

# Assisted Hatching

Dini Budhiarko, Caroline Tan Sardjono, Ferry Sandra  
Stem Cell and Cancer Institute, Kalbe Pharmaceutical Company, Indonesia

## ABSTRAK

*Hatching* adalah proses keluarnya embrio dari zona pelucida. Proses tersebut merupakan kunci utama pada pertumbuhan embrio. Setelah melalui proses *hatching* embrio akan berimplantasi pada endometrium dan tumbuh menjadi fetus. Bila proses *hatching* pada embrio tahap blastosit ini gagal maka implantasi dan kehamilan tidak akan terjadi dan embrio akan mengalami degenerasi atau mati. *Assisted hatching* adalah mekanisme buatan yang dilakukan untuk membantu proses *hatching*. Mekanisme buatan tersebut merupakan upaya untuk meningkatkan keberhasilan terjadinya implantasi dan kehamilan. *Assisted hatching* dapat dilakukan dengan metode *zona thinning* (penipisan zona), *zona drilling* (pengeboran zona), dan *zona slithing* (penyayatan zona). Beberapa reagen dan perlengkapan yang digunakan dalam *assisted hatching* antara lain asam tyrode, laser, pronase, dan PZD (*partial zona dissecting*). Perlu diperhatikan bahwa sekalipun melalui penerapan *assisted hatching* persentase implantasi dan kehamilan dapat meningkat, prosedur ini juga dapat menyebabkan terjadinya embrio kembar monozygot atau degenerasi pada embrio.

*Kata kunci* : *assisted hatching, asam tyrode, laser, pronase, and partial zona dissecting (PZD)*

## PENDAHULUAN

Memiliki keturunan merupakan salah satu ciri makhluk hidup. Untuk dapat memiliki keturunan diperlukan sel gamet (ovum dan sperma) serta seperangkat alat reproduksi yang memprasaranaikan proses pembentukan, pematangan sel gamet, proses fertilisasi, hingga terjadinya kehamilan sampai akhirnya fetus dilahirkan. Pada organ yang terlibat dan proses yang berjalan seringkali terjadi hambatan atau permasalahan. Salah satu permasalahan yang menyebabkan seseorang sulit atau tidak bisa memiliki keturunan secara alami adalah tidak terjadinya fertilisasi antara sel telur dan sperma. Untuk mengatasi masalah tersebut maka berkembanglah teknologi reproduksi berbantu (*assisted reproduction technology*) yang bertujuan untuk menghasilkan zigot dari fertilisasi antara sel telur dan sel sperma secara *in vitro*. Zigot yang dihasilkan kemudian dikultur dan ditransfer kembali ke dalam uterus pada saat embrio berumur 3 hari<sup>[1]</sup>.

Embrio tersebut diharapkan akan berkembang dan tumbuh, mencapai tahap blastosit, mengalami *hatching*, berimplantasi, terjadi kehamilan dan diakhiri dengan adanya kelahiran. Namun dari jumlah embrio yang ditransfer, jumlah embrio yang berimplantasi masih rendah dan tingkat kehamilan yang terjadi lebih rendah dari tingkat implantasi. Rendahnya implantasi tersebut disebabkan karena embrio yang ditransfer gagal dalam proses *hatching* (tidak dapat keluar dari zona pelucidanya)<sup>[2]</sup>. Maka muncul suatu gagasan untuk membantu proses *hatching* dengan tujuan untuk meningkatkan jumlah embrio yang berimplantasi dan kehamilan yang terjadi.

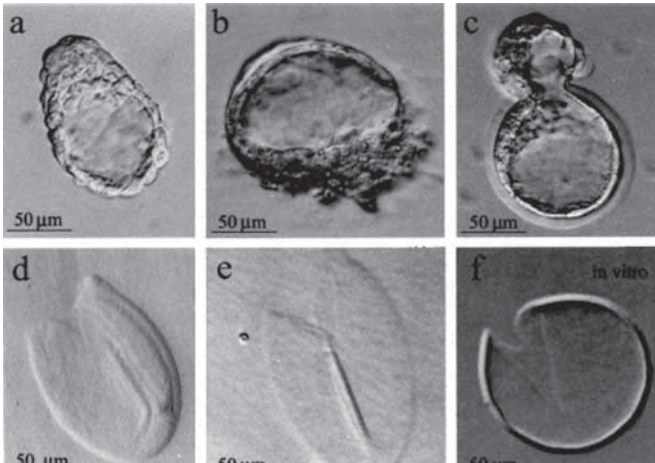
## Hatching

Zona pelucida terbentuk pada awal folikel antral, dihasilkan dari interaksi antara oosit dan sel-sel granulososa. Zona pelucida terdiri dari 3 lapis glikoprotein yang membungkus oosit, yaitu *ZP1*, *ZP2*, dan *ZP3*<sup>[3,4]</sup>. Zona tersebut berfungsi untuk melindungi dan menjaga sel telur. Pada saat fertilisasi zona pelucida melindungi dan membatasi jumlah sperma yang masuk ke dalam sel telur sehingga hanya 1 sperma saja yang dapat membuahi sel telur<sup>[5]</sup>.

Setelah terjadi pembuahan (fertilisasi), sel telur akan menjadi zigot dan mengalami pembelahan membentuk blastomer-blastomer. Pada fase ini zona pelucida berfungsi sebagai pembatas untuk menjaga kesatuan embrio saat embrio belum mengalami kompaksi (*pre-compacted*). Blastomer-blastomer tersebut dilindungi agar tidak menyebar, tetap saling berdekatan dan berinteraksi satu sama lain sampai terbentuk ikatan yang kompleks<sup>[2,6]</sup>. Setelah mengalami kompaksi maka sel-sel bagian paling luar akan mensekresikan suatu cairan. Dominasi cairan tersebut mendesak sel-sel di bagian dalam sampai terkumpul di satu sisi. Ruang yang terisi cairan tersebut dinamakan blastocoel, sel-sel bagian tepi dinamakan sel-sel *trophectoderm* dan sel-sel di bagian tengah disebut *inner cell mass*. Embrio dengan struktur seperti tersebut di atas dinamakan blastosit<sup>[1, 5]</sup>.

Pada tahap blastosit embrio akan mengalami penambahan ukuran dan volume sehingga mendesak zona pelucida. Keluarnya embrio dari zona pelucida yang melapisinya disebut dengan *hatching* (Gambar 1).

*Hatching* merupakan kunci utama pada pertumbuhan embrio. Setelah melalui proses ini maka embrio akan berimplantasi pada endometrium dan tumbuh menjadi fetus. Jika embrio pada tahap blastosit ini gagal untuk *hatching* maka implantasi dan kehamilan tidak akan pernah terjadi dan embrio tersebut akan mengalami degenerasi atau mati [1, 7].



Gambar 1. Embrio dan zona pelucida yang telah kosong setelah terjadinya proses *hatching*. (a) Blastosit setelah proses *hatching*; (b) Blastosit yang akan ber-implantasi dengan penonjolan sitoplasma sel-sel trophoctoderm; (c) proses *hatching*; (d, e, f) macam-macam bentuk bukaan dari zona pelucida yang telah kosong [8].

*Hatching* terjadi karena adanya pengaruh faktor intrinsik dan ekstrinsik. Faktor intrinsik adalah faktor yang mempengaruhi zona pelucida yang berasal dari embrio. Faktor tersebut berupa penambahan ukuran dan volume dari blastosit yang mendesak zona pelucida serta sekresi enzim oleh sel trophoctoderm. Sedangkan faktor ekstrinsik adalah faktor yang ditimbulkan dari saluran reproduksi (*in vivo*), berupa sekresi enzim yang akan berperan dalam penipisan dan pelisisan zona pelucida [8], Kiefer & Sailing 2002, Elhelw et. al. 2004). Namun mekanisme pasti proses *hatching* tersebut masih belum diketahui, hingga kini masih dipelajari apakah kedua faktor harus berinteraksi atau hanya salah satu faktor saja yang berpengaruh. Hal tersebut disebabkan adanya mekanisme *hatching* yang berbeda pada proses yang terjadi secara alami (*in vivo hatching*) pada tiap spesies [8, 9]. Pada hamster terlihat bahwa keluarnya embrio dari zona pelucida yang membungkusnya tidak bergantung pada aktivitas embrio (faktor intrinsik), namun lebih bergantung pada aktivitas sel endokrin uterus yang mengontrol sekresi enzim protease (faktor ekstrinsik) [9]. Sedangkan pada sapi mekanisme yang terjadi berbeda dengan yang terjadi pada hamster. Pada sapi proses *hatching* yang terjadi tidak bergantung pada reaksi dari *lysins* yang dihasilkan oleh sel-sel uterus.

Hasil *flushing* (pengambilan ovum/embrio dengan mengalirkan cairan pada oviduct sehingga ovum/embrio akan terbawa dan kemudian diisolasi) embrio sapi pada tahap *hatching* dari bagian uterus yang dilakukan secara berkala selalu disertai dengan zona pelucida yang kosong. Hasil tersebut mengindikasikan bahwa zona pelucida tidak mengalami pelisisan. Selain itu pengukuran yang juga dilakukan secara berkala pada volume total embrio dan ketebalan zona pelucida sapi selama embrio mengalami penambahan ukuran dan volume (*embryo expansion*) memperlihatkan penipisan zona pelucida adalah merupakan pengaruh dari dalam embrio akibat adanya daya dorong [8,9]. Hal ini menunjukkan bahwa pada hamster proses *hatching* sangat ditentukan oleh faktor ekstrinsik sedangkan pada sapi faktor yang berperan dalam proses *hatching* adalah faktor intrinsik.

Pada embrio mencit, zona pelucida diluruhkan oleh sintesis enzim tripsin yang dihasilkan oleh sel-sel *trophectoderm* (Lin et. al. 2001), enzim tersebut dikenal dengan nama stripsin [10]. Enzim yang sama menurut Gordon et. al. (1993) dan Sawada et. al. (1990) dapat dibentuk pada seluruh permukaan sel blastosit manusia, sehingga disimpulkan bahwa proses *hatching* dipengaruhi oleh faktor intrinsik [6].

Pada embrio manusia yang dihasilkan dari proses bantuan reproduksi buatan (*assisted reproduction*) baik In Vitro Fertilization (IVF) atau *Intracytoplasmic Sperm Injection* (ICSI), embrio akan ditransfer pada saat berumur 3 hari [11, 12]. Untuk membedakan apakah umur embrio yang ditransfer mempengaruhi tingkat implantasi dan kehamilan, Utsunomiya et. al. (2004) membandingkan hasil implantasi dari embrio umur 3 hari (usia embrio yang biasanya ditransfer) dan embrio umur 5-6 hari (embrio tahap blastosit). Hasil penelitian tersebut membuktikan bahwa tidak ada perbedaan pada tingkat implantasi dan kehamilan yang terjadi dari umur embrio yang ditransfer [13]. Embrio-embrio yang dihasilkan melalui proses IVF diseleksi berdasarkan morfologi dan kecepatan awal pembelahan pada saat embrio dikultur secara *in vitro*, dari hasil tersebut ditentukan embrio yang akan ditransfer. Penilaian embrio dilakukan sebagai berikut: tingkat 1 adalah embrio yang tidak mengalami kerusakan (embrio yang utuh) dengan ukuran dan bentuk blastomer yang sama (homolog), tingkat 2 adalah embrio dengan kerusakan <20% dan blastomer yang homolog, tingkat 3 adalah embrio dengan kerusakan berkisar antara 20-50% dan ukuran serta bentuk blastomer yang dimilikinya tidak sama (non homolog), tingkat 4 adalah embrio dengan kerusakan > 50% dan blastomer yang non-homolog (Fong et. al. 2001, Mantoudis et. al. 2001).

Embrio yang dipilih untuk kemudian ditransfer ke dalam uterus adalah embrio yang termasuk dalam kategori 1 dan 2 dari 4 tingkatan yang digunakan sebagai penilaian dan waktu pembelahan yang sesuai dengan tahapan [11,12].



Pada satu kali proses transfer embrio, embrio yang ditransfer berjumlah antara 2-3 embrio, untuk meningkatkan kemungkinan terjadinya implantasi dan kehamilan. Namun demikian keberhasilan implantasi dan terjadinya kehamilan masih rendah<sup>[14]</sup>. Penyebab rendahnya tingkat implantasi dan kehamilan diperkirakan karena adanya hambatan dalam proses *hatching* embrio. Hal tersebut merupakan salah satu faktor yang membatasi efisiensi reproduksi manusia yang berkaitan dengan reproduksi berbantu (*assisted reproduction*, Fong et. al. 1998,<sup>[15]</sup>).

### **Assisted hatching**

*Assisted hatching* adalah proses buatan yang dilakukan untuk membantu keluarnya embrio dari zona pelucida (*hatching*)<sup>[6]</sup>. *Assisted hatching* merupakan upaya untuk meningkatkan terjadinya implantasi dan kehamilan dengan memastikan bahwa embrio yang ditransfer dapat keluar dari zona pelucida<sup>[16,17]</sup>. Konsep tersebut pertama kali dikemukakan oleh Cohen pada tahun 1990. Cohen melakukan *assisted hatching* dengan sistem *zona drilling* menggunakan asam tyrode pada embrio umur 3 hari<sup>[18]</sup>. Tingkat implantasi pada embrio dengan metode tersebut lebih tinggi dibandingkan tingkat implantasi pada embrio kontrol, embrio yang mengalami proses *hatching* secara alami, sehingga pada embrio hasil IVF dilakukan teknik *assisted hatching* untuk meningkatkan efisiensi dari implantasi<sup>[18]</sup>.

Pada awalnya *assisted hatching* pada manusia dilakukan hanya pada embrio yang dihasilkan dari wanita-wanita yang termasuk dalam kategori sebagai berikut: berumur > 35 tahun dan atau mendapat stimulasi dengan *Follicle Stimulating Hormone* (FSH) dengan dosis tinggi (> 10 mIU/ml antara hari 2 dan 4), pernah mengalami kegagalan implantasi pada siklus IVF termasuk ICSI (*Intracytoplasmic Sperm Injection*) yang dilakukan sebelumnya, memiliki kualitas embrio yang rendah (tingkat 3 dan 4), dan zona pelucida yang tebal (> 15\_μm)<sup>[12, 17]</sup>.

Namun demikian ternyata embrio dengan kategori dan perkembangan yang baik juga tetap mempunyai potensi mengalami kegagalan dalam implantasi yang disebabkan kesulitan pada proses *hatching*-nya. Hasil penelitian Nishio et. al. (2006) memperlihatkan bahwa 54,5% embrio manusia hasil IVF, ternyata mengalami kesulitan dalam proses *hatching*<sup>[19]</sup>. Menurut Ebner et. al. (2002) embrio mamalia yang dikultur secara *in vitro* akan mengalami perubahan arsitektur zona pelucidanya. Zona pelucida mengalami pertambahan ketebalan atau kekerasannya dan penurunan elastisitas<sup>[3]</sup>. Hal tersebut karena tidak adanya lisin dan molekul-molekul lain yang disekresikan oleh sel-sel pada saluran reproduksi yang berfungsi untuk membantu proses *hatching*. Selain itu, ketebalan zona pelucida akan bertambah seiring dengan pertambahan umur dan penurunan kualitas dari embrio<sup>[20]</sup>.

Berdasarkan penelitian Fong et. al. (2001) dan Marakis et. al. (2006) kesulitan *hatching* pada blastosit dikelompokkan menjadi 4 kelompok, yaitu :

- 1) *expanded blastosit* awal dengan zona yang tidak mengalami pembukaan
- 2) blastosit dengan tahapan awal *hatching* (zona mulai terbuka) tapi sel-sel *trophectoderm* menarik zona ke arah dalam sehingga zona tertutup kembali
- 3) blastosit yang tertahan pada tahapan awal *hatching*, pembukaan zona pelucida terhenti sehingga proses *hatching* tertahan
- 4) blastosit yang telah melalui  $\geq 50\%$  tahapan *hatching* tapi kemudian proses tersebut terhenti. Blastosit-blastosit yang gagal untuk keluar dari zona (*hatching*) tersebut akan mengalami degenerasi atau mati<sup>[11, 15]</sup>.

### **Metode assisted hatching**

Metode bantuan dalam proses *hatching* dikelompokkan menjadi 3 yaitu : *zona thinning*, *zona drilling*, dan *zona slitting*. *Zona thinning* (penipisan zona) adalah suatu teknik yang dilakukan dengan tujuan menipiskan ketebalan zona pelucida. Metode ini dapat dilakukan secara biokimia menggunakan reaksi enzim pronase, asam tyrode ataupun secara mekanik menggunakan laser<sup>[9,17]</sup>. *Zona drilling* (pengeboran zona) adalah bantuan yang diberikan dengan tujuan membuat lubang pada zona pelucida. Metode ini menggunakan laser atau secara kimia menggunakan asam tyrode<sup>[17]</sup>. *Zona slitting* (penyayatan zona) dilakukan dengan menyayat zona, lebih dikenal dengan *partial zona dissecting* (PZD)<sup>[7]</sup>. Menurut Blake et. al. 2001, penipisan zona (*zona thinning*) merupakan metode yang lebih baik dibanding dengan pengeboran zona (*zona drilling*). Pada *zona drilling* lubang yang dihasilkan menghilangkan perlindungan zona pelucida dan menyebabkan terjadinya kontak langsung antara blastomer dengan lingkungannya. Hal tersebut menimbulkan, risiko infeksi, sehingga diperlukan penggunaan antibiotik pada saat dilakukan kultur embrio<sup>[9]</sup>.

### **Enzim Pronase**

Enzim pronase digunakan untuk menipiskan atau menghilangkan zona pelucida. Embrio yang mengalami kesulitan untuk *hatching* saat dimonitor pada hari ke 5-8 dapat diselamatkan dengan memaparkannya pada pronase selama 1.5 menit. Embrio-embrio tersebut akan keluar dari zona pelucidanya secara sempurna 4-5 jam setelah perlakuan. Dari 54.5% embrio (100% = 44 embrio) yang mengalami kesulitan untuk *hatching*, 80% berhasil *hatching*. Selama embrio-embrio yang mengalami kesulitan untuk *hatching* tersebut tidak mengalami degenerasi maka cara ini (pemaparan embrio pada pronase) dapat menyelamatkan embrio-embrio tersebut<sup>[11]</sup>. Penggunaan pronase sebagai *zona thinning* dapat meningkatkan tingkat implantasi (33%) dengan terjadinya kehamilan sebesar 53% dari blastosit tanpa zona pelucida yang ditransfer pada perempuan-perempuan dengan kegagalan IVF lebih dari 2 kali<sup>[17]</sup>. Dalam proses *thinning* pemaparan dengan pronase dengan dosis 10 IU/ml dilakukan pada suhu 37°C<sup>[11]</sup>.

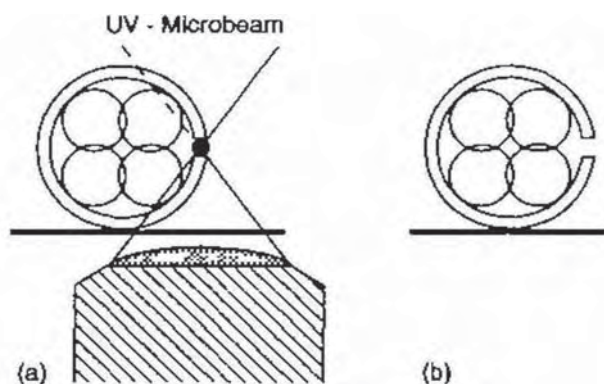


Lamanya pemaparan tersebut bergantung pada tujuan, menipiskan zona atau menghilangkan zona secara keseluruhan. Pada pemaparan selama 60 detik blastosit akan mengalami penipisan zona pelucida<sup>[17]</sup>. Namun pada pemaparan selama 1.5 menit, blastosit akan kehilangan seluruh lapisan zona pelucidanya<sup>[11]</sup>. Penipisan ataupun penghilangan zona pelucida ini meningkatkan keberhasilan terjadinya implantasi<sup>[11, 17]</sup>.

### Laser

Metode *assisted hatching* dengan menggunakan *non-contact UV laser* pertama kali dikembangkan oleh Antinori et. al. (1996, Gambar 2). Metode tersebut menggantikan metode sebelumnya yang dikenal dengan *contact UV laser*. Berbeda dengan *contact UV laser* yang memerlukan *holding* dan *cutting tools* (*micro-pipettes* atau *optical fibre*), metode *non-contact UV laser* tidak memerlukan peralatan tersebut. Efek yang ditimbulkan pada zona pelucida (*shape dan orientation*) didapat dengan mengatur parameter laser (energi per pulse, banyaknya pengulangan pulse) atau dengan menggerakkan presisi *microscope stage*. Keuntungan sistem *non-contact laser* adalah tidak adanya kontak dan pemaparan yang minimal terhadap laser, juga pengaturan pada tiap penggunaannya yang lebih mudah<sup>[21]</sup>.

Menurut Jones et. al. (2006) sinar laser yang digunakan sebaiknya sinar dengan panjang gelombang yang tidak dapat diserap DNA sehingga tidak merusak DNA dan panas yang dihasilkan hanya bersifat lokal di daerah yang dituju<sup>[18]</sup>. Waktu yang diperlukan untuk melakukan *assisted hatching* dengan metode ini sekitar 20 detik<sup>[17]</sup>. Diameter lubang yang sama dapat dihasilkan dari penggunaan jenis laser yang berbeda *Octax laser shot system*<sup>[19]</sup>, *ZILOS-tk zona infrared laser optical system*<sup>[15]</sup>, dan 1,48 mikrometer *infrared diode laser*<sup>[11]</sup>, yaitu berkisar antara 5-10\_μm. Embrio dipaparkan pada laser sebanyak 2-3 kali tergantung pada ketebalan zona pelucida, dengan lamanya masing-masing pemaparan 0,5 mili detik<sup>[15,19]</sup>. Kelebihan penggunaan laser dalam *assisted hatching* adalah waktu yang diperlukan relatif singkat<sup>[17]</sup> dan dihasilkan lubang dengan ukuran yang konsisten (Gambar 2)<sup>[17, 18, 20]</sup>.



Gambar 2. Mekanisme penggunaan laser pada *assisted hatching* (a). Prinsip zona drilling menggunakan laser, (b). Lubang pada zona pelucid<sup>[21]</sup>.

Mantoudis et.al. (2001) membandingkan 3 macam bentuk yang dihasilkan dari penggunaan laser sebagai *assisted hatching*, yaitu *total*, *partial*, dan *quarter*. Pada *total laser*, zona pelucida secara total ditembus oleh laser sehingga terbentuk lubang. Sedangkan pada *partial laser*, laser hanya menembus setengah ketebalan zona pelucida. *Quarter laser* menyerupai *partial laser*, hanya menembus setengah ketebalan zona, perbedaannya terletak pada luasnya daerah yang dibuat. *Partial laser* hanya merupakan satu kali tembakan laser, namun *quarter laser* merupakan beberapa kali tembakan laser. Perbedaan ke 3 bentuk tersebut ternyata dapat meningkatkan persentase kehamilan yang terjadi dengan urutan kehamilan klinikal 5,2% (4/77), 18,3% (29/158) dan 22,1% (19/87)<sup>[12]</sup>.

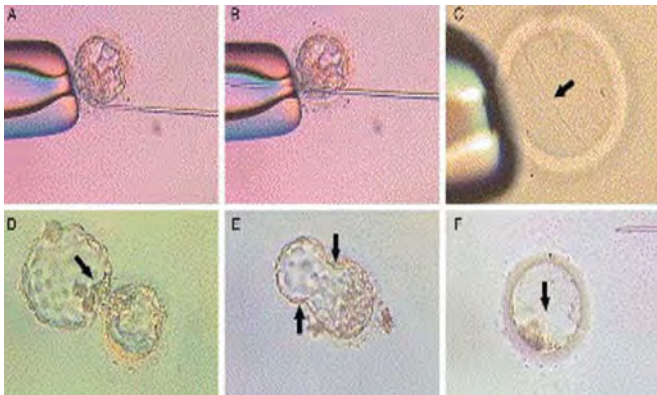
### Asam tyrode

Salah satu teknik pengeboran zona pelucida (*zona drilling*) dapat dilakukan dengan menggunakan asam tyrode. Larutan asam tyrode yang digunakan memiliki pH 2,2-2,6<sup>[18]</sup> atau 2,5-2,8<sup>[22]</sup>. pH tersebut merupakan pH yang umum digunakan untuk menghilangkan zona pelucida pada IVF dan melisiskan blastomer pada *preimplantation genetic diagnosis/PGD*<sup>[18]</sup>. Menurut Balaban et. al. (2002) pengeboran dengan metode ini membutuhkan waktu 40 detik<sup>[17]</sup> dan lubang yang dihasilkan cenderung besar, berukuran 2040\_μm<sup>[9]</sup>. Penggunaan asam tyrode sebagai *zona drilling* pada *assisted hatching* pertama kali diprakarsai oleh Cohen pada tahun 1992. Cara ini berhasil meningkatkan keberhasilan implantasi embrio yang dihasilkan dibandingkan dengan embrio tanpa perlakuan<sup>[17]</sup>. Risiko yang perlu dipertimbangkan dalam penggunaan teknik *drilling* dengan menggunakan asam tyrode ini adalah risiko kerusakan pada sel blastomer di dalam zona pelucida akibat pemaparan embrio pada larutan asam. Selain itu, lubang yang dihasilkan dengan metode ini relatif besar sehingga menimbulkan risiko terjadinya *premature hatching* atau keluarnya blastomer dari zona pelucida sebelum waktunya<sup>[17]</sup>. Pemaparan pada pH rendah pada asam tyrode yang digunakan juga dapat menimbulkan efek toksik pada embrio dan dapat berakibat kematian embrio<sup>[9,17,18]</sup>. Proses metode ini adalah dengan menahan embrio menggunakan *holding pipet*, sementara *multipipete* dengan diameter 10-12 mikro yang berada pada arah berlawanan (arah jam 3) menyemprotkan larutan asam tyrode pada zona pelucida hingga terbentuk lubang<sup>[23]</sup>. Lubang yang dihasilkan dari metode ini tidak bisa distandarisasi karena volume larutan yang disemprotkan dan waktu pemaparan sangat bergantung pada operator. Lubang yang dihasilkan juga bervariasi antara 10-13\_μm pada daerah dekat permukaan blastomere dan 15-8\_μm pada permukaan zona (lapisan paling luar dari zona)<sup>[18]</sup>.

### Zona Dissection

Metode ini umumnya dikenal dengan *Partial Zona Dissection* (PZD). Pada awalnya metode ini digunakan pada *assisted reproduction* untuk membantu sperma melewati zona pelucida pada saat masuk ke dalam sel telur. Metode tersebut kemudian berkembang menjadi *Subzonal Sperm Injection* (SUZI) dan terakhir disempurnakan menjadi *Intracytoplasmic Sperm Injection* (ICSI). Menurut Balaban et. al. 2002 penggunaan metode ini dalam *assisted hatching* memerlukan waktu kurang lebih 40 detik. Keterbatasan metode tersebut adalah sulitnya membuat lubang dengan ukuran yang sama pada setiap kali perlakuan sehingga didapatkan hasil yang bervariasi [17].

Sayatan dibuat dengan cara menahan embrio dengan *holding* pipet kemudian pada arah yang berlawanan dilakukan injeksi menggunakan *injection* pipet untuk menembus bagian zona pelucida. Zona pelucida kemudian digesekkan pada *holding* atau *petri dish* sampai zona terpotong. Lyu et. al. (2005) memperkenalkan cara baru untuk membuat sayatan pada embrio, dikenal dengan *controlled zona dissection* (CZD). Perbedaan cara ini terletak pada sudut yang dibuat pada mulut *holding* pipet sehingga terbentuk sudut 65°. Selain itu ujung pipet injeksi tidak dibuat runcing melainkan tumpul. Sudut yang dibuat memudahkan untuk menggulirkan embrio sehingga lebarnya sayatan dapat dibuat lebih panjang dibandingkan dengan cara yang biasa dilakukan. Ujung pipet injeksi yang dibuat tumpul menjadi lebih aman bagi blastomer sehingga mengurangi kemungkinan untuk melukai blastomer [24] (Gambar 30).



Gambar 3. Cara kerja dan hasil dari *controlled zona dissection*.

(a) pipet injeksi ditusukkan pada zona pelucida; (b) pembuatan lebar sayatan; (c) LZD yang dihasilkan; (d) inner cell mass yang besar tertahan pada bukaan yang dihasilkan dengan MZD; (e) blastosit yang sedang *hatching* pada sayatan yang dihasilkan LZD; (f) zona yang kosong setelah proses *hatching* [24].

Perbedaan antara PZD dan CZD terletak pada bentuk sayatan yang dihasilkan. Hasil dari PZD pada *assisted hatching* berupa sayatan yang bersilangan '+' dengan ukuran masing-masing sayatan 20-30  $\mu$ m. Sedangkan sayatan pada CZD berupa satu garis melintang.

CZD dibedakan menjadi 2 berdasarkan ukurannya, *long zona dissection* (LZD) dengan ukuran 100  $\mu$ m dan *moderate zona dissection* (MZD) dengan ukuran antara 55--65  $\mu$ m. LZD merupakan pengembangan dari MZD yang dibuat untuk mengatasi kegagalan *hatching* pada embrio yang telah mengalami MZD. Kegagalan tersebut disebabkan karena ukuran *inner cell mass* yang besar sehingga masih tetap terhambat walaupun sudah dilakukan *assisted hatching*. Embrio dengan LZD memiliki tingkat keberhasilan *hatching* yang lebih tinggi dibanding MZD. Namun tingkat implantasi yang dihasilkan dengan LZD masih harus diuji secara klinik [24].

### Risiko dari Prosedur Assisted Hatching

*Assisted hatching* merupakan metode yang dapat membantu pasien IVF yang memiliki embrio dengan keadaan-keadaan yang seringkali menyebabkan kesulitan untuk terjadinya *hatching* secara spontan. Namun, perlu diperhatikan bahwa *assisted hatching* tidak hanya meningkatkan persentase implantasi dan kehamilan tapi juga meningkatkan risiko terjadinya hal yang tidak diinginkan, yaitu degenerasi embrio dan terbentuknya kembar monozygot [16, 25].

*Monozygotic twinning* adalah dua zigot yang memiliki materi genetik yang sama / kembar identik karena berasal dari 1 zigot. *Monozygotic twinning* terjadi karena *inner cell mass* terbagi 2 pada saat proses *hatching*. Diasumsikan sebagian *inner cell mass* tertahan dan terbagi 2 pada saat melalui lubang yang dibuat dengan *assisted hatching* [25]. Pada kelahiran yang terjadi secara alami persentase terjadinya *monozygotic twinning* diperkirakan sekitar 0,42% [16, 25].

### DAFTAR PUSTAKA

1. Plachot M. The blastocyst. *Human Reproduction* 2000; 15: 49--58.
2. Fong C-Y, Bongso A., Ng S-C., et. al. Blastocyst transfer after enzymatic treatment of the zona pellucida: Improving in-vitro fertilization and understanding implantation. *Human Reproduction* 1998; 13: 2926--2932.
3. Ebner T, Moser M., Yaman C., et. al. Prospective hatching of embryos developed from oocytes exhibiting difficult oolemma penetration during ICSI. *Human Reproduction* 2002; 17: 1317--1320.
4. Kiefer SM, Sailing P. Proteolytic processing of human zona pellucida proteins. *Biology of Reproduction* 2002; 66: 407--414.
5. Shostak S. 1991. *Embryology: An introduction to developmental biology*. Harper Collins, New York: xiii + 778 hlm.
6. Elhelw BA, El Sadek MM, El Nomrosy KM. Assisted hatching: Routine or selective application in IVF. *Middle East Fertility Society J* 2004; 9: 198--201.
7. Ng EHY, Naveed F, Lau EYL et. al. A randomized double-blind controlled study of the efficacy of laser-assisted hatching on implantation and pregnancy rates of frozen-thawed embryo transfer at the cleavage stage. *Human Reproduction* 2005; 20: 979--985.
8. Lin S-P, Lee R K-K, Tsai Y-J. In vivo hatching phenomenon of mouse blastocyst during implantation. *J Assist Reprod and Genetics* 2001; 18: 341-345.
9. Blake DA, Forsberg AS, Johansson BR. et. al. Laser zona pellucida thinning—an alternative approach to assisted hatching. *Human Reproduction* 2001; 16:1959--1964.



10. Montag M, Koll B, Holmes P, et. al. Significance of the number of embryonic cells and the state of the zona pellucida for hatching of mouse blastocyst in vitro versus in vivo. *Biology Reproduction*, 2000; 62: 1738--1744.
11. Fong C-Y, Bongso A, Sathananthan H et. al. Ultrastructural observations of enzymatically treated human blastocyst: zona-free blastocyst transfer and rescue of blastocyst with hatching difficulties. *Human Reproduction* 2001; 16: 540--546.
12. Mantoudis E, Podsiadly BT, Gorgy A, et. al. A comparison between quarter, partial, and total laser assisted hatching in selected infertility patients. *Human Reproduction* 2001; 16: 2181--2186.
13. Utsunomiya T, Ito H, Nagaki M, et. al. A prospective, randomized study: day 3 versus hatching blastocyst stage. *Human Reproduction* 2004; 19: 1598--1603.
14. Magli MC, Gianaroli L, Ferraretti AP et. al. Rescue of implantation potential in embryos with poor prognosis by assisted zona hatching. *Human Reproduction* 1998; 13: 1331--1335.
15. Marakis E, Angeli I, Agapitou K et. al. Laser versus mechanical assisted hatching: A prospective study of clinical outcomes. *Fertil. Steril.* 2006; 86: 1596--1600.
16. Allegra A, Sammartano F, Scaglione P et. al. Monozygotic bichorionic twinning after transfer of a single frozen/thawed embryo that has undergone quarter laser-assisted zona thinning: A case report. *J Assisted Reprod and Genetics* 2005; 22: 437--441.
17. Balaban B, Urman B, Alatas C et. al. A comparison of four different techniques of assisted hatching. *Human Reproduction* 2002; 17: 1239--1243.
18. Jones AE, Wright G, Kort HI et. al. Comparison of laser-assisted hatching and acidified Tyrode's hatching by evaluation of blastocyst development rates in sibling embryos: a prospective randomised trial. *Fertil. Steril* 2006; 85: 487--491.
19. Nishio E, Moriwaki T, Yoshi K, et. al. Chemical removal of zona pellucida versus laser assisted hatching after repeated failures of assisted reproductive technology. *Reproductive Medicine and Biology* 2006; 5: 263--267.
20. Bider D, Livshits A, Yonish M, et. al. Assisted hatching by zona drilling of human embryos in women of advanced age. *Human Reproduction* 1997; 12: 317--320.
21. Antinori S, Selman HA, Caffa B et. al. Zona opening of human embryos using a non-contact UV laser for assisted hatching in patients with poor prognosis of pregnancy. *Human Reproduction* 1996; 11: 2488--2492.
22. Zenrique HC, Wheeler MB, Beebe DJ. A microfluid method for removal of the zona pellucida from mammalian embryos. *Lab Chip*, 2005; 5: 108-110.
23. Gabrielsen A, Agerholm I, Toft B et.al. Assisted hatching improves implantation rates on cryopreserved-thawed embryos. A randomized prospective study. *Human Reproduction* 2004; 19: 2258--62.
24. Lyu QF, Wu LQ, Li YP et.al. An improved mechanical technique for assisted hatching. *Human Reproduction* 2005; 6: 1619--1623.
25. Sills ES, Moomjy M, Zaninovic N et. al. Human zona pellucida micromanipulation and monozygotic twinning frequency after IVF. *Human Reproduction* 2000; 15: 890--895.

