

## ARTIKEL ASLI

## THE EVIDENCE OF TOXOPLASMOSIS IN SPONTANEOUS ABORTION CASES IN DR. SAIFUL ANWAR HOSPITAL DETECTED BY SEROLOGICAL, HISTOPATHOLOGICAL AND PCR ANALYSIS

### KEJADIAN TOXOPLASMOSIS PADA KASUS-KASUS ABORTUS SPONTAN DI RS DR SAIFUL ANWAR DIDETEKSI DENGAN PEMERIKSAAN SEROLOGIK, HISTOPATOLOGIK DAN PCR

Teguh Wahyu Sardjono\*, Soetomo Soewarto\*\*, Mudjiwiyono\*\*\*, Lubnah Muhammad\*\*\*\*

\* Laboratorium Parasitologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya

\*\* Lab./UPF Obstetri Ginekologi FK Unibraw/RS dr Saiful Anwar

\*\*\* Laboratorium Patologi Anatomi FK Unibraw/RS dr Saiful Anwar

\*\*\*\* Fakultas MIPA Universitas Brawijaya

#### ABSTRACT

*Toxoplasmosis has been claimed as an important cause of spontaneous abortion in woman, but how exactly the role of the disease to cause it, is not well known. This study was done to know the evidence of Toxoplasmosis in spontaneous abortion cases in Dr Saiful Anwar Hospital, detected by Serological (ELISA), histopathological and PCR technique. Within the period of four months (March to June 2000), there were 451 abortion cases (18,83%) among 2395 patients visited at Department of Obstetrics and Gynecology Saiful Anwar Hospital. Among them, only 43 of spontaneous abortion cases and 23 of normal pregnancy cases were eligible in this study. The mean of both IgM and IgG levels in control group were higher than in the study group ( $p > 0.05$ ). The prevalence rate of IgG (+) and IgG (-) in control group (14 : 9) was higher than in study group (22 : 21), but the difference was not statistically significant ( $p = 0.45$ ; OR = 0.67). The prevalence rate of IgM (+) and IgM (-) in control group (1 : 22) and in study group (3 : 40) was also not statistically significant different ( $p = 0.67$ ; OR = 1.65). We did not find Toxoplasma parasite in abortion tissues, both by histopathological neither PCR analysis. This study suggested that Toxoplasmosis is not the main cause of spontaneous abortion in human. Pregnant woman with IgG (+) trends to have the lower risk of abortion compared with who has IgG (-).*

**Keyword:** Toxoplasma, Abortus, Placenta, Histo - PA, PCR

#### ABSTRAK

*Toxoplasmosis dikenal sebagai salah satu penyebab penting dari abortus spontan pada manusia, tetapi seberapa besar sebenarnya peran dari penyakit ini sebagai penyebab abortus, belum diketahui secara pasti. Penelitian ini dilakukan untuk mengetahui angka kejadian Toxoplasmosis pada kasus-kasus abortus spontan di RSUD dr. Saiful Anwar (RSSA) Malang, dengan menggunakan metode pemeriksaan serologic, histopatologik dan PCR. Dalam kurun waktu 4 bulan (Maret – Juni 2000) dari 2395 kunjungan pasien di bagian Obstetri-Ginekologi RSSA didapatkan 451 kasus abortus (18,83%). Diperoleh 43 kasus abortus spontan dan 23 kasus kehamilan normal yang memenuhi syarat dan bersedia mengikuti penelitian ini. Pada kelompok kehamilan normal, rerata kadar IgM maupun IgG ternyata lebih tinggi dibanding kelompok subyek, tetapi perbedaan tersebut tidak bermakna ( $p > 0.05$ ). Rasio prevalensi kasus dengan IgM (-) dan IgM (+) pada kelompok pembandingan (1 : 22) dibanding pada kelompok studi (3 : 40) tidak berbeda secara bermakna ( $p = 0,67$ ; OR = 1,65). Rasio prevalensi kasus dengan IgG (+) dan IgG (-) pada kelompok pembandingan (14 : 9) lebih besar dari pada kelompok subyek (22 : 21), tetapi perbedaan ini juga tidak bermakna ( $p = 0,45$ ; OR = 0,67). Pada penelitian ini tidak ditemukan adanya Toxoplasma di jaringan kerokan sisa kehamilan, baik melalui pemeriksaan histopatologik dan maupun PCR. Hasil penelitian ini tidak dapat menyimpulkan bahwa Toxoplasmosis merupakan penyebab utama dari abortus spontan. Wanita hamil dengan IgG Toxoplasma positif justru mempunyai resiko lebih rendah untuk mengalami abortus dibandingkan yang IgGnya negatif.*

**Kata kunci:** Toxoplasma, Abortus, Histo – PA, PCR

## PENDAHULUAN.

Abortus merupakan gangguan kehamilan yang sampai saat ini memiliki angka kejadian yang cukup tinggi. Pada tahun 1984 angka kejadian abortus di Bagian Obstetri FKUI dilaporkan sebesar 9.85% (1). Pada tahun 1997 dilaporkan bahwa dari berbagai gangguan kehamilan yang terjadi di antara 18.155 kunjungan pasien selama tahun 1995-1996 di Poliklinik Ginekologi RSUD dr. Saiful Anwar (RSSA) Malang; tercatat sejumlah 1698 kasus abortus atau 9.35%. Angka kejadian abortus ini paling tinggi bila dibandingkan gangguan kehamilan yang lain, yaitu lahir mati (4,39%), imatur dan prematur (3,99%), dan lahir cacat (0,77%) (2). Di Amerika, angka kejadian abortus pada tahun 1995 dilaporkan sebesar 20 per 1000 kehamilan (3). Di Inggris, hampir seperlima dari ibu-ibu hamil, mengalami perdarahan pada kehamilan kurang dari 20 minggu, dan lebih dari separohnya berakhir dengan abortus (4). Data yang diperoleh dari berbagai klinik atau rumah sakit, menyebutkan bahwa angka kejadian abortus berkisar antara 12% - 15%; sedangkan angka kejadian yang sebenarnya terjadi di masyarakat mungkin dua atau tiga kali lebih tinggi daripada yang dilaporkan tersebut (5,6).

Penyebab terjadinya abortus bersifat multifaktorial, tetapi yang dapat dideteksi ternyata tidak lebih dari 50%. Faktor-faktor tersebut antara lain adalah faktor genetik, kelainan anatomis, infeksi, gangguan endokrin, imunologik, dan lain-lain (5,6,7). Di antara faktor-faktor tersebut, infeksi merupakan salah satu penyebab terjadinya abortus yang cukup penting (8). *Toxoplasmosis* merupakan salah satu penyakit infeksi dari jajaran TORCH yang sering dihubungkan dengan gangguan kehamilan, terutama bila infeksi primer terjadi pada trimester pertama kehamilan. Hal ini diperkirakan karena adanya transmisi parasit melalui plasenta (9,10,11,12). Disebutkan bahwa pada kira-kira sepertiga dari wanita yang terinfeksi dengan *Toxoplasma gondii* selama kehamilannya dapat terjadi transmisi parasit tersebut ke bayi yang dikandungnya melalui plasenta (12). Namun sejauh ini belum ada penelitian yang menghasilkan kesepakatan di antara para peneliti tentang seberapa besar sebenarnya kontribusi *Toxoplasmosis* dalam menyebabkan abortus. Beberapa penulis menyebutkan kontribusi *toxoplasmosis* pada kejadian abortus dalam angka-angka yang bervariasi; yaitu antara 1,38% (13), 7,1% (14), 54,19% (15), 18,5% (16), 50% (17), sampai dengan 73,3% (18).

Penelitian ini dilakukan untuk mengetahui kontribusi *Toxoplasmosis* sebagai penyebab abortus di RS dr. Saiful Anwar Malang, dengan menganalisis sediaan darah dari ibu yang mengalami abortus spontan secara serologis, dan pemeriksaan jaringan sisa kehamilan secara histopatologis dan metoda PCR.

## DESAIN PENELITIAN, BAHAN DAN CARA KERJA:

### Pemeriksaan serologis

Penelitian dilakukan secara iris silang (*cross sectional*) dengan mengambil subyek ibu-ibu yang mengalami abortus spontan di bagian Obstetri-Ginekologi RS dr Saiful Anwar (OBG-RSSA) Malang. Untuk pemeriksaan serologis, subyek yang telah menyatakan kesediaan untuk mengikuti kegiatan penelitian ini dicatat data-datanya lalu diambil sampel darah dari vena mediana

cutibi sebanyak 5 cc. Sampel darah disentrifus, serumnya dipisahkan dan diperiksa kandungan zat anti IgM dan IgG *Toxoplasma* dengan metoda ELISA. Sebagai pembanding, sampel darah diambil dari kelompok ibu hamil normal yang datang ke poliklinik hamil RSSA, dan dilakukan pemeriksaan serologis dengan metoda yang sama. Hasil pemeriksaan dari ke dua kelompok dibandingkan dan dianalisis secara statistik dengan perangkat lunak SPSS-10.

### Pemeriksaan histo-patologi dan PCR dari jaringan sisa kehamilan

Kuretase merupakan prosedur standar yang dilakukan terhadap semua kasus abortus di Lab/UPF OBG-RSSA Malang. Subyek yang telah bersedia mengikuti penelitian, dari kerokan sisa kehamilan yang diperoleh dari tindakan kuretase, diambil contoh jaringan masing-masing sebanyak lebih kurang 1 cm<sup>3</sup> untuk pemeriksaan histopatologi dan untuk pemeriksaan PCR. Untuk keperluan pemeriksaan histopatologi, contoh jaringan dimasukkan ke dalam pot berisi formalin 10% lalu dikirim ke laboratorium Patologi Anatomi RSSA Malang untuk dibuat sediaan histo PA. Sediaan dicat dengan Hematoksilin Eosin kemudian diperiksa di bawah mikroskop.

Untuk pemeriksaan PCR, contoh jaringan dimasukkan ke dalam appendorf, lalu dibawa ke laboratorium Biomolekuler FMIPA Unibraw. Sementara menunggu perlakuan lebih lanjut, sampel disimpan dalam suhu -20° C. Isolasi DNA dilakukan dengan prosedur standart, ekstraksi dilakukan dengan chloroform/isoamilalkohol, dilanjutkan pengendapan dengan ethanol absolut dingin. Hasil isolat DNA yang diperoleh disimpan pada suhu - 20°C (19,20,21). Keberadaan *Toxoplasma gondii* di jaringan plasenta dideteksi dengan teknik *Hot-start PCR* dengan menggunakan primer spesifik untuk *Toxoplasma gondii* sesuai dengan yang digunakan oleh Hohfield (1994) (22), yaitu: Toxo-B22: 5'AAC GGG CGA GTA GCA CCT GAG GAG A 3', dan Toxo-B23: 5'TGG GTC TAC GTC GAT GGC ATG ACA AC 3'. Alat PCR dijalankan dengan 1 siklus pada temperatur 80 °C dan dilanjutkan dengan 32 siklus pada (94° ; 60° ; 72°C dan 94° ; 54° , 72°C ). Masing-masing siklus meliputi *denaturasi* pada 94°C selama 1 menit 18 detik ; *annealing* pada 60° dan 54 °C, 2 menit dan *ekstensi* pada 72°C selama 2,5 menit. Setelah 32 siklus ditambahkan waktu 5 menit untuk inkubasi pada 72°C. Untuk pembanding positif digunakan isolat DNA *Toxoplasma strain RH* yang diperoleh dari Makmal ImunoEndokrinologi FKUI. *Running electrophoresis* hasil amplifikasi dilakukan dalam agarose 1%. *Running electrophoresis* dalam TBE 1x, dijalankan pada 80 V; 300 mA selama 65 menit. Hasilnya dibaca dibawah *transilluminator-UV*, dan difoto dengan Pollaroid.

### HASIL PENELITIAN

Karena berbagai hambatan teknis di lapangan penelitian hanya berjalan selama 4 bulan yaitu mulai bulan Maret sampai dengan Juni 2000. Dalam periode tersebut, dari 2395 kunjungan pasien di bagian OBG-RSSA Malang, tercatat 451 kasus abortus (18,83%). Dari jumlah tersebut terkumpul sampel sebanyak 53 kasus abortus spontan dan 25 kasus kehamilan normal yang

bersedia mengikuti penelitian ini, tetapi hanya 43 kasus abortus sebagai kelompok subyek dan 23 kasus kehamilan normal sebagai kelompok pembanding, yang sample darah dan jaringannya dapat di analisis. Karakteristik dari ke dua kelompok tersebut dapat dilihat pada tabel 1. Dari sisi umur ibu, umur kehamilan dan paritas tidak didapatkan perbedaan yang bermakna ( $P>0,05$ ).

Hasil pemeriksaan serologis zat anti Toxoplasma (ELISA) dari sampel darah kedua kelompok dapat dilihat pada tabel 2. Di antara 43 kasus abortus pada kelompok subyek didapatkan sampel dengan IgM positif sebanyak 3 kasus (7,5%), sedang pada kelompok pembanding hanya satu kasus (4,5%) dengan IgM positif, tetapi kadarnya cukup tinggi, yaitu 159,365 IU/ml ( $p = 0,056$ ).

Rerata kadar IgM pada kelompok pembanding ternyata justru lebih tinggi dibanding kelompok subyek ( $p = 0,059$ ). Perbandingan rasio prevalensi antara sampel dengan IgM (+) dengan IgM (-) pada kelompok pembanding (1 : 22), lebih rendah dibanding pada kelompok subyek (3 : 40), tetapi perbedaan ini tidak bermakna ( $p = 0,67$ ; OR = 1,65). Rerata kadar IgG pada kelompok pembanding (33,557 IU/ml) lebih tinggi dibandingkan pada kelompok subyek (18,933 IU/ml), tetapi perbedaan tersebut secara statistik juga tidak bermakna ( $p>0,05$ ). Perbandingan antara prevalensi sampel dengan IgG (+) dengan IgG (-) pada kelompok pembanding (14 : 9) lebih besar dibandingkan dengan kelompok subyek (22 : 21), walaupun secara statistik perbedaan ini tidak bermakna ( $p = 0,45$ ; OR = 0,67).

Tabel 1. Karakteristik kelompok subyek dan pembanding

Deskripsi	Kelompok subyek (N = 43)	Kelompok pembanding (N = 23)	Nilai Statistik (p-value)
Umur bumil (tahun) (rata-rata)	17 – 40 (27,81)	19 – 36 (26,96)	$p = 0,531$
Umur kehamilan (minggu) (rata-rata)	6 – 19 (11,81)	10 – 17 (10,30)	$p = 0,067$
Primigravida : multigravida	18 : 25	7 : 16	$p = 0,362$
Riwayat keluarga abortus (ada : tidak ada)	11 : 32	2 : 21	$p = 0,103$

Tabel 2 : Kadar Zat Anti Toxoplasma dalam Serum (ELISA)

Deskripsi	Kelompok subyek (N = 43)	Kelompok pembanding (N = 23)	Nilai Statistik
Rerata Index IgM	0,346	0,427	$p = 0,059$
Rerata IgM-rate	112,256	159,365	$p = 0,056$
IgM (+) : IgM (-) (cut-off positif > 0,500)	3 : 40	1 : 22	$p = 0,67$ OR = 1,65
Rerata kadar IgG (IU/ml)	18,933	33,557	$p = 0,258$
Rerata IgG-rate	215,805	310,861	$p = 0,371$
IgG (+) : IgG (-) (cut -off positif kadar IgG > 2,949 U/ml)	22 : 21	14 : 9	$p = 0,45$ OR = 0,67

Dari 53 kasus abortus spontan hanya ada 43 sediaan kerokan jaringan sisa kehamilan yang berhasil dikumpulkan untuk dibuat sediaan histopatologi dan dilakukan pemeriksaan PCR. Hasil pemeriksaan histopatologi menunjukkan bahwa kerokan jaringan sisa kehamilan yang diambil sebagai sampel ternyata sangat beraneka ragam. Tabel 3 menunjukkan keaneka-ragaman jaringan yang terambil pada saat kuretase dan dikirim sebagai bahan pemeriksaan dalam penelitian ini. Sebagian besar jaringan yang diterima sebagai sampel terdiri dari jaringan sisa kehamilan, yaitu desidua ( 35 sampel) villi choriales (19 sampel) dan trofoblas (17 sampel). Beberapa sampel mengandung jaringan yang bukan

berasal dari sisa kehamilan, yaitu endometrium (26 sampel), endocervix (10 sampel) dan gumpalan darah (3 sampel). Ada 6 sampel yang samasekali tidak mengandung jaringan sisa kehamilan, yaitu endometrium saja (3 sampel), endometrium dan endocervix (2 sampel) dan endocervix saja (1 sampel). Pada pemeriksaan histopatologi, sebagian besar jaringan mengalami nekrosis ((65.1%) disertai peradangan non spesifik dengan infiltrasi sel-sel MN dan PMN yang padat (25.6%) dan longgar (46.5%). Pada sediaan PA tidak ditemukan adanya parasit di jaringan sisa abortus maupun gambaran spesifik dari proses peradangan akibat Toxoplasma (Tabel 3).

**Tabel 3 : Hasil pemeriksaan Histopatologi dari jaringan kerokan sisa abortus spontan di RSSA (N = 43 sediaan)**

Komponen jaringan*)	N	%	Gambaran histopatologik	N	%
Desidua	35	81,4	Infiltrasi sel-sel radang PMN		
Trofoblast	17	39,5	- padat	11	25,6
Villi	19	44,2	- renggang/kendor	20	46,5
Endometrium	26	60,5	Sel-sel nekrosis	28	65,1
Endocervix	10	23,2			
Gumpalan darah	3	6,9			
Bukan jaringan sisa kehamilan	6	13,9			

\*) Catatan : setiap sediaan dapat mengandung satu jenis komponen jaringan atau lebih

Setelah dilakukan isolasi DNA contoh jaringan sisa kehamilan dan dilakukan *running* PCR, tidak didapatkan sumuran yang positif menunjukkan pita DNA yang diharapkan, kecuali pada sumuran yang berisi sampel pembanding. (Gambar hasil *running*-electrophoresis tidak di sertakan).

## PEMBAHASAN

Penelitian ini tidak dapat berjalan dengan lancar karena berbagai hambatan, yang terutama disebabkan oleh keterbatasan wewenang peneliti untuk mengambil sampel di Rumah Sakit. Untuk mendapatkan sampel jaringan, peneliti sangat tergantung kepada tim yang terdiri dari dokter jaga dari bagian OBG dan Anastesi. Akibatnya, kualitas dan kuantitas jaringan yang diambil sebagai sampel tidak seragam, baik dari sisi interval waktu dilakukannya kuretase dengan kejadian abortus maupun jenis kerokan jaringan yang dikirim ke laboratorium.

Dalam kurun waktu 4 bulan (Maret – Juni 2000) angka kejadian abortus di Poliklinik OBG- RSSA karena berbagai sebab, tercatat sebanyak 451 kasus (18,83%). Angka ini lebih tinggi dibandingkan penelitian yang terdahulu di Jakarta (9,85%) (1), Malang (9,35%)<sup>2</sup>, maupun di Jepang (12-15%) (5,6). Hasil penelitian ini memperkuat data bahwa hampir dari setiap lima kehamilan, satu diantaranya berakhir dengan abortus, sehingga wajarlah bila *The Symposium and Workshop on Reproductive Health Research Agenda* di Bandung menyatakan bahwa abortus merupakan salah satu masalah kesehatan yang menjadi prioritas penelitian untuk tahun 1999-2004 (23).

Toxoplasmosis dikatakan sebagai salah satu penyebab utama berbagai jenis gangguan kehamilan, termasuk abortus, lahir mati dan lahir cacat, namun sampai saat ini kebenaran tentang hal ini masih menjadi bahan perdebatan. Berbagai metoda diagnosis untuk Toxoplasmosis masih belum ada yang lebih dapat diunggulkan dari pada yang lain namun pemeriksaan serologis masih merupakan metoda yang paling banyak digunakan karena paling praktis dan cukup sensitif. Pada penelitian ini nampak bahwa dari 43 kasus abortus spontan yang memenuhi kriteria, 3 di antaranya menunjukkan hasil IgM (+) atau 6,97%; dan 22 diantaranya IgG (+) atau 52,16% (tabel 2). Pada penelitian terhadap ibu-ibu yang melahirkan bayi cacat di

beberapa Rumah Sakit di Kodya Malang disebutkan bahwa prevalensi zat anti IgG Toxoplasma selama tahun 1997 dan 1997-1998, masing-masing adalah 56,7% dan 53,7%. (24,25). Hal ini menunjukkan bahwa angka kejadian Toxoplasmosis pada kelompok ibu-ibu hamil yang mengalami gangguan kehamilan cukup tinggi, yaitu di atas 50%.

Pada kelompok pembanding ditemukan IgM (+) sebanyak 1 kasus (4,35%) IgM (+) dan 14 kasus (60,87%) IgG (+). Pada penelitian ini, yang menarik adalah bukan saja prosentase keberadaan zat anti Toxoplasma yang lebih besar, tetapi rerata kadar IgM maupun IgG pada kelompok hamil normal justru lebih tinggi dibanding kelompok kasus abortus. Hal ini menunjukkan bahwa ibu hamil yang telah memiliki zat anti toxoplasma mempunyai resiko lebih kecil untuk mengalami abortus.

Pemeriksaan histopatologis pada penelitian ini ditujukan untuk melihat adanya perubahan-perubahan spesifik pada jaringan sisa kehamilan, termasuk kemungkinan ditemukannya parasit Toxoplasma. Dikatakan bahwa bila infeksi Toxoplasma terjadi selama masa kehamilan, maka bisa terjadi transmisi parasit melalui plasenta. Pada penelitian ini, dari 43 sampel jaringan yang diperiksa, 37 sampel (86,05%) diantaranya memastikan adanya kehamilan yang gagal, yaitu dengan didapatkannya jaringan desidua, trofoblas ataupun vili khorealis. Dari 43 sampel tersebut ditemukan 3 kasus abortus dengan IgM (+), sehingga patut diduga kalau pada saat abortus terjadi, penderita sedang mengidap Toxoplasmosis fase akut. Namun demikian pada pemeriksaan histopatologi tidak ditemukan gambaran spesifik ataupun keberadaan parasit di jaringan sisa kehamilan, sehingga tidak dapat disimpulkan bahwa kegagalan kehamilan tersebut disebabkan oleh Toxoplasmosis.

Pada pemeriksaan PCR dari contoh jaringan tersebut tidak didapatkan satupun sampel yang memberi hasil positif walaupun pada pemeriksaan serologis 52,16% diantaranya memberi hasil IgG positif. Demikian juga pada penelitian terdahulu yang dilakukan oleh Sardjono dkk (2000) yaitu pada 99 sampel jaringan plasenta, masing-masing dari 54 kasus bayi lahir cacat dan 45 kasus bayi lahir normal, juga tidak ditemukan sampel yang positif padahal 53,7% diantaranya menunjukkan hasil IgG positif (25). Penelitian lain yang dilakukan oleh Fricker-

Hidalgo et.al (1998) terhadap 94 sampel jaringan plasenta dari ibu-ibu yang terinfeksi *Toxoplasma*, pada analisis PCR hanya ditemukan 3 sampel yang positif (26). Hal ini mungkin disebabkan karena pemeriksaan serologis, kultur dan PCR mempunyai tingkat sensitifitas dan spesifitas yang berbeda. Kit diagnostik serologis pada umumnya menggunakan antigen dari strain RH-*Toxoplasma*, yaitu strain yang sudah dikenal patogen, namun mungkin masih bereaksi silang dengan strain lain. Pada penelitian ini digunakan primer untuk PCR yang berasal dari strain RH, tetapi mungkin tidak cocok dengan strain yang menginfeksi ibu-ibu yang mengalami abortus, sehingga hasilnya negatif.

Pengambilan sampel jaringan yang kurang representatif juga dapat menyebabkan hasil yang negatif. Perlu dilakukan penelitian lanjutan dengan menggunakan urutan primer yang berbeda dan pengambilan sampel jaringan yang lebih representatif.

#### UCAPAN TERIMAKASIH

Ucapan terimakasih disampaikan kepada teman-teman sejawat PPDS-OBG FKUB/RSSA, Ibu Zaafril Ilyas, Puskowanjati serta semua pihak yang telah membantu terlaksananya penelitian ini.

#### DAFTAR KEPUSTAKAAN

- Bernard, R.P. and Sastrawinata, S., Previous Spontaneous Abortion (PSAB) in Indonesian University Obstetrics, An Exercise in Programmed MCM-Analysis and Results-Display Feedback. Geneva. 1984.
- Laboratorium Obstetri Ginekologi RSUD dr Saiful Anwar Malang. Laporan Tahunan Data Persalinan dan Kunjungan Poliklinik Tahun 1995 – 1997. 1997
- Koonin, L.M., Smith, J.C., Ramick, M., and Straus, L.T., Morbidity and Mortality Weekly Report Centers for Disease Control and Prevention. 1998: 47 (SS-2).
- Everet, C., Incidence and Outcome of Bleeding Before the 20<sup>th</sup> Week Pregnancy: Prospective Study from General Practice, British Medical Journal. 1997: 315 : 32-34
- Hatasaka, H.H., Recurrent Miscarriage : Epidemiologic Factors, Definitions and Incidence. Clin. Obst. Gyn. 1994: 37 (3) : 625-634.
- Chung, P.H., and Yeko, T.R., Recurrent Miscarriage : Causes and Management, Hospital Practice. 1996: 157-164.
- Dudley, D.J., Recurrent Pregnancy Loss and Cytokines, Not as Simple as it Seems, JAMA. 1995: 273 (24) : 1958-1959.
- Brent, R.L., and Beckman, D.A., The Contribution of Environmental Teratogens to Embryonic and Fetal Loss. Clin.Obst.Gyn. 1994: 37(3) : 646-670
- Remington, J.S., Desmonts, G. Toxoplasmosis. In : Remington JS, Kleins JO, eds. Infectious Diseases of The Fetus and Newborn Infants, 3<sup>rd</sup> ed. WB Saunders, Philadelphia. 1990: 89-129.
- Kasper, L.H., Boothroyd, J.C., *Toxoplasma gondii* and Toxoplasmosis, In : Warren KS. Immunology and Molecular Biology of Parasitic Infections, Blackwell Scientific Publications. 1993 : 269-301.
- Berebbi, A., Kobich, W.E., Bessieres, M.H., Termination of Pregnancy For Maternal Toxoplasmosis The Lancet. 1994: 234: 36-39.
- Kasper, L.H., Toxoplasma Infection, In: Fauci AL, Braunwald E, Isselbacher, KJ, Wilson JD, Martin JB, Kasper DL, Hauser SL, Longo DL. Harrison's Principle of Internal Medicine, 14<sup>th</sup> ed. , McGraw-Hill, New York. 1998: 1197-1202.
- Stojanovic, D., The Effect of Toxoplasmosis on Occurance of Spontaneous Abortions and Anomalies in Neonates in The Timok Region, Vojnosanit Pregl. 1998: 55 (2) : 151-159.
- Crucerescu, E., Epidemiological Data on Toxoplasmosis. The Aspects of Congenital Toxoplasmosis. (Abstract) (Article in Romanian). Bacteriol. Virusol.Parazitol.Epidemiol. 1998: 43(3): 147-155.
- Zargar, A.H., Masoodi, S.R., Laway, B.A., Sofi, B.A., Wani, A.I., Seroprevalence of Toxoplasmosis in Women With Repeated Abortion in Kashmir. J. Epid. Comm.Hlth. 1998: 52: 35-36.
- Al-Hamdani, M.M., Mahdi, N.K., Toxoplasmosis Among Women With Habitual Abortion. Eastern Mediterranean Health Journal. 1997: 310-315.
- Altintas, N., Kuman, H.A., Akisu, C., Aksoy, U., Atambay, M., Toxoplasmosis in Last Four Years in Aegan Region, Turkey. J.Egypt Soc Parasitol. 1997: 27(2): 439-443.
- Owen, M.R., Clarkson, M.J., Trees, A.J., Acute Phase Toxoplasma Abortions in Sheep. Vet Rec. 1998: 142 (18): 480-482.
- Michael, A.I., D.H. Gefland, J.J.Sninsky, and T.J. White., PCR Protocols : A Guide To Methods and Application. Academic Press, Inc. Tokyo. 1990
- Weil, J.H., Biochimie Generale. Sixieme ed. Masson S.A. Paris. 1990: 322 - 344.
- Dupon, M., J. Cazenave, J.L. Pellegrin, J.M. Ragnaud, A.Cheyrou , L. Fischer , B. Leng and J.Y. Lacut., Detection of Toxoplasma Gondii by PCR and Tissue Culture in Cerebrospinal Fluid and Blood of Human Immunodeficiency Virus- seropositive Patients. J. Clin Microbiol Sep. 1995: 33 (9) : 2421-2426
- Hohfield, P., Daffos, F., Costa, J.M., Thulliez, P., Forestier, F., Vidaud, M., Prenatal Diagnosis of Congenital Toxoplasmosis With A Polymerase Chain Reaction Test on Amniotic Fluid. N.Engl.J.Med. 1994: 331(16) : 695-699.
- Department of Health-POGI-WHO-USAID. Reproductive Health Research Priorities 1999-2004. The Symposium and Workshop on Reproductive Health Research Agenda, Bandung. 1999
- Sardjono, T.W., Hidayat, A., Aulanniam, Irfan, M., Zat Anti Toxoplasma Pada Ibu-ibu yang Melahirkan Bayi Cacat di Beberapa Rumah Sakit di Kodya Malang, selama tahun 1997. Maj.Ked.Ind. 1998: 48(11) : 431-435.

25. Sardjono, T.W., Aulanni'am, Hidayat, A., Irfan, M., Keberadaan *Toxoplasma Gondii* di Jaringan Plasenta Dideteksi Dengan Teknik PCR dan Hubungannya Dengan Cacat Bawaan. *Majalah Kedokteran Tropis Indonesia*. 2000: 11(1): 6-16.
26. Fricker-Hidalgo, H., Pelloux, H., Racinet, C., Grefenstete, I., Bost-Bru, C., Goullier-Fleuret, A., Ambrose-Thomas, P., Detection of *Toxoplasma Gondii* in 94 Placentae From Infected Women by Polymerase Chain Reaction, in *Vvivo* and *in-Vitro* Cultures. *Placentae*. 1998: 19(7): 545-549.
27. Gandahusada, S., Penanggulangan Toxoplasmosis Dalam Meningkatkan Kualitas Sumber Daya Manusia. *Pidato Pengukuhan Guru Besar Tetap FKUI*. Jakarta. 25 Maret 1995.