

Perbandingan antara Pengaruh Olahraga Berlebihan dan Paparan Asap Rokok terhadap Kualitas Spermatozoa Tikus Wistar (*Rattus norvegicus*)

¹Vania E. Laoh
²Lydia E. N. Tendean
²Grace Turalaki

¹Program Studi Pendidikan Dokter Fakultas Kedokteran Universitas Sam Ratulangi Manado

²Bagian Biologi Fakultas Kedokteran Universitas Sam Ratulangi Manado

Email: vanela379@gmail.com

Abstract: Excessive exercise can cause an increase in free radicals 2-3 times. Cigarette smoke can also increase free radicals and reduce antioxidants in semen, therefore, it can cause DNA damage through cellular DNA fragmentation. Free radicals can come from endogenous sources, such as the normal oxidation reaction in mitochondria, peroxisomes, whereas free radicals from exogenous sources come from cigarette smoke, inflammation, and excessive exercise training. This study was aimed to compare the effect of excessive exercise and exposure to cigarette smoke on the quality of sperm of Wistar rats (*Rattus norvegicus*). This was an experimental study using a post-test only control group design. Samples were 9 Wistar rats (*Rattus norvegicus*) divided into 3 groups: P₀ group, the control group without any treatment; P₁ group, treated with excessive intensity exercise; and P₂ group, treated with 2-cigarette-smoke exposure. The treatment was carried out for 50 days. The results showed differences in concentration between study groups but not statistically significant ($P>0.05$). Motility showed significant differences in normal motility of group P₀ and P₁ ($P=0.002$), and of group P₀ and P₂ ($P=0$). Morphology showed a significant difference between groups P₀ and P₁ ($P=0.004$). **Conclusion:** Excessive exercise and exposure to cigarette smoke affect the quality of spermatozoa of Wistar rats (*Rattus norvegicus*).

Keywords: excessive exercise, cigarette smoke, sperm quality

Abstrak: Olahraga berlebihan dapat menyebabkan peningkatan radikal bebas sebanyak 2–3 kali. Asap rokok dapat meningkatkan radikal bebas serta menurunkan antioksidan dalam cairan semen sehingga dapat mengakibatkan kerusakan DNA melalui fragmentasi DNA seluler. Radikal bebas dapat berasal dari sumber endogen, yaitu pada reaksi reduksi oksidasi normal dalam mitokondria, peroksisom, sedangkan radikal bebas dari sumber eksogen berasal dari asap rokok, inflamasi, dan latihan olahraga berlebihan. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui perbandingan antara pengaruh olahraga berlebihan dan paparan asap rokok terhadap kualitas spermatozoa tikus Wistar (*Rattus norvegicus*). Jenis penelitian ialah eksperimental dengan *post-test only control group design*. Sampel penelitian sebanyak 9 ekor tikus wistar (*Rattus norvegicus*) dibagi menjadi 3 kelompok: kelompok P₀ tidak diberikan olahraga berlebihan dan paparan asap rokok; kelompok P₁ diberikan olahraga berlebihan intensitas berat; dan kelompok P₂ diberikan paparan asap rokok 2 batang. Perlakuan dilakukan selama 50 hari. Hasil penelitian menunjukkan perbedaan konsentrasi antar kelompok penelitian, namun analisis statistik menunjukkan hasil yang tidak bermakna ($P>0,05$). Pada motilitas didapatkan hasil bermakna untuk motilitas normal dan abnormal kelompok P₀ dan P₁ ($P=0,002$), serta kelompok P₀ dan P₂ ($P=0$). Pada morfologi didapatkan hasil bermakna antara kelompok P₀ dan P₁ ($P=0,004$). **Simpulan:** Pemberian olahraga berlebihan dan paparan asap rokok berpengaruh terhadap kualitas spermatozoa tikus Wistar (*Rattus norvegicus*).

Kata kunci: olahraga berlebihan, asap rokok, kualitas spermatozoa

Olahraga adalah segala bentuk aktivitas fisik yang dilakukan secara terstruktur dengan tujuan untuk mengekspresikan dan meningkatkan kesehatan fisik dan psikis, membentuk hubungan social, maupun sebagai sarana kompetisi dalam berbagai tingkat.¹ Olahraga baik yang ringan maupun berat pada dasarnya menyebabkan peningkatan *reactive oxygen species* (ROS). Olahraga berlebihan dapat menyebabkan peningkatan radikal bebas sebanyak 2-3 kali.²

Akumulasi ROS sebagai salah satu oksidan (radikal bebas) dapat mengakibatkan ketidakseimbangan jumlah oksidan dan antioksidan intrasel. Kondisi ini disebut stres oksidatif yang dapat menyebabkan kerusakan berantai pada lipid, protein, dan pada *deoxyribonucleic acid* (DNA) sel spermatozoa.³ Radikal bebas dapat berasal dari sumber endogen, yaitu reaksi reduksi oksidasi normal dalam mitokondria, peroksisom, sedangkan radikal bebas dari sumber eksogen yaitu asap rokok, inflamasi, dan latihan olahraga berlebihan.⁴ Olahraga berlebihan seperti bersepeda >5 jam bagi laki-laki dapat menurunkan kualitas spermatozoa oleh karena peningkatan produksi ROS yang berlebihan.^{5,6}

Jozkow dan Rossato⁷ membandingkan kualitas spermatozoa dari olahragawan (perilaku olahraga berlebihan), kelompok yang memiliki gaya hidup *sedentary* (kurang beraktifitas fisik), serta pria dengan perilaku olahraga ringan. Kelompok olahragawan didapatkan memiliki konsentrasi spermatozoa, motilitas, dan persentase spermatozoa dengan morfologi normal yang paling rendah di antara ketiga kelompok tersebut.⁸

Asap rokok dapat meningkatkan radikal bebas serta menurunkan antioksidan dalam cairan semen sehingga dapat mengakibatkan kerusakan DNA melalui fragmentasi DNA seluler. Hasil pembakaran rokok menghasilkan 2 jenis asap yaitu, *mainstream smoke* yang dihisap perokok aktif dan *sidestream smoke* yang dihirup perokok pasif.⁹ *Mainstream smoke* mengandung 4000 jenis bahan kimia dengan lebih dari 200 bahan berbahaya untuk

tubuh terdiri atas campuran substansi-substansi kimia dalam bentuk gas dan partikel-partikel terdispersi di dalamnya.^{4,10} Komponen gas di antaranya terdiri dari karbon monoksida, karbondioksida dari nitrogen dan senyawa hidrokarbon, sedangkan komponen partikel di antaranya terdiri dari tar, nikotin, benzopiren, fenol, dan cadmium.¹¹ Fragmentasi DNA sebagai akibat merokok menghasilkan penurunan kualitas spermatozoa seperti peningkatan persentase spermatozoa dengan abnormalitas morfologi,¹² serta penurunan konsentrasi dan motilitas spermatozoa.¹³

Liu et al.¹⁴ membandingkan parameter semen dari 68 orang pria infertil yang merokok dan 79 orang yang tidak merokok. Hasil penelitian mendapatkan bahwa konsentrasi, motilitas, dan morfologi normal spermatozoa dari pria perokok secara signifikan lebih rendah bila dibandingkan dengan pria yang tidak merokok.

Penelitian ini bertujuan untuk membandingkan antara pengaruh olahraga berlebihan dan paparan asap rokok terhadap kualitas spermatozoa tikus Wistar (*Rattus norvegicus*).

METODE PENELITIAN

Penelitian ini menggunakan metode eksperimental dengan *post-test only control group design*. Penelitian dilakukan di Laboratorium Bagian Biologi Fakultas Kedokteran Universitas Sam Ratulangi selama 50 hari pada bulan Oktober sampai Desember 2018.

Sampel penelitian ini ialah 9 ekor tikus Wistar yang memenuhi kriteria inklusi yaitu tikus Wistar (*Rattus norvegicus*) jantan, berumur 12-15 minggu dengan berat badan 95-150 gram. Kriteria eksklusi yaitu tikus Wistar tampak sakit, tidak bergerak secara aktif, atau mati saat penelitian. Variabel bebas dalam penelitian ini yaitu olahraga berlebihan dan asap rokok, sedangkan untuk variabel tergantung ialah kualitas spermatozoa yaitu: konsentrasi, motilitas, dan morfologi spermatozoa tikus Wistar.

Perlakuan diberikan setelah tikus wistar mengalami aklimatisasi selama 1 minggu.

Sebelum dilakukan perlakuan tikus wistar terlebih dahulu ditimbang untuk mengetahui berat badan awal.

Perlakuan olahraga berlebihan dilakukan dengan olahraga aerobik intensitas berat yaitu berenang dengan penggunaan beban sebesar 9% dari berat badan yang diikat pada bagian ekor tikus wistar.¹⁵ Olahraga dilakukan sampai tikus Wistar hampir tenggelam atau tampak tanda-tanda kelelahan berupa tenggelamnya hampir semua badan kecuali hidung dan melemahnya gerakan anggota gerak.¹⁶ Renang dilakukan dengan frekuensi 3 kali per minggu¹⁷ di dalam air dengan suhu 33°-36°C.¹⁸

Perlakuan asap rokok dilakukan dengan memasukkan 2 batang rokok/hari yang sudah dibakar ke dalam wadah yang sudah disediakan di dalam kandang perlakuan hingga rokok habis terbakar.

Sampel dibagi menjadi 3 kelompok yaitu, kelompok kontrol (P₀) yang tidak diberi olahraga berlebihan dan paparan asap rokok, kelompok perlakuan 1 (P₁) yang diberi olahraga berlebihan, dan kelompok perlakuan 2 (P₂) yang diberi paparan asap rokok.

Pada akhir perlakuan, tikus Wistar diterminasi dengan pembedahan menggunakan *dissecting kit* untuk mengambil organ reproduksi berupa kauda epididimis. Parameter yang diamati ialah konsentrasi, motilitas, dan morfologi spermatozoa sampel.

HASIL PENELITIAN

Tabel 1 memperlihatkan perbedaan rerata konsentrasi spermatozoa antara kelompok kontrol (P₀), kelompok perlakuan 1 (P₁), dan kelompok perlakuan 2 (P₂). Rerata konsentrasi spermatozoa kelompok P₀ berjumlah 54,4x10⁶ spermatozoa/mL suspensi; kelompok P₁ dengan jumlah 29,8 x10⁶ spermatozoa/mL suspense, dan kelompok P₂ yaitu sebesar 68,2x10⁶ spermatozoa/mL suspensi.

Tabel 2 menunjukkan perbedaan rerata motilitas spermatozoa antara kelompok P₀, kelompok P₁, dan kelompok P₂. Rerata motilitas spermatozoa normal kelompok P₀

sebesar 90% dan abnormal sebesar 10%; rerata motilitas spermatozoa normal kelompok P₁ sebesar 75,6% dan abnormal sebesar 24,3%; dan rerata motilitas spermatozoa normal kelompok P₂ sebesar 32,3% dan abnormal sebesar 67,7%.

Tabel 1. Rerata konsentrasi spermatozoa tikus Wistar (*Rattus norvegicus*) setelah pemberian olahraga berlebihan dan pemaparan asap rokok

Kelompok sampel	Konsentrasi spermatozoa (x10 ⁶ / mL)
Kontrol	54,4
Perlakuan 1	29,8
Perlakuan 2	68,2

Tabel 2. Rerata motilitas spermatozoa tikus Wistar (*Rattus norvegicus*) setelah pemberian olahraga berlebihan dan pemaparan asap rokok

Kelompok sampel	Motilitas spermatozoa (%)	
	Normal	Abnormal
Kontrol	90	10
Perlakuan 1	75,6	24,3
Perlakuan 2	32,3	67,7

Tabel 3 menunjukkan perbedaan rerata morfologi spermatozoa antara kelompok P₀, P₁ dan P₂. Rerata morfologi spermatozoa normal kelompok P₀ 91,8% dan abnormal sebesar 8,2%, sedangkan rerata morfologi spermatozoa kelompok P₁ yaitu morfologi normal sebesar 73% dan abnormal sebesar 27%, serta rerata morfologi spermatozoa normal kelompok P₂ sebesar 44,3% dan abnormal sebesar 55,6%.

Tabel 3. Rerata morfologi spermatozoa tikus Wistar (*Rattus norvegicus*) Setelah pemberian olahraga berlebihan dan pemaparan asap rokok

Kelompok sampel	Morfologi Spermatozoa (%)	
	Normal	Abnormal
Kontrol	91,8	8,2
Perlakuan 1	73	27
Perlakuan 2	44,3	55,6

Uji komparabilitas antar kelompok penelitian dijabarkan dalam Tabel 4-6.

Tabel 4. Perbandingan kualitas spermatozoa kelompok kontrol (P_0) dan perlakuan 1 (P_1)

Kualitas spermatozoa	Kelompok		P
	P_0	P_1	
Konsentrasi	54,4	29,8	0,146
Motilitas normal	90	75,6	0,002
Morfologi normal	91,8	73	0,054

Tabel 5. Perbandingan kualitas spermatozoa kelompok kontrol (P_0) dan perlakuan 2 (P_2)

Kualitas spermatozoa	Kelompok		P
	P_0	P_2	
Konsentrasi	54,4	68,2	0,504
Motilitas normal	90	32,3	0,000
Morfologi normal	91,8	44,3	0,004

Tabel 6. Perbandingan kualitas spermatozoa kelompok perlakuan 1 (P_1) dan perlakuan 2 (P_2)

Kualitas spermatozoa	Kelompok		P
	P_1	P_2	
Konsentrasi	29,8	68,2	0,104
Motilitas Normal	75,6	32,3	0,001
Morfologi Normal	73	44,3	0,036

Keterangan: Nilai $P < 0,05$ menyatakan adanya perbedaan yang bermakna

BAHASAN

Pada penelitian ini terdapat perbedaan rerata konsentrasi spermatozoa dari kelompok kontrol (P_0), perlakuan 1 (P_1), dan perlakuan 2 (P_2) (Tabel 4-6). Rerata konsentrasi spermatozoa kelompok P_0 sebesar $54,4 \times 10^6$ spermatozoa/mL bila dibandingkan dengan rerata konsentrasi spermatozoa kelompok P_1 sebesar $29,8 \times 10^6$ spermatozoa/mL yang menunjukkan bahwa rerata konsentrasi spermatozoa mengalami penurunan, tetapi meningkat pada kelompok P_2 dengan rerata konsentrasi sebesar $68,2 \times 10^6$ spermatozoa/mL.

Meskipun terdapat perbedaan rerata konsentrasi spermatozoa antar kelompok penelitian, namun hasil uji T Independen menunjukkan hasil analisis yang tidak bermakna ($P > 0,05$) atau tidak terdapat pengaruh perlakuan terhadap konsentrasi spermatozoa. Hal ini sejalan dengan penelitian dari Bagattel dan Bremner¹⁹ yang menunjukkan bahwa olahraga berlebihan tidak berpengaruh terhadap konsen-

trasi spermatozoa dan penelitian dari Tooy et al.²⁰ yang menunjukkan bahwa paparan asap rokok tidak berpengaruh terhadap konsentrasi spermatozoa.

Pada penelitian ini didapatkan perbedaan rerata motilitas spermatozoa kelompok P_0 , P_1 , dan P_2 (Tabel 4-6). Rerata motilitas spermatozoa normal dari kelompok P_1 (75,6%) dan P_2 (32,3%) menurun dibandingkan dengan rerata motilitas spermatozoa normal kelompok P_0 (90%) dan berdasarkan hasil uji T independen penurunan motilitas spermatozoa dari kelompok P_1 dan P_2 keduanya bermakna ($P < 0,05$). Hal ini berarti terjadi penurunan bermakna dari motilitas spermatozoa pada kelompok P_1 dan P_2 yang diberi olahraga berlebihan dan paparan asap rokok. Hasil yang didapatkan ini sejalan dengan penelitian dari Maleki dan Tartibian²¹ yang menunjukkan bahwa olahraga berlebihan dapat menurunkan motilitas spermatozoa serta penelitian dari Meri²² yang menyatakan bahwa paparan asap rokok dapat menurunkan

kan motilitas spermatozoa.

Pada penelitian ini didapatkan perbedaan rerata morfologi dari kelompok P₀, P₁, dan P₂ (Tabel 4-6). Rerata morfologi normal kelompok P₁ dan P₂ mengalami penurunan yaitu sebesar 73% dan 44,3% bila dibandingkan dengan kelompok P₀ sebesar 91,8%. Penurunan rerata morfologi normal pada kelompok P₁ tidak didukung dengan hasil dari uji T independen yang menyatakan tidak terdapat perbedaan bermakna bila dibandingkan dengan kelompok P₀, sedangkan penurunan morfologi normal kelompok P₂ dinyatakan memiliki perbedaan bermakna. Hal ini sejalan dengan penelitian Bagattel dan Bremner¹⁹ yang menyatakan bahwa olahraga berlebihan tidak berpengaruh terhadap morfologi spermatozoa tetapi tidak selaras dengan penelitian Zhang et al.²³ yang menyatakan bahwa paparan asap rokok berpengaruh dalam penurunan morfologi normal spermatozoa.

Hasil pemeriksaan kualitas spermatozoa tikus Wistar yang didapatkan tidak bermakna pada pemberian olahraga berlebihan (konsentrasi dan morfologi spermatozoa) dapat disebabkan oleh keterbatasan penelitian yang tidak memperhitungkan daya tahan tubuh dari tikus Wistar (*Rattus norvegicus*) sehingga perlakuan olahraga yang berlebihan belum tercapai. Hasil tidak bermakna terhadap kualitas spermatozoa tikus Wistar dalam hal ini konsentrasi spermatozoa yang diberi paparan asap rokok dapat disebabkan oleh karena perbedaan volume dan jenis larutan pengencer yang digunakan, serta keterbatasan waktu pemaparan asap rokok.

Penurunan kualitas spermatozoa yang didapatkan dalam penelitian ini disebabkan oleh pemberian olahraga berlebihan dan pemaparan asap rokok. Olahraga berlebihan pada dasarnya akan memicu pembentukan ROS dan menyebabkan terjadinya peningkatan radikal bebas sebanyak 2-3 kali. Selama olahraga berlebihan pembentukan ROS akan semakin meningkat, Hal ini dapat disebabkan oleh peningkatan epinefrin dan beberapa katekolamin yang dapat menyebabkan terbentuknya radikal

bebas jika dimetabolisme dalam bentuk inaktif, produksi asam laktat yang mengubah senyawa radikal lemah (*superoxide*) menjadi lebih kuat (*hydroxyl*), dan respon inflamasi sebagai akibat dari kerusakan otot pada olahraga berlebihan.²

Rokok yang mengandung banyak bahan berbahaya diantaranya tar, nikotin dan timbal, menghasilkan asap rokok yang mengandung ROS. Tidak hanya itu saja, kandungan dalam rokok juga dapat menghambat kerja antioksidan.^{4,6,11}

Radikal bebas (ROS) yang dihasilkan olahraga berlebihan dan paparan asap rokok bersifat reaktif dan tidak stabil, serta memiliki satu elektron yang tidak berpasangan, sehingga molekul ini cenderung menangkap elektron dari molekul lain. Hal ini dapat mengakibatkan kerusakan pada membran sel melalui reaksi peroksidasi lipid, dimana ROS bereaksi secara kimiawi dengan *polyunsaturated fatty acid* (PUFA) yang ada di membran sel. Peroksidasi lipid menyebabkan terjadinya peningkatan permeabilitas membran, kerusakan mitokondria, hingga fragmentasi DNA.^{2,3} Kerusakan mitokondria sebagai pemasok energi untuk motilitas menyebabkan menurunnya motilitas spermatozoa.²⁴

SIMPULAN

Berdasarkan hasil penelitian dapat disimpulkan bahwa pemberian olahraga berlebihan dan paparan asap rokok berpengaruh terhadap kualitas spermatozoa tikus Wistar (*Rattus norvegicus*). Pemberian olahraga berlebihan berpengaruh secara bermakna terhadap penurunan motilitas spermatozoa tikus Wistar dan pemaparan asap rokok berpengaruh secara bermakna terhadap penurunan motilitas dan morfologi spermatozoa. Terdapat perbedaan antara pengaruh pemberian olahraga berlebihan dan paparan asap rokok terhadap kualitas spermatozoa tikus wistar (*Rattus norvegicus*)

SARAN

Perlu dilakukan penelitian lebih lanjut dengan jumlah sampel yang lebih banyak dengan waktu yang lebih lama. Perlu

dilakukan penelitian lebih lanjut dengan jenis olahraga, intensitas, frekuensi, durasi, maupun alat yang lebih memadai untuk lebih menggali pengaruh olahraga berlebihan terhadap kualitas spermatozoa.

Disarankan untuk berolahraga dengan intensitas, frekuensi, dan durasi yang tepat, serta menghindari olahraga yang berlebihan dan konsumsi rokok.

DAFTAR PUSTAKA

1. NHS. Health and sport – a winning team. NHS Sport and Health, 2013 Februari; p. 1.
2. **Nurdyansyah F.** Stress oksidatif dan status antioksidan pada latihan fisik. *Jendela Olahraga*. 2017;2(1):105-9.
3. **Choudhary R, Chawala VK, Soni ND, Kumar J, Vyas RK.** Oxidative stress and role of antioxidants in male infertility. *Pakistan Journal of Physiology*. 2010;6(2):54-9
4. **Fitria, Triandhini R, Mangimbulude JC, Karwur FF.** Merokok dan oksidasi DNA. *Sains Medika*. 2013;5(2):113-20.
5. HIFERI, PERFITRI. *Konsensus Penanganan Infertilitas Hestiantoro A*, editor. HIFERI, PERFITRI, 2013.
6. **Laksmi DNDI.** Glutathion meningkatkan kualitas tubulus seminiferus pada mencit yang menerima pelatihan fisik berlebih. *Buletin Veteriner Udayana*. 2010;2(1):11-9.
7. **Jozkow P, Rossato M.** The impact of intense exercise on semen quality. *American Journal of Men's Health*. 2017;11(3): 654-662.
8. **Tartibian B, Maleki B.** Correlation between seminal oxidative stress biomarkers and antioxidants with sperm DNA damage in elite athletes and recreationally active men. *Clinical Journal of Sport Medicine*. 2012;22: 132-9.
9. **Cahyono T.** *Penyehatan Udara*. Risanto E, editor. Yogyakarta: Andi ofset; 2017.
10. **Benowitz NL, Fu H.** Smoking & occupational health. In: Ladou J, editor. *Occupational & Environmental Medicine* (4th ed). 2007; p. 710-8.
11. **Batubara IVD, Wantouw B, Tendean L.** Pengaruh Paparan Asap Rokok Kretek terhadap kualitas spermatozoa mencit jantan (*Mus musculus*). *eBm*. 2013; 1(1):330-7.
12. **Sukmaningsih A.** Penurunan jumlah spermatozoid dan spermatid tubulus seminiferus testis mencit (*Mus musculus*) yang dipaparkan asap rokok. *Jurnal Biologi Udayana*. 2009;13(2): 31-5.
13. **Künzle R, Mueller M, Hänggi W, Birkhäuser M, Drescher H, Bersinger N.** Semen quality of male smokers and nonsmokers in infertile couples. *Fertility and Sterility*. 2003; 79(2):287-91.
14. **Liu RZ, Gao JC, Zhang HG, Wang RX, Zhang ZH, Liu XY.** Seminal plasma zinc level may be associated with the effect of cigarette smoking on sperm parameters. *Journal of International Medical Research*. 2010;38(3):923-8.
15. **Bompa TO.** *Theory and Methodology of Training The Key to Athletic Performance* (3rd ed). Hunt Publishing Company, 1994.
16. **Munita FF.** Pengaruh ekstrak tape ubi ungu (*Ipomoea batatas L.*) terhadap kadar mda plasma tikus setelah aktivitas fisik maksimal [Karya Tulis Ilmiah]. Semarang: Fakultas Kedokteran Universitas Diponegoro; 2015.
17. **Kemenkes.** P2PTM: Durasi & frekuensi latihan fisik. [Online]. 2018 [cited 2018 Sept 7]. Available from: [http:// p2ptm.kemkes.go.id/preview/infografhic/durasi-frekuensi-latihan-fisik](http://p2ptm.kemkes.go.id/preview/infografhic/durasi-frekuensi-latihan-fisik).
18. **Kregel KC, Allen DL, Booth FW.** *Resource Book for the Design of Animal Exercise Protocols: American Physiological Society*; 2006.
19. **Bagatell CJ, Bremner WJ.** Sperm counts and reproductive hormones in male marathoners and lean controls. *Fertility and Sterility*. 1990;53(4): 688-92.
20. **Tooy M, Tendean L, Satiawati L.** Perbandingan kualitas spermatozoa tikus wistar (*Rattus norvegicus*) yang diberi paparan asap rokok dengan asap rokok elektronik. *eBm*. 2016; 4(2).
21. **Maleki HB, Tartibian B.** Long-term low-to-intensive cycling training: impact on semen parameters and seminal cytokines. *Clin J Sport Med*. 2015; 25(6):535-40.
22. **Meri ZB, Irshid IB, Migdadi M, Irshid AB, Mhanna SA.** Does cigarette smoking affect seminal fluid parameters? A comparative study. *Oman Med J*. 2013;28(1):12-5.

23. Zhang ZH, Zhu HB, Li LL, Yu Y, Zhang HG, Liu RZ. Decline of semen quality and increase of leukocytes with cigarette smoking in infertile men. Iran

J Reprod Med. 2013;11(7): 589-96.

24. Hall JE, Guyton AC. Textbook of Medical Physiology (13th ed). Philadelphia: Elsevier Inc., 2016.