

# PENGEMBANGAN TIKUS MODEL PCOS DENGAN INDUKSI TESTOSTERON PROPIONAT



**PENGEMBANGAN TIKUS  
MODEL PCOS DENGAN  
INDUKSI TESTOSTERON  
PROPIONAT**

# **PENGEMBANGAN TIKUS MODEL PCOS DENGAN INDUKSI TESTOSTERON PROPIONAT**

dr. Alfaina Wahyuni, Sp.OG., M.Kes.

Dr. dr. Ikhlas Muhammad Jenie, M.Med.Sc.



# **PENGEMBANGAN TIKUS MODEL PCOS DENGAN INDUKSI TESTOSTERON PROPIONAT**

***Penulis:***

dr. Alfaina Wahyuni, Sp.OG., M.Kes.

Dr. dr. Ikhlas Muhammad Jenie, M.Med.Sc.

***ISBN:***

978-623-6992-91-3

***Editor:***

Apt. Sri Tasminatun, M.Si.

***Penyelaras Aksara:***

Tim The Journal Publishing

***Pemeriksa Aksara:***

Tim The Journal Publishing

***Desain Sampul:***

Tim The Journal Publishing

***Penerbit:***

CV. The Journal Publishing (Anggota IKAPI)

v+48 Hlm; 14,8 x 21 cm.

Cetakan I, Maret 2022

***Alamat Penerbit:***

Lemahdadi, Bangunjiwo, Kasihan, Bantul Regency, Special Region of Yogyakarta  
55184

*Hak Cipta Dilindungi Undang-Undang.*

*Dilarang Memperbanyak buku ini dalam bentuk dan dengan cara apa pun tanpa izintertulis  
dari penerbit.*

# KATA PENGANTAR

Puji syukur penulis panjatkan kehadirat Allah SWT, karena atas izin dan karunia-Nya penulis dapat menyelesaikan Buku Monograf yang berjudul “PENGEMBANGAN TIKUS MODEL PCOS DENGAN INDUKSI TESTOSTERON PROPIONAT”. Buku Monograf pengembangan tikus model PCOS ini lebih dimaksudkan untuk penelitian sehingga tidak bersifat komersial. Namun demikian buku ini penting bagi peneliti yang tertarik dalam bidang penemuan obat-obat baru PCOS yang memerlukan tikus model PCOS.

Monograf Pengembangan Tikus Model PCOS (Polycystic Ovary Syndrome) ini menjelaskan tentang salah satu cara membuat tikus model PCOS yaitu tikus yang secara anatomi dan fisiologi mirip dengan gambaran penderita PCOS. Berbeda dengan metode yang sudah ada sebelumnya, pada penelitian ini digunakan injeksi testosteron intramuskuler dengan tehnik yang lebih mudah. Pengembangan tikus model PCOS penting untuk penelitian terkait dengan penemuan obat-obat baru yang harus diujikan dulu pada tikus model.

Kritik dan saran konstruktif dari pembaca buku ini sangat kami harapkan demi penyempurnaan, untuk itu kami ucapkan terima kasih.

Yogyakarta, 03 Februari 2022

Penulis

# DAFTAR ISI

Daftar ISI .....	i
BAB I PENDAHULUAN .....	1
BAB II POLIKISTIK OVARIUM SINDROM .....	5
BAB III PEMBUATAN TIKUS MODEL POLIKISTIK OVARIUM SINDROM .....	17
BAB IV METODOLOGI.....	25
Jenis dan Rancangan Penelitian .....	25
Bahan dan Alat Penelitian.....	25
Tatalaksana Penelitian .....	28
BAB V HASIL PENELITIAN DAN ANALISIS.....	36
BAB VI KESIMPULAN .....	43
DAFTAR PUSTAKA .....	44

# BAB I

## PENDAHULUAN

*Polycystic ovary syndrome/* Sindrom Poli Kistik Ovarium (PCOS) adalah kelainan endokrin umum dengan prevalensi global 5-10% dan merupakan penyebab penting anovulasi kronis pada wanita muda. PCOS menjadi penyebab sekitar tiga perempat dari semua kasus infertilitas anovulasi (Kort and Lobo, 2014). Beberapa penelitian melaporkan adanya peningkatan prevalensi akhir akhir ini karena pola makan yang tinggi kalori dan tinggi karbohidrat, jarang olahraga dan kecenderungan peningkatan obesitas yang selanjutnya meningkatkan resistensi insulin (Ding et al., 2017; Khademi et al., 2010).

PCOS ditandai oleh ketidakteraturan menstruasi, tanda-tanda hiperandrogenisme seperti jerawat, rambut tubuh berlebih, kebotakan pola pria dan infertilitas. Selain itu, PCOS terkait dengan banyak masalah kesehatan jangka panjang seperti penyakit kardiovaskular dan diabetes. PCOS memiliki implikasi kesehatan yang luas termasuk

metabolisme yang merugikan (obesitas, diabetes tipe dua, penyakit kardiovaskular), reproduksi (infertilitas, keguguran, kehamilan dan komplikasi neonatal), dan risiko psikologis (kecemasan, depresi dan stres).

Etiologi PCOS tidak dipahami dengan jelas, tetapi ketidakseimbangan lipid, stres oksidatif, resistensi insulin dan genetika adalah beberapa faktor yang berkontribusi (Reddy et al., 2016). Beberapa penelitian telah membuktikan bahwa resistensi insulin dan hiperinsulinemia kompensasi berperan dalam patogenesis Polycystic Ovary Syndrome (PCOS). Wanita dengan PCOS memiliki peningkatan tingkat resistensi insulin dibandingkan dengan kontrol, dengan tingkat absolut resistensi insulin setinggi 65-75% pada wanita dengan berat badan normal dan 95% pada wanita obesitas. Resistensi insulin serta hiperandrogenisme pada wanita dengan PCOS telah terlibat dalam disfungsi sumbu hipotalamus-hipofisis-ovarium, yang menyebabkan anovulasi dan ketidakteraturan menstruasi (Kort and Lobo, 2014). Gangguan kerja insulin pada jaringan target perifer dan hambatan sekresi insulin diduga



berperan dalam mekanisme timbulnya resistensi insulin (Kort and Lobo, 2014). Penelitian tentang patofisiologi dan penatalaksanaan PCOS masih perlu banyak dilakukan termasuk penelitian terkait penemuan obat baru. Banyak penelitian yang harus dilakukan terlebih dahulu pada hewan sebelum diujicobakan pada manusia sehingga diperlukan penelitian terkait pengembangan model hewan percobaan yang representatif khususnya pengembangan model hewan coba dengan tehnik yang sederhana, dengan biaya yang murah dan dalam waktu yang singkat. Banyak penelitian yang telah dilakukan untuk membuat model tikus polikistik ovarium sindrom dengan kelebihan dan kekurangan masing-masing. Di Indonesia sendiri baru ada 1 institusi yang sudah berhasil membuat tikus model PCOS-Resistensi Insulin, namun untuk model PCOS sendiri belum pernah dilakukan (Susanto and Santoso, 2012). Pada penelitian ini digunakan Testosteron propionat injeksi intramuskuler. Bagaimana pengaruh testosteron propionat terhadap jumlah folikel, jumlah corpus luteum, jumlah kista folikuler dan kadar glukosa darah pada Tikus Wistar? Penelitian ini

penting dilakukan untuk mengembangkan model tikus PCOS sebagai penunjang dalam penelitian bahan obat maupun penelitian patofisiologi PCOS menemukan bahan alam yang banyak ditemukan di Indonesia yang berpotensi untuk terapi PCOS. Manfaat dari penelitian ini adalah untuk pengembangan model hewan PCOS.

## **BAB II**

### **POLIKISTIK OVARIUM SINDROM**

Kejadian infertilitas pada pasangan suami istri di Indonesia cukup tinggi. Diperkirakan 15-25% pasangan di Indonesia mengalami infertilitas (Risksedas, 2013). Salah satu penyebab infertilitas wanita adalah gangguan ovulasi. Sekitar 75% penyebab infertilitas anovulasi adalah PCOS (Santosa, 2014).

Polycystic ovary syndrome (PCOS)/ Sindrom Poli Kistik Ovarium (PCOS) adalah kelainan endokrin yang banyak diderita oleh wanita usia reproduksi. Prevalensi di beberapa belahan dunia sangat bervariasi tergantung pada kriteria diagnosis yang digunakan (Tabel 1). Secara global, prevalensi PCOS berkisar antara 5-10% dari populasi perempuan usia subur. (Wolf et al., 2018; McCartney and Marshall, 2016; Copp et al., 2019).

Di Indonesia, penelitian tentang epidemiologi PCOS belum banyak dilakukan sehingga belum ada publikasi angka kejadian PCOS berskala nasional. Dari beberapa

penelitian skala regional dikatakan bahwa angka kejadian PCOS di Indonesia berkisar antara 4-10% wanita usia reproduksi sehat (Baziad, A, 2012; Santosa, 2014), 45,7% diantaranya terjadi pada usia 26-30 tahun (Pangastuti, NP and Sumapradja, K, 2011). Prevalensi ini cenderung meningkat seiring dengan perubahan pola hidup kearah gaya hidup masyarakat dengan diet tinggi kalori namun dengan *sedentary lifestyle* (Santosa, 2014). Hampir 98,2% penduduk tingkat konsumsi buah dan sayur kurang dari 5 porsi sehari, sedangkan 47,7% masyarakat kurang dalam aktifitas olah raga (Riskesdas, 2018). Perubahan gaya hidup ini meningkatkan prevalensi obesitas pada wanita yang pada akhirnya bisa meningkatkan resistensi insulin dan meningkatkan risiko gangguan ovulasi termasuk PCOS. Penelitian Mareta et al (2018) menunjukkan bahwa 92,2% dari 249 pasien PCOS mengalami obesitas. Pada jangka panjang PCOS mengakibatkan infertilitas. Sekitar 61% – 89,6% pasien PCOS mengalami infertilitas. Wanita PCOS mempunyai resiko infertilitas sebesar 8,5 kali lipat

dibandingkan dengan wanita yang tidak PCOS (Mareta et al, 2018).

Tabel 1. Kriteria Diagnosis PCOS (Copp et al., 2019)

<b>National Institutes of Health (1990) (Zawadzki, 1992)</b>	<b>Rotterdam* (2003) (The Rotterdam ESHRE/ASRM PCOS Workshop, 2004)</b>	<b>Androgen Excess and PCOS society (2006) (Azziz et al, 2006)</b>
Need both: - Oligo-ovulation or anovulation - Clinical or biochemical signs of hyperandrogenism And exclusion of other causes	Need two of the following: - Oligo-ovulation or anovulation - Clinical or biochemical signs of hyperandrogenism - Polycystic ovaries on ultrasound And exclusion of other causes	Need: - Clinical or biochemical signs of hyperandrogenism AND one of the following: - Oligo-ovulation or anovulation - Polycystic ovaries on ultrasound And exclusion of other causes

PCOS merupakan penyebab penting anovulasi kronis pada wanita muda (Themes, 2016) dan menjadi penyebab sekitar tiga perempat dari semua kasus infertilitas anovulasi. Wanita PCOS yang berhasil hamil, 50% diantaranya mengalami abortus berulang (Pourali, 2017; Brown and Farquhar, 2016). Beberapa penelitian melaporkan bahwa akhir-akhir ini terjadi peningkatan prevalensi PCOS karena meningkatnya pola makan yang tinggi kalori, tinggi karbohidrat, tinggi serat serta jarang olahraga dan kecenderungan peningkatan obesitas yang selanjutnya meningkatkan resistensi insulin (Arentz et al., 2017; Martins et al., 2014; Teede et al., 2018).

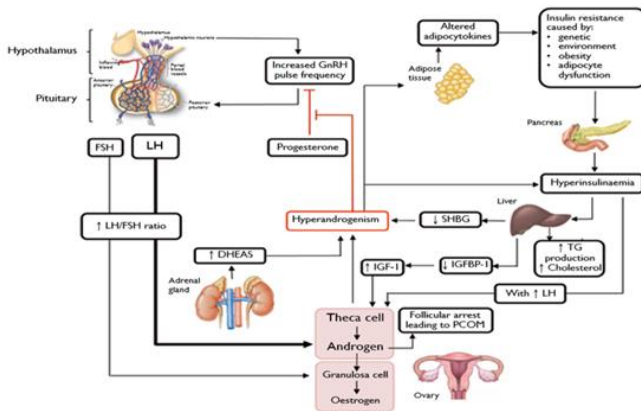
Secara klinis, PCOS ditandai oleh ketidakteraturan menstruasi, anovulasi, hambatan folikulogenesis, tanda-tanda hiperandrogenisme seperti jerawat, rambut tumbuh berlebih, kebotakan pola pria dan infertilitas (Begum et al., 2017; Pericleous and Stephanides, 2018; Kiranmayee et al., 2017). Dalam jangka panjang, PCOS memiliki implikasi kesehatan yang luas termasuk metabolisme yang merugikan (obesitas, diabetes tipe dua, penyakit kardiovaskular), reproduksi (infertilitas, keguguran, kehamilan dan komplikasi neonatal serta keganasan endometrium), dan risiko psikologis (kecemasan, depresi dan stress) (Ebrahimi-Mamaghani et al., 2015; Themes, 2016; Kiranmayee et al., 2017).

Etiologi PCOS tidak dipahami dengan jelas, tetapi ketidakseimbangan metabolisme karbohidrat dan lipid, stres oksidatif, resistensi insulin dan genetika adalah beberapa faktor yang berkontribusi (Reddy et al., 2016; Vejrazkova et al., 2017; Zhao et al., 2019). Kurang lebih 50-70% wanita dengan PCOS memiliki gejala klinis akibat hiperandrogen (Mishra et al., 2018; Tsai et al., 2013) dan

65% - 95% mengalami peningkatan tingkat resistensi insulin dibandingkan dengan kontrol (Layegh et al., 2016; Namavar Jahromi et al., 2017; Zuo et al., 2016a).

Sampai saat ini, patofisiologi PCOS masih belum jelas dan diduga multifaktorial, di mana interaksi antara faktor endokrin, metabolik, genetik, dan lingkungan intrinsik satu sama lain saling berperan (Gambar 1). Resistensi insulin juga merupakan penyebab utama hiperandrogenisme pada PCOS dengan memacu sekresi androgen ovarium dan menghambat produksi globulin pengikat hormon seks hati (SHBG). Hiperandrogenisme meliputi biosintesis androgen, penggunaan, dan metabolisme yang berlebihan. Ketika ovarium distimulasi untuk menghasilkan androgen dalam jumlah yang berlebihan, terjadi akumulasi banyak folikel di ovarium. Resistensi insulin juga merupakan penyebab utama hiperandrogenisme pada PCOS, dengan memacu sekresi androgen ovarium dan menghambat produksi globulin pengikat hormon seks hati (SHBG). Wanita dengan PCOS dan hiperandrogenisme dapat mengalami pertumbuhan

rambut berlebih, jerawat, dan / atau folikulogenesis abnormal. Tiga jalur patofisiologis utama telah dijelaskan, yaitu disfungsi ovulasi, pelepasan gonadotropin yang tidak teratur, dan resistensi insulin.



Gambar 1. Patofisiologi Sindrom Ovarium Polikistik (Yau et al., 2017).

Hiperandrogenisme secara klinis ditandai adanya hirsutisme yang terjadi pada sekitar 80% wanita PCOS atau secara laboratoris dengan peningkatan kadar androgen darah. Pada wanita, peningkatan konsentrasi testosteron mengaktifkan AR dalam sel  $\beta$  untuk meningkatkan GSIS secara patologis, yang menyebabkan disfungsi mitokondria,



stress oksidatif dan pada akhirnya mengakibatkan disfungsi sel  $\beta$ . Disfungsi yang berkelanjutan memacu terjadi kegagalan sel  $\beta$  (Xu et al., 2019). Dilaporkan bahwa tikus betina yang terpapar androgen secara kronis menunjukkan terjadinya hiperinsulinemia dan resistensi insulin yang terkait dengan kegagalan sel  $\beta$  pankreas sekunder sehingga menyebabkan hiperglikemia. Paparan DHT akut meningkatkan respirasi mitokondria dan konsumsi oksigen pada kultur sel  $\beta$ . Pada penelitian *in vivo*, paparan DHT kronis menyebabkan kerusakan oksidatif dan kerentanan terhadap induksi streptozotocin melalui androgen receptor (AR) dalam sel  $\beta$ . Studi ini menunjukkan bahwa kelebihan androgen mempengaruhi aktivasi androgen reseptor yang akan menyebabkan stres oksidatif yang menyebabkan resistensi insulin perifer. Selanjutnya sel  $\beta$  pankreas mengkompensasi dengan hipersekresi insulin, dan lebih lanjut akan terjadi kegagalan sel  $\beta$  sekunder yang pada akhirnya akan menyebabkan Diabetes Tipe 2 (Mishra et al., 2018; Navarro et al., 2018).

Kelebihan androgen menginduksi ketidakseimbangan status oksidan-antioksidan ovarium yang ditandai dengan peningkatan ROS. Peningkatan ROS dalam ovarium menghambat proses steroidogenesis. Aktivitas PPAR $\gamma$  berkaitan dengan steroidogenesis dan proses folikulogenesis di ovarium. Ekspresi PPAR gamma terdeteksi secara bervariasi pada tahapan folliculogenesis. Pada fase folikuler PPAR gamma semakin meningkat dan tingkat ekspresi tertinggi tampak pada saat lonjakan LH dan ovulasi. Pada fase luteal ekspresinya kembali menurun (Minge et al., 2008; Sahmani, 2012).

Tingginya tingkat stress oksidatif pada PCOS, menghambat IKk $\beta$  dan memacu NFk $\beta$  yang selanjutnya meningkatkan TNF $\alpha$ , IL 6 dan CRP (14, 15, 16). Agen pro inflamasi ini mempunyai kontribusi yang penting pada induksi hiperandrogen dan resistensi insulin pada PCOS. IL-6 adalah pengatur peradangan dan kekebalan, memodulasi sekresi berbagai sitokin, dan mempromosikan sekresi berbagai sitokin, dan mempromosikan aktivasi sel-T dan sentiasi sel-B yang berbeda. TNF-a terdeteksi dalam

makrofag, oosit, sel granulosa, atresia, dan sel teka. Telah ditunjukkan bahwa ekspresi berlebih dari sitokin ini dalam jaringan adiposa manusia dan tikus menyebabkan resistensi insulin dan kenaikan kadar glukosa (Kort and Lobo, 2014).

Ovarium merupakan suatu struktur organ yang dinamis dimana proses folikulogenesis secara teratur berlangsung sejak terbentuknya folikel primordial. Dalam proses siklus menstruasi yang normal, perkembangan folikel dapat mencapai stadium ovulasi, namun demikian dalam perkembangannya sebagian besar folikel akan terjadi atresi. Proses folikulogenesis dimulai dengan proses *recruitment (initiation)* folikel primordial untuk menjadi folikel pre-antral dan kemudian melalui proses *selection* hanya satu folikel yang akan tumbuh menjadi masak dan berovulasi. Setelah terseleksi satu *dominant follicle* akan berkembang dan menjadi masak dalam 2 minggu dengan diameter 20 mm yang kemudian disebut dengan stadium pre-ovulasi atau folikel De Graaf (*Graafian follicle*). Proses *recruitment* dan *selection* serta perkembangan folikel dipengaruhi oleh FSH, dimana kadar FSH telah mulai

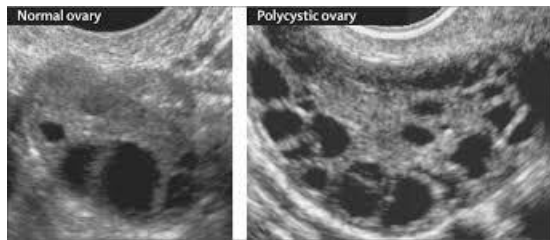
meningkat sejak akhir fase luteal dari siklus menstruasi sebelumnya dan berlangsung sampai awal fase folikuler. Kenaikan kadar FSH tersebut mempengaruhi terjadinya proses *selection* folikel yang dominan (Sperrof, 1999; Anwar & Widad, 2006).

Hiperandrogenisme pada wanita dengan PCOS terlibat dalam disfungsi sumbu hipotalamus-hipofisis-ovarium dan menyebabkan ketidakseimbangan hormon dalam sumbu tersebut. (Ebrahimi-Mamaghani et al., 2015; Ranade and Acharya, 2017). Berdasarkan Gambar 1, berawal dari hipersensitivitas hipofisis terhadap GnRH akibat peningkatan frekuensi dan amplitudo GnRH. Hipofisis merespons dengan peningkatan sekresi LH yang lebih banyak dibandingkan dengan sekresi FSH. LH memacu sel teka ovarium untuk memproduksi androgen secara berlebihan (Franks and Hardy, 2018). Hiperandrogen menyebabkan menghambat perkembangan folikel dan menurunkan produksi estradiol dari sel granulosa, meningkatkan produksi dihidrotestosteron (DHT) sehingga merangsang hirsutisme dan meningkatkan konversi perifer

estradiol menjadi estrone oleh aromatase (Das et al., 2008; Franks and Hardy, 2018; Themes, 2016). Di samping itu, hiperandrogen mampu menginduksi penurunan sensitifitas hipotalamus dan hipofisis terhadap umpan balik estrogen dan progesteron sehingga semakin meningkatkan sekresi pulsatile GnRH dan LH sedangkan FSH menurun (Rosenfield and Ehrmann, 2016).

Proses folikulogenesis normal tidak bisa dilepaskan dari peran AMH. AMH berpengaruh pada penghambatan perekrutan awal folikel primer. Pada tahap pematangan folikel yang bergantung pada FSH dan pemilihan folikel dominan, AMH berperan dalam menurunkan sensitivitas folikel terhadap FSH. Selanjutnya menghambat FSH dalam menginduksi aromatase pada sel granulosa, mengurangi konversi testosteron menjadi estradiol (Crespo et al., 2018). Kadar AMH yang lebih tinggi pada pasien PCOS membuat folikel lebih resisten terhadap aksi FSH, yang berpuncak pada penghambatan maturarion folikel dan ovulasi, pada penghambatan ekspresi aromatase, akibatnya, menyebabkan hiperandrogenisme. Sebagai

akibat dari hiperandrogen, penurunan FSH dan peningkatan AMH pada PCOS akan menghambat proses folikulogenesis sehingga folikel preantral dan folikel antral awal gagal tumbuh menjadi folikel antral. Folikel antral yang berhasil tumbuh menjadi folikel matur, gagal mengalami ovulasi, dan tumbuh menjadi kista folikuler.



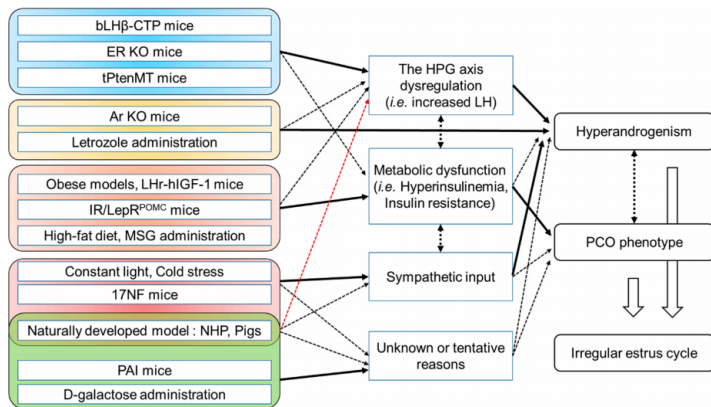
Gambar 2. Gambaran USG PCOS ((Norman RJ, 2007)

### **BAB III**

## **PEMBUATAN TIKUS MODEL POLIKISTIK OVARIUM SINDROM**

Baru-baru ini, banyak penelitian telah dilakukan untuk membentuk model hewan PCOS (Gambar 3) beberapa diantaranya menggunakan androgen sebagai bahan induksi PCOS (Tabel 2) maupun hormon estrogenik (Tabel 3) (Paixão et al., 2017; Ryu et al., 2019a). Salah satu ciri klinis pasien PCOS adalah hiperandrogenisme, maka induksi PCOS dengan metode pemberian hormon androgen langsung banyak dilakukan dengan agen seperti testosteron propionat (Amelia et al., 2018), dihidrotestosteron (DHT) (Song and Tan, 2018; Zhang et al., 2017), atau dehydroepiandrosterone. Agen hormonal lain seperti estradiol valerate (EV) (Mohammadi et al., 2017), glukokortikoid, human chorionic gonadotropin (hCGO (Li et al., 2015) dan hormon anti-Müllerian (AMH) juga telah digunakan. Hormon-hormon ini menyebabkan munculnya fenotip PCOS baik pemberian prenaal dan post natal pada hewan pengerat, domba, dan primata non-

manusia. Ada banyak mekanisme yang mendorong peningkatan androgen produksi PCOS yaitu meliputi peningkatan stimulasi LH akibat dinamika sekresi LH yang abnormal dan peningkatan bioaktivitas LH, dan hiperinsulinemia akibat resistensi insulin. Namun, baru beberapa penelitian yang terbukti bisa menginduksi model tikus PCOS dengan insulin resistensi.



Gambar 3. Representasi skematis ringkasan patofisiologi untuk menjelaskan manifestasi peningkatan kadar testosteron dan morfologi ovarium polikistik (PCO) pada beberapa penelitian model hewan uji PCOS (Ryu et al., 2019b)

Agen yang bersifat aromatase inhibitor seperti letrozole juga digunakan untuk induksi PCOS pada hewan



model (Eman and El-Sayed, 2019; Xu et al., 2020). Pemberian diet tinggi lemak dan tinggi glukosa juga bisa menginduksi gambaran PCOS dan gangguan metabolisme glukosa dan resistensi insulin namun tidak menimbulkan hiperandrogenemia (Roberts et al., 2017). Kombinasi antara testosteron propionate dengan diet tinggi lemak (Ding et al., 2019) maupun antara letrozole dengan diet tinggi lemak (Wang et al., 2020) juga sudah pernah dilakukan. Semua metode mempunyai kelebihan dan kekurangan, di satu sisi menimbulkan gambaran ovarium mirip dengan PCOS namun disisi lain tidak terjadi hiperandrogenemia maupun tidak terjadi resistensi insulin ataupun sebaliknya. Penggunaan testosteron propionat untuk induksi pcos bisa menimbulkan gambaran histologis PCOS namun belum mampu menimbulkan resistensi insulin. Kombinasi testosteron propionat dan diet tinggi lemak mampu menginduksi resistensi insulin namun akan mempengaruhi tingkat hormon dari PCOS. Wang et al, 2019 (28) menggunakan tikus dalam kelompok model yang diberi larutan letrozole dalam 0,5% CMC (1 mg / kg

/ hari) secara intragastrik dan dikombinasikan dengan diet tinggi lemak selama 21, 24, 27, dan 30 hari. Penelitian ini menemukan bahwa letrozole yang dikombinasikan dengan diet tinggi lemak selama 27 hari dapat menginduksi model tikus PCOS-IR yang memiliki karakteristik perubahan polikistik ovarium dan gangguan endokrin dan metabolik.

Aromatase adalah enzim yang berperan penting dalam konversi androgen menjadi estrogen. Letrozole adalah inhibitor aromatase yang efektif. Letrozole menghalangi konversi androgen menjadi estrogen dalam ovarium tikus, dan akhirnya menyebabkan kondisi hiperandrogenisme. Letrozole, penghambat aromatase P450, telah banyak digunakan untuk menginduksi fenotipe yang mirip PCOS pada hewan pengerat (Ryu et al., 2019b).

Tabel 2. Model Hewan PCOS dengan Induksi Androgen (Paixão et al., 2017)

Author, year (reference)	Animal	N	Intervention and duration	Studied variables	Results
Intervention period: Fetal					
Tyndall et al. 2012 [11]	Wistar rat	--	(Fetal and postnatal) Testosterone propionate 25–90 days	sexual hormones gonadotropin ovarian morphology	↑T = E2 ↓ FSH ↑ cystic follicles No CL
Wu et al. 2010 [10]	Sprague–Dawley rat	45	(PA) Testosterone + DHT 70 days	sexual hormones gonadotropin ovarian morphology	↑ T ↑E2 ↑LH = FSH No cysts ↓CL
Caldwell et al. 2014 [13]	Mouse	--	PA; DHT Postnatal: DHT/DHEA/ Letrozole During 90 days	sexual hormones gonadotropin ovarian morphology	=T = E2 =FSH = LH ↑ cystic follicles ↑ atretic
Yan et al. 2013 [12]	Sprague Dawley rat	44	(PA) DHT 30 days	sexual hormones ovarian morphology	=T = E2 ↑ cystic follicles ↑ atretic follicles
Abbott et al. 1998 [25]	Rhesus macaque	21	Testosterone propionate 15–88 days	sexual hormones gonadotropin ovarian morphology	↑T ↑LH ↓FSH ↑multiple follicles >1 mm
Intervention period: Postnatal					
Ota et al. 1983 [17]	Wistar–Imamichi rat	55-77	Testosterone propionate Single dose Observed for 200 days	sexual hormones gonadotropin ovarian morphology	↑T ↓E2 ↑LH ↑FSH ↑ cystic follicles No CL
Zhai et al. 2012 [15]	Sprague–Dawley rat	30	Andronate/ Andronate + HFD 60 days	sexual hormones gonadotropin ovarian morphology	↑T ↑ cystic follicles =FSH ↑LH
Misugi et al. 2006 [18]	Wistar rat	30	DHEA (not reported)	sexual hormones ovarian morphology	↑T ↑ cystic follicles ↑atretic follicles
Van Houten et al. 2012 [14]	C57/BL6 female mouse	--	DHT 90 dias	sexual hormones	↑ DHT
Manneras et al. 2007 [16]	Wistar rat	--	DHT 75 days	sexual hormones ovarian morphology	=T = E2 ↑ cystic follicles
Paixão et al. 2016 [28]	Wistar rat	20	eCG + DHEA	sexual hormones ovarian morphology	↑T ↑ cystic follicles
Ongaro et al. 2015 [26]	Sprague–Dawley rats	35	Testosterone propionate Single dose During 30 and 60 days	sexual hormones ovarian morphology	=T = E2 ↑ cystic follicles (60 days-old)
Marcondes et al. 2015 [27]	Wistar rats	10	Testosterone propionate Single dose	sexual hormones gonadotropin ovarian morphology	↑T ↑LH = FSH ↑ cystic follicles No CL
Intervention period: Pubertal					
Familiari et al. 1985 [19]	Mouse	--	DHEA 20 days	sexual hormones ovarian morphology	↑T ↑ cystic follicles
Knudsen et al. 1975 [20]	Holtzman rat	12/16	DHEA 20 days	sexual hormones, gonadotropin ovarian morphology	=T = E2 =FSH = LH No cysts
Intervention period: Adult					
Tang et al. 2012 [21]	Female Rhesus macaque	6	Testosterone propionate + hCG 60 days	sexual hormones gonadotropin ovarian morphology	↑T = E2 ↑LH = FSH ↑ cystic follicles
McGee et al. 2014 [22]	Rhesus macaque	12	Testosterone + HFD 72 months	sexual hormones gonadotropin ovarian morphology	↑T ↓LH amplitude ↑antral follicles

Kafali dkk. (2003) pertama kali melaporkan bahwa pemberian letrozole menghasilkan gambaran kista ovarium, siklus estrus asiklik, dan peningkatan kadar testosteron serum dan LH sedangkan serum tingkat estradiol menurun secara signifikan. Selain itu, pengobatan letrozole jangka panjang menyebabkan gangguan metabolisme seperti hiperinsulinemia dan intoleransi insulin. Ekspresi genetiknya berubah secara signifikan sehingga meningkatkan ekspresi reseptor LHb dan GnRh di kelenjar pituitari dan meningkatkan Kissr1 di hipotalamus tikus yang diberi letrozole. Infiltrasi makrofag dan peningkatan kadar mRNA IL-6, TNF- $\alpha$ , dan MCP-1 diamati pada jaringan adiposa tikus yang diobati dengan letrozole. Meski beberapa profil hormonal (misalnya, kadar serum estradiol atau FSH) menunjukkan variasi dalam penelitian yang berbeda, letrozole menunjukkan hasil yang baik dan konsisten untuk menimbulkan gambaran mirip PCOS pada hewan pengerat. Model ini memberikan hiperandrogenisme bersamaan dan hipoestrogenisme oleh penghambatan aromatasase, yang berbeda dari hewan model PCOS yang diberi androgen

lainnya (Oakley et al., 2011; Paixão et al., 2017; Wang et al., 2020).

Letrozole menimbulkan perubahan karakteristik endokrin dan morfologi ovarium mirip dengan PCOS, termasuk hiperandrogenemia, gangguan ovulasi, obesitas, dan sebagainya. Kombinasi letrozole dengan diet tinggi lemak dapat menyebabkan reaksi inflamasi hipotalamus dan mengakibatkan metabolisme glukosa dan metabolisme lipid dalam tubuh yang abnormal, sebagai akibatnya timbul obesitas dan resistensi insulin (Hurrell and Hsu, 2017; Rodriguez Paris and Bertoldo, 2019; Wang et al., 2020).

Tabel 3. Model Hewan PCOS yang diinduksi dengan Hormon Estrogenik (Paixão et al., 2017)

Author, year [reference]	Animal	N	Intervention	Studied variables	Results
Intervention period: Postnatal and puberty					
Cruz et al. 2012 [29]	Sprague–Dawley rats	30	Estradiol valerate Single dose	Sexual hormones Gonadotropin Ovary morphology	↑ E2 ↓ androstenedione = LH ↑ atretic follicles ↓ corpora lutea ↑ cystic follicles
Schulster et al. 1984 [30]	Wistar rats (pubertal)	65	Estradiol valerate Single dose	Sexual hormones Gonadotropin Ovary morphology	↓ E2 ↓ LH ↑ cystic follicles
Brawer et al. 1986 [31]	Wistar rats (pubertal)	50	Estradiol valerate Single dose	Gonadotropin Ovary morphology	↓ LH ↓ FSH ↑ cystic follicles ↑ atretic follicles No CL
Fernández et al. 2010 [32]	Sprague–Dawley rats	30	Bisphenol A 10 days	Sex hormones Ovary morphology	↑ E2 ↑ T ↑ cystic follicles ↑ atretic follicles ↓ CL
Marcondes et al. 2015 [27]	Wistar rats	10	Estradiol Benzoate Single dose	Sexual hormones Gonadotropin Ovarian morphology	= T = LH = FSH ↑ cystic follicles No CL
Intervention Period: Adulthood					
Hemmings et al. 1983 [35]	Wistar rats	32	Estradiol valerate Single dose	Sexual hormones Gonadotropin Ovary morphology	= T ↓ LH ↑ cystic follicles
Quandt et al. 1993 [34]	Guinea pigs	32	Estradiol-17β 2 days	Sexual hormones Ovary morphology	↑ E2 = androstenedione ↑ cystic follicles ↑ atretic follicles
Zangeneh et al. 2011 [33]	Wistar rats	48	Estradiol valerate Single dose + cold stress simultaneously	Sex hormones Gonadotropin Ovary morphology	↑ E2 = LH = FSH ↑ cystic follicles
McCarthy & Brawer, 1990 [36]	Wistar rats	58	E2 pellets 50 days	Sexual hormones Gonadotropin Ovary morphology	= E2 ↑ cystic follicles No CL

T testosterone, E2 estradiol, LH luteinizing hormone, FSH follicle-stimulating hormone, CL corpus luteum; ↑ increase; ↓ decrease; = equal

Diet tinggi lemak dan tinggi glukosa sendiri mampu menginduksi gambaran PCOS dan resistensi insulin (Roberts et al., 2017), diharapkan bila dikombinasikan dengan letrozole akan menghasilkan model PCOS-IR secara lebih efektif dan lebih cepat.

## BAB IV

# METODOLOGI

### Jenis dan Rancangan Penelitian

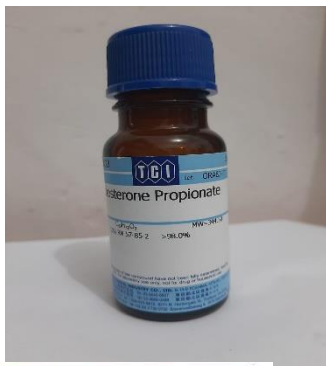
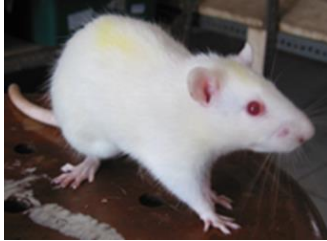
Penelitian ini merupakan penelitian eksperimental laboratorium. Rancangan penelitian yang digunakan berupa *the post test only control group design*.

### Bahan dan Alat Penelitian

Bahan yang akan digunakan pada penelitian ini adalah:

1. 15 tikus betina *Rattus norvegicus* strain Wistar berusia 3 bulan dan beratnya 150-200 gram
2. Testosteron propionat injeksi yang diencerkan dengan corn oil
3. Pakan dan minum tikus
4. Bahan – bahan untuk swab vagina (obyek glas, lidi kapas, metylen blue)
5. Bahan – bahan untuk pembuatan preparat dengan pengecatan Hematoksilin Eosin (HE) (Chamber pengecatan, Xylol, Alkohol, Kertas saring, Kapas, Objek glass, Deck glass, Cat hematoksilin, Cat eosin,

Canada balsam (minyak terpentin / minyak tusam)  
dan Label).



Gambar 4. Alat dan Bahan Penelitian



Instrumen pada penelitian ini terdiri dari:

1. Kandang tikus
2. S spuit injeksi
3. Timbangan hewan dan timbangan obat.
4. Alat bedah tikus Wistar.
5. Pipa mikrokapiler.
6. Tabung reaksi.
7. Tabung ependorf
8. Glucostick dan alat "One Touch Ultra"
9. Mikroskop cahaya (Olympus CX21) serta kamera mikroskop digital Optilab.



Gambar 5. Instrumen penelitian

## Tatalaksana Penelitian

### C.1. Populasi, Teknik Sampling, dan Besar Sampel

Populasi target penelitian ini adalah tikus Wistar. Populasi aktualnya adalah tikus Wistar yang ada di Laboratorium Gizi Pusat Antar Universitas (PAU) Universitas Gajah Mada Yogyakarta. Sampel penelitian diambil dari populasi aktual secara purposive sampling yaitu teknik pengambilan sampel dengan cara memilih subjek penelitian berdasarkan ciri-ciri

tertentu. Sampel harus memenuhi kriteria inklusi yaitu: Tikus putih betina , galur Wistar, umur 3 bulan, berat badan 150-200 g, tidak cacat fisik, dan aktivitas tampak normal. Kriteria eksklusi berupa tikus putih yang mengalami sakit atau mati dalam masa perlakuan. Digunakan 15 ekor tikus wistar betina.

### C.2. Alur penelitian

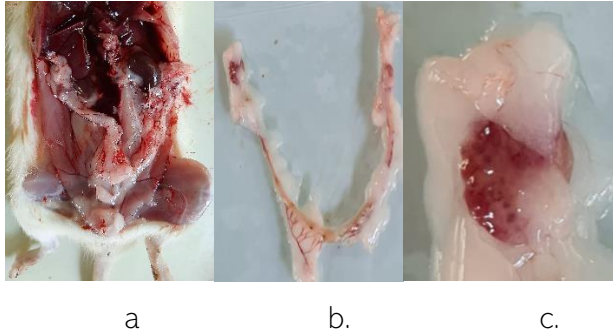
Sebelum penelitian dimulai dilakukan periode adaptasi hewan uji selama seminggu. Digunakan tikus betina dalam kondisi sehat, dalam perilaku normal dan hasil swab vagina normal serta tidak hamil dan tidak ada kelainan anatomi. Siklus estrus diobservasi selama 3 siklus (12 hari). Semua tikus dipelihara dalam lingkungan yang sama dalam kandang plastik berukuran 40x30x10cm yang ditutup dengan anyaman kawat. Tikus dipelihara dalam kondisi pakan, minum, dan pencahayaan yang sama.



Gambar 6. Menyuntik tikus secara intramuskuler

Setelah dilakukan observasi siklus estrus, dipilih 15 ekor yang sedang dalam fase estrus secara acak untuk dibuat model PCOS dengan induksi testostosterone propionat. Tikus dipilih secara acak dan dibagi menjadi 3 kelompok yaitu kelompok kontrol tanpa perlakuan, kelompok Testosteron 14 diberikan injeksi IM Testosteron Propionat dalam corn oil 1mg/100gram BB selama 14 hari dan kelompok Testosteron 28 diberikan injeksi IM Testosteron Propionat dalam corn oil 1 mg/100gram BB selama 28 hari. Setelah injeksi, dilakukan tes apus vagina setiap hari, dievaluasi dengan pengecatan giemsa. PCOS ditegakkan

ketika terjadi serangkaian perubahan dalam siklus estrus sampai mencapai tahap cornifikasi vagina yang persisten.



Gambar 7. Ovarium Tikus ( a. ovarium didalam rongga pelvis; b. Letak ovarium di ujung kranial uterus; c. ovarium dengan lemak paraovarial)

Pada hari ke15 perlakuan, Tikus kelompok kontrol dan kelompok Testosteron 14 dibiarkan puasa selama 12 jam, kemudian dibius dengan anestesi eter ringan. Kadar glukosa darah di tentukan dengan metode glukose axidase biosensor, menggunakan alat "One Touch Ultra". Darah diambil dari bagian ekor tikus, dengan cara ekor tikus dibersihkan lalu dipijat atau diurut perlahan-lahan, kemudian bagian ujung ditusuk dengan jarum (lancet). Darah yang

keluar kemudian ditempelkan pada strip glukometer. Kadar glukosa darah akan terukur dan nampak pada layar glukometer setelah 5 detik, dinyatakan dalam mg/dl. Ovarium diangkat dan disimpan dalam formalin 10% untuk fiksasi. Setelah fiksasi, organ ovarium dipotong dengan ketebalan 0,5 cm, dibuat blok dehidrasi dan parafin selanjutnya dilakukan irisan dengan mikrotom dengan ketebalan 5-7 m dipasang pada objek gelas dan diwarnai dengan menggunakan hematoxylin-eosin. Slide histopatologis diamati di bawah mikroskop dengan perbesaran 100x dan 400x. Parameter yang diamati adalah jumlah dan diameter folikel sekunder, folikel antral awal, folikel antral, jumlah corpus luteum dan jumlah kista folikuler. Perlakuan yang sama dilakukan pada tikus kelompok Testosteron 28 di hari ke 29 perlakuan.

Adapun Prosedur Pengecatan Histologi Hematoksilin Eosin adalah sebagai berikut (Andi Tri Atmojo, 2016)

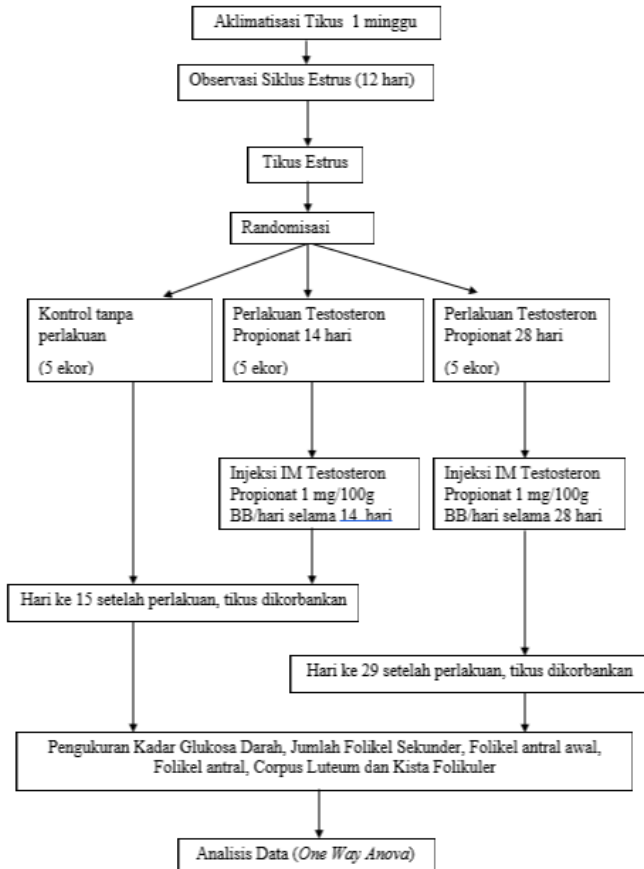
1. Deparafinisasi preparat yang telah kering dalam xylol sebanyak 3 kali (masing-masing selama 10-15 menit).

2. Masukkan ke dalam alkohol 96% sebanyak 2 kali (masing-masing selama 5 menit).
3. Cuci dengan air mengalir sampai alkohol hilang.
4. Masukkan ke dalam cat hematoksilin selama 7-10 menit.
5. Cuci dengan air mengalir sampai tidak luntur.
5. Celupkan ke dalam HCl sebanyak 2 kali celup untuk dekolorisasi.
6. Cuci kembali dengan air mengalir.
7. Rendam di dalam air sebentar sampai warna menjadi biru.
8. Masukkan ke dalam cat eosin selama 3-5 menit.
9. Cuci dengan air mengalir.
10. Masukkan ke dalam larutan alkohol 1.
11. Masukkan ke dalam larutan alkohol 2.
12. Cuci dengan air mengalir.
13. Tekan preparat dengan kertas, lap dengan kapas.
14. Masukkan ke dalam xylol.
15. Tekan kembali preparat dengan kertas, lap dengan kapas.

16. Lakukan Mounting, dan beri nomor laboratorium.



Diagram Alur Penelitian

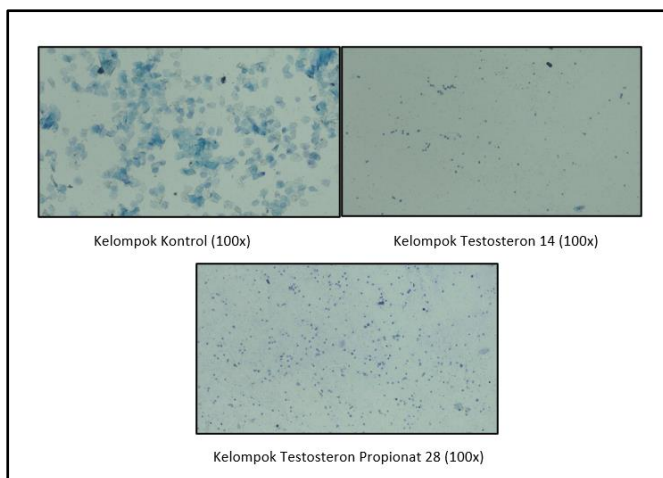


Gambar 8. Diagram Alur Penelitian

## **BAB V**

### **HASIL PENELITIAN DAN ANALISIS**

Penelitian dilakukan di Laboratorium Pemeliharaan Hewan Coba di Fakultas Kedokteran dan Ilmu Kesehatan. Digunakan 15 tikus Wistar usia betina dengan berat badan rata-rata 150-200 gram. Dilakukan aklimatisasi selama 1 minggu untuk adaptasi tikus dengan lingkungan pemeliharaan. Selanjutnya di observasi siklus estrus selama 3 siklus (12 hari) untuk mengetahui apakah siklus estrus normal atau tidak. Tikus yang terbukti sehat dan sedang dalam kondisi estrus (Gambar1) memenuhi syarat sebagai sampel penelitian. Tikus dipilih secara acak dan dibagi menjadi 3 kelompok yaitu kelompok kontrol tanpa perlakuan, kelompok Testosteron 14 diberikan injeksi IM Testosteron Propionat dalam corn oil 1mg/100gram BB selama 14 hari dan kelompok Testosteron 28 diberikan injeksi IM Testosteron Propionat dalam corn oil 1mg/100gram BB selama 28 hari.



Gambar 9. Swab vagina sebelum pembedahan pada kelompok Kontrol, Testosteron 14 dan Testosteron 28. Tampak bahwa swab vagina pada kelompok kontrol banyak gambaran epitel sesuai dengan fase estrus. Sedangkan pada kelompok Testosteron 14 dan Testosteron 28 didominasi oleh leukosit yang tersebar dengan sedikit epitel, sesuai dengan fase diestrus.

Pada hari ke 22, setelah puasa 12 jam tikus kelompok kontrol dan kelompok Testosteron 14 dikorbkan. Sebelumnya diukur kadar glukosa darah puasa dan dilakukan swab vagina untuk memastikan bahwa tikus kontrol dalam kondisi estrus sedangkan pada tikus

Testosteron 14 dalam kondisi diestrus. Tikus dilakukan pembedahan diambil darah dan ovarium. Selanjutnya ovarium dibuat preparat histologi dengan pengecatan HE. Pembuatan preparat hisitologi dikerjakan di Laboratorium Patologi Anatomi RS Asri Medical Center. Pembedahan Kelompok Testosteron 28 dilakukan pada hari ke 29 dilakukan dengan cara yang sama.

Tabel 4. Berat Badan dan kadar Gula Darah Puasa pada saat pembedahan

Kelompok	Berat Badan Akhir	Kenaikan BB	Kadar GDP
Kontrol	173,0±34,76	6,25±1,89	138,5±7,55
Testosteron 14	200,5±16,19	22,35±9,9	140,7±13,2
Testosteton 28	203,3±15,6	60,25±32,7*	91,25±18,3*
P (Anova)	1,91	0,012	0,001

Keterangan: \* berbeda bermakna dengan Kontrol dan Testosteron 14

Tabel 5. Jumlah Folikel Sekunder, Folikel antral awal dan Fokilel antral

Kelompok	Folikel sekunder	Folikel antral awal	Folikel antral
Kontrol	10,25±2,62	9±5,3	5,5±2,38
Testosteron14	39±14,02*	26,75±13,3	2,5±1,29
Testosteton28	19±14,17**	2,3±2,5	2,3±2,5
P (Anova)	0,019	0,155	0,121

Keterangan:

\*: berbeda bermakna dengan kontrol

\*\* : berbeda bermakna dengan kontrol dan Testosteron 14

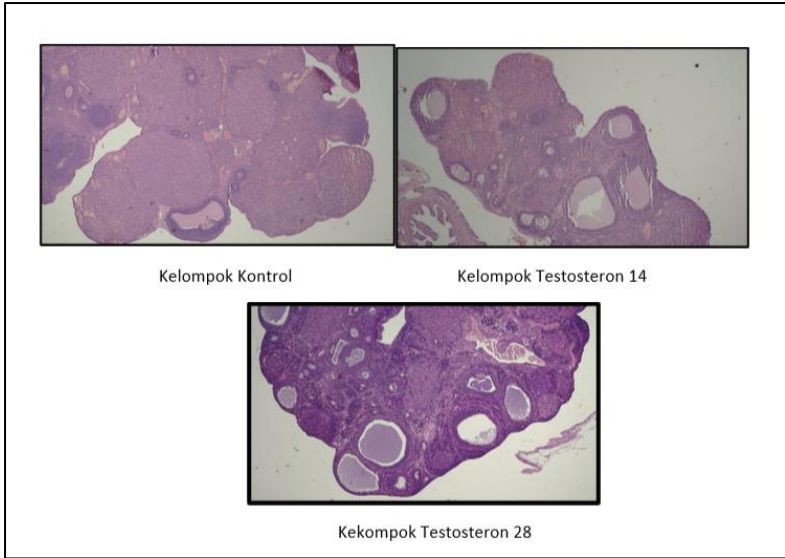
Tabel 6. Jumlah Corpus Luteum dan Folikel Kistik

Kelompok	Corpus Luteum	Folikel Kistik
Kontrol	42,25±7,8	0,00
Testosteron14	12,25±4,6*	6,0±1,15*
Testosteton28	8,0±2,0*	3,6±1,5**
P (Anova)	0,000	0,000

Keterangan:

\*: berbeda bermakna dengan kontrol

\*\* : berbeda bermakna dengan kontrol dan Testosteron 14



Gambar 10. Gambaran Histologi Ovarium pada Kelompok Kontrol, Testosteron 14 dan Testosteron 28. Tampak bahwa pada kelompok kontrol didominasi dengan gambaran corpus luteum sedangkan pada kelompok Testosteron 14 dan 28 lebih banyak gambaran folikel kistik dan gambaran folikel sekunder dan folikel preantral.

Tabel 4 menunjukkan bahwa kenaikan berat badan awal dan akhir meningkat akibat perlakuan dengan Testosteron Propionat terutama pada perlakuan selama 28 hari. Namun hasil Kadar Gula Darah Puasa menunjukkan hasil yang sebaliknya. Pada kelompok Testosteron 28, kadar

GDP menurun secara bermakna dibandingkan dengan dua kelompok yang lain. Dari Tabel 5 dan Gambar 10 menunjukkan bahwa pada kelompok kontrol terdapat banyak gambaran corpus luteum. Hal ini mengindikasikan terjadi ovulasi pada tikus Kontrol. Selaras dengan gambaran swab vagina sebelum pembedahan kelompok kontrol. Sementara pada kelompok Testosteron 14 dan Testosteron 28, jumlah corpus luteum menurun secara bermakna dibandingkan dengan kelompok kontrol. Hal ini menunjukkan bahwa pada kelompok Testosteron 14 dan Testosteron 28 terjadi gangguan ovulasi. Akibat tidak terjadi ovulasi, folikel antral berkembang menjadi folikel kistik yang secara statistik jumlahnya meningkat bermakna pada kelompok Testosteron 14 dan Testosteron 28. Jumlah folikel sekunder pada kelompok Testosteron 14 meningkat signifikan dibandingkan dengan kelompok kontrol. Kondisi ini menunjukkan adanya gangguan perkembangan folikel pada tahap awal sehingga gagal menjadi folikel preantral. Pada tabel 2 terlihat bahwa rerata jumlah folikel preantral meningkat pada kelompok Testosteron 14 namun jumlah

folikel antral menurun dibandingkan dengan kontrol meskipun secara statistik tidak bermakna. Sementara pada kelompok Testosteron 28 jumlah folikel sekunder dan folikel antral awal menurun dibandingkan dengan Testosteron 14, ini menunjukkan kemungkinan terjadi atresia folikel sekunder.



## **BAB V**

### **KESIMPULAN**

Simpulan dari penelitian ini adalah perlakuan dengan testosteron propionat 1 mg/100 gr BB/hari selama 14 hari mampu menginduksi terjadinya tanda-tanda PCOS pada tikus. Sedangkan perlakuan selama 28 hari menyebabkan folikel sekunder atresia. Namun perlakuan testosteron 1 mg/100 gr/BB/ hari selama 14 hari maupun 28 hari belum secara konsisten meningkatkan kadar gula darah puasa dengan kata lain tidak bisa menginduksi timbulnya resistensi insulin.

## DAFTAR PUSTAKA

- Amelia, D., Santoso, B., Purwanto, B., Miftahussurur, M., Joewono, H.T., Budiono, 2018. Effects of *Moringa oleifera* on Insulin Levels and Folliculogenesis in Polycystic Ovary Syndrome Model with Insulin Resistance. *IEMAMC* 18, 22–30. <https://doi.org/10.2174/1871522218666180426100754>
- Andi Tri Atmojo, 2016. Pengecatan Histologi Hematoksilin-Eosin. Indonesian Medical Laboratory. URL <https://medlab.id/pengecatan-histologi-hematoksilin-eosin/> (accessed 2.20.21).
- Crespo, R.P., Bachega, T.A.S.S., Mendonça, B.B., Gomes, L.G., 2018. An update of genetic basis of PCOS pathogenesis. *Archives of Endocrinology and Metabolism* 62, 352–361. <https://doi.org/10.20945/2359-3997000000049>
- Ding, T., Hardiman, P.J., Petersen, I., Wang, F.-F., Qu, F., Baio, G., 2017. The prevalence of polycystic ovary syndrome in reproductive-aged women of different ethnicity: a systematic review and meta-analysis. *Oncotarget* 8. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.19180>
- Ding, Y., Jiang, Z., Xia, B., Zhang, L., Zhang, C., Leng, J., 2019. Mitochondria-targeted antioxidant therapy for an animal model of PCOS-IR. *Int J Mol Med* 43, 316–324. <https://doi.org/10.3892/ijmm.2018.3977>
- El-Naggar, M.E., Al-Joufi, F., Anwar, M., Attia, M.F., El-Bana, M.A., 2019. Curcumin-loaded PLA-PEG copolymer nanoparticles for treatment of liver inflammation in streptozotocin-induced diabetic rats. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* 177, 389–398. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2019.02.024>

- EMAN EL-BAHAIE, Ph.D., S.M.M.M., M.D., El-Sayed, M.D., S.F., 2019. Reversal of Haemostatic Changes in Letrozole-Induced PCOS Rat Model with Vitamin D Supplementation. *The Medical Journal of Cairo University* 87, 1753–1767. <https://doi.org/10.21608/mjcu.2019.53961>
- Escobar-Morreale, H.F., Luque-Ramírez, M., González, F., 2011. Circulating inflammatory markers in polycystic ovary syndrome: a systematic review and metaanalysis. *Fertility and Sterility* 95, 1048-1058.e2. <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2010.11.036>
- González, F., Rote, N.S., Minium, J., Kirwan, J.P., 2006. Increased activation of nuclear factor kappaB triggers inflammation and insulin resistance in polycystic ovary syndrome. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 91, 1508–1512. <https://doi.org/10.1210/jc.2005-2327>
- Hua, W., Yi, C., Lin, S., Chen, K., Wang, X., 2017. Expressional profile of apoptosis and anti-apoptosis proteins in polycystic ovary syndrome patients and related mechanisms. *Biomed Res* 28, 6.
- Hurrlé, S., Hsu, W.H., 2017. The etiology of oxidative stress in insulin resistance. *Biomed J* 40, 257–262. <https://doi.org/10.1016/j.bj.2017.06.007>
- Khademi, A., Alleyassin, A., Aghahosseini, M., Tabatabaeefar, L., Amini, M., 2010. The Effect of Exercise in PCOS Women Who Exercise Regularly. *Asian Journal of Sports Medicine* 1. <https://doi.org/10.5812/asjasm.34874>
- Kort, D.H., Lobo, R.A., 2014. Preliminary evidence that cinnamon improves menstrual cyclicity in women with polycystic ovary syndrome: a randomized controlled trial. *American Journal of Obstetrics and Gynecology* 211, 487.e1-487.e6. <https://doi.org/10.1016/j.ajog.2014.05.009>

- Li, X., Cui, P., Jiang, H.-Y., Guo, Y.-R., Pishdari, B., Hu, M., Feng, Y., Billig, H., Shao, R., 2015. Reversing the reduced level of endometrial GLUT4 expression in polycystic ovary syndrome: a mechanistic study of metformin action. *Am J Transl Res* 7, 574–586.
- Mohammadi, S., Kayedpoor, P., Karimzadeh-Bardei, L., Nabiuni, M., 2017. The Effect of Curcumin on TNF- $\alpha$ , IL-6 and CRP Expression in a Model of Polycystic Ovary Syndrome as an Inflammation State 18, 9.
- Norman RJ, 2007. References in Polycystic ovary syndrome - The Lancet [WWW Document]. URL [https://www.thelancet.com/journals/lancet/article/PIIS0140-6736\(07\)61345-2/references](https://www.thelancet.com/journals/lancet/article/PIIS0140-6736(07)61345-2/references) (accessed 2.20.21).
- Oakley, O., Lin, P.-C., Bridges, P., Ko, C., 2011. Animal Models for the Study of Polycystic Ovarian Syndrome. *Endocrinol Metab* 26, 193. <https://doi.org/10.3803/EnM.2011.26.3.193>
- Paixão, L., Ramos, R.B., Lavarda, A., Morsh, D.M., Spritzer, P.M., 2017. Animal models of hyperandrogenism and ovarian morphology changes as features of polycystic ovary syndrome: a systematic review. *Reprod Biol Endocrinol* 15. <https://doi.org/10.1186/s12958-017-0231-z>
- Reddy, P.S., Begum, N., Mutha, S., Bakshi, V., 2016. Beneficial effect of Curcumin in Letrozole induced polycystic ovary syndrome. *Asian Pacific Journal of Reproduction* 5, 116–122. <https://doi.org/10.1016/j.apjr.2016.01.006>
- Roberts, J.S., Perets, R.A., Sarfert, K.S., Bowman, J.J., Ozark, P.A., Whitworth, G.B., Blythe, S.N., Toporikova, N., 2017. High-fat high-sugar diet induces polycystic ovary syndrome in a rodent model†. *Biology of Reproduction* 96, 551–562. <https://doi.org/10.1095/biolreprod.116.142786>

- Rodriguez Paris, V., Bertoldo, M.J., 2019. The Mechanism of Androgen Actions in PCOS Etiology. *Med Sci (Basel)* 7. <https://doi.org/10.3390/medsci7090089>
- Ryu, Y., Kim, S.W., Kim, Y.Y., Ku, S.-Y., 2019a. Animal Models for Human Polycystic Ovary Syndrome (PCOS) Focused on the Use of Indirect Hormonal Perturbations: A Review of the Literature. *International Journal of Molecular Sciences* 20, 2720. <https://doi.org/10.3390/ijms20112720>
- Ryu, Y., Kim, S.W., Kim, Y.Y., Ku, S.-Y., 2019b. Animal Models for Human Polycystic Ovary Syndrome (PCOS) Focused on the Use of Indirect Hormonal Perturbations: A Review of the Literature. *Int J Mol Sci* 20. <https://doi.org/10.3390/ijms20112720>
- Song, S., Tan, Y., 2018. Expression of FKBP52 in the ovaries of PCOS rats. *Int J Mol Med*. <https://doi.org/10.3892/ijmm.2018.3998>
- Susanto, E., Santoso, B., 2012. Korelasi Jumlah Ekspresi Reseptor IGF-1 (Insulin Like Growth Factor-1) dan Kelenjar Endometrium Rattus norvegicus Strain Wistar Model SOPK (Sindroma Ovarium Polikistik) yang Mendapat Testosteron 20, 7.
- Wang, M.-X., Yin, Q., Xu, X., 2020. A Rat Model of Polycystic Ovary Syndrome with Insulin Resistance Induced by Letrozole Combined with High Fat Diet. *Med Sci Monit* 26, e922136-1-e922136-10. <https://doi.org/10.12659/MSM.922136>
- Xu, J., Dun, J., Yang, J., Zhang, J., Lin, Q., Huang, M., Ji, F., Huang, L., You, X., Lin, Y., 2020. Letrozole Rat Model Mimics Human Polycystic Ovarian Syndrome and Changes in Insulin Signal Pathways. *Med Sci Monit* 26, e923073-1-e923073-13. <https://doi.org/10.12659/MSM.923073>

Zhang, Y., Hu, M., Meng, F., Sun, X., Xu, H., Zhang, J., Cui, P., Morina, N., Li, X., Li, W., Wu, X.-K., Brännström, M., Shao, R., Billig, H., 2017. Metformin Ameliorates Uterine Defects in a Rat Model of Polycystic Ovary Syndrome. *EBioMedicine* 18, 157–170. <https://doi.org/10.1016/j.ebiom.2017.03.023>