

## Pemanfaatan Teknik *Assisted Hatching* dalam Meningkatkan Implantasi Embrio

### (Utilization of Assisted Hatching Techniques to Enhance Embryo Implantation)

Arie Febretrisiana<sup>1</sup> dan FA Pamungkas<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Loka Penelitian Kambing Potong, PO Box I Sei Putih, Galang 20585, Sumatera Utara

<sup>2</sup>Pusat Penelitian dan Pengembangan Peternakan, Jl. Raya Pajajaran Kav. E-59, Bogor 16128  
[febre\\_arie@yahoo.com](mailto:febre_arie@yahoo.com)

(Diterima 29 September 2016 – Direvisi 12 Januari 2017 – Disetujui 27 Februari 2017)

#### ABSTRACT

Gestation is the main goal for *in vitro* fertilization. The embryo that has been developed outside the body will be transferred directly into uterus leading to the process of hatching, implantation, and pregnancy. However, approximately 85% of embryos that have been transferred were failed to implant and it might be caused by hatching failure. Hatching is the process of releasing embryo from zona pellucida. If this process does not occur, it will cause pregnancy failure. Assisted hatching is a mechanism that dealing with thinning, slicing or artificially making holes in the zona pellucida to improve hatching. The process can be applied both in fresh or frozen embryos. This review describes various methods in assisted hatching such as enzymatic, chemical, mechanical, and laser beam as well as their advantages and disadvantages. Generally, some researches show that the technology of assisted hatching can improve the percentage of hatching and implantation of the embryo. However, in spite of the benefits, there are such weaknesses find in the zona pellucida of the embryo that has been manipulated such as toxic hazard medium, the risk of damage to the blastomeres or monozygotic twinning. Therefore, it is advisable to perform assisted hatching in certain cases that tends to face obstacles during the process of hatching such factors as age, embryo quality, the thickness of the zona pellucida and the number of failures in the *in vitro* fertilization program.

**Key words:** Hatching, assisted hatching, implantation, *in vitro* fertilization, embryo

#### ABSTRAK

Kebuntingan merupakan tujuan utama yang akan dicapai melalui proses fertilisasi *in vitro*. Embrio yang telah dikembangkan di luar tubuh akan ditransfer kembali ke dalam rahim dan akan mengalami proses *hatching*, implantasi dan selanjutnya terjadi kebuntingan. Namun, diperkirakan 85% embrio yang ditransfer kembali gagal berimplantasi dan kegagalan proses keluarnya embrio dari zona pelusida (*hatching*) menjadi salah satu penyebabnya. *Hatching* adalah proses keluarnya embrio dari zona pelusida. Jika tahap *hatching* tidak terjadi maka kebuntingan juga gagal. *Assisted hatching* adalah teknologi berbantu yang dilakukan di laboratorium dan dikerjakan di bawah mikroskop dengan tujuan melakukan penipisan, penyayatan atau pembuatan lubang secara buatan pada zona pelusida untuk mempermudah terjadinya proses *hatching*. *Assisted hatching* tidak hanya diterapkan pada embrio segar, namun dapat pula dilakukan pada embrio beku. Ulasan ini menjelaskan berbagai metode *assisted hatching* (enzimatis, kimiawi, mekanis dan penggunaan sinar laser) beserta kelebihan dan kekurangannya. Secara umum, dari berbagai hasil penelitian menunjukkan bahwa teknologi *assisted hatching* mampu meningkatkan persentase keberhasilan *hatching* dan implantasi embrio. Selain keuntungan yang diperoleh dari penerapan teknologi ini, terdapat kelemahan pada embrio yang telah mengalami manipulasi pada zona pelusida seperti bahaya toksik medium, risiko kerusakan pada blastomer maupun terjadinya kembar monozygotik sehingga disarankan untuk melakukan *assisted hatching* pada kasus yang cenderung mengalami hambatan pada proses *hatching* seperti faktor umur, kualitas embrio, ketebalan zona pelusida dan jumlah kegagalan pada program fertilisasi *in vitro* yang telah dilakukan.

**Kata kunci:** *Hatching*, *assisted hatching*, implantasi, fertilisasi *in vitro*, embrio

#### PENDAHULUAN

Kelahiran individu baru atau berketurunan adalah tujuan utama dari proses reproduksi. Terjadinya kelahiran individu baru diperoleh setelah melalui serangkaian proses yang saling berkaitan satu sama lain di dalam tubuh. Proses diawali dengan pematangan sel

telur dan sperma yang didukung oleh lingkungan organ reproduksi yang mendukung agar dapat terjadi fertilisasi sehingga kemudian terbentuk embrio, terjadi kebuntingan dan kelahiran individu baru. Gangguan proses reproduksi secara alami untuk memperoleh keturunan dapat terjadi antara lain berupa gangguan ovulasi, gangguan pada tuba dan uterus atau gangguan

pada spermatozoa (Roupa et al. 2009; Raheem & Ralph 2011).

Perkembangan dan aplikasi teknologi reproduksi berkembang pesat dan salah satu pengembangan teknologi reproduksi yang dilakukan adalah teknologi reproduksi berbantu. Teknologi reproduksi berbantu dimanfaatkan untuk membantu menangani permasalahan gangguan reproduksi yang dapat menyebabkan kesulitan memperoleh keturunan. Salah satu teknologi reproduksi berbantu adalah Fertilisasi *In Vitro* (IVF) yaitu teknologi reproduksi yang memungkinkan sebagian proses terjadinya kebuntingan dapat berlangsung di luar tubuh melalui penerapan proses aspirasi dan maturasi oosit, pembuahan dengan spermatozoa dan perkembangan embrio dilakukan di luar tubuh (Uzelac et al. 2012). Dengan kata lain, embrio dihasilkan di luar tubuh dan pada saat embrio berumur tiga hari akan ditransfer kembali ke dalam uterus untuk memperoleh kebuntingan (Goldberg et al. 2007). Teknologi IVF juga telah dikembangkan dengan metode mikroinseminasi yaitu *Intracytoplasmic Sperm Injection* (ICSI) dimana sperma secara langsung diinjeksi ke dalam sel telur sehingga diharapkan akan dapat meningkatkan keberhasilan kebuntingan (Yanagida 2009). Akan tetapi, angka keberhasilan kebuntingan menggunakan teknologi ini masih belum optimal yakni sebesar 40-60% (Turhan et al. 2011).

Salah satu faktor penyebab rendahnya tingkat keberhasilan teknologi IVF adalah rendahnya keberhasilan embrio setelah ditransfer ke uterus yang dapat berimplantasi. Diperkirakan 85% embrio yang ditransfer kembali ke dalam rahim mengalami kegagalan implantasi. Dilaporkan hanya 10-15% embrio yang ditransfer pada hari kedua atau hari ketiga umur embrio mampu berimplantasi. Sedangkan tingkat keberhasilan implantasi embrio yang ditransfer pada tahap blastosis hanya mencapai 23-25% (Huisman et al. 2000). Penyebab rendahnya tingkat implantasi dan kebuntingan kemungkinan disebabkan oleh gangguan yang terjadi pada embrio. Diketahui bahwa kegagalan implantasi berkaitan erat dengan kualitas embrio (Shi et al. 2014), metode yang digunakan pada saat proses transfer embrio maupun kesiapan penerimaan endometrium. Kualitas embrio yang tidak baik dapat terefleksi dari ketidaknormalan yang terdapat pada embrio seperti ketebalan zona pelusida, jumlah blastomer dan rata-rata fragmentasi yang terdapat pada embrio (Bó & Mapletoft 2013). Kualitas embrio yang ditransfer bahkan dapat menjadi salah satu cara memprediksi keberhasilan kebuntingan yakni melalui determinasi kriteria morfologi embrio (Sugimura et al. 2012).

Lebih lanjut disebutkan bahwa gangguan fertilisasi dapat pula disebabkan oleh blastosit abnormal pada zona pelusida (Montag et al. 2008). Ada dugaan bahwa terjadi pengerasan pada zona yang

terjadi selama embrio yang dikultur *in vitro* pada medium atau setelah mengalami proses pembekuan (Vanderzwalmen et al. 2013). Akibat dari gangguan ini embrio kesulitan mengalami proses *hatching* (Makrakis et al. 2006). Proses terjadinya kebuntingan melibatkan banyak fenomena biologi yang rumit dan unik yang saling berkaitan satu sama lain. Agar dapat terjadi kebuntingan, embrio harus dapat melekat pada dinding endometrium untuk berimplantasi (Koot et al. 2012). *Hatching* adalah proses keluarnya embrio dari zona pelusida. Untuk dapat melekat pada dinding endometrium, embrio harus terlebih dahulu keluar dari zona pelusida. Proses ini menjadi tahap krusial karena jika tahap *hatching* tidak terjadi maka kebuntingan juga gagal (Hammadeh et al. 2011).

Beberapa pendekatan teknologi digunakan untuk mengatasi masalah kegagalan proses *hatching*. Salah satu teknologi yang banyak digunakan adalah *Assisted Hatching* (AH). *Assisted hatching* merupakan teknologi berbantu yang dilakukan di laboratorium dan dikerjakan di bawah mikroskop pada zona pelusida sebelum embrio ditransfer ke dalam uterus untuk membantu agar embrio dapat keluar dari zona pelusida untuk kemudian berimplantasi pada dinding rahim (Feng et al. 2009). Dasar dari metode ini adalah memanipulasi zona pelusida secara buatan agar proses *hatching* dapat terjadi. Ada beberapa metode AH yang saat ini banyak digunakan diantaranya adalah penipisan zona (*zona thinning*), pelubangan zona (*zona drilling*), menghilangkan secara keseluruhan zona menggunakan bahan kimia, teknik mekanik maupun menggunakan laser (Valojerdi et al. 2008).

*Assisted hatching* telah banyak diterapkan pada pusat kesehatan yang berkaitan dengan infertilitas pada manusia. Beberapa penelitian menunjukkan bahwa teknik AH yang dilakukan dapat meningkatkan hasil kehamilan dan jumlah kelahiran pada pasien yang diprediksi mengalami kesulitan kehamilan seperti usia yang telah melebihi 35 tahun, kualitas embrio yang tidak baik, embrio dengan ketebalan zona pelusida lebih dari 13  $\mu\text{m}$  atau pasien yang telah mengalami kegagalan pada program fertilisasi *in vitro* (Lanzendorf et al. 2007). Akan tetapi, beberapa laporan menunjukkan hal yang sebaliknya (Frydman et al. 2006). Tulisan ini bertujuan mengemukakan berbagai teknik AH dan evaluasi keuntungan dan kerugian, serta potensi untuk dapat meningkatkan keberhasilan implantasi pada embrio.

## MEKANISME HATCHING

Di sekeliling sel telur baik pada tahap perkembangan, ovulasi maupun saat berkembang menjadi embrio selalu dilindungi oleh sebuah lapisan ekstraselular yang disebut zona pelusida (Goudet et al. 2008). Struktur zona pelusida terutama terdiri dari

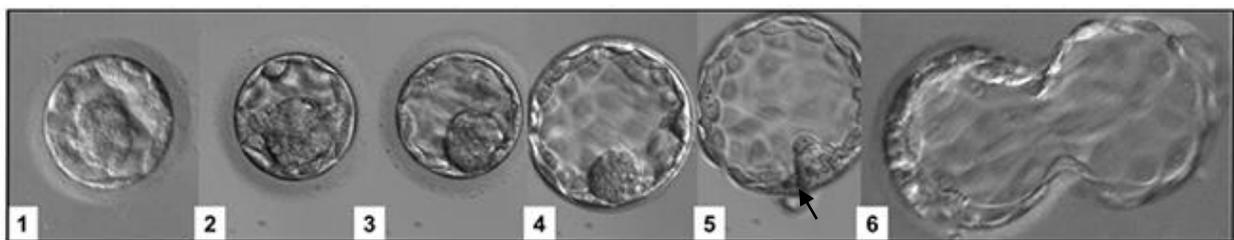
glikoprotein yang berperan dalam menambah atau membatasi perkembangan embrio serta kompetensi perkembangannya. Zona pelusida terbentuk pada tahap terakhir proses oogenesis. Dalam tahap perkembangannya, inisiasi bertambahnya ketebalan zona pelusida sesuai dengan pertambahan diameter sel telur. Ketebalan zona bervariasi 2-20  $\mu\text{m}$  tergantung pada jenis spesies (Nara et al. 2006). Lebih lanjut dilaporkan oleh Nara et al. (2006) bahwa ketebalan zona pelusida akan menurun setelah mengalami fertilisasi.

Pembelahan sel akan terjadi setelah proses fertilisasi dan pembelahan akan terus berkembang membentuk blastomer-blastomer. Fase selanjutnya adalah fase kompaksi yang ditandai dengan adanya perubahan pada pembatas blastomer yang menyatu satu sama lain untuk memulai kompaksi bersama-sama (Prados et al. 2012). Setelah 24 jam, embrio akan memasuki tahap kavitasasi dan akan membentuk embrio blastosit yang ditandai dengan terbentuknya rongga berisi cairan atau yang disebut dengan *blastocoel*. Sel-sel kemudian berdiferensiasi dengan sel-sel bagian tepi disebut *trophectoderm* (TE) dan sel-sel di bagian tengah disebut *inner cell mass*. Akumulasi air dihasilkan dari transportasi  $\text{Na}^+$  ke dalam blastosol dan terus ditingkatkan oleh kerja  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase yang meningkatkan konsentrasi garam di dalam embrio dengan menarik air melalui mekanisme osmosis (Watson et al. 2004). Sebagai akibat dari akumulasi cairan yang terus meningkat, begitu pula dengan jumlah sel yang bertambah menyebabkan pembesaran pada blastosit. Pembesaran ukuran blastosit selanjutnya berakibat penipisan progresif pada zona pelusida (Brevini & Georgia 2013). Selain itu, sel-sel TE diketahui mensekresikan beberapa jenis asam amino seperti tripsin, plasmin, glutamin, insulin dan *epidermal growth factor*. Kedua kejadian utama yang terjadi pada embrio pada akhirnya akan mendesak blastosit keluar dari zona pelusida, tahap ini disebut dengan *hatching*.

Setelah proses *hatching*, implantasi menjadi tahap selanjutnya yang akan dilalui oleh embrio. Implantasi embrio merupakan peristiwa perkembangan dinamis yang melibatkan serangkaian interaksi fisik dan fisiologis antara TE dan berbagai jenis sel endometrium seperti luminal, kelenjar epitel dan sel stroma (Lim & Dey 2009). Jika proses *hatching* telah terjadi itu artinya sel TE akan dapat berinteraksi dengan sel endometrium dan implantasi akan dapat terjadi (Wang & Dey 2006). *Hatching* menjadi salah satu tahap krusial pada keberhasilan kebuntingan karena jika *hatching* gagal terjadi maka embrio tidak dapat menempel pada endometrium dan artinya kebuntingan tidak akan terjadi (Taniyama et al. 2011).

### ASSISTED HATCHING

*Assisted hatching* adalah teknologi berbantu yang dilakukan di laboratorium dan dikerjakan di bawah mikroskop dengan tujuan melakukan penipisan, penyayatan atau pembuatan lubang secara buatan pada zona pelusida dengan harapan mempermudah terjadinya proses *hatching*. Metode yang dilakukan adalah dengan melakukan manipulasi secara buatan pada ketebalan zona pelusida. Keuntungan yang diperoleh adalah dapat memastikan terjadinya koneksi awal antara embrio dan endometrium (Feng et al. 2009). Beberapa metode AH telah dikembangkan dan dikategorikan ke dalam beberapa metode yaitu metode kimiawi (menggunakan asam *tyrode*) (Jones et al. 2006), metode mekanis (pemotongan, penipisan, pelubangan menggunakan mikromanipulator) (Nakayama et al. 1998; Hershlag et al. 1999; Kim et al. 2012), metode enzimatik menggunakan pronase (Sifer et al. 2006) dan metode terbaru yang saat ini berkembang adalah dengan menggunakan berbagai macam jenis laser (Ghannadi et al. 2011).



(1) Proses kavitasasi *blastocoel* terbentuk kurang dari setengah volume embrio; (2) *Blastocoel* terbentuk hampir setengah dari volume embrio; (3) Blastosit terbentuk sempurna ditandai dengan *blastocoel* telah memenuhi semua bagian tepi embrio; (4) Blastosit mengalami ekspansi dan mulai terjadi penipisan zona pelusida; (5) Embrio memasuki tahap awal *hatching*, zona pelusida mulai terbuka (tanda panah); (6) Embrio telah mengalami *hatching*

**Gambar 1.** Ekspansi blastosit dan *hatching* pada embrio

**Sumber:** Kovačić & Vlaisavljević (2012)

### Metode kimiawi

Metode ini menggunakan larutan asam *tyrode* dengan pH 2,2. Metode ini menjadi metode yang paling sederhana karena hanya memaparkan embrio pada larutan asam *tyrode* untuk membuat sebuah lubang atau menghasilkan penipisan zona pada embrio. Terlebih dahulu embrio dipastikan tidak dapat bergerak dengan menahannya pada *holding* pipet. Pada saat yang hampir bersamaan pipet kedua dengan diameter 10 mikro yang berisi larutan asam *tyrode* didekatkan pada zona pelusida dan dibuat lubang dengan menyempotkan secara terkontrol larutan asam *tyrode* pada permukaan zona (Geber et al. 2011).

### Metode enzimatis

Penipisan atau penghilangan zona pelusida pada metode AH dengan metode enzimatis dapat dilakukan dengan menggunakan pronase. Embrio ditempatkan pada medium yang telah ditambahkan 10 IU/ml pronase selama satu menit pada suhu 37°C untuk menginisiasi peregangan dan pelunakan pada zona pelusida. Pada umumnya zona pelusida akan meregang dan melunak setelah satu menit dipaparkan pada pronase. Embrio akan ditransfer kembali setelah zona pelusida menipis atau hilang secara keseluruhan. Keberhasilan kebuntingan dengan menggunakan metode ini dilaporkan mencapai 53% dengan persentase implantasi mencapai 33% (Sifer et al. 2006).

### Metode mekanis

*Assisted hatching* dapat dilakukan dengan metode mekanis yaitu dengan membuat lubang buatan pada zona pelusida menggunakan *microneedle* (jarum dengan ukuran yang sangat kecil), teknik ini dikenal dengan *Partial Zona Dissection* (PZD). Embrio akan ditahan menggunakan *holding* pipet agar tidak bebas bergerak kemudian zona pelusida ditusuk menggunakan *microneedle* dengan sudut 30° dari arah yang berlawanan pada bagian kosong antara zona dan blastomer. Kemudian digesekkan pada *holding* atau ke dasar *petri dish* hingga zona pelusida tersayat.

Teknik ini kemudian banyak dikembangkan melalui penelitian untuk mengoptimalkan hasil, antara lain dengan *cross Mechanical Assisted Hatching* (cMAH). Metode yang dikembangkan oleh Park et al. (2014) sebenarnya adalah pengembangan dari PZD. Namun, cMAH dikerjakan dengan membuat dua kali sayatan yang saling bersilangan. Setelah membuat satu sayatan pada bagian zona pelusida, embrio kemudian diputar 90° secara vertikal dan kemudian dibuat sayatan baru dengan posisi menyilang pada sayatan pertama. Teknik ini dapat dikerjakan dalam waktu satu

menit tanpa membuat kerusakan pada blastomer dan keberhasilan *hatching* mencapai 80,6%. Pengembangan PZD juga dilakukan pada teknik *Controlled Zona Dissection* (CZD) yang dibedakan menjadi dua yaitu *Long Zona Dissection* (LZD) dengan panjang sayatan 100 µm dan *Moderate Zona Dissection* (MZD) dengan panjang sayatan 66-65 µm. Teknik ini dilakukan dengan mengubah sudut *holding* pipet menjadi 65° sehingga memudahkan untuk membuat sayatan yang lebih panjang jika dibandingkan dengan teknik lainnya. Tingkat keberhasilan *hatching* pada LZD mencapai 100% sedangkan MZD mencapai 71,8% (Lyu et al. 2005). Keberhasilan implantasi embrio dengan teknik AH ini masih memerlukan kajian lebih lanjut.

### Laser assisted hatching

*Laser assisted hatching* saat ini menjadi salah satu teknik yang banyak dikembangkan dalam aplikasi AH. Penggunaan sinar laser dianggap sebagai alat yang ideal untuk prosedur pembedahan mikro karena energinya lebih mudah untuk difokuskan kepada area objek yang dituju dan dapat menghasilkan ukuran lubang yang lebih konsisten (Hammadeh et al. 2011). Secara umum, prosedur yang dilakukan berupa metode kontak atau non-kontak UV laser. Metode UV laser kontak memerlukan alat berupa *holding* dan alat pemotong yang digunakan untuk menyampaikan panjang gelombang sinar ultraviolet (UV) yang disampaikan melalui pipet kaca atau *optical fibre* (Antinori et al. 1996). Berbeda dengan metode UV kontak, metode UV non-kontak tidak memerlukan alat sebagai penghantar gelombang, akan tetapi dikerjakan dengan mengatur besarnya energi dan jumlah pengulangan yang diberikan.

Berbagai pengembangan metode AH menggunakan sinar laser terus dilakukan. Salah satunya adalah beberapa pengembangan penggunaan berbagai jenis sinar laser seperti 1,48 µm *infrared laser diode* (Park et al. 2014), ZILOS-TK *infrared laser optical system* (Makrakis et al. 2006), OCTAX *laser shot system* (Nishio et al. 2006) dan *erbium-yttrium-aluminium-garnet* (Er:YAG) (Obruca et al. 1997).

Jenis laser non-kontak yang menggunakan *infrared* dioda dengan panjang gelombang 1,48 µm dapat menghasilkan luasan area tembakan yang besar dan dapat dikerjakan hanya dalam waktu 10 detik (Park et al. 2014). Sekitar 50% embrio akan *hatching* dengan sempurna tanpa mengalami kerusakan pada blastomer atau kekhawatiran pengaruh buruk antibiotik terhadap embrio jika sinar laser hanya digunakan untuk mengikis zona tanpa membuat lubang. Hasil pengamatan embrio dengan menggunakan mikroskop elektron menunjukkan bahwa lokasi awal sobekan pada zona terjadi pada lapisan yang mengalami pengikisan dominan sehingga menunjukkan bahwa teknik ini dapat

**Tabel 1.** Penggunaan berbagai jenis sinar laser pada teknik *assisted hatching*

Jenis laser	Luas pembukaan zona ( $\mu\text{m}$ )	Jenis metode <i>hatching</i>	Implantasi (%)		Kebuntingan (%)	
			LAH	Kontrol	LAH	Kontrol
1,48 $\mu\text{m}$ <i>laser diode</i>	80	Penipisan zona	15,8	14,9	31,4	28,6
1,48 $\mu\text{m}$ <i>laser diode</i>	16-18	Penipisan zona	17,7	20,8	33,3	40,3
Zilos-tk <i>laser system</i>	5-10	Pelubangan zona	51	-	43	-
<i>Octax laser shot system</i>	5-10	Pelubangan zona	-	-	29,7	30,4
Er:YAG laser	18	Pelubangan zona	14,4	6	40	16,2

LAH: *Laser assisted hatching*

**Sumber:** Disarikan dari hasil penelitian Obruca et al. (1994); Baruffi et al. (2000); Petersen et al. (2005); Makrakis et al. (2006); Nishio et al. (2006)

menciptakan garis sobekan yang alami pada zona pelusida. Akan tetapi kekurangan dari teknik ini adalah kesulitan untuk mengontrol kedalaman pengikisan yang banyak dipengaruhi oleh faktor lain seperti pengalaman operator, ketepatan posisi sinar laser dan jumlah air yang terkandung di dalam matriks glikoprotein (Blake et al. 2001).

Jenis sinar laser lain yaitu Er:YAG dengan diameter tip *laser fibre* 20  $\mu\text{m}$ , energi yang digunakan sebesar 10  $\mu\text{J}$  dan kedalaman penetrasi 3  $\mu\text{m}$  menjadi salah satu cara untuk melakukan AH. Teknik ini diketahui juga tidak menyebabkan kerusakan pada ultrastruktur embrio maupun sel telur (Gambar 2). Bentuk lubang dengan menggunakan sinar ini menghasilkan bentuk yang hampir bulat sempurna dengan bagian dalam menyerupai bentuk kerucut dengan ujung yang terpotong. Sinar ini sangat mudah diserap oleh air sehingga pengerjaan harus terfokus pada permukaan zona pelusida bukan pada medium kultur embrio (Obruca et al. 1997).

#### ASSISTED HATCHING PADA EMBRIO POST-THAWING

Kualitas embrio setelah proses pembekuan diketahui mengalami penurunan kemampuan untuk bertahan hidup dan menunjukkan persentase keberhasilan kebuntingan yang juga rendah (Taniyama et al. 2011). Perbandingan penurunan persentase kebuntingan antara embrio tanpa pembekuan dengan embrio yang telah dibekukan dapat mencapai 10-13% (Hasler 2001). Hal ini diduga disebabkan terjadinya kerusakan pada embrio setelah proses kriopreservasi. Akibat dari kriopreservasi menyebabkan terjadinya kerusakan pada zona pelusida dan embrio mengalami penurunan massa atau volume. Stres selama proses pembekuan juga menyebabkan kerusakan mikrovili atau membran plasma, pembesaran pada mitokondria dan terjadi akumulasi molekul debris. Hal ini pada akhirnya menyebabkan perubahan pada matriks

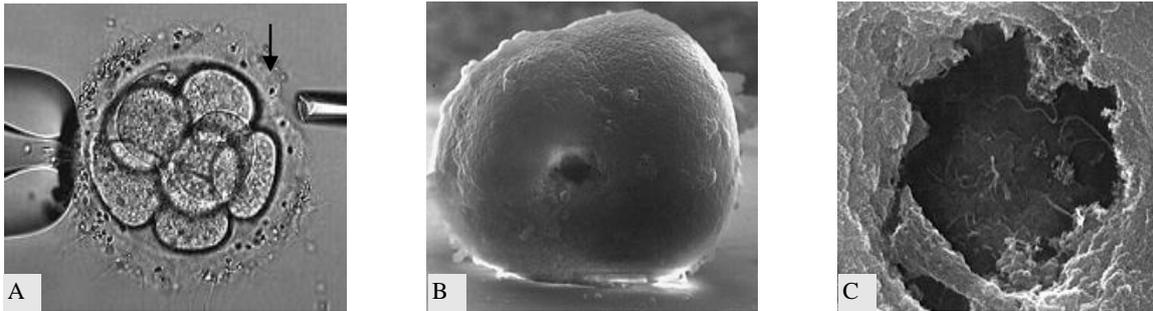
glikoprotein dan memicu pengerasan pada zona pelusida sehingga menghambat embrio untuk dapat *hatching* dan menurunkan tingkat keberhasilan kebuntingan (Moreira Da Silva & Metelo 2005).

Secara umum, keberhasilan kebuntingan menggunakan embrio yang dibekukan lebih rendah bila dibandingkan dengan menggunakan embrio tanpa pembekuan (Tucker et al. 1991). Berbagai metode AH dilakukan pada embrio pasca-pembekuan untuk dapat meningkatkan keberhasilan kebuntingan. *Assisted hatching* menjadi alternatif metode yang dapat membantu embrio pasca-dibekukan untuk dapat keluar dari zona pelusida dan meningkatkan potensinya untuk dapat berimplantasi (Tabel 2).

#### KELEBIHAN DAN KEKURANGAN TEKNOLOGI ASSISTED HATCHING

Kemampuan embrio untuk keluar dari zona pelusida menjadi syarat agar embrio dapat menempel pada dinding rahim dan terjadi kehamilan. *Assisted hatching* menjadi teknik yang dikembangkan untuk membantu meningkatkan keberhasilan implantasi embrio pada uterus. Pada manusia, penggunaan metode AH telah diterapkan pada banyak pusat-pusat pelayanan kesehatan infertilitas. Akan tetapi masih diperdebatkan penggunaannya hanya pada kasus tertentu atau dapat digunakan sebagai prosedur rutin dalam program IVF. Hal tersebut terjadi karena hingga saat ini keberhasilan atau keuntungan penggunaan teknik ini masih dalam perdebatan apakah teknologi ini secara nyata mampu memberi keuntungan (Valojerdi et al. 2008).

Merujuk pada keuntungan maupun kerugian yang ditimbulkan akibat dari penggunaan teknologi AH, masing-masing teknik yang digunakan juga memiliki keunggulan sekaligus kelemahan pada praktiknya. Seperti penggunaan asam *tyrode* yang diketahui bersifat toksik dan dapat menyebabkan kerusakan pada embrio jika larutan asam masuk



(A) Embrio dipaparkan pada sinar laser Er:YAG (tanda panah); (B) Gambaran *scanning* pada embrio menggunakan mikroskop elektron setelah dilakukan AH dengan sinar laser Er:YAG; (C). Ultrastruktur zona pelusida pada membran ooplasma yang tergambar dari karakter permukaan mikrovili yang masih terjaga dengan baik

**Gambar 2.** Penggunaan sinar laser Er:YAG

**Sumber:** Obruca et al. (1997)

**Tabel 2.** Keberhasilan implantasi embrio setelah dibekukan dengan berbagai metode *assisted hatching*

Metode <i>assisted hatching</i>	Keberhasilan implantasi (%)		Referensi
	Embrio beku	Kontrol	
Enzimatis pronase	9,6	9,2	Sifer et al. (2006)
Asam tyrode	11,4	5,8	Gabrielsen et al. (2004)
Laser			
Pelubangan	20,1	9,9	Balaban et al. (2006)
Penghilangan 50% zona pelusida	52,0	10,0	Hiraoka et al. (2008)
Pembelahan zona	25,0	28,0	Vanderzwalmen et al. (2013)

ke dalam, merusak blastomer dan menyebabkan kematian sel. Metode ini juga tidak memiliki standarisasi dalam pembuatan ukuran lubang atau penipisan zona karena bergantung pada kemampuan dan pengalaman operator (Jones et al. 2006). Cohen et al. (1990) menyatakan bahwa apabila metode ini dilakukan pada embrio yang mencapai tahap blastosis atau telah mencapai tahap blastosis sempurna akan ada konsekuensi besar yang akan terjadi pada embrio yaitu hilangnya blastomer melalui zona pelusida yang telah terbuka. Akan tetapi, hal ini tidak terbukti seperti yang dilaporkan Fong et al. (1998) bahwa penghilangan zona secara keseluruhan dengan menggunakan metode enzimatis tidak menunjukkan kerusakan pada sel bahkan hingga pada saat akan ditransfer. Seperti halnya penggunaan teknik enzimatis penggunaan teknik mekanis adalah metode yang mudah, dapat dilakukan dengan waktu yang relatif cepat dan tidak memerlukan biaya yang besar akan tetapi ukuran sayatan yang dihasilkan sangat bervariasi dan sangat bergantung pada keahlian dan pengalaman operator (Cohen & Feldberg 1991).

*Assisted hatching* yang diterapkan pada embrio beku juga perlu memperhatikan pengaruh yang akan ditimbulkan akibat penerapan teknik ini. Metode

mekanis, kimiawi dan laser saat ini menjadi metode yang banyak dikembangkan untuk menjawab berbagai perdebatan yang muncul berkaitan dengan keberhasilan implantasi dengan menggunakan AH pada embrio beku. Meskipun penggunaan pronase memiliki keuntungan yaitu mudah untuk diterapkan dan tidak membutuhkan biaya yang besar serta mampu melindungi embrio dari pengaruh buruk lingkungan eksternal yang mampu merusak embrio jika zona pelusida dihilangkan, namun hasilnya tidak menunjukkan keberhasilan dalam meningkatkan implantasi embrio beku (Sifer et al. 2006).

Penggunaan laser mampu meningkatkan keberhasilan implantasi pada embrio beku, akan tetapi metode ini membutuhkan biaya yang tinggi. Selain itu, perlu diperhatikan bahaya yang ditimbulkan akibat dari paparan sinar laser terhadap embrio terutama berkaitan dengan luasan daerah zona pelusida yang akan mengalami penipisan atau yang akan dihilangkan. Diketahui embrio dapat mengalami *shock* akibat dari paparan suhu yang tinggi yang ditandai dengan aktivasi produksi *heat shock protein* (Hartshorn et al. 2005). Akan tetapi, teknik laser AH lebih baik dalam keakuratan posisi target yang diinginkan dan menjadi alat yang ideal untuk bedah mikro (Makrakis et al.

2006). Selain itu, penggunaan laser juga dapat menghemat waktu sehingga embrio tidak terlalu lama keluar dari lingkungan yang ideal dan mencegah penurunan kualitas embrio. Penggunaan laser juga meminimalkan embrio terpapar pada zat kimia yang merugikan. Akan tetapi, perlu diperhatikan panjang gelombang yang digunakan agar tidak merusak DNA embrio (Lanzendorf et al. 2007). Penggunaan metode pembelahan zona harus memperhatikan tingkat kesulitan pada pembuatan ukuran lubang yang konsisten dan risiko buruk yaitu terjadinya lisis pada blastomer selama proses berlangsung. Akan tetapi, kajian terhadap metode yang baik untuk meningkatkan keberhasilan implantasi pada embrio beku masih terus dilakukan terutama dengan pengembangan modifikasi metode yang saat ini banyak dikerjakan.

Hal lain yang perlu menjadi pertimbangan adalah setelah aplikasi AH, zona pelusida akan terbuka dan menyebabkan embrio tidak terlindungi sepenuhnya dari lingkungan luar yang dapat menyebabkan kematian embrio atau merusak blastomer sehingga menurunkan kemampuan hidup embrio. Selain itu, embrio yang telah dimanipulasi pada zona pelusida akan sangat rentan terhadap toksisitas lingkungan organ reproduksi, mikroorganisme atau sel-sel imunitas pada saat proses transfer embrio. Selain itu, akibat dari pembukaan pada zona pelusida akan dapat meningkatkan risiko terjadinya kembar monozigot (*monozygotic twinning*) (Aston et al. 2008).

Berdasarkan pertimbangan kebaikan dan keburukan dari teknologi AH maka direkomendasikan tidak dilakukan pada semua embrio hasil IVF. Hingga saat ini, laporan dari berbagai penelitian masih menunjukkan hasil yang berbeda-beda pada aplikasi AH dalam peningkatan keberhasilan implantasi. Hal ini kemungkinan dapat terjadi karena keberhasilan embrio untuk berimplantasi tidak sepenuhnya dipengaruhi oleh embrio meski telah dilakukan AH untuk membantu berimplantasi, namun harus diperhatikan pula karakteristik atau riwayat pasien program IVF (Sagoskin et al. 2007). Aplikasi AH hanya dilakukan pada ketentuan keadaan umur ibu dan jumlah kegagalan program IVF yang telah terjadi pada pasien. Kualitas embrio yang tidak baik juga menjadi pertimbangan penggunaan teknologi AH. Transfer embrio dengan menggunakan embrio beku serta ketebalan zona pelusida yang lebih dari 13  $\mu\text{m}$  juga direkomendasikan untuk dilakukan AH (Brezina & Zhao 2011). Usia ibu menjadi salah satu alasan AH dipergunakan karena semakin tua usia ibu maka risiko terjadinya penurunan pembentukan blastosis, perkembangan embrio juga menjadi lebih lambat dan kemampuan embrio untuk *hatching* semakin rendah (Tucker & Bal 2009).

## APLIKASI *ASSITED HATCHING* DI INDONESIA

Kasus infertilitas yang dialami oleh pasangan suami istri memberikan dampak pada keadaan fisiologis baik pada suami maupun pada istri. Hal ini berkaitan dengan kultur budaya khususnya di Indonesia yang beranggapan bahwa setiap pasangan suami istri yang telah menikah kurang lengkap apabila belum mampu memiliki keturunan (Pranata 2009). Oleh karena itu, saat ini telah banyak berdiri pusat-pusat atau klinik infertilitas di Indonesia. Tujuannya adalah untuk memberikan bantuan kepada pasangan-pasangan suami istri yang mengalami masalah dalam memiliki keturunan. Program yang dilakukan oleh klinik infertilitas umumnya mencakup produksi embrio secara *in vitro* baik menggunakan teknologi ICSI ataupun dengan fertilisasi secara konvensional. Dalam perkembangannya, pusat-pusat kesehatan infertilitas ini terus meningkatkan pelayanan dalam menunjang keberhasilan program bayi tabung. Banyak teknologi-teknologi yang dikembangkan diantaranya penggunaan teknologi AH, *intracytoplasmic morphologically selected sperm injection* dan *preimplantation genetic diagnosis*.

Teknologi AH ditawarkan untuk membantu meningkatkan keberhasilan implantasi setelah proses transfer embrio. Akan tetapi, hingga saat ini sulit menemukan laporan-laporan ilmiah yang mengemukakan keberhasilan aplikasi AH di Indonesia. Selain itu juga belum ditemukan laporan penggunaan metode AH yang digunakan dalam aplikasi penggunaannya pada program bayi tabung. Jika merujuk pada nilai alat yang digunakan dalam metode pelaksanaan AH maka penggunaan laser dalam aplikasi AH tentu akan meningkatkan biaya pada program bayi tabung. Karena pihak klinik tentu membutuhkan biaya yang besar untuk melengkapi fasilitas klinik dengan alat laser AH. Tentunya hal ini akan berimbas pada peningkatan biaya program bayi tabung yang saat ini masih belum dapat dijangkau seluruh lapisan masyarakat Indonesia. Oleh karena itu, perlu dilakukan kajian metode aplikasi AH yang tepat digunakan di Indonesia terkait tingkat keberhasilan, keamanan embrio dan biaya program bayi tabung di Indonesia. Agar program ini tetap dapat dijangkau untuk seluruh lapisan masyarakat Indonesia.

Hingga saat ini, belum ditemukan laporan penggunaan AH yang dimanfaatkan untuk meningkatkan keberhasilan kebuntingan pada ternak di Indonesia. Penggunaan hewan masih hanya sebatas sebagai hewan model pada penelitian-penelitian yang dilakukan. Hal ini kemungkinan disebabkan oleh aplikasi AH memerlukan fasilitas dan peralatan laboratorium yang memadai untuk mendukung

keberhasilannya. Riset di Jepang dilakukan untuk memanfaatkan teknologi AH dengan tujuan meningkatkan nilai guna embrio sapi donor dengan kualitas yang tidak baik agar tetap dapat dimanfaatkan dan tidak terbuang sia-sia dan turut dirancang pula mikroskop stereo yang dapat berfungsi sebagai mikromanipulator dalam aplikasi AH sehingga memudahkan dan lebih praktis digunakan di peternakan (Taniyama et al. 2011).

Indonesia memiliki potensi yang cukup besar dalam mewujudkan program swasembada daging nasional. Salah satunya melalui program produksi embrio secara massal secara *in vitro*. Program ini dikerjakan oleh Balai Embrio Ternak (BET) Cipelang, Bogor. Setiap tahun, BET Cipelang mampu memproduksi ribuan embrio baik secara *in vivo* maupun *in vitro*. Pada tahun 2015, BET Cipelang menghasilkan 1.805 embrio dengan berbagai variasi kualitas embrio yang dihasilkan (Balai Embrio Ternak 2015). Dengan potensi yang dimiliki oleh Indonesia, tentunya teknologi AH menjadi salah satu peluang untuk meningkatkan keberhasilan kebuntingan program embrio transfer yang ada di Indonesia. Namun tentunya perlu pula ditunjang dengan fasilitas yang memadai untuk pelaksanaan aplikasi ini terutama kemudahan pelaksanaan di lapangan. Oleh karena itu, perlu terus dilakukan riset dan kajian agar hal tersebut dapat terlaksana.

## KESIMPULAN

Aplikasi teknik AH baik menggunakan metode enzimatis, kimiawi, mekanis dan sinar laser terhadap embrio hasil fertilisasi *in vitro* dapat membantu meningkatkan keberhasilan implantasi embrio. Akan tetapi, aplikasi teknologi ini direkomendasikan hanya pada resepien dengan kasus tertentu yaitu umur, jumlah kegagalan keberhasilan program IVF, kualitas embrio yang tidak baik, embrio beku dan ketebalan zona pelusida >13  $\mu\text{m}$ . Masing-masing metode AH memiliki kelebihan dan kekurangan pada penggunaannya. Namun, penggunaan teknik laser dengan berbagai jenis sinar yang berbeda dapat menjadi alternatif pilihan untuk digunakan pada aplikasi AH. Laser *assisted hatching* menjadi alat yang ideal untuk ketepatan dan akurasi posisi, waktu pengerjaan yang cepat sehingga dapat mencegah embrio terpapar lingkungan yang kurang ideal dan dapat mengurangi paparan zat kimia yang berbahaya pada embrio.

## DAFTAR PUSTAKA

- Antinori S, Selman HA, Caffa B. 1996. Zona opening in human embryos using a non-contact UV laser for assisted hatching in patients with poor prognosis of pregnancy. *Hum Reprod.* 11:2488-2492.
- Aston KI, Peterson CM, Carrell DT. 2008. Monozygotic twinning associated with assisted reproductive technologies: A review. *Reproduction.* 136:377-386.
- Balaban B, Urman B, Yakin K, Isiklar A. 2006. Laser-assisted hatching increases pregnancy and implantation rates in cryopreserved embryos that were allowed to cleave *in vitro* after thawing: A prospective randomized study. *Hum Reprod.* 21:2136-2140.
- Balai Embrio Ternak. 2015. Laporan tahunan Balai Embrio Ternak Cipelang. Bogor (Indonesia): Balai Embrio Ternak.
- Baruffi RLR, Mauri AL, Petersen CG, Ferreire RC, Coelho J, Franco JG. 2000. Zone thinning with non contact diode laser in patients age  $\leq 37$  years with no previous failure of implantation: A prospective randomized study. *J Assist Reprod Genet.* 17:557-560.
- Blake DA, Forsberg AS, Johansson BR, Wikland M. 2001. Laser zona pellucida thinning - An alternative approach to assisted hatching. *Hum Reprod.* 16:1959-1964.
- Bó GA, Mapletoft RJ. 2013. Evaluation and classification of bovine embryos. *Anim Reprod.* 10:344-348.
- Brevini TAL, Georgia P. 2013. Gametogenesis, early embryo development and stem cell derivation. Milan (Italy): Springer.
- Brezina P, Zhao Y. 2011. Laser assisted zona hatching: What is the evidence to justify its use? *Middle East Fertil Soc J.* 16:107-113.
- Cohen J, Elsner C, Kort H. 1990. Impairment of the hatching process following IVF in the human and improvement of implantation by assisted hatching using micromanipulation. *Hum Reprod.* 5:7-13.
- Cohen J, Feldberg D. 1991. Effects of the size and number of zona pellucida openings on hatching and trophoblast outgrowth in the mouse embryo. *Mol Reprod Dev.* 30:70-78.
- Feng HL, Hershlag A, Scholl GM, Cohen MA. 2009. A retrospective study comparing three different assisted hatching techniques. *Fertil Steril.* 91:1323-1325.
- Fong CY, Bongso A, Ng SC, Kumar J, Trounson A, Ratman S. 1998. Blastocyst transfer after enzymatic treatment of the zona pellucida: improving *in vitro* fertilization and understanding implantation. *Hum Reprod.* 13:2926-2932.
- Frydman N, Madoux S, Hesters L, Duvenoy C, Feyereisen E, Le Du A. 2006. A randomized double-blind controlled study on the efficacy of laser zona pellucida thinning on live birth in case of advanced female age. *Hum Reprod.* 21:2131-2135.
- Gabrielsen A, Agerholm I, Toft B, Hald F, Petersen K, Aagaard J, Feldinger B, Lindenberg S, Fedder J. 2004. Assisted hatching improves implantation rates on cryopreserved-thawed embryos. A randomized prospective study. *Hum Reprod.* 19:2258-2262.

- Geber S, Bossi R, Lisboa CB, Valle M, Sampaio M. 2011. Laser confers less embryo exposure than acid tyrode for embryo biopsy in preimplantation genetic diagnosis cycles: A randomized study. *Reprod Biol Endocrinol.* 9:58-62.
- Ghannadi A, Kazerooni M, Jamalzadeh F, Amiri S, Rostami P, Absalan F. 2011. The effects of laser assisted hatching on pregnancy rates. *Iran J Reprod Med.* 9:95-98.
- Goldberg JM, Tommaso F, Marjan A. 2007. *In vitro* fertilization up date. *Cleve Clin J Med.* 74:329-339.
- Goudet G, Mugnier S, Callebaut I, Monget P. 2008. Phylogenetic analysis and identification of pseudogenes reveal a progressive loss of zona pellucida genes during evolution of vertebrates. *Biol Reprod.* 78:796-806.
- Hammadeh ME, Fischer-Hammadeh C, Ali KR. 2011. Assisted hatching in assisted reproduction a state of the art. *Assist Hatch Assist Reprod.* 28:119-128.
- Hartshorn C, Anshelevich A, Wangh LJ. 2005. Laser zona drilling does not induce hsp70i transcription in blastomeres of eight-cell mouse embryos. *Fertil Steril.* 84:1547-1550.
- Hasler JE. 2001. Factor affecting froen and fresh embryo transfer pregnancy rates in cattle. *Theriogenology.* 56: 1401-1415.
- Hershlag A, Paine T, Cooper GW, Scholl GM, Rawlinson K, Kvapil G. 1999. Monozygotic twinning associated with mechanical assisted hatching. *Fertil Steril.* 71:144-146.
- Hiraoka K, Megumi F, Kaori H, Toshitaka H, Tomoto M, Masayuki K, Kazuo K. 2008. Effect of the size of zona pellucida opening by laser assisted hatching on clinical outcome of frozen cleave embryo that were cultures to blastocyst after thawing in women with multiple implantation failure of embryo transfer: A retrospective study. *J Asisted Reprod Genet.* 25:129-135.
- Huisman GJ, Fauser BC, Eijkemans MJ, Pieters MH. 2000. Implantation rates after *in vitro* fertilization and transfer of maximum of two embryos that have undergone three to five days in culture. *Fertile Steril.* 73:117-122.
- Jones AE, Wright G, Kort HI. 2006. Comparison of laser-assisted hatching and acidified tyrode's hatching by evaluation of blastocyst development rates in sibling embryos: A prospective randomized trial. *Fertil Steril.* 85:487-491.
- Kim HJ, Kim CH, Lee SM, Choe SA, Lee JY, Jee BC, Hwang D, Kim KC. 2012. Outcomes of preimplantation genetic diagnosis using either zona drilling with acidified tyrode's solution or partial zona dissection. *Clin Exp Reprod Med.* 39:118-124.
- Koot YEM, Teklenburg G, Salker MS, Brosens JJ, Macklon NS. 2012. Molecular aspects of implantation failure. *Biochim Biophys Acta - Mol Basis Dis.* 1822:1943-1950.
- Kovačić B, Vlajsavljević V. 2012. Importance of blastocyst morphology in selection for transfer, advances in embryo transfer. In: Wu B, editor. Rijeka (Croatia): InTech.
- Lanzendorf SE, Ratts VS, Moley KH, Goldstein JS, Dahan MH, Odem RR. 2007. A randomized, prospective study comparing laser-assisted hatching and assisted hatching using acidified medium. *Fertil Steril.* 87:1450-1457.
- Lim HJ, Dey SK. 2009. HB-EGF: A unique mediator of embryo-uterine interactions during implantation. *Exp Cell Res.* 315:619-626.
- Lyu QF, Wu LQ, Li YP, Pan Q, Liu DE, Xia DE, Liang DS, Cai F, Long ZG, Dai HP, Xia JH. 2005. An improved mechanical technique for assisted hatching. *Hum Reprod.* 20:1619-1623.
- Makrakis E, Angeli I, Agapitou K, Pappas K, Dafereras A, Pantos K. 2006. Laser versus mechanical assisted hatching: A prospective study of clinical outcomes. *Fertil Steril.* 86:1596-1600.
- Montag M, Schimming T, Köster M, Zhou C, Dorn C, Rösing B, van der Ven H, Ven der Ven K. 2008. Oocyte zona birefringence intensity is associated with embryonic implantation potential in ICSI cycles. *Reprod Biomed Online.* 16:239-244.
- Moreira Da Silva F, Metelo R. 2005. Relation between physical properties of the zona pellucida and viability of bovine embryos after slow-freezing and vitrification. *Reprod Domest Anim.* 40:205-209.
- Nakayama T, Fujiwara H, Tastumi K, Fujita K, Higuchi T, Mori T. 1998. A new assisted hatching technique using a piezo-micromanipulator. *Fertil Steril.* 69:784-788.
- Nara M, Yonezawa N, Shimada T, Takahashi K, Tanokura M, Yumoto F, Nakagawa H, Ohashi K, Hamano S, Nakano M. 2006. Fourier transform infrared spectroscopic analysis of the intact zona pellucida of the mammalian egg: Changes in the secondary structure of bovine zona pellucida proteins during fertilization. *Exp Biol Med.* 231:166-171.
- Nishio E, Moriwaki T, Yoshi K. 2006. Chemical removal of zona pellucida versus laser assisted hatching after repeated failures of assisted reproductive technology. *Reprod Med Biol.* 5:263-267.
- Obruca A, Strohmer H, Blaschitz A, Schonick E, Dohr G, Feichtinger W. 1997. Ultrastructural observations in human oocytes and preimplantation embryos after zona opening using anerbium-yttrium-aluminium-garnet (Er:YAG) laser. *Hum Reprod.* 12:2242-2245.
- Obruca A, Strohmer H, Sakkas D, Menezo Y, Kogosowski A, Barak Y, Feichtinger W. 1994. Fertilization and early embryology: Use of lasers in assisted fertilization and hatching. *Hum Reprod.* 9:1723-1726.

- Park SB, Kim HJ, Choi YB, Ahn KH, Lee KH, Yang JB, Yu CS, Seo BB. 2014. The effect of various assisted hatching techniques on the mouse early embryo development. *Clin Exp Reprod Med*. 41:68-74.
- Petersen CG, Mauri AL, Baruffi RL, Oliveira JBA, Massaro FC, Elder K, Franco JG. 2005. Implantation failure: Success of assisted hatching with quarter-laser zona thinning. *Reprod Bio Med*. 10:224-229.
- Prados JF, Debrock S, Lemmen JG, Agerholm I. 2012. The cleavage stage embryo. *Hum Reprod*. 27:50-71.
- Pranata S. 2009. Infertilitas di kalangan laki-laki Madura studi tentang permasalahan sosial dan konsekuensi infertilitas. *Bul Penelitian Sistem Kesehatan*. 12:393-402.
- Raheem AA, Ralph D. 2011. Male infertility: Causes and investigation. *Trend Urol Men's Heal*. 2:8-11.
- Roupa Z, Polikandrioti M, Sotiropoulou P, Faros E, Koulouri A, Wozniak G, Gourni M. 2009. Causes of infertility in women at reproductive age. *Heal Sci J*. 3:80-87.
- Sagoskin AW, Levy MJ, Tucker MJ, Richter KS, Widra EA. 2007. Laser assisted hatching in good prognosis patients undergoing *in vitro* fertilization-embryo transfer: A randomized controlled trial. *Fertil Steril*. 87:283-287.
- Shi W, Xu B, Wu LM, Jin RT, Luan HB, Luo LH, Zhu Q, Johansson L, Liu YS, Tong XH. 2014. Oocytes with a dark zona pellucida demonstrate lower fertilization, implantation and clinical pregnancy rates in IVF/ICSI cycles. *PLoS One*. 9: e89409.
- Sifer C, Sellami A, Poncelet C, Kulski P, Martin-Pont B, Bottero J, Porcher R, Cedrin-Durnerin I, Hugues JN, Wolf JP. 2006. A prospective randomized study to assess the benefit of partial zona pellucida digestion before frozen-thawed embryo transfers. *Hum Reprod*. 21:2384-2389.
- Sugimura S, Akai T, Hashiyada Y, Somfai T, Inaba Y, Hirayama M, Yamanouchi T, Matsuda H, Kobayashi S, Aikawa Y, et al. 2012. Promising system for selecting healthy *in vitro*-fertilized embryos in cattle. *PLoS One*. 7: e36627.
- Taniyama A, Watanabe Y, Nishino Y, Inoue T, Taura Y, Takagi M, Kubota C, Otoi T. 2011. Assisted hatching of poor-quality bovine embryos increases pregnancy success rate after embryo transfer. *Reprod Dev*. 57:553-556.
- Tucker MJ, Bal GD. 2009. Assisted hatching as a technique for use in human *in vitro* fertilization and embryo transfer is long overdue for careful and appropriate study. *J Clin Embryol*. 12:9-14.
- Tucker MJ, Cohen J, Massey JB, Mayer, Wiker S, Wright G. 1991. Partial zona dissection of zona pellucida of frozen thawed human embryo may enhance blastocyst hatching, implantation, and pregnancy rate. *Obs Gynecol*. 165:341-345.
- Turhan N, Pekel A, Ayrim A, Bayrak O. 2011. ICSI outcome in severely oligoasthenozoospermic patients and its relationship to prewash progressive sperm motility. *Turkish J Med Sci*. 41:995-999.
- Uzelac PS, Christensen GL, Nakajima ST. 2012. The role of *in vitro* maturation in fertility preservation. New York (US): Springer Science Business Media.
- Valojerdi MR, Eftekhari-Yazdi P, Karimian L, Ashtiani SK. 2008. Effect of laser zona pellucida opening on clinical outcome of assisted reproduction technology in patients with advanced female age, recurrent implantation failure, or frozen-thawed embryos. *Fertil Steril*. 90:84-91.
- Vanderzwalmen P, Bertin G, Debauche C, Standaert V, Bollen N, Van Roosendaal E, Vandervorst M, Schoysman R, Zech N. 2013. Vitrification of human blastocysts with the Hemi-Strawcarrier: application of assisted hatching after thawing. *Hum Reprod*. 18:1504-1511.
- Wang H, Dey SK. 2006. Roadmap to embryo implantation: clues from mouse models. *Nat Rev Genet*. 7:185-199.
- Watson AJ, Natale DR, Barcroft LC. 2004. Molecular regulation of blastocyst formation. *Anim Reprod Sci*. 83:583-592.
- Yanagida K. 2009. Recent progress in *in vitro* fertilization and intracytoplasmic sperm injection technologies in Japan. *J Japan Med Assoc*. 52:29-33.