

Paparan Formalin Menghambat Proses Spermatogenesis pada Mencit

(*FORMALDEHYDE EXPOSURE INHIBITS
THE SPERMATOGENESIS PROCESS IN MICE*)

Luh Gde Sri Surya Heryani¹, Ni Nyoman Werdi Susari¹,
I Made Kardena², Desak Nyoman Dewi Indira Laksmi³

¹Laboratorium Anatomi, ²Laboratorium Patologi, ³Laboratorium Reproduksi,
Fakultas Kedokteran Hewan, Universitas Udayana,
Jl.PB. Sudirman Denpasar Bali
Email: surya_heryani@yahoo.com

ABSTRAK

Formalin merupakan sumber radikal bebas eksogen. Paparan formalin yang berlebihan akan menyebabkan lebih banyak radikal bebas atau senyawa oksigen reaktif (SOR) yang terbentuk melalui rantai transport elektron. SOR yang berlebihan memicu terjadinya reaksi peroksidasi lipid pada membran sel spermatozoa. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui paparan formalin dapat menyebabkan penurunan proses spermatogenesis meliputi jumlah spermatogonium A, spermatogonium pakhtiten, spermatid 7 serta spermatid 16. Penelitian ini menggunakan rancangan *Randomized Pretest - Posttest Control Group Design*. Sampel dalam penelitian ini adalah mencit jantan dewasa (umur 2 – 3 bulan) strain Balb-C dengan kriteria : bobot badan 22 – 25 gram dan sehat. Mencit sebanyak 48 ekor secara acak dibagi menjadi tiga kelompok yaitu kelompok kontrol dan kelompok perlakuan 1 dan kelompok perlakuan 2. Sebelum perlakuan, dari setiap kelompok diambil setengahnya untuk pre-test dengan pembuatan preparat mikroskopis testis dan pemeriksaan jumlah sel spermatogenik. Sisa mencit dipergunakan untuk post-test yang diberikan perlakuan selama 35 hari. Pada hari ke-36, seluruh sisa mencit dikorbankan nyawanya kemudian dibedah dan dibuat preparat mikroskopis testis. Hasil penelitian ini menunjukkan bahwa paparan formalin menyebabkan terjadinya penurunan secara bermakna ($p < 0,05$) pada jumlah sel spermatogenik dengan rerata berturut-turut pada kelompok kontrol, perlakuan 1 dan perlakuan 2 yaitu spermatogonium A: $39,90 \pm 0,51$; $20,42 \pm 0,72$; $15,65 \pm 0,88$; spermatogonium Pakhtiten: $48,47 \pm 1,28$; $32,60 \pm 3,06$; $23,14 \pm 3,16$; spermatid 7: $97,47 \pm 5,28$; $39,98 \pm 4,28$; $30,36 \pm 2,96$ dan spermatid 16: $73,08 \pm 4,05$; $21,70 \pm 1,70$; $16,38 \pm 1,87$. Dari hasil penelitian ini dapat disimpulkan bahwa paparan formalin menyebabkan penurunan jumlah sel spermatogenik pada mencit. Hasil penelitian ini diharapkan dapat dipakai sebagai dasar penelitian lebih lanjut untuk mengukur kadar formalin sebagai radikal bebas pada testis.

Kata kunci : paparan formalin, radikal bebas, spermatogenesis.

ABSTRACT

Formaldehyde is one of the exogenous free radicals. During formaldehyde exposure, there will be more free radical or reactive oxygen compound formed through electron transport chain. Excessive reactive oxygen compound triggers the process of lipid peroxide reaction in the membrane of spermatozoa cell. The aims of this study were to find out that formaldehyde exposure caused abnormalities in the number of the number of spermatogonium type A, spermatogonium type Pachytene, 7th spermatid and 16th spermatid in spermatogenesis process. This study was experimentally and randomly pretested-posttested- with control group design. The samples of this study were adult male mice strain Balb-C (age 2-3 months) with the following criteria: body weight between 22-25 grams and healthy. Randomly, 48 mice were divided into three groups, were control group, the first treatment group and the second treatment group. Prior to the treatment, were taken a half from each group for the pre-test, by preparing microscopic preparation testicle and examination was performed to the total spermatogenic cells. The rests of the mice were used as post-test examination after 35 days treatment. On the 36th day, all the rest mice were necropsied for microscopic testicle preparation. The result of this study showed that the formaldehyde exposure caused significantly decrease in the number of spermatogenic cells ($p < 0,05$), the average of type A spermatogonium cells at control group, 1st treatment group and 2nd treatment group were $39,90 \pm 0,51$; $20,42 \pm 0,72$; $15,65 \pm 0,88$ respectively; spermatogonium type Pachytene were $48,47 \pm 1,28$; $32,60 \pm 3,06$; $23,14 \pm 3,16$ respectively; 7th spermatid were $97,47 \pm 5,28$; $39,98 \pm 4,28$; $30,36 \pm 2,96$ respectively and 16th spermatid were $73,08 \pm 4,05$; $21,70 \pm 1,70$; $16,38 \pm 1$ respectively. It can be concluded that the formaldehyde exposure decreased the amount of spermatogenic cells. The result of this study is expected to be used as the baseline for further study in order to measure formaldehyde content as a free radical in testicle .

Key words : formaldehyde exposure, free radical, spermatogenesis.

PENDAHULUAN

Kesuburan atau fertilitas merupakan masalah penting bagi setiap pasangan, yang ingin mendapatkan keturunan. Fertilitas dapat dievaluasi dengan menganalisis jumlah dan kualitas sel-sel yang berperan dalam sistem reproduksi pria dan wanita.

Ketidaksuburan atau infertilitas pada pria berkaitan erat dengan proses spermatogenesis. Proses ini dipengaruhi oleh dua faktor yaitu faktor internal dan eksternal. Faktor internal meliputi faktor hormonal, psikologik dan genetik dan faktor eksternal meliputi bahan kimia (obat-obatan dan bahan kimia lainnya), fisik (suhu, radiasi dan gelombang ultrasonic), vitamin dan gizi, serta trauma dan peradangan (Steinberger, 1977; Mitchell *et al*, 1977; Guyton and Hall, 2001).

Proses spermatogenesis terjadi di tubulus seminiferus testis. Dimana didalamnya terdapat sel-sel induk spermatozoa atau spermatogonium, sel Sertoli yang berfungsi memberi makan spermatozoa juga sel Leydig yang terdapat pada jaringan interstitial yang berfungsi menghasilkan testosteron. Adanya gangguan pada organ reproduksi ini akibat zat kimia secara tidak langsung akan mempengaruhi proses spermatogenesis (Guyton and Hall, 2001).

Akhir-akhir ini banyak sekali bahan kimia yang bersifat toksik yang dicampur ke dalam makanan dan digunakan sebagai pengawet makanan, salah satunya adalah formalin. Pemeriksaan yang dilakukan oleh Badan Pemeriksa Obat dan Makanan (BPOM) menunjukkan ada beberapa makanan yang mengandung formalin seperti mie basah, bakso, ikan asin dan tahu. Dari hasil penelitian badan POM di Jakarta pada tahun 2005 menunjukkan adanya kandungan formalin pada beberapa jenis makanan seperti: ikan asin 2,36 – 107,9 mg/kg, tahu 3,41 – 80,18 ppm, mie basah 326,63 ppm, mie keriting 50,36 ppm, ikan cucut 91,41 ppm (Nurheti, 2007).

Formalin sangat berbahaya jika terhirup, mengenai kulit dan tertelan. Akibat yang ditimbulkan dapat berupa luka bakar pada kulit, iritasi pada saluran pernafasan, reaksi alergi dan bahaya kanker pada manusia. Jika kadar formalin dalam tubuh tinggi, akan bereaksi secara kimia dengan hampir semua zat di dalam sel, sehingga menekan fungsi sel dan menyebabkan kematian sel yang menyebabkan kerusakan pada organ tubuh. Formalin juga merupakan sumber senyawa oksigen reaktif

(SOR) dan radikal bebas eksogen (Judarwanto, 2005; Nurheti, 2007; Mahdi *et al*, 2008).

Ambang batas aman formalin di dalam tubuh menurut IPCS (*International Programme on Chemical Safety*) lembaga khusus PBB yang bertugas mengontrol keselamatan penggunaan bahan kimiawi, dalam bentuk cairan adalah 1 miligram per liter, sedangkan dalam bentuk makanan untuk orang dewasa adalah 1,5 – 14 mg/hari. (Wisnu, 2006; Nurheti, 2007).

Formalin diekskresikan dalam bentuk karbondioksida dan air, diperkirakan sekitar 10% diekskresi melalui urine, 1% melalui feses, dan 10-20% melalui saluran nafas. Sebagian besar asam formiat dari formalin mengendap dalam jaringan tubuh dan dapat menimbulkan efek yang permanen atau bisa bergabung menjadi grup methyl ke dalam asam nukleat dan protein (Hedberg *et al.*, 2001; Thrasher and Kilburn, 2001).

Paparan formalin menyebabkan meningkatnya reaktivitas SOR yang akan merusak DNA, protein dan lipid penyusun membran sel. Keadaan tersebut menyebabkan menurunnya aktivitas enzim superoxide dismutase (SOD) yang berperan sebagai antioksidan enzimatis, karena SOD, katalase dan glutathion merupakan scavenger utama yang terlibat dalam inaktivasi dan terminasi radikal oksigen bebas (Ji, 2000; Mahdi *et al.*, 2008; Winarsi, 2007).

Potensi penangkapan senyawa oksigen reaktif dalam saluran reproduksi secara normal ditunjukkan oleh cukupnya kadar antioksidan SOD, katalase, glutathion, vitamin E, dan C serta α -karoten. Bila terjadi ketidakseimbangan antara kadar antioksidan dan banyaknya senyawa oksigen reaktif akan terjadi kondisi yang disebut stres oksidatif dan menyebabkan turunnya fertilitas (Fridovich, 1986; Sikka, 1996).

Beberapa penelitian pada tikus dan anjing dengan pemberian formalin dalam dosis tertentu jangka panjang secara bermakna mengakibatkan adenokarsinoma pilorus, preneoplastik hiperplasia pilorus dan adenokarsinoma duodenum. Penelitian dengan pemberian formalin peroral pada ayam dan burung puyuh menunjukkan penurunan berat testis dan berkurangnya diameter tubulus seminiferus (Johannsen *et al.*, 1986; Anwar *et al.*, 2001; Khan *et al.*, 2002).

Abnormalitas sperma telah diteliti pada tikus dengan perlakuan pemberian formalin peroral dengan dosis 100-200 mg/kg bb selama 1 hari dan dosis 5, 15 dan 25 mg/kg bb selama 4

minggu. Pemberian formalin melalui injeksi intraperitoneal dengan dosis 8 atau 16 mg/kg badan selama 10 hari mengakibatkan degenerasi jaringan testis, penghambatan spermatogenesis, dan menurunnya berat organ testis pada tikus (WHO, 2005).

Berdasarkan latar belakang di atas maka perlu dilakukan penelitian mengenai pengaruh formalin terhadap proses spermatogenesis pada mencit.

METODE PENELITIAN

Penelitian ini menggunakan rancangan *Randomized Pre test – Post test Control Group Design*. Besar sampel yang diperlukan dalam penelitian ini didasarkan pada rumus Pocock (1986). Sampel dalam penelitian ini adalah mencit jantan dewasa strain Balb-C dengan kriteria sebagai berikut : bobot badan 22–25 gram, umur 2–3 bulan dan sehat. Sampel diambil secara acak sederhana. Sampel dibagi menjadi 3 kelompok yaitu kelompok kontrol dan kelompok perlakuan 1 dan 2. Sebelumnya dilakukan aklimatisasi selama tiga hari di tempat penelitian untuk penyesuaian terhadap lingkungan yang baru, selama proses adaptasi ini mencit tetap diberi makan dan minum.

Pada hari ke-4, setengah dari kelompok kontrol, perlakuan 1 dan 2 sebagai kelompok *pre-test*, dilakukan pengambilan testis untuk pembuatan sediaan histopatologi dengan pewarnaan Hematoxylin-Eosin (HE) dan dinilai di bawah mikroskop. Sisanya dipakai sebagai kelompok *post-test* diberi perlakuan dengan sonde peroral selama 35 hari. Kelompok kontrol diberi perlakuan aquabidest peroral 0,2mg/25g bb mencit, kelompok perlakuan 1 diberi formalin peroral 0,2 mg/25 g bb mencit dan kelompok perlakuan 2 diberi formalin peroral 0,5 mg/25 g bb mencit.

Pada hari ke-39 (hari ke-36 setelah perlakuan), seluruh sisa mencit dikorbankan nyawanya dibedah untuk diambil kedua testisnya yang kemudian dimasukkan ke dalam cairan pengawet berupa buffer formalin 10% sampai kedua testis terendam, selanjutnya dibuat sediaan histopatologi dengan pewarnaan HE.

Data kuantitatif pada masing-masing mencit diperoleh dari rata-rata jumlah sel-sel spermatogenik dalam lima lapang pandang pada stadium VII tubulus seminiferus testis kanan dan kiri secara mikroskopis dengan pembesaran 400x. Data yang diperoleh pada penelitian ini dianalisis sebagai berikut : analisis deskriptif, uji normalitas data diperoleh dengan tes Shapiro-Wilk, uji homogenitas data dipakai *Leuvene's test* dan uji komparabilitas analisis dengan uji statistik One-Way Anova (Nazir, 1999).

HASIL DAN PEMBAHASAN

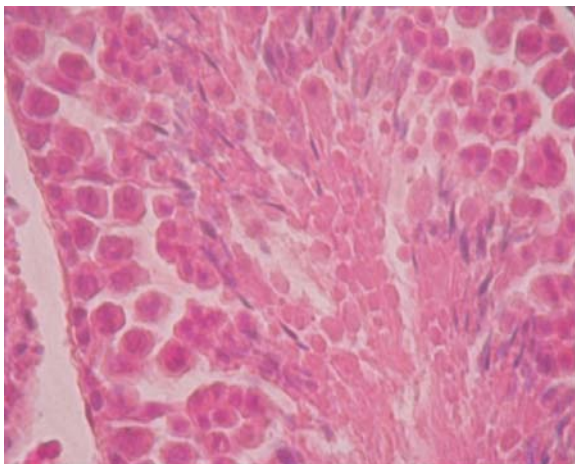
Hasil penelitian menunjukkan terjadi perbedaan jumlah sel-sel spermatogenik antara kelompok kontrol dengan kelompok perlakuan 1 dan kelompok perlakuan 2. Terjadi penurunan yang bermakna ($p < 0,05$) pada jumlah sel spermatogonium A, spermatogonium Pakhiten, spermatid 7 dan spermatid 16 dibandingkan dengan kelompok kontrol. Penurunan pada kelompok perlakuan 2 lebih hebat dibandingkan dengan kelompok perlakuan 1. Hal ini menunjukkan bahwa paparan formalin dosis yang lebih tinggi menyebabkan kerusakan yang lebih hebat dibandingkan dengan paparan formalin dengan dosis yang lebih rendah.

Penurunan jumlah sel-sel spermatogenik ini terjadi akibat kerusakan pada membran sel akibat adanya paparan formalin yang merupakan sumber radikal bebas eksogen yang akan dapat meningkatkan produksi SOR, dan

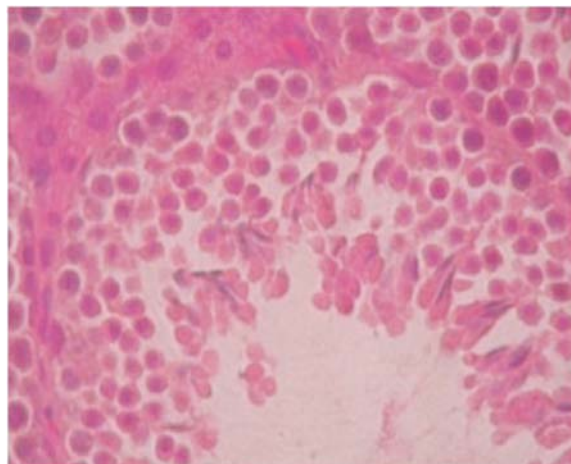
Tabel 1. Beda rata-rata sel-sel spermatogenik antar kelompok

Kelompok	Beda rata-rata				Probabilitas
	Sp A	Sp P	Sp 7	Sp16	
Kontrol dan Perlakuan 1	19,47	15,87	57,49	51,39	0,000
Kontrol dan Perlakuan 2	24,25	25,33	67,11	56,70	0,000
Perlakuan 1 dan Perlakuan 2	4,77	9,46	9,62	5,31	0,000

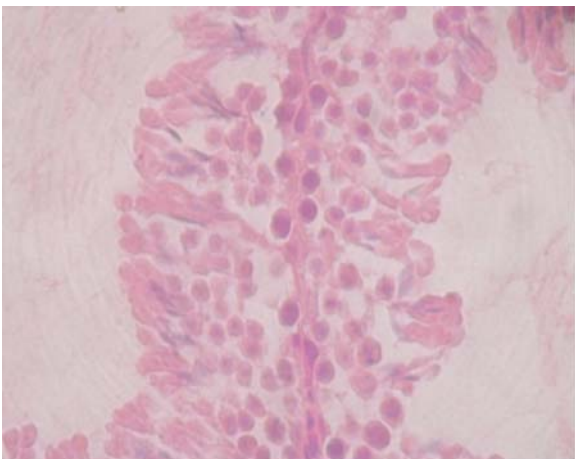
Keterangan : Sp A : spermatogonium A; Sp P: spermatogonium Pakhiten; Sp 7 : spermatid 7; Sp 16: spermatid 16.



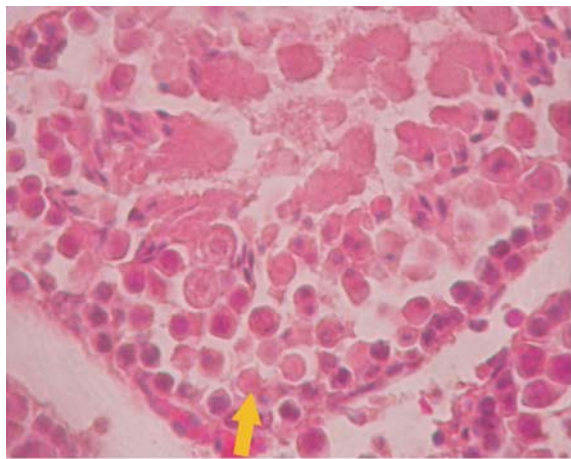
Gambar 1. Gambaran testis mencit kelompok kontrol dengan pembesaran 400x dan pewarnaan HE menunjukkan jumlah sel-sel spermatogenik yang normal.



Gambar 2. Gambaran testis mencit kelompok Perlakuan 1 dengan pembesaran 400x dan pewarnaan HE menunjukkan terjadinya penurunan jumlah sel-sel spermatogenik



Gambar 3. Gambaran testis mencit kelompok Perlakuan 2 dengan pembesaran 400x dan pewarnaan HE menunjukkan terjadinya penurunan jumlah sel-sel spermatogenik.



Gambar 4. Gambaran testis mencit kelompok Perlakuan 2 dengan pembesaran 400x dan pewarnaan HE menunjukkan terjadinya penurunan jumlah sel-sel spermatogenik dengan kerusakan sel yang sangat parah bahkan terjadi nekrosis.

SOR merupakan mediator yang memegang peranan penting dalam kejadian cedera sel dan kerusakan oksidatif (Burkhart *et al.*, 1990; Murray *et al.*, 1996; Saito *et al.*, 2005; Gurel *et al.*, 2005; Mc Coy, 2007).

Penurunan jumlah sel spermatogonium A disebabkan oleh terhambatnya proliferasi perkembangan sel germinal. Penurunan jumlah sel spermatogonium pakhiten terjadi akibat adanya gangguan pada proses spermatogenesis, sedangkan penurunan jumlah spermatid 7 dan spermatid 16 terjadi akibat adanya

gangguan pada fase meiosis dan spermiogenesis. Penurunan terjadi pada semua fase dalam proses spermatogenesis karena peneliti tidak dapat mengendalikan pada stadium mana terjadinya paparan tersebut. Spermatogenesis yang merupakan proses penting dalam menentukan fertilitas pria dikatakan sangat sensitif terhadap pengaruh dari luar seperti toksin, radiasi, bahan kimia, trauma mekanik, suhu serta bahan sitotoksik. Radikal bebas sebagai bahan yang bersifat sitotoksik dilaporkan terdapat pada 25% sampai 40% semen pria yang infertil

(Matsumoto, 1996; Guyton and Hall, 2001; Saleh dan Argawal, 2002).

Paparan formalin menyebabkan penurunan jumlah spermatozoa, perubahan patologi berupa atrofi tubulus seminiferus, penurunan bobot testis, degenerasi dan nekrosis pada sel spermatogenik serta menurunnya viabilitas dan motilitas sel spermatozoa yang akan menyebabkan infertilitas (Tang *et al.*, 2003; Zhou *et al.*, 2006; Tootian *et al.*, 2007).

Formalin menyebabkan menurunnya aktivitas SOD dan GSH-Px yang merupakan antioksidan enzimatis yang terlibat dalam inaktivasi radikal bebas, serta meningkatkan kadar malondialdehid (MDA) yang merupakan produk penting dari peroksidasi lipid. Peningkatan kadar MDA merupakan indikator terjadinya peningkatan kadar radikal bebas dalam tubuh (Chang and Xu, 2006; Dang-Xia *et al.*, 2006; Mahdi *et al.*, 2008).

Dengan melihat hasil penelitian di atas yang menunjukkan bahwa paparan formalin dapat menyebabkan penurunan jumlah sel-sel spermatogenik akibat sifat sitotoksik formalin. Hal tersebut akan mempengaruhi tingkat kesuburan seseorang. Sehingga proses spermatogenesis terganggu dan terjadi penurunan jumlah sel-sel spermatogenik. Keadaan ini akan menyebabkan terjadinya infertilitas pada pria. Demikian hebatnya efek yang ditimbulkan paparan formalin sehingga perlu lebih diperhatikan pemakaiannya secara luas.

SIMPULAN

Dari hasil penelitian dengan perlakuan berupa paparan formalin pada mencit jantan dapat diambil simpulan bahwa paparan formalin dapat menurunkan jumlah sel-sel spermatogonium A, sel-sel spermatosit pakhiten, sel-sel spermatid 7 dan sel-sel spermatid 16.

UCAPAN TERIMA KASIH

Penulis mengucapkan terima kasih kepada semua pihak yang telah membantu pelaksanaan penelitian ini dan kepada Direktorat Jenderal Pendidikan Tinggi yang telah membiayai penelitian ini melalui dana DIPA Universitas Udayana tahun anggaran 2010 dengan kontrak nomor : 1677.C.26/H14/HM/2010.

DAFTAR PUSTAKA

- Anwar MI, Khan MZ, Muhammad G. 2001. Effect of Dietary Formalin on the Health and Testicular Pathology of Male Japanese Quails (*Coturnix coturnix japonica*). Departement of Veterinary Pathological. Clinical Medicine and Surgery. University of Agricultural. Faisalabad, Pakistan.
- Ari FS. 2007. Dampak Buruk Formalin dalam Makanan di Indonesia. Available from : <http://www.te.ugm.ac.id/forum/viewtopic.php?f=7&t=3824>. Accessed : October 16, 2008. 10:36 AM.
- Burkhart KK, Kulig KW, Mc Martin KE. 1990. Formate Levels Following Formalin ingestion. *Vet.Hum. Toxicol.* 32(2):135-137.
- Chang JR, Xu DQ. 2006. Effect of Formaldehyde on the Activity of Superoxide Dismutases and Glutathione Peroxidase and the Concentration of Malondialdehyde. Available from : <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17086726?ordinalpos=1&itoo..> Accessed : July 6, 2008
- Dang-Xia Zhou., Shu-Dong Qiu., Jie Zhang., Hong Tian., Hai-Xue Wang. 2006. The protective effect of vitamin E against Oxidative Damage caused by Formaldehyde in the Testis of Adult Rat. *Asian J Androl* 8 (5) ; 584-588
- Fridovich I. 1986. Superoxide Dismutase in *Advances in Enzymology and Related Areas of Molecular Biology. Journal of Biological Chemistry.* 58:61-97.
- Guyton AC, Hall JE. 2001. Reproductive and Hormonal Functions of the Male (and Function of the Pineal Gland). In: *Textbook of Medical Physiology.* Philadelphia. WB. Saunders.
- Gurel A, Coskun O, Armutcu F, Kanter M. 2005. Vitamin E against Oxidative Damage caused by Formaldehyde in Frontal Cortex and hippocampus: Biochemical and Histological Studies. *J Chem Neuroanat* 2005;29:173-8.
- Hedberg JJ, Backlund M, Stromberg P, Lonn S, Dahl ML, Ingelman-Sundberg M, Hoog JO. 2001. Functional Polymorphism in the Alcohol dehydrogenase 3 (ADH3) Promoter. *Pharmacogenetics* 11(9):815-824.
- Johannsen FR, Lovenskaskas GJ, Tegeris AS. 1986. Effect of Formaldehyde in The Rats and Dog Following Oral Exposure. *Toxicol. Lett.* 30:1-6.

- Ji LL. 2000. Antioxidant and Oxidative Strees in Exercise. Proceeding of the Society for Experimental Biology and Medicine. 222: 238-292.
- Judarwanto W. 2005. Pengaruh Formalin Bagi Sistem Tubuh. RS. Bunda. Jakarta
Available from : <http://puterakembara.org/arvhives8/00000066.shtml>. Accessed : October 16, 2008. 10:04 PM
- Khan MZ, Ali Z, Muhammad G, Khan A . 2002. Pathological Effect of Formalin (37% Formaldehyde) Mixed in Feed or Administered into the Crops of White Leghorn Cockerels. Departement of Veterinary Pathology. University of Agriculture. Faisalabad. Pakistan.
- Matsumoto AM. 1996. Spermatogenesis, In: *Reproductive Endocrinology, Surgery and Technology*. Philadelphia. Lippincott.
- Mahdi, C., Aulaniam., Sumarno., Widodo, M. A. 2008. Suplementasi Yoghurt pada Tikus (*Rattus novergicus*) yang Terpapar Formaldehid dalam Makanan terhadap Aktivitas Antioksidan, Kerusakan Oksidatif Jaringan Hepar. Available from : http://www.journal.unair.ac.id/detail_jurnal.php?id=2477&med=28..... Accessed : Februari 26, 2009.
- Mc Coy JT. 2007. Formaldehyde in Spacecraft Water Exposure Guidelines for Selected Contaminant Vol.2. NASA-Johnson Space Center Habitability and Environmental Factors office Houston. Texas. Available from : http://books.nap.edu/openbook.php?record_id=11778&page=300. Accessed : April 17, 2009.
- Mitchell JA, Nelson L, Robin C. 1977. Motility of Spermatozoa in: Hafez, E.S.E. Human Semen and Fertility Regulation in Men. The C.V. Mosby Company. United State of America. p.83-99.
- Mukono, H. J. 2005. Toksikologi Lingkungan. Surabaya. Airlangga University Press.
- Murray RK, Granner D, Mayes PA, Rodwell VW. 1996. Harper's Biochemistry, 24th Ed. P : 634-778.
- Nazir M. 1999. Metodologi Penelitian. Cetakan ke-4. Jakarta. Ghalia Indonesia.
- Nurheti, Y. 2007. Awas Bahaya! Dibalik Lezatnya Makanan. Yogyakarta. CV Andi Offset.
- Pocock, S. J. 1986. The Size of Clinical Trial. In: *Clinical Trials a Practical Approach*. John Wiley & Sons. New York, p : 123 – 127.
- Saleh RA, Agarwal A. 2002. Oxidative Stress and Male Infertility, from Research Bench to Clinical Practice. *Journal of Andrology*. Vol.6. no.23.
- Saito Y, Nishio K, Yoshida Y, Niki E. 2005. Cytotoxic effect of Formaldehyde with Free Radicals via Increment of Cellular Reactive Oxygen Species. *Toxicology* 210:235-45.
- Sikka SC. 1996. Oxidative Stress a Role of Antioksidants in Normal and Abnormal Sperm Function. Available from: www.bioscience.org. Accessed: December 14, 2008.
- Steinberger A. 1977. Neuroendocrine Control of Testicular Function. In : Hafez ESE, ed. *Human Semen and Fertility Regulation in Men*. Saint Louis. The CV Mosby Company. P.17 - 30.
- Tang M, Xie Y, Yi Y, Wang W. 2003. Effect of Formaldehyde on Germ Cells of Male mice. Available from : <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14963899?ordinalpos=1&itoo>.. Accessed : July 6 2008.
- Thrasher JD, Killburn H. 2001 Embryo Toxicity and Teratogenicity of Formaldehyde. *Arch Environ Health* 56(4):300-311.
- Tootian Z, Tajik P, Fazelpour S, Taghva M. 2007. Effect of Formaldehyde Injection in Mice on Testis Function. *International Journal of Pharmacology* 3(5): 421-424.
- WHO. 2005. Concise International Chemical Assessment Document 40 Formaldehyde. Geneva : World Health Organization.
- Winarsi H. 2007. Antioksidan Alami dan Radikal Bebas, Potensi dan Aplikasinya dalam Kesehatan. Yogyakarta. Kanisius.
- Wisnu, C. 2006. *Analisis dan Aspek Kesehatan. Bahan Tambahan Pangan*. Jakarta. PT. Bumi Aksara.
- Zhou DX, Qiu SD, Zhang J, Wang ZY. 2006. Reproductive Toxicity of Formaldehyde to Adult Male Rats and the Functional Mechanism Concerned. Available from : <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16909603?ordinalpos=1&itoo>. Accessed : July 6, 2008.