

The Sperm Quality of Diabetic Rat (*Rattus norvegicus*) After Treated with Bitter Melon (*Momordica charantia L.*) Extract

Elsa Suarni¹, Dasrul^{2*}, Triva Murtina³, Azhar³, Rinidar⁴, Ismail⁵

¹Program Studi Pendidikan Dokter Hewan Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Syiah Kuala, Banda Aceh

²Laboratorium Reproduksi Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Syiah Kuala, Banda Aceh

³Laboratorium Fisiologi Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Syiah Kuala, Banda Aceh

⁴Laboratorium Farmakologi Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Syiah Kuala, Banda Aceh

⁵Laboratorium Kesmavet Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Syiah Kuala, Banda Aceh

*Corresponding author: dasrul_fkh@unsyiah.ac.id

ABSTRACT

The purpose of this study was to determine the sperm quality of diabetic rat (*Rattus norvegicus*) after treated with bitter melon (*Momordica charantia L.*) extracts. This study followed direct complete randomized design using 15 male rats (*Rattus norvegicus*) Wistar's strain which divided into 3 groups. group I (K1) as a control, group II (K2) was diabetic rat which induced 120mg / kg bw alloxan intraperitoneally, and group III (K3) was diabetic rat which treated with 100mg / kg bw extract of bitter melon. Examination of sperm count, motility, and sperm abnormality was checked at day 48. Data sperm count, motility, and sperm abnormalities was analyzed using ANOVA and Duncan multiple test. The results showed that administration of bitter melon extract dose 100 mg / kg bw for 48 days can improve count and motility spermatozoa ($P < 0,05$) and decrease abnormalities of spermatozoa ($P < 0,05$). Bitter melon fruit extract dose 100 mg / kg bw can prevent decrease sperm quality of diabetic rats.

Keywords: Bitter melon extract, rat, diabetes, sperm quality

PENDAHULUAN

Sejalan dengan perubahan gaya hidup pada masyarakat saat ini, terjadi juga perubahan pola penyakit yang lebih cenderung kearah penyakit metabolik seperti diabetes mellitus (DM). Diabetes mellitus merupakan penyakit metabolik kronis tidak menular, dengan karakteristik peningkatan kadar glukosa darah (hiperglikemia) yang disebabkan karena kelainan sekresi insulin, kerja insulin atau keduanya yang tidak dapat disembuhkan tetapi dapat dikendalikan (Pebrianti, 2014). Indonesia, dengan jumlah penduduk saat ini melebihi 200 juta jiwa, sejak awal abad ini telah menjadi negara dengan jumlah penderita diabetes mellitus terbanyak ke-4 di dunia, setelah Amerika Serikat, India dan China (Kustarini dkk., 2012).

Diabetes mellitus diketahui sebagai penyebab berbagai masalah medis, psikologis dan seksual (Enzlin dkk., 2003) yang selanjutnya dapat menyebabkan

infertilitas (George dkk., 2014). Menurut *America Diabetes Association Annual Meeting* (1999) infertilitas pada pria sering ditemukan sebagai komplikasi DM lanjut dapat berupa penurunan libido dan penurunan kualitas spermatozoa (Arikawe dkk., 2006). Pada penelitian lain ditemukan bahwa DM dapat menyebabkan penurunan produksi testosteron oleh testis secara bermakna dibandingkan dengan tikus yang tidak mengalami DM (Sukawan, 2002). Diabetes mellitus juga dilaporkan dapat menyebabkan gangguan fungsi jalur hipofisa-pituitari-gonad, regulasi hormon testosteron yang disertai gangguan proses spermatogenesis, perubahan morfologi spermatozoa, (Umoh dkk., 2010) dan penurunan jumlah sel-sel spermatogenik dan sel Leydig (Abbasi dkk., 2013).

Faktor utama pemicu terjadinya infertilitas dan penurunan kualitas spermatozoa pada penderita DM adalah akibat peningkatan produksi senyawa oksigen reaktif (*reactive oxygen*

spesies/ROS) dalam tubuh. Peningkatan ROS yang melebihi kapasitas enzim antioksidan dalam tubuh untuk menetralsirnya dikenal dengan istilah stress oksidatif (Yuliani, 2014) yang selanjutnya menyebabkan terjadinya reaksi peroksidasi pada lipid, protein, dan DNA membran sel-sel tubuh termasuk didalamnya sel-sel interstitial testis dan spermatozoa (Agarwal, 2008). Upaya untuk menghindari hal tersebut dapat dilakukan dengan cara suplai antioksidan seperti senyawa flavonoid, karatinoid, vitamin C, dan vitamin E dari luar tubuh yang dapat ditemukan pada sayuran dan buah-buahan (Hadi, 2013).

Buah pare (*Momordica charantia* Linn) merupakan salah satu buah-buahan yang diketahui mengandung bahan yang bersifat antioksidan seperti polifenol, flavonoid, alkaloid, saponin dan tannin (Abarshi dkk., 2014). Selain itu buah pare juga mengandung charantin dan *polypeptide-P insulin* (polipeptida yang mirip insulin) komponen yang menyerupai *sulfonylurea* (Kumar, 2013). Hasil penelitian Nadesul (2002), membuktikan bahwa buah pare banyak digunakan untuk menyembuhkan penyakit kencing manis (diabetes mellitus), malaria, sariawan, batuk, cacingan, disentri, bisul, dan bronkitis. Mekanisme kerja buah pare dalam menurunkan glukosa darah pada hewan percobaan dengan cara mencegah penyerapan glukosa pada usus. Hasil penelitian Yuda dkk. (2013), membuktikan pemberian ekstrak buah pare pada dosis 50-100 mg/kg BB dapat menurunkan kadar glukosa darah sebanding dengan glibenklamid.

Oleh karena itu, penelitian tentang manfaat kandungan ekstrak buah pare perlu terus dilakukan. Penelitian ini akan difokuskan untuk menguji pengaruh ekstrak buah pare terhadap kualitas spermatozoa pada tikus yang mengalami diabetes mellitus.

MATERI DAN METODE

Alat dan Bahan Penelitian

Alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah : timbangan elektrik, blender, *rotary evaporator*, erlenmeyer, sonde oral, glukometer, seperangkat alat bedah dan papan bedah, *Haemocytometer*, *object glass* dan *cover glass*, gunting, baki, sarung tangan, kapas, pinset anatomis, pinset surgis, kamera digital, pipet tetes, gelas ukur, kertas tissue, inkubator, mikroskop cahaya, dan kandang tikus serta peralatan makan.

Bahan biologis yang digunakan dalam penelitian ini adalah buah pare hijau (*Momordica charantia* L) yang diperoleh dari pasar Lambaro, Aceh Besar. Tikus putih (*Rattus norvegicus*) strain Wistar jantan yang berusia 3-4 bulan dengan berat badan berkisar antara 150-200 gram, yang diperoleh dari Universitas Sumatra Utara, Medan digunakan sebagai hewan coba. Bahan kimia terdiri dari larutan etanol, aloskan, akuades, NaCl fisiologis, dan Eosin

Metode Penelitian

Penelitian ini merupakan penelitian *experimental laboratorik* jenis *Posttest Only Control Group Design*, dengan menggunakan rancangan acak lengkap (RAL) pola satu arah dengan tiga kelompok perlakuan. Masing-masing perlakuan terdiri dari 5 ekor. Adapun masing-masing kelompok perlakuan sebagai berikut: Kelompok 1 (K1) yaitu tikus yang hanya diberi akuades 1 ml selama 48 hari. Kelompok 2 (K2) yaitu tikus yang diinjeksi aloskan, kemudian diberi akuades 1 ml selama 48 hari. Kelompok 3 (K3) yaitu tikus yang diinjeksi aloskan, kemudian diberi ekstrak etanol buah pare dosis 100 mg/kg bb selama 48 hari.

Proses Ekstrak Buah Pare

Sebanyak 6 kg buah pare hijau segar yang diperoleh dari pasar Lambaro, Aceh Besar, dicuci dengan air bersih. Kemudian dibelah dan dibuang bijinya, setelah itu di potong kecil-kecil, dikeringanginkan selama seminggu, kemudian dimasukkan ke dalam inkubator dengan suhu 60°C selama 4 jam agar didapatkan berat kering yang konstan. Setelah itu dihaluskan dengan blender hingga didapatkan serbuk buah dengan kehalusan yang diinginkan. Sebanyak 350 g serbuk buah pare yang didapatkan kemudian dimaserasi dengan menggunakan pelarut etanol 96% selama 3x24 jam sampai diperoleh maserat yang jernih, selanjutnya dievaporasi dengan menggunakan *rotary evaporator* sampai diperoleh ekstrak kental.

Penentuan Dosis Ekstrak Buah Pare

Berdasarkan hasil penelitian Yuda dkk. (2013) dosis terbaik ekstrak buah pare untuk menurunkan kadar glukosa darah adalah 100 mg/kg bb /hari. Oleh karena itu pada penelitian ini dosis yang digunakan adalah 100mg/kg bb /hari.

Adaptasi Hewan Coba

Pada tahap adaptasi semua tikus putih diberi pakan standar secara *ad libitum* dan dibiarkan selama seminggu untuk proses aklimasi hewan percobaan. Selama proses aklimasi, berat badan dan aktivitas hewan coba terus diperhatikan.

Perlakuan Hewan Coba

Pada akhir masa adaptasi masing-masing tikus ditimbang agar diketahui beratnya untuk kesesuaian dengan kriteria inklusi yang telah ditetapkan. Kemudian tikus-tikus tersebut dibagi secara acak ke dalam 3 kelompok perlakuan. Kelompok 2 dan 3 diberi aloksan dengan dosis tunggal 120 mg/kg bb secara intraperitoneal. Pada hari ke 8 semua tikus diambil darahnya untuk pengujian kadar glukosa darah. Selanjutnya kelompok 1 dan 2 diberi

akuades 1 ml/hari sedangkan untuk kelompok 3 tikus diberi ekstrak buah pare dosis 100 mg/kg bb setiap hari selama 48 hari. Pada hari berikutnya kadar glukosa darah tikus kembali diperiksa.

Pengukuran Kadar Glukosa Darah

Pengukuran glukosa darah menggunakan Glukometer (*EZ Smart*). Darah diambil dengan menusuk ekor tikus dengan kanul sampai keluar darah, dengan menyentuhkan setetes darah pada strip, reaksi dari wadah strip akan otomatis menyerap darah ke dalam strip melalui aksi kapiler. Ketika wadah terisi penuh oleh darah, alat akan mulai mengukur kadar glukosa darah, hasil pengukuran dibaca selama 9 detik setelah darah masuk ke dalam strip (Yuda dkk., 2013).

Pemeriksaan Kualitas Spermatozoa

Setelah perlakuan selama 48 hari, semua tikus dibunuh. Untuk mendapatkan organ reproduksi tikus, tikus diletakkan pada nampan dengan posisi ventral dan dilakukan pembedahan. Kemudian organ testis beserta epididimis sebelah kanan atau kiri diambil dan diletakkan ke dalam cawan petri yang berisi NaCl 0,9 %. Kauda epididimis dipisahkan dengan cara memotong bagian proksimal korpus epididimis dan bagian distal vas deferens. Selanjutnya kauda epididimis dimasukkan ke dalam cawan Petri yang berisi 1 ml NaCl 0,9 % hangat (37°C), kemudian bagian proksimal kauda dipotong sedikit dengan gunting lalu kauda ditekan dengan perlahan hingga sekresi/cairan epididimis keluar yang selanjutnya dipakai untuk pemeriksaan jumlah, motilitas dan abnormalitas spermatozoa.

Penghitungan Jumlah Spermatozoa

Spermatozoa yang telah diambil dari epididimis tikus disedot menggunakan pipet eritrosit sampai batas 0,5. Kemudian,

dengan pipet yang sama, disedot NaCl 3% sampai batas 101. Pipet dikocok perlahan agar campuran spermatozoa dan NaCl menjadi homogen. Kemudian, campuran dibuang tiga tetes dan ditetaskan ke dalam kamar hitung *Neubauer* selanjutnya ditutup dengan *cover glass*. Diamati dan hitung jumlah spermatozoa yang ada di bawah mikroskop cahaya perbesaran 400x dengan menggunakan rumus $N \times 10^7$ spermatozoa/ml.

Motilitas Spermatozoa

Pemeriksaan terhadap motilitas spermatozoa dilakukan dengan jalan menempelkan satu tetes semes diatas *object glass*, lalu ditutup dengan *cover glass*. Motilitas spermatozoa ditentukan menurut kriteria Toelihere (1981), yakni: 0= tidak ada gerakan maju, 1=jelek, <30% yang bergerak maju, 2=cukup, 30-50% yang bergerak maju, 3=baik, 50-75% yang bergerak maju, 4=baik sekali, 75-80% yang bergerak maju, 5=sempurna, > 80% yang bergerak maju.

Abnormalitas Spermatozoa

Semen segar yang diambil dari epididimis tikus kemudian ditetaskan di atas

object glass. Selanjutnya dilakukan pewarnaan dengan meneteskan pewarna Eosin. Setelah itu dismeear menggunakan *cover glass* dengan kemiringan 45°. Selanjutnya preparat diamati di bawah mikroskop cahaya dengan perbesaran 400x dan dilanjutkan dengan pengamatan jumlah spermatozoa abnormal dan menghitung presentase (%) jumlah spermatozoa abnormal tersebut.

Analisis Data

Data yang diperoleh dari hasil pengamatan terhadap jumlah, persentase motilitas dan abnormalitas spermatozoa dianalisis dengan menggunakan *analisis of variance* (ANOVA) satu arah. Untuk mengetahui perbandingan efek antar perlakuan maka dilakukan analisis lanjutan dengan uji berganda Duncan (Steel dan Torrie, 1990).

HASIL DAN PEMBAHASAN

Rata-rata ($\pm$ SD) jumlah, persentase motilitas dan abnormalitas spermatozoa tikus putih strain Wistar pada berbagai kelompok perlakuan dapat dilihat pada Tabel 1.

Tabel 1. Rata-rata ($\pm$ SD) kualitas spermatozoa tikus putih strain Wistar diabetes mellitus yang diberi ekstrak buah pare selama 48 hari

Kelompok perlakuan	Kualitas spermatozoa		
	Jumlah ($\times 10^7$ /ml)	Motilitas (%)	Abnormalitas (%)
K1	214,60 $\pm$ 53,79 ^a	80,00 $\pm$ 4,08 ^a	5,68 $\pm$ 2,42 ^a
K2	121,20 $\pm$ 51,77 ^b	56,25 $\pm$ 7,50 ^b	12,61 $\pm$ 6,33 ^b
K3	209,60 $\pm$ 44,30 ^a	78,25 $\pm$ 3,56 ^a	5,88 $\pm$ 0,89 ^a

Keterangan: Superskrip huruf yang berbeda pada kolom yang sama menunjukkan perbedaan yang nyata ($P < 0.05$).

Berdasarkan hasil analisis of variance (ANOVA) satu arah terhadap jumlah, persentase motilitas dan abnormalitas spermatozoa menunjukkan terdapat perbedaan nyata antar kelompok perlakuan ($P < 0,05$). Hasil ini menunjukkan bahwa pemberian ekstrak buah pare dosis 100 mg/kgbb selama 48 hari berpengaruh secara nyata ($P < 0,05$) terhadap jumlah, persentase motilitas dan abnormalitas spermatozoa tikus putih strain Wistar yang diinduksi aloksan. Uji berganda Duncan terhadap jumlah, persentase motilitas dan abnormalitas spermatozoa pada perlakuan K2 berbeda secara nyata ($p < 0,05$) dibandingkan dengan perlakuan K1 dan K3. Sedangkan jumlah, persentase motilitas dan abnormalitas spermatozoa pada perlakuan K1 tidak berbeda secara nyata ($p > 0,05$) dibandingkan dengan K3.

Terjadinya penurunan jumlah dan persentase motilitas serta peningkatan persentase abnormalitas disebabkan oleh induksi aloksan dengan dosis 120 mg/kg bb dengan dosis tunggal dapat menyebabkan kondisi hiperglikemia. Pada kondisi hiperglikemia persisten, dapat menyebabkan overproduksi radikal bebas melalui aktivasi poliol dan glukosa pentosa pathway, autooksidasi glukosa dan peroksidasi lipid (Baynes dan Thorpe 1999). Radikal bebas menyebabkan modifikasi lipid, protein, dan asam nukleat (Gutierrez dkk., 2006).

Testis dan sel spermatozoa rentan terhadap kerusakan akibat radikal bebas karena tingginya asam lemak tak jenuh (PUFA). Paparan radikal bebas pada penderita diabetes dapat merusak sperma melalui peroksidasi lipid dan oksidasi protein. Kerusakan oksidatif memulai penghancuran membran plasma sperma, apoptosis dan kematian sel germinal (Gobbo dkk., 2012). Selain itu, pada penderita diabetes melitus terjadi penurunan kadar testosteron yang signifikan disertai penurunan LH dan FSH, sehingga

mengganggu proses spermatogenesis, sehingga menyebabkan berkurangnya jumlah spermatozoa (Idris dkk., 2012).

Mitokondria adalah sumber dan target radikal bebas (Gutierrez dkk., 2006). Rusaknya mitokondria spermatozoa akan mempengaruhi proses *phosphorilasi oksidatif* sehingga produksi ATP sebagai sumber energi spermatozoa menjadi menurun dan menyebabkan gangguan motilitas spermatozoa (Giri, 2008).

Meningkatnya abnormalitas spermatozoa disebabkan karena berbagai macam gangguan dalam proses spermatogenesis terutama pada tahap spermiogenesis. Gangguan ini bisa disebabkan akibat hormonal, radikal bebas dan bahan kimia (Yatim, 1994). Pada penderita DM terjadi penurunan kadar testosteron (Rachmadi, 2008) yang dapat menyebabkan proses spermatogenesis tidak berjalan optimal, dan pada akhirnya menurunkan kualitas spermatozoa, termasuk morfologi spermatozoa (Matsumoto, 2001). Hal tersebut diperparah dengan kurangnya mekanisme transkripsi dan tingginya kondensi DNA dalam sperma, di mana radikal bebas menyebabkan *genotoxicity* melalui denaturasi DNA dan fragmentasi dengan perbaikan DNA yang terbatas. Kerusakan material genetik di spermatogonium dan spermatosit berhubungan dengan meningkatnya abnormalitas spermatozoa (Hadi, 2013).

Pada kelompok perlakuan tikus DM dan diterapi dengan 100mg/kg bb ekstrak buah pare (K3), terjadi peningkatan jumlah dan persentase motilitas serta penurunan persentase spermatozoa abnormal. Hal ini disebabkan karena efek charantin dan polipeptida-p yang terdapat dalam buah pare dapat menurunkan kadar glukosa darah, dengan demikian maka tidak terjadi lagi overproduksi radikal bebas, dan hipofisis akan kembali peka terhadap rangsangan gonadotropin dari hipotalamus sehingga

mampu merangsang testis untuk memproduksi testosteron yang mencukupi kebutuhan.

Antioksidan yang terdapat dalam buah pare seperti polifenol, alkaloid, flavonoid, saponin dan tanin diduga dapat memperbaiki kualitas spermatozoa tikus DM melalui beberapa mekanisme diantaranya bekerja dalam meredam radikal bebas akibat hiperglikemia dan melindungi sel dan organ dari radikal bebas. Selain itu Kao dkk. (1998), mengatakan bahwa, flavonoid dapat menghambat enzim aromatase. Dengan dihambatnya enzim tersebut yaitu yang berfungsi mengkatalis konversi androgen menjadi estrogen, maka jumlah androgen (testosteron) akan meningkat.

Disamping agen hipoglikemik dan antioksidan yang terdapat dalam buah pare, kandungan asam lemak tidak jenuh seperti asam linoleat dari buah pare, dapat menstimulasi aktivitas enzim 17β -hydroxysteroid dehidrogenase, sebagai prekursor pembentuk testosteron (Hamman, 2008). Hormon testosteron sangat diperlukan untuk mengawali dan mempertahankan proses spermatogenesis, serta mempertahankan kualitas spermatozoa hingga keluar dari tubuh (Sinaga, 2002).

KESIMPULAN

Pemberian ekstrak buah pare (*Momordica charantia* L.) selama 48 hari dengan dosis 100mg/ kg bb dapat mencegah penurunan kualitas spermatozoa tikus DM yang diinduksi aloksan.

DAFTAR PUSTAKA

Abarshi, M.M., S. B. Mada, A. Garba, and H. A. Mohammed. 2014. Protective effect of momordica charantia extract on lead-induced male reproductive toxicity in rats. **World Journal of Pharmaceutical Research**. 3(10): 97-109.

Abbasi, Z., S.R.F. Tabatabaei, Y. Mazaheri, F. Barati, and H. Morovvati. 2013. Effects of sesame oil on the reproductive parameters of diabetes mellitus-

induced male rats. **World J. Mens Health**. 31(2): 141-149.

Agarwal, A., M. Cocuzza, H. Abdelrazik, and R. Sharma. 2008. **Oxidative Stress Measurement in Patients With Male or Female Factor Infertility. Handbook of Chemiluminescent Methods in Oxidative Stress Assessment**. Transworld Research Network. India.

America Diabetes Association Annual Meeting. 1999. Diabetes Care <http://www.higbeam.com/library/docfree.asp>. 3 Oktober 2015.

Arikawe, A.P., A.O. Daramold, A.O. Odofin, and L.F.O. Obika. 2006. Alloxan-induced and insulin-resistant diabetes mellitus affect semen parameters and impair spermatogenesis in male rats. **African Journal of Reproductive Health**. 10(3) : 107-113.

Baynes, J.W. and S.R. Thorpe. 1999. Role of oxidative stress in diabetic complications. **Diabetes**. 48:1-9.

Enzlin, P., C. Mathieu, V.A. Bruel, and D. Vanderschueren, and K. Demyttenaere. 2003. Prevalence and Predictors of Sexual Dysfunction in Patients with Type 1 Diabetes. <http://www.care.diabetesjournals.org/cgi/content/full/26/2/409>. 1 Agustus 2015.

George, G.S., E. Opuene, and E.A. Onuoha. 2014. Male hyperglycemic-induced infertility: an integration of some biochemical factors. **British Journal of Marketing Studies**. 2(8) : 45-51.

Giri L.N. 2008. Potensi Antioksidan Daun Salam Kajian *in vivo* pada Tikus Hiperkolesterolemia dan Hiperglikemia. **Skripsi**. Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Institut Pertanian Bogor. Bogor.

Gobbo, M.G., D.L. Ribeiro, S.R. Taboga, E.A. de Almeida, and R.M. Góes. 2012. Oxidative stress markers and apoptosis in the prostate of diabetic rats and the influence of vitamin C treatment. **J. Cell Biochem**. 113(7) :2223-2233.

Gutierrez, J., S.W. Ballinger, V.M.D. Usmar, and A.Landar. 2006. Free radicals, mitochondria, and oxidized lipids.the emerging role in signal transduction in vascular cells. **Circ. Res**. 99:924-932.

Hadi, M.A., H.K. Zaidan, T.M. Natah, and A.H. Al-Saadi.. 2013. Protective effect of plants extracts mixture on sperm abnormalities, testicular and epididymal tissues in diabetic male rats. **Journal of Natural Sciences Research**. 3(9): 28-37.

Kao, Y.H., Z. Changbao, S. Mark, C.A. Laughton, and S. Chen. 1998. Molecular basis of the inhibition of human aromatase (estrogen synthetase) by flavone and isoflavone phytoestrogens: a site-directed mutagenesis study. **Environ. Health Perspect**. 106(2):85-92.

Kumar, A. 2013. Review: Antidiabetic effects of *Momordica charantia* (bitter melon) and its medicinal potency. **Asian Pacific Journal Tropical Disease**. 3(2): 93-102.

Kustarini, I., S. Dewi, dan I. Pawitra. 2012. Efek ekstrak etanol *Morinda citrifolia* L (mengkudu) terhadap kadar gula darah, jumlah neutrofil, dan fibronektin

- glomerulus tikus diabetes mellitus. **Media Medika Indonesiana**. 46(3):178-180.
- Kusuma, R. 2008. Pengaruh pemberian Ekstrak Buah Pare (*Momordica charantia* L) terhadap Kualitas Spermatozoa Tikus Jantan Strain Wistar. **Tesis**. Program Pascasarjana, Universitas Andalas, Padang.
- Matsumoto, A.M. 2001. The testis. In: Felig, P., L.A. Frohman, editors. **Endocrinology and Metabolism**, 4th ed. The McGraw-Hill Companies Inc. USA.
- Nadesul, H. 2002. Melawan Wabah Diabetes Dunia dengan Buah Pare. <http://www.gizi.net/cgibin/berita/fullnews.cgi?newsid1025597117,76900>. 1 Oktober 2015.
- Pebrianti, D.K. 2014. Hubungan Antara Dukungan Keluarga Dengan Kadar Gula Darah Pasien Diabetes Melitus Tipe 2 Di Puskesmas II Denpasar Barat. **Skripsi**. Fakultas Kedokteran Universitas Udayana Denpasar.
- Rachmadi, A. 2008. Kadar Gula Darah Dan Kadar Hormon Testosteron Pada Pria Penderita Diabetes Mellitus Hubungannya Dengan Disfungsi Seksual Dan Perbedaannya Dengan Yang Tidak Mengalami Disfungsi Seksual. **Tesis**. Program Pascasarjana, Universitas Diponegoro, Semarang.
- Sinaga, E.S. 2012. Pengaruh Isoflavon Kedelai Terhadap Jumlah Kecepatan Dan Morfologi Spermatozoa Tikus Putih Jantan (*Rattus Norvegicus*). **Tesis**. Fakultas Kedokteran Universitas Andalas, Padang.
- Steel, R.G.D. dan J. Torie. 1990. **Prinsip dan Prosedur Statistika Suatu Pendekatan Biometrik**. Alih Bahasa Bambang Sumantri, Gramedia Pustaka Utama. Jakarta.
- Sukawan, U.Y. 2002. Gangguan Seksual pada Pria Penderita Diabetes Mellitus. dalam : Pertemuan Ilmiah tahunan XIV Perkumpulan Andrologi Indonesia dan Kongres Nasional I Asosiasi Sexolog Indonesia. **Buku Acara dan Kumpulan Abstrak**.
- Toelihere, M.R. 1981. **Inseminasi Buatan Pada Ternak**. Angkasa. Bandung.
- Umoh, U., C.M.A. Davies, and J. Adeleye. 2010. Serum testosterone and lipids in relation to sexual dysfunction in males with metabolic syndrome and type 2 diabetes mellitus. **International Journal of Medicine and Medical Sciences**. 2(12) : 402-412.
- Yatim, W. 1994. **Reproduksi dan Embriologi**. Bandung , Tarsito.
- Yuda, I.K.A., M.S. Anthara, dan A.A.G.O. Dharmayudha. 2013. Identifikasi golongan senyawa kimia ekstrak etanol buah pare (*Momordica charantia*) dan pengaruhnya terhadap penurunan kadar glukosa darah tikus putih jantan (*rattus novergicus*) yang diinduksi aloksan. **Buletin Veteriner Udayana**. 5(2): 87-95.
- Yuliani, F., F. Oenzil, dan D. Iryani. 2014. Hubungan berbagai faktor risiko terhadap kejadian penyakit jantung koroner pada penderita diabetes mellitus tipe 2. **Artikel Penelitian**. Fakultas Kedokteran. Universitas Andalas, Padang.