

PENURUNAN JUMLAH SPERMATOSIT PAKITEN DAN SPERMATID TUBULUS SEMINIFERUS TESTIS PADA MENCIT (*Mus musculus*) YANG DIPAPARKAN ASAP ROKOK

REDUCTION ON THE NUMBER OF PACHYTENT SPERMATOCYTS AND SPERMATIDS OF MICE (*Mus musculus*) SEMINIFEROUS TUBULES TESTIS EXPOSED BY CIGARETTE SMOKE

A.A.SG A. SUKMANINGSIH

Jurusan Biologi, FMIPA, Universitas Udayana

Email : asukmaningsih@yahoo.com

INTISARI

Telah dilakukan penelitian mengenai paparan asap rokok pada mencit jantan yang bertujuan untuk mengetahui pengaruh paparan asap rokok terhadap penurunan jumlah spermatisit pakiten dan spermatisid pada mencit (*Mus musculus*) jantan. Sebanyak 63 ekor mencit jantan berusia 12 minggu, dikelompokkan menjadi 3 yakni KO = kelompok mencit kontrol tanpa mendapat perlakuan. KM = kelompok mencit terpapar asap rokok putih, dan KJS = kelompok mencit terpapar asap rokok kretek. Setelah 40 hari terpapar asap rokok 1 batang per ekor per hari, dilakukan analisis kadar nikotin plasma darah mencit dengan KCKT untuk membandingkan kadar nikotin rokok putih dan rokok kretek. Pembuatan preparat mikroskopis testis dilakukan untuk pengamatan spermatogenesis yang meliputi jumlah spermatogonia A, spermatisit pakiten, spermatisid dan sel Sertoli. Hasil penelitian didapatkan bahwa nikotin dalam plasma darah KJS berbeda bermakna ($P < 0,05$) dengan KM. Didapatkan juga paparan asap rokok KM dan KJS menyebabkan penurunan jumlah spermatisit pakiten dan spermatisid pada spermatogenesis.

Kata kunci ; Asap rokok, nikotin plasma darah, spermatisit pakiten, spermatisid

ABSTRACT

This study was conducted to observe the effect of cigarette smoke exposure on spermatogenesis of male mice. The animals used in this study were 63 male mice, aged 12 weeks. They were divided randomly into 3 groups, each group consisted of 21 mice. One group was used as control, two groups were used as treatment (KO = control, KM = mice group exposed by a *light* cigarette smoke, KJS = male exposed by a *kretek* cigarette smoke). The animals in each treatment were exposed by 21 cigarette smoke once daily for forty days. After 40 days of treatment, analysis on plasma level of nicotine was conducted and the testicles were sectioned and stained for qualitative and quantitative microscopic analysis. The results showed that plasma level of nicotine on the KJS group outweighed significantly ($P < 0,05$) the KM group. It was also found that the number of pachytent spermatocyt and spermatisids for both KM and KJS cigarette smoke exposure reduced significantly ($P < 0.05$)

Keywords : Cigarette smoke, plasma level of nicotine, pachytent spermatocyt, spermatisids.

PENDAHULUAN

Rokok adalah salah satu hasil olahan tembakau dengan menggunakan bahan ataupun tanpa bahan tambahan. Rokok dengan bahan tambahan berupa cengkeh disebut rokok kretek. Rokok tanpa bahan tambahan cengkeh disebut sebagai rokok putih. Rokok putih sering dihubungkan dengan rokok ultramild, mild, dan light. Rokok semacam adalah rokok dengan kandungan nikotin dan tar yang rendah yang biasanya dicantumkan pada label pembungkus rokok.

Dalam proses merokok terjadi dua reaksi yaitu reaksi pembakaran dan reaksi pirolisa. Reaksi pembakaran dengan oksigen akan membentuk senyawa CO_2 ,

H_2O_2 , NO, So, dan Co. Reaksi pirolisa menyebabkan pemecahan struktur kimia rokok menjadi banyak senyawa kimia yang strukturnya sangat kompleks (Bindar, 2000). Dilaporkan sekitar 100 senyawa tersebut bersifat toksik seperti bahan karsinogen, tar, nikotin, nitrosamin, karbonmonoksida, senyawa PAH (*Polynuclear Aromatic Hydrogen*), fenol, karbonil, klorin dioksin, dan furan (Fowles, 2000).

Nikotin yang merupakan senyawa utama rokok diserap ke dalam sistem peredaran darah melalui paru yang selanjutnya disirkulasikan ke otak dalam waktu yang sangat cepat. Nikotin bereaksi langsung ke jantung dengan merubah kecepatan denyut dan tekanan darah.

Beberapa penelitian mengenai efek bahan kimia rokok terhadap sistem reproduksi oleh Bizzarro *et al.* (2003) menunjukkan adanya gangguan spermatogenesis pada mencit yang diberi perlakuan timbal secara *gavage*. Ditemukan juga bahwa resiko penyakit yang ditimbulkan pada perokok *mild*, *ultramild*, dan *light* sama besarnya dengan resiko perokok kretek. PAH menyebabkan atrofi testis, menghambat spermatogenesis, dan merusak morfologi spermatozoa (Revel, 2001). Pemberian nikotin menyebabkan penurunan kadar hormon testosteron (Seggara & Strand, 1999). Nikotin juga dikatakan menghambat sel Leydig sehingga menghambat sekresi hormon testosteron (Paccifi, 1993).

Spermatogenesis merupakan proses perkembangan sel – sel spermatogenik yang terdiri dari 3 tahap yaitu tahap spermatositogenesis atau proliferasi, tahap meiosis dan spermiogenesis. Spermatositogenesis merupakan proliferasi sel induk spermatogonia yang membelah secara mitosis menghasilkan spermatis primer. Spermatis primer mengalami pembelahan meiosis I menjadi spermatis sekunder. Pembelahan meiosis I terdiri dari profase, metafase, anafase dan telofase. Profase dari spermatis primer dibedakan menjadi leptoten, zigoten, pakiten, diploten dan diakinesis. Spermatis pakiten merupakan sel yang mudah diamati karena memiliki kromatid tebal, memendek, dan ukuran relatif besar dibandingkan sel spermatogenik yang lainnya. Pada pembelahan meiosis II spermatis sekunder menjadi spermatid. Spermatid mengalami perubahan morfologi dari bentuk bulat menjadi bentuk oval dan berekor yaitu spermatozoa melalui proses spermiogenesis (Johnson and Everitt, 1990). Spermatogenesis pada mencit memerlukan waktu selama 35,5 hari setelah menempuh 4 kali daur epitel seminiferus. Lama satu daur epitel Seminiferus pada mencit adalah 207 ± 6 jam (Johnson and Everitt, 1990).

Spermatogenesis dipengaruhi oleh berbagai faktor yang merupakan faktor endogen dan eksogen. Faktor endogen meliputi hormonal, psikologis, dan genetik. Faktor eksogen dapat berupa bahan kimia dan obat – obatan. Fisik berupa suhu, radiasi sinar X, dan getaran ultrasonik, vitamin, gizi, trauma dan peradangan. Berlangsungnya spermatogenesis pada tubulus seminiferus melibatkan poros hipotalamus, hipofisis dan testis. GnRH hipotalamus merangsang hipofisis anterior untuk mensekresikan LH dan FSH. LH mempengaruhi spermatogenesis melalui testosteron yang dihasilkan oleh sel Leydig. FSH berpengaruh langsung terhadap sel Sertoli dalam tubulus Seminiferus. FSH meningkatkan sintesis protein pengikat hormon androgen (ABP). ABP merupakan glikoprotein yang mengikat testosteron. ABP disekresikan ke dalam lumen tubulus seminiferus dan dalam proses ini testosteron yang dihasilkan oleh sel Leydig diangkut dengan konsentrasi yang tinggi ke tubulus seminiferus (Mc Lachland *et al.*, 1996).

Berdasarkan hal tersebut dilakukan penelitian mengenai pengaruh paparan asap rokok terhadap

spermatogenesis pada tubulus seminiferus testis. Tujuan penelitian ini adalah mengkaji penurunan jumlah spermatis pakiten dan spermatid pada mencit yang terpapar asap rokok putih dan rokok kretek.

MATERI DAN METODE

Sejumlah 63 ekor mencit jantan berusia sekitar 12 minggu dengan berat 20 – 25 gram dibagi dalam 3 kelompok secara random masing - masing 21 ekor. Kelompok kontrol (KO) adalah mencit yang tidak mendapat perlakuan apapun. KM adalah kelompok mencit yang dipaparkan asap rokok dari rokok putih dengan kandungan tar dan nikotin sebanyak 11 mg dan 0,8 mg per batang. KJS adalah kelompok mencit yang dipaparkan asap rokok kretek dengan kandungan tar dan nikotin 69 mg dan 3,2 mg per batang rokok.

Paparan asap rokok diberikan setiap hari 1 batang per ekor selama 40 hari setelah hewan percobaan diaklimatisasi selama satu minggu. Perlakuan diberikan dengan cara mengganti penutup kandang mencit dengan plastik yang cukup tebal. Dibuatkan dua lubang pada plastik tersebut. Satu lubang cukup untuk memasukkan rokok ke dalam kandang. Satu lubang yang lain untuk aliran udara. Agar rokok tetap menyala pangkal rokok dihubungkan dengan aerator melalui selang dengan diameter yang sesuai dengan diameter rokok.

Setelah perlakuan, dilakukan analisis nikotin plasma darah mencit dengan menggunakan KCKT (Kromatografi Cair Kinerja Tinggi). Fase diam berupa kolom Bondapack CLC – ODS/C18. Fase gerak terdiri dari acetonitrile ; methanol ; buffer (90 ; 30 ; 880), pH 4,8. Kecepatan aliran 0,8 ml/mnt UV 260 mm (Odoze *et al.*, 1988). Darah diambil melalui *plexus venosus retroorbitalis* dengan menggunakan mikrohematokrit yang telah dibilas dengan heparin. Plasma darah didapatkan dengan sentrifugasi 6500 rpm selama 10 menit. Ekstraksi plasma darah dengan dichlorometane dan sentrifugasi dengan 200 rpm selama 10 menit (Ghosheh *et al.*, 2000).

Pembuatan sediaan mikroanatomi testis untuk pengamatan spermatogenesis dengan menggunakan metode paraffin. Larutan fiksatif yang digunakan adalah formalin buffer dan Bouin. Pewarnaan dengan menggunakan Hematoxylin Ehrlich – Eosin. Pengamatan dilakukan dengan menghitung jumlah spermatogonia A, Spermatis pakiten, spermatid dan sel Sertoli.

Hasil analisis nikotin plasma dianalisa statistik dengan uji t. Hasil pengamatan spermatogenesis dianalisa dengan uji one way Anova untuk data berdistribusi normal dan memiliki varians yang homogen. Bila terdapat perbedaan yang bermakna dilanjutkan dengan uji LSD dan Post Hoc Test. Data dengan varians yang tidak homogen dianalisa dengan uji Kruskall Wallis. Bila terdapat perbedaan bermakna dilanjutkan dengan uji Mann-Whitney U.

HASIL

Analisis Nikotin plasma darah mencit

Berdasarkan analisis nikotin dengan menggunakan KCKT, pada plasma darah kelompok mencit kontrol tidak ditemukan nikotin yang merupakan salah satu senyawa dalam rokok. Plasma pada kelompok KM dan KJS terdapat nikotin dengan konsentrasi yang berbeda nyata. Kadar nikotin plasma darah pada kelompok mencit KJS lebih besar dibandingkan dengan nikotin plasma pada kelompok KM. Pada Tabel 1 dapat dilihat bahwa nilai uji t dengan equal varians sebesar 2.250 dan nilai $p = 0.035$ dengan nilai mean pada KM = 19,794 dan KJS = 23.930.

Tabel 1. Hasil Analisis Konsentrasi Nikotin pada KM dan KJS dengan Equal Mean t tes.

Variabel	Mean	SD	T	P
KM	19,794 ^a	1,391	2,250	0,035
KJS	23,930 ^b	6,213		

Keterangan : angka diikuti notasi berbeda menunjukkan perbedaan yang bermakna

Hal ini sesuai dengan kadar nikotin rokok yang tercantum pada masing - masing kemasan kedua merek rokok, dimana rokok KJS memiliki kadar nikotin dan tar yang lebih tinggi dibandingkan dengan rokok KM.

Gambaran mikroanatomi tubulus seminiferus

Gambar 1. menunjukkan adanya sel spermatogenik pada sayatan melintang tubulus seminiferus testis mencit. Kelompok mencit kontrol (A) tergolong normal dengan susunan sel rapat dan kompak. Terlihat perkembangan sel - sel spermatogenik mulai dari membran basalis ke arah lumen yaitu spermatogonia, spermatisit, dan spermatid. Lumen tampak terisi penuh oleh spermatozoa baik yang masih menempel pada sel Sertoli maupun yang telah mengalami spermiogenesis. Pada KM (B)

dan KJS (C) terlihat susunan sel - sel spermatogenik yang longgar dan tidak teratur. Kepadatan spermatozoa di dalam lumen tubulus tidak seperti KO. Lumen pada kedua kelompok ini mengandung spermatisit pakiten dan spermatid yang lebih sedikit sehingga lumen terlihat tidak penuh.

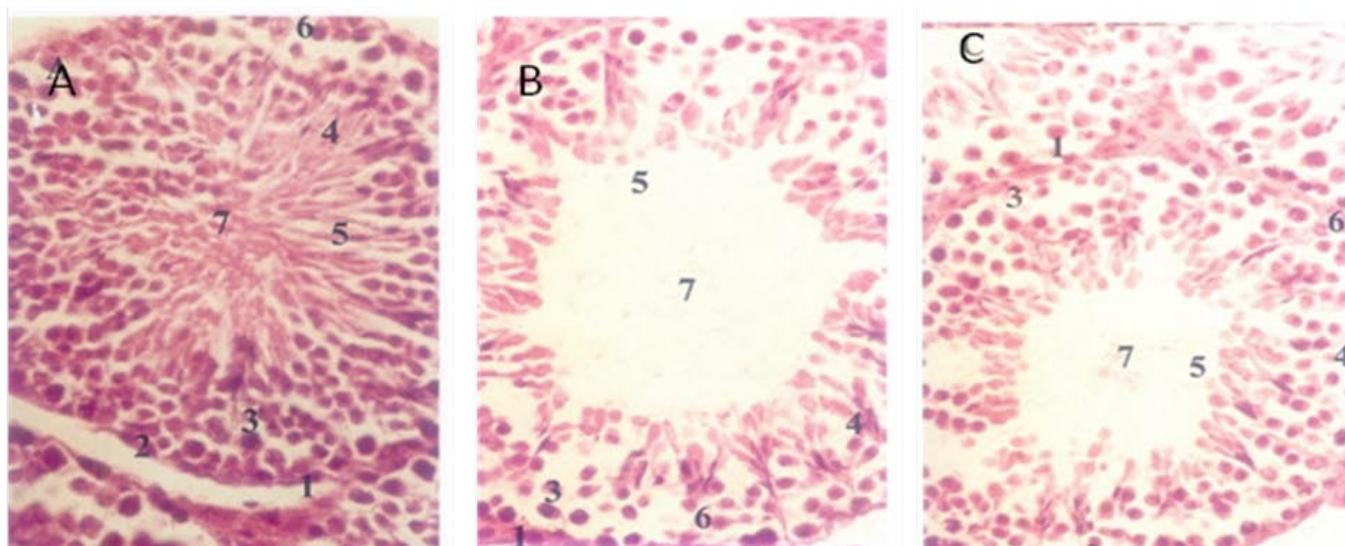
Terjadi kerusakan pada penampang tubulus seminiferus mencit kelompok KM dan KJS dibandingkan dengan tubulus seminiferus mencit kelompok KO. Pada KO terlihat sel - sel spermatogenik yang normal dimana susunan sel rapat dan kompak. Pada KM dan KJS terlihat sel-sel spermatogenik mengalami vakuolisasi sel, sitolisis, dan piknotik serta menghilangnya sebagian sel dalam tubulus Seminiferus.

Jumlah Sel-sel spermatogenik

Berdasarkan hasil analisis data didapatkan bahwa terjadi penurunan jumlah spermatisit pakiten dan spermatid secara bermakna pada testis mencit yang diberi perlakuan asap rokok dibandingkan dengan kontrol.

Pada Tabel 2 dapat dilihat bahwa nilai mean jumlah spermatogonia A menunjukkan perbedaan yang tidak bermakna ($P > 0,05$) dengan Fhit 3,073 dimana KO = 11,90, KM = 12,15, dan KJS = 11. Nilai mean jumlah spermatisit pakiten menunjukkan perbedaan bermakna ($P < 0,05$) dengan Fhit 4,864 dimana KO = 71,41, KM = 69,17, KJS = 68,60. Setelah dilanjutkan dengan uji LSD dengan Post Hoc Test didapatkan bahwa terdapat perbedaan bermakna spermatisit pakiten antara KO dan KM, KO dan KJS (angka diikuti tanda bintang) dan perbedaan tidak bermakna antara KM dan KJS (Angka tidak diikuti tanda bintang).

Pada Tabel 3 dapat dilihat bahwa ranking nilai mean jumlah spermatid menunjukkan perbedaan yang bermakna ($P < 0,05$) dengan nilai Chi square 25,07. dimana KO = 47,12, KM = 19,40, dan KJS = 29,69.



Gambar 1. Penampang melintang tubulus seminiferus testis. Kontrol (A). KM (B) KJS (C). Membran basalis (1). Spermatogonium A. (2). Spermatisit (3). Spermatid (4). Spermatozoa (5). Sel Sertoli (6). Lumen (7).

Tabel 2. Hasil analisis perbedaan rata - rata mean spermatogonia A, Spermatisit pakiten dengan uji one way Anova.

Variabel	Perlakuan	Mean	F hitung	P
Spermatogonia A	KO	11,90 ^a	3,073	0,054
	KM	12,15 ^a		
	KJS	11,00 ^a		
Spermatisit Pakiten	KO	71,41 ^a	4,864	0,011
	KM	69,17 ^b		
	KJS	68,60 ^b		

Keterangan : angka diikuti notasi berbeda menunjukkan perbedaan yang bermakna

Setelah dilanjutkan dengan uji Mann Whitney U (tabel 5) terdapat perbedaan bermakna antara KO dan KM, KO dan KJS, KM dan KJS (P < 0,05). Pada Tabel 3 nilai rangking mean jumlah sel Sertoli menunjukkan perbedaan tak bermakna (P > 0,05) dengan nilai Chi Square 4,036 dimana KO = 37, 19, KM = 32,74, dan KJS = 27,07.

Tabel 3. Hasil Analisis Perbedaan Rata-Rata Spermatisit dan Sel Sertoli dengan uji Kruskal Wallis

Variabel	Perlakuan	Rangking Mean	Chi Square	P
Spermatisit	KO	47,12	25,07	0,01
	KM	29,69		
	KJS	19,40		
Sel Sertoli	KO	37,19	4,036	0,133
	KM	32,74		
	KJS	27,07		

Tabel 4. Hasil Analisis Perbedaan Spermatisit di Antara Kelompok Perlakuan dengan Uji Mann Whitney

Variabel	Perlakuan	Nilai Z	Nilai P
Spermatisit	KO vs KM	-4,552	0,000
	KO vs KJS	-3,473	0,001
	KM vs KJS	-2,236	0,025

PEMBAHASAN

Berdasarkan hasil penelitian dan analisis data, mencit jantan yang diberi perlakuan asap rokok kretek (KJS) menunjukkan kadar nikotin yang lebih besar dalam plasma darahnya dibandingkan dengan mencit yang diberi perlakuan asap rokok putih (KM). Hal ini sesuai dengan kadar niktotin rokok yang tercantum pada masing masing kemasan kedua merek rokok, dimana rokok KJS memiliki kadar nikotin dan tar yang lebih tinggi (69 mg dan 3,2 mg/ batang rokok) dibandingkan dengan rokok putih (KM) yang memiliki kadar nikotin dan tar (11 mg dan 0,8 mg/batang rokok).

Gangguan pada tubulus seminiferus testis juga terjadi yaitu ditandai dengan menurunnya jumlah spermatisit pakiten dan spermatisit. Rokok KJS yang memiliki kadar nikotin dan tar yang lebih tinggi tidak selalu menimbulkan efek yang lebih buruk. Hal ini dapat dilihat pada hasil penelitian terhadap penurunan jumlah spermatisit yang lebih besar terjadi pada mencit yang diberi perlakuan asap rokok KM.

Analisis Nikotin plasma mencit jantan

Asap rokok yang merupakan hasil pembakaran dari rokok telah diketahui mengandung banyak senyawa

berbahaya seperti tar, nikotin, dan nitrosamine. Beberapa bahan karsinogen dan mutagen lain yakni polonium, benzo(a) pirene, dimetilnitrosamine, naphthalane, CO₂, H₂O_x, NO_x, SO_x dan CO, merkuri, tembaga (Pb), dan kadmium.

Guven *et al.* (1999) melaporkan bahwa pemberian PAH dapat menyebabkan atrofi testis, menghambat spermatogenesis, dan merusak morfologi spermatozoa pada mencit. Francavilla *et al.* (2000) menyatakan bahwa NO dapat menyebabkan terhambatnya motilitas spermatozoa dan bersifat toksis pada sperma. Revel *et al.* (2001) melaporkan bahwa mencit yang terpapar B(a)P mengalami kerusakan DNA dan meningkatnya apoptosis sel spermatogonia. Bizzarro *et al.* (2003) mencit yang menerima timbal secara *gavage* menunjukkan adanya gangguan spermatogenesis dan kerusakan DNA sel Sertoli.

Berdasarkan hal tersebut di atas dapat dikatakan bahwa selain nikotin dan tar ada bahan kimia lain yang menyebabkan penurunan jumlah spermatisit pakiten dan spermatisit karena dalam asap rokok masih banyak bahan-bahan kimia berbahaya yang juga dapat menghambat spermatogenesis. Hal ini menunjukkan bahwa efek rokok yang merugikan tidak tergantung dari kadar nikotin saja.

Gambaran Mikroanatomi Tubulus Seminiferus Testis

Mikroanatomi tubulus seminiferus yang normal akan menunjukkan asosiasi sel spermatogenik tersusun berlapis sesuai dengan tingkat perkembangannya dari membran basalis menuju ke arah lumen tubulus yakni spermatogonia, spermatisit, dan spermatisit. Lumen tampak terisi penuh oleh spermatozoa.

Longgarnya susunan sel spermatogenik tubulus seminiferus testis pada penelitian ini disebabkan oleh adanya kerusakan sel - sel spermatogenik yang selanjutnya akan berdegenerasi dan difagositosis oleh sel Sertoli. Tidak penuhnya spermatozoa dalam lumen tubulus seminiferus terjadi karena berkurangnya jumlah spermatisit dan adanya gangguan spermiogenesis sehingga spermatisit terhambat untuk berdiferensiasi menjadi spermatozoa. Hal ini sesuai dengan penghitungan jumlah sel - sel spermatogenik dimana terjadi penurunan jumlah spermatisit pakiten, dan spermatisit.

Asap rokok menyebabkan terganggunya spermatogenesis dalam tubulus Seminiferus. FSH, testosteron dan LH adalah hormon yang berperan penting dalam spermatogenesis. Yardimci (1997) dan Yamamoto (1999) menyatakan bahwa asap rokok menyebabkan terjadinya penurunan kadar hormon testosteron. Nikotin mempengaruhi kerja sistem saraf pusat dengan cara menghambat kerja *GnRH* sehingga pembentukan FSH dan LH terhambat. Dengan terhambatnya pembentukan FSH dan LH maka spermatogenesis berjalan tidak normal.

Penurunan jumlah spermatisit pakiten pada penelitian

ini diduga karena terjadi penurunan hormon testosteron. Bartlett (1989) menyatakan bahwa perkembangan sel spermatogenik dipengaruhi oleh hormon testosteron dan FSH. FSH menstimulasi terjadinya spermatogenesis dan testosteron dalam konsentrasi intratestikuler yang tinggi akan menjaga proses ini. Testosteron diperlukan untuk memulai proses meiosis sel spermatisit. Soehadi (1979) menyatakan bahwa testosteron berperan pada pembelahan profase meiosis pertama tahap diakinesis, yaitu pada saat dimulainya pembelahan metaphase. Penurunan jumlah spermatisit pakiten ini didukung juga oleh pernyataan Everitt dan Johnson (1990) bahwa spermatisit sangat sensitif terhadap pengaruh luar dan cenderung mengalami kerusakan setelah profase meiosis pertama khususnya pada tahap pakiten, yaitu pada saat terjadinya pindah silang antara kromosom yang homolog. Pada tahap ini, inti serta sitoplasma tumbuh menjadi sel terbesar di antara lapisan sel spermatogenik. Bila spermatisit mengalami kerusakan seperti atrofi tubular, nekrosis tubular, hilangnya sel intermedia, maka akan mengalami degenerasi dan difagositosis oleh sel Sertoli sehingga jumlah spermatisit menjadi berkurang.

Penurunan jumlah spermatisit menyebabkan jumlah spermatid juga menurun karena spermatisit yang mengalami meiosis kedua menjadi spermatid menurun. Sekresi hormon testosteron yang diduga menurun karena perlakuan asap rokok menyebabkan terganggunya spermiogenesis. Pada penelitian McLachlan *et al.* (1996), hormon testosteron dan FSH menyebabkan spermatid terikat pada sel Sertoli. Holdcraft dan Robert (2004) menyatakan bahwa hormon testosteron akan menjaga semua tahap perkembangan spermatid. Penurunan hormon mengakibatkan terlepasnya spermatid dari sel Sertoli ke lumen tubulus. Hal ini mengakibatkan gagalnya tahap spermiogenesis. Sel Sertoli mempunyai peranan penting dalam spermiogenesis tetapi asap rokok bersifat toksik terhadap fungsi sel Sertoli (Güven *et al.*, 1999)

SIMPULAN

Berdasarkan hasil penelitian dan pembahasan mengenai paparan asap rokok pada mencit jantan maka dapat diambil kesimpulan bahwa paparan asap rokok putih dan rokok kretek menurunkan jumlah spermatisit pakiten dan spermatid. Efek buruk yang ditimbulkan diduga disebabkan oleh berbagai macam bahan kimia berbahaya dari asap rokok dan bukan hanya oleh nikotin dan tar saja.

KEPUSTAKAAN

Bindar, Y. 2000. Ekonomi, Rokok dan Konsekuensinya. Jurusan Teknik Kimia. ITB. <http://www.Angelfire/.com/il/nalapr-laya/rokok/html>.
Bizarro, P., S. Acevedo, G. Nino-Cabrera, P. Mussali-Galante, F.

Pasos, M. R. Avilacosta, T. I. Fortoul. 2003. Ultrastructural Modification in the Mitochondrion of Mouse Sertoli Cells After Inhalation of Lead, Cadmium or Lead – Cadmium Mixture. *Reproductive Toxicology* 17 : 561 – 566.
Donnell, L.O., R. L. McLachlan, N. G. Wreford, D. M. de Kretser, D. M. Robertson. 1996. Testosterone Withdrawal Promotes stage-specific Detachment of Roun Spermatid from the Rat Seminiferous Epithelium. *Biol. Reprod.* 55 : 895 – 900
Fowles, J., M. Bates. 2000. The Chemical Constituents in Cigarettes and Cigarette Smoke : Priorities For Harm Reduction. *Epidemiology and Toxicology Group. ESR ; Kenepuru Science Centre. New Zealand.*
Francavilla, F., R. Santucci, B. Macerola, G. Ruvolo, R. Romano. 2000. Nitric Oxide Synthase Inhibition in Human Sperm Affect Sperm – oocyte Fusion but Not Zona Pellucida binding. *Biology of Reproduction* 63 : 425 – 429.
Galbacs, Z.M., G. Gabor. 2002 Chemical Aspect of the Dangerous of Cigarette Smoke. *Cejoem* 8 : 213 – 220.
Ghosheh, O.A. 2000. A Simple High Performance Liquid Chromatographic Method for The Quantification of Total Cotinine. Total 3'-Hydroxycotinine and Caffeine in The Plasma of Smokers. *Therapeutic Drug Monitoring* 20 : 358 - 363
Güven, M.C., B. Can, A. Ergun, Y. Saran, Aydos. 1999. Ultrastructure Effect of Cigarette Smoke on Rat testis. *European Urology* 36 : 645 -649.
Holdcraft, R.W., Braun. 2004. Hormonal Regulation of Spermatogenesis. *International Journal of Andrology* 27 : 335-342
Johnsons, M., B. Everitt. 1990. *Essential Reproduction*. 3rd edition. Blackwell Sci.Pub.Oxford, London, Edinburg.
Martini, F. 2001. *Fundamental of Anatomy and Physiology*. Prentice Hall, Inc. New Jersey.
Mc Lachlan, R.L., N.G. Wreford, L. O' Donnell, D. M. de Kretser, D. M. Robertson. 1996. Endocrine Regulation of Spermatogenesis ; Independent Roles for Testosterone and FSH. *Journal of Endocrinology* 148 : 1 – 9
Pacifci, R., I. Altieri, L. Gandini, A. Lenzi, Simena, P. Zuccaro. 1993. Nicotine, Cotinine and Trans -3- Hydroxycotinine Levels in Seminal Plasma of Smpkers. Effect on Sperm Parameters. *Therapeutic Drug Monitoring* 15 : 358 – 363.
Patterson, T.R., D. S. John, M. Wayne. 1989. Nicotine and Cotinine Inhibit Steroidogenesis In Mouse Leydig Cells. *Life Science*. Vol. 46, pp265 – 272.
Revel, A., N. Raanani, E. Younglai, J. Xu, R. Han. 2001. Resveratrol, a Natural Aryl Hydrocarbon Receptor Antagonist, Protect Sperm from DNA Damage and Apoptosis Caused by Benzo(a)Pyrene. *Reproductive Toxicology* 15 : 479 – 486.
Yamamoto, Y., E. Isoyama, N. Sofikitis, I. Miyagawa. 1998. Effect of Smoking on Testicular Function and Fertilizing Potential in Rats. *Urol Res.* 26 : 45 -48.
Yardimci, S., A. Atan, T. Delibasi, K. Sunguroglu, M. C. Güven. 1997. Long Term effect of Cigarette Smoke Exposure on Plasma Testosterone, Lutenizing Hormone and Follicle Stimulating Hormone Levels in Male Rats. *Br J Urol.* 79 9 : 66 – 9.
Zhang J.P., Q. Y. Meng, Q. Wang, L. J. Zhang. 2000. Effect of Smoking on semen quality of Infertile men in Shandong, China. Department of Histology/ Embryology Jining Medical College Shandong. *Asian Journal Andrology* 2 : 143 – 146.