

Hubungan Ekspresi Calretinin dan Choline Transporter dengan Keberadaan Sel Ganglion dan Serabut Saraf dalam Diagnosis Penyakit Hirschsprung di RSUP Dr. M. Djamil Padang Tahun 2021-2022

Dini Kusumardani^{1*}, Noza Hilbertina², Tofrizal Tofrizal³, Aswiyanti Asri⁴, Budi Pratama Arnofyan⁵, Husna Yetti⁶

¹Program Studi Patologi Anatomi, Fakultas Kedokteran Universitas Andalas, Padang, Indonesia

E-mail: dinikoer@gmail.com

*Corresponding Author

^{2,3,4} Departemen Patologi Anatomi, Fakultas Kedokteran, Universitas Andalas, Padang, Indonesia

⁵ Departemen Bedah Anak, Fakultas Kedokteran, Universitas Andalas, Padang, Indonesia

⁶ Departemen Ilmu Kesehatan Masyarakat, Fakultas Kedokteran, Universitas Andalas, Padang, Indonesia

Abstrak

Latar Belakang: Penyakit Hirschsprung merupakan kelainan bawaan yang ditandai dengan tidak adanya sel ganglion di lapisan submukosa atau muskularis propria dari kolon distal dan rektum. Prevalensi kejadiannya 1:5000 kelahiran hidup di populasi umum. Diagnosis pasti penyakit Hirschsprung adalah dengan pemeriksaan histopatologi untuk menentukan adanya sel ganglion dan serabut saraf, tetapi pada sampel jaringan dengan lapisan submukosa yang tidak adekuat dapat sulit untuk menentukan sel ganglion dan serabut saraf. Untuk mengatasi masalah ini dapat dilakukan pemeriksaan imunohistokimia Calretinin dan Choline Transporter. Calretinin, merupakan protein pengikat kalsium yang terlibat dalam pensinyalan kalsium. Calretinin tidak diekspresikan pada segmen aganglionik dan bersifat imunopositif pada sel ganglion atau serabut saraf kolon normal. Choline Transporter merupakan penanda alternatif untuk saraf kolinergik yang efektif dalam mengidentifikasi kasus penyakit Hirschsprung dan secara kualitatif mirip dengan Asetilkolinesterase. **Tujuan:** penelitian ini bertujuan untuk mengetahui hubungan Calretinin dengan keberadaan sel ganglion dan Choline Transporter dengan keberadaan serabut saraf dalam menegakkan diagnosis penyakit Hirschsprung. **Metode:** Penelitian ini merupakan penelitian *cross sectional* dengan sampel sebanyak 70 kasus penyakit Hirschsprung yang telah didiagnosis di Laboratorium Patologi Anatomi RSUP Dr. M. Djamil Padang 2021-2022. Sampel diperoleh secara *simple random sampling* dari blok paraffin. Dilakukan penilaian ulang pada slaid untuk menilai gambaran histopatologis. Ekspresi Calretinin dan Choline Transporter dilihat dengan pemeriksaan imunohistokimia. Untuk mengetahui korelasi dilakukan analisis statistik bivariat menggunakan uji *chi-square* dengan tingkat kemaknaan $p < 0,05$. **Hasil:** Dari 70 kasus, didapatkan ekspresi Calretinin negatif pada 28 kasus (80%) dan memiliki hubungan yang bermakna dengan keberadaan sel ganglion ($p = 0,003$). Didapatkan ekspresi Choline Transporter positif pada 29 kasus (82,86%) dan memiliki hubungan yang bermakna dengan keberadaan serabut saraf ($p = 0,000$). **Kesimpulan:** Penelitian ini menyimpulkan bahwa terdapat hubungan yang bermakna antara ekspresi Calretinin dengan keberadaan sel ganglion dan ekspresi Choline Transporter berhubungan dengan serabut saraf.

Kata Kunci: ekspresi Calretinin, ekspresi Choline Transporter, penyakit Hirschsprung, sel ganglion, serabut saraf

Abstract

Background: Hirschsprung's disease is a congenital disorder characterized by the absence of ganglion cells in the submucosa or muscularis propria layer of the distal colon and rectum. The prevalence is 1:5000 live births

*in the general population. The definitive diagnosis of Hirschsprung's disease is by histopathological examination to determine the presence of ganglion cells and nerve fibers, but in tissue samples with an inadequate submucosal layer it can be difficult to determine ganglion cells and nerve fibers. To overcome this problem, Calretinin and Choline Transporter immunohistochemical examination can be carried out. Calretinin, is a calcium binding protein involved in calcium signaling. Calretinin is not expressed in aganglionic segments and is immunopositive in ganglion cells or normal colonic nerve fibers. Choline Transporter is an alternative marker for cholinergic neurons that is effective in identifying cases of Hirschsprung's disease and is qualitatively similar to Acetylcholinesterase. **Aims:** The aim of this study was to determine the correlation between Calretinin and the presence of ganglion cells and the correlation between Choline Transporter and the presence of nerve fibers in establishing a diagnosis of Hirschsprung's disease. **Method:** This research was a cross sectional study with a sample of 70 cases of Hirschsprung's disease that had been diagnosed at the Anatomical Pathology Laboratory of Dr. M. Djamil Hospital Padang in 2021-2022. Samples were obtained by simple random sampling from paraffin blocks. Slaid was re-evaluated to asses the histopathological features. Expression of Calretinin and Choline Transporter were determined by immunohistochemical staining. Chi-square test was used to determine the correlation, with a significance level of $p < 0.05$. **Result:** Of the 70 cases, Calretinin expression was negative in 28 cases (80%) and had a significant correlation with the presence of ganglion cells ($p = 0.003$). Choline Transporter expression was positive in 29 cases (82.86%) and had a significant correlation with the presence of nerve fibers ($p = 0.000$). **Conclusion:** This study concludes that there is a significant relationship between Calretinin expression and the presence of ganglion cells and Choline Transporter expression is related to nerve fibers.*

Keywords: *Calretinin expression, Choline Transporter expression, Hirschsprung's disease, ganglion cells, nerve fibers*

I. PENDAHULUAN

Obstruksi usus neonatal adalah keadaan darurat bedah dan terjadi sekitar 1 dari 2.000 kelahiran hidup. Penyebab obstruksi beragam dan beberapa etiologi yang mendasarinya belum dijelaskan dengan baik. Beberapa temuan dari obstruksi usus neonatal dapat dideteksi sebelum lahir pada pencitraan ultrasonografi (USG). Beberapa kasus obstruksi usus neonatal yang sering terjadi, yaitu penyakit Hirschsprung, atresia duodenum, malrotasi usus, intususepsi, atresia usus, ileus mekonium, imaturitas fungsional usus besar, dan malformasi anorektal.¹ Penyakit Hirschsprung menyumbang sekitar 20% dari obstruksi usus neonatal ini.²

Penyakit Hirschsprung merupakan kelainan bawaan yang ditandai dengan tidak adanya sel ganglion di lapisan submukosa atau muskularis propria dari kolon distal dan rektum. Prevalensi kejadiannya 1:5000 kelahiran hidup di populasi umum.³ Kejadian kasus ini di Eropa 1,09 kasus per 10.000 kelahiran hidup dan populasi Asia memiliki angka kejadian 2,8 per 10.000 kelahiran hidup, sementara prevalensi di Indonesia 3,1 kasus per 10.000 kelahiran hidup.^{4,5}

Insiden pada laki-laki lebih sering daripada perempuan dengan rasio 4:1.^{6,7,8} Dalam beberapa kasus, pasien asimtomatik sampai remaja dan pubertas serta 15% kasus tetap tidak terdiagnosis sampai usia tersebut.⁹

Fakhry *et al.* 2019 melaporkan usia rata-rata diagnosis penyakit Hirschsprung adalah 3 hari–2 tahun dengan perbandingan laki-laki dengan perempuan 3:1.¹⁰ Sementara Ceylan *et al.* 2020 melaporkan usia rata-rata diagnosis penyakit Hirschsprung adalah 14 bulan dengan perbandingan laki-laki dengan perempuan 3:1.¹¹

Penyakit Hirschsprung umumnya ditandai dengan keterlambatan keluarnya mekonium, distensi abdomen, vomitus dan/atau

konstipasi kronis pada neonatus. Palissei *et al.* pernah melaporkan 91 kasus pasien Hirschsprung pada kelompok usia neonatus 41,38% dengan riwayat keterlambatan keluarnya mekonium, 31,03 % dengan distensi abdomen dan 27,58% dengan vomitus. Sementara pada kelompok usia 1-5 tahun 47,27% dengan gejala konstipasi kronis dan 40% dengan distensi abdomen.^{6,12}

Kelainan bawaan yang mendasari penyakit Hirschsprung adalah tidak adanya sel ganglion pada bagian paling distal dari saluran pencernaan. Karena kondisi aganglionosis ini, menyebabkan berkurangnya gerakan peristaltik usus yang terkena dengan hilangnya relaksasi otot polos dan terjadi konstiksi fungsional. Sekitar 80% dari pasien penyakit.¹³ Penyakit Hirschsprung memiliki tingkat kematian 20 sampai 25%, sehingga diagnosis yang cepat dan tepat wajib dilakukan. Tatalaksana bedah telah mengurangi angka kematian penyakit ini menjadi 3%.²

Diagnosis penyakit Hirschsprung didasarkan pada kombinasi gambaran klinis, radiologis dan histopatologis pada biopsi rektum yaitu, gambaran aganglionosis dan ukuran saraf yang tidak normal (hipertrofi). Dalam praktiknya, diagnosis pasti penyakit Hirschsprung untuk tatalaksana lebih lanjut, sepenuhnya berdasarkan pada hasil pemeriksaan histopatologis. Namun ada beberapa faktor yang dapat menjadi tantangan dalam analisis untuk menegakkan penyakit Hirschsprung yaitu: lokasi biopsi terlalu distal, sampel terlalu dangkal, serta teknik operasi yang umum digunakan sekarang yaitu dengan *suction rectal biopsy* yang hanya mengambil jaringan usus terbatas hingga lapisan submukosa saja. Faktor-faktor ini dapat menjadi penyebab adanya keraguan dalam menegakkan diagnosis penyakit Hirschsprung jika hanya dengan pewarnaan Hematoksin Eosin (HE).¹⁴

Untuk mengatasi keraguan tersebut, beberapa penelitian melaporkan bahwa pemeriksaan enzim histokimia Asetilkolinesterase dapat menjadi salah satu metode yang digunakan dalam menegakkan diagnosis penyakit Hirschsprung dan telah dijadikan *gold standar*, dengan sensitivitas dan spesivitasnya yang mencapai 100%.¹⁵ Tetapi, metode ini mempunyai beberapa kekurangan yaitu harus menggunakan jaringan segar atau beku dan hanya digunakan khusus untuk pemeriksaan penyakit Hirschsprung, sehingga penggunaannya masih sangat terbatas.^{16,17}

Kapur *et al.* melaporkan protein Choline Transporter, dapat digunakan sebagai penanda alternatif untuk saraf kolinergik menggantikan enzim histokimia Asetilkolinesterase dalam menegakkan diagnosis penyakit Hirschsprung. Hasil penelitian ini menunjukkan serabut saraf yang terwarnai oleh Choline Transporter sama dengan yang terwarnai oleh Asetilkolinesterase.¹⁸

Selain Choline Transporter ada beberapa penanda imunohistokimia yang dapat digunakan untuk membantu menegakkan diagnosis penyakit Hirschsprung, yaitu calretinin, S100, peripherin, NSE, synaptophysin dan chromogranin A.^{2,19} Dari beberapa penelitian terbaru, Zemheri *et al.* melaporkan pemeriksaan khususnya calretinin pada kasus penyakit Hirschsprung dengan sensitivitas 93,3 % dan spesivitas 100 %.²⁰ Penelitian lain oleh Qaiser *et al.* melaporkan sensitivitas 96 % dan spesivitas 100 %.²¹

Calretinin merupakan protein pengikat kalsium yang berperan penting dalam perkembangan dan fungsi sistem saraf pusat. Calretinin mempunyai beberapa keunggulan dalam mendiagnosis penyakit Hirschsprung yaitu, dapat mendeteksi sel ganglion pada potongan jaringan dengan jumlah sel ganglion yang sedikit, sel ganglion immatur, lapisan submukosa yang tidak optimal dan

area muskularis mukosa yang tidak terlihat. Calretinin juga mudah didapat dan sudah digunakan secara luas pada penyakit lainnya.^{22,23}

Berdasarkan uraian diatas dan dari permasalahan yang dijumpai dalam praktek sehari-hari dalam menegakkan secara pasti penyakit Hirschsprung berupa ukuran sampel yang kecil, sampel dengan lapisan submukosa dan muskularis mukosa yang tidak optimal sehingga menyulitkan untuk mengevaluasi adanya sel ganglion dan pleksus saraf yang nantinya akan mempengaruhi akurasi dalam menegakkan diagnosis penyakit Hirschsprung, maka penulis tertarik untuk meneliti hubungan ekspresi Calretinin dan Choline Transporter dengan keberadaan sel ganglion dan serabut saraf dalam diagnosis penyakit Hirschsprung.

II. BAHAN DAN METODE

Penelitian ini adalah penelitian observasional dengan desain *cross sectional*. Populasi penelitian adalah semua kasus penyakit Hirschsprung yang telah didiagnosis di laboratorium Patologi Anatomi RSUP Dr. M. Djamil Padang selama periode Januari 2021 – Desember 2022. Sampel penelitian adalah semua populasi yang mempunyai data rekam medis patologi anatomik, slaid dan blok paraffin yang lengkap. Pada 35 sampel yang diambil secara *simple random sampling* dilakukan reevaluasi slaid HE berupa gambaran gambaran histopatologi.

Blok parafin sampel penelitian dipotong ulang untuk dilakukan pewarnaan imunohistokimia dengan antibodi primer *anti* Calretinin/ 232R-14 Rabbit Antibodi Monoklonal, dilusi 1:1000 dan Choline Transporter/ ABN458 Rabbit Antibodi Poliklonal, Merck Millipore, dilusi 1:100.

Ekspresi Calretinin pada sel ganglion dan serabut saraf di lapisan submukosa, lamina propria atau muskularis mukosa yang dinilai dengan ekspresi warna coklat terpulas di inti

atau sitoplasma sel ganglion dan ekspresi warna coklat dengan pola granular atau linear pada serabut saraf. Ekspresi Choline Transporter pada serabut saraf di lapisan submukosa, lamina propria atau muskularis mukosa yang dinilai dengan ekspresi warna coklat dengan pola granular atau linear

kasus (80%) dan ekspresi Choline Transporter positif sebanyak 29 kasus (82,86%) dapat dilihat pada gambar 1

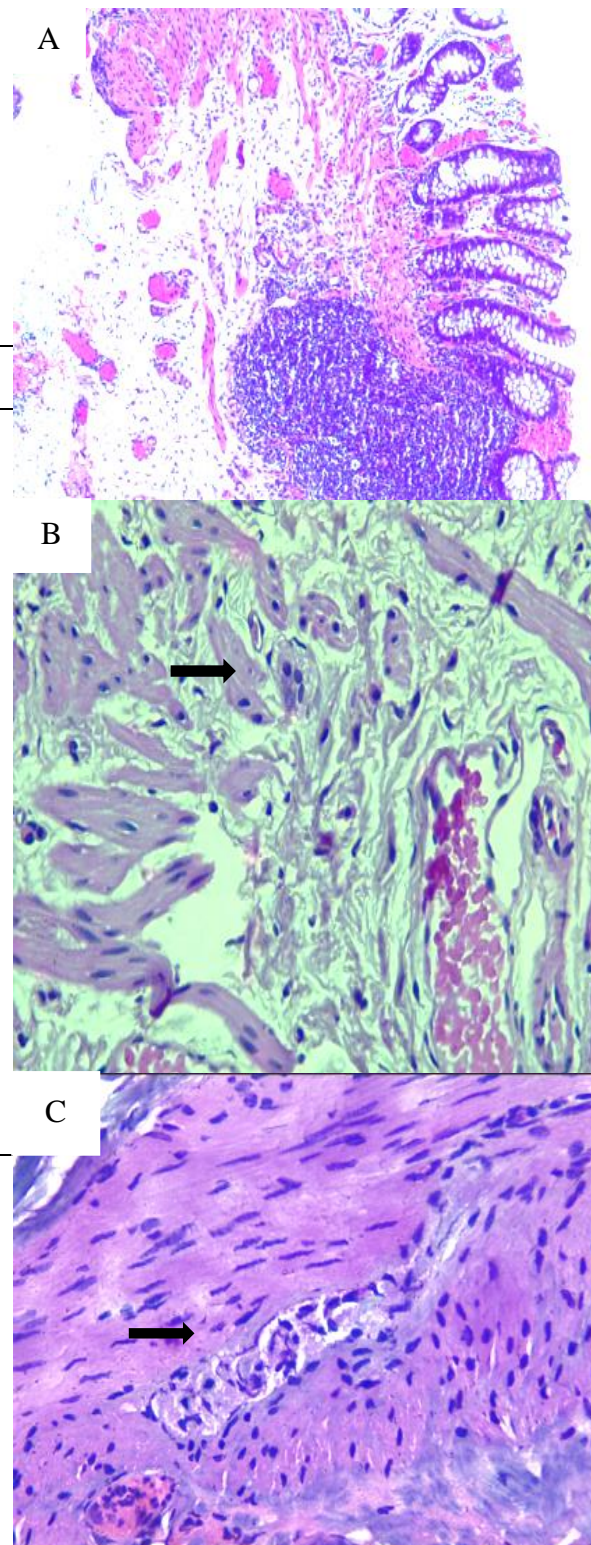
III. HASIL

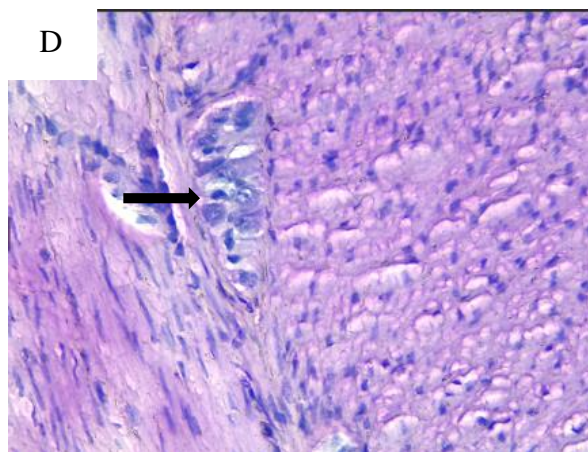
A. KARAKTERISTIK SUBJEK PENELITIAN

TABEL1. KARAKTERISTIK PENYAKIT HIRSCHSPRUNG

Variabel		f(n) =35	%
Usia (tahun)	Tahun	24	68,57%
	> 1-5 Tahun	7	20%
	> 5 Tahun	4	11,43%
Jenis Kelamin	Laki-Laki	24	68,57%
	Perempuan	11	31,43%
Cara Pengambilan Sampel	Biopsi	33	94,29%
	Reseksi	2	5,71%
Gambara Histopatologi	Sel Ganglion		
	Positif	5	14,29%
	Negatif	30	85,71%
Ekspresi Calretinin	Serabut Saraf		
	Positif	31	88,57%
	Negatif	4	11,43%
Ekspresi Choline Transporter	Positif	7	20%
	Negatif	28	80%
	Positif	29	82,86%
	Hipertrofi	3	10,34%
	Serabut Saraf	26	89,66%
	Non Hipertrofi	6	17,14%
	Negatif		

Pada tabel 1 terlihat bahwa kelompok umur dengan kasus penyakit Hirschsprung terbanyak adalah kelompok usia 0-1 tahun sebanyak 24 kasus (68,57%). Berdasarkan jenis kelamin didapatkan laki-laki lebih banyak dibandingkan perempuan sebanyak 24 kasus (68,57%). Cara pengambilan sampel terbanyak adalah biopsi sebanyak 33 kasus (94,29%). Gambaran histopatologik yang paling banyak dijumpai adalah sel ganglion negatif yaitu 30 kasus (85,71%). Pada penelitian ini paling banyak ditemukan ekspresi Calretinin negatif sebanyak 28





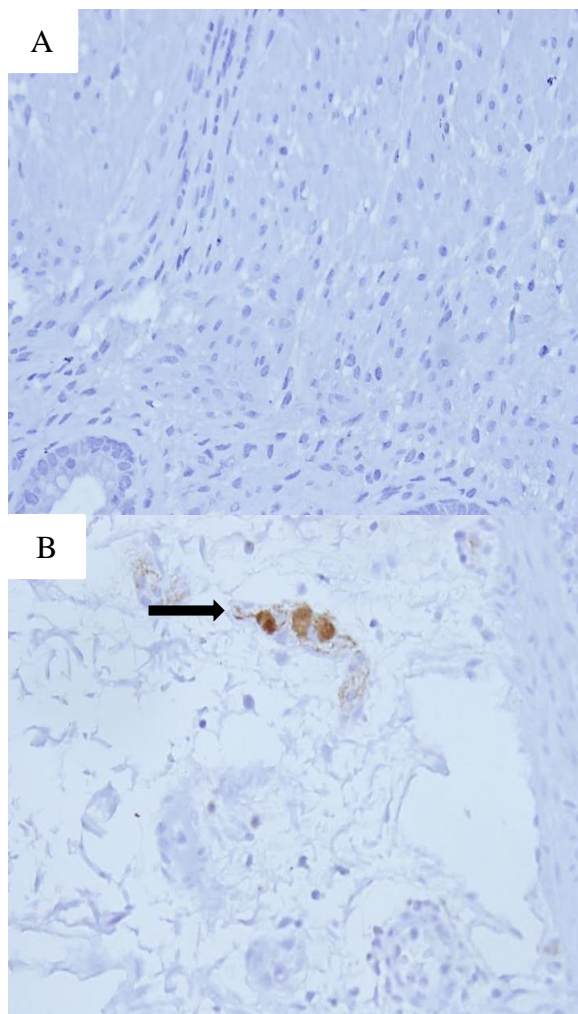
GAMBAR 1. GAMBARAN HISTOPATOLOGI PENYAKIT HIRSCHSPRUNG, A. TIDAK DITEMUKAN SEL GANGLION DAN PLEKSUS SARAF, 400X, B. DITEMUKAN SEL GANGLION DAN TIDAK DITEMUKAN PLEKSUS SARAF (TANDA PANAH), 400X, C. TIDAK DITEMUKAN SEL GANGLION DAN DITEMUKAN PLEKSUS SARAF (TANDA PANAH), 400X , D. DITEMUKAN SEL GANGLION DAN PLEKSUS SARAF (TANDA PANAH), 400X

B. HUBUNGAN EKSPRESI CALRETININ DENGAN KEBERADAAN SEL GANGLION DAN SERABUT SARAF

TABEL 2. HUBUNGAN EKSPRESI CALRETININ DENGAN KEBERADAAN SEL GANGLION DAN SERABUT SARAF

HE	Calretinin				Total		p-value
	Negatif		Positif		f	%	
	f	%	f	%			
Sel Ganglion							
Negatif	27	90	3	10	30	100	0,003
Positif	1	20	4	80	5	100	
Serabut saraf							
Negatif	3	75	1	25	4	100	1
Positif	25	80,65	6	19,35	31	100	

Tabel 2 menunjukkan bahwa pada penelitian ini ditemukan ekspresi Calretinin yang paling banyak adalah negatif sebanyak 27 kasus (90%). Secara statistik terdapat hubungan yang bermakna antara ekspresi Calretinin dengan keberadaan sel ganglion dengan nilai $p=0,003$. Gambar ekspresi Calretinin dapat dilihat pada gambar 2.



GAMBAR 2. GAMBARAN EKSPRESI CALRETININ. A. EKSPRESI CALRETININ NEGATIF. B. EKSPRESI CALRETININ POSITIF PADA SEL GANGLION (TANDA PANAH), 400X.

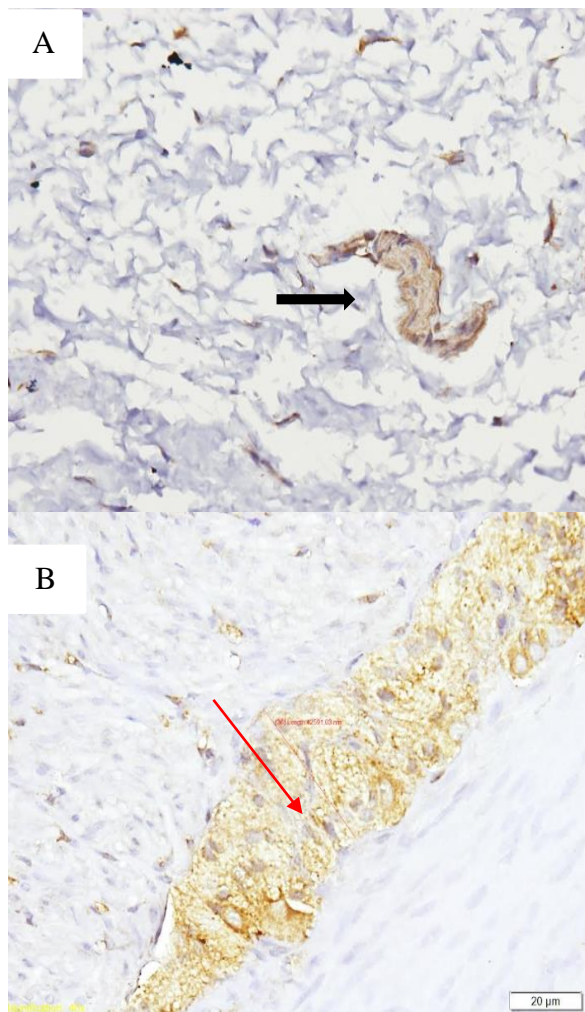
C. HUBUNGAN EKSPRESI CHOLINE TRANSPORTER DENGAN KEBERADAAN SERABUT SARAF

TABEL 3. HUBUNGAN EKSPRESI CHOLINE TRANSPORTER DENGAN KEBERADAAN SERABUT SARAF

HE (Serabut saraf)	Choline Transporter				Total		p-value
	Negatif		Positif		f	%	
	f	%	f	%			
Negatif	4	100	0	0	4	100	0,000
Positif	2	6,45	29	93,55	31	100	

Berdasarkan tabel 3, hasil analisis hubungan antara ekspresi Choline Transporter dengan keberadaan serabut saraf memperlihatkan bahwa ekspresi Choline Transporter yang

terbanyak adalah positif sebanyak 29 kasus (80%). Hasil uji Chi-square diperoleh nilai $p=0,000$ maka dapat disimpulkan bahwa terdapat hubungan bermakna antara ekspresi Choline Transporter dengan keberadaan serabut saraf. Gambar ekspresi Choline Transporter dapat dilihat pada gambar 3.



GAMBAR 3. GAMBARAN IMUNOEKSPRESI CHOLINE TRANSPORTER. A. CHOLINE TRANSPORTER POSITIF PADA SERABUT SARAF NON HIPERTROFI (TANDA PANAH HITAM). B. IMUNOEKSPRESI CHOLINE TRANSPORTER PADA SERABUT SARAF YANG HIPERTROFI (PANAH MERAH, 42µM) ,400X.

IV. PEMBAHASAN

A. KARAKTERISTIK SUBJEK PENELITIAN

Pada penelitian ini, penyakit Hirschsprung paling banyak ditemukan pada kelompok usia 0-1 tahun sebanyak 24 kasus (68,57%), diikuti dengan kelompok usia >1-5 tahun

sebanyak 7 kasus (20%) dan >5 tahun sebanyak 4 kasus (11,43%). Pada penelitian yang pernah dilakukan oleh Keerthi *et al.* melaporkan kasus penyakit Hirschsprung paling banyak ditemukan pada kelompok usia 0-1 tahun sebanyak 94,33 % dan Tran *et al.* melaporkan kasus penyakit Hirschsprung yaitu sebanyak 81,2 % pada kelompok umur yang sama.^{23,39} Corputty *et al.* dari Fakultas Kedokteran Sam Ratulangi Manado melakukan penelitian tentang penyakit Hirschsprung dan ditemukan kasus paling banyak pada usia 0-1 tahun yaitu 51,28 %.⁴⁰ Penyakit Hirschsprung adalah kompleks kelainan bawaan yang sebagian besar berasal dari faktor genetik, dan juga akibat dari gangguan pensinyalan normal selama perkembangan sel saraf enterik yang mengakibatkan aganglionosis usus bagian distal. Penyakit Hirschsprung ini sering menjadi penyebab obstruksi usus pada neonatal dan juga dikaitkan dengan kelainan bawaan (5-32%).⁴¹

Kasus penyakit Hirschsprung pada penelitian ini ditemukan lebih banyak pada laki-laki yaitu sebanyak 24 kasus (68,57%) dibandingkan perempuan yaitu sebanyak 11 kasus (31,43%). Penelitian yang pernah dilakukan oleh Patil *et al.* melaporkan kasus penyakit Hirschsprung sebanyak 74,42 % kasus pada laki-laki dan 25,58 % kasus pada perempuan. Penelitian yang sama juga dilakukan oleh Prabakaran *et al.* dimana kasus penyakit Hirschsprung ditemukan lebih banyak pada laki-laki yaitu sebanyak 61,6 %, sedangkan kasus pada perempuan didapatkan sebanyak 38,4%.^{37,42} Patandianan *et al.* dari Fakultas Kedokteran Universitas Hasanuddin Makasar melakukan penelitian tentang penyakit Hirschsprung dimana ditemukan sebanyak 73,1 % kasus pada laki-laki dan 26,9 % pada perempuan.⁴³ Penelitian lain menunjukkan perbandingan laki-laki dengan perempuan 4:1, dengan perkiraan penetrasi mutasi RET *proto-oncogene* sebesar 72% pada laki-laki dan 51% pada perempuan, dimana mutasi RET ini sangat berperan terhadap pathogenesis

terjadinya penyakit Hirschsprung. Perbandingan laki-laki dan perempuan secara signifikan lebih tinggi untuk penyakit Hirschsprung segmen pendek di dibandingkan dengan penyakit Hirschsprung segmen panjang.^{44,45}

Pada penelitian ini cara pengambilan sampel terdiri atas biopsi rektal dan reseksi, dimana pada sebagian besar kasus ini dilakukan pengambilan dengan cara biopsi yaitu sebanyak 85,49 %, sementara pengambilan dengan cara reseksi hanya sebanyak 14,51 %. Seperti yang pernah dilaporkan oleh Keerthi *et al.* cara pengambilan sampel pada kasus penyakit Hirschsprung sebagian besar dengan biopsi yaitu sebanyak 92,45 %. Hasil penelitian ini sesuai dengan pembahasan sebelumnya bahwa standar emas untuk diagnosis penyakit Hirschsprung adalah *rectal suction biopsy*, yang memiliki sensitivitas rata-rata 97% dan spesifisitas 99%, serta juga dengan minimal invasif sehingga lebih nyaman terhadap pasien.²³ Pada penelitian ini tidak ditemukan hasil yang bermakna antara cara pengambilan sampel dengan sel ganglion dan serabut saraf, karena sebagian besar cara pengambilannya adalah biopsi.

Pada penelitian ini ditemukan gambaran histopatologi penyakit Hirschsprung yang bervariasi, dimana ditemukan lebih banyak serabut saraf positif (88,57%) dan sel ganglion negatif (85,71%). Zemheri *et al.* melakukan penelitian tentang kasus penyakit Hirschsprung pada tahun 2021 dengan melaporkan gambaran histopatologi berdasarkan adanya hipertrofi pleksus saraf dan adanya gambaran aganglionosis.²⁰ Namun dari penelitian lain melaporkan gambaran histopatologis yang bervariasi pada kasus-kasus yang didiagnosis penyakit Hirschsprung, yang tidak hanya berdasarkan adanya pleksus saraf yang mengalami hipertrofi dan gambaran aganglionosis. Penelitian yang dilaporkan oleh Rakhshani *et al.* pada tahun 2016 melaporkan gambaran histopatologi penyakit Hirschsprung

berdasarkan adanya sel ganglion dan adanya pleksus saraf.²² Sementara Patil *et al.* pada tahun 2020 melaporkan gambaran histopatologis penyakit Hirschsprung berdasarkan adanya sel ganglion dan tidak adanya sel ganglion dengan atau tanpa adanya hipertrofi pleksus saraf.³⁷ Dari beberapa penelitian didapatkan adanya standar klasifikasi gambaran histopatologi yang berbeda untuk menegakkan suatu kasus yang diduga penyakit Hirschsprung, yang kemungkinan disebabkan karena masih adanya keraguan patolog dalam menentukan diagnosis berdasarkan ada tidaknya sel ganglion dan juga pleksus saraf.⁴⁶

Ekspresi Calretinin negatif adalah yang paling banyak ditemukan pada penelitian ini (80%). Rakhshani *et al.* (2016), melaporkan hasil pemeriksaan ekspresi Calretinin pada kasus penyakit Hirschsprung dengan hasil ekspresi Calretinin negatif dengan gambaran histopatologi HE sel ganglion negatif adalah yang paling banyak ditemukan (96,2%).²² Keerty *et al.* (2019) melaporkan kasus penyakit Hirschsprung dengan ekspresi Calretinin negatif paling banyak ditemukan dengan gambaran histopatologi sel ganglion negatif (92%).²³

Pada penelitian ini didapatkan ekspresi Choline Transporter positif adalah yang terbanyak yaitu 82,86%. Sedangkan ekspresi Choline Transporter negatif hanya 17,14%. Hal ini sejalan dengan penelitian yang dilakukan oleh Kapur *et al.* (2017), yang melaporkan ekspresi Choline Transporter adalah yang paling banyak positif pada kasus penyakit Hirschsprung.¹⁸

B. HUBUNGAN EKSPRESI CALRETININ DENGAN KEBERADAAN SEL GANGLION

Penelitian ini mendapatkan hubungan yang bermakna antara ekspresi Calretinin dengan keberadaan sel ganglion, dimana ekspresi Calretinin yang paling banyak adalah negatif pada kasus penyakit Hirschsprung. Hal ini sejalan dengan penelitian yang dilakukan

oleh Rakhshani *et al.* (2016), melaporkan hasil pemeriksaan ekspresi Calretinin pada kasus penyakit Hirschsprung dengan hasil ekspresi Calretinin negatif.²²

Calretinin merupakan protein pengikat Kalsium yang berperan penting dalam perkembangan dan fungsi sistem saraf pusat. Sel ganglion dan serabut saraf mengekspresikan Calretinin pada usus normal sedangkan pada penyakit Hirschsprung sel ganglion dan serabut saraf menunjukkan hilangnya ekspresi Calretinin, sehingga tidak adanya ekspresi Calretinin dapat membantu menegakkan diagnosis penyakit Hirschsprung. Calretinin dianggap positif jika ditemukan pada pewarnaan serabut saraf yang kuat dengan pola granular atau linear pada lamina propria, muskularis mukosa, submukosa dan atau muskularis propria, serta pewarnaan inti dan sitoplasma yang kuat dari sel ganglion pada area yang sama.³⁷

Pada penelitian ini dari 35 sampel, 7 diantaranya didapatkan ekspresi Calretinin positif, dengan 3 sampel diantaranya tersebut mempunyai gambaran HE yang negatif sel ganglion, hal ini dapat disebabkan salah interpretasi pada pemerikssan HE dikarenakan ukuran sampel yang kecil dan kesulitan mendeteksi sel ganglion dikarenakan usia pasien sebagian besar < 1 tahun, dimana sel ganglionnya merupakan sel ganglion immatur yang mirip dengan sel endotel ataupun sel radang seperti limfosit. Selain itu, karena jaringan yang diambil adalah dari biopsi sehingga hanya terlihat sampai lapisan submukosa, pada lapisan submukosa ini sel ganglion relatif terpisah jauh satu dengan lainnya dan jumlahnya lebih sedikit sehingga sulit untuk dideteksi. Sementara 4 sampel mempunyai gambaran HE positif sel ganglion yang diduga karena jaringan tersebut merupakan batas yang sudah ganglionik.²³ Dari hasil penelitian ini menunjukkan bahwa Calretinin dapat membantu meningkatkan akurasi diagnosis penyakit Hirsccsprung.

C. HUBUNGAN EKSPRESI CHOLINE TRANSPORTER DENGAN KEBERADAAN SERABUT SARAF

Penelitian ini mendapatkan hubungan yang bermakna antara ekspresi Choline Transporter dengan keberadaan serabut saraf, dimana ekspresi Choline Transporter yang terbanyak adalah positif. Hal ini sejalan dengan penelitian yang dilakukan oleh Kapur *et al.* (2017), melaporkan hasil pemeriksaan ekspresi Choline Transporter dengan hasil ekspresi Choline Transporter positif.¹⁸

Choline Transporter merupakan pengganti histokimia Asetilkolinesterase yang pada beberapa penelitian dapat membantu menegakkan diagnosis penyakit Hirschsprung dengan akurasi 99-100%, namun Asetilkolinesterase tidak dapat digunakan pada penelitian ini karena membutuhkan jaringan segar atau beku dan tidak dapat digunakan pada jaringan yg tertanam formalin. Oleh karena itu, digunakan Choline Transporter sebagai pengganti Asetilkolinesterase untuk membantu menegakkan diagnosis penyakit Hirschsprung, dimana memberikan hasil yang sama yaitu ekspresi yang positif. Choline Transporter digunakan untuk penyerapan kolin pada sistem saraf, dimana komponen kolinergik mengambil kolin melalui Choline Transporter afinitas tinggi untuk selanjutnya mensintesis Asetilkolin oleh Kolinasetiltransferase dari kolin dan Asetil-koenzim A. Asetilkolin selanjutnya di translokasi menjadi vesikel sinaptik kecil oleh Vesikular Asetilkolin Transporter dan dilepaskan melalui eksositosis. Setelah dilepaskan, Asetilkolin menjalankan fungsi selulernya melalui reseptor muskarinik dan nikotinik yang akhirnya Asetilkolin dengan cepat terdegradasi menjadi kolin dan asetat oleh Asetilkolinesterase.¹⁸

Pada penelitian ini dari 35 sampel yang diperiksa, 6 diantaranya menunjukkan ekspresi Choline Transporter negatif, sehingga dapat disimpulkan kemungkinan

sampel sudah mengandung segmen ganglionik karena tidak terdapat adanya proliferasi serabut saraf, tetapi ada faktor lain yang dapat menyebabkan hasil negatif pada kasus yang diduga penyakit Hirschsprung yaitu faktor usia, dimana pada beberapa penelitian melaporkan intensitas pewarnaan meningkat seiring dengan bertambahnya usia, oleh karena itu pasien yang < 1 tahun dapat terjadi resiko negatif palsu sehingga belum dapat menyingkirkan kemungkinan suatu penyakit Hirschsprung.

Pada penelitian ini juga dilakukan pengukuran serabut saraf pada sampel dengan ekspresi Choline Transporter positif. Dari 29 sampel yang positif Choline Transporter ditemukan 3 diantaranya hipertrofi saraf. Hal ini sesuai dengan literatur yang menyebutkan hipertrofi saraf merupakan kompensasi dari kondisi aganglionik dan merupakan salah satu kriteria gambaran histopatologis untuk menegakkan diagnosis penyakit Hirschsprung. Tetapi temuan ini tidak mutlak karena tidak semua kasus penyakit Hirschsprung menunjukkan adanya serabut saraf yang hipertrofi.²⁰

V. KESIMPULAN DAN SARAN

Penelitian *cross sectional* ini memberikan bukti bahwa terdapat hubungan yang bermakna antara ekspresi Calretinin dengan keberadaan sel ganglion dan terdapat hubungan yang bermakna antara ekspresi Choline Transporter dengan keberadaan serabut saraf. Diperlukan penelitian lanjutan menggunakan sampel jaringan reseksi untuk menilai secara keseluruhan ekspresi Calretinin dan Choline Transporter.

DAFTAR PUSTAKA

- [1]. Desoki SM, Kylat RI, Udayasankar U. Managing neonatal bowel obstruction: clinical perspectives. *Research and Reports in Neonatology*. 2018;19-32.
- [2]. Zuikova V, Franckevica I, Strumfa I, Melderis I. Immunohistochemical Diagnosis of Hirschsprung's Disease and Allied Disorders. *Latvian Surgery Journal*. 2016;2015(18):50-7.

- [3]. Silambi A, Setyawati T, Langitan A. Case report: Hirschsprung disease. *Journal Medical Profession (Medpro)*2020;2(1):36-40.
- [4]. Green HL, Rizzolo D, Austin M. Surgical management for Hirschsprung disease: A review for primary care providers. 2016.
- [5]. Anand S, Taherian M. Hirschsprung Disease. *National Library Of Medicine*. 2020;(September).
- [6]. Eltayeb AA, Ibrahim NH, Eltayeb AA. Journal of Pediatric Surgery Case Reports Pitfalls in diagnosis and treatment of Hirschsprung's disease. *J Pediatr Surg Case Reports*. 2020;60:101455.
- [7]. Prabhakaran S. Hirschsprung's disease. *Int J Acad Med*. 2017;3(3):96-100.
- [8]. Pradhan P, Pal BC, Rath G. Role of Calretinin Immunohistochemical Stain in Evaluation of Hirschsprung's Disease. *Journal of Clinical and Diagnostic Research*. 2021;15(1):8-11.
- [9]. Alehossein M, Roohi A, Pourgholami M, Mollaeian M. Diagnostic Accuracy of Radiologic Scoring System for Evaluation of Suspicious Hirschsprung Disease in Children. *Iran J Radiol*. 2015;12(2):0-4.
- [10]. Fakhry T, Samaka RM, Sheir M, Albatanony AA. Comparative study between use of calretinin and synaptophysin immunostaining in diagnosis of Hirschsprung disease. *Int Surg J*. 2019;6(3):658-63.
- [11]. Role of Calretinin in Determining the Aganglionic Segment in Hirschsprung's Disease. *Research Article*. 2020;10(2):164-9.
- [12]. Palissei AS, Faruk M. Hirschsprung's disease: epidemiology, diagnosis, and treatment in a retrospective hospital-based study. *Journal of the Medical Sciences*, 2021;53(2):127-34.
- [13]. Verkuijl SJ, Friedmacher F, Harter PN. Persistent bowel dysfunction after surgery for Hirschsprung's disease: A neuropathological perspective. *World J Gastrointest Surg*. 2021;9366(8).
- [14]. Guinard-samuel V, Bonnard A, Lagausie P De, et al. Calretinin immunohistochemistry: a simple and efficient tool to diagnose Hirschsprung disease. *Mod Pathol*. 2009;1379-84.
- [15]. Hwang S, Kapur R p. Advances and Pitfalls in the Diagnosis of Hirschsprung Disease. *Surg Pathol Clin*.2020.
- [16]. Yoshimaru K, Yanagi Y, Obata S, Takahashi Y, Irie K, Omori A. Acetylcholinesterase staining for the pathological diagnosis of Hirschsprung's disease. *Surg Today*. 2020
- [17]. Agrawal RK, Kakkar N, Vasishta RK, Kumari V, Samujh R, Rao KLN. Acetylcholinesterase histochemistry (AChE) - A helpful technique in the diagnosis and in aiding the operative procedures of Hirschsprung disease. *Diagn*

- Pathol.* 2015;1-8.
- [18]. Kapur RP, Raess PW, Hwang S, Winter C. Choline Transporter Immunohistochemistry: An Effective Substitute for Acetylcholinesterase Histochemistry to Diagnose Hirschsprung Disease With Formalin-fixed Paraffin-embedded Rectal Biopsies. *Pediatr Dev Pathol.* 2017.
- [19]. Galazka P, Styczynski J, et al. Diagnostic Algorithm in Hirschsprung ' s Disease : Focus on Immunohistochemistry Markers. *Onco Surg.* 2020. 1355-59.
- [20]. Zemheri E, Zerk EP. Calretinin immunohistochemical staining in Hirschsprung ' s disease: An institutional experience. *North Clin Istanb.* 2021;8(6):601-6.
- [21]. Qaiser M, Javeed S, Fawad R, et al. Diagnostic Utility of Calretinin Immunohistochemistry for the Diagnosis of Hirschsprung ' s Disease. *J Islamic Int Med Coll.* 2022;17(3):170-4.
- [22]. Rakhshani N, Araste M, Imanzade F, Panahi M, Safarnezhad F. Hirschsprung Disease Diagnosis : Calretinin Marker Role in Determining the Presence or Absence of Ganglion Cells. *Iran J Pathol.* 2016;11(4):409-15.
- [23]. Keerthi CP, Prema NS. Comparison of Haematoxylin and Eosin Staining and Calretinin Immunohistochemistry in Clinically Suspected Hirschsprung Disease to Evaluate the Diagnostic Utility of Calretinin in Hirschsprung Disease. *J Evolution Med Dent Sci.* 2019;8(49).
- [24]. Mazumder W, Karim ASMB. Hirschsprung ' s Disease : Diagnosis and Management. *J Enam Med Col.* 2020;10(2):13-17.
- [25]. Kusuma MI, Sampetoding S, Bahrin M. Article Case report Adult Hirschsprung disease as acute intestinal obstruction : a case report. *PanAfrican Medical Journal.* 2022.
- [26]. Arthipriyadharsini R. Study Of Calretinin Immunohistochemistry Staining Pattern and Its Histopathological Correlation In Diagnosis Of Hirschsprung ' s Disease. 2019;(MAY).
- [27]. Kumar V, Abbas A., Aster J. *Pathologic Basis of Disease.* 9 Ed.; 2015.
- [28]. Roy S, Mathur A, Bihari A. Conventional and emerging technologies for combating Hirschsprung ' s disease : The scope of electroanalytical sensing modalities. *Sensors Int.* 2022;3(May).
- [29]. Surya LI, Dharmajaya MI. Symptoms And Diagnosis of Hirschsprung's Disease. *Jurnal Medika Udayana.* 2014.
- [30]. Kohashi K, Kinoshita I, Oda Y. *Hirschsprung ' s Disease Pathology.*; 2019.
- [31]. Torre LD, Wehrli LA. Seminars in Pediatric Surgery Error traps and culture of safety in Hirschsprung disease. *Semin Pediatr Surg.* 2019;28(3):151-9.
- [32]. Kyrklund K, Sloots CEJ, Blaauw I, et al. ERNICA guidelines for the management of rectosigmoid Hirschsprung ' s disease. *Orphanet Journal of Rare Diseases.* 2020;3:1-16.
- [33]. Thanoon HH, Alazzo NS. The Role of Calretinin Immunohistochemistry in Detection of Ganglion Cell in Hirschsprung Disease. *Iraq Medical Journal.* 2021;20(4):368-72.
- [34]. Xiang Y, Wu Y, Zhang H, Wu J, Zhang J. Characterization and Localization of Calb 2 in Both the. *Journal of Animals.* 2020.
- [35]. Rekhtman N, Bishop JA. *Quick Reference Handbook for Surgical Pathologists.*
- [36]. Beltman L, Roelofs JDWJJTH, Derikx JPVJPM, Bakx R. Diagnostic accuracy of calretinin and acetylcholinesterase staining of rectal suction biopsies in Hirschsprung disease examined by unexperienced pathologists. *Virchows Arch.* 2022;245-52.
- [37]. Patil PU, Rane S, Khokar DS. To assess calretinin immunohistochemistry in Hirschsprung ' s disease and allied disorders. *Indian J Pathol Onco.* 2020;7(3):408-14.
- [38]. Sastroasmoro I. *Dasar-Dasar Metodologi Penelitian Klinis.* Sagung seto; 2011.
- [39]. Tran V quoq, Lam KT, Truong DQ. Diagnostic value of rectal suction biopsies using calretinin immunohistochemical staining in Hirschsprung ' s disease. *J Pediatr Surg.* 2016;51(12):2005-9.
- [40]. Corputty ED, Lampus HF, Monoarfa A. Gambaran Pasien Hirschsprung Di RSUP Prof. DR. R. D. Kandou Manado Periode Januari 2010 sampai September 2014. 2015;3(April).
- [41]. Moore SW. Congenital Anomalies and Genetic Associations in Hirschsprung ' s Disease. 2019.
- [42]. Prabakaran S, Thilagam KK. Profile of Hirschsprung ' s disease cases diagnosed in tertiary care teaching hospital : a retrospective observational study. *Int J Contemp Pediatr.* 2020;7(3):551-5.
- [43]. Patandianan Y, Nurmantu F, Mariana N, et al. Relationship of nerve diameter using S-100 immunohistochemistry with Hirschsprung-associated enterocolitis degrees. *Medicina Clínica Práctica.* 2021;4:0-4.
- [44]. Sergi CM, Caluseriu O, Mccoll H, Eisenstat DD. Hirschsprung ' s disease: clinical dysmorphology, genes, micro-RNAs, and future perspectives. *International Pediatric Research Foundation.* 2017;81(1):177-91.
- [45]. Jaroy EG, Acosta-jimenez L, Hotta R, Goldstein AM, Emblem R. " Too much guts and not enough brains " : (epi) genetic mechanisms and future therapies of Hirschsprung disease — a review. 2019:1-11.
- [46]. Memarzadeh M, Talebi A, Edalaty M, Hosseinpour M. O riginal A rticle Hirschsprung ' s disease diagnosis: Comparison of immunohistochemical , hematoxilin and eosin staining. *J Indian Assoc Pediatr Surg.* 2009;14(2):8-11.