

Efek Kondisi Hiperglikemik terhadap Struktur Ovarium dan Siklus Estrus Mencit (*Mus musculus L*)

Effect of Hyperglykemic Conditions on Ovarian Structure and Estrous Cycle of Mice (Mus musculus L)

Eva Tyas Utami, Rizka Fitrianti, Mahriani, Susantin Fajariyah
Jurusan Biologi FMIPA Universitas Jember

ABSTRACT

Streptozotocin cause hyperglycemic condition in mice. The objective of this study was to determine whether the hyperglycemic conditioned by streptozotocin (STZ) has an impact at follicular atretic and estrous cycle prolonged. Mice were injected by STZ until hyperglycemic condition was reached. The vaginal smear was recorded daily for twice estrous cycle. Mice were sacrificed soon after the last vaginal smear observation. The ovary was removed, prepared by parafin method and stained by hematoxylin-eosin. The result showed that hyperglycemic causes increasing the number of atretic follicles, decreasing the number of corpus luteum and prolonged of estrous cycle.

Keywords : Hyperglycemic, ovarian, estrous cycle

PENDAHULUAN

Gula darah adalah istilah yang mengacu pada kadar glukosa di dalam darah. Glukosa yang dialirkan melalui darah adalah sumber energi utama untuk sel-sel tubuh. Kadar gula darah diatur melalui umpan balik negatif untuk mempertahankan keseimbangan di dalam tubuh. Pankreas berperan dalam pengaturan kadar glukosa dalam darah. Apabila konsentrasi glukosa menurun, maka pankreas melepaskan glukagon yang akan mengubah glikogen menjadi glukosa, proses ini disebut *glikogenolisis*. Glukosa dilepaskan ke dalam aliran darah, sehingga kadar gula darah meningkat. Apabila kadar gula darah meningkat, maka hormon insulin dilepaskan dari sel beta pankreas. Hormon ini menyebabkan hati mengubah lebih banyak glukosa menjadi glikogen (Wikipedia 2005).

Gula di dalam darah tidak dapat masuk dalam sel-sel jaringan tubuh lainnya seperti otot dan jaringan lemak apabila tidak terdapat insulin. Penurunan hormon insulin mengakibatkan seluruh gula (glukosa) yang dikonsumsi tubuh tidak dapat di proses secara sempurna, sehingga kadar glukosa di dalam tubuh akan meningkat (Utami 2003). Apabila kadar glukosa darah seseorang meningkat tajam dalam waktu relatif singkat, kondisi ini disebut dengan hiperglikemik (Ranakusuma 1997, Soeharto 2001, Utami 2003).

Pada mencit kadar glukosa dalam darah normal adalah 62-175 mg/dl (Malole & Pramono 1989), apabila kadar glukosa dalam darah melebihi angka tersebut maka mencit dapat dipastikan dalam keadaan hiperglikemik. Hiperglikemik dapat menyebabkan gangguan metabolisme karbohidrat, protein, dan lipid. Akibat gangguan metabolisme tersebut dapat menyebabkan kegagalan pada berbagai organ, terutama mata, ginjal, saraf, jantung, dan pembuluh darah (Kurniawan 2005, Lumbantobing 2003), serta pada organ reproduksi.

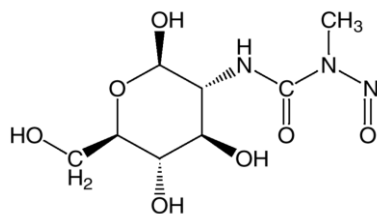
Menurut Garris *et al.* (1984) kondisi hiperglikemik pada hamster china (*Cricetus griseus*) dapat menyebabkan kerusakan struktur endometrium sehingga mengakibatkan meluasnya sel epitel pada lumen dan degenerasi membran stroma, terjadinya atropi sel-sel uterus dan akumulasi lipid. Berdasarkan penelitian Garris & Garris (2003), pada tikus hiperglikemik terjadi atropi folikel akibat adanya akumulasi lipid. Hal ini ditandai dengan adanya degenerasi jaringan sehingga terjadi depresi fungsi ovarium.

Kondisi hiperglikemik pada sistem reproduksi betina dapat berpengaruh terhadap fungsi folikel ovarium. Keadaan hiperglikemik mempengaruhi transport glukosa dalam ovarium dan produksi estrogen yang dihasilkan oleh folikel ovarium sehingga kadar estrogen dalam tubuh menjadi rendah (Cox *et al.* 1994).

Pada mencit estrogen akan mempengaruhi sensitivitas epitel vagina untuk mengalami kornifikasi sebagai tanda bahwa mencit tersebut telah memasuki tahap estrus (Jesionowska *et al.* 1990). Dengan demikian keadaan hiperglikemik diduga berpengaruh terhadap struktur ovarium dan siklus estrus pada mencit.

Keadaan hiperglikemik yang terus menerus dapat mengindikasikan terjadinya diabetes mellitus. Menurut Utami (2003), pada dasarnya *diabetes mellitus* merupakan kelainan metabolisme yang disebabkan karena kelainan sekresi hormon insulin, kerja insulin, atau keduanya. Insulin tersebut dihasilkan dari sel beta pankreas. Salah satu faktor yang dapat meningkatkan kadar gula darah adalah senyawa yang mampu merusak sel beta pankreas secara langsung sehingga menimbulkan gejala diabetes mellitus. Senyawa tersebut adalah streptozotocin (STZ).

Streptozotocin merupakan senyawa antibiotik yang mempunyai spektrum luas. Senyawa ini tersusun oleh glukosamine-nitrosourea yang bersifat sitotoksik terhadap sel beta pankreas sehingga dapat menyebabkan keadaan hiperglikemik. Streptozotocin (STZ) dapat menginduksi tikus, anjing, hamster, keria, mencit, dan marmot menjadi hiperglikemik. Streptozotocin dapat merusak DNA sel-sel pulau pankreas, dan menstimulasi sintesis poli nuklear (ADP-ribosa), NAD, dan NADP yang kemudian akan menghambat atau menghalangi sintesis proinsulin dan akhirnya menyebabkan diabetes. Streptozotocin juga dapat mengaktifkan jenis-jenis oksigen seperti superoksida, hydrogen peroksida, dan radikal hidroksil yang merupakan radikal bebas. Streptozotocin terdiri dari 1-methyl-nitrosourea yang terikat pada C2 dari D-glukosa (Ling Li 2001, Nurdiana *et al.* 1998). Rumus bangun STZ dapat dilihat pada Gambar 1.



Gambar 1. Rumus Bangun senyawa STZ (Second Annual Report on Carcinogens 2004).

METODE PENELITIAN

Bahan dan alat

Penelitian ini dilakukan di laboratorium Zoologi, Jurusan Biologi Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Jember. Bahan yang digunakan dalam penelitian ini meliputi mencit (*Mus musculus* L.) betina perawan strain Balb^cC, umur 8 minggu dengan berat rata-rata 20 gram, yang diperoleh dari PUSVETMA Surabaya, streptozotocin (STZ) (Sigma), buffer sitrat 0,1 M dengan pH 4,5, akuades, kapas, larutan fiksatif : formalin, PBS, alkohol bertingkat, parafin, pewarna hematoxylin-eosin, garam fisiologis dan xylo.

Uji pendahuluan

Mencit terlebih dahulu diperlakukan dengan STZ agar kadar gula darahnya meningkat. Senyawa streptozotocin [N-(Methylnitrosocarbomoyl)-D-glukos amine] dilarutkan dalam buffer sitrat 0,1 M dengan pH 4,5. Dosis STZ yang digunakan untuk membuat mencit mengalami kenaikan kadar gula darah yaitu 55 mg/kg BB sebanyak 0,1 ml. Dari uji pendahuluan diketahui bahwa pemberian STZ dengan dosis 1,4 mg/g BB dan 2,1 mg/g BB diperoleh kadar gula darah berturut-turut $109 \pm 5,91$ mg/dL dan $169 \pm 3,81$ mg/dL. Sedangkan pemberian STZ dengan dosis 55 mg/kg BB menyebabkan kadar gula darah meningkat menjadi $177 \pm 2,24$ mg/dL.

Pemberian STZ dilakukan secara intravena dengan cara ekor mencit direndam dalam air hangat selama 1-2 menit agar terjadi vaso dilatasi, kemudian jarum dimasukkan sejajar dengan ekor dan larutan STZ 0,1 ml disuntikkan sesuai dengan dosis yang telah ditentukan melalui pembuluh vena (Malole & Pramono, 1989). Empat puluh delapan jam setelah penyuntikan, dilakukan pengambilan darah melalui ekor dan glukosa darah diperiksa menggunakan alat pengukur kadar gula darah (*glukostix*).

Perlakuan

Dua puluh ekor mencit betina normal diaklimasi selama 7 hari dengan hanya diberi pakan berupa pellet dan air minum secara ad libitum. Selesai aklimasi, kemudian mencit-mencit tersebut ditimbang dan dikelompokkan menjadi dua kelompok yaitu kelompok kontrol dan kelompok perlakuan. Untuk kelompok kontrol mencit diberi buffer sitrat 0,1 M, sedangkan untuk kelompok perlakuan diberi larutan STZ sesuai dengan hasil uji pendahuluan. Streptozotocin diberikan secara intravena dengan volume pemberian 0,1 ml selama empat hari berturut-turut. Pada hari ke-7 mencit mengalami kenaikan kadar gula darah (hiperglikemik). Mencit dipertahankan dalam keadaan hiperglikemik. Pengukuran glukosa darah dilakukan seminggu sekali selama dua kali siklus

estrus (10 hari). Selanjutnya mencit dibedah dan ovarium diambil untuk dibuat preparat histologi.

Pengamatan siklus estrus

Pengamatan siklus estrus dilakukan sampai dua kali masa estrus (10 hari). Pengamatan dilakukan terhadap lama satu siklus estrus yang meliputi fase: proestrus, estrus, metestrus dan diestrus. Pengamatan dilakukan dengan membuat apusan vagina dengan pewarnaan methylen blue 1% menurut Bivens & Olster (1997).

Pembuatan preparat dan pengamatan

Pembuatan preparat ovarium dilakukan menggunakan metode parafin dan pewarnaan hematoxylin-eosin. Langkah pertama adalah dilakukan fiksasi ovarium dengan larutan formalin-PBS 10%, dilanjutkan dehidrasi menggunakan alkohol bertingkat dan clearing menggunakan xylol. Setelah clearing dilakukan infiltrasi parafin dan penanaman (*embedding*) dalam parafin. Setelah terbentuk blok parafin maka blok tersebut ditempel pada holder, dilakukan trimming, dan pengirisan menggunakan rotary microtom. Pita-pita preparat yang terbentuk ditempel pada gelas benda (*affixing*). Proses yang terakhir adalah pewarnaan (*staining*) dengan pewarna hematoxylin-eosin. Langkah terakhir adalah penutupan (*mounting*) (Handari 1983). Pengamatan struktur ovarium dilakukan dengan menghitung jumlah folikel primer atresi, sekunder atresi, tersier atresi, dan korpus luteum pada sayatan preparat histologi ovarium.

Analisis data

Data hasil pengamatan dianalisis menggunakan Anava dilanjutkan dengan uji Beda Nyata Terkecil (BNT) (Gaspersz 1994).

HASIL dan PEMBAHASAN

Pemberian perlakuan senyawa streptozotocin (STZ) pada mencit mengakibatkan terjadinya kenaikan kadar glukosa darah. Hal ini dapat dilihat pada Tabel 1. Pada Tabel 1 diketahui bahwa pada perlakuan STZ kadar gula darah mencit adalah $177 \pm 2,24$ mg/dL dibandingkan dengan kontrol awal sebelum diperlakukan STZ ($109 \pm 5,92$ mg/dL).

Pada mencit kadar glukosa darah normal adalah 62-175 mg/dL (Malole & Pramono 1989). Apabila kadar glukosa darah melebihi angka tersebut (diatas 200 mg/dL) maka mencit dapat dipastikan dalam keadaan hiperglikemik. Dari hasil uji chi-square diperoleh bahwa kadar gula 177 mg/dL berbeda nyata dengan kadar gula 109 mg/dL, sehingga mencit dipastikan dalam keadaan hiperglikemik.

Adanya peningkatan kadar glukosa darah setelah pemberian STZ mengindikasikan telah terjadi penurunan kadar insulin dalam darah. Hal ini disebabkan karena kerusakan pankreas sebagai penghasil hormon insulin. STZ merupakan senyawa yang mampu merusak sel beta pankreas secara langsung (Rossini *et al.* 1977). STZ bekerja pada DNA sel-sel pulau Langerhans pankreas, merangsang sintesis poli nuklear (ADP-ribosa), NAD dan NADP yang kemudian akan menghambat atau menghalangi sintesis proinsulin (Ling Li 2001), sehingga menyebabkan produksi insulin menurun. Hal ini mengakibatkan homeostasis glukosa dalam darah terganggu. Glukosa dalam darah tidak dapat diproses dengan sempurna sehingga terjadi peningkatan kadar gula darah atau terjadinya kondisi hiperglikemik (Lumbantobing 2003, Johnson 1998, dan Utami 2003). Kondisi hiperglikemik yang terjadi secara terus menerus mengarah pada terjadinya diabetes mellitus.

Tabel 1. Kadar gula darah mencit setelah pemberian senyawa streptozotocin.

Perlakuan	Kadar gula darah (mg/dL)
Kontrol awal	$109 \pm 5,92^a$
Streptozotocin	$177 \pm 2,24^b$

Ket: angka yang berbeda pada kolom yang sama menunjukkan beda nyata menurut uji BNT 5%

Pengamatan struktur histologi ovarium dilakukan dengan menghitung jumlah folikel primer, sekunder dan folikel matang yang mengalami atresia serta jumlah korpus luteum pada sayatan preparat histologi ovarium. Pengamatan dilakukan dengan mikroskop cahaya. Hasil pengamatan tersebut dapat dilihat pada Tabel 2.

Dari hasil pengamatan pada Tabel 2 tampak bahwa rerata jumlah folikel yang mengalami atresi baik pada folikel primer, sekunder maupun matang pada mencit hiperglikemik mengalami peningkatan yang signifikan dibandingkan dengan kontrol. Folikel atresi merupakan folikel yang sedang atau telah mengalami degenerasi (Bajpai 1989). Proses atresi dapat berlangsung pada setiap tahap perkembangan folikel yang ditandai dengan berhentinya pembelahan mitosis sel-sel granulosa, terjadi pelepasan sel granulosa

tersebut dari membran basalis dan terjadi kematian oosit (Junquiera & Carneiro 1998).

Dari hasil pengamatan struktur ovarium diketahui bahwa sel-sel granulosa pada folikel primer dan sekunder yang mengalami atresi tersusun kurang kompak, dan terjadi degenerasi oosit (Gambar 2). Perkembangan folikel membutuhkan interaksi antar sel granulosa maupun dengan sel germinal yang melibatkan jalur endokrin, autokrin, parakrin dan gap junction. Dengan demikian hubungan dua arah antara oosit dan sel-sel granulosa sangat penting untuk dapat terjadinya proses perkembangan folikel.

Menurut Colton *et al.* (2003) berkurangnya komunikasi antar sel granulosa menyebabkan perubahan komunikasi parakrin antara oosit dan sel granulosa. Selain itu, sel sel folikel memerlukan supply nutrisi melalui gap junction untuk perkembangan oosit. Gap junction merupakan daerah khusus pada membran sel-sel yang berdekatan yang memungkinkan terjadinya komunikasi antar sel tersebut (Granot & Dekel, 1998). Gap junction berperan penting dalam perkembangan sel-sel granulosa, diferensiasi dan luteinisasi (Kidder & Mahwi 2002 dalam Krysko *et al.*, 2004). Pada perkembangan folikel, komunikasi tersebut juga diperlukan untuk mengontrol keadaan meiosis pada oosit. Jenis-jenis protein gap junction dikenal sebagai connexin. Sel granulosa diketahui mengekspresikan connexin-43 sedangkan pada oosit berupa connexin-37 (Granot & Dekel 1998)

Berdasarkan penelitian Chang *et al.* (2005), kondisi hiperglikemia menyebabkan menurunnya ekspresi protein connexin-43 yang mempengaruhi komunikasi interseluler pada sel-sel granulosa dan meningkatkan terjadinya apoptosis pada sel-sel granulosa tersebut. Hal ini serupa dengan penelitian Colton *et al.*

(2003) yang menunjukkan bahwa kondisi kadar glukosa yang tinggi secara simultan juga meningkatkan terjadinya apoptosis pada sel-sel granulosa.

Berdasarkan pengamatan pada Tabel 2 tampak bahwa kondisi hiperglikemik menyebabkan berkurangnya jumlah korpus luteum dibanding kontrol. Menurut Bearden *et al.* (2004) insulin dapat meningkatkan terjadinya ovulasi. Hal ini ditandai dengan meningkatnya jumlah korpus luteum yang terbentuk. Dengan demikian pada kondisi kadar insulin yang rendah akibat kerusakan sel-sel beta pankreas setelah pemberian STZ terjadi penurunan angka ovulasi, sehingga jumlah korpus luteum semakin sedikit.

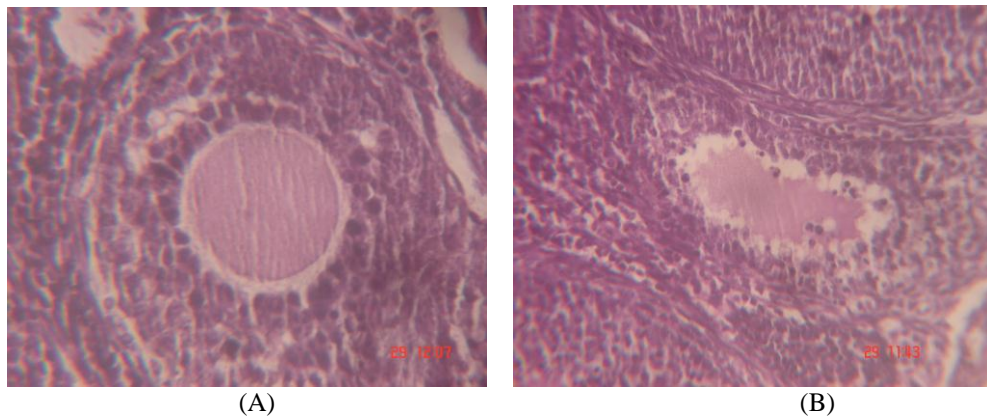
Hasil pengamatan terhadap lama siklus estrus dan tahapan dalam siklus estrus menunjukkan bahwa pada kondisi hiperglikemik terjadi peningkatan lama siklus estrus maupun lama waktu tiap tahap dalam siklus estrus. Hal ini dapat dilihat pada Tabel 3. Berdasarkan data pengamatan pada Tabel 3 tampak bahwa lama siklus estrus pada setiap tahapan estrus cenderung meningkat dan pada tahapan metestrus meningkat secara nyata. Demikian pula lama satu siklus estrus pada kondisi hiperglikemik meningkat secara nyata dibandingkan kontrol. Hal ini disebabkan karena lamanya siklus estrus sejalan dengan perkembangan folikel.

Kondisi hiperglikemik mempengaruhi transport glukosa dalam ovarium dan mempengaruhi fungsi folikel dalam menghasilkan estrogen. Kadar estrogen yang dihasilkan menjadi rendah (Cox *et al.* 1994). Menurut penelitian Jesionowska *et al.* (1990) kadar estrogen berpengaruh terhadap kornifikasi epitel vagina. Pada kadar estrogen rendah terjadi hambatan kornifikasi vagina sehingga tanda-tanda estrus tidak dijumpai.

Tabel 2. Rerata jumlah folikel primer, sekunder dan matang atresi serta rerata jumlah korpus luteum mencit pada keadaan hiperglikemik.

Perlakuan	Rata-rata jumlah ($\bar{x} \pm sd$)			
	Folikel primer atresi	Folikel sekunder atresi	Folikel matang atresi	Korpus luteum
Kontrol awal	$0,88 \pm 0,16^a$	$1,00 \pm 0,54^a$	$0,62 \pm 0,31^a$	$3,46 \pm 0,55^a$
Streptozotocin	$1,68 \pm 0,25^b$	$3,00 \pm 0,66^b$	$3,88 \pm 0,60^b$	$2,00 \pm 0,66^b$

Ket: angka yang berbeda pada kolom yang sama menunjukkan beda nyata menurut uji BNT 5%



Gambar 2. Sayatan histologi ovarium mencit : folikel sekunder normal (A) dan folikel sekunder mengalami atresia (B).

Tabel 3. Lama siklus estrus dan masing-masing fase estrus pada mencit hiperglikemik.

Perlakuan	Lama siklus (hari)				
	proestrus	estrus	metestrus	diestrus	Satu siklus estrus
Kontrol	2,20 ±0,45 ^a	2,40 ±0,99 ^a	2,40 ±0,55 ^a	2,80 ±0,84 ^a	4,90 ±0,42 ^a
STZ	2,40 ±0,55 ^a	3,40 ±0,89 ^a	4,60 ±1,14 ^b	2,40 ±0,55 ^a	6,40 ±0,42 ^b

Ket: angka yang berbeda pada kolom yang sama menunjukkan beda nyata menurut uji BNT 5%.

Kondisi hiperglikemik juga menurunkan sensitivitas aksis hipotalamus-hipofisis-ovarium terhadap perubahan kadar hormon steroid dalam darah. Selain kadar estrogen yang rendah, kondisi hiperglikemik juga mengakibatkan menurunnya kadar LH sehingga proses ovulasi menjadi terhambat (Cox *et al.* 1994). Berkurangnya kadar hormon steroid yang dihasilkan oleh ovarium tersebut diduga berpengaruh terhadap lama siklus estrus.

KESIMPULAN

Berdasarkan hasil penelitian maka dapat disimpulkan bahwa perlakuan dengan senyawa streptozotocin (STZ) dengan dosis 55 mg/kg BB dapat menyebabkan kondisi hiperglikemik pada mencit. Kondisi hiperglikemik tersebut mengakibatkan meningkatnya jumlah folikel yang mengalami atresi, menurunkan jumlah korpus luteum serta memperpanjang siklus estrus pada mencit.

Ucapan Terima Kasih

Ucapan terima kasih disampaikan pada Dirjen Pendidikan Tinggi Departemen Pendidikan Nasional yang telah membiayai penelitian ini sesuai dengan surat perjanjian pelaksanaan penelitian dosen muda Nomor:

022/SP3/PP/DP2M/II/2006 tanggal 1 Pebruari 2006.

DAFTAR PUSTAKA

Bajpai RN. 1989. *Histologi Dasar*. Edisi 4. Jakarta. PT Binarupa Aksara.

Bearden HJ. John WF. & Scott TW. 2004. *Applied Animal Reproduction*. Sixth Edition. New Jersey: Pearson Prentice Hall.

Bivens CLM. & Olster HO. 1997. Abnormal Estrous Cyclicity and Behavioral Hyporesponsiveness to Ovarian Hormones in Genetically Obese Zucker Female Rats. *Endocrinology* **138** (1): 143-148

Chang AS. Dale AN. & Moley KH. 2005. Maternal Diabetes Adversely Affects Preovulatory Oocyte Maturation, Development and Granulosa Cell Apoptosis. *Endocrinology* **146**(5): 2445-2453.

Colton SA. Humpherson PG. Leese HJ. & Downs SM. 2003. Physiological Changes in Oocyte-cumulus Cell Complexes from Diabetic Mice that Potentially Influence Meiotic Regulation. *Biology of Reproduction* **69**:761-770.

Cox NM. Meurer KA. Carlton CA. Tubbs RC & Mannis DP. 1994. Effect of Diabetes Mellitus during the Luteal Phase of Oestrous Cycle on Preovulatory Follicular Function, Ovulation and Gonadotrophins in Gilts. *Journal of Reproduction and Fertility* **101**:77-86

Garris DR. Williams SK. Smith-West C. & West L. 1984. Diabetes-Associated Endometrial Disruption in The Chinese Hamster: Structure

- Changes in Relation to Progressive Hyperglycemia. *Experimental Biology and Medicine* **17**(6): 293-300.
- Garris DR & Garris BL. 2003. Diabetes-induced. Progressive Endometrial Involution Characterization of Periluminal Epithelial Lipoanathrophy. *Experimental Biology and Medicine* **52**(1):51-58.
- Gaspersz V. 1994. *Metode Perancangan Percobaan Untuk Ilmu-ilmu Pertanian, Ilmu-ilmu Teknik, Biologi*. Bandung: Armico.
- Granot I. & Dekel N. 1998. Cell-to-Cell Communication in The Ovarian Follicle: Development and Hormonal Regulation of The Expression of Connexin 43. *Human Reproduction* **13** Suppl:4. European Society for Human Reproduction and Embryology.
- Handari SS. 1983. *Metode Pewarnaan*. Jakarta: Bhatara Karya Aksara.
- Jesionowska H. Karelus K. & Nelson JF. 1990. Effects of Chronic Exposure to Estradiol on Ovarian Cyclicity in C57BL/6J Mice: Potention at Low Doses and Only Partial Suppression at High Doses. *Biology of Reproduction* **43**:312-317.
- Johnson M. 1998. *Diabetes; Terapi dan Pencegahannya*. Jawa Barat: Indonesia Publishing House Anggota IKAPI.
- Junqueira LC. & Carneiro J. 1998. *Histologi Dasar*. Edisi 3. Terjemahan Adji Dharna dari *Basic Histology*. Jakarta: Penerbit Buku Kedokteran EGC.
- Krysko DV. Mussche S. Leybaert L. & D'Herde K. 2004. Gap junctional Communication and Connexin43 Expression in Relation to Apoptotic Cell Death and Survival of Granulosa Cells. *Journal of Histochemistry and Cytochemistry* **52**(90):1199-1207.
- Diabetes Mellitus*. Solo, 19 Maret 2005. Solo: Panitia Pelantikan Dokter Periode 151 Fakultas Kedokteran Universitas Sebelas Maret.
- Ling Li. 2001. *Streptozotocin*. The University of Iowa City. <http://www.medicine.uiowa.edu/frfb/education/>, diakses pada tanggal 6 oktober 2004.
- Lumbantobing SM. 2003. *Stroke Bencana Peredaran Darah di Otak*. Jakarta: Balai penerbit Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia.
- Malole MBM & CSU Pramono. 1989. *Penggunaan Hewan-Hewan Percobaan Di Laboratorium*. Bogor: Institut Pertanian Bogor.
- Nurdiana PN. Setyawati & Ali M. 1998. Efek Streptozotocin Sebagai Bahan Diabetogenik Pada Tikus Wistar Dengan Cara Pemberian Intraperitoneal Dan Intravena. *Majalah Kedokteran Unibraw* **XIV** (2): 66-73.
- Ranakusuma AB. 1997. *Koma Hiperosmolar Hiperglikemik Non Ketotik*. Buku Ajar Ilmu Penyakit Dalam Jilid I. Edisi 3. Jakarta: Balai Penerbit Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia.
- Rossini AA. Like AA. Chick WL. Appel MC. & Cahili AFJr. 1977. Studies of Streptozotocin-induced Insulitis and Diabetes. *Proc.Natl.Acad.Sci.USA*. **74**(6):2485-2489.
- Second Annual Report on Carcinogens. 2004. *Streptozotocin*. www.medicine.uiowa.edu/frfb/education/, diakses pada tanggal 6 oktober 2004.
- Soeharto I. 2001. *Pencegahan dan Penyembuhan Penyakit Jantung Koroner Panduan Bagi Masyarakat Umum*. Jakarta: Penerbit PT Gramedia Pustaka Utama.
- Utami P. 2003. *Tanaman Obat untuk Mengatasi Diabetes Melitus*. Jakarta: Agromedia Pustaka.
- Wikipedia 2005. *Gula Darah*. <http://wikipedia.org/Gula-darah> [20 Desember 2005].

Kurniawan AA. 2005. Diabetes Mellitus. *Prosiding Symposium An Update The Management of*