



## Efek Protektif Ekstrak Daun Cincau Hijau terhadap Viabilitas Spermatozoa Mencit Jantan yang Dipapar Asap Rokok Konvensional dan Asap Rokok Elektrik

### *Protective Effects of Green Cincau Leaf Extract on Spermatozoa Viability of Male Mice Exposed to Conventional Cigarette Smoke and E-Cigarette Smoke*

Nadia Amandasari,<sup>1</sup> Rochman Basuki,<sup>1</sup> Kanti Ratnaningrum,<sup>1\*</sup> Arum Kartikadewi<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Program studi S1 Kedokteran, Fakultas Kedokteran Universitas Muhammadiyah Semarang, Indonesia

\*Corresponding author: [kantiratna@ymail.com](mailto:kantiratna@ymail.com)

#### Abstrak

Latar belakang: Gangguan viabilitas spermatozoa dapat terjadi akibat adanya radikal bebas. Asap rokok merupakan salah satu sumber radikal bebas. Antioksidan alami dapat digunakan sebagai alternatif dalam mencegah radikal bebas. Tanaman cincau hijau (*Cyclea barbata L. Miers*) merupakan salah satu sumber antioksidan alami. Masih adanya perdebatan antara pengaruh penggunaan rokok elektrik dan rokok konvensional terhadap gangguan fertilitas, adanya kandungan antioksidan pada cincau hijau, dan potensi pengolahan cincau hijau tanpa proses pemanasan, maka peneliti ingin mengetahui apakah pemberian ekstrak daun cincau hijau memiliki efek protektif terhadap viabilitas spermatozoa pada kelompok mencit jantan yang dipapar asap rokok konvensional maupun kelompok yang dipapar asap rokok elektrik. Metode: Penelitian ini merupakan penelitian eksperimental menggunakan *posttest only control group design* dengan simple random sampling. Penghitungan sampel menggunakan rumus Federer. Sampel dibagi menjadi 5 kelompok: kelompok tanpa perlakuan (K-), kelompok yang dipapar asap rokok konvensional (K1), kelompok yang dipapar asap rokok elektrik (K2), kelompok yang dipapar asap rokok konvensional dan diberi ekstrak daun cincau hijau (P1), dan kelompok yang dipapar asap rokok elektrik dan diberi ekstrak daun cincau hijau. Sampel menggunakan mencit balb/c jantan dengan pengamatan 30 hari. Pemeriksaan viabilitas spermatozoa dilakukan pada hari ke 31. Data dianalisis menggunakan uji Shapiro-Wilk, Lavene test, uji One Way Anova, dan uji post hoc LSD. Hasil: Viabilitas spermatozoa kelompok P1 signifikan dibandingkan kelompok K1 ( $p=0,011$ ), viabilitas spermatozoa kelompok P2 signifikan dibandingkan kelompok K2 ( $p=0,006$ ). Kesimpulan: Ekstrak daun cincau hijau memiliki efek protektif dalam meningkatkan viabilitas spermatozoa pada kelompok mencit jantan dipapar asap rokok konvensional maupun elektrik.

**Kata Kunci:** cincau hijau, viabilitas spermatozoa, rokok konvensional, rokok elektrik

#### Abstract

*Background: Impaired spermatozoa viability can occur due to presence of free radicals. Cigarette smoke is a source of free radicals. Natural antioxidants can be used as an alternative in preventing free radicals. Green grass jelly (Cyclea barbata L. Miers) is a source of natural antioxidants. There is still a debate between the effect of using e-cigarettes and conventional cigarettes on fertility disorders, the presence of antioxidants in green grass jelly, and the potential for processing green grass jelly without heating, the researchers wanted to find out whether giving green grass jelly leaf extract had a protective effect on spermatozoa viability in the mice group. males exposed to conventional cigarette smoke and groups exposed to e-cigarette smoke. Methods: An experimental study using a posttest only control group design with simple random sampling. Sample*

Universitas Muhammadiyah Semarang

Seminar Nasional Publikasi Hasil-Hasil Penelitian dan Pengabdian Masyarakat



calculation using Federer formula. The sample was divided into 5 groups: the untreated group (K-), the group exposed to conventional cigarette smoke (K1), the group exposed to e-cigarette smoke (K2), the group exposed to conventional cigarette smoke and given green grass jelly leaf extract (P1), and the group that was exposed to e-cigarette smoke and given green grass jelly leaf extract. The sample used male balb/c mice with 30 days of observation. Spermatozoa viability examination was carried out on day 31. Data were analyzed using the Shapiro-Wilk test, Lavene test, One Way Anova test, and post hoc LSD test. Results: The spermatozoa viability of the P1 group was significant compared to the K1 group ( $p=0.011$ ), the spermatozoa viability of the P2 group was significant compared to the K2 group ( $p=0.006$ ). Conclusion: Green grass jelly leaf extract had a protective effect in increasing the viability of spermatozoa in a group of male mice exposed to conventional and electric cigarette smoke.

**Keywords:** green grass jelly, spermatozoa viability, conventional cigarettes, e-cigarettes

## PENDAHULUAN

Gangguan kesuburan atau infertilitas pada laki-laki masih merupakan masalah dalam kesehatan reproduksi di Indonesia.<sup>1</sup> Viabilitas sperma termasuk salah satu parameter yang digunakan untuk menilai kualitas sperma, semakin baik viabilitas spermatozoa maka semakin banyak spermatozoa yang mampu mencapai sel telur sehingga kemungkinan keberhasilan fertilisasi semakin besar.<sup>2</sup>

Sekitar 60% penyebab infertilitas disebabkan karena kelainan produksi sperma akibat radiasi/ bahan toksik. Bahan toksik pada rokok dapat menyebabkan gangguan kesuburan laki-laki.<sup>3</sup> Asap rokok memiliki kandungan zat kimia yang merupakan toksik meliputi nikotin, fenol, asetaldehida, dan cadmium dan beberapa komponen gas, contohnya *Carbon monoksida* (CO), *Carbon dioksida* (CO<sub>2</sub>), Hidrogen sianida (HCN), dan Nitrogen oksida (NO<sub>x</sub>).<sup>4</sup> Pada perkembangannya terdapat rokok elektrik sebagai alternatif pengganti rokok konvensional yang mengandung nikotin, *Tobacco-specific nitrosamines* (TSNAs), *Volatile organic compounds* (VOCs), *Polycyclic aromatic hydrocarbons* (PAHs), dan perasa. Senyawa yang terkandung pada kedua jenis rokok tersebut berpotensi menimbulkan radikal bebas.<sup>2</sup>

Salah satu pencegahan gangguan viabilitas spermatozoa akibat rokok adalah dengan penggunaan antioksidan. Antioksidan alami dapat digunakan sebagai alternatif dalam mencegah radikal bebas. Tanaman cincau hijau (*Cyclea barbata L. Miers*) merupakan salah satu alternatif sumber antioksidan alami karena memiliki senyawa fenol yaitu flavonoid.<sup>5</sup> Masih adanya perdebatan antara pengaruh penggunaan rokok elektrik dan rokok konvensional terhadap gangguan fertilitas, adanya kandungan antioksidan pada cincau hijau, dan potensi pengolahan cincau hijau tanpa proses pemanasan, maka peneliti ingin mengetahui apakah pemberian ekstrak daun cincau hijau sebagai agen protektif memiliki pengaruh terhadap viabilitas spermatozoa pada kelompok mencit jantan yang dipapar asap rokok konvensional maupun kelompok yang dipapar asap rokok elektrik



## METODE

Penelitian ini merupakan penelitian eksperimental menggunakan *posttest only control group design* dengan *simple random sampling* penomoran sederhana. Penghitungan sampel menggunakan rumus Federer sebanyak 5 sampel tiap kelompok dengan penambahan 1 sampel sebagai antisipasi *drop out*, menjadi 6 sampel tiap kelompok perlakuan. Penelitian dilakukan di laboratorium biologi Fakultas Matematika Dan Ilmu Pengetahuan Alam (FMIPA) Universitas Negeri Semarang (UNNES) pada bulan Februari – Maret 2021. Sampel menggunakan mencit balb/c jantan dengan kriteria inklusi mencit strain balb/c jantan tanpa kelainan anatomi, berat badan rata-rata 25-30 gram, dan umur 8-12 minggu; kriteria eksklusi adalah mencit strain balb/c jantan yang mengalami sakit atau mati pada saat adaptasi; dan kriteria *drop out* meliputi tidak aktif dalam masa penelitian, mati dalam masa penelitian. Sampel dibagi menjadi 5 kelompok meliputi kelompok tanpa ekstrak daun cincau hijau dan asap rokok apapun (K-), kelompok terpapar asap rokok konvensional tanpa ekstrak daun cincau hijau (K1), kelompok terpapar asap rokok elektrik tanpa ekstrak daun cincau hijau (K2), kelompok terpapar asap rokok konvensional dan ekstrak daun cincau hijau (P1), kelompok terpapar asap rokok elektrik dan ekstrak daun cincau hijau (P2). Penelitian ini diawali dengan studi pendahuluan dengan menggunakan 4 mencit selama 30 hari, bertujuan mengetahui pemilihan dosis yang digunakan tidak membuat mencit mati atau sakit pada masa penelitian. Penelitian ini sudah mendapatkan persetujuan Etik dengan diterbitkannya Ethical Clearance (EC) No.040/EC/FK/2021 oleh KEPK Fakultas Kedokteran Unimus. Data dianalisis menggunakan uji *Shapiro-Wilk*, *Lavene test*, uji *One Way Anova*, dan uji *post hoc LSD*.

### A. Pembuatan Ekstrak Daun Cincau Hijau

Pembuatan ekstrak daun cincau dimulai dengan 1). Pemilihan daun cincau dengan kriteria daun cincau yang muda, yaitu 2 sampai 5 ruas dari pucuk dan diusahakan tingkat ketebalan daun cincau yang digunakan sama, 2). Sebanyak 7 kg daun cincau hijau dicuci, dibersihkan, dikeringkan, tanpa terpapar sinar matahari secara langsung, 3). Setelah kering, kemudian dihaluskan, 4). Lakukan ekstraksi dengan cara maserasi menggunakan pelarut etanol 70% sebanyak 10 liter selama 3 hari, 5). Hasil ekstrak diperas dan disaring dengan menggunakan kertas saring atau flannel, 6). Ekstrak diuapkan di *rotary evaporator* dengan suhu 40°C, hasil penguapan merupakan ekstrak kental dengan konsentrasi 100%.

### B. Penentuan Dosis dan Pemberian Dosis

Ekstrak daun cincau hijau dengan dosis 52,5 mg/ml pada 200 gram tikus yang didapatkan dari daun cincau kering sebanyak 7 kg.<sup>6</sup> Pada penelitian ini, dosis ekstrak



daun cincau hijau 52,5 mg dikonversikan sesuai tabel konversi dosis hewan coba dengan faktor konversi dari tikus 200 gram ke mencit 20 gr yaitu 0,14. Hasil yang diperoleh yaitu: ekstrak kental untuk dosis tikus: 52,5 mg/ml, dosis mencit:  $0,14 \times 52,5$  mg/ml = 7,35 mg/ml, maka kebutuhan untuk dosis semua kelompok selama rentang waktu 30 hari adalah 220,5 mg/ml dari bobot kering 7 kg.

### C. Paparan asap rokok

Kelompok mencit strain balb/c jantan yang diberi pemaparan rokok konvensional dimasukkan ke dalam kotak berukuran 30x20x20 cm (*smoking box*) pada gambar 1. Kotak tersebut memiliki lubang kecil yang dapat menghubungkan selang ke alat pembakaran rokok, sehingga asap yang dihasilkan oleh rokok konvensional dapat dialirkan menuju *smoking box*. Kelompok mencit yang akan dipapar rokok konvensional dimasukkan bersamaan ke dalam *smoking box*, kemudian tutup box. Satu batang rokok dipasang pada ujung alat pembakaran rokok, bertujuan agar rokok dapat dipompa sehingga dapat menghasilkan asap, kemudian alat pembakaran rokok dihubungkan dengan aliran listrik dan dinyalakan sehingga rokok akan terpompa hingga asap dapat masuk ke dalam *smoking box* melalui selang yang sudah terpasang.

Rokok konvensional yang digunakan adalah rokok bermerek Sampoerna mild dengan kandungan 0,8-1,1 mg nikotin dan 10-18 mg tar. Asap yang dihasilkan oleh uap tersebut akan masuk ke *smoking box*. Kelompok mencit yang ada di *smoking box* konvensional adalah kelompok K1 dan P1. Pada kelompok P1, 30 menit sebelum mulai paparan asap rokok, diberikan ekstrak daun cincau hijau melalui sonde lambung. Paparan asap rokok konvensional diberikan sebanyak 4 batang perhari dalam 2x pemaparan yaitu 2 batang pada pagi hari dan 2 batang pada siang hari selama 30 hari

Rokok elektrik yang digunakan adalah rokok bermerek PICO isi ulang custom original dengan kandungan 4 mg nikotin dalam 10 ml larutan. Liquid rokok elektrik dihubungkan dengan selang ke alat pembakaran rokok pada ujung alat, hal ini bertujuan agar liquid dapat dituangkan sehingga liquid dapat masuk ke alat pembakaran rokok, sehingga terjadi pembakaran dan menghasilkan asap. Asap yang dihasilkan oleh uap tersebut akan dikirim ke *smoking box*. Kelompok mencit yang ada di *smoking box* elektrik adalah kelompok K2 dan P2. Pada kelompok P2, 30 menit sebelum mulai paparan, diberikan ekstrak daun cincau hijau terlebih dahulu melalui sonde lambung. Paparan asap rokok elektrik diberikan perhari dalam 2x pemaparan yaitu 5 ml pada pagi hari dan 5 ml pada siang hari selama 30 hari.



Gambar 1. *Smoking box* dan selang penghubung asap rokok

#### **D. Pengamatan viabilitas spermatozoa**

Pengambilan sampel diawali dengan pembiusan menggunakan anastesi etamin dosis 0,1 ml/kgbb secara intra muscular. Selanjutnya posisikan mencit pada papan bedah dan pinning pada kaki mencit yang akan dibedah. Pada bagian perut mencit diusap dengan alcohol 70% dan selanjutnya dilakukan pembedahan pada bagian perut mencit dengan scalpel hingga bagian rusuk terbuka. Pengambilan spermatozoa dilakukan melalui pembedahan menggunakan dissecting untuk mengambil organ vas deferens pada mencit serta pengambilan kauda epididimis kanan dan kiri. Selanjutnya diletakkan di cawan petri dan diplirir/ diurut hingga sperma keluar dan dilakukan pembuatan suspense sperma.

Pada hari ke-31 dilakukan pengamatan viabilitas spermatozoa dengan cara mengambil satu tetes suspensi spermatozoa, ditambahkan 2-3 tetes eosin 1% dan negrosin 10% di atas gelas objek. Suspensi zat pewarna dihomogenkan dan dibuat smear, dibiarkan selama 5-10 menit, kemudian dilihat viabilitas spermatozoa dengan menggunakan mikroskop binokuler. Pengamatan viabilitas dilakukan pada 100 spermatozoa per preparat dengan ulangan 3x dengan menggunakan mikroskop perbesaran 400x. Proses yang dilakukan baik dari pengambilan sampel, pewarnaan, pembuatan smear hingga pengamatan viabilitas spermatozoa dilakukan dalam satu waktu tanpa jeda. Proses ini membutuhkan waktu 15 menit dan diharapkan tidak terjadi penurunan viabilitas spermatozoa. Data yang diambil berupa pengamatan meliputi spermatozoa yang hidup dan spermatozoa yang mati. Pada kepala spermatozoa, bila tidak terwarnai berarti spermatozoa tersebut masih hidup dan yang mati pada daerah kepala berwarna merah (terwarnai). Kepala berwarna merah karena zat warna eosin dan negrosin menembus masuk dalam membran sel. Masuknya eosin dan negrosin disebabkan oleh permeabilitas membran sel spermatozoa mati meningkat didaerah kepala yang tidak tertutup akrosom dan memakai preparat hapusan spermatozoa dengan diwarnai eosin juga nigrosine. Interpretasi data pada penelitian ini dikonfirmasi oleh dokter spesialis Patologi Klinik. Adapun penghitungan viabilitas spermatozoa menggunakan rumus <sup>3</sup>:

$$\text{Spermatozoa hidup (\%)} = \frac{\text{jumlah sperma terhitung} - \text{jumlah sperma mati}}{\text{jumlah sperma terhitung}}$$

## HASIL DAN PEMBAHASAN

### A. Hasil

Dari 30 sampel mencit dibagi 5 kelompok masing-masing 6 mencit tiap kelompok, tidak terdapat sampel yang drop out selama pengamatan. Berdasarkan tabel 1 didapatkan nilai rata-rata dari viabilitas spermatozoa kelompok kontrol negatif (K-) 88,67 dengan standar deviasi  $\pm 5,88$  adalah nilai tertinggi, sedangkan kelompok yang dipapar rokok elektrik tanpa pemberian ekstrak daun cincau hijau (K2) memiliki nilai rata-rata 77,2 dengan standard deviasi  $\pm 3,34$  menjadi kelompok dengan nilai rata-rata terendah.

Tabel 1.  
Rerata Viabilitas Spermatozoa Antar Kelompok



Kelompok	Rerata % ( $\pm$ SD)	Median (Min-Max)
K-	88,67 ( $\pm 5,88$ )	90 (78-95)
K1	80,67 ( $\pm 5,27$ )	80,5 (74-88)
K2	77,2 ( $\pm 3,34$ )	77 (73-81)
P1	88,16 ( $\pm 4,4$ )	89,5 (81-93)
P2	85,83 ( $\pm 3,86$ )	86,5 (80-90)

Hasil uji Shapiro wilk di dapatkan data viabilitas spermatozoa yang berdistribusi normal. Uji homogenitas *Levene test*, menunjukkan  $p=0,879$  ( $p>0,05$ ) sehingga memiliki ragam data homogen. Analisis bivariat dengan metode *Uji One Way Anova* menunjukkan hasil  $p=0,001$  ( $p<0,05$ ). Hal ini membuktikan perbedaan yang signifikan ada diantara viabilitas spermatozoa kelompok K1 sampai dengan P2. Gambaran mikroskopis viabilitas spermatozoa dapat dilihat pada gambar 2.

Gambar 2. Gambaran mikroskopis spermatozoa





Berdasarkan tabel 2 hasil analisis *post-hoc* menunjukkan bahwa viabilitas spermatozoa pada kelompok K- secara signifikan lebih baik dibandingkan kelompok K1 ( $p=0,007$ ), viabilitas spermatozoa pada kelompok K- secara signifikan lebih baik dibandingkan kelompok K2 ( $p=0,000$ ). Viabilitas spermatozoa di kelompok P1 secara signifikan lebih baik dibandingkan kelompok K1 ( $p=0,011$ ), viabilitas spermatozoa kelompok P2 signifikan lebih baik dibandingkan kelompok K2 ( $p=0,006$ ).

Viabilitas spermatozoa pada kelompok K- tidak signifikan terhadap P1 ( $p=0,855$ ), viabilitas spermatozoa pada kelompok K- tidak signifikan terhadap P2 ( $p=0,306$ ). Tidak terdapat perbedaan viabilitas sperma yang signifikan antara kelompok K1 dan K2 ( $p=0,235$ ) dan antara kelompok P1 dan P2 ( $p=0,398$ ) (tabel 2).

Tabel 2.  
Perbandingan Viabilitas Spermatozoa Antar Kelompok

Kelompok Perlakuan	K-	K1	K2	P1	P2
K-	-	0,007	0,000	0,855	0,306
K1	0,007	-	0,235	0,011	0,069
K2	0,000	0,235	-	0,001	0,006
P1	0,855	0,011	0,001	-	0,398
P2	0,306	0,069	0,006	0,398	-

## B. Pembahasan

Dari hasil analisis, kelompok mencit yang dipapar asap rokok elektrik memiliki rerata viabilitas yang paling rendah dibanding rerata kelompok rokok konvensional dan kelompok lain (77,2%). Pada kelompok mencit yang dipapar asap rokok konvensional memiliki rerata viabilitas spermatozoa sebesar 80,67%. Persentase pada kelompok paparan rokok konvensional ini lebih tinggi dari penelitian sebelumnya sebesar 47,6%;<sup>6</sup> 44,6%;<sup>7</sup> dan 76,32%.<sup>8</sup>

Tidak terdapat perbedaan yang bermakna antara viabilitas spermatozoa kelompok mencit yang dipapar asap rokok konvensional dan asap rokok elektrik maupun antara kelompok yang diberi ekstrak daun cincau hijau dan paparan asap rokok konvensional dan kelompok yang diberikan ekstrak daun cincau hijau dan paparan asap rokok elektrik. Hal ini dikarenakan asap rokok yang dihasilkan dari rokok konvensional maupun elektrik memiliki kandungan radikal bebas. Beberapa unsur pokok pada asap rokok konvensional dalam bentuk gas diantaranya adalah  $\text{NH}_3$ , CO,  $\text{CO}_2$ , NO,  $\text{NO}_2$  dan HCN.<sup>4,9,10</sup> Sedangkan dalam bentuk partikulat diantaranya adalah tar, nikotin, dan metal. Nikotin dalam asap rokok dapat menstimulasi medulla adrenal untuk melepaskan katekolamin yang dapat



mempengaruhi sistem saraf pusat, sehingga mekanisme umpan balik antara hipotalamus, hipofisis anterior, dan testis terganggu. Akibatnya, proses sintesis hormon testosterone dan spermatogenesis akan terganggu.<sup>9,10</sup> Serupa dengan rokok konvensional, rokok elektrik mengandung TSNAs, VOCs, dan PAHs yang jika dipapar terus menerus dapat mencetuskan radikal bebas dan merupakan zat karsinogen.<sup>2</sup> Meskipun bahan kimia berbahaya yang ditemukan di rokok elektrik lebih sedikit dibandingkan rokok konvensional, kromium dan nikel ditemukan 4x lipat dalam beberapa jenis rokok elektrik yang tidak ada di rokok tembakau.<sup>11</sup> Kandungan logam pada rokok elektrik memicu terjadinya *Reactive Oxygen Spesies* (ROS).<sup>12</sup>

Ekstrak daun cincau hijau berpengaruh terhadap viabilitas spermatozoa pada kelompok yang dipapar asap rokok konvensional maupun asap rokok elektrik. Hal ini terjadi karena adanya senyawa polifenol dan flavonoid yang memiliki efek antioksidan. Polifenol dan flavonoid memiliki metabolit yang disebut *O-methylated glucuronoides* yang mampu mendonorkan atom hidrogen ke senyawa stres oksidatif, sehingga menghilangkan kemampuannya untuk merusak spermatozoa.<sup>13</sup>

## KESIMPULAN

Ekstrak daun cincau hijau memiliki efek protektif dalam meningkatkan viabilitas spermatozoa di kelompok mencit jantan dipapar asap rokok konvensional dan elektrik. Perlu dilakukan analisis terhadap parameter kesehatan spermatozoa lainnya, seperti motilitas dan bentuk, sehingga mendukung hasil pemeriksaan viabilitas spermatozoa.

## DAFTAR PUSTAKA

1. Indarwati Ika, Hastuti Uki Retno, Dewi Yuli Lanti. 2019. Analysis of Factors Influencing Female Infertility dalam *Journal of Maternal and Child Health*. Vol II. No II (Hal XI-XIII) Surakarta: Journal of Maternal and Child Health.
2. Colagar Hosseinzadeh, Karimi, Jorsaraei. 2013. Correlation of Sperm Parameters with Semen Lipid Peroxidation and Total Antioxidants Levels in Astheno and Oligoastheno-teratospermic Men dalam *Iran Red Crescent Med J* Vol. XV. No. IX (Hal. XX-XXV) Iran: The IRMJ.
3. Sukmaningsih Alit. 2016. Penurunan jumlah spermatosit pakiten dan spermatid tubulus seminiferous testis mencit (*Mus musculus*) yang dipaparkan asap rokok dalam *Jurnal Biologi Universitas Udayana*. Vol. XII. No. X (Hal. XXXI-XXXII) Bekasi: J Kesmas.
4. Mandasari Ayu, Kusuma Lintang K, Aisiyah. 2019. Perubahan Kualitas Sperma Mencit (*Mus musculus*) yang Terpapar Asap Rokok Elektrik dalam *Biotropic*. Vol. I. No. I (Hal. LX-LXII) Yogyakarta: The Journal of Tropical Biology.





5. Atikasari Rinda Gita. 2010. Pengaruh Pemberian Ekstrak Daun *Cyclea barbata* L. Miers Terhadap Morfologi Spermatozoa Mencit BALB/C Jantan yang Dipapar Asap Rokok. Vol I. No. I. Semarang: Jurnal Kedokteran Universitas Diponegoro.
6. Maulita W. (2016) Pengaruh ekstrak daun katuk (*Sauropus Androgynus* (L.) Merr.) terhadap viabilitas spermatozoa mencit jantan balb/c yang diberi paparan asap rokok. Undergraduate thesis. Semarang: Fakultas Kedokteran UNISSULA. 2016. Diakses tanggal 21 November 2021, <http://repository.unissula.ac.id/5100/>
7. Nida NA. Pengaruh pemberian ekstrak ubi jalar jingga (*Ipomoea batatas* L.) terhadap viabilitas spermatozoa - studi eksperimen pada mencit jantan (*Mus musculus*) yang dipapar asap rokok. Undergraduate thesis. Semarang: Fakultas Kedokteran UNISSULA. 2017. Diakses tanggal 21 November 2021, <http://repository.unissula.ac.id/7677/>
8. lestari ND, Tjandrakirana, Rahayu YS. Pengaruh filtrat daun kenikir (*Cosmos Caudatus*) terhadap kualitas spermatozoa mencit (*Mus musculus*) yang terpapar asap rokok. LenteraBio Vol. 7 No. 1, Januari 2018: 55-60.
9. Yuhendri. Pengaruh rokok terhadap jumlah sel spermatozoa mencit jantan (*Mus musculus*, Strain Jepang). 2014. Jurnal Saintek Vol. VI. No. I (Hal XXX-XXV).
10. Sitohang AG, Wantouw B, Queljoe E. Perbedaan antara efek pemberian vitamin C dan vitamin E terhadap kualitas spermatozoa tikus wistar (*Rattus norvegicus*) jantan setelah diberi paparan asap rokok. 2015. Jurnal e-Biomedik. 2015 Jan; 3(1): 66.
11. Septiani D, Effendi EM, Moerfiah. Penyimpanan spermatozoa pada suhu preservasi dan berbagai pengencer semen terhadap daya tahan hidup spermatozoa. 2017. Ekologia. 2017 Oct; 17(2): 18-23
12. Nurlela J. The Effect Of Leaf Green Grass Jelly Extract (*Cyclea* L. Barbata Miers) To Motility In Mice Balb/C Male That Exposed Smoke dalam J Majority. Vol. IV. No. IV (Hal. LVII-LXIII). 2015. Lampung: J Majority.
13. Shaula V. Pengaruh Ekstrak Daging Biji Kara Benguk (*Mucuna Pruriens*) Terhadap Viabilitas Spermatozoa studi Eksperimental Terhadap Mencit Balb/C Yang Mendapat Paparan Asap Rokok. Undergraduate thesis. Semarang: Fakultas Kedokteran UNISSULA. 2019.