KORELASI ANTARA PERIKSAAN DARAH SAMAR TINJA MENGGUNAKAN ANTI-HEMOGLOBIN MANUSIA DAN PENGAMATAN MIKROSKOPIS

(The Correlation Between Fecal Occult Blood Test Using Anti-Human Hemoglobin And Microscopic Examination)

Liana,* Prihatini

ABSTRACT

Test for occult blood in faeces is an important part of the early detection of colorectal cancer, gastrointestinal bleeding, and anaemia. Colorectal cancer is the second leading cause of cancer deaths in the United States. Immunochemistry method for detection of human haemoglobin in faeces has been developed. The advantages of this method are improving analytical sensitivity and specificity, also avoiding the dietary restrictions requirement, compared with benzidine test, and guaiacum test. A study was performed to correlate the result of fecal occult blood by immunochemistry method using anti-human haemoglobin and microscopic examination of red blood cells in faeces of outpatients in the Clinical Pathology Laboratory, Dr. Soetomo Hospital, Surabaya. Faeces of fifty one patients tested for fecal occult blood were examined by immunochemistry method compared with microscopic examination of red blood cells. Comparison of the two methods was done by statistical analysis, Mc Nemar test. The correlation was measured using ROC curve. The results showed a correlation between immunochemistry method and microscopic examination with average red blood cells (RBC) ≤ 2/hpf, p = 0.008; RBC ≥ 3/hpf, p = 0.289. ROC curve showed r = 0.941. In conclusion, a significant correlation between positive results of immunochemistry method and microscopic examination with average red blood cells ≥ 3/hpf. Further research using larger and more representative samples should be carried out.

Keywords: *Fecal occult blood, anti-human haemoglobin,microscopic examination*

PENDAHULUAN

Pemeriksaan darah samar di tinja memiliki peranan penting untuk mengenali (deteksi) dini keganasan usus besar, perdarahan saluran cerna, dan anemia. Angka kematian akibat keganasan usus besar cukup tinggi. Di Amerika Serikat kematian akibat keganasan usus besar menempati urutan kedua di antara penyebab kematian. Berbagai organisasi kesehatan menyarankan untuk memeriksa penyaringan keganasan usus besar. Pemeriksaan darah samar tinja termasuk salah satu pemeriksaan penyaring yang sering dikerjakan.

Guide to Clinical Preventive Service and the College of American Pathologists Laboratory Testing Strategy Task Force menyarankan pemeriksaan darah samar tinja tiap tahun sebagai standar pemeriksaan.[1] Jika diketahui ada pendarahan, disarankan memeriksa dengan endoskopi untuk mencari penyebab perdarahan. *Colonoscopy* merupakan pemeriksaan yang penting sebagai penyaring keganasan usus besar. Tetapi pemeriksaan ini bersifat invasif (*invasive*), memerlukan tenaga ahli, selain itu biayanya masih relatif mahal.[2]

Pada tahap awal penyakit, darah di dalam tinja jumlahnya masih sedikit sehingga tidak tampak secara kasat mata. Oleh karena itu pemeriksaan darah samar tinja memiliki arti penting untuk dapat mengenali dan mengobati penyakit di tahap awal.[3]

Sampai saat ini belum ada pemeriksaan darah samar tinja yang memiliki sensitivitas dan spesifisitas 100%, untuk menentukan perdarahan.[4] Ada beberapa metode pemeriksaan darah samar tinja antara lain menggunakan tes *benzidine*, *guaiac test*, imunokimia. Dari beberapa penelitian disimpulkan bahwa pemeriksaan *benzidine* dikatakan sensitif tetapi kurang spesifik, karena banyak dipengaruhi oleh diet dan obat yang diminum oleh penderita.[4,5] Di samping itu *benzidine* memiliki efek karsinogenik dan mulai banyak ditinggalkan. *Guaiacum test* masih banyak memberi hasil positif palsu, dan dipengaruhi oleh diet, obat, dan *non-human hemoglobin*, rehidrasi.[6,7]

Metode imunokimia menggunakan antibodi terhadap hemoglobin manusia. Metode, ini dapat dipakai sebagai metode alternatif karena cara pemeriksaannya praktis, cepat, tidak memerlukan persiapan diet sebelum pemeriksaan, dan *non-invasive*.[6]

* *Bagian Patologi Klinik, Fakultas Kedokteran Universitas Airlangga, RSU Dr. Soetomo Surabaya,email: pdspatklin_sby@telkom.net*

Tujuan penelitian memperoleh informasi hasil pemeriksaan darah samar tinja dengan metode imunokimia menggunakan anti-hemoglobin manusia dan pengamatan mikroskopis sel darah merah pada tinja di lnstalasi Patologi Klinik, RSU Dr. Soetomo, Surabaya.

Apakah pemeriksaan darah samar metode imunokimia menggunakan anti-hemoglobin manusia berkorelasi dengan pengamatan mikroskopis sel darah merah pada tinja.

BAHAN DAN METODE

Penelitian ini merupakan penelitian amatan potong silang (*observasional cross sectional*). Sampel tinja diperiksa dengan dua metode yaitu imunokimia dan pemeriksaan mikroskop sel darah merah tinja, dan hasil kedua metode tersebut kemudian dibandingkan.

Sampel tinja penderita diperiksa dengan pemeriksaan darah samar tinja di Instalasi Patologi Klinik, RSU Dr. Soetomo, Surabaya, dikumpulkan dari bulan Januari 2006 sampai dengan Agustus 2006, sampai jumlah sampel terpenuhi.

Kriteria Penerimaan Sampel: Sampel tinja diperiksa dalam waktu kurang dari 3 jam dari saat mengumpulkan sampel. Penderita tidak harus diet sebelum pemeriksaan.

Kriteria Penolakan Sampel: sampel tinja tercampur dengan air kemih (*urine*), warna tinja tampak kehitaman atau tampak darah di tinja, penderita sedang menstruasi, atau sedang mendapat terapi supositoria.

Bahan: Wadah penampung tinja yang bersih, kering, bermulut lebar, dan tertutup rapat; *Amgenix OnSight rapid strip test* dan larutan dapar; mikroskop; larutan eosin; gelas obyek dan gelas penutup.

Pembuatan preparat basah dengan pewarnaan eosin: 1) disiapkan kaca obyek yang dilabel dengan tanda pengenal (identitas) penderita, 2) larutan eosin diteteskan 1 tetes di gelas obyek, 3) spesimen tinja diambil dengan menggunakan lidi, kemudian dioleskan tipis di kaca obyek dan dicampur dengan larutan eosin, 4) setelah itu kaca obyek ditutup dengan kaca penutup. Hindari terbentuknya gelembung udara saat menutup dengan kaca pelindung.

Pengamatan preparat basah di bawah mikroskop: 1) preparat basah yang telah dibuat segera diamati di bawah mikroskop. Pengamatan dimulai dengan lensa obyektif 10× ke seluruh lapangan pandang. Pencahayaan diatur sehingga objek yang diamati tampak sambil menggerakkan mikrometer, 2) pengamatan dengan lensa obyektif 40× untuk menunjukkan elemen yang tampak. Sel darah merah yang tampak dihitung dengan lapangan pandang yang berbeda. Sel darah merah tampak sebagai bentukan bulat, lebih kecil dibandingkan dengan leukosit, dan tidak berinti. Sel darah merah akan lisis dengan penambahan asam acetat 10% di tepi kaca pelindung.

Pemeriksaan darah samar tinja dengan cara imunokimia: 1) reagen dan larutan dapar dikeluarkan dari lemari pendingin dan dibiarkan sejenak pada suhu ruang. Sebelum dipakai larutan dapar diperiksa terlebih dahulu apakah warna tetap jernih dan volume tidak berkurang, 2) sampel tinja diambil di 4 tempat yang berbeda dengan menggunakan batang (stik) yang terdapat di penutup botol larutan dapar, 3) batang (stik) dimasukkan ke botol plastik berisi larutan dapar dan dikocok sampai tinja tercampur dengan larutan dapar, 4) ujung penutup tabung plastik dipatahkan, kemudian larutan diteteskan 2 tetes di sumuran sampel (S) pada simpai uji (strip tes), 5) simpai (strip) diletakkan di tempat datar dan dibaca dalam waktu 5 menit, 6) tafsiran (Interpretasi) hasil:

Jika tidak terbentuk garis merah di area pembanding (control/C), maka hasil tidak diikutkan dalam perhitungan hasil penelitian.

Negatif: jika hanya terbentuk 1 garis merah di area pembanding (control/C),

Hasil positif: jika terbentuk 2 garis merah, yaitu di area pembanding (control/C), dan di area uji (tes/T).

HASIL DAN PEMBAHASAN

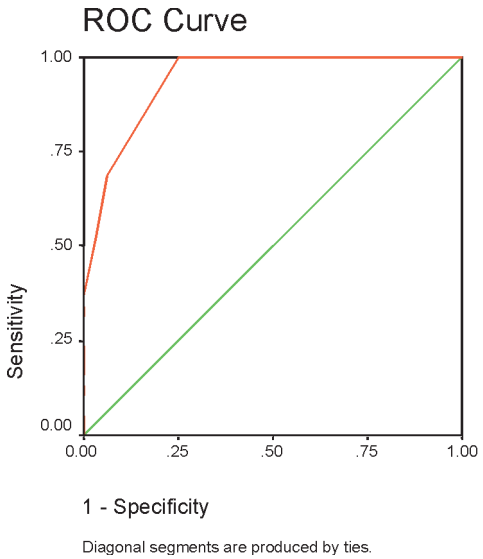
Selama bulan Januari 2006 sampai dengan September 2006, diambil 51 sampel yang memenuhi kriteria penerimaan sampel. Dengan metode imunokimia, didapatkan hasil positif 19 sampel, dan negatif 32 sampel, sedangkan dengan pengamatan mikroskopis didapatkan sel darah merah di 27 sampel, dan tidak didapatkan sel darah merah di 24 sampel. Hasil dianalisis menggunakan SPSS ver 11,0. Korelasi diukur menggunakan kurva ROC (Gambar 1). Perbedaan hasil kedua metode dibandingkan dengan *Mc Nemar test*, sedangkan kesesuaian hasil dibandingkan dengan kesepakatan pengukuran Kappa (*measure of agreement Kappa*).

Dari kurva ROC didapatkan r = 0,941. Dengan *Mc. Nemar test* didapatkan perbedaan yang bermakna antara hasil pemeriksaan imunokimia dibandingkan dengan rerata jumlah sel darah merah ≤ 2/lp, p = 0,008; sedangkan dengan rerata sel darah merah ≥ 3/lp, p = 0,289 (tidak bermakna). Didapatkan kesesuaian hasil antar kedua metode sebesar 84,3%. Didapatkan sensitivitas 68,4%, spesifisitas 93,8%, nilai ramal positif 86,7%, dan nilai ramal negatif 83,3%.

Tabel 1. Kesesuaian hasil pemeriksaan metode imunokimia dan pengamatan mikroskopis sel darah merah pada tinja

Mikroskopis Rerata eritrosit/lp	*Imunokimia*		*Uji stastistik*		*Kesesuaian (%)*	*Sens (%)*	*Spes (%)*	*NRP (%)*	*NRN (%)*
	Positif	**Negatif**	**Mc. Nemar (nilai p)**	**Kappa (nilai p)**					
≥2	19	8	0,008	0,0001	84,3	100	75	70,4	100
<2	0	24							
≥3	13	2	0,289	0,0001	84,3	68,4	93,8	86,7	83,3
<3	6	30							

Keterangan: Sens = sensitivitas; Spes = spesifisitas; NRP = Nilai Ramal Positif; NRN = Nilai ramal negatif



Gambar 1. Kurva ROC (Korelasi pemeriksaan imunokimia dan pengamatan mikroskopis)

Semua sampel dengan rerata sel darah merah ≥ 5/lp, didapatkan hasil yang positif dengan metode imunokromatografi (10 sampel), sedangkan semua sampel yang tidak ditemukan sel darah merah pada pengamatan mikroskopis, didapatkan hasil yang negatif dengan metode imunokimia.

Metode imunokimia secara teoritis dikatakan spesifik untuk mengenali perdarahan usus bagian bawah karena darah hanya sebagian kecil yang mengalami kemunduran (degradasi) selama peralihan (transit). Metode imunokimia menggunakan antibodi terhadap epitop globin manusia, dan dapat mengenali perdarahan kolon < 0,3 ml, dan tidak dapat mengenali perdarahan saluran cerna bagian atas jika dalam jumlah kecil. Keterbatasan metode ini adalah jika antigenitas globin hilang pada suhu ruangan.[4,5]

Pemeriksaan darah samar pada tinja secara kualitatif dengan asas imunokimia yaitu menentukan kadar kekebalan dua sisi berlapis (*two site sandwich immunoassay*) untuk mengenali hemoglobin manusia dalam tinja, tidak dipengaruhi oleh hemoglobin hewan (ayam, babi, *bovine*, kambing, kelinci), *horseradish peroxidase*, obat pada kadar tertentu (parasetamol, *acetylsalicylic acid*, *ampicillin*, vitamin C, *atropine, caffeine*).[8]

Pada penelitian ini sampel diperoleh dari penderita yang sebelum pemeriksaan tidak diet. Dari 24 sampel yang tidak didapatkan eritrosit pada pengamatan mikroskopis, semua memberi hasil negatif dengan metode imunokimia. Hal ini menunjukkan bahwa dengan metode imunokimia memiliki spesifisitas yang baik dan kurang dipengaruhi diet penderita.

Pada keadaan normal, 0,5–1,5 ml darah terbuang dalam tinja, yaitu setara dengan 2 mg hemoglobin per gram tinja.[2] Jika didapatkan > 2 mg hemoglobin/gram tinja, merupakan tanda patologis. Kuantitas heme pada tinja bergantung ukuran dan letak sumber perdarahan.[4] Kadar hemoglobin terendah yang dapat diketahui oleh *Amgenix OnSight rapid test* adalah 200μg/l suspensi tinja dalam 5 menit, atau setara dengan 100–200 μg hemoglobin/gram tinja.

Pada penelitian ini didapatkan perbedaan yang bermakna antara hasil imunokimia yang positif dengan rerata sel darah merah ≤ 2/lp. Hal ini mungkin disebabkan kadar hemoglobin pada sampel <100–200 μg hemoglobin/gram tinja atau karena proses pencampuran tinja dalam larutan dapar yang kurang sempurna sehingga memberi hasil negatif palsu.

Di 2 sampel dengan rerata eritrosit ≥ 3/lp, didapatkan hasil pemeriksaan imunokimia yang negatif. Hal ini mungkin disebabkan hemoglobin dalam tinja tersebut kehilangan efek antigenitasnya atau pencampuran tinja dan larutan dapar yang tidak sempurna.[6,9]

SIMPULAN DAN SARAN

Didapatkan korelasi yang bermakna antara hasil pemeriksaan metode imunokimia yang positif dan pengamatan mikroskopis yang positif dengan rata-rata jumlah sel darah merah ≥ 3/lp.

Penelitian ini merupakan penelitian pendahuluan dengan jumlah sampel yang kecil, sehingga masih diperlukan banyak perbaikan untuk penelitian selanjutnya antara lain jumlah sampel yang lebih banyak dan lebih mewakili (*representative*), serta menambah parameter yang diteliti. Kemampuan pemeriksa untuk mengamati, menunjukkan (mengidentifikasi), dan menghitung sel darah merah masih perlu ditingkatkan dengan mengikuti pelatihan ataupun lokakarya.

UCAPAN TERIMA KASIH

Ucapan terima kasih yang sebesar-besarnya peneliti ucapkan kepada: PT. UKM (Usaha Karyatama Mandiri), sebagai penyedia reagen penelitian;

DAFTAR PUSTAKA

1. Heisig DG, Gregory A, Threatte, Hendry JB. Laboratory Diagnosis of Gastrointestinal and Pancreatic Disorders. In: Hendry JB, editor. Clinical Diagnosis and Management by Laboratory Methods, 20th ed. Philadelphia, WB Saunders Company, 2001; 462–76.
2. Donald E, Nease Jr, Elena Stoffel, Kim Turgeon, Mack T Ruffin. Colorectal Cancer Screening. Clinic in Family Practice, 2004; 6(3): 603–707.
3. Fischbach FT, Dunning MB. Stool Studies. In: A Manual of Laboratory and Diagnostic Tests, 7th ed. Philadelphia, Lippicott Williams and Wilkins, 2004; 269–78.
4. Don C Rockey. Occult Gastrointestinal Bleeding. Gastroenterol Clin N Am 2005; 34: 699–718.
5. Beg M, Singh M, Saraswat MK, Rewari BB. Occult Gastrointestinal Bleeding: Detection, Interpretation and Evaluation. JIACM, 2002; 3(2): 153–8.
6. Margaret A Piper. Immunochemical versus Guaiac Fecal Occult Blood Tests. Blue Cross and Blue Shield Association 2004; 19(5): 1–27.
7. Wong WM, Cheung KL, Tong TSM, Rozen P, Young GP. A Sensitive Guaiac Faecal Occult Blood Test is Less Useful Than an Immunochemical Test for Colorectal Cancer Screening in: A Chinese Population. Aliment Pharmacol Ther, 2003; 18: 941–6.
8. Nakazato M, Hiro-o Yamano, Hiro-o Matsushita, Kentaro Sato, Kazuhiko Fujita. Immunologic Fecal Occult Blood Test for Colorectal Cancer Screening. JMAJ, 2006; 49(5): 203–7.
9. James E Allison. Colon Cancer Screening Guidelines 2005. The Fecal Occult Blood Test Option Has Become a Better Fecal Immunochemical Tests. Gastro-enterology 2005; 129(2): 745–8.