



SINGLE NUCLEOTIDE POLYMORPHISM (SNP) EXON 17 C/T HIS 1058 GEN INSR PADA PENDERITA SOPK DENGAN RESISTENSI INSULIN

Dewi Puspitasari V¹⁾, Setyawan A¹⁾, Thaufik S¹⁾

SINGLE NUCLEOTIDE POLYMORPHISM (SNP) EXON 17 C/T HIS 1058 OF INSR GENE IN POLYCYSTIC OVARIAN SYNDROM WITH INSULIN RESISTANCE

ABSTRACT

Background: Objective: To assess the association between single nucleotide polymorphism in exon 17 of the insulin receptor (INSR) gene and polycystic ovarian syndrome (PCOS) with insulin resistance in Indonesian population.

Methods: Design of this study was cross sectional and the study was conducted at RSUP Dr. Kariadi, RS Permata Medika and RSIA Kusumapradja in period of July 2015 until February 2016. The study participants were 24 PCOS patients with insulin resistance (case group) and 24 women without PCOS and insulin resistance (control group). History, physical examination, transvaginal ultrasound, HOMA-IR and blood sample examination for PCR-RFLP were examined in all subjects.

Results: There is no significant difference of CC, CT, TT genotypes in case group and control group ($p=0.441$). The frequency of C allele, which known as a normal allele, was higher in control group than in case group. The frequency of allele T was higher in control group than in case group ($p=0.037$). Polycystic ovarium feature and phenotype 4 (oligo/anovulation + polycystic ovarium) was the highest clinical feature found in all participants.

Conclusion: There is no association between SNP exon 17 C/T His 1058 of INSR gene and polycystic ovarian syndrome (PCOS) with insulin resistance in Indonesian population. C allele known as the wildtype allele was found higher in control group that leads probability of C allele being the mutant one.

Keywords: SNP exon 17 C/T His 1058, INSR gene, PCOS, insulin resistance

ABSTRAK

Latar belakang: Tujuan: Mengidentifikasi SNP exon 17 C/T His 1058 gen INSR pada perempuan dengan sindrom ovarium polikistik dengan resistensi insulin.

Metode: Rancangan penelitian ini adalah penelitian belah lintang dengan tempat penelitian adalah RSUP Dr. Kariadi, RS Permata Medika dan RSIA Kusumapradja yang dilakukan pada periode Juli 2015–Februari 2016. Subjek penelitian pada kelompok kasus adalah 24 pasien SOPK dengan resistensi insulin dan 24 orang perempuan normal tanpa SOPK dan tidak resistensi insulin pada kelompok kasus. Seluruh populasi penelitian dilakukan anamnesis, pemeriksaan fisik dan pemeriksaan penunjang berupa USG transvaginal dan HOMA IR serta pengambilan sampel darah untuk pemeriksaan PCR RFLP untuk mengidentifikasi SNP.

Hasil: Genotip CC, CT dan TT pada kelompok kasus dan kelompok kontrol didapatkan perbedaan tidak bermakna ($p=0,441$). Frekuensi alel C ditemukan lebih tinggi pada kelompok SOPK dengan resistensi insulin sedangkan alel T ditemukan lebih tinggi pada kelompok kontrol dengan hasil berbeda bermakna ($p=0,037$). Gambaran klinis yang paling sering dijumpai pada seluruh subjek penelitian adalah gambaran ovarium polikistik. Fenotip yang paling banyak dijumpai adalah Fenotip 4 (oligo/anovulasi + ovarium polikistik)

Simpulan: Tidak terdapat asosiasi antara SNP exon 17 C/T His 1058 gen INSR dengan perempuan dengan sindrom ovarium polikistik dengan resistensi insulin di Indonesia. Alel C yang dianggap sebagai alel normal didapatkan lebih tinggi pada kelompok SOPK dengan resistensi insulin sehingga perlu dipertimbangkan ulang apakah alel C bersifat mutan.

Kata kunci: SNP exon 17 C/T His 1058, gen INSR, SOPK, resistensi insulin

¹⁾ Bagian Obstetri Ginekologi FK UNDIP/RSUP Dr. Kariadi Semarang

PENDAHULUAN

Sindroma ovarium polikistik (SOPK) merupakan endokrinopati yang paling sering dijumpai pada sekitar 7% perempuan usia reproduksi.¹ Manifestasi klinisnya amat bervariasi mulai dari anovulasi kronik, haid tak teratur, infertilitas, hiperandrogenisme serta gangguan metabolik. Pada jangka pendek, keadaan ini menyebabkan disfungsi reproduksi (infertilitas) sedangkan jangka panjang dapat menyebabkan intoleransi glukosa, diabetes mellitus tipe 2, dislipidemia serta penyakit kardiovaskuler.^{2,3}

Gangguan metabolik pada SOPK dimulai dari terjadinya resistensi insulin yaitu penurunan penggunaan glukosa yang diperantarai oleh insulin. Resistensi insulin ditemukan pada 50–90% wanita dengan SOPK walaupun prevalensinya pada populasi umum hanya 10–20%.⁴ Penyebab dari terjadinya resistensi insulin pada SOPK sampai saat ini belum jelas dan melibatkan lebih dari satu mekanisme termasuk faktor genetik dan lingkungan. Hipotesis yang dikemukakan adalahagalnya fosforilasi tirosin pada reseptor insulin dan digantikan oleh fosforilasi serin yang akan mengaktifkan jalur produksi androgen yang berlebihan pada sel teka ovarium.⁵

Banyak kandidat gen yang terlibat dalam regulasi aksi dan sekresi insulin yaitu gen *INS* (Insulin), *INSR* (reseptor insulin), *IRS*, *ENPP1*, *Calpain-10* serta *PPAR γ* .⁶ Gen *INSR* terdiri dari 22 exon sepanjang 120kb pada kromosom 19.⁷ Domain tyrosine kinase pada *INSR* (exon 17–21) banyak mendapatkan perhatian karena mutasi domain ini berkaitan dengan hiperinsulinemia dan resistensi insulin. Substitusi dari C ke T pada posisi His 1058 (yaitu His1058 pada dbSNP) menunjukkan asosiasi dengan resistensi insulin pada SOPK. Polimorfisme gen *INSR* ini juga banyak diteliti karena bertanggungjawab mengkode sebagian domain tyrosine kinase dan mutasi pada gen ini berkaitan dengan hiperandrogenemia.¹

Pada penelitian pada populasi China dan Kaukasia ditemukan bahwa polimorfisme gen *INSR* exon 17 C/T His 1058 berkaitan dengan SOPK namun penelitian pada populasi Korea dan Iran menunjukkan polimorfisme dan SOPK mempunyai hubungan yang tak bermakna.¹ Variasi pengaruh polimorfisme ini rupanya dipengaruhi oleh jenis populasi sehingga perlu diteliti apakah ada

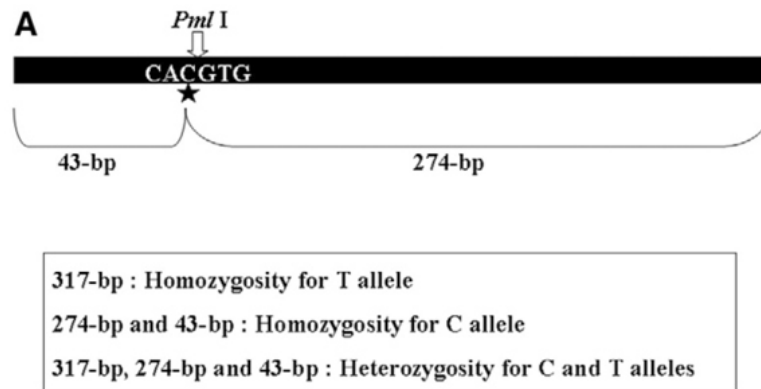
perbedaan gambaran *single nucleotide polymorphism* (SNP) gen *INSR* pada exon 17 C/T His 1058 pada penderita SOPK di Indonesia. Penelitian ini bertujuan untuk mengidentifikasi asosiasi SNP exon 17 C/T His 1058 gen *INSR* pada perempuan dengan sindrom ovarium polikistik dengan resistensi insulin serta mendeskripsikan fenotip perempuan dengan sindrom ovarium polikistik dengan resistensi insulin berdasarkan genotip pada polimorfisme gen *INSR*.

METODE

Rancangan penelitian yang digunakan pada penelitian ini adalah *cross sectional*. Ruang lingkup bidang ilmu yang diteliti adalah bidang ilmu fertilitas, endokrinologi dan reproduksi dengan titik berat pada cabang ilmu endokrinologi. Tempat penelitian adalah RSUP Dr. Kariadi Semarang, RSU Permata Medika Semarang dan RSIA Kusumapradja Semarang, Pusat Riset Biomedik/*Center for Biomedical Research* (CEBIOR) Fakultas Kedokteran Universitas Diponegoro, Semarang. Waktu penelitian adalah bulan Juli 2015 hingga jumlah sampel terpenuhi.

Populasi penelitian ini adalah pasien sindrom ovarium polikistik dengan resistensi insulin di RSUP Dr. Kariadi Semarang dan RSU Permata Medika Semarang yang memenuhi kriteria inklusi. Subjek kasus diambil dari penderita SOPK dengan resistensi insulin dan subjek kelompok kontrol adalah perempuan yang mempunyai siklus menstruasi normal dan sudah pernah melahirkan bayi hidup, tidak menderita SOPK dan tidak resistensi insulin. Diagnosis SOPK ditegakkan berdasarkan kriteria Rotterdam. Pengambilan sampel dilakukan dengan metode *consecutive sampling* yaitu berdasarkan kedatangan subyek penelitian di rumah sakit. Besar sampel dihitung berdasarkan rumus besar sampel untuk uji diagnostik dan didapatkan besar sampel sebanyak 24 untuk masing-masing kelompok kasus dan kelompok kontrol.

Kriteria inklusi subjek penelitian adalah semua pasien usia reproduksi (18–38 tahun) dengan diagnosis SOPK berdasar kriteria Rotterdam (pasien memenuhi dua dari tiga Kriteria Rotterdam berupa oligo /anovulasi, skor Ferriman-Galwey >8 dan morfologi ovarium polikistik pada pemeriksaan USG) serta resistensi insulin berdasar



Gambar 1. Lokasi restriksi enzim PmlI pada exon 17 gen INSR, * site polimorfisme His 1058 C/T (Lee EJ, Yoo KJ, Kim SJ, Lee SH, Cha KY, Baek KH. Single nucleotide polymorphism in exon 17 of the insulin receptor gene is not associated with polycystic ovary syndrome in a Korean population. *Fertil Steril.* 2006; 86:3804)

hasil HOMA-IR >2 yang belum pernah mendapatkan terapi serta perempuan usia reproduksi dengan siklus menstruasi normal dan pernah melahirkan bayi hidup yang datang ke RSUP Dr. Kariadi Semarang dan RSU Permata Medika Semarang dan RSIA Kusumapradja Semarang. Kriteria eksklusi dari penelitian ini adalah pasien dengan kelainan endokrinologi selain SOPK atau subjek menolak berpartisipasi dalam penelitian.

Subjek diberikan penjelasan mengenai tujuan penelitian (informatif dan mudah dipahami) setelah subjek mengerti dan setuju, mereka diminta mengisi lembar persetujuan penelitian (*informed consent*). Data karakteristik pasien dikumpulkan meliputi umur, riwayat medis dan obstetrik serta siklus menstruasi (oligoovulasi/anovulasi atau tidak). Data obyektif didapat melalui pemeriksaan fisik (indeks massa tubuh, Skor Ferriman Galwey), ultrasonografi transvaginal (volume ovarium dan jumlah folikel antral) dan pemeriksaan laboratorium HOMA-IR. Pengambilan sampel darah dari darah vena dengan tabung vacutainer 10cc yang mengandung EDTA untuk pemeriksaan SNP exon 17 C/T dengan teknik *polymerase chain reation restriction fragment length polymorphism* (PCR-RFLP). Teknik pemeriksaan DNA dimulai dari ekstraksi DNA menggunakan metode *Salting Out* (metode Miller dengan modifikasi manual Laboratorium CEBIOR) tahun 1998. Analisis *Single Nucleotide Polymerase Exon 17 C/T* dilakukan sebagai berikut; exon 17 diamplifikasi dengan *polymerase chain reaction* (PCR) menggunakan *primer forward* 5'-TCAGGAAAGCCAGCCCATGTC-3' dan *primer*

reverse 5'-CCAAGGATGCTGTGTAGATAAG-3'. Kemudian 100 ng DNA digunakan sebagai cetakan (*template*) pada reaksi campuran. Parameter *cycling* meliputi denaturasi 94°C selama 2 menit, 30 siklus dengan 94°C selama 1 menit, 55°C selama 1 menit, 72°C selama 1 menit, dan 72°C selama 10 menit. Setelah amplifikasi dengan teknik PCR, DNA kemudian dimurnikan dari produk PCR lain dengan PCR purification kit dan dilakukan digesti dengan PmlI selama 3 jam pada 37°C.

Fragmen DNA yang telah terdigesti kemudian dilakukan elektroforesis dengan gel agarose 2%. Bahan yang digunakan gel Agarose 2%, *buffer* TBE (tris Boric EDTA) dan *Molecular Weight Marker*: 50 bp. Masak hingga homogen atau larutan berubah menjadi jernih. Tuangkan ke dalam cetakan yang sudah disiapkan, setelah beku pindahkan ke dalam *tank* gel elektroforesis yang dialiri dengan 100 Volt selama 1 jam kemudian dilihat pada *Gel Documentation*.

Pada subjek yang mempunyai alel C maka PmlI akan mengenali *site* tersebut (CACGTG) dan akan melakukan restriksi pada tempat tersebut sehingga terbentuk 2 fragmen berukuran 274 bp dan 43 bp. Jadi band tunggal 317 bp menunjukkan homozygositas dari alel T. Dua fragmen 274bp dan 43 bp menunjukkan homozygositas alel C dan apabila didapatkan 3 fragmen yaitu 317 bp, 274 bp dan 43 bp menunjukkan heterozygositas untuk alle C atau allel T.

Data yang terkumpul diolah dengan tahapan *editing*, *koding*, *entry data*, dan *cleaning data*. Hasil disajikan dalam bentuk tabel dan grafik. Data berskala ratio, yakni umur subjek, indeks massa

tubuh, gula darah puasa, insulin puasa, HOMA-IR akan disajikan nilai-nilai deskriptifnya (rerata, simpang baku, nilai minimum dan maksimumnya). Data bersifat nominal yaitu gambaran klinis SOPK akan disajikan dalam prosentase. Uji hipotesis yang digunakan adalah uji *Chi Square* dan bila tidak memenuhi syarat dilakukan Uji *Fisher Exact Test* dan Uji *Kolmogorov-Smirnov*. Penelitian ini dilakukan setelah disetujui oleh komisi etik RS Permata Medika Semarang. Seluruh subyek telah diberi penjelasan tentang tujuan, manfaat serta prosedur penelitian dan telah memberikan *informed consent* secara tertulis. Subyek tidak dibebani biaya tambahan untuk pemeriksaan yang berkaitan dengan penelitian. Efek samping yang berkaitan dengan penelitian ditanggung oleh peneliti. Identitas subjek penelitian dirahasiakan dan tidak akan dipublikasikan tanpa seijin subyek penelitian. Sampel darah yang digunakan akan dimintakan persetujuan tertulis bahwa sampel darah yang digunakan dapat dipakai lagi dalam penelitian lain apabila pasien setuju.

HASIL

Data karakteristik subjek penelitian didapatkan perbedaan yang bermakna pada kedua kelompok karena memang pada penelitian ini diperlukan kelompok kontrol yang berbeda karakteristiknya dengan kelompok kasus dalam hal resistensi insulin. Pada kedua kelompok didapatkan bahwa umur, IMT, gejala klinis oligo/anovulasi, hiperandrogenisme klinis, ovarium polistik, insulin puasa serta HOMA-IR berbeda bermakna antara kedua kelompok ($p < 0,05$), namun rerata gula

darah puasa pada kedua kelompok ditemukan berbeda tidak bermakna ($p = 0,016$).

Rerata umur pada kedua kelompok berbeda bermakna ($p = 0,001$) dimana rerata umur kelompok kasus ($27,54 \pm 4,54$ tahun) lebih muda dibandingkan pada kelompok kontrol ($31,67 \pm 3,70$ tahun). Rerata BMI pada kelompok kasus adalah $30,62 \pm 5,52$ kg/m² lebih tinggi dibandingkan dengan kelompok kontrol yaitu $23,45 \pm 4,33$ kg/m² dengan hasil berbeda bermakna ($p = 0,000$). Gambaran klinis yang paling sering dijumpai pada kelompok SOPK adalah gambaran ovarium polistik yang didapatkan pada USG transvaginal (100%) kemudian diikuti dengan oligo/anovulasi sebanyak 83,3% dan hiperandrogenisme klinis yang ditentukan berdasar skor *Ferriman-Galwey* hanya ditemui pada 29,2% subjek.

Rerata gula darah puasa pada pasien kelompok kasus adalah 90,5 (71–186) mg/dL dan kelompok kontrol 82,5 (73–94) mg/dL dengan hasil berbeda tidak bermakna ($p = 0,016$). Walaupun rerata gula darah puasa pada kedua kelompok hampir sama namun pada didapatkan rerata GDP kelompok kasus lebih tinggi daripada kelompok kontrol. Rerata insulin puasa pada kelompok kasus 21,95 (10,2–128) μ IU/mL dan kelompok kontrol 4,61 (2,1–49) μ IU/mL berbeda bermakna ($p = 0,000$). Pada penelitian ini didapatkan bahwa rerata insulin puasa pada kelompok kasus jauh lebih tinggi dibandingkan kelompok kontrol. Kedua kelompok dibedakan menjadi kelompok dengan resistensi insulin apabila nilai HOMA-IR > 2 dan tidak resistensi insulin bila HOMA-IR ≤ 2 . Pada kedua kelompok didapatkan nilai HOMA-IR berbeda bermakna ($p = 0,000$) dengan rerata HOMA-IR pada

Tabel 1. Karakteristik klinis dan parameter resistensi insulin pada kelompok SOPK dan kelompok kontrol

Variabel	Kelompok		p
	Kasus (n =24)	Kontrol (n =24)	
Umur (tahun)	27,54 \pm 4,54	31,67 \pm 3,70	0,001*§
IMT (kg/m ²)	30,62 \pm 5,52	23,45 \pm 4,33	0,000*§
Oligo/anovulasi (%)	20 (83,3)	0 (0)	0,000*¥
Hiperandrogenisme klinis (%)	7 (29,2)	0 (0)	0,010*¥
Ovarium polistik (%)	24 (100)	0 (0)	0,000*¥
GDP (mg/dL)	90,5 (71 - 186)	82,5 (73 - 94)	0,016*‡
IP (μ IU/mL)	21,95 (10,2 - 128)	4,61 (2,1 - 49)	0,000*‡
HOMA-IR	4,24 (2,33 - 17,47)	0,97 (0,42 - 1,88)	0,000*‡

IMT: indeks massa tubuh; GDP: gula darah puasa; IP: insulin puasa; HOMA-IR: *homeostatic model assesment of insulin resistance*; * Bermakna bila $p < 0,05$; § *Independent t-test*; ‡ Uji *Mann-Whitney U*; ¥ *Chi Square*



Gambar 2. Gambar 10. Hasil RFLP gen INSR. M; marker, Bl: basepair ladder (50 bp), kolom 1: CT, kolom 2: TT, kolom 3: CC, kolom 4: CC, kolom 5: CT. Pada kolom CC didapatkan 2 fragmen dengan ukuran 274 bp dan 43 bp, pada kolom CT didapatkan 3 fragmen ukuran 317 bp, 274 bp dan 43 bp serta kolom TT didapatkan 1 fragmen dengan ukuran 317 bp. Box sebelah kanan menunjukkan besaran produk gen INSR.

masing-masing kelompok kasus dan kontrol adalah 4,24 (2,33–17,47) dan 0,97 (0,42–1,88).

Amplifikasi DNA pada exon 17 C/T His 1058 dengan metode PCR dilakukan di CEBIOR dengan besar produk yang diharapkan adalah 317 bp dengan marker kelipatan 50 bp yang dijadikan sebagai pengukur. Hasil *restriction fragment length polymorphism analysis* dapat dilihat pada gambar 8 dimana didapatkan 3 genotip dari site His 1058 gen INSR yaitu CC, CT dan TT. Genotip CC menunjukkan C alel homozygot sekaligus memperlihatkan bahwa enzim restriksi PmlI dapat mengenali CACGTG dan dihasilkan 2 fragmen sebesar 274 bp dan 43 bp. Genotip CT menunjukkan heterozygot dengan dihasilkan 3 fragmen yaitu 317bp, 274bp dan 43bp sedangkan genotip TT menunjukkan adanya mutasi dan ditandai dengan terdapat hanya 1 fragmen sebesar 317 bp (gambar 2).

Pada tabel 2 dapat dilihat bahwa genotip dari kelompok kasus dan kelompok kontrol didapatkan perbedaan tidak bermakna ($p=0,441$). Proporsi genotip TT pada kelompok kontrol (50%) didapatkan lebih tinggi dibandingkan pada kelompok kasus (25%) sedangkan proporsi genotip CT pada kelompok kasus didapatkan sedikit lebih tinggi dibandingkan kelompok kontrol (kelompok kasus: 50% dan kelompok kontrol:

41,7%). Proporsi genotip CC pada kelompok kontrol lebih rendah dibandingkan dengan kelompok kasus (kelompok kasus: 25% dan kelompok kontrol: 8,3%).

Apabila hasil penelitian dianalisis berdasarkan distribusi alel T pada kedua kelompok maka didapatkan bahwa alel T pada kedua kelompok berbeda bermakna ($p=0,037$) dengan *prevalence rate* 0,412 (0,18–0,96). Pada kelompok kontrol didapatkan alel T lebih tinggi daripada kelompok kasus (kelompok kasus: 50% dan kelompok kontrol 70,8%) sedangkan distribusi alel C pada kelompok kasus lebih tinggi daripada kelompok kontrol (kelompok kasus: 50% dan kelompok kontrol 29,2%). Pada kelompok kasus didapatkan proporsi alel T dan alel C yang sama (tabel 3).

Dalam menentukan diagnosis PCOS pada penelitian ini dipakai 3 parameter yaitu oligoovulasi/anovuasi, hiperandrogenisme klinis (skor *Ferriman Galwey* >8) dan gambaran ovarium polikistik pada pemeriksaan USG transvaginal pada hari ketiga menstruasi pada pasien dengan haid teratur sedangkan pada pasien dengan anovulasi USG dilakukan pada saat pasien datang untuk berkonsultasi. Pada kelompok kontrol tidak didapatkan tiga karakteristik tersebut dan pada kelompok kasus ditemukan 83,3% pasien mengalami oligo/anovulasi, hiperandrogenisme

Tabel 2. Perbedaan distribusi SNP exon 17 C/T His 1058 gen INSR pada kelompok perempuan SOPK dengan resistensi insulin dan kelompok kontrol

SNP	Kelompok Kasus (%) <i>n</i> =24	Kelompok Kasus (%) <i>n</i> =24	<i>p</i>
TT	6 (25)	12 (50)	0,441 [£]
CT	12 (50)	10 (41,7)	
CC	6 (25)	2 (8,3)	

SNP: *single nucleotide polymorphism* £ Uji Kolmogorov Smirnov**Tabel 3.** Asosiasi alel exon 17 C/T His 1058 gen INSR dengan kelompok perempuan SOPK dengan resistensi insulin dan kelompok kontrol

Alel	Kelompok		<i>p</i>	PR (CI 95%)
	Kasus	Kontrol		
Alel T	24 (50)	34 (70,8)	0,037	0,412 (0,18 - 0,96)
Alel C	24 (50)	14 (29,2)		

* Uji Chi Square, PR: *prevalence rate*, CI: *confidence interval***Tabel 4.** Asosiasi alel exon 17 C/T His 1058 gen INSR dengan kelompok perempuan SOPK dengan resistensi insulin dan kelompok kontrol

Alel	Kelompok		<i>p</i>	PR (CI 95%)
	Kasus	Kontrol		
Alel T	24 (50)	34 (70,8)	0,037	0,412 (0,18 - 0,96)
Alel C	24 (50)	14 (29,2)		

* Uji Chi Square, PR: *prevalence rate*, CI: *confidence interval*

klinis didapatkan pada 29,2% pasien serta gambaran ovarium polikistik pada semua pasien SOPK (Tabel 4).

Perempuan dengan SOPK tidak selalu mempunyai ketiga karakteristik kriteria Rotterdam, bahkan pada ras Asia jarang ditemukan pasien dengan gambaran klinis hiperandrogenisme berupa hirsutisme.²⁰ Pada penelitian ini ditemukan bahwa sebagian besar penderita SOPK mempunyai gejala oligo/anovulasi dan didapatkan gambaran ovarium polikistik (70,83%). Fenotip 3 (hiperandrogenisme dan ovarium polikistik) ditemukan pada 16,67% penderita SOPK, fenotip 1 (oligo/anovulasi, hiperandrogenisme dan ovarium polikistik) ditemukan pada 12,5% penderita SOPK sedangkan fenotip 2 berupa oligo/anovulasi dan ovarium polikistik tidak ditemukan pada subjek penelitian (Tabel 5).

Pada seluruh genotip (TT,CT, CC), fenotip yang paling sering ditemui adalah fenotip 4 (oligo/anovulasi dan ovarium polikistik) diikuti oleh fenotip 3 dan fenotip 1. Hasil uji beda distribusi antara genotip gen INSR dengan fenotip kelompok kasus didapatkan berbeda tidak bermakna

($p=1,000$) dan $r=0,278$. Hasil ini menunjukkan tidak ada satu genotip khusus yang dapat menjadi faktor risiko terjadinya salah satu fenotip.

Pada alel T ditemukan bahwa gambaran fenotip yang paling sering ditemukan adalah oligo/anovulasi dan ovarium polikistik hasil ini sama dengan alel C dimana fenotip 4 paling sering ditemui. Pada alel T gambaran genotip 3 (HA+PCO) didapatkan lebih banyak dibandingkan dengan kelompok kontrol. Sedangkan fenotip 1 (ANOV+HA+PCO) ditemukan dalam jumlah yang sama pada kedua alel. Perbedaan distribusi fenotip berdasar alel ditemukan berbeda tidak bermakna ($p=1,000$) diantara kedua alel walaupun frekuensi fenotip 4 lebih tinggi dibandingkan dengan fenotip yang lain (Tabel 6).

PEMBAHASAN

Pasien dengan SOPK rentan untuk mengalami komplikasi diabetes mellitus tipe 2 dengan gejala intoleransi glukosa dan resistensi insulin. Maka gen - gen yang berkaitan dengan aksi insulin dapat berkaitan juga dengan SOPK. Gen INSR terdiri dari

22 exon sebesar 120 kb pada kromosom 19. Exon 17 – 21 adalah regio yang mengkode domain tirosin kinase pada reseptor insulin, dan mutasi pada exon tersebut akan menyebabkan resistensi insulin yang berat dan hiperinsulinemia. Beberapa peneliti juga menemukan perubahan autofosforilasi akibat polimorfisme pada domain tirosin kinase. Polimorfisme *INSR* yang paling banyak dipelajari adalah polimorfisme C/T His1058 (rs1799817) yang terletak pada exon 17 yang mengkode domain tyrosine kinase secara parsial pada *INSR* serta banyak diteliti korelasinya dengan SOPK pada banyak populasi.

Pada penelitian ini kami menganalisis asosiasi antara polimorfisme His 1058 C/T pada domain tirosin kinase gen *INSR* pada penderita SOPK dengan resistensi insulin. Rerata IMT pada kelompok SOPK menunjukkan sebagian besar subjek adalah penderita SOPK tipe obese (IMT = $30,62 \pm 5,52$ kg/m²) dan semuanya mengalami resistensi insulin (HOMA R = 4,24 (2,33 – 17,47)). Sedangkan pada kelompok kontrol, subjek mempunyai IMT tipe *lean* ($23,45 \pm 4,33$ kg/m²) dan tidak mengalami resistensi insulin (HOMA R = 0,97 (0,42 – 1,88)). Frekuensi genotip CC dan CT/TT pada kedua kelompok hampir sama dan bahkan frekuensi alel T lebih tinggi pada kelompok kontrol dibandingkan dengan kelompok SOPK (kelompok SOPK: 50% dan kelompok kontrol: 70,8%). Hasil penelitian tersebut memperlihatkan bahwa hasil penelitian yang didapatkan tidak sesuai dengan hipotesis yang dikemukakan.

Pada penelitian Siegel dkk tahun 2002 didapatkan hasil bahwa polimorfisme pada gen *INSR* ditemukan pada pasien dengan SOPK dengan BMI ≤ 27 kg/m² (tipe *lean*) sedangkan SOPK pada tipe obese (BMI >27 kg/m²) polimorfisme didapatkan perbedaan tidak bermakna dibandingkan subjek obese namun tidak menderita SOPK. Genotip CT + TT pada kelompok SOPK tipe *lean* ditemukan lebih banyak bila dibandingkan kelompok kontrol tipe *lean* (47% vs 29%, $p=0,03$). SOPK mempunyai ekspresi fenotip yang dipengaruhi oleh banyak gen maka mungkin saja hanya sebagian tipe saja yang mempunyai korelasi dengan polimorfisme gen *INSR*. Mekanisme yang mendasari mengapa polimorfisme banyak terjadi pada pasien SOPK tipe *lean* dan bukan tipe obese walau resistensi insulin jelas berkaitan dengan obesitas belum diketahui dengan jelas. Obesitas

merupakan faktor predisposisi untuk terjadinya hiperandrogenisme pada populasi di Amerika, hal ini dibuktikan dengan adanya korelasi IMT dengan kadar testosteron dan *free androgen index* (FAI). Temuan ini menjelaskan bagaimana obesitas dan resistensi insulin berperan dalam perkembangan SOPK. Beberapa penelitian menyebutkan bahwa resistensi insulin pada SOPK tidak bergantung pada berat badan maka polimorfisme gen *INSR* dapat menjelaskan mengapa terjadi resistensi insulin pada pasien SOPK tipe *lean*.⁷

Pada penelitian Mukherjee (2009) di India juga didapatkan polimorfisme C/T pada His1058 gen *INSR* pada penderita SOPK tipe *lean* dan bukan pada tipe obese. Genotip CT+TT didapatkan lebih banyak pada kelompok pasien SOPK tipe *lean* (69,3%) bila dibandingkan dengan kelompok kontrol tipe *lean* (46,4%, $p=0,004$) dengan frekuensi genotip TT yang rendah pada kedua grup. Semua penderita SOPK pada penelitian tersebut mengalami resistensi insulin dimana pada kelompok SOPK tipe *lean* (rerata IMT: $20,07 \pm 1,95$ kg/m²) didapatkan rerata HOMA R $2,18 \pm 1,02$ dan pada kelompok SOPK tipe obese (rerata IMT: $28,53 \pm 4,67$ kg/m²) didapatkan rerata HOMA R $2,31 \pm 1,75$. Hasil penelitian pada populasi China juga serupa dimana pada penderita SOPK non obese lebih banyak ditemukan polimorfisme dibandingkan kelompok SOPK tipe obese (52,2% vs 25,5%, $p<0,01$).¹⁰

Hasil penelitian-penelitian tersebut menunjukkan bahwa SNP exon 17 C/T His 1058 gen *INSR* mempunyai asosiasi dengan resistensi insulin pada pasien SOPK tipe *lean* walaupun secara teori obesitas berkaitan dengan resistensi insulin. Namun fakta ini menunjukkan kemungkinan bahwa SNP exon 17 C/T His 1058 gen *INSR* dapat berperan langsung dalam terjadinya resistensi insulin pada SOPK tipe *lean*. Polimorfisme ini dapat memicu perempuan kurus (tipe *lean*) untuk mengalami resistensi insulin dan hiperinsulinemia yang masih dapat dikompensasi yang kemudian akan memicu hiper androgenisme yang akan berkembang menjadi SOPK. Walaupun banyak penelitian yang mendukung hipotesis di atas namun penelitian pada beberapa populasi lain menunjukkan hasil yang berbeda.

Hasil penelitian di Korea menunjukkan hasil yang serupa dengan penelitian ini dimana frekuensi genotip CC dan CT /TT sama antara kelompok

pasien dan kontrol. Fakta yang menarik adalah alel T ditemukan sedikit lebih tinggi pada kelompok kontrol daripada kelompok SOPK (kelompok SOPK: 60,35%, kelompok kontrol: 66,67%) walaupun perbedaannya tidak bermakna. Pada penelitian tersebut sebagian besar subjek adalah tipe *lean* dengan rerata BMI pada kelompok SOPK adalah 22,67 kg/m²) maka hasil tersebut tidak menunjukkan bahwa SNP exon 17 C/T His 1058 gen INSR berkaitan dengan mekanisme resistensi insulin pada SOPK tipe *lean* seperti yang ditemukan pada penelitian Siegel dkk dan Mukherjee dkk.¹⁶

Pada penelitian di Irak didapatkan hasil tidak ditemukan polimorfisme baik pada kelompok kontrol maupun kelompok kasus. Semua sampel penelitian menunjukkan band sebesar 317 bp setelah restriksi. Sebagian besar subjek penelitian adalah SOPK adalah tipe obese (64,4%) dengan definisi tipe obese adalah IMT >27 kg/m². Argumentasi yang dikemukakan adalah bahwa resistensi insulin pada pasien SOPK berkaitan dengan penyebab selain gen INSR, metode skrining polimorfisme yang digunakan berbeda dengan penelitian lain dan faktor etnis/ras yang berbeda. Penelitian lain yang mempunyai temuan yang sama adalah penelitian pada populasi di Kroasia dimana genotip CT+TT yang ditemukan pada kelompok SOPK dan kelompok kontrol berbeda tidak bermakna.⁹

Skrgatic dkk menemukan bahwa genotip TT lebih banyak ditemukan pada kelompok kontrol dibandingkan dengan kelompok kasus (kelompok kasus: 2,6% dan kelompok kontrol: 3,9%), hal ini serupa dengan hasil penelitian ini dan sebuah penelitian di Turki. Pada penelitian ini subjek penelitian secara umum adalah SOPK tipe *lean* 26,7±5,9 kg/m² dengan rerata HOMA-IR 2,3±2,8 namun tetapi tidak ditemukan asosiasi antara polimorfisme gen dengan resistensi insulin pada SOPK tipe *lean*. Kesimpulan dari penelitian tersebut bahwa polimorfisme tersebut tidak berkaitan dengan meningkatnya nilai parameter resistensi insulin pada pasien SOPK.²⁰

Hasil penelitian-penelitian di Korea, Irak dan Kroasia menunjukkan hasil yang amat berbeda dengan hasil penelitian-penelitian sebelumnya bukan saja dalam hal kaitannya dengan tidak ditemukan asosiasi SNP exon 17 C/T His 1058 gen INSR pada SOPK dengan resistensi insulin namun juga membantah teori bahwa polimorfisme dapat

menjelaskan kejadian resistensi insulin pada SOPK tipe *lean* karena subjek penelitian di Korea dan Kroasia sebagian besar adalah SOPK tipe *lean* dengan rerata IMT < 27 kg/m². Perbedaan hasil ini dapat disebabkan karena tiga hal, pertama karena ada perbedaan pola polimorfisme pada tiap ras, kedua karena SNP exon 17 C/T His 1058 gen INSR bukan merupakan gen utama yang berperan dalam mekanisme resistensi insulin walaupun gen ini berperan langsung dalam fungsi reseptor insulin dan argumen ketiga adalah karena adanya ketidakseragaman dalam definisi resistensi insulin berdasarkan nilai HOMA-IR serta dalam hal kriteria penentuan SOPK tipe obese dan tipe *lean*.

Penelitian ini merupakan penelitian pertama di Indonesia yang meneliti mengenai polimorfisme gen INSR dalam kaitannya dengan resistensi insulin pada SOPK khususnya pada ras Jawa (Deutro-Melayu). Polimorfisme gen amat dipengaruhi oleh ras, hal terbukti dengan bervariasinya hasil analisis polimorfisme ini di ras-ras lain seperti India, China, Kaukasia, Korea, Kroasia, Turki maupun Irak. Sebuah metaanalisis yang menganalisis hubungan SNP exon 17 C/T His 1058 gen INSR pada SOPK dengan resistensi insulin menyimpulkan bahwa SNP tidak berperan langsung namun masih menyarankan diperlukan penelitian lain dengan desain yang lebih baik dan multiras atau multi-etnis.²¹

Sensitivitas insulin yang terganggu baik secara *in vivo* maupun *in vitro* memimpin pada hipotesis bahwa lesi genetik dari gen reseptor insulin atau pensinyalan *post reseptor* dapat berkontribusi pada patogenesis SOPK. Polimorfisme sendiri didefinisikan sebagai variasi natural pada gen, *sequence* DNA atau kromosom yang tidak mempunyai efek negatif/membahayakan pada individu dan kejadiannya cukup tinggi pada populasi umum. Penelitian molekuler terhadap regio pengkode gen reseptor insulin pada perempuan dengan SOPK memperlihatkan sejumlah besar polimorfisme namun sebagian besar polimorfisme tersebut juga dapat diidentifikasi pada subjek normal dan dianggap sebagai polimorfisme yang umum yang tidak menunjukkan gangguan nyata pada fungsi reseptor insulin.^{18,22,23}

Shaikh dkk menjelaskan bahwa interaksi insulin dengan reseptor insulin (INSR) memicu kaskade sinyal molekuler penting yang berpartisipasi secara aktif dalam aksi biologis sel target yang berkaitan

(gambar 4). Hal ini menunjukkan bahwa sebenarnya INSR berperan penting dalam terjadinya autofosforilasi tirosin karena ia mengkode domain tirosin kinase pada reseptor insulin walaupun bersifat parsial. Maka peran gen INSR walaupun memegang peranan penting tetap tergantung pada kinerja gen lain seperti IRS, INS, EPPN1, PPAR γ dan Calpain 10 yang semuanya berperan dalam pensinyalan insulin. Selain itu juga ditemukan beberapa polimorfisme yang dapat berkaitan dengan SOPK yaitu polimorfisme baru T/C pada Cys1008 ditemukan berkaitan dengan SOPK dan menurunnya sensitivitas insulin pada populasi China. Penelitian lain juga menemukan variasi C/T pada Tyr984 yang bersifat *silent* pada pasien SOPK dan penderita diabetes mellitus. Pada beberapa penelitian di Korea, mereka memilih untuk dilakukan *sequencing* pada seluruh gen INSR dan menemukan polimorfisme baru yang berkaitan dengan SOPK dan resistensi insulin seperti rs2252673. Pada penelitian di China mereka melakukan hal yang sama namun tidak menemukan polimorfisme baru yang berkaitan dengan SOPK dan resistensi insulin.^{6,19,24,25}

Dunaif dkk pada observasinya mengemukakan bahwa pada 50% kejadian resistensi insulin pada penderita SOPK mekanisme yang terjadi adalah akibat penurunan autofosforilasi tirosin dan meningkatnya autofosforilasi serin sedangkan mekanisme yang lain belum diketahui. Observasi pada hasil penelitian ini menunjukkan bahwa mekanisme bagaimana polimorfisme gen dapat menyebabkan resistensi insulin pada SOPK berbeda pada tipe *lean* maupun tipe obese yang memerlukan penelitian lebih lanjut dengan teknik pemeriksaan yang lebih baik seperti DNA *sequencing* untuk menemukan defek gen yang berperan langsung dalam mekanisme resistensi insulin pada SOPK. Speroff menyatakan bahwa SOPK merupakan kelainan yang bersifat poligenik yang melibatkan banyak gen dan dipengaruhi oleh faktor lingkungan. Banyaknya gen yang terlibat menunjukkan bahwa SOPK merupakan kelainan endokrin yang spesifik dan merupakan akibat dari anovulasi kronik karena berbagai penyebab.⁵

Penelitian ini semula bertujuan untuk mencari asosiasi polimorfisme gen INSR akibat resistensi insulin dan pada beberapa penelitian juga menunjukkan bahwa resistensi insulin memang berkaitan dengan resistensi insulin khususnya pada

tipe *lean*. Namun pada penelitian ini subjek dengan resistensi insulin mempunyai rerata IMT tipe obese (BMI >27 kg/m²) sehingga hasil yang didapatkan berbeda tidak bermakna. Maka dapat disimpulkan bahwa resistensi insulin yang terjadi pada subjek penelitian tidak berkorelasi dengan polimorfisme pada gen INSR yang mengkode reseptor insulin dan didapatkan bahwa obesitas (IMT >30 kg/m²) berkorelasi dengan resistensi insulin. Maka penentuan tipe obese dan tipe *lean* pada SOPK sebaiknya tidak semata-mata berdasarkan IMT namun bisa dipertimbangkan metode lain yang lebih akurat untuk mengidentifikasi obese tipe sentral yaitu dengan *waist circumference* atau *waist/hip ratio*.

Bervariasinya hasil penelitian dapat diakibatkan karena belum adanya kriteria yang seragam dalam hal menentukan batasan nilai HOMA-IR untuk menentukan kriteria resistensi insulin serta batasan SOPK tipe obese maupun tipe *lean*. Pada penelitian di Kroasia digunakan HOMA-IR 2,5 untuk menentukan resistensi insulin bahkan pada penelitian di Irak bahkan digunakan batasan HOMA-IR 1,9, sedangkan pada penelitian ini yang dipakai adalah 2. Parameter lain yang dapat digunakan untuk menentukan resistensi insulin adalah kriteria Muharam dimana hasil rasio insulin puasa/glukosa puasa >10. Penentuan tipe obese dan *lean* pada penelitian Siegel digunakan batasan IMT 27 kg/m², di India peneliti menggunakan batasan IMT 23 kg/m², pada penelitian ini digunakan batasan IMT >25 kg/m².^{10,14,20}

Perbedaan hasil ini pada penelitian ini dimana alel C lebih banyak ditemukan pada kelompok SOPK dengan resistensi insulin dibandingkan dengan kelompok kontrol ($p=0,037$) dapat menjadi bahan pertimbangan apakah benar alel T adalah mutan dan alel C yang bersifat *wild type*. Mutib dkk pada penelitian di Irak menunjukkan bahwa genotip CC lebih tinggi pada kelompok SOPK baik tipe obese maupun tipe *lean* dan genotip TT lebih tinggi pada kelompok kontrol yang mengalami obesitas maupun tidak. Pada penelitian ini juga menunjukkan bahwa genotip CC berkaitan dengan IMT dan *waist-hip ratio* yang meningkat, tes intoleransi glukosa yang abnormal, profil lipid yang abnormal dan resistensi insulin. Penelitian tersebut menyatakan bahwa SNP pada exon 17 gen INSR (*domain tyrosin kinase*) berkaitan dengan resistensi insulin dan atherogenik lipoprotein yang berperan

dalam pathogenesis SOPK pada perempuan Irak namun tidak menyatakan alel manakah yang bersifat mutan.

Pada penelitian di Jepang, Kashima dkk menemukan bahwa frekuensi genotip CC hampir sama pada kelompok pasien SOPK (47,5%) dan kelompok kontrol (35,4%). Pada kelompok pasien dengan $IMT \leq 20 \text{ kg/m}^2$, frekuensi genotip CC lebih tinggi pada kelompok SOPK (65,0%) daripada kelompok kontrol yaitu sebanyak 36,6% ($p < 0,05$). Berdasar hasil tersebut genotip CC berkaitan dengan kejadian SOPK khususnya tipe *lean*. Kesimpulan yang ditarik adalah bahwa SNP exon 17 gen INSR ini berkaitan dengan pathogenesis SOPK tipe *lean* pada perempuan di Jepang.

Pada gambaran fenotip SOPK sesuai kriteria Rotterdam didapatkan gambaran oligo/anovulasi dan ovarium polikistik yang paling sering ditemui yaitu sebesar 70,83%. Fenotip yang tidak ditemui adalah oligo/anovulasi yang disertai hiperandrogenisme klinis. Hasil ini sesuai dengan penelitian Pangastuti dkk di RS Cipto Mangunkusumo Jakarta dimana fenotip yang paling sering ditemui adalah oligo/anovulasi dan ovarium polikistik sebanyak 44,8% dan yang paling jarang dijumpai adalah hiperandrogenisme dan ovarium polikistik (4,8%). Hiperandrogenisme klinis pada penelitian di Jakarta ditemukan paling sedikit diantara gambaran klinis lain yaitu sebesar 32,4%, hal ini sama dengan hasil penelitian ini dimana hiperandrogenisme klinis hanya ditemukan pada 29,2% subjek penelitian. Hiperandrogenisme klinis berupa hirsutisme ditemukan bervariasi antara ras dan suku serta juga berbeda dalam hal respon gen kelenjar pilosebaseus terhadap hormon androgen yang bersirkulasi, hal ini dapat menerangkan mengapa hiperandrogenisme di Indonesia merupakan gambaran klinis yang paling jarang ditemui (26,2%).²⁶

Hasil ini berbeda dengan penelitian di Yunani dimana fenotip yang paling sering dijumpai pada usia 21–30 tahun adalah oligo/anovulasi, hiperandrogenisme dan ovarium polikistik (50,2%) sedangkan anovulasi dan polikistik hanya ditemukan pada 9,5% populasi. Gambaran fenotip ditemukan juga pada usia <20 tahunan sedangkan pada usia 31–39 tahun fenotip yang paling sering dijumpai adalah fenotip 4 (oligo/anovulasi dan ovarium polikistik). Fenotip yang tidak mengalami perubahan berdasarkan umur adalah fenotip 2

(oligo/anovulasi dan hiperandrogenisme) serta fenotip 3 (hiperandrogenisme dan ovarium polikistik).

Penelitian ini juga menunjukkan bahwa hiperandrogenisme menurun dengan bertambahnya umur namun resistensi insulin meningkat dengan bertambahnya umur dan kemungkinan penyebab utamanya adalah meningkatnya obesitas abdomen (IMT , *waist circumference* dan *waist-to-hip ratio*). Hasil ini serupa dengan penelitian ini dimana subjek penelitian dengan IMT dengan kategori *overweight* dan obes mengalami resistensi insulin. Sebagian besar subjek penelitian ini yang mengalami resistensi insulin berusia <30 tahun ($27,54 \pm 4,54$) sedangkan pada kelompok yang tidak mengalami resistensi berusia >30 tahun, hal ini menunjukkan bahwa umur tidak berkaitan langsung dengan resistensi insulin namun cenderung pada faktor IMT yang memang berkaitan dengan kejadian resistensi insulin yang meningkat seperti pada temuan penelitian Panidis dkk. Pada penelitian ini tidak dilakukan analisis asosiasi antara umur dengan kejadian resistensi insulin dan alel T. Pada penelitian ini didapatkan bahwa alel T bukan merupakan faktor yang berperan dalam timbulnya manifestasi klinis baik berupa oligo/anovulasi maupun hiperandrogenisme, alel T juga tidak berkaitan dengan timbulnya salah satu fenotip. Hasil tersebut menunjukkan peran lemah alel T terhadap timbulnya gejala klinis SOPK.

Hasil penelitian ini berbeda dengan penelitian-penelitian lain karena adanya perbedaan pola polimorfisme di antara ras/etnis di dunia dan perbedaan mekanisme terjadinya resistensi insulin pada berbagai macam varian SOPK. Kelebihan penelitian ini adalah karena pertama kali dilakukan identifikasi SNP exon 17 C/T His 1058 di Indonesia walaupun belum secara spesifik dilakukan pada ras tertentu. Subjek penelitian yang dibandingkan adalah subjek dengan resistensi insulin dan bukan resistensi insulin, dengan tidak ditemukannya asosiasi maka perlu dipertimbangkan ulang peran polimorfisme ini pada patogenesis resistensi insulin pada SOPK. Hal lain yang dapat berperan dalam perbedaan hasil adalah penentuan obesitas sentral yang hanya menggunakan IMT dan belum menggunakan *waist circumference* dan *waist-to-hip ratio*. Keterbatasan lain yang dapat berkontribusi adalah teknik pemeriksaan genetik yang digunakan

dan belum mempertimbangkan faktor penurunan genetik pada keluarga (penelusuran etnis, riwayat SOPK pada keluarga).

SIMPULAN

Tidak terdapat asosiasi antara SNP exon 17 C/T His 1058 gen INSR dengan perempuan dengan sindrom ovarium polikistik dengan resistensi insulin di Indonesia. Fenotip yang paling banyak ditemui pada perempuan dengan sindrom ovarium polikistik dengan resistensi insulin adalah oligo/anovulasi dan ovarium polikistik. Alel C berasosiasi dengan kejadian resistensi insulin pada penderita SOPK dan dapat dianggap sebagai alel yang mutan.

Perlu dilakukan pemeriksaan yang lebih baik untuk mengidentifikasi polimorfisme lain pada gen INSR seperti DNA sequencing.

DAFTAR PUSTAKA

- Kosova G, Urbanek M. Genetics of the Polycystic Ovary Syndrom. *Mol Cell Endocrinol*. 2013;373(0):29-38.
- Daan NMP, Louwers YV, Koster MP, Eijkemans MJC, dr Rijke YB, Lentjes EWG, et al. Cardiovascular and metabolic profiles amongst different polycystic ovary syndrome phenotypes: who is really at risk? *Fertil Steril*. 2014;102:1444-51.
- Peigné M, Dewailly D. Review: Long term complications of polycystic ovary syndrome (PCOS). *Annales d'Endocrinologie*. 2014;75:194-199
- Ferk P, Perme MP, Gersak K. Insulin Gene Polymorphism. *The Journal of International Medical Research*. 2008;36:1180-7.
- Sperroff L, Glass RH, Kase NG. Clinical Gynecologic Endocrinology and Infertility. 8th ed. Baltimore: Lippincott Williams & Wilkins. 2011; p.495-531.
- Shaikh, N, Dadachanji R, Mukherjee S. Genetic Markers of Polycystic Ovary Syndrome: Emphasis on Insulin Resistance. *International Journal of Medical Genetics*. 2014: 1-10.
- Siegel S, Futterweit W, Davies TF, Conception ES, Greenberg Da, Villanueva R, et al. A C/T single nucleotide polymorphism at the tyrosine kinase domain of the insulin receptor gene is associated with polycystic ovarian syndrome. *Fertil Steril*. 2002;78: 1240-3.
- Jing D, Wang J, Sun X, Xu X, Fang Z, Wang B, Shi Y, Chen Z. Family-based analysis of INSR polymorphism in Chinese PCOS. *Reproductive Biomedicine Online*. 2014(29): 239-44.
- Dhahi, RAM. Molecular Screening for Single Nucleotide Polymorphism in Insulin Receptor Gene in Iraqi Women with Polycystic Ovarian Syndrome. *International Journal of Modern Biology and Medicine*. 2013;3(17-26)
- Mukherjee S, Shaikh N, Khavale S, Shinde G, Meherji P, Shah N, Maitra A. Genetic variation in exon 17 of INSR is associated with insulin resistance and hyperandrogenemia among lean Indian women with polycystic ovary syndrome. *Eur J Endocrinol*. 2009;160:85562.
- The Rotterdam ESHRE/ASRM-Sponsored PCOS Consensus Workshop Group. Revised 2003 consensus on diagnostic criteria and long-term health risks related to polycystic ovary syndrome. *Fertil Steril*. 2004;81:19-25.
- Panidis Tziomalos K, MAcut D, Delkos D, Betsas G, Misichronis G and Katsikis I. Cross-sectional analysis of the effects of age on the hormonal, metabolic, and ultrasonographic features and the prevalence of the different phenotypes of polycystic ovary syndrome. 2012;97:494-500
- Chang JE. Polycystic Ovary Syndrome and Hyperandrogenic States. *Yen and Jaffe's Reproductive Endocrinology 7ed*. 2014;485-511.
- Wiweko B, Mulya R. Profil Resistensi Insulin pada Sindroma Ovarium Polikistik (SOPK) di RS Dr. Cipto Mangunkusumo Jakarta. *Maj Obstet Ginekol Indones*. 2008;32(2):93-98
- Ben Shlomo I, Younis JS. Basic research in PCOS: are we reaching new frontiers? *Rep Biomed*. 2014;28: 669-83.
- Lee EJ, Yoo KJ, Kim SJ, Lee SH, Cha KY, Baek KH. Single nucleotide polymorphism in exon 17 of the insulin receptor gene is not associated with polycystic ovary syndrome in a Korean population. *Fertil Steril*. 2006;86:380-4.
- Goodarzi MO, Louwers YV, Taylor KD, Jones MR, Cui J, Kwon S, Chen YD, Guo X, Stolk L, Uitterlinden AG, Laven JS, Azziz R. Replication of association of a novel insulin receptor gene polymorphism with polycystic ovary syndrome. *Fertil Steril*. 2011;95:1736-1741. e11.
- Diamanti-Kandarakis E, Piperi C. Genetics of polycystic ovary syndrome: searching the way out of labyrinth. *Hum Reprod Update*. 2005;11(6):631-43.
- Lee EJ, Oh B, Lee JY, Kimm K, Lee SH, Baek KH. A novel single nucleotide polymorphism of INSR gene for polycystic ovary syndrome. *Fertil Steril*. 2008; 89:1213-20.
- Skrgetic L, Baldani DP, Gersak K, Cerne JZ, Ferk P, Coric M. Genetic Polymorphisms of INS, INSR and IRS-1 Genes Are Not Associated with Polycystic Ovary Syndrome in Croatian Women. *Coll. Antropol*. 2013;37(1): 141-6.
- Sutanto A. Hubungan polimorfisme gen IFN γ +874 A>T dengan kejadian berulang: studi populasi pada ras Malayan-Mongoloid. Tesis. 2012. p.33-35
- Mukherjee S, Maitra A. Molecular and genetic factors contributing to insulin resistance in polycystic ovarian syndrome. *Indian J Med Res*. 2010: 743-60.
- Haring HA, Gallwitz B. Insulin resistance: pathophysiology, molecular mechanisms, genetic insights. p.10-21.
- Jin L, Zhu X, Luo Q, Qian Y, Jin F, Huang H. A novel SNP at exon 17 of INSR is associated with decreased insulin sensitivity in Chinese women with PCOS. *Mol Hum Reprod*. 2006; 12(3): 151-5.
- Xu X, Zhao H, Shi Y, You L, Bian Y, Zhao Y, Chen Z. Family association study between INSR gene polymorphism and PCOS in Han Chinese. *Reprod Biol Endocrin*, 2011; 9(76):1-5.
- Pangastuti NP, Kusumapradja, K. Profile of Polycystic Ovarian Syndrome Patients in Dr. Cipto Mangunkusumo General Hospital Jakarta March 2009 - March 2010. *Maj Obstet Ginekol Indones*. 2011;35(1):8-13

