klinis yang disebabkan oleh paparan asap rokok dapat diatasi dengan beberapa upaya diantaranya menjaga pola hidup sehat, konsumsi buah dan sayur yang cukup serta mengatur pola tidur teratur. Selain aplikasi pola hidup sehat, suplementasi antioksidan dari produk herbal menjadi salah satu alternatif solusi untuk memperbaiki kondisi klinis pasca paparan asap rokok.

Rokok berpotensi menimbulkan penyakit kardiovaskular dan pernapasan, paparan asap rokok dalam jangka waktu panjang dapat mempengaruhi fertilitas atau tingkat kesuburan pria (Dai et al., 2015). Dampak lain yang disebabkan oleh radikal bebas tersebut adalah

penurunan kualitas sperma. Asap rokok menghambat proses spermatogenesis pada tahap spermatid juga menghambat produksi hormon testosterone (Gunes *et al.*, 2018).

Mengacu pada pemaparan permasalahan diatas, peneliti tertarik melakukan penelitian terkait dengan metode pengukuran kerusakan viabilitas dan morfologi spermatozoa hewan coba setelah dipapar asap rokok. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui kerusakan viabilitas dan morfologi spermatozoa yang diberikan paparan asap rokok. Hasil penelitian ini diharapkan dapat menjadi sumber referensi di bidang kesehatan dalam upaya mengurangi dampak negative paparan asap rokok terhadap kesehatan manusia terutama terhadap kualitas sperma. Selain itu, hasil penelitian ini juga dapat digunakan sebagai panduan praktikum pada mata kuliah Anatomi dan Fisiologi Hewan dan mata kuliah relevan lainnya.

## Bahan dan Metode

### Waktu dan tempat penelitian

Penelitian berlangsung pada bulan Maret – Mei 2022 pada kurun waktu 8 minggu. Rincian sebagai berikut: pertama, 1 minggu untuk persiapan, kemudian, 5 minggu untuk perlakuan, selanjutnya, 2 minggu untuk analisis statistik dan penyusunan seminar hasil. Penelitian bertempat di Laboratorium Imunobiologi, FMIPA, Universitas Mataram.

### Alat dan bahan

Alat penelitian yaitu Kandang Mencit, Spuit / Syringe, Sonde, Mikroskop, Neraca Analitik, Obyek glass, Cover, Glass, Disecting set (alat bedah), Smoke, box, Spektrofotometer UV-Vis, Falcon 15 mL, Falcon 50 mL, Erlenmeyer 100 mL, well plate, dan Mikropipet. Bahan penelitiannya yaitu hewan coba yang dipapar asap rokok dengan metode Rancangan Acak Lengkap (RAL) dengan pola faktorial.

### Prosedur kerja

Penelitian ini dilakukan dengan dua prosedur utama yaitu pemaparan asap rokok dan pengamatan kualitas sperma. Prosedur mendetail dipaparkan sebagai berikut:

#### *Aklimatisasi hewan uji*

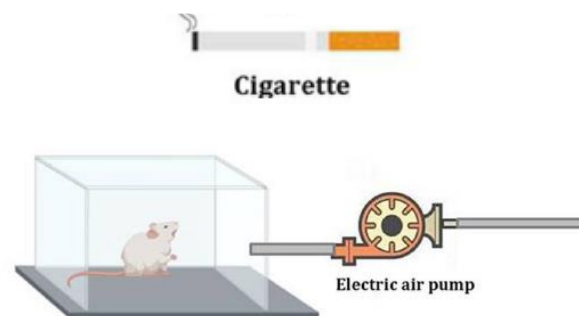
Mencit sebanyak 60 ekor dibagi dalam 5 kelompok yaitu kelompok kontrol negatif dan

positif, perlakuan 1, perlakuan 2, dan perlakuan 3. Mencit diaklimatisasi selama 7 hari dan diberikan pakan.

#### *Paparan asap rokok pada hewan uji*

Memasukkan mencit dalam box kemudian ditutup menggunakan tutup plastik yang telah dihubungkan aerator. Pemaparan asap rokok dilakukan selama  $\pm$  0', 5', 15' atau 30'. Pemberian ekstrak kulit buah naga merah 0,5 mL setiap perlakuan konsentrasi 50  $\mu$ g / mL, 500  $\mu$ g / mL, 5000  $\mu$ g / mL, dilakukan secara oral 30 menit kemudian. Penimbangan berat badan mencit juga akan dilakukan secara berkala yaitu setiap 1 kali dalam 1 minggu untuk menganalisis dampak pemaparan asap rokok pada mencit. Jarak waktu penimbangan yang cukup jauh dipilih untuk menghindari stress pada mencit.

Paparan asap rokok dan ekstrak kulit buah naga merah diberikan setiap hari selama 30 hari. Perlakuan 1 – 3 merupakan kelompok yang diberikan perlakuan konsumsi 0,5 mL ekstrak kulit buah naga merah konsentrasi 50, 500 atau 5000  $\mu$ g/mL selama 30 hari berturut-turut. Pengamatan kualitas sperma pada hari ke 31 dengan menggunakan sperma dari epididimis cauda. Mengamati kualitas sperma yaitu motilitas spermatozoa, viabilitas spermatozoa, morfologi spermatozoa dan konsentrasi jumlah spermatozoa.



**Gambar 1.** Ilustrasi pemaparan asap rokok terhadap mencit (Prasedya *et al.*, 2020)

### Pengumpulan data

#### *Penilaian viabilitas spermatozoa*

Presentase viabilitas spermatozoa diamati menggunakan preparat apus dengan cara semen ditetaskan pada objek gelas sekitar 10-15  $\mu$ L kemudian ditambahkan 5-10  $\mu$ L pewarna nigrosin eosin. Cover glass digeser ke arah kanan

serta dikering anginkan kemudian diamati di bawah mikroskop dengan perbesaran 400 kali. Persentase hidup dan mati serta morfologi spermatozoa dihitung hingga 100-200 sel spermatozoa (Hariadi, 2018).

#### Penilaian morfologi sperma

Morfologi sperma dinilai dari slide yang telah digunakan saat penilaian viabilitas sperma. Penilaian ini dilakukan dengan mengamati morfologi sperma dengan menggunakan mikroskop.

#### Analisis data

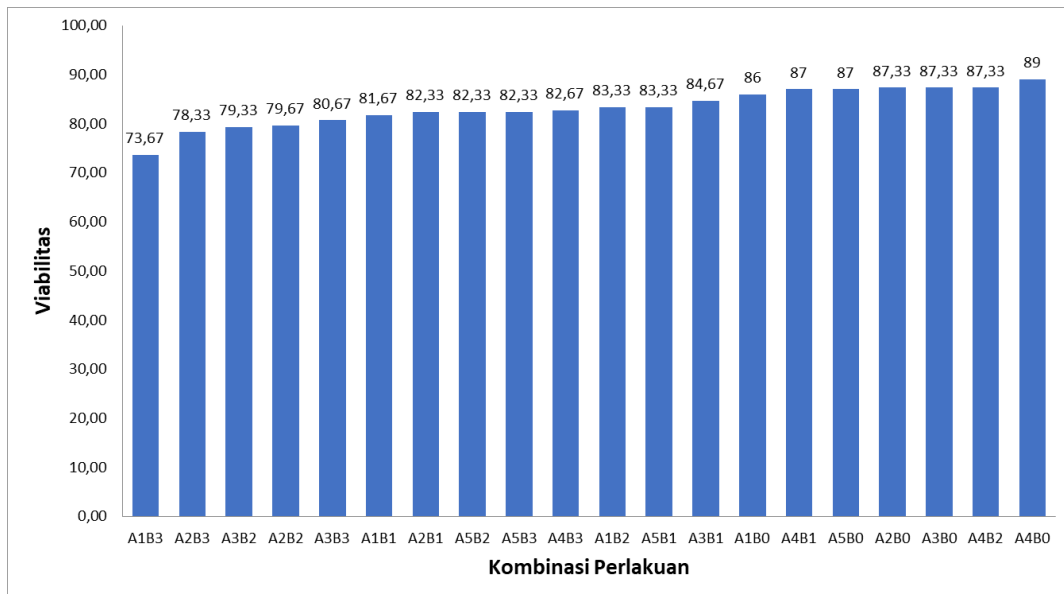
Seluruh data yang diperoleh dari penelitian ini dianalisis dengan program statistik SPSS IBM 22. Analisis deskriptif digunakan untuk menganalisis data-data berupa berat badan, konsentrasi spermatozoa, motilitas, viabilitas spermatozoa, persentase morfologi spermatozoa. Uji normalitas data dilakukan dengan tes *Shapiro-Wilk* terhadap data motilitas, viabilitas, morfologi spermatozoa dan konsentrasi spermatozoa. Data dinyatakan terdistribusi normal bila nilai  $p > 0.05$ . Data-data motilitas,

viabilitas, morfologi, dan konsentrasi sperma dianalisis dengan ANOVA yang dilanjutkan dengan uji Tukey pada taraf signifikansi 5%.

### Hasil dan Pembahasan

#### Viabilitas spermatozoa mencit

Hasil penelitian pada gambar 2 menunjukkan pengaruh paparan asap rokok dan pemberian ekstrak kulit buah naga merah terhadap viabilitas spermatozoa mencit. Hasil viabilitas yang paling rendah yaitu A1B3, A2B3, dan A3B2 artinya pada paparan 15 dan 30 menit ekstrak kulit buah naga merah belum mampu mempertahankan viabilitas spermatozoa. Sedangkan hasil yang paling tinggi yaitu A4B0, A4B2, dan A3B0 artinya pemberian 500  $\mu\text{g/mL}$  ekstrak kulit buah naga mampu mempertahankan viabilitas spermatozoa mencit pada paparan 15 menit. Viabilitas merupakan jumlah spermatozoa yang hidup. Hasil penelitian kualitas sperma pada paparan 0, 5, 15 dan 30 menit mengalami perbedaan yang nyata ( $p > 0.05$ ). Artinya paparan asap rokok mampu menurunkan viabilitas spermatozoa.



**Gambar 2.** Hasil uji lanjut pengaruh paparan asap rokok dan pemberian ekstrak kulit buah naga merah terhadap viabilitas spermatozoa mencit

Paparan 15 dan 30 menit menurunkan kualitas viabilitas spermatozoa mencit. Hasil penelitian ini sejalan dengan Jems dalam Mandasari *et al.*, (2019), bahwa pemaparan asap rokok secara nyata mempengaruhi viabilitas

spermatozoa. Hasil penelitian ini, lebih tinggi dibandingkan Dewanto dan Isnaini (2017) di mana viabilitas yang dihasilkan 30-68,2. Hal ini diduga karena kandungan antioksidan dalam kulit buah naga merah yang dapat

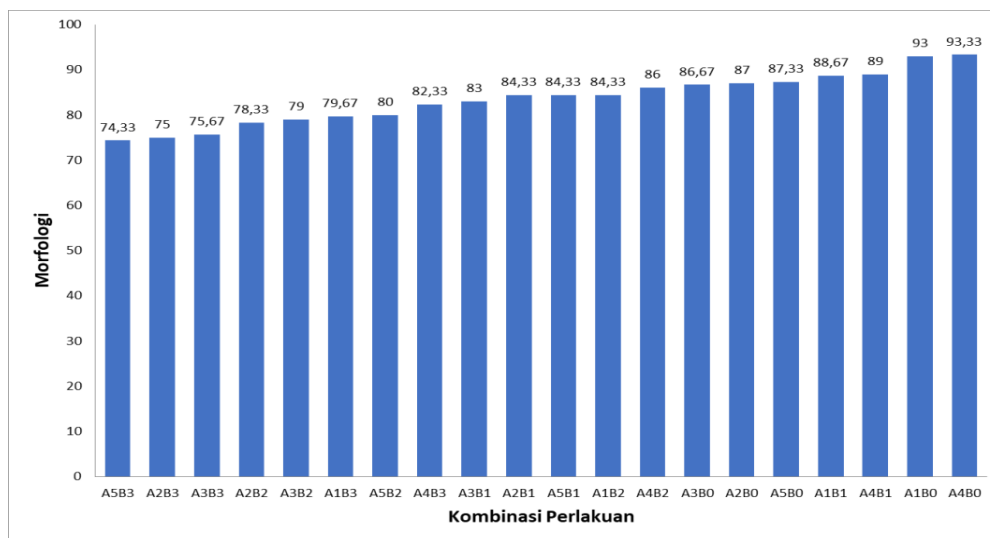
mempertahankan viabilitas spermatozoa. Spermatozoa mengalami penurunan viabilitas skarena stress oksidatif. Hal ini dipengaruhi oleh perubahan struktur asam nukleat, protein, plasma sel sperma dan lipoprotein. Membran plasma sel sperma akan membentuk asam lemak tak jenuh. Jika terjadi ikatan antara lemak tak jenuh dengan radikal bebas maka akan terbentuk peroksidasi lipid yang akan menyebabkan penurunan fungsi dari membran plasma spermatozoa sehingga spermatozoa akan mati (Rahmanisa *et al.*, 2018).

Nikotin dalam asap tembakau dapat menggerakkan medula adrenal untuk mengeluarkan katekolamin. Katekolamin yang dikirimkan akan mempengaruhi sistem sensorik fokal sehingga menyebabkan gangguan penggabungan kimia testosteron dan spermatogenesis (Amandasari *et al.*, 2021). Tubuh dapat memproduksi radikal bebas ketika

terdapat nikotin dan zat berbahaya lainnya. Permasalahan ini membawa perubahan mortalitas dan perubahan morfologi spermatozoa selama siklus spermatogenesis.

### Morfologi spermatozoa mencit

Hasil penelitian pada gambar 2. menunjukkan pengaruh paparan asap rokok dan pemberian ekstrak kulit buah naga merah terhadap morfologi spermatozoa mencit. Hasil morfologi yang paling rendah yaitu A5B3, A2B3, dan A3B3 artinya pada paparan 30 menit ekstrak kulit buah naga merah belum mampu mempertahankan morfologi spermatozoa. Sedangkan hasil yang paling tinggi yaitu A4B0, A1B0, dan A4B1 artinya pemberian 500 µg/mL ekstrak kulit buah naga mampu mempertahankan morfologi spermatozoa mencit pada paparan 5 menit.



**Gambar 3.** Hasil uji lanjut pengaruh paparan asap rokok dan pemberian ekstrak kulit buah naga merah terhadap morfologi spermatozoa mencit

Tubuh dapat memproduksi senyawa berbahaya ketika terdapat nikotin dan zat berbahaya lainnya. Permasalahan ini membawa perubahan mortalitas dan perubahan morfologi spermatozoa selama siklus spermatogenesis. Viabilitas sperma mencit yang memiliki persentasi hidup terbanyak ialah pada perlakuan kedua dengan pemberian 500 µg/mL. Artinya pada perlakuan kedua mampu mempertahankan serta meningkatkan viabilitas spermatozoa mencit.

Berkurangnya viabilitas dari setiap paparan disebabkan oleh peningkatan gas dan bagian

molekul yang terdiri dari nitrogen dan hidrokarbon yang dihirup oleh perokok aktif atau perokok laten. Meningkatkan senyawa berbahaya atau oksigen reaktif, bahan kimia dalam rokok akan mengganggu spermatogenesis (Batubara, 2013). Peningkatan produksi radikal bebas dapat diatasi dengan antioksidan. Senyawa flavonoid yang terkandung dalam strip produk alami binatang mitos merah dapat membangun GnRH dalam pelepasan FSH dan LH. Kemampuan LH untuk mengeluarkan bahan kimia testosteron.

Hasil penelitian menunjukkan bahwa paparan 0 menit, paparan 5 menit, paparan 15

menit dan paparan 30 menit memiliki nilai signifikansi  $p < 0.05$  artinya berbeda nyata. Semakin bertambahnya waktu pemaparan asap rokok maka morfologi normal spermatozoa akan menurun. Hasil penelitian ini mempunyai morfologi normal lebih baik dibandingkan Toy *et al.*, (2016), morfologi yang didapatkan tanpa asap rokok sebesar 84% dan menurun menjadi 67% setelah diberikan paparan.

Pemberian paparan rokok secara nyata mempengaruhi morfologi spermatozoa mencit pada menit ke-15 dan 30 menit. Artinya bahwa semakin lama mencit dipapar maka morfologi spermatozoa semakin menurun. Hal ini sejalan dengan Zakiyyah (2017), bahwa semakin lama paparan asap rokok akan meningkatkan radikal bebas dalam tubuh dan menurunkan antioksidan. Penurunan antioksidan akan mempengaruhi proses spermatogenesis sehingga menghasilkan spermatozoa yang tidak sempurna (abnormal).

Akibat reaksi oksidatif yang mengakibatkan mutasi pada DNA mitokondria, produksi radikal bebas tubuh akan meningkatkan kerusakan morfologi spermatozoa. Sehingga semakin lama paparan maka semakin besar jumlah partikel radikal bebas dalam tubuh. Sistem oksidasi nikotinamida adenin dinukleotida fosfat pada tingkat membran plasma atau tingkat mitokondria adalah dua cara tubuh menghasilkan radikal bebas (Awuy *et al.*, 2021). Morfologi spermatozoa mencit dalam penelitian ini mengalami keabnormalan mulai dari kepala, leher maupun ekor. Hasil penelitian ini menunjukkan bahwa pada indikator morfologi, pada perlakuan kedua yaitu pemberian 500  $\mu\text{g/mL}$  ekstrak kulit buah naga merah mampu meningkatkan kembali persentasi morfologi normal spermatozoa mencit. Kesimpulannya bawah pemberian ekstrak kulit buah naga merah dengan dosis 500  $\mu\text{g/mL}$  mampu mempertahankan morfologi secara signifikan. Hasil penelitian ini lebih tinggi dibandingkan Claudia *et al.*, (2013) morfologi normal yang dihasilkan 43,81% dan abnormal 60%.

Morfologi spermatozoa dipengaruhi oleh motilitas spermatozoa, motilitas spermatozoa yang dihasilkan dalam penelitian claudia berjumlah 43%. Dalam penelitian ini motilitas yang dihasilkan lebih tinggi sehingga morfologi normal pun lebih tinggi. Morfologi spermatozoa terbentuk pada saat proses spermatogenesis, jika terjadi gangguan spermatogenesis maka akan

menyebabkan terjadinya abnormalitas primer. Jika terjadi gangguan maturasi spermatozoa dalam epididimis maka akan terjadi abnormalitas sekunder. Abnormalitas primer ditandai dengan kepala ganda, ukuran kepala yang tidak normal dan sebagainya. Abnormalitas sekunder ditandai dengan terjadi kelainan pada ekor (Ermayant *et al.*, 2010).

## Kesimpulan

Penelitian pengukuran kerusakan viabilitas dan morfologi spermatozoa hewan coba setelah dipapar asap rokok dapat disimpulkan bahwa da pengaruh paparan rokok dengan pemberian ekstrak kulit buah naga merah terhadap kualitas sperma mencit. Paparan asap rokok tertinggi diberikan pada ekstrak kulit buah naga merah ditinjau dari viabilitas sebesar 89% dan morfologi sebesar 93,33%. Pemberian ekstrak kulit buah naga merah mengurangi pengaruh paparan asap rokok terhadap viabilitas dan morfologi mencit.

## Ucapan Terima Kasih

Peneliti ucapkan terima kasih kepada seluruh pihak yang terlibat dalam penelitian ini sehingga dapat diselesaikan, serta kepada Laboratorium Immunobiologi FMIPA Universitas Mataram yang telah turut mengkomodir pelaksanaan penelitian ini.

## Referensi

- Amalia, S., Wahdaningsih, S., & Untari, E. K. (2014). Antibacterial activity testing of n-hexane fraction of red dragon (*Hylocereus polyrhizus* britton & rose) fruit peel on *Staphylococcus aureus* ATCC 25923. *Majalah Obat Tradisional*, 19(2), 89-94.  
<https://doi.org/10.22146/tradmedj.8146>
- Amandasari, N., Basuki, R., Ratnaningrum, K., dan Kartikadewi, A. (2021). Efek Protektif Ekstrak Daun Cincau Hijau terhadap Viabilitas Spermatozoa Mencit Jantan yang Dipapar Asap Rokok Konvensional dan Asap Rokok Elektrik. *In Prosiding Seminar Nasional Unimus* (Vol. 4). <https://prosiding.unimus.ac.id/index.php/s emnas/article/view/959>

- Awuy, F. D., Purwanto, D. S., dan Mewo, Y. M. (2021). Pengaruh Pemberian Vitamin C Terhadap Kualitas Spermatozoa Yang Terpapar Asap Rokok. *eBiomedik*, 9(2). <http://doi.org/10.35790/ebm.9.2.2021.33451>.
- Aziz, F.A. dan Noor, M.N. (2010). Ethanol Extract of Dragon Fruit And Its Effect On Sperm Quality And Histology Of The Testes In Mice. *Advances In Applied Biomedical Research Journal*. 21 (2): 126-130.
- Badan Penelitian Pengembangan Kesehatan Kementerian Kesehatan RI.(2018). Riset Kesehatan Daerah. Jakarta: Riskesdas.
- Batubara, I.V.D., B. Wantouw dan L. Tendean. (2013). Pengaruh Paparan Asap Rokok Kretek Terhadap Kualitas Spermatozoa Mencit Jantan (Mus Musculus). *Jurnal e-Biomedik*. 1(1): 330-337. <https://doi.org/10.35790/ebm.v1i1.4367>
- Claudia, V., de Queljoe, E., & Tendean, L. (2013). Perbedaan Kualitas Spermatozoa Mencit Jantan (Mus musculus L) yang diberikan vitamin C setelah pemaparan asap rokok. *eBiomedik*, 1(1). <https://doi.org/10.35790/ebm.v1i1.4610>
- Dai, J.B., Wang, Z.X., dan Qiao, Z.D. (2015). The Hazardous Effects of Tobacco Smoking On Male Fertility. *Asian Journal of Andrology*, 17, 964 – 960. 10.4103/1008-682X.150847.
- Dewanto, H. N., dan Isnaeni, W. (2017). Pengaruh Ekstrak Kulit Buah Rambutan Terhadap Kualitas Sperma Tikus yang Terpapar Asap Rokok. *Life Science*, 6(2), 62-68. <https://journal.unnes.ac.id/sju/UnnesJLifeSci/article/view/25349>
- Gunes, S., Mahmutoglu, A.M., Arslan, M.A., dan Henkel, R. (2018). Smoking-induced genetic and epigenetic alterations in infertile men. *First International Journal of Andrology*, 2018, 1 – 17. 10.1111/and.13124
- Hariadi I., (2018). Pengaruh Level Ekstrak Biji Kelor (*Moringaoleifera*) Pada Pengencer Tris Kuning Telur Ayam Dalam Mempertahankan Kualitas Spermatozoa Kambing Kacang pada Suhu 5°C. *Skripsi*. Fakultas Peternakan Universitas Mataram.
- Kaufman, M. R., Merritt, A. P., Rimbatmaja, R., dan Cohen, J. E. (2015). ‘Excuse me, sir. Please don’t smoke here’. A qualitative study of social enforcement of smoke-free policies in Indonesia. *Health policy and planning*, 30(8), 995-1002. 10.1093/heapol/czu103
- Kementerian Kesehatan Republik Indonesia. (2013). Peraturan Menteri Kesehatan Republik Indonesia Nomor 28 Tahun 2013 Tentang Tentang Pencantuman Peringatan Kesehatan dan Informasi Kesehatan pada Kemasan Produk Tembakau. Jakarta: Kemenkes RI.
- Kementrian Kesehatan. (2013). Riset Kesehatan Dasar (RISKESDAS) *Laporan Nasional 2013*.
- Lin, X. E., Gao, H., Ding, Z., Zhan, R., Zhou, Z., dan Ming, J. (2021). Comparative metabolic profiling in pulp and peel of green and red pitayas (*Hylocereus polyrhizus* and *Hylocereus undatus*) reveals potential valorization in the pharmaceutical and food industries. *BioMed research international*, 10.1155/2021/6546170.
- Mandasari, A. A., Asiyah, S. N., dan Lintang, K. (2019). Perubahan Kualitas Sperma Mencit (Mus musculus) Yang Terpapar Asap Rokok Elektrik. *Biotropic*, 3(1), 122-128. <https://doi.org/10.29080/biotropic.2019.3.2.122-128>
- Prasedya, E.S., Ambana, Y., Martyasari, N.W.R., Aprizal, Y., Nurrijawati, dan Sunarpi. (2020). Short-term E-cigarette toxicity effects on brain cognitive memory functions and inflammatory responses in mice. *Toxicological Research*, 2020, 1 – 7. <https://doi.org/10.1007/s43188-019-00031-3>
- Prastika, Z., Susilowati, S., Agustono, B., Safitri, E., Fikri, F., dan Prastiya, R. A. (2018). Motilitas dan viabilitas spermatozoa sapi rambon di Desa Kemiren Banyuwangi. *Jurnal Medik Veteriner*, 1(2), 38-42. <https://doi.org/10.20473/jmv.vol1.iss2.2018.38-42>
- Rahmanisa, S., Kurniawaty, E., dan Hayatillah, N. (2018). Pengaruh Pemberian Ekstrak Etanol 96% Bekatul Beras Merah Terhadap Jumlah dan Viabilitas

- Spermatozoa Tikus Putih (*Rattus norvegicus*) Galur Sprague dawley yang Diinduksi Asap Rokok Kretek. In Prosiding Seminar Nasional Penelitian dan Pengabdian Kepada Masyarakat. Lembaga Penelitian dan Pengabdian Kepada Masyarakat (LPPM) Unila.
- Sushmitha, H. S., Roy, C. L., Gogoi, D., Velagala, R. D., Nagarathna, A., Balasubramanian, S., dan Rajadurai, M. (2018). Phytochemical and Pharmacological Studies on *Hylocereus undatus* Seeds: An In Vitro Approach. *World Journal of Pharmacological Research*, 7(14), 986-1006.
- Tan, M.C., Tan, C.P., dan Ho, C.W. (2013). Effect of extraction solvent system, time and temperature on total phenolic content of henna (*Lawsonia inermis*) stems. *International Food Research Journal*, 20(6), 3117 – 3123.
- Tooy, M., Tendean, L., & Satiawati, L. (2016). Perbandingan kualitas spermatozoa tikus wistar (*rattus norvegicus*) yang diberi paparan asap rokok dengan asap rokok elektronik. *eBiomedik*, 4(2). <https://doi.org/10.35790/ebm.v4i2.14632>