

**KUALITAS EMBRIO, INTERFERON GAMMA,  
WAKTU TRANSFER DAN KEGAGALAN  
IMPLANTASI EMBRIO**



**Tesis  
untuk memenuhi sebagian persyaratan  
mencapai derajat S-2**

**Magister Ilmu Biomedik**

**Dicky Moch. Rizal  
G4A098003**

**PROGRAM PASCASARJANA  
UNIVERSITAS DIPONEGORO  
SEMARANG  
MEI  
2003**

**HALAMAN PENGESAHAN**

**TESIS**

**KUALITAS EMBRIO, INTERFERON GAMMA,  
WAKTU TRANSFER DAN KEGAGALAN IMPLANTASI EMBRIO**

Disusun oleh :

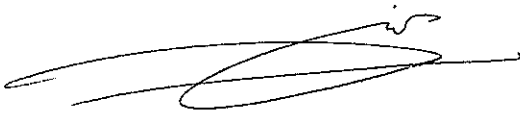
**Dicky Moch Rizal  
G4A098003**

Telah dipertahankan didepan Tim Penguji  
Pada tanggal 22 Mei 2003  
Dan dinyatakan telah memenuhi syarat untuk diterima

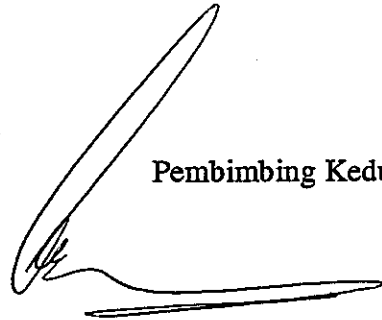
Pembimbing Utama

Menyetujui,  
Komisi Pembimbing

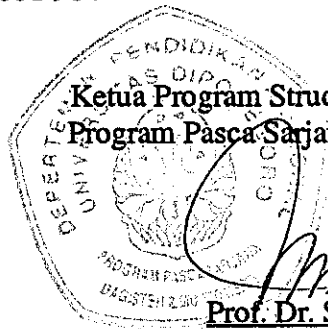
Pembimbing Kedua



Prof. DR. Dr. Susilo Wibowo, MS Med, Sp. And  
NIP 130 881 984



Prof. Dr. Moch. Anwar, MMed. ScSp. OG  
NIP 130 367 342



**Ketua Program Studi Magister Ilmu Biomedik  
Program Pasca Sarjana Universitas Diponegoro**

Prof. Dr. Subowo, Sp.P.A  
NIP. 130 352 549

## HALAMAN PERNYATAAN

### PERNYATAAN

Dengan ini saya menyatakan bahwa tesis ini adalah hasil pekerjaan saya sendiri dan didalamnya tidak terdapat karya yang pernah diajukan untuk memperoleh gelar kesarjanaan disuatu perguruan tinggi dan lembaga pendidikan lainnya. Pengetahuan yang diperoleh dari hasil penerbitan maupun yang belum diterbitkan, sumbernya dijelaskan didalam tulisan dan daftar pustaka

Semarang, 22 Mei 2003

Dicky Moch. Rizal  
NIM G4A098003

## RIWAYAT HIDUP

Nama : dr. Dicky Moch. Rizal  
Tempat/tanggal lahir : Surabaya, 8 Oktober 1969  
Alamat : Poh Ruboh RT02/52 No. 25c, Condong Catur,  
Depok, Sleman, DIY

Nama Istri : dr. Denny Agustiningsih, Mkes

Nama Anak : Faiz Noviansyah dan Hasnah Rachmayani  
Sholichah

Riwayat pekerjaan :

1. Dokter PTT di Puskesmas Semanu I, Gunung Kidul, Yogyakarta, th. 1995-1996
2. Staf Pengajar di Bagian Ilmu Faal Fakultas Kedokteran Universitas Gadjah Mada Yogyakarta, th. 1996-sekarang
3. Staf medis di Bagian Andrologi, Klinik Infertilitas Permata Hati RSUP DR Sardjito/FK UGM Yogyakarta, 1996-sekarang

Riwayat Pendidikan Formal :

1. SDN Dr. Sutomo V Surabaya, th. 1977-1982
2. SMPN 12 Surabaya, th. 1982-1985
3. SMAN V Surabaya, th. 1985-1988
4. FK Undip Semarang, th. 1998-1995

## KATA PENGANTAR

Alhamdulillahirabbil 'alamiin. Segala puji bagi Allah, Dzat yang maha berkehendak atas segala sesuatu. Demikian pula atas terselesaikannya karya tulis ilmiah ini, semua merupakan ridlo dari Allah SWT.

Karya tulis yang berjudul "Kualitas embrio, interferon gamma dan kegagalan implantasi" ini berawal dari sekian banyak pertanyaan mengenai faktor yang menyebabkan mengapa embrio pada peserta program IVF di Klinik Infertilitas Permata Hati gagal diimplantasikan. Angka keberhasilan kehamilan program IVF atau bayi tabung sebesar 10-20% ternyata masih belum dapat ditingkatkan akibat banyaknya kegagalan pada saat implantasi. Berbekal dorongan semangat terutama dari Prof. Susilo Wibowo, Prof. Anwar dan dr. Amino, penulis mencoba mengetahui salah satu dari sekian banyak faktor penyebab kegagalan implantasi yaitu kadar interferon gamma dan kualitas embrio.

Sebagai karya tulis, sudah barang tentu memiliki banyak ketidak sempurnaan. Oleh sebab itu, penulis berkeinginan untuk mendapat saran dari segenap pakar dibidang reproduksi dan teman-teman demi kesempurnaan karya tulis ini.

Penulis juga ingin menyampaikan ucapan terima kasih kepada :

1. Prof. Dr. dr. Susilo Wibowo, MS, Sp.And. dengan luar biasa sabar dan tekun membimbing dan mengarahkan serta menjawab keingintahuan penulis di bidang reproduksi khususnya Andrologi di setiap saat.
2. Prof. dr. Moch. Anwar HAS, M. Med. Sc, SpOG berkat kesabaran beliau pula penulis dapat mengerjakan karya tulis ini
3. dr. Denny Agustiningasih istriku tercinta, yang selalu memompakan semangat untuk menyelesaikan pendidikan S-2 ini. Anak-anakku Mas Faiz dan Dik Hasnah aku ucapkan terimakasih pula atas kelucuan dan kenakalan kalian, aku saksikan tumbuh kembang kalian sambil sekolah
4. Yang Cip dan Yang Ti ibuku, Datuk dan Yang Kung ayahku, serta semua saudaraku (Mas Agus-Mbak Luki, Mas Novi-Mbak Saly, Mas Ruli-Mbak Ika serta Angie dan Nicky) tanpa doa dan restu kalian mustahil penulis menyelesaikan pendidikan ini
5. dr. AR Amino, SpOG yang setiap bertemu menanyakan sampai dimana proses belajar penulis di Semarang serta mengizinkan bekerja di Permata Hati
6. Prof. dr. Sri Kadarsih, MSc, PhD, dr. Suwono dan teman sejawat di Bagian Ilmu Faal dengan dorongan semangatnya
7. Prof. Dr.dr. Noerhajati, yang telah mengizinkan menggunakan Lab. Hayati UGM
8. Prof. dr.Subowo, SpPA, Prof. Dr. dr. Tjahyono, SpPA, dr. Edi Darmana MSc, PhD, selaku pengurus Program Pasca Sarjana S2 Biomedik FK Undip. Mbak Nata, Mbak Lusi, Mas Dul, yang banyak membantu informasi
9. Teman-teman di Permata Hati, teman-teman seangkatan di S2 , thank for all.

Semoga karya tulis ini dapat bermanfaat dan diteruskan oleh rekan yang lain.

Penulis

## Daftar Isi

	Halaman
HALAMAN JUDUL .....	i
HALAMAN PENGESAHAN .....	ii
HALAMAN PERNYATAAN .....	iii
RIWAYAT HIDUP .....	iv
KATA PENGANTAR .....	v
DAFTAR ISI .....	vi
DAFTAR GAMBAR .....	viii
DAFTAR TABEL .....	ix
SINGKATAN .....	x
DAFTAR LAMPIRAN .....	xi
ABSTRACT .....	xii
ABSTRAK .....	xiii
BAB 1. PENDAHULUAN .....	1
1.1. Latar Belakang	
1.2. Perumusan Masalah	
1.3. Tujuan Penelitian	
1.4. Manfaat Penelitian	
BAB 2. TINJAUAN PUSTAKA .....	5
2.1. Kualitas embrio dan kegagalan implantasi embrio	
2.2. Interferon Gamma dan respon imun adaptif	
2.3. Interferon Gamma dan kegagalan implantasi	
2.4. Waktu transfer dan implantasi embrio	
BAB 3. KERANGKA TEORI, KERANGKA KONSEPTUAL DAN HIPOTESIS PENELITIAN .....	20
3.1. Kerangka teori	
3.2. Kerangka konseptual	

### 3.3. Hipotesis

<b>BAB 4. METODE PENELITIAN .....</b>	<b>22</b>
4.1. Rancangan penelitian	
4.2. Populasi	
4.3. Besar sampel	
4.4. Variabel penelitian	
4.5. Tempat dan waktu penelitian	
4.6. Protokol penelitian	
4.6.1 Penilaian kualitas embrio	
4.6.2. Pemeriksaan kadar interferon Gamma	
4.6.3. Waktu transfer embrio	
4.7. Analisis Data	
4.7.1. Penilaian kualitas embrio	
4.7.2. Pemeriksaan kadar interferon Gamma	
4.7.3. Waktu transfer embrio	
<b>BAB 5. HASIL PENELITIAN .....</b>	<b>31</b>
5.1. Hasil penelitian	
<b>BAB 6. PEMBAHASAN .....</b>	<b>35</b>
6.1. Kualitas embrio dan implantasi	
6.2. Interferon Gamma dan implantasi embrio	
6.3. Waktu transfer dan implantasi embrio	
6.4. Hal-hal lain yang mempengaruhi implantasi	
<b>BAB 7. KESIMPULAN DAN SARAN .....</b>	<b>53</b>
7.1. Kesimpulan	
7.2. Saran	

RINGKASAN .....	54
DAFTAR PUSTAKA .....	57
LAMPIRAN	

## DAFTAR GAMBAR

	Halaman
Gambar 1. Tahap-tahap perkembangan embrio .....	8
Gambar 2. Penilaian kualitas embrio berdasarkan metoda Hill .....	9
Gambar 3. Peran Th1/Th2 dalam penyakit .....	14
Gambar 4. Pencitraan <i>pinopode</i> dengan menggunakan mikroskop elektron .....	46

## DAFTAR TABEL

	Halaman
Tabel 1. Implantasi dan penilaian kualitas embrio .....	32
Tabel 2a. Implantasi embrio dan kadar IFN $\gamma$ serum .....	33
Tabel 2b. Implantasi embrio dan kadar IFN $\gamma$ kultur supernatan.....	33
Tabel 3. Implantasi dan waktu transfer embrio .....	34

## SINGKATAN

IFN $\gamma$	= <i>Interferon gamma</i>
TGF $\beta$	= <i>Transforming Growth Factor <math>\beta</math></i>
TNF $\alpha$	= <i>Tumor Necrosing Factor <math>\alpha</math></i>
IL	= <i>Interleukin</i>
GMCSF	= <i>Granulocyte macrophage colony stimulating factor</i>
CD	= <i>Cluster of differentiation</i>
APC	= <i>Antigen-presenting cell</i>
IVF	= <i>In vitro fertilization</i>
ET	= <i>Embryo transfer</i>
hCG	= <i>human chorionic gonadotropin</i>
PGD	= <i>preimplantation genetic diagnosis</i>
PCR	= <i>polymerase chain reaction</i>
FISH	= <i>fluorescent insitu hybridization</i>
MHC	= <i>major histocompatibility complex</i>
ECM	= <i>extra celluler matrix</i>
E2/P	= <i>estradiol/progesterone</i>
FSH/LH	= <i>Follicle Stimulating Hormone/Luteinizing Hormone</i>
PBMC	= <i>Peripheral Blood MononuclearCell</i>
PHA	= <i>Phyto Haem Agglutinin</i>
APA	= <i>Anti Phospholipid Antibody</i>

## DAFTAR LAMPIRAN

LAMPIRAN 1. Data dasar

LAMPIRAN 2. Analisa statistik

## ABSTRACT

Successful of embryo implantation may contribute on successful of pregnancy. In ART (Artificial Reproductive Technology), the increasing of fertilization rate is not followed by the increasing of pregnancy rate. Many factors may be cause implantation failure, such as embryo, imunological factor with Th1 predominant (especially interferon gamma) and endometrium receptivity.

The aim of this study is to know the role of embryo quality, interferon gamma and day of embryo transfer to implantation failure.

*Subject:* 31 women under take IVF-ET from Infertility Clinic of Permata Hati Sardjito Hospital Yogyakarta in January-December 2000. The subject is grouped in implantation failure (n=25) and successful implantation (n=6).

*Design and method:* This is cross sectional study. Method: a) Grading of embryo quality by Hill's Method divide into 4 grade of embryo quality: grade I, II, III and IV. b) Measurement of IFN  $\gamma$  level from serum and supernatant culture by ELISA method use reagent from Pelekine IFN  $\gamma$  by CLB Laboratories, Netherlands, c) Day of embryo transfer is taken from medical record

*Result:* 81 embryos have been transferred from subject. It is classified on implantation failure group with grade I: 13 embryos, grade II: 30 embryos, grade III: 20 embryos, grade IV: no embryos. On successful implantation group are grade I: 9 embryos, grade II: 7 embryos, grade III: 2 embryos, grade IV: no embryos. There is difference significant between embryo qualities from two groups ( $p=0.012$ ). There is negative correlation (-0.267) between embryo quality and implantation: more higher grade of embryo, more higher the chance to get implantation failure.

The rate of IFN  $\gamma$  serum level is  $4.86 \pm 0.96$  pg/ml (implantation failure group) and  $5.82 \pm 1.66$  pg/ml (implantation group). There is no difference significant between two groups. Embryo transfer is done on day 12-21. There is no correlation day of transfer with successful implantation between two groups.

*Conclusion:* There is significant difference embryo quality between implantation group and no implantation group and there is negative correlation between embryo quality and successful of implantation, higher of grade, higher the chance to get implantation failure. There is no significant difference on IFN  $\gamma$  serum level of two groups and there is no correlation day of transfer and successful implantation on two groups.

Key words: embryo quality, interferon gamma, day of transfer, implantation

## ABSTRAK

Kegagalan implantasi merupakan salah satu permasalahan dibidang reproduksi khususnya infertilitas. Beberapa faktor terkait dalam hal ini yaitu, faktor embrio, faktor imun dan faktor endometrium. Faktor embrio berasal dari kualitas embrio yang tidak baik yang disebabkan oleh beberapa hal antara lain morfologi embrio yang tidak baik. Faktor imun dapat menyebabkan kegagalan implantasi yang dijelaskan antara lain oleh konsep imunodevasi Th-1 dan Th-2 oleh Tom Wegman. Imunodevasi ini antara lain disebabkan oleh dominasi IFN  $\gamma$  sebagai sitokin utama kelompok Th-1. Faktor endometrium dapat berasal dari permasalahan waktu transfer embrio. Waktu transfer embrio yang tidak pas dengan terjadinya *window of implantation* dapat menyebabkan embrio gagal berimplantasi. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui pengaruh kualitas embrio, kadar IFN  $\gamma$  dan waktu transfer embrio terhadap kegagalan implantasi embrio.

*Subyek penelitian* : sebanyak 31 wanita peserta program IVF-ET di Klinik Infertilitas Permata Hati RSUP DR Sardjito Yogyakarta antara bulan Januari-Desember 2000 yang dikelompokkan dalam kelompok gagal implantasi (n=25) dan kelompok berhasil implantasi (n=6).

*Rancangan penelitian dan cara penelitian*: penelitian ini menggunakan rancangan penelitian potong lintang. Cara penelitian : a) Penilaian kualitas embrio : menggunakan metode Hill yang membagi kualitas embrio kedalam 4 *grade*, yaitu *grade* I, II, III, dan IV. Makin besar *grade*-nya, makin buruk kualitas embrio tersebut. b) Pemeriksaan kadar IFN  $\gamma$  serum dan supernatan kultur limfosit menggunakan *Pelikine* IFN  $\gamma$  kit produksi laboratorium CLB, Netherland, Belanda dengan metode ELISA. c) Waktu transfer embrio : berasal dari catatan medik subyek penelitian

*Hasil penelitian* : Telah dilakukan transfer sebanyak 81 embrio dari 31 subyek penelitian. Pada kelompok gagal implantasi terdiri dari 13 embrio kelas I, 30 embrio kelas II, 20 embrio kelas III dan 0 embrio kelas IV. Sedangkan kelompok berhasil implantasi terdiri dari 9 embrio kelas I, 7 embrio kelas II, 2 embrio kelas III dan 0 embrio kelas IV. Didapatkan perbedaan bermakna antara kualitas embrio kelompok gagal implantasi dengan kelompok berhasil implantasi (p=0,012). Terdapat korelasi negatif (-0,267) antara kualitas embrio dengan hasil implantasi yaitu semakin besar *grade* embrio, makin besar kemungkinan mengalami kegagalan implantasi.

Rerata kadar IFN  $\gamma$  serum  $4,86 \pm 0,96$  pg/ml (kelompok gagal implantasi) dan  $5,82 \pm 1,66$  pg/ml (kelompok berhasil implantasi). Tidak didapatkan perbedaan bermakna kadar IFN  $\gamma$  serum antara kedua kelompok.

Transfer embrio dilakukan pada waktu hari ke 12 sampai hari ke 21. Tidak didapatkan korelasi antara waktu transfer embrio dengan keberhasilan implantasi antara kedua kelompok.

*Kesimpulan* : Terdapat perbedaan bermakna kualitas embrio kelompok gagal implantasi dan berhasil implantasi serta ada korelasi negatif antara kualitas embrio dengan keberhasilan implantasi, yaitu makin besar *grade*-nya, makin besar kemungkinan kegagalan implantasi. Tidak didapatkan perbedaan bermakna kadar IFN  $\gamma$  serum dan tidak didapatkan korelasi antara waktu transfer embrio dan keberhasilan implantasi pada kedua kelompok subyek penelitian.

Kata kunci : kualitas embrio, interferon gamma, waktu transfer, implantasi

# BAB 1.

## PENDAHULUAN

### 1.1. Latar Belakang

Proses suatu kehamilan didahului oleh adanya pertemuan antara ovum atau sel telur dari pihak wanita dengan spermatozoa dari pihak pria yang disebut sebagai proses fertilisasi. Setelah terjadi konsepsi barulah terjadi perkembangan sel yang disebut sebagai embrio yang terdiri dari beberapa sel. Selanjutnya embrio ini akan tertanam di rongga rahim ibu atau berimplantasi dan selanjutnya akan tumbuh dan berkembang melalui diferensiasi sel hingga tumbuh menjadi janin.<sup>1</sup> Peristiwa ketidakmampuan hamil seringkali berasal dari kegagalan yang terjadi saat fertilisasi maupun implantasi. Kehadiran tehnik *in vitro fertilization* atau disebut juga teknologi bayi tabung sebagai salah satu usaha untuk mengatasi problem infertilitas, ternyata hanya menghasilkan kehamilan kurang dari 10 % dari tahap blastokis yang baik. Hal ini menunjukkan permasalahan yang sesungguhnya terjadi pada saat ini terletak dalam keberhasilan implantasi embrio.<sup>2</sup>

Secara teori kegagalan implantasi dapat dibedakan pre dan pasca implantasi. Disebut sebagai kegagalan pre implantasi bila hasil konsepsi hilang segera setelah fertilisasi. Beberapa sel telur yang telah dibuahi tidak pernah membelah dan blastokis gagal berimplantasi.. Disebut kegagalan pasca implantasi bila blastokis mungkin hilang sebelum atau pada saat menstruasi yang akan datang.<sup>3</sup> Akan tetapi pengertian ini sulit untuk diterapkan secara klinis. Meskipun pembuktian kehamilan secara kimiawi dengan

menggunakan  $\beta$  hCG dan ditunjang pemeriksaan menggunakan ultra sono grafi dapat menunjukkan keberhasilan implantasi embrio.

Sampai saat ini mekanisme yang pasti mengenai kegagalan implantasi embrio masih menjadi sebuah tanda tanya yang sangat besar. Proses implantasi embrio di tentukan oleh berbagai faktor, antara lain kemampuan embrio, kesiapan endometrium maternal dan respon imun maternal. Meskipun demikian endometrium menjadi bukan hal penting, karena secara faktual blastokis embrio dapat tertanam di jaringan lain selain endometrium, seperti tuba falopii, ovarium, rongga peritoneum, lien atau di testis. Oleh karena itu dapat dikatakan bahwa faktor embrio dan imun maternal menjadi lebih dominan.<sup>4</sup> Beberapa penelitian tentang hal-hal yang mempengaruhi implantasi oleh faktor embrio antara lain disebabkan karena abnormalitas kromosom atau genetik. Faktor abnormalitas kromosom dapat berasal dari orang tua maupun didapat oleh embrio setelah fertilisasi. Kualitas embrio sebenarnya secara kasar dapat diamati pada pelaksanaan teknologi bayi tabung dengan cara menilai morfologi embrio tersebut.

Konsep yang memandang kegagalan implantasi embrio dari sudut imunologi dimulai oleh Medawar (1953, cit ref. no. 5 ) yang mengatakan bahwa terdapat hubungan antara janin dan ibunya yang dapat dipandang dalam kerangka imunologi transplantasi. Embrio sebenarnya merupakan sebuah allograf yang mengekspresikan antigen histokompatibilitas turunan dari ayah yang dapat menimbulkan penolakan oleh imunokompeten ibu.<sup>5</sup> Konsep lain mengenai imunologi implantasi dikemukakan oleh Tom Wegman (1993, cit ref. no. 6 ) , yang meyakini bahwa kehamilan mungkin merupakan hasil dari fenomena dominasi T helper-2 (Th-2) terhadap T helper-1(Th-1). Interferon gamma (IFN  $\gamma$ ) merupakan sitokin utama kelompok Th-1, sedangkan sitokin

Th-1 yang lainnya antara lain interleukin-1(IL-1), interleukin-6 (IL-6), *tumor necrosis factor alpha* (TNF  $\alpha$ ), *coloni stimulating factor* (CSF). Th-2 melibatkan sitokin antara lain interleukin 4 (IL-4), interleukin 3 (IL-3), interleukin 10 (IL-10) dan *transforming growth factor  $\beta$*  (TGF  $\beta$ ).<sup>6</sup> Apabila terjadi imunodevasi, dimana Th-1 yang tercermin dari IFN  $\gamma$ , lebih dominan dari Th-2 dapat mengakibatkan terjadinya kegagalan implantasi maupun abortus. Hal tersebut masih menjadi kontroversi diantara para ahli imunologi reproduksi oleh karena penelitian selama ini dilakukan pada binatang coba, sedangkan pada manusia dilakukan secara in vitro atau in vitro dengan menggunakan subyek penelitian wanita dengan riwayat abortus berulang.

Selain faktor kualitas embrio dan respon imun maternal seperti teori imunodevasi diatas, faktor penerimaan oleh endometrium maternal juga memegang peranan yang cukup penting. Pada pelaksanaan teknologi reproduksi dibantu (*artificial reproductive technology/ART*) penerimaan endometrium dapat diamati pada saat melakukan transfer embrio. Waktu yang tepat untuk melakukan transfer embrio merupakan salah satu faktor keberhasilan terjadinya implantasi. Sampai saat ini masih terjadi perbedaan pendapat dikalangan para ahli infertilitas untuk menentukan kapan waktu yang tepat untuk melaksanakan transfer embrio tersebut.

## **1.2. Perumusan Masalah**

- 1.2.1. Apakah kualitas embrio mempengaruhi kegagalan atau keberhasilan implantasi ?
- 1.2.2. Apakah ada perbedaan bermakna kadar IFN  $\gamma$  pada kegagalan dan keberhasilan implantasi embrio ?

1.2.3. Apakah ada korelasi antara waktu transfer embrio dengan kegagalan atau keberhasilan implantasi ?

### **1.3. Tujuan Penelitian**

1.3.1. Tujuan khusus : penelitian ini bertujuan untuk mengetahui dan membuktikan bahwa kadar IFN  $\gamma$  yang tinggi, kualitas embrio tidak baik dan waktu transfer yang tidak tepat dapat menyebabkan kegagalan implantasi embrio.

1.3.2. Tujuan umum : temuan pada penelitian ini diharapkan dapat menambah pengetahuan dalam bidang reproduksi, khususnya mengenai proses implantasi.

### **1.4. Manfaat Penelitian**

Faedah yang diharapkan dari penelitian ini dapat dipakai sebagai petunjuk kemungkinan penyebab kegagalan implantasi embrio dan sebagai petunjuk bagi praktisi kebidanan dan kandungan untuk mengeradikasi semaksimal mungkin patogen-patogen penyebab munculnya kenaikan kadar interferon gamma. Lebih jauh diharapkan penelitian ini dapat membantu mengatasi masalah infertilitas khususnya dalam hal kegagalan implantasi embrio. Faedah lain bagi ilmu pengetahuan adalah untuk menambah wacana dalam bidang imunologi reproduksi yang sekarang berkembang sangat pesat khususnya mengenai implantasi embrio.

## BAB 2.

### TINJAUAN PUSTAKA

#### 2.1. Kualitas embrio dan kegagalan implantasi embrio

Fertilisasi yang ditandai dengan bertemunya spermatozoa dan sel telur, biasanya terjadi di tuba Fallopii dalam waktu yang sangat pendek (dalam hitungan menit sampai jam) setelah ovulasi. Fertilisasi yang lengkap terjadi jika inti haploid dari spermatozoa dan ovum (yang dinamakan pronukleus) bersatu membentuk sebuah zigot diploid dengan 23 pasang kromosom lengkap. Kemudian terjadi rangkaian pembelahan sel atau mitosis. Pembelahan sel meliputi pembagian DNA atau materi genetik dalam zigot menjadi dua buah sel yang masing-masing berdiri sendiri. Pembelahan pertama akan menjadi lengkap kira-kira 36 jam setelah fertilisasi dan pembelahan berikutnya akan memakan waktu kurang lebih dua kali dalam 1 hari. Dua sel zigot yang dihasilkan dari pembelahan pertama berdiameter sekitar 0,1 mm. Kumpulan anak sel tersebut yang kemudian dinamakan blastomer. Setelah kurang lebih 50 jam akan terjadi empat sel, dan selanjutnya pembelahan mitosis tetap terus berlangsung. Blastomer-blastomer tersebut akan membelah lagi menjadi masing-masing dua sel yang sama besar dan ukurannya. Pembelahan enam sampai delapan sel yang pertama tersebut tetap berlangsung didalam zona pellucida. Kurang lebih tiga hari setelah fertilisasi, sebuah bola yang padat dengan kira-kira 8-50 sel blastomer terbentuk dan mempunyai permukaan seperti buah mulberry sehingga dinamakan morula.

Pada saat berbentuk sebagai morula, embrio ini mempunyai ukuran 10 mm dan kemudian mengadakan perjalanan sepanjang tuba uterina dan mendekati jalan masuk ke

uterus. Embrio akan terus berkembang, kemudian memasuki rongga uterus kurang lebih 4 hari setelah fertilisasi. Diferensiasi pertama kali yang terjadi pada sel telur manusia yang telah dibuahi menjadi sel-sel embrionik dan bakal plasenta terjadi dalam bentuk morula yang terdiri kurang lebih 58 sel. Empat sampai lima hari setelah fertilisasi, morula berkembang menjadi blastokis, sebuah *hollow sphere* yang didalamnya terdapat cairan, dengan sebuah ruangan didalamnya yang disebut *blasticoel*. Perbedaan fitur dari blastokis adalah telah terdiferensiasinya satu kutub menjadi sebuah *inner cell mass* dari embrio awal mula terbentuk dan dikelilingi lapisan epitelial yang dinamakan *trophoectoderm* yang disusun oleh sel-sel trofoblas. *Trophoectoderm* nantinya akan berkembang menjadi chorion dan akan menjadi bagian dari sistem membran yang berperan dalam transpor nutrisi dari dan ke embrio. Blastokis akan terapung dengan satu bagian menempel pada dinding uterus dalam satu sampai dua hari, sementara itu tetap membelah dan berkembang serta mendapat makanan dari cairan yang disekresi oleh kelenjar-kelenjar endometrium. Sekarang blastokis siap untuk merobek dinding zona pellucida untuk menembus sebagian dari dinding uterus. Blastokis mulai tertanam di endometrium dan kehamilan dimulai. Implantasi juga didefinisikan sebagai suatu proses perlekatan embrio di dinding rongga uterus dan pertama kali menembus epitel dan kemudian terjadi sistem sirkulasi maternal untuk membentuk plasenta.<sup>7,8</sup> Massa sel bagian dalam menuju epitelium, sementara *trophoectoderm* akan menempel di epitelium, biasanya di fundus, dinding posterior uterus. Pada saat seperti ini blastokis belum sepenuhnya berimplantasi. Dalam waktu 24 jam setelah blastokis menempel di dinding uterus, trofoblas berubah menjadi sitotrofoblas dan sinsiotrofoblas. Sinsiotrofoblas inilah yang akan menempelkan blastokis ke dinding rahim melalui penembusan ke dalam

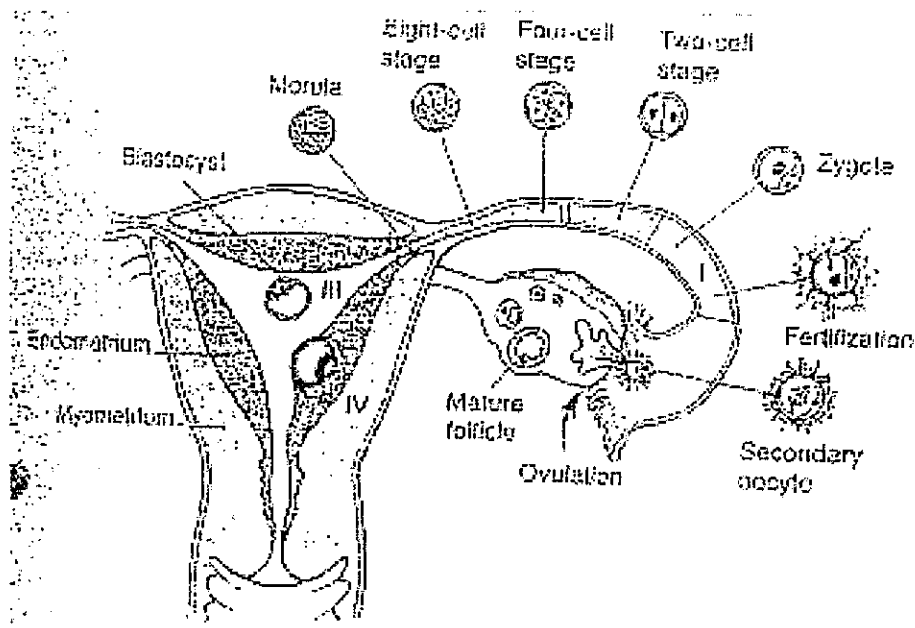
endometrium. Pada hari ke 9, blastokis sempurna tertanam pada jaringan endometrium dan akan terus tumbuh dan berkembang. Jika implantasi berlanjut sampai minggu ke dua, massa sel sebelah dalam akan berubah menjadi pipih dan blastokis diasumsikan sebagai cakram pipih dan datar yang membentuk diskus embrionik dua lapis (*bilaminar embryonic disk*). Dua lapisan ini terdiri dari endoderm dan ektoderm. Sebagaimana dua lapisan tersebut, beberapa membran pendukung dan struktur yang lain juga akan berkembang menjadi rongga amnion, kantung Yolk, khorion dan *body stalk*.<sup>8</sup>

Mekanisme yang pasti mengenai proses implantasi belum dapat diketahui secara detail sampai sekarang. Tetapi proses implantasi ini mungkin sekali terjadi sebagai resultansi dari berbagai faktor, antara lain kemampuan embrio itu sendiri, endometrium maternal dan respon imun maternal. Proses ini ada yang menyebutnya sebagai interaksi antara proses invasi trofoblas, desidualisasi dan penerimaan imunologis.<sup>9</sup> Penelitian lain menyebutkan, bahwa anomali embrio yang dalam hal ini direpresentasikan sebagai kualitas embrio tampaknya sangat berpengaruh terhadap keberhasilan implantasi. Kualitas embrio yang tidak baik mempunyai probabilitas lebih besar untuk mengalami kegagalan implantasi. Salah satu faktor yang mempengaruhinya adalah kelainan kromosom, terutama kelainan kromosom embrio yang dapat diketahui melalui pemeriksaan PGD (*preimplantation genetic diagnosis*). Pemeriksaan ini kemudian dikerjakan dengan menggunakan metode PCR (*polymerase chain reaction*) atau FISH (*fluorescent insitu hybridization*).<sup>10</sup> Pemeriksaan tersebut diatas merupakan pemeriksaan yang canggih dan membutuhkan biaya yang mahal.

Untuk memprediksi kemungkinan implantasi embrio, sebenarnya dapat dilakukan dengan penilaian kualitas embrio. Dengan melihat morfologi embrio atau dengan

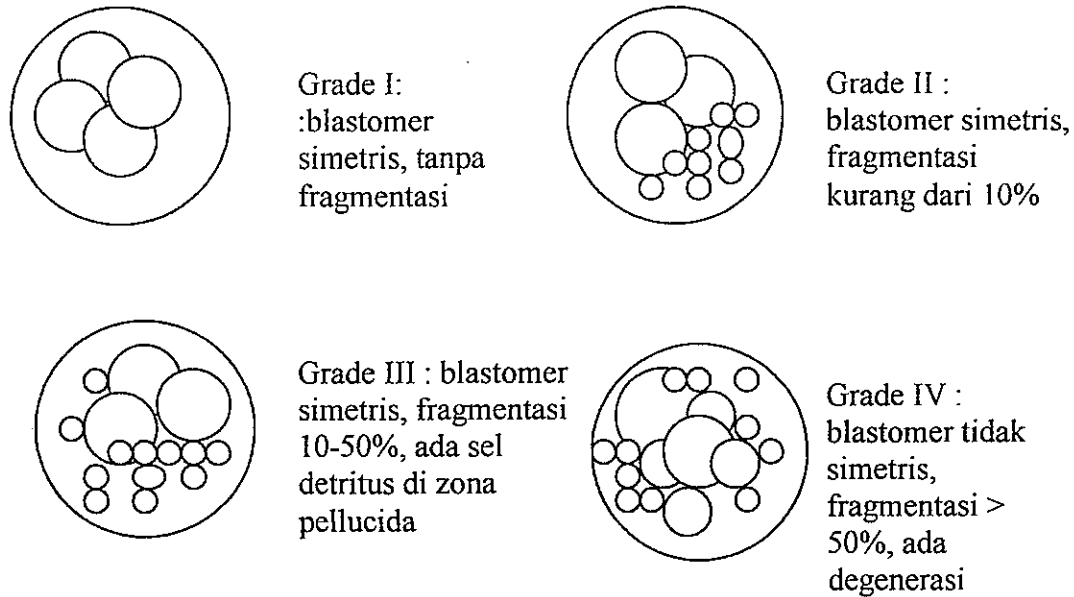
menggunakan skor kumulatif dari beberapa poin yang akan dinilai. Para ahli embriologi sampai saat ini masih banyak menggunakan penilaian dari Hill yang menitikberatkan pada penilaian ukuran blastomer dan serta adanya fragmentasi.<sup>11</sup>

Untuk lebih mudahnya mengikuti perjalanan implantasi embrio disajikan dalam gambar 1 dan penilaian kualitas embrio pada gambar 2.



Gambar 1. Tahap-tahap perkembangan embrio

Sumber : Carola R, Harley JP, Noback CR (eds). Human Growth & Development. In: Human Anatomy & Physiology. Mc Graw Hill. 1990. 858-61.<sup>8</sup>



Gambar 2. Penilaian kualitas embrio berdasarkan metoda Hill.

Sumber : Lens JW. The embryo practice. In : IVF Lab. Laboratory aspects of in-vitro fertilization. N.V. Organon. 1996.<sup>10</sup>

## 2.2. Interferon gamma dan respon imun adaptif

Interferon sebenarnya termasuk dalam kelompok sitokin yang terlibat dalam mekanisme kekebalan. Interferon dapat dibedakan dalam 2 tipe berdasarkan perbedaan kelompok protein secara serologis. Interferon tipe I terdiri dari IFN- $\alpha$  dengan rangkaian polipeptida kurang lebih 18 kD dan dibedakan lagi berdasarkan urutan asam aminonya menjadi IFN- $\alpha$ 1 dan IFN- $\alpha$ 2 atau IFN-tau. Sumber utama penghasil IFN- $\alpha$  ini adalah fagosit mononuklear sehingga sering disebut sebagai interferon leukosit. Interferon tipe I yang lain adalah IFN- $\beta$  yang mengandung produk dari sebuah gen tunggal, penghasil glikoprotein seberat 20 kD. Sel yang biasanya digunakan untuk menghasilkan IFN- $\beta$  sering disebut sebagai interferon fibroblas. Produksi dari IFN tipe I ini umumnya meningkat dengan adanya molekul RNA utas ganda sintesis, identik dengan sebuah

sinyal untuk berproduksi selama replikasi virus. Baik IFN- $\alpha$  maupun  $\beta$  disekresi selama adanya respon imun terhadap antigen, dalam hal ini antigen pengaktivasi sel T merangsang fagosit mononuklear memproduksi IFN tipe I. Kedua IFN tipe I ini mempunyai kemiripan dalam struktur dan akan berikatan dengan reseptor permukaan sel yang sama serta memunculkan respon imun seluler yang sama pula berupa sebuah rantai tunggal polipeptida.<sup>12</sup>

Interferon yang termasuk dalam tipe II adalah interferon gamma ( IFN - $\gamma$  ) atau dikenal sebagai interferon imun, dan merupakan sebuah glikoprotein homodimer yang mengandung kurang lebih 21-24 kD sub unit. Variasi ukuran dari sub unit tersebut disebabkan oleh variasi dari derajat glikosilasi, akan tetapi tiap sub unit mengandung sebuah polipeptida sebesar 18 kD yang dikode oleh gen yang sama. IFN- $\gamma$  dihasilkan baik oleh Th-0 dan

Th-1 Cluster Differentiation (Th-1 CD)4+ sel T pembantu dan oleh hampir semua Cluster Differentiation (CD) 8+ sel T. Transkripsi langsung dimulai sebagai respon dari aktivasi antigen dan diperbanyak oleh interleukin-2 (IL-2) dan interleukin-12 (IL-12). *Natural Killer Cell* (NK-cells) merupakan penghasil IFN  $\gamma$ . Hal ini dapat diketahui pada percobaan dengan menggunakan tikus kekurangan sel T (IFN  $\gamma$  bertindak sebagai mediator kekebalan alami). Bersama interferon tipe I, IFN  $\gamma$  bertindak sebagai anti proliferasi dan berfungsi sebagai anti virus. Kromosom yang bertugas mengatur keberadaan IFN  $\gamma$  adalah kromosom 5q dengan jumlah gennya sebanyak 1 buah. IFN  $\gamma$  berikatan dengan sebuah reseptor permukaan sel yang berbeda dengan reseptor yang digunakan IFN tipe I, tetapi secara struktural bentuknya relatif sama. IFN  $\gamma$  sebagai IFN tipe II memiliki beberapa fungsi yang penting dalam pengaturan kekebalan yang dapat

membedakannya dari IFN tipe I. Perbedaan antara tipe I dengan tipe II terletak pada berat molekulnya, penghasil utamanya, serta kemampuan tipe I dalam menghambat ekspresi molekul MHC kelas II. Pada IFN tipe II justru terjadi pemacuan ekspresi molekul MHC kelas II, akan tetapi kedua tipe IFN tersebut sama-sama mampu mengekspresikan MHC kelas I.<sup>7</sup>

Sel T yang terlibat dalam respon imun adaptif harus mengalami proliferasi dan diferensiasi menjadi sel yang mampu untuk melenyapkan patogen sehingga dinamakan sel T efektor prajurit atau *armed effector T cells* karena sel ini mampu bergerak dalam waktu yang singkat segera setelah mengenali MHC (*major histocompatibility complex*) kompleks peptida pada sel lain. Sel T efektor akan menjadi 3 kelas fungsional dalam mendeteksi antigen dari berbagai macam patogen. Dari letak antigen, maka dapat dibagi menjadi 2 kelas molekul MHC yang berbeda, yaitu kelas MHC I dan kelas MHC II. Antigen yang dihasilkan oleh patogen yang memperbanyak diri didalam sel akan dibawa menuju permukaan sel oleh molekul MHC kelas I dan dipresentasikan untuk CD8+ sel T sitotoksik yang akan membunuh sel terinfeksi. Sedangkan antigen yang dihasilkan oleh patogen yang mengalami multiplikasi di luar sel akan di telan oleh *poly morpho nuclear macrofag* dan masuk ke dalam vesikel intraseluler (organela) dan akan dibawa molekul MHC kelas II ke permukaan sel untuk dipresentasikan ke CD4+ sel T. Dalam reaksi CD4+sel T dapat dibedakan adanya 2 tipe efektor sel T, yaitu *inflammatory T cells* (Th-1) yang akan mengaktifkan makrofag terinfeksi untuk menghancurkan patogen intraselular dan helper T cells (Th-2) yang akan mengaktifkan sel B spesifik untuk menghasilkan antibodi. Untuk CD8+ sel T sitotoksik, patogen yang akan dihancurkan adalah jenis virus (*vaccina virus, influenza virus, rabies virus, hepatitis virus dll*), parasit (*toxoplasma*

*gondii*, plasmodium, chlamidia dll), bakteri (*listeria monocytogenes*) dengan cara langsung membunuh sel yang terinfeksi. Pembunuhan dilakukan dengan cara mengeluarkan perforin 1 (yang akan melobangi membran target sel), *granzymes* (yang terdiri dari protease), dan melalui pengeluaran sitokin. Sitokin utama yang dihasilkan oleh CD8+ sel T sitotoksik ini adalah IFN  $\gamma$  yang fungsinya antara lain dapat memblokir replikasi virus.<sup>13</sup>

Sel NK adalah efektor selain sel T yang dapat menghasilkan IFN- $\gamma$  dalam jumlah banyak. Sel ini dapat berfungsi menjadi kontrol dari beberapa infeksi, sebelum sel T diaktifkan untuk memproduksi IFN  $\gamma$ . Pentingnya sel NK sebagai penghasil IFN  $\gamma$  terbukti dalam penelitian menggunakan tikus yang berasal dari keluarga yang cukup tahan terhadap sebuah bakteri intraseluler yaitu *Listeria monocytogenes*. Jika terjadi kehilangan sel NK atau mutasi pada gen pengkode TNF- $\alpha$  atau IFN  $\gamma$  atau reseptornya membuat tikus-tikus tersebut menjadi sangat rentan dan kemudian akan mati dalam beberapa hari pasca infeksi, sebelum imunitas adaptif terbentuk. Beberapa virus dan bakteri akan menginduksi sekresi IL-12 (sitokin produk dari makrofag yang dapat menjadi faktor untuk mengaktifkan sel NK) untuk memproduksi IFN- $\gamma$ . Kehadiran IFN- $\gamma$  dan IL-12 ini akan menyebabkan CD4+ sel T murni yang seimbang (Th-0) berubah dan bergeser menjadi Th-1predominan.<sup>12,13,14</sup>

### **2.3. Interferon gamma dan kegagalan implantasi**

Faktor yang menentukan keberhasilan implantasi embrio selain invasi trofoblas dan desidualisasi adalah faktor imunologis. Konsep awal fenomena imunologi kehamilan adalah janin sebagai produk *allograf* mampu bertahan hidup di lingkungan baru dan asing, telah diperbaharui dengan konsep baru yang mengetengahkan adanya fenomena

imunodeviasi. Kaidah mengenai biologi fetomaternal yang sekarang banyak dianut tersebut berdasarkan pada adanya bipolaritas imunoregulasi pada kehamilan. Pada fenomena kehamilan terdapat keseimbangan antara reaksi rejeksi atau penolakan dan reaksi fasilitasi atau penerimaan. Reaksi rejeksi merupakan suatu proses pertahanan imunologis terhadap patogen dari luar yang dapat memacu agen seluler sel T efektor mengeluarkan sitokin yang biasa disebut *inflammatory T cell* atau T helper-1 dengan markernya antara lain IFN- $\gamma$ , IL-2, TNF- $\alpha$ . Sedangkan reaksi fasilitasi dapat memberikan lingkungan yang kondusif untuk pertumbuhan janin yang sering disebut *Th-2 Phenomenon* dengan markernya antara lain IL-4, IL-3, IL-10 dan TGF- $\beta$  atau dikelompokkan dalam T helper-2 (Th-2). Ketidakseimbangan antara aktivitas Th-1 dan Th-2 yang diyakini dalam konsep deviasi imunologi, yaitu kecenderungan peningkatan Th-1, akan menyebabkan terjadinya kegagalan implantasi embrio atau abortus. Secara fisiologis memang terdapat proses neoplasia dan inflamasi yang terlibat dalam implantasi embrio. Tetapi sebenarnya beberapa komponen respon inflamasi tersebut mempunyai peran penting dalam proses implantasi.<sup>1,4</sup> Sekresi sitokin dari limfosit akan menginfiltrasi endometrium dan mengaktifkan lisis seluler dari trofoblas. Mekanisme ini dapat bertindak sebagai sebuah proses penting dalam membatasi invasi trofoblas jauh ke dalam endometrium. Telah diketahui bahwa endometrium ternyata juga mensekresi beberapa sitokin antara lain IL-1, IL-6, IFN- $\gamma$ , *Colony stimulating factor*, TNF- $\alpha$  dan TGF- $\beta$  untuk membatasi proses nidasi atau invasi trofoblas.<sup>15</sup> Untuk lebih memudahkan memahami proses imunologis yang terjadi didalam tubuh kami sajikan gambar 3 mengenai peran Th1/Th2.

Gambar 3. Peran Th1/Th2 dalam penyakit.

Sumber : Romagnani S. The Th1/Th2 paradigm. *Immunology today*.1997;18(6):263.<sup>16</sup>

Dari paparan diatas, maka saat ini anomali embrio tidak dapat dianggap sebagai satu-satunya faktor yang dianggap paling bertanggung jawab atas terjadinya kegagalan implantasi embrio. Saat ini perlu dipertimbangkan pula eksistensi faktor penolakan embrio secara imunologis, dimana keseimbangan Th-1 dan Th-2 akan bergeser lebih dominan ke arah Th-1.

Sesuai dengan mekanisme keterlibatan IFN  $\gamma$  pada respon imun adaptif, maka IFN  $\gamma$  dalam darah maternal bisa meningkat diakibatkan oleh adanya reaksi terhadap patogen baik itu virus maupun bakteri. Pada infeksi virus, maka reaksinya akan melibatkan jalur CD8 + sel T sitotoksik melalui molekul MHC kelas I. Akan tetapi jika patogen berasal dari bakteri, maka jalur CD4+ sel T terutama yang akan bereaksi. Selain itu reaksi berantai yang terjadi juga akan melibatkan sel NK dalam memproduksi IFN  $\gamma$ .

Oleh sebab itu dibanding dengan sitokin yang lain yang termasuk Th-1 (TNF- $\alpha$  dan IL-2), maka IFN- $\gamma$  yang dapat menggunakan ketiga jalur tersebut secara bersamaan.<sup>12</sup>

Melalui percobaan binatang diketahui bahwa sel-sel maternal yang terinflamasi dimasuki desidua basalis di tempat implantasi embrio dalam 48 jam setelah implantasi.<sup>15</sup> Selanjutnya makrofag akan mengaktifkan sel NK sebagai efektor yang akan memproduksi IFN  $\gamma$ . Kenaikan kadar IFN  $\gamma$  yang terjadi akan menghambat proliferasi sel-sel trofoblas dan sebagai akibatnya perkembangan dan pertumbuhan trofoblas akan terhambat.<sup>17</sup> Adanya kenaikan TNF- $\alpha$  dan IFN  $\gamma$  dapat menginduksi hilangnya viabilitas dari trofoblas. Reaksi ini akan mengakibatkan kerusakan, peningkatan fraksi trofoblas yang mengandung *nicked DNA* dan terjadi peningkatan sel-sel yang lepas dengan kandungan DNA yang rendah serta DNA yang mengalami kerusakan (*fragmented DNA*). Selain itu jalur kerusakan embrio dapat terjadi oleh karena IFN  $\gamma$  mungkin dapat menyebabkan apoptosis dari vili sitotrofoblas.<sup>18</sup>

Sebenarnya IFN  $\gamma$  dapat terdeteksi pada jaringan maternal seperti endometrium, plasenta, peritoneum, serum darah, jaringan fetal seperti embrio itu sendiri dan amnion<sup>19,20</sup>. Keberadaan IFN  $\gamma$  di dalam vilus plasenta selama kehamilan normal belum diketahui fungsinya, meskipun demikian IFN  $\gamma$  ternyata meningkat jumlahnya sampai pada akhir semester II, terus menurun kadarnya pada awal trimester III sampai pasca persalinan. Akan tetapi peningkatan ini selalu diikuti dengan kenaikan dan penurunan komponen Th-2, sehingga tidak mengubah keseimbangan rasio Th-1 dan Th-2.<sup>21</sup> Penurunan IFN- $\gamma$  ini diduga sebagai akibat dari aktivitas *tumor growth factor beta-2* (TGF- $\beta$ 2) dan Prostaglandin E-2 yang bertindak sebagai modulator sitokin-sitokin Th-2. Sebuah penelitian pada anak babi menemukan adanya mRNA reseptor IFN  $\gamma$  pada

permukaan membran jaringan embrio mulai hari ke 10 masa gestasi. Penelitian tersebut juga mengungkapkan bahwa ekspresi reseptor IFN  $\gamma$  pada sel trofoblas terus mengalami perkembangan selama masa kehamilan. Penelitian ini menunjukkan bahwa endometrium maternal bukan satu-satunya sasaran untuk IFN, akan tetapi adanya induksi untuk mengekspresikan reseptor IFN  $\gamma$  di trofoblas sekitar hari ke 16 masa gestasi dianggap bertanggung jawab atas keberadaan IFN  $\gamma$  jaringan embrio yang mungkin pengaruh dari sistem autokrin lambat (*delayed autocrine effect*) dari IFN  $\gamma$  trofoblas.<sup>22</sup> Penelitian lain menyebutkan, IFN- $\gamma$  terdeteksi pada cairan medium dari kultur embrio manusia sebelum diimplantasikan atau pada hari ke 2 dan 4 konsepsi *in vitro*.<sup>23</sup> IFN  $\gamma$  ternyata juga terdeteksi pada cairan blastocoelic embrio tikus.<sup>24</sup> IFN  $\gamma$  dalam jumlah kecil diketahui dapat bersinergi dengan lipopolisakarida dalam menginduksi terjadinya resorpsi atau aborsi, tetapi hal ini dapat dicegah dengan alloimunisasi dan *anti natural killer anti serum*.<sup>25</sup>

Penemuan adanya keterlibatan IFN  $\gamma$  terhadap kegagalan implantasi embrio penting dalam penanganan infertilitas. Penelitian pada wanita infertil dibandingkan dengan wanita fertil dalam keadaan tidak hamil menunjukkan kadar IFN  $\gamma$  di serum darah wanita infertil lebih tinggi secara bermakna.<sup>20</sup> Wanita dengan tingkat stres yang tinggi juga dapat menyebabkan embrio gagal berimplantasi. Hubungan stress dengan kegagalan implantasi diperkirakan melalui kenaikan subset Th-1 (IL-1 dan TNF- $\alpha$ ) akan menurunkan aktivitas supresi dari TGF- $\beta$ 2 melalui jalur dependent *neurotransmitter substance P*.<sup>26</sup> Penurunan TGF- $\beta$ 2 akan menyebabkan modulasi sitokin-sitokin Th-2 berkurang dan Th-1 menjadi dominan. Secara langsung stres psikologis juga akan

meningkatkan secara bermakna produksi TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ , IL-6 dan IL-1 sehingga dapat menginduksi terjadinya kegagalan implantasi.<sup>27</sup>

#### **2.4. Waktu transfer dan implantasi embrio**

Embrio diperkirakan mencapai uterus di tahap morula-blastokis dengan kandungan sel kurang lebih 60 buah, yaitu pada kira-kira 4-5 hari setelah ovulasi pada kondisi alami. Peristiwa ini dijadikan dasar secara logika untuk melakukan pemindahan embrio kedalam uterus pada proses IVF. Awalnya para praktisi di bidang IVF memilih untuk melakukan transfer embrio ke uterus pada saat sel-sel embrio berjumlah 8 sampai 16 sel, itu berarti 3-4 hari setelah aspirasi folikel dilakukan. Hal ini dilakukan karena sistem kultur embrio masih belum memungkinkan untuk memelihara embrio selama 5 hari. Tetapi saat ini hal tersebut sangat memungkinkan dengan tersedianya perubahan kondisi kultur dan atau ko-kultur (kultur penunjang), sehingga embrio dapat hidup lebih lama dalam biakan bahkan bisa mencapai tahap pembelahan blastokis.

Tahapan perkembangan embrio secara *in vitro* di mulai dari zigot hingga terjadi blastokis. Pada sebuah siklus alami, zigot berada didalam tuba fallopii. Untuk mendekati keadaan alami metode ZIFT (*Zygote intra-fallopian transfer tube*) dilakukan pada hari ke-1 atau 20-24 jam setelah inseminasi agar terjadi zigot dalam tuba fallopii. Keuntungan dari transfer hari 1 tersebut adalah bahwa sel telur yang sudah dibuahi dan berada di luar tubuh ibu dalam waktu yang tidak terlalu lama segera dikembalikan ke suatu tempat dan kondisi natural. Kerugiannya adalah sampai saat ini masih belum jelas benar apakah zigot yang dipindahkan tersebut akan berkembang dengan baik hingga menjadi embrio yang berkualitas baik. Embrio yang ditransfer pada hari ke-2 atau 36-48 jam setelah inseminasi memiliki 2-4 sel, tetapi terkadang sudah mencapai 6-8 sel. Pada situasi alami embrio

masih berada didalam tuba fallopii, tetapi pada prakteknya para ahli mentransfer embrio tersebut langsung ke dalam uterus. Keuntungan dari transfer hari ke-2 adalah bahwa embrio hanya sebentar berada diluar tubuh untuk kemudian segera dilakukan transfer. Semakin lama berada diluar tubuh dan berada dalam kondisi yang tak alamiah berarti resiko kerusakan embrio akan semakin besar. Ancaman terhadap embrio yang berasal dari luar adalah berupa fluktuasi CO<sub>2</sub>, suhu dan kelembaban udara serta infeksi. Keberhasilan implantasi antara transfer embrio 4 sel dan 2 sel adalah 21% dan 14%. Kemudian para ahli mencoba mnegkultur embrio sampai hari ke 3. Pada hari ke-3 embrio telah berkembang menjadi 6-8 sel bahkan terkadang mencapai 10-12 sel. Kenyataan yang terjadi adalah embrio yang berkembang didalam kultur hingga 8 sel atau lebih merupakan embrio yang cukup potensial mengalami implantasi. Secara alami seharusnya pada hari ke-3 ini embrio masih berada di dalam tuba fallopii sedangkan pemindahan yang dilakukan ke dalam uterus pada proses IVF, tampaknya tidak terlalu berpengaruh pada keberhasilan implantasinya. Embrio kemudian mengapung di dalam kavum uteri sampai siap untuk berimplantasi. Penelitian mengenai keberhasilan implantasi pada embrio yang ditransfer hari ke-2 dibandingkan hari ke-3 menunjukkan bahwa embrio yang ditransfer hari ke-3 meningkat angka keberhasilan implantasinya.<sup>28</sup> Akan tetapi dibandingkan dengan transfer embrio yang dilakukan pada hari ke-5 ternyata tidak didapatkan adanya peningkatan angka keberhasilan implantasi secara bermakna.<sup>29</sup> Meskipun sebenarnya transfer embrio yang dilakukan pada hari ke -4 atau 5 lebih mendekati situasi alami. Pada saat sekarang ini diketahui bahwa embrio mampu untuk mengubah dari informasi maternal ke informasi embrionik (*maternal to zygote transition*). Beberapa laporan menunjukkan bahwa keberhasilan implantasi cukup banyak didapatkan setelah dilakukan

transfer pada tahap ini dengan mengubah kondisi kultur embrio dengan cara menggunakan ko-kultur (sel satu lapis atau *mono layer cells*). Sebuah penelitian menunjukkan penggunaan satu lapis sel Vero (sel ginjal kera) dapat meningkatkan jumlah sel didalam *inner cell mass* dari blastokis. Akan tetapi hal ini tetap masih diperdebatkan penggunaannya di dalam laboratorium IVF sebagai bagian pelaksanaan rutin disebabkan adanya ancaman kontaminasi virus.<sup>30</sup>

Dari paparan diatas dapat diperoleh gambaran bahwa aktu transfer embrio merupakan salah satu hal yang harus diperhatikan untuk meningkatkan keberhasilan implantasi. Hal ini dikaitkan dengan kesiapan endometrium untuk menerima embrio dalam berimplantasi. Seringkali asinkronisasi antara waktu transfer dan kesiapan endometrium mengakibatkan kegagalan implantasi embrio.<sup>31</sup>

### BAB 3.

## KERANGKA KONSEPTUAL, KERANGKA TEORI DAN HIPOTESIS

### 3.1. Kerangka teori

Berdasarkan tinjauan pustaka didepan, maka kerangkak teori penelitian dapat disusun dan diringkas sebagai dasar hipotesis dan disajikan dalam diagram 1.

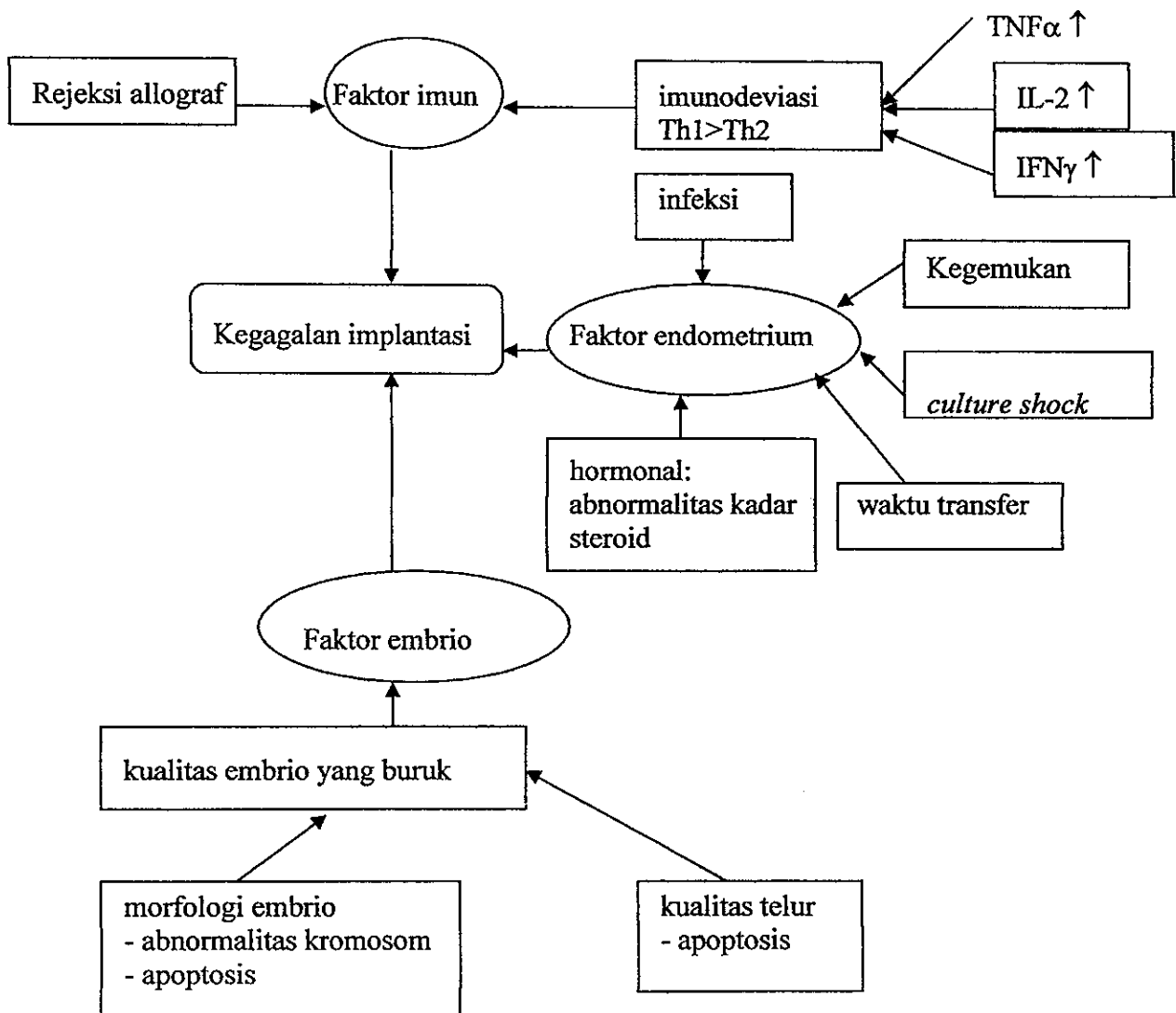


Diagram 1. Kerangka teori

### 3.2. Kerangka Konsep

Kerangka konsep penelitian disederhanakan dan disajikan dalam diagram 2. dibawah ini :

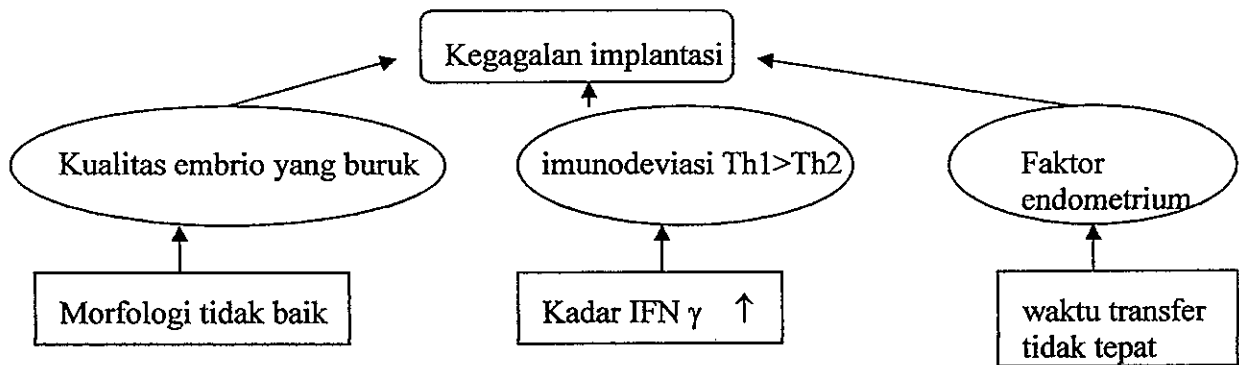


Diagram 2. Kerangka Konsep

### 3.3. HIPOTESIS

Dideduksi dan induksi dari permasalahan, kerangka teori dan kerangka konsep penelitian dapat dibuat hipotesis penelitian sebagai berikut :

1. Kualitas embrio kurang baik dapat menyebabkan kegagalan implantasi embrio
2. a. Didapatkan perbedaan bermakna kadar IFN  $\gamma$  serum antara yang berhasil implantasi dan gagal implantasi.  
b. Didapatkan perbedaan bermakna kadar IFN  $\gamma$  supernatan kultur limfosit antara yang berhasil implantasi dan gagal implantasi
3. Waktu transfer embrio berkorelasi dengan keberhasilan implantasi

## BAB 4.

### METODE PENELITIAN

#### 4.1. Rancangan penelitian

Penelitian yang akan dilakukan adalah penelitian observasional dengan menggunakan disain potong lintang dan bersifat perbandingan analisa laboratoris .

#### 4.2. Populasi dan definisi

Populasi penelitian ini adalah wanita peserta program IVF di Klinik Permata Hati RS Sardjito Yogyakarta. Dipilihnya kelompok ini dengan pertimbangan hanya melalui program bayi tabung, dapat diketahui perjalanan fertilisasi dan perkembangan embrio dengan jelas sesuai dengan maksud dan tujuan penelitian. Klinik Permata Hati RS Sardjito Yogyakarta adalah penyelenggara program IVF sejak tahun 1995. Dari populasi tersebut diambil dua kelompok sampel, yaitu :

1. Wanita pasangan infertil yang mengikuti program *in vitro fertilization* (IVF) di Klinik Permata Hati RS. DR. Sardjito yogyakarta yang telah melalui tahap pemindahan embrio atau *embrio transfer* (ET) dengan sejumlah embrio hasil fertilisasi *in vitro* atau *in vitro fertilization* (IVF) dan berhasil implantasi
2. Wanita pasangan infertil yang juga mengikuti program IVF-E, tetapi embrio gagal berimplantasi .

Yang dimaksud embrio berhasil berimplantasi pada penelitian ini adalah peserta program IVF yang telah mengikuti alur penatalaksanaan program hingga sampai ke tahap fertilisasi *in vitro* dan pemindahan sejumlah embrio atau transfer embrio (IVF-ET) ke rahim ibu atau sudah melalui. Pasca pemindahan embrio pada hari ke 14 pada perkiraan

menstruasi berikutnya wanita tersebut tidak mengalami perdarahan pervaginam atau menstruasi. Kehamilan wanita ini juga dibuktikan secara kimiawi kualitatif dengan melakukan tes kehamilan (menggunakan  $\beta$ -hCG) melalui sampel urin yang dinyatakan positif. Selanjutnya diagnosis pasti kehamilan dilakukan melalui pemeriksaan USG pada minggu ke 5 dengan didapatkannya gambaran kantung kehamilan maupun buah kehamilannya/janin.

Yang dimaksud embrio gagal berimplantasi pada penelitian ini adalah peserta program IVF yang telah melalui penatalaksanaan program hingga ke tahap fertilisasi invitro dan pemindahan embrio (IVF-ET) ke rahim ibu, tetapi pada hari ke 14 pasca pemindahan embrio wanita tersebut mengalami perdarahan pervaginam atau menstruasi. Selain itu pemeriksaan  $\beta$ -hCG kualitatif dengan sampel urin juga dinyatakan negatif.

#### **4.3. Besar sampel**

Penelitian ini menggunakan *purposive sample* yang di batasi waktu yaitu sampel serum darah subyek penelitian yang terkumpul dari bulan Januari-Desember 2000. Hal ini terpaksa dilakukan karena tidak ada penelitian sebelumnya dengan subyek sejenis. Angka prevalensinya juga tidak diketahui oleh karena sedikitnya jumlah peserta program IVF-ET di Klinik Infertilitas RS DR Sardjito mengingat biaya penelitian dan program IVF yang cukup tinggi.

#### **4.4. Variabel penelitian.**

Variabel bebas dalam penelitian ini adalah kadar serum IFN  $\gamma$  dalam pg/ml, sedangkan variabel tergantungnya adalah terjadinya  $\beta$ -hCG positif dan  $\beta$ -hCG negatif sebagai tanda bahwa embrio sudah mengalami implantasi atau tidak.

Berdasarkan teori yang telah diuraikan sebelumnya, peningkatan IFN- $\gamma$  dapat berasal dari jalan Th-1, CD8+ dan sel NK. Bergesernya keseimbangan Th-1/Th-2 seharusnya juga dilihat dari kadar IL-2, TNF- $\alpha$ , IL-4, IL-10 dan TGF- $\beta$ . Tetapi oleh karena keterbatasan dana, peneliti hanya dilakukan dengan melihat kadar IFN- $\gamma$ , tanpa memperhatikan kadar yang lainnya.

Variabel bebas untuk kualitas embrio adalah kelas embrio berdasarkan metode Hill dalam kategori embrio kelas I, II, III dan IV. Sedangkan untuk variabel tergangungnya adalah terjadinya  $\beta$ -hCG positif dan  $\beta$ -hCG negatif sebagai tanda bahwa embrio sudah mengalami implantasi.

#### **4.5. Tempat dan waktu penelitian**

Penelitian dilakukan di Klinik Infertilitas Permata hati RS Sardjito Yogyakarta dan Laboratorium Hayati Universitas Gadjah Mada Yogyakarta antara April- Mei 2001.

#### **4.6. Protokol penelitian.**

##### **4.6.1. Penilaian kualitas embrio**

Data penilaian kualitas embrio merupakan data sekunder yang diperoleh catatan penilaian embrio oleh ahli embriologi setempat. Kualitas embrio dinilai berdasarkan kaidah dari Hill yang telah ada, yaitu :

- embrio kelas I, adalah embrio yang mempunyai ukuran blastomer yang sama, mungkin ada fragmentasi tapi sangat minimal dan tidak nampak adanya degenerasi
- embrio kelas II, adalah embrio yang tidak sama ukuran blastomernya, fragmentasi lebih dari 10%, tapi tidak ada degenerasi
- embrio kelas III, adalah embrio yang terdiri dari blastomer dengan ukuran yang sama, tetapi terdapat fragmentasi lebih dari 50% dan sel detritus dalam zona pellucida

- embrio kelas IV, adalah embrio yang terdiri dari blastomer dalam ukuran yang tidak sama, fragmentasi berlebihan atau total fragmentasi, membran blastomer tampak rapuh, tampak degenerasi.

#### 4.6.2. Pemeriksaan kadar IFN $\gamma$

Program bayi tabung dimulai dan dikerjakan setelah adanya kesediaan pasangan suami istri yang mengalami kesulitan mendapatkan keturunan dan telah mendapatkan pemeriksaan baik pada suami ataupun istri serta bersedia mengikuti program. Beberapa faktor istri telah diperiksa dan dapat disebutkan disini antara lain adalah adanya obstruksi tuba bilateral atau tuba non paten bilateral, endometriosis, hidrosalping bilateral. Sedangkan faktor suami untuk program IVF ini adalah oligozoospermia atau oligoasthenozoospermia berat yang diakibatkan oleh berbagai macam sebab antara lain varikokel, hormonal ataupun sebab yang tidak diketahui. Diagnosis kelainan wanita dilakukan melalui berbagai pemeriksaan antara lain : deteksi ovulasi melalui USG untuk mengetahui ada atau tidaknya folikel yang diperkirakan dapat mengalami ovulasi; juga Histerosalpingografi untuk melihat patensi tuba; beberapa juga dilakukan histerolaparoskopi eksplorasi untuk mengetahui secara langsung kondisi organ reproduksinya. Setelah kelainan terdiagnosis, maka suami istri ditawarkan kesediaannya untuk mengikuti program bayi tabung.

Pengobatan pertama program IVF ini dimulai dengan induksi ovulasi menggunakan berbagai preparat antara lain klomifen sitrat, GnRH (*Gonadotrophin releasing hormone*) analog, atau FSH (*follicle stimulating hormone*). Selanjutnya profil hormon yaitu estrogen, FSH, LH (*luteinizing hormone*) dan P4 (*progesterone*) serta perkembangan folikel peserta program IVF dipantau. Peserta program yang hasil tes  $\beta$

hCG nya pada hari 14 setelah fertilisasi dinyatakan negatif dikelompokkan dalam subyek gagal implantasi, sedangkan peserta program dengan tes  $\beta$ hCG positif dan setelah dilakukan pemeriksaan USG pada minggu ke 5 terlihat adanya implantasi embrio, maka dikelompokkan dalam subyek berhasil implantasi.

Pemeriksaan kadar IFN  $\gamma$  serum dilakukan dengan metode ELISA menggunakan sampel serum darah perifer yang diambil pada hari ke 2 atau ke 3 sebelum aspirasi oosit. Alat yang dipakai adalah spuit sekali pakai 5 cc untuk mengambil darah vena subjek. Setelah itu dilakukan sentrifus untuk mendapatkan serum. Pemeriksaan dilakukan dengan metode ELISA non-kompetitif dari serum darah subyek. Bahan yang dipergunakan adalah serum darah yang disimpan di freezer dengan suhu  $<20^{\circ}$  C. Setelah sampel serum terkumpul  $\pm$  31 buah selama 1 bulan, kemudian dibawa ke Laboratorium Hayati UGM untuk diperiksa kadar IFN  $\gamma$ .

Sebagai pemeriksaan tambahan, beberapa peserta program IVF yang setuju juga diambil darah vena sebanyak 15 cc yang ditampung dalam tabung berheparin untuk pemeriksaan kadar IFN  $\gamma$  yang diproduksi oleh limfosit. Supernatan yang didapatkan dengan cara isolasi limfosit kemudian diinduksi dengan menggunakan PHA (*Phyto Haem Agglutinin*).

Protokol isolasi limfosit yang diinduksi dengan menggunakan PHA, dilanjutkan dengan mengambil supernatan kultur.<sup>32</sup>

- 15 ml darah heparin (2000 u heparin/100 ml) diencerkan dengan larutan Hank's BSS dengan perbandingan 1:1 dalam tabung 50 ml kemudian dicampur secara merata.
- 12-15 ml Ficol-Hypaque diambil dengan pipet dan dimasukkan ke dasar tabung secara perlahan. Lalu di sentrifus selama 15 menit pada 1800 rpm ( $\pm$  300 g).

- Cairan yang diatas dibuang sampai  $\pm 1,5$  cm diatas cairan putih limfosit, kemudian limfosit dipindahkan ke tabung lain. Ditambahkan larutan Hank's BSS sampai 50 ml lalu dicampur.
- Diputar selama 10 menit pad 1400 rpm, kemudian supernatan dibuang.
- Pellet diresuspensi dengan cairan sisa dan ditambahkan larutan Hank's BSS sampai 50 ml lalu dicampurkan. Disentrifus selama 10 menit pada 1400 rpm kemudian supernatan dibuang.
- Pellet diresuspensi dalam 3-4 ml. Larutan RPMI+5% human serum. Jumlah sel yang ada kemudian dihitung dengan menggunakan bilik hitung.
- Suspensi sel kemudian dimasukkan ke dalam sumuran dimana tiap sumur 100 ul ( $10^5$ ) dan ditambahkan 100 ul larutan mitogen PHA 1/100.
- Dieramkan sel selama 2 hari dalam inkubator CO2 5% dengan suhu 37oC setelah itu diambil supernatannya untuk diperiksa kadar IFN  $\gamma$ .

Bahan reagen untuk menganalisa IFN  $\gamma$  dalam penelitian ini diproduksi oleh laboratorium *Central Laboratorium Blood Transfusion* Amsterdam, Belanda dengan merek *Pelikine@ kit for IFN- $\gamma$* . Berdasarkan buku petunjuk dari pembuat, reagen ini mempunyai sensitifitas  $2 \times$  (*MEAN calculated zero signal*) : 4-8 pg/ml (*shake static incubation*). Nilai IFN  $\gamma$  yang muncul dibawah 10 pg/ml dinyatakan sebagai sampel berasal dari individu sehat. Kemampuan deteksi kadar IFN  $\gamma$  terendah adalah 0-2,5 pg/ml sedangkan tertinggi 1800 pg/ml.<sup>33</sup>

Prinsip kerja metode ELISA non-kompetitif adalah adanya antigen yang khusus terikat pada fase padat. Antibodi subjek tak berlabel yang ditambahkan sesaat kemudian akan bereaksi dengan antigen. Dilanjutkan dengan pencucian pertama dan langsung

ditambahkan enzim-berlabel antiglobulin. Antibodi kedua ini akan bereaksi dengan bagian Fe dari antibodi subjek yang terikat pada fase padat. Jika tidak terdapat antibodi subjek yang terikat pada fase padat, antibodi terlabel kedua tidak terikat. Setelah langkah pencucian kedua, substrat enzim ditambahkan. Jumlah enzim yang terdeteksi adalah berbanding langsung dengan jumlah antibodi di dalam spesimen. Metode ini mempunyai spesifisitas dan sensitivitas yang tinggi<sup>19</sup>.

Adapun cara pemeriksaan IFN  $\gamma$  adalah sebagai berikut<sup>33</sup> :

- Dilakukan *coating antibodi* pada suhu ruangan
- Diencerkan *coating antibodi* 1:100 dalam PBS, ditambahkan 100 ul/sumuran, diinkubasi pada suhu kamar
- Plate dicuci 5 kali dengan menggunakan PBS/Tween
- Ditambahkan 200ul/sumuran larutan blocking (500ul *blocking* plus 25 ml PBS)
- Diinkubasi 1 jam pada suhu kamar
- Menyiapkan standar dan sampel dalam buffer yang diencerkan
- Kurva standar cit a:konsentrasi tertinggi =100 ul standar ditambah 300 ul buffer yang diencerkan= 1800 pg/ml diencerkan 1 sampai 3 kali sehingga konsentrasinya 1800-600-200-66,7-22,2-7,4-2,5-0 pg/ml
- Ditambahkan sampel pada *plate* kering (tidak dicuci setelah blocking) 100ul/sumuran, dibiarkan selama 1 jam pada suhu kamar
- Dicuci 5 kali dengan PBS, lalu ditambahkan 100 ul/sumuran biotinylated AB (1:100) dalam buffer yang diencerkan
- Diinkubasi 30 menit, ditambahkan substrat, ditambahkan *stop solution*
- Diukur pada od 450 nm dan kemudian diplot pada kurva standar seperti diatas

### **4.6.3. Waktu transfer embrio**

Data mengenai waktu transfer embrio merupakan data sekunder yang dibuat oleh ahli embriologi klinik yang terdapat didalam catatan medik subyek. Waktu transfer embrio adalah saat di mana embrio di transfer atau dikembalikan ke uterus setelah terjadinya fertilisasi in vitro. Pencatatan waktu transfer dihitung mulai dari hari pertama menstruasi sampai dilakukannya transfer embrio.

## **4.7. Analisis Data**

### **4.6.1. Penilaian kualitas embrio**

Data yang berasal dari variabel bebas yaitu kualitas embrio berupa data ordinal (embrio kelas I,II,III dan IV) dan data dari variabel terikat juga menggunakan data ordinal (berhasil dan gagal implantasi). Setelah memasukkan data, kemudian dilihat distribusinya. Selanjutnya dilakukan uji korelasi Kendal's tau-b untuk mendapatkan kemaknaannya dengan menggunakan program SPSS 10.0 dengan signifikansi  $p < 0,05$

### **4.7. 2. Kadar IFN $\gamma$**

Data yang berasal dari variabel bebas (kadar IFN- $\gamma$ ) menggunakan skala nominal (pg/ml) dan variabel terikat yang berskala ordinal (berhasil dan gagal implantasi). Setelah data selesai dimasukkan, kemudian dilihat distribusinya, dicari reratanya dan standar deviasi. Selanjutnya dilakukan uji beda statistic of difference M-Whitney dan dianalisa secara statistik kemaknaannya melalui program SPSS 10.0 dengan tingkat kemaknaan  $p < 0.05$ .

#### **4.7.3. Waktu transfer embrio**

Data yang berasal dari variabel bebas (waktu transfer) menggunakan skala ordinal (hari ...) dan variable terikat yang berskala ordinal (berhasil dan gagal implantasi). ). Setelah data selesai dimasukkan, kemudian dilihat distribusinya. Selanjutnya dilakukan uji korelasi dan dianalisa secara statistik Kendal's tau-b melalui program SPSS 10.0 dan telah ditentukan tingkat kemaknaan  $p < 0.05$ .

## BAB 5.

### HASIL PENELITIAN

#### 5.1 Hasil penelitian

Sebanyak 31 orang wanita peserta program bayi tabung di Klinik Ingin Anak “Permata Hati” RSUP DR Sardjito Yogyakarta yang telah menerima pemindahan embrio periode September 1999 sampai Maret 2000 diikutkan sebagai subyek penelitian. Didapatkan 6 subyek berhasil implantasi dan 25 subyek mengalami kegagalan implantasi. Pada penelitian ini telah dipindahkan sebanyak 81 embrio(100%) dari 31 subyek penelitian. Pada kelompok berhasil implantasi (n=6) telah dipindahkan embrio sebanyak 18 embrio dengan perincian embrio kelas I sebanyak 9 embrio (50%), embrio kelas II sebanyak 7 embrio (38,9%), embrio kelas III 2 embrio (11,1%) dan tidak memindahkan embrio kelas IV karena memang tidak ada. Sedangkan kelompok yang gagal implantasi (n=25) telah dipindahkan embrio sebanyak 63 embrio dengan perincian embrio kelas I sebanyak 13 embrio (20,6%), embrio kelas II sebanyak 30 embrio (47,6%), embrio kelas III sebanyak 20 embrio (31,8%) dan tidak memindahkan embrio kelas IV karena memang tidak ada (0%) (Tabel 1. Implantasi dan penilaian kualitas embrio).

Perbandingan kadar IFN  $\gamma$  serum kedua kelompok tersebut, rerata dan uji statistiknya disajikan dalam Tabel 2 a Implantasi embrio dan kadar IFN  $\gamma$  serum. Sedangkan pada pengukuran kadar IFN  $\gamma$  dari supernatan kultur juga dicoba dilakukan, akan tetapi adanya kendala dana serta adanya subyek yang tidak bersedia mengikuti penelitian menyebabkan data yang berhasil dikumpulkan hanya sedikit (n=7), sehingga hanya ditampilkan secara deskriptif seperti tersaji pada Tabel 2 b. Implantasi embrio dan kadar IFN  $\gamma$  supernatan kultur.

Waktu transfer embrio dilaksanakan bervariasi pada hari ke-12 hingga hari ke-21. Terbanyak dilakukan transfer embrio pada hari ke-14 (13 embrio pada kelompok gagal implantasi dan 11 embrio pada kelompok berhasil implantasi) dan pada hari ke-12 ditransfer embrio paling sedikit (5 embrio pada kelompok gagal implantasi). Analisa statistik dan table mengenai korelasi antara waktu transfer dengan keberhasilan implantasi disajikan pada table 3. Implantasi dan waktu transfer embrio

Tabel 1. Implantasi dan penilaian kualitas embrio

	Hasil implantasi		total
	Gagal	Berhasil	
Kualitas <i>Grade</i> I	13	9	22
Embrio <i>Grade</i> II	30	7	37
<i>Grade</i> III	20	2	22
Total	63	18	81

*Kendall's tau-b*

$P=0,012$

*Koefisien Korelasi -0,267*

Hipotesis 1 diterima oleh karena didapatkan perbedaan bermakna antara kualitas embrio kelompok gagal implantasi dan kelompok yang berhasil implantasi ( $P=0,012$ ). Selain itu didapatkan pula korelasi negatif antara kualitas embrio dengan hasil implantasi yaitu semakin besar *grade*-nya makin besar kemungkinan mengalami kegagalan implantasi embrio (koefisien korelasi  $-0,267$ ), sebab makin besar *grade* makin jelek kualitas embrio.

Tabel 2 a. Implantasi embrio dan kadar IFN  $\gamma$  serum

Kelompok	N	Minimum	Maksimum	Rerata	Simpangan baku
Gagal implantasi	25	3,19	7,73	4,86	0,96
Berhasil implantasi	6	3,94	8,11	5,82	1,66

*Mann whitney U*  $P = 0,193$

Hipotesis 2a ditolak oleh karena tidak didapatkan perbedaan bermakna kadar IFN  $\gamma$  serum antara kelompok yang gagal implantasi embrio dengan kelompok yang berhasil implantasi embrio ( $P=0,193$ )

Tabel 2b. Implantasi embrio dan kadar IFN  $\gamma$  kultur supernatan

No.	Nomer urut subyek	Kadar IFN $\gamma$	Hasil implantasi	
			gagal	berhasil
1.	12	3,914	Gagal	
2.	8	91,27	Gagal	
3.	10	12,52	Gagal	
4.	11	20,99	Gagal	
5.	17	4,194	Gagal	
6.	20	4,577	Gagal	
7.	31	89,73		

Data yang tersedia sangat sedikit yang disebabkan adanya kendala dana pemeriksaan yang terbatas serta adanya subyek yang tidak bersedia mengikuti penelitian. Dari data yang diperoleh pada kelompok berhasil implantasi hanya didapatkan 1 subyek saja, sehingga tidak dapat dilakukan uji beda secara statistik. Meskipun demikian terpaksa

secara kasar metode ini juga tidak menjanjikan untuk dipakai sebagai determinan keberhasilan implantasi embrio.

Tabel 3. Implantasi dan waktu transfer embrio

Waktu transfer (Hari ke ...)	Hasil implantasi		Total
	Gagal implantasi	Berhasil implantasi	
12	15		5
13	11	2	13
14	13	11	24
15	17		18
16	1		1
17	10		10
18	2	4	6
19	2		2
21	2		2
total	63	18	81

*Korelasi Kendall's tau-b*  $P=0,274$

Hipotesis ke-3 ditolak oleh karena tidak didapatkan korelasi antara waktu transfer embrio dengan keberhasilan implantasi antara kelompok gagal implantasi dan kelompok berhasil implantasi ( $P=0,274$ ).

## BAB 6.

### PEMBAHASAN

#### 6.1. Kualitas embrio dan implantasi

Metode yang banyak digunakan untuk menilai kualitas embrio yang ada selama ini dalam program IVF adalah berdasarkan penilaian dari Hill, yang membagi embrio dalam empat kelas.<sup>11</sup> Peran kualitas embrio terhadap keberhasilan implantasi pada penelitian ini dapat ditunjukkan dengan adanya perbedaan bermakna secara statistik dengan  $P = 0,012$  ( $P < 0,05$ ), antara embrio yang berhasil implantasi dan yang gagal implantasi di tiap-tiap kelas embrio. Dapat dilihat pada tabel 1, persentase embrio dengan kualitas kelas I pada peserta yang berhasil implantasi (50%) jauh lebih besar dibandingkan dengan yang gagal implantasi (20,6%). Sebaliknya, embrio dengan kualitas yang buruk (embrio kelas III) lebih banyak didapatkan pada kelompok gagal implantasi (47,6%) dibandingkan kelompok berhasil implantasi (11,1%). Selain itu dengan koefisien korelasi yang negatif ( $KK = -0,267$ ) dapat dikatakan bahwa makin tinggi *grade* embrio, makin besar kemungkinan untuk gagal implantasi.

Komponen utama dari penilaian kualitas embrio dengan metode Hill adalah ukuran blastomer dan fragmentasi. Morfologi embrio dengan ukuran blastomer yang baik dan tidak adanya fragmentasi merupakan nilai yang utama. Beberapa penelitian kemudian menghubungkan dengan adanya proses apoptosis dan nekrotisasi pada embrio.<sup>34</sup> Sebenarnya apoptosis adalah sebuah proses yang wajar terjadi pada sebuah organisme yang merujuk pada pergantian dari sel oleh kematian sel itu sendiri. Kejadian yang merupakan rangkaian dari apoptosis adalah kondensasi dari kromatin, pecahnya inti sel, menggelembungnya membran plasma dan sel mengalami fragmentasi menjadi

*apoptosis bodies*. Proses ini juga dikenal sebagai kematian sel yang terprogram (*programmed cell death*), meskipun ternyata pengertian ini hanya menggambarkan satu tipe saja dari apoptosis dan tidak terjadi pada semua tipe.<sup>35</sup> Apoptosis dikatakan merupakan penyebab yang tak tampak dari tingginya insiden fragmentasi yang terjadi pada embrio preimplantasi yang mungkin dikaitkan dengan abnormalitas kromosom atau kondisi kultur yang kurang menunjang. Sebuah penelitian mengenai kondisi kultur dari dua jenis media kultur yang berbeda (M16 dan KSOM) dan pengaruhnya terhadap embrio pre implantasi dari tikus yang berbeda strain (MF1 dan C57BL6/CBA) menunjukkan bahwa komposisi kimia dan genetik membawa pengaruh terhadap tingkat apoptosis masing-masing embrio.<sup>36</sup> Penelitian mengenai apoptosis pada embrio sapi preimplantasi yang menunjukkan adanya ekspresi Bcl-2 yang tinggi pada embrio dengan kualitas yang baik, sedangkan pada embrio dengan kualitas yang buruk didapatkan peningkatan ekspresi BAX. Rasio dari BAX tersebut dapat pula dipergunakan sebagai petunjuk apakah embrio tersebut akan berkembang dengan baik atautkah mengalami apoptosis.<sup>37</sup>

Berdasarkan wawancara dengan beberapa dokter yang terlibat dalam pelaksanaan program bayi tabung di Permata Hati terungkap bahwa faktor usia ibu merupakan salah satu faktor dalam menghasilkan embrio yang berkualitas. Semakin tua usia ibu, makin besar kemungkinan dihasilkan sel telur yang tidak baik. Sehingga menghasilkan embrio yang berkualitas tidak baik. Jawaban para dokter itu disesuaikan dengan referensi yang menyebutkan bahwa sel-sel kumulus dari kelompok pasien IVF-ET yang berusia diatas 40 tahun akan mengalami peningkatan insiden apoptosis yang sangat bermakna.<sup>38</sup>

Kualitas embrio yang nyata-nyata dipengaruhi oleh kualitas sel telur yang dihasilkan ibu ternyata juga sangat dipengaruhi oleh induksi ovulasi yang dilakukan<sup>39</sup>. Jenis induksi yang diberikan, lamanya atau jangka waktu pemberian, maupun tingginya kadar dari estrogen, FSH dan LH yang dihasilkan oleh induksi tersebut sangat mempengaruhi. Meskipun demikian tampak adanya ketidakseragaman pendapat mengenai penggunaan induksi ovulasi berdasarkan data catatan medisnya. Berbagai penelitian menyebutkan bahwa kualitas sel telur yang dihasilkan dari induksi ovulasi yang menggunakan *GnRH analog* akan lebih baik kualitasnya dibanding dengan jenis induksi yang lain, misalnya dengan menggunakan klomifen sitrat atau FSH. Selain itu jangka waktu pemberian yang dikategorikan sebagai *long protocole* juga dikatakan dapat meningkatkan kualitas sel telur.<sup>40</sup>

Kualitas embrio juga dipengaruhi oleh faktor abnormalitas kromosom pada sel-ovum. Embrio yang mengalami berhenti berkembang dan banyak fragmentasinya sering disebabkan oleh adanya kelainan kromosom. Kelainan kromosom yang dibawa serta oleh ovum tersebut antara lain disebabkan oleh adanya aneuploidi.<sup>41</sup>Peningkatan terjadinya aneuploidi ternyata juga berkaitan dengan peningkatan usia ibu.

## **6.2. IFN $\gamma$ dan implantasi embrio**

Interferon gamma termasuk kelompok sitokin yang merupakan glikoprotein monomerik yang mengandung asam amino yang mempunyai panjang kurang lebih 21-24 Kd sub unit. IFN  $\gamma$  dihasilkan oleh T helper type 0 dan T helper type 1 dan oleh hampir semua sel T CD8+ atau sel T sitotoksik selain itu juga dihasilkan oleh sel Natural Killer . Transkripsi langsung dimulai sebagai respon dari aktivasi antigen dan diperbanyak oleh interleukin-2 dan interleukin-12. Keterlibatan IFN  $\gamma$  dalam respon imun adaptif terutama

dengan cara mengaktifkan makrofag terinfeksi untuk menghancurkan patogen intra seluler. menyebabkan IFN  $\gamma$  dimasukkan dalam kelompok T helper type 1 (Th 1).<sup>14</sup>

Konsep imunodevasi antara Th1 dan Th2 mengatakan bahwa kenaikan kadar IFN  $\gamma$  sebagai komponen utama Th1 akan menyebabkan terjadinya dominasi Th1 terhadap Th2. Penelitian terhadap hewan coba dan kelompok wanita yang sering mengalami keguguran menunjukkan adanya peningkatan Th1 dan tertekannya Th2, meskipun sebenarnya telah diketahui bahwa sel-sel endometrium menghasilkan IFN  $\gamma$  sebagai mekanisme pertahanan terhadap proses inflamasi.<sup>15</sup> Penelitian lain menunjukkan adanya peningkatan IFN  $\gamma$  akan mengakibatkan pertumbuhan trofoblas terhambat, menginduksi hilangnya viabilitas trofoblas serta menyebabkan kerusakan DNA trofoblas.<sup>17</sup> IFN  $\gamma$  sendiri selamanya dapat terdeteksi dalam serum darah, jaringan endometrium, plasenta, amnion, peritoneum dan jaringan embrio.<sup>19</sup> Keberhasilan proses implantasi ditentukan oleh adanya mekanisme apoptosis dalam memelihara toleransi imun. IFN  $\gamma$  sebagai salah satu komponen Th-1 sangat berkaitan dengan proses apoptosis suatu sel. Apoptosis mungkin dikaitkan dengan kehilangan efek perlindungan oleh bcl-2 dimana diikuti dengan peningkatan ekspresi protein bax. Penurunan ekspresi bcl-2 dan peningkatan ekspresi bax di sel desidua merupakan salah satu karakteristik dari kegagalan kehamilan di trimester I oleh karena peran apoptosis. Ekspresi IFN  $\gamma$  dan TNF  $\alpha$  di vili-vili plasenta mungkin menginduksi apoptosis dari sel-sel sitotrofoblas. Hal ini diketahui dari sebuah penelitian yang melihat adanya penurunan ekspresi protein bcl-2 pada vili-vili plasenta atau sitotrofoblas yang distimulasi dengan IFN  $\gamma$  dan TNF  $\alpha$ .<sup>42</sup>

Hasil dari penelitian ini menunjukkan bahwa secara statistik tidak terdapat perbedaan bermakna kadar IFN  $\gamma$  antara subyek penelitian yang mengalami kegagalan

implantasi embrio (n=25; dengan rerata kadar IFN  $4,86 \pm 0,86$  pg/ml) dan yang berhasil (n=6; dengan rerata  $5,82 \pm 0,66$  pg/ml) dengan  $P=0,193$ , (lihat tabel.2 a). Sebuah penelitian mengenai kadar IFN  $\gamma$  serum dalam bidang reproduksi dengan subyek yang berbeda yaitu membandingkan kadar IFN  $\gamma$  serum wanita fertil dan infertile ternyata menghasilkan perbedaan bermakna secara statistik dengan  $p<0.05$ . Kelompok infertil dengan rerata  $834,5 \pm 162,991$  pg/ml, sedangkan kelompok fertil dengan rerata  $603,714 \pm 137,97$  dengan jumlah subyek penelitian sebanyak 38 orang.<sup>43</sup>

Penelitian lain mengenai kadar IFN  $\gamma$  serum yang berhubungan dengan keguguran berulang juga pernah dilakukan oleh Jenkins dan kawan-kawan.<sup>44</sup> Penelitian ini membagi subyek penelitian dalam 4 kelompok berbeda, yaitu kelompok 1 wanita sedang tidak hamil, kelompok 2 wanita hamil primi trimester I ( $7.5 \pm 2.5$  minggu kehamilan), kelompok 3 wanita hamil ( $6.8 \pm 1.8$  minggu) primi yang pernah mengalami abortus spontan sekali, dan kelompok 4 wanita hamil ( $6.4 \pm 1.2$  minggu) dengan riwayat abortus berulang lebih dari 3 kali. Masing-masing kelompok terdiri dari 10 orang subyek tanpa mendapat perlakuan apapun, serum darah diperiksa kadar IFN  $\gamma$ -nya dengan menggunakan ELISA kit dari Amersham, UK. Hasil dari penelitian ini adalah terdapat perbedaan bermakna kadar IFN  $\gamma$  antara kelompok 2 dibanding dengan kelompok 4, tetapi tidak didapatkan perbedaan bermakna kadar IFN  $\gamma$  dikelompok lain. Pada penelitian ini kelompok subyek penelitian pada program bayi tabung mempunyai subyek yang hampir sama, yaitu wanita gagal hamil atau mengalami kegagalan implantasi dengan kata lain tidak sedang hamil (mirip dengan kelompok pada penelitian Jenkins dkk yaitu wanita yang tidak hamil) dan wanita yang hamil (trimester I kehamilan 5 minggu berdasarkan pemeriksaan USG. Tidak adanya perbedaan ini mirip dengan

kondisi pada penelitian Jenkins dimana tidak terdapat perbedaan bermakna kadar IFN  $\gamma$  antara kelompok 1 (wanita tidak hamil) dibanding kelompok 2 (wanita hamil primi). Kesamaan penelitian ini juga pada penggunaan sampel serum dan metode ELISA yang digunakan meskipun dengan menggunakan asal (pabrikan) kit yang berbeda. Adanya perbedaan bermakna antara kelompok 2 dan 4 pada penelitian Jenkins dan kawan kawan mungkin dapat diadaptasi dengan melakukan penelitian pada kelompok peserta program bayi tabung yang telah mengalami aborsi pada kehamilannya.<sup>44</sup>

Angka rerata kadar IFN  $\gamma$  subyek yang mengalami keberhasilan implantasi embrio ternyata lebih besar dari rerata subyek yang mengalami kegagalan implantasi ( $5,82 \pm 0,96$  pg/ml dibanding  $4,86 \pm 1,66$  pg/ml). Oleh karena perbedaannya tak bermakna, maka hal ini tidak dapat diartikan bahwa pada subyek dengan keberhasilan implantasi sedang menderita penyakit dengan patogen penyebab terekspresinya IFN  $\gamma$  atau mengalami gangguan non psikis. Kadar IFN  $\gamma$  serum yang rendah pada kelompok gagal implantasi mungkin mengindikasikan tidak adanya patogen-patogen yang menyebabkan terekspresinya IFN  $\gamma$  seperti *m. tuberculosis*, *toxoplasma gondii*, *candida albican*, *chlamydia trachomatis* atau bahkan HIV.

Penelitian lain mengenai peran toxoplasma, malaria, *chlamydia trachomatis* (tiga parasit intraseluler yang sering dihubungkan dengan kasus abortus atau *recurrent pregnancy loss*) memang menunjukkan adanya ekspresi IFN  $\gamma$  yang berlebihan. Tetapi belum diketahui hubungan kausatif antara kenaikan IFN  $\gamma$  pada kasus tersebut dengan kegagalan implantasi.<sup>45</sup> Seperti diketahui toxoplasma adalah parasit intraseluler yang dapat mengalami perpindahan secara trans plasental terutama pada fase akut atau periode takizoit yang ditandai dengan Ig M yang tinggi. Peningkatan kadar IFN  $\gamma$  pada saat akut

dimaksudkan sebagai mekanisme pertahanan tubuh terhadap serangan infeksi. Penelitian pada 2 tikus coba dengan strain yang berbeda, yaitu jenis AJ (tahan terhadap infeksi) dan C57BL (rentan infeksi) menunjukkan bahwa hanya jenis C57BL yang mengalami kenaikan kadar IFN  $\gamma$ , dengan demikian tidak semua strain dapat mengalami peningkatan kadar IFN  $\gamma$ . Keterkaitan kemampuan peningkatan IFN  $\gamma$  dengan ras atau genetik mungkin saja juga terjadi pada manusia.<sup>46</sup> Penelitian mengenai infeksi jenis lain yaitu chlamidia dan kegagalan implantasi pada program IVF menunjukkan adanya kontroversi, ada yang mengatakan tidak berpengaruh, tetapi ada pula yang mengatakan berpengaruh. Meskipun demikian, peneliti yang mendukung kearah adanya hubungan chlamidia dan kegagalan implantasi belum dapat mengungkap secara detail mekanismenya.<sup>47,48,49</sup> Meskipun dalam infeksi chlamydia kadar IFN  $\gamma$  jelas mengalami peningkatan yang bermakna. Para peneliti bahkan menghubungkannya dengan hal-hal atau fenomena kejadian yang sangat jauh misalnya dengan kerusakan epitel tuba fallopii selain itu ada juga yang menghubungkan Ig G dari *chlamidia trachomatis* dengan buruknya respon ovarium terhadap stimulasi gonadotropin sebelum IVF.<sup>50</sup>

Secara laboratoris penggunaan kit dalam pemeriksaan kadar IFN  $\gamma$  mungkin saja berpengaruh terhadap hasil penelitian. Saat ini berbagai macam produk bagi pengukuran kadar IFN  $\gamma$  tersedia, seperti produk laboratorium CLB (*Central Laboratorium Blood Transfusion*) Asterdam yang dipakai dalam penelitian ini, produk dari Laboratorium R&D Amerika Serikat, produk dari Amersham, *United of Kingdom*, Inggris. Produk dari CLB ini mencantumkan spesifitas dan sensitifitas yang cukup tinggi untuk berbagai macam sampel yang digunakan. Patokan untuk nilai positif kadar IFN  $\gamma$  pada orang sehat yang tercantum pada produk ini adalah 10 pg/ml.<sup>33</sup> Dengan menggunakan patokan ini,

maka hasil dari penelitian ini dapat dikatakan bahwa kadar IFN  $\gamma$  dari sampel serum yang digunakan ( $x \pm SD$ ) kenaikannya tidak terdeteksi atau subyek tidak ada yang sakit.

Penggunaan serum juga merupakan problem tersendiri bagi terekspresinya IFN  $\gamma$  pada penelitian ini. Melalui diskusi dengan peneliti lain ada beberapa hal yang mungkin terjadi dengan penggunaan serum yaitu bahwa serum yang tersimpan terlebih dahulu (dikumpulkan) apalagi dalam waktu yang cukup lama, lebih dari 1 bulan misalnya, sering mengakibatkan kadar IFN  $\gamma$  mengalami penurunan dibandingkan dengan pemeriksaan sampel serum segar (dilakukan pemeriksaan pada saat itu juga). Akan tetapi hal ini tidak bisa menjadi patokan, oleh karena hasil diskusi dengan beberapa peneliti lain mengatakan bahwa serum masih dapat dipergunakan setelah disimpan dalam jangka waktu yang cukup lama, 2 tahun misalnya, asal disimpan dibawah  $-20$  C. Pada penelitian ini seru, disimpan dibawah  $-20$  sehingga dapat dianggap memenuhi syarat. Selain itu tidak ada petunjuk pasti dari pabrik pembuat kit IFN  $\gamma$  mengenai hal ini.<sup>33</sup>

Selain serum darah, bahan yang digunakan untuk melihat kadar IFN  $\gamma$  dapat berasal dari kultur limfosit atau PBMC (*Peripheral Blood Mononuclear Culture*) dengan diinduksi dengan PHA (*PhytoHaem Agglutinin*) sebagai mitogen untuk memacu produksi atau ekspresi IFN  $\gamma$ . Pemeriksaan dengan cara ini selain cukup akurat juga dapat memperlihatkan kapasitas produksi dari subyek. Kendala yang dialami jika menggunakan kultur akan memakan biaya yang cukup tinggi dan waktu yang cukup lama untuk mengerjakan kultur sehingga tidak dapat dipakai dalam pelayanan sehari-hari dilaboratorium. Pada penelitian ini juga telah dicoba untuk mengadakan pengukuran kadar IFN  $\gamma$  yang berasal dari supernatan kultur PBMC. Beberapa subyek tidak bersedia mengikuti penelitian dengan berbagai sebab antara lain tidak bersedia diambil darahnya

atau tidak menjawab/hadir pada saat pelaksanaan pengambilan darah setelah diundang. Hal ini menjadikan data yang ada menjadi terlalu sedikit dan untuk kelompok berhasil implantasi hanya diikuti oleh satu subyek sehingga tidak memenuhi syarat untuk dilakukan analisis statistik atau uji beda. Meskipun demikian hasil pengukuran ini tetap ditampilkan pada tabel 2b. Tampak bahwa tidak terdapat linieritas antara kadar IFN  $\gamma$  serum dengan kadar IFN  $\gamma$  yang berasal dari supernatan kultur. Sehingga mungkin terjadi kadar IFN  $\gamma$  serum hampir sama dengan kadar IFN  $\gamma$  yang berasal dari supernatan kultur atau mungkin malah lebih tinggi. Sebuah penelitian lain yang membandingkan kadar IFN  $\gamma$  supernatan kultur subyek wanita yang mengalami riwayat abortus berulang dan wanita yang mengalami abortus kemudian hamil normal menunjukkan tidak terdapat perbedaan bermakna pada kultur 96 jam. Pada penelitian yang sama tetapi dengan menggunakan kultur 24 jam dan kelompok yang berbeda menghasilkan kadar IFN  $\gamma$  yang tinggi secara bermakna pada wanita hamil dengan riwayat abortus berulang dibandingkan dengan wanita hamil normal tanpa riwayat abortus sebelumnya.<sup>51</sup>

Selain menggunakan sample serum dan supernatan kultur limfosit, untuk mengetahui kadar IFN  $\gamma$  dapat dilakukan dengan menggunakan sample jaringan endometrium yang dikultur sebelumnya. Disamping itu dapat pula dilakukan analisa RT-PCR (*reverse transkriptase-Polimerase Chain Reaction*) dari jaringan itu. Penelitian mengenai hal itu telah dilakukan dengan menggunakan subyek wanita dengan riwayat abortus berulang dan wanita sehat dan fertile yang menjalani sterilisasi melalui laparoskopi sebagai kontrol. Hasilnya sesudah menggunakan metoda RT-PCR ini IFN  $\gamma$  positif didapatkan pada subyek riwayat abortus berulang dan tidak ditemukan satupun yang positif pada kontrol.<sup>52</sup>

Penelitian lain yang berhubungan dengan IFN  $\gamma$  juga pernah dilakukan untuk mengetahui adanya pengaruh IFN  $\gamma$  terhadap embrio. Embrio yang sedang dikultur diberi IFN  $\gamma$  dalam dosis tertentu kemudian diamati perkembangannya. Hasil yang dapat disimpulkan adalah bahwa IFN  $\gamma$  akan mempengaruhi atau meracuni embrio pada hari ke 6 keatas. Jika diberikan sebelum hari ke 6, embrio masih akan tetap dalam kondisi yang baik.<sup>53</sup>

### 6.3. Waktu transfer dan implantasi embrio

Penelitian komprehensif dengan menggunakan subyek peserta program IVF ternyata keberhasilan implantasi tidak hanya ditentukan oleh kadar IFN  $\gamma$  dalam konteks keramahan endometrium atau kualitas embrio saja, tetapi masih ada beberapa hal lain yang turut berperan. Kondisi yang sangat berperan aktif dalam menentukan keberhasilan implantasi pada program IVF adalah penerimaan endometrium, yaitu :

**Penerimaan endometrium** (*endometrium receptivity*) terutama ditentukan oleh adanya bahan-bahan yang mampu melekatkan hasil pembuahan dengan endometrium. Pada manusia dikenal adanya protein yang disebut sebagai *integrins*, yaitu golongan protein permukaan sel yang bekerja sebagai reseptor utama bagi matriks ekstra seluler janin atau *extra cellular matrix (ECM) protein*. Nama *integrins* dipakai untuk menunjukkan adanya *integral membrane glycoproteins* yang memediasi adhesi sel dengan sub strata lain (*cell-substratum adhesion*) atau adesi sel dengan sel (*cell-cell adhesion*).<sup>54</sup> Baik sel yang motil atau bergerak maupun sel yang non motil yang menempel (implantasi embrio, respon imun/kekebalan, penyembuhan luka, dan metastase/penyebaran tumor) sangatlah tergantung pada ECM atau integrin ini untuk melekat dan mendukung kehidupan selanjutnya. *Integrins* adalah glikoprotein dengan

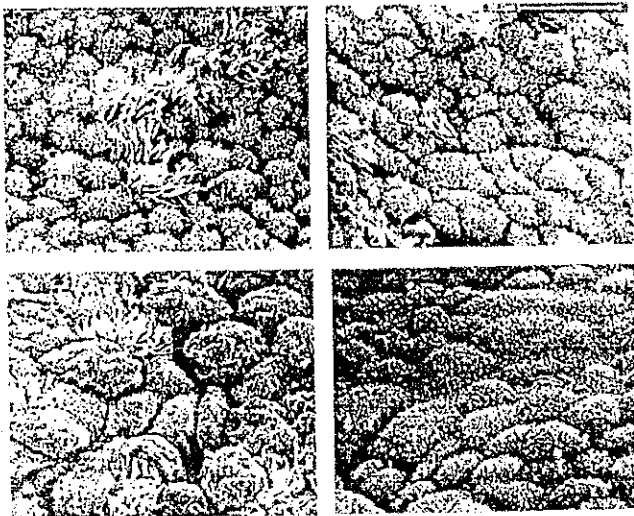
berbagai bentuk (*heterodimeric glycoprotein*) yang terdiri atas  $\alpha$  dan  $\beta$  subunit yang diekspresikan melalui membran sel. Berbagai integrin telah dikenal untuk mengenali rangkaian asam amino spesifik pada target molekul ECM seperti: *laminin*, *collagen*, *fibronectin*, *vitronectin* dan sebagainya. Saat ini dikenal ada 14 macam subunit  $\alpha$  dan 8 macam sub-unit  $\beta$ . Kedua macam sub-unit ini akan berpasangan dan membentuk berbagai kombinasi *integrins*.<sup>55</sup>

Dalam bidang reproduksi, integrins yang diproduksi oleh epitel endometrium manusia adalah  $\alpha 2, \alpha 3, \alpha 6$ , dan  $\beta 3, \beta 4$ . Beberapa *integrins* tampak pada porsi basolateral dari sel epitelial yang mengindikasikan perannya dalam implantasi embrio (*anchoring embryo*). Ekspresi dan konsentrasi berbagai *integrins* tersebut ternyata ada dibawah kontrol kadar hormon tubuh. *Integrin  $\alpha 1$*  dan *vitronectin* reseptor ( $\alpha v \beta 3$ ) sangat dipengaruhi oleh kadar hormon dalam siklus menstruasi.<sup>56</sup> Sebaliknya embrio sendiri mungkin juga mengekspresikan *integrins*. Tetapi hal ini belum jelas, meskipun telah diketahui bahwa plasenta juga mengekspresikan berbagai macam *integrins* sebagai bagian dari pertumbuhan dan perkembangan janin.<sup>57</sup>

Dalam teori implantasi juga dikenal istilah “*window of implantation*” atau jendela implantasi yang dikembangkan oleh Finn<sup>58</sup> berdasarkan model pada mamalia<sup>59</sup> melalui interaksi reseptor antara embrio dan sel endometrium ibu dalam ekspresi *ECM* dan *Integrins*.<sup>60</sup> Pengertian jendela implantasi disini adalah saat dimana sel-sel endometrium mengalami sekresi dan siap menerima proses implantasi embrio. Konsep ini menggambarkan bahwa implantasi hanya terjadi pada saat tertentu saja, sebelum atau sesudah saat-saat tertentu tersebut tidak akan pernah terjadi proses implantasi.<sup>61</sup> Dengan menggunakan *scanning electron microscopy* (SEM) akan didapatkan gambaran epitel

endometrium sebagai berikut : sel-sel mikrovili seperti berambut yang berfusi menjadi sebuah proyeksi membran tunggal yang disebut sebagai *pinopode* (gambar 4).<sup>62</sup> Pada kegagalan implantasi embrio tampak adanya ekspresi yang minimal dari *pinopode* ini.

Berkurangnya kemampuan implantasi embrio pada siklus IVF dapat diakibatkan oleh pematangan prematur dari endometrium yang mengikuti peristiwa perubahan ekspresi *pinopode*. *Pinopode* endometrium terbentuk sekurang-kurangnya pada 4 hari setelah pemberian hCG. Selanjutnya, peningkatan dini kadar progesteron mungkin mempercepat penutupan dari jendela implantasi dan hal ini akan diikuti dengan kemungkinan kegagalan implantasi.<sup>63</sup>



Keterangan :

- A. Gambaran endometrium hari ke 14
- B. Gambaran endometrium hari ke 17
- C. Gambaran endometrium hari ke 19
- D. Gambaran endometrium hari ke 21

Gambar 4. Pencitraan *pinopode* dengan menggunakan mikroskop electron.

Sumber : Nikas G, Develioglu OH, Toner JP dan Jones HW. Endometrial pinopodes indicate a shift in the window of receptivity in IVF cycle. Hum Reprod 1999 14 (3) : 787-792.<sup>64</sup>

Jendela implantasi rupanya berbeda-beda antara siklus alami, siklus hiperstimulasi ovarium terkontrol ataupun siklus hormonal terkontrol akibat pemberian estradiol dan progesteron dari luar. Penampakan *pinopode* pada siklus alami 28 hari akan terjadi pada hari ke 20 sampai hari ke 21 kemudian menghilang. Pada siklus hiperstimulasi ovarium terkontrol atau biasa disebut sebagai *super ovulasi*, *pinopode* akan muncul mulai hari ke 18 sampai 22 (hari ke 14 adalah saat pengambilan oosit). Sedangkan pada siklus hormonal terkontrol akibat pemberian estradiol dan progesteron, *pinopode* akan tampak pada hari ke 6-8 pemberian progesterone. Penemuan ini dikatakan berdampak langsung terhadap keberhasilan implantasi embrio. Pada siklus alami akan didapatkan sinkronisasi antara kesiapan uterus dengan perkembangan embrio, sedangkan pada siklus IVF, perkembangan embrio mungkin mengalami keterlambatan selama didalam kultur in vitro, sementara proses pematangan uterus terus berjalan. Tentunya hal ini akan mengakibatkan kesempatan implantasi atau jendela implantasi akan tertutup sebelum tercapainya tahap yang memungkinkan terjadinya implantasi.<sup>64</sup>

Waktu yang tepat untuk implantasi embrio pada manusia belum jelas benar. Kemungkinan terjadi pada saat ekspresi integrin  $\beta 3$  sub-unit yang secara mendadak muncul pada hari ke 20 dari siklus menstruasi. Asinkroni antara perkembangan embrio dan reseptivitas atau penerimaan uterus (perlambatan pembukaan "*window of implantation*" yang ditandai dengan terlambatnya ekspresi  $\beta 3$  *integrin*) akan menyebabkan kehilangan kehamilan (*pregnancy loss*). Jadi pemunculan  $\beta 3$  *integrin* dapat membedakan atau dapat dipakai sebagai *marker* (tanda) *in phase* atau *out phase* pada saat transfer embrio.<sup>65</sup> Pada penelitian ini belum didapatkan gambaran secara bermakna korelasi waktu atau saat pemindahan embrio dengan keberhasilan implantasi (korelasi kendall's tau-b

$p=0,274$ ) (lihat table 3). Transfer embrio biasanya dilakukan 3 hari setelah *ovum pick up* atau aspirasi oosit dan kemungkinan implantasinya terjadi pada hari ke 5-7 setelah OPU.<sup>31</sup> Waktu transfer embrio pada kelompok gagal implantasi paling sering dilakukan pada hari ke 15 dan didominasi oleh transfer hari ke 13-21 menstruasi. Jika transfer embrio dilakukan 3 hari pasca OPU dan implantasi mungkin terjadi pada hari ke 5-7 pasca OPU berarti kemungkinan implantasi terjadi hari ke 15-25. Hal ini mungkin kurang pas dengan teori bahwa *window of implantation* mungkin terjadi pada hari 18-22 pada siklus dengan induksi ovulasi. Sehingga subyek yang dilakukan transfer hari ke 12, 18, 19, dan 21 besar kemungkinan mengalami kegagalan implantasi. Meskipun demikian dimungkinkan adanya faktor lain yang mempengaruhi keberhasilan tersebut.

Pada penelitian ini tampak bahwa transfer embrio yang dilakukan pada hari ke 12, mengalami kegagalan implantasi embrio, kemungkinan karena implantasinya mendahului masa "*window of implantation*" atau belum *in phase*. Pada kasus hiper stimulasi pertumbuhan *pinopode* berlangsung mulai hari ke 18, sehingga subyek ini juga mungkin mengalami "hiper-hiper stimulasi" atau lebih dari sekedar hiper stimulasi. Dapat disebut sebagai hiperstimulasi jika didapatkan beberapa tanda antara lain ukuran ovarium 6-12 cm atau gambaran roda pedati pada pemeriksaan ultrasonografi. Hiperstimulasi ovarium terjadi setelah luteinisasi folikuler secara massif. Hal ini dapat dilihat pada ovarium yang mendapatkan hCG atau sebuah puncak peningkatan LH yang diinduksi oleh peningkatan produksi estrogen dari perkembangan folikel. Pada penderita penyakit ovarium polikistik dengan peningkatan kadar LH, cukup banyak yang mengalami sindroma hiperstimulasi dengan pemberian klomifen sitrat dan gonadotrophin.<sup>66</sup>

## **6.4. Hal-hal lain yang mempengaruhi implantasi**

### **6.4.1. Keramahan endometrium.**

Keramahan endometrium dalam kehamilan dapat dijabarkan pada konsep bahwa embrio adalah “ non self” dan akan mendapat reaksi tubuh yang bermacam-macam sehubungan dengan statusnya itu.<sup>22</sup> Berdasarkan asumsi tersebut berkembang teori keramahan yaitu : *fetal maternal histocompatibility* dan *maternal natural killer cell response*. Teori *fetal maternal histocompatibility* didasarkan pada adanya abortus berulang yang berhubungan dengan kompatibilitas HLA tipe I antara ibu dan anak. Jika ayah dan ibu mempunyai gene HLA set yang mirip, maka *compatibility* ini akan menghambat imun sistem ibu untuk memproduksi antibodi terhadap HLA embrio. Demikian juga teori *maternal natural killer cell response* menyatakan bahwa respon yang abnormal pada ibu atau embrionya terhadap HLA tipe I berperan dalam gangguan kehamilan. Kedua teori ini masih belum meyakinkan karena kebanyakan berdasar pada penelitian *in vitro* dan bukan *in vivo*.

### **6.4.2. Abnormalitas kadar steroid ovarium.**

Selain faktor endometrium, tingginya kadar steroid ovarium ternyata turut mempengaruhi terjadinya kegagalan implantasi embrio sebagai konsekuensi dari pengobatan atau pemakaian gonadotropin. Kemampuan menerima uterus (*uterine receptivity*) sebenarnya mengalami kekacauan selama hiperstimulasi ovarium yang terkontrol yang digunakan pada program IVF. Tujuan utama pemakaian obat-obatan induksi ovulasi ini adalah menghasilkan lebih banyak sel telur, sebagai akibatnya keadaan suprafisiologis dari kadar hormon steroid juga muncul. Kadar E2 (estradiol) yang tinggi dan perubahan rasio E2/P (estradiol/progesterone) juga berhubungan dengan

kegagalan penerimaan endometrium. Kadar E2 >3000 pg/ml pada hari pemberian hCG ternyata mengakibatkan kegagalan penerimaan endometrium tanpa mempengaruhi kualitas embrio yang dihasilkan.<sup>67</sup> Kehamilan dan rata-rata implantasi menurun sebagai akibat dari peningkatan kadar E2 pada hari ke 4 sampai hari ke 6 setelah pengambilan sel telur (periode pre implantasi). Hal ini diyakini telah terjadi miliu endokrin yang abnormal yang berakibat terjadinya kegagalan implantasi embrio.<sup>68</sup> Sebuah penelitian lain mengikutkan pasien yang telah mengalami kegagalan implantasi pada program IVF dengan 3-4 embrio yang berkualitas baik dan kadar E2>3000 pg/ml pada hari pemberian hCG. Kemudian peneliti membandingkan antara pemakaian regimen *step-down* dengan protokol standar pada siklus berikutnya. Hasilnya adalah kadar E2 menjadi lebih rendah secara bermakna pada regimen *step down*, tetapi jumlah sel telur yang dihasilkan ternyata juga lebih sedikit dibanding dengan protokol standar. Jumlah embrio dan kualitas yang dihasilkan tidak berbeda, akan tetapi implantasi dan rata-rata kehamilan pada subyek dengan regimen *step-down* berbeda bermakna. Hal ini menunjukkan pengurangan kadar E2 yang abnormal tinggi hingga mendekati keadaan yang fisiologis dapat meningkatkan keberhasilan implantasi embrio.<sup>69</sup>

#### **6.4.2. Keterkejutan embrio yang diakibatkan oleh perubahan media kultur (*culture shock media*).**

Peran media kultur terhadap keberhasilan mendapatkan embrio dengan kualitas yang baik telah banyak dilakukan. Meskipun demikian media kultur yang mendekati keadaan atau komposisi yang sealami mungkin masih terus dicari. Sekarang telah banyak tersedia media kultur dengan berbagai keunggulan masing-masing, akan tetapi media kultur yang mirip atau mendekati komposisi yang sebenarnya dari sekresi tuba Fallopii

dan uterus masih sulit untuk diwujudkan. Perbedaan milieu yang terjadi akibat proses pemindahan embrio dari media kultur invitro ke uterus tentu akan menimbulkan keterkejutan secara fisik. Saat ini mulai dikembangkan kultur bertahap yang mendekati keadaan fisiologis tersebut yang kemudian dikenal sebagai kultur G1 dan G2. Kultur sebelumnya hanya didasarkan pada kadar karbohidrat di dalam tuba Fallopii dan mengandung asam amino non esensial dan didisain untuk keberlangsungan perkembangan embrio sampai tahap pembelahannya. Kultur yang terbaru didasarkan pada kadar karbohidrat di dalam uterus yang mengandung asam amino esensial dan asam amino non esensial untuk menghadapi perkembangan dan diferensiasi blastokis. Kultur dilakukan sampai pada hari ke 5 dan dibagi dalam dua tahap. Dengan cara ini embrio tidak akan terpapar atau mengalami keterkejutan oleh stres seluler di dalam uterus sebagaimana yang terjadi selama ini dengan transfer pada hari ke 2 atau ke 3. Sebagai bukti dari perlakuan ini, Gardner, peneliti, dapat menghasilkan 68% rata-rata kehamilan per pengambilan sel telur dan 48% keberhasilan implantasi per transfer. Angka-angka ini sangat tinggi dibandingkan dengan 13-18% keberhasilan implantasi pertransfer dengan menggunakan perlakuan kultur sebelumnya.<sup>70</sup>

#### **6.4.3. Kegemukan.**

Kegemukan yang dimaksud disini adalah wanita yang mempunyai *body mass index* (BMI) lebih dari 25 kg/m<sup>2</sup>. Selama ini kegemukan pada wanita sering dihubungkan dengan adanya ovarium polikistik yang sering menyebabkan terjadinya an ovulasi dan buruknya respon ovarium terhadap stimulasi.<sup>71</sup> Hal ini dikaitkan dengan peningkatan kadar serum leptin pada cairan folikel. Penelitian mengenai BMI dan keberhasilan implantasi sudah dilakukan oleh beberapa peneliti yang menghasilkan penemuan

hubungan yang bermakna antara tingginya rasio BMI : serum leptin dengan kegagalan implantasi embrio pada peserta program IVF.<sup>72</sup> Demikian juga data rata-rata kehamilan peserta program IVF sebanyak 144 orang yang dilakukan oleh *Advance Fertility Center Chicago* terdapat penurunan yang bermakna pada wanita dibawah usia 40 tahun dengan BMI > atau = 25kg/m<sup>2</sup>.<sup>73</sup> Penelitian secara prospektif terhadap 383 peserta IVF yang menerima berbagai jenis stimulasi ovarium (GnRHa, FSH atau HMG, dan klomifen sitrat kemudian didukung oleh progesterone) menunjukkan adanya faktor resiko terhadap kegagalan implantasi embrio dan sedikitnya jumlah sel telur yang didapatkan pada wanita dengan BMI > atau = 25 kg/m<sup>2</sup>.<sup>74</sup>

#### **6.4.3. Lain-lain**

Selain ke tiga hal diatas ternyata masih ada yang berpengaruh terhadap keberhasilan implantasi embrio terutama pada program IVF. Meskipun masih banyak terjadi pertentangan pendapat, beberapa penelitian lain menyebutkan adanya pengaruh anti phospholipid antibodi (APA). Sebenarnya APA terbentuk untuk melawan sebuah variasi dari epitop phospholipid yang terdapat baik ekstra maupun interseluler. Bentuk reaksi dari APA tidak terlihat memiliki efek secara sistemik terhadap organisme maternal. Akan tetapi, APA dapat terlibat dalam perubahan villi sitotrofoblas menjadi sinsitiotrofoblas (sinsialisasi, respirasi dan interaksi endokrin antara janin yang berkembang dengan induknya, secara langsung merusak sitotrofoblas ekstra vilious, dan kemudian terjadi perubahan signaling HLA G).<sup>75</sup> Tetapi sebuah meta analisis terhadap beberapa penelitian tentang pengaruh APA terhadap kegagalan implantasi embrio pada program IVF menghasilkan kesimpulan bahwa kadar serum APA tidak mempunyai hubungan yang bermakna dengan kegagalan implantasi embrio pada program IVF.<sup>76</sup>

## BAB 7.

### KESIMPULAN DAN SARAN

#### 7.1. Kesimpulan

Penelitian ini menghasilkan kesimpulan antara lain terdapat perbedaan bermakna kualitas embrio kelompok gagal implantasi dan berhasil implantasi serta ada korelasi negatif antara kualitas embrio dengan keberhasilan implantasi. Makin besar grade embrio, makin besar pula kemungkinan kegagalan implantasi. Pada penelitian ini tidak didapatkan perbedaan bermakna kadar IFN  $\gamma$  serum dan tidak didapatkan korelasi antara waktu transfer embrio dengan keberhasilan implantasi pada kedua kelompok subyek penelitian.

#### 7.2. Saran

Beberapa hal yang dapat disarankan oleh peneliti antara lain adalah perlunya untuk mengadakan penapisan terhadap kemungkinan adanya infeksi pada subyek penelitian guna mengetahui asal dari kenaikan kadar IFN  $\gamma$ . Sebagai lanjutan dari penelitian ini dapat dilakukan penelitian lain dengan subyek yang lebih banyak, baik yang menggunakan sampel serum maupun dari supernatan kultur limfosit dengan mitogen. Jaringan lokal seperti endometrium dapat pula diajukan sebagai sample penelitian untuk mendeteksi kemampuan produksi IFN  $\gamma$  jika ada stimulan. Kelompok Th2 (IL4 dan IL10 ) sebagai pembanding disarankan ikut diukur kadarnya, sehingga dimungkinkan untuk mendapatkan rasio antara Th-1 dan Th-2.

## DAFTAR PUSTAKA

1. Cunningham FG, Mac Donald PC, Gant NF et al (eds). William Obstetrics. 20<sup>th</sup> edition. Connecticut Prentice Hall.1997.19-20
2. Lopata A.Implantation of the human embryo. Human Reproduction. Supplement I1996.178
3. Cunningham FG, Mac Donald PC, Gant NF et al (eds). Wiliam Obstetrics. 20<sup>th</sup> edition. Conecticut. Prentice Hall. 1997.579-85
4. Speroff L, Glass RH, Kase NG (eds). Clinical Gynaecologic Endocrinology and Infertility. Baltimore. William and Wilkins. 1994.242-3
5. Fernandez N, Sprinks MT, Cooper JC et al. Embryonic Development and The Major Histocomtability Complex. In: Immunology of Human Reproduction. Kurpisz M, Fernandez N (eds). Bios Scientific Publishes. 1995.185-6
6. Voisin GA, Rajgupathy R. Immunodeviation of The Immune Respons during Pregnancy. In: Immunology of Human Reproduction. Kurpisz M, Fernandez N (eds). Bios Scientific Publishes.335-6
7. Benirschke K. Normal Development. In: Maternal Fetal Medicine. Creasy RK, Resnik R (eds). WB Saunders Co. 1994.96-7
8. Carola R, Harley JP, Noback CR (eds). Human Anatomy & Physiology.Mc Graw Hill.1990.858-61
9. Lim KJ, Odukaya OA, Ajjan RA et al. Profile of cytokine mRNA expression in peri implantation human endometrium. Mol Human Reprod.1998 Jan;4(1):77-81
10. Pieters MHEC, Dumolin JCM.Pre implantation Diagnosis.In: IVF Lab.Laboratory aspect of in vitro Fertilization.Bras M,Lens JW, Piederiet MH, Rijnders PM, Verveld M, Zeilmaker GH (eds).NV Organon.1996.218-20
11. Herrler A, Beier HM (eds). Manual on Assisted Reproduction. Springer.1997.211-213
12. Abbas AK, Lichtman AH, Pober JS (eds). Molecular Immunology. @nd edition. WB Saunders Co. Philadelphia.1994.243-255
13. Janeway, Travers (eds). Immunobiology. Churcill Livingstone.1996.7:1-2
14. Male D, Cooke A, Owen M et al (eds). Advanced Immunology. 3<sup>rd</sup> Edition. Mosby.1996. 10:10-11
15. Baines MG, Ducks AJ, Anteckka S et al. Decidual infiltration and activation of macrophage leads to early embryo loss. Am J Reprod Immunol.1997 Jun;37(6):471-7
16. Romagnani S. The Th1/Th2 paradigm. Immunology today.1997 June 18(6):263.
17. Christiansen OB. A fresh look at the causes and treatment of recurrent miscarriage, especially its immunolocigal aspects.Hum Reprod Update. 1996 Jul-Aug;2(4): 271-93
18. Andre M, Sole R. Cytotoxicity of tumour necrosis factor-alpha and gamma interferon againts primary human placental trophobiast. Placental. 1994 Dec;15(8):819-35
19. Olah KS, Vince GS, Neilson JP et al. Interleukin-6, interferon gamma, interleukin-8 and granulocyte- macrophage colony stimulating factor levels in human amniotic at term.J Reprod Immunol. 1996 Nov;32(1):89-98

20. Naz RK, Butler A, Witt BR et al. Levels of interferon gamma and tumor necrosis factor alpha in sera and cervical mucus of fertile and infertile women: implication in infertility. *J Reprod Immunol.* 1995 July;29(2):105-17
21. Stevens CD. *Clinical Immunology and Serology: A Laboratory Perspective.* F.A. Philadelphia. Davis Co. 1996. 148-9
22. Fortin M, Quелlette MJ, Lambert RD. TGF beta2 and PGE2 in rabbit peritoneal fluid can modulate GM-CSF production by human lymphocytes. *Am J Reprod-Immunol.* 1997 Aug;38(2):129-39
23. D'Andrea S, La Bomardi'ere C. Cloning of the porcine interferon gamma receptor and its foetoendometrial expression in early pregnancy. *Mol-Reprod-Dev.* 1998 Nov;51(3):225-34
24. Ozomet Mh, Biefeld P, Krussel JS et al. Interferon gamma production by the human preimplantation embryo. *Am-J-Reprod-Immunol.* 1997 Jun;37(6):435-7
25. Chaouat G. Synergy of lipopolysaccharide and inflammatory cytokines in murine pregnancy: alloimmunization prevents abortion but does not affect the induction of preterm delivery. *Cell Immunol.* 1994 Sep;157(2):328-40
26. Arck PC, Troutt AB; Clark DA. Soluble receptors neutralizing TNF alpha and IL-1 block stress triggered murine abortion. *Am J Reprod-Immunol.* 1997 Mar;37(3):262-6
27. Maes M, Song C, Lin A et al. The effect of psychological stress on human: increased production of pro-inflammatory cytokines and a Th1-like response in stress-induced anxiety
28. Lens JW. The embryo practice. In : *IVF Lab. Laboratory aspects of in-vitro fertilization.* N.V. Organon. 1996. 196-199
29. Abdelmassih S, Abdelmassih V, Abdelmassih R, Salgueiro LL, Oliviera FG, Esteves SC, Balmaeda JP. The effect of Day-2, Day-3 and Day-5 Embryo culture on Intracytoplasmic Sperm Injection Pregnancy, Implantation and abortion Rates. In : *Program supplement to Fertility and Sterility.* 1998. O-039
30. Menezo YJ, Guerin JF, Czyba JC. Improvement of human early embryo development in vitro by coculture on monolayer of Vero cells. *Biology of Reproduction.* 1990;42:301-306
31. Rabe T, Diedrich K, Eberhardt I, Kupker W. *Manual Assisted Reproduction.* Germany. Springer. 1997. 310-312
32. *Laboratorium Hayati UGM. Petunjuk praktikum.* 1995. 15-20
33. *Central Laboratory of the Netherland Red Cross. Pelikine Compact human IFN gamma ELISA kit cat No. M1933*
34. Juriscova A, Varmussa S, Casper RF. Programmed cell death and human embryo fragmentation. *Mol Hum Reprod* 1996 2: 93-98
35. Fuller GM, Shields D (eds). *Molecular basis of medical cell biology.* Connecticut Appleton&Lange. USA. 114-5
36. Kamjoo M, Brison DR, Kimber SJ. Apoptosis in the preimplantation mouse embryo: effect of strain difference and in vitro culture. *Mol Reprod Dev* 2002 Jan;61(1):67-77
37. Yang MY, Rajamahendran R. Apoptosis in bovine oocytes and in preimplantation embryos: the role of Bcl-2 and Bax genes. *Animal Reprod Sci* 2002 Apr 15;70(3-4):150-69

38. Lee KS, Joo BS, Na YJ, Yoon MS, Choi OH, Kim WW. Cumulus cells apoptosis as an indicator to predict the quality of oocytes and the outcome of IVF-ET. *J Assist Reprod Genet* 2001 Sep;18(9):490-8
39. Mikkelsen AL, Lindenberg S. Morphology of in-vitro matured oocytes: impact on fertility potential and embryo quality. *Hum Reprod* 2001 Aug;16(8):1714-8
40. Tavmergen E, Gokr EN, Sendag F, Sendag H, Levi R. Comparison of short and long ovulation induction protocols used in ART applications according to the ovarian response and outcome of pregnancy. *Arch Gynecol Obstet* 2002 Jan;266(1):5-11
41. Steirteghem AV, Devroey P, Liebars I. Microinjection. In : *Manual on assisted Reproduction*. Rabe T, Diedrich K, Runnebaum (eds). Springer. Germany.321-324
42. Boehm U, Klamp T, Groot M, Howard J.C. Cellular responses to interferon. *Annal Rev. Immunol.*1997.15:749-795
43. Riazi SH, Khansari N. The study of subsets of T-cells in Reproduction.Program supplement to fertility and sterility.ASRM.Alabama.1998.S491
44. Jenkins C, Roberts J, Wilson R, MacLean MA, Shilito J, Walker JJ. Evidence of a Th1 type response associated with recurrent miscarried. *Fertil Steril* 2000 June: 73(6):1206-8
45. Windhagen A, Nicholson LB, Weiner HL, Kuchroo VK, Hafler DA. Role of Th1 and Th2 cells in Bacterial infections. In : *Th1 and Th2 celles health and disease*. Karger. New York. 1996. 84
46. Cook N. *Toxoplasma gondii* : Takes a licking and keeps on ticking. Student note on immunology Davidson College. (unpublished)
47. Sharara FI, Queenan JT Jr, Springer RS et al. Elevated serum Chlamydia trachomatis IgG antibodies. What do they mean for IVF pregnancy rates and loss?. *J Reprod.Med.*1997 May;42(5):281-6
48. Gaudoin M, Rekha P, Morris A, Lynch J, Acharya U. Bacterial vaginosis and past chlamydial infection are strong and independently associated with tubal infertility but do not affect in vitro fertilization success rates. *Fertil Steril.* 1999 Oct;72(4):730-2
49. Sharara FI, Queenan JT Jr. Elevated serum Chlamydia trachomatis IgG antibodies. Association with decreased implantation rates in GIFT. *J Reprod Med* 1999 Jul;44(7):581-6
50. Keay SD, Barlow R, Eley A, Masson GM, Anthony FW, Jenkins JM. The relation between immunoglobulin G antibodies to Chlamydia trachomatis ad poor ovarian response to gonadotropin stimulation before in vitro fertilization. *Fertil Steril* 1998 Aug;70(2):214-8
51. Makhseed M, Raghupathy R, Azizieh A, Omu A, Al-Shamali E, Ashkanani L. Th 1 and Th 2 cytokine in recurrent aborters with successful pregnancy and with subsequent abortions. *Human Repro* 2001;16(10)2219-2226
52. Kelvin JH, Odukaya OA, Ajjan RA, Li TC, Weetman AP, Cooke D. The role of T-helper cytokine in human reproduction. *Fertil steril* 2000 Jan;73(1):136-142
53. Cameo M, Fontana V, Cameo P, Vauthay LG, Kaplan J, Tesone M. Similar embryotoxic effects of sera from infertile patients and exogenous IFN g on long

- term in vitro development of mouse embryos. *Hum Reprod* 1999 Apr;14(4):959-63
54. Albelda SM, Buck CA. Integrin and other cells adhesion molecules. *FASEB J* 1990.4:2868-80
  55. Abas AK, Lichtman AH, Pober JS (eds). Cellular and molecular immunology. W.B Saunders USA. 1994. 154-155
  56. Rouslahti E. Integrins. *J Clin Invest* 1991.87:1-5
  57. Lala KP, Lysiak JJ. Autocrine-paracrine regulation of human placental growth and invasion by locally active growth factors. In : Immunology of human reproduction. Kurpysz M, Fernandez N (eds). Bios scientific. 1995. 239-240
  58. Finn CA. Implantation reaction. In: Biology of uterus. Wynn RM (ed). Plenum Press. New York 1997. p245-303
  59. Mc Laren A. The Control of implantation. In: In Vitro Fertilization and donor insemination. Thompson W, Joyce DN, Newton JR (eds). Royal College of obstetrician and gynecologists, London 1985. p 13-22
  60. Sutherland AE, calarco PG, Damsky CH. Ekspresion and function cell surface extracelluller matrix receptors in mouse blastocyst attachment and outgrowth. *J cell Biol* 1988. 106: 1331-1348
  61. Advanced fertility center of Chicago. Window of implantation. [www.advancedfertility.com](http://www.advancedfertility.com)
  62. Nikas G. Pinopodes as markers of endometrial receptivity. Maret 2001. [www.ferti.net.com/ferti\\_magazine.march2001](http://www.ferti.net.com/ferti_magazine.march2001)
  63. Kolb A.B., Najmabamadi S, Paulson RJ. Ultrastructural characteristic of the luteal phase endometrium in donors undergoing controlled ovarian hyperstimulation. *Fertil Steril* 1997.67;625-630
  64. Nikas G, Develioglu OH, Toner JP, Jones HW. Endometrial pinopodes indicate a shift in the window of receptivity in IVF cycles. *Hum Reprod* 1999.(14)3:787-792
  65. Lessey BA. Integrins and assisted Reproduction. *Assisted Reproduction Review* 1993.25:56-62
  66. Insler V, Lunenfeld E, Lunenfeld B. Manual Assisted Reproduction. Germany. Springer. 1997. 157-161
  67. Simon C, Cano F, Valbuena D, et al. Clinical evidence for a detrimental effect on uterine receptivity of high serum estradiol concentration in high and normal responder patients. *Hum Reprod* 1995;10:2432-2437
  68. Pellicer A, Valbuena D, cano F et al. Lower implantation rates in high responders: Evidence for an altered endocrine milieu during the preimplantation periode. *Fertil Steril*. 1996;65:1190-1195
  69. Simon C, Garcia V, Valbuena D et al. Increased uterine receptivity by decreasing estradiol level during preimplantation periode in high responder patiens by using an FSH step down regulation regimen. *Fertil steril*. 1997
  70. Brown TS. Less is more. In: single embryo transfer. *Orgyn* 2000;4:30-3
  71. Butzow TL, Moilanen JM, Lehtovirta M, Toumi T, Hovatta O, Siegle R, et al. Serum and follicular fluid leptin during IVF relation ship among leptin increase, body fat mass and reduce ovarian response. *J Clin Endocrinol Metab* 1999 Sep;84

72. Brannian JD, Schmidt SM, Kreger DO, Hansen KA. Baseline non fasting serum leptin concentration to body mass Index ratio is predictive of IVF outcomes. Hum Reprod 2001 Sep;16(9):1819-26
73. Advanced fertility center of Chicago. Weight and IVF. <http://www.advancedfertility.com/weight.htm>
74. Fedorsack P, Storeng R, Dale PO, Tanbo T, Abyholm. Obesity is a risk factor for early pregnancy loss after IVF or ICSI. Acta Obstet Gynecol Scand 2000 Jan;79
75. Sher Institute for reproductive medicine. Immunologic implantation failure : Why it often leads to IVF failure and the role of selective immunotherapy. <http://haveababy.com/infert/immunosci.asp>
76. Hornstein MD, Davis OK, Massey JB, Paulson RJ, Collins JA. Antiphospholipid antibodies and in vitro fertilization success: a meta analysis. Fertil Steril 2000 Feb;73(2):330-3