

Case Study: Gallstones (*Cholelithiasis*) in Long-tailed Macaques (*Macaca fascicularis*)

J. Susilo¹, B. Tri Wibowo¹, Y. Tinasari¹, M. Nur Salim^{2*}, Dian Masyitha³, Erdiansyah Rahmi³, M. Isa⁴, Herialfian⁴, Fakhurrrazi⁵, T. Fadrial Karmil⁶, Fadli A. Gani⁷

¹Laboratorium Patologi, Balai Veteriner Lampung, Bandar Lampung

²Laboratorium Patologi, Fakultas Kedokteran Hewan, Universitas Syiah Kuala, Banda Aceh

³Laboratorium Histologi, Fakultas Kedokteran Hewan, Universitas Syiah Kuala, Banda Aceh

⁴Laboratorium Biokimia, Fakultas Kedokteran Hewan, Universitas Syiah Kuala, Banda Aceh

⁵Laboratorium Mikrobiologi, Fakultas Kedokteran Hewan, Universitas Syiah Kuala, Banda Aceh

⁶Laboratorium Klinik, Fakultas Kedokteran Hewan, Universitas Syiah Kuala, Banda Aceh

⁷Laboratorium Anatomi, Fakultas Kedokteran Hewan, Universitas Syiah Kuala, Banda Aceh

*Corresponding author: mnursalim@unsyiah.ac.id

ABSTRACT

The purpose of this case study is to diagnose the cause of death of the long-tailed macaque (*Macaca fascicularis*). Two cadaver of *Macaca fascicularis* were received by the Lampung Veterinary Center from a customer. Necropsy was carried out at the Pathology Laboratory of the Lampung Veterinary Center by observing macroscopic changes. The samples taken were then observed by ram staining in the Bacteriology laboratory and hematoxylin-eosin staining at the Pathology laboratory. The results of macroscopic observations showed an enlarged gallbladder with a length of 4 cm and a width of 2 cm, blackish in color. Gallbladder surgery found 15 gallstones measuring 2 mm in diameter, brownish-colored bile, fibrin clots, and blood. The native Gram stain of bile showed several types of rod-shaped bacteria form and Gram-negative cocci (eosinophilic), and Gram-positive rods (basophilic). Specific histopathological changes in the ductus choleductus are multifocal neutrophil inflammatory cell infiltration, enlarged gallbladder lumen filled with multi-bacterial, cell debris, fibrin, and erythrocytes. Multifocal hepatitis occurs by neutrophils, multibacterial, and fibrin. It can be concluded that the causes of death of *Macaca fascicularis* were cholelithiasis and hepatitis.

Keywords: Cholelithiasis, *Macaca fascicularis*, hepatitis

PENDAHULUAN

Batu empedu atau kolelitiasis adalah deposit cairan pencernaan yang mengeras di dalam kantung empedu. Epidemiologi kolelitiasis atau batu empedu di negara maju sekitar 10–15% dari populasi dewasa, dengan prevalensi jenis kolelitiasis kolesterol. Sedangkan di negara Asia epidemiologi kolelitiasis berkisar 3–10%. Batu empedu merupakan penyakit yang terjadi pada manusia ataupun primata. Kasus kolelitiasis primate terjadi pada spesies *Callitrichidae* (juga disebut *Arctopithecini* atau *Hapalidae*) adalah keluarga monyet dunia baru, sebanyak 6

ekor dari tahun 1997 hingga Januari 2005 (Smith *et al.*, 2006).

Etiologi kolelitiasis terdiri dari 3 mekanisme utama, yaitu supersaturasi kolesterol, produksi bilirubin berlebih, dan hipomotilitas atau gangguan kontraktilitas kantung empedu (Lammert *et al.*, 2016; Tanaja *et al.*, 2019). Penyebab kolelitiasis kolesterol terutama berasal dari sekresi kolesterol yang berlebih oleh sel hepar, disertai hipomotilitas atau gangguan pengosongan kantung empedu. Kolelitiasis pigmen hitam disebabkan produksi bilirubin yang berlebih akibat pemecahan heme yang tinggi, seperti pada penderita hemolitik kronis atau sirosis hepatis. Kolelitiasis

pigmen coklat disebabkan oleh kolonisasi bakteri akibat sumbatan pada duktus empedu, seperti striktur bilier. Koledokolitiasis adalah batu empedu yang berada di saluran empedu (Heuman, 2019).

Kolelitiasis yang paling sering ditemukan merupakan batu empedu kolesterol, diikuti dengan batu empedu pigmen hitam dan coklat. Faktor resiko terbentuknya batu empedu kolesterol adalah jenis kelamin wanita, usia di atas 40 tahun, obesitas, diet tinggi lemak dan rendah serat, diabetes melitus, dislipidemia, penurunan berat badan drastis, *sedentary lifestyle*, dan kehamilan (Njeze *et al.*, 2013; Abraham *et al.*, 2014). Tujuan dari study ini adalah melakukan diagnosis penyebab kematian kera ekor panjang (*Macaca fascicularis*).

MATERI DAN METODE

Nekropsi cadaver

Nekropsi dilakukan oleh medik dan paramedik veteriner di ruang bedah Laboratorium Patologi Balai Veteriner Lampung. Semua perubahan makroskopis dari penampakan luar dari kepala hingga kaki dan ekor secara keseluruhan diamati dan dicatat perubahannya. Proses bedah bangkai dengan mengamati perubahan semua organ visceral yang ada untuk diambil kesimpulan sementara.

Pewarnaan Gram

Obyek glass dibersihkan menggunakan alcohol 70% dan siapkan ose untuk mengulas cairan empedu lalu ratakan di obyek glass. Dilanjutkan 2–3 tetes larutan *crystal violet* pada apusan tersebut dan dibiarkan 1 menit. Dicuci dengan air mengalir dan dikeringkan hingga kering atau dikeringkan menggunakan kertas isap secara hati-hati. Ditetes *Lugol Iodine* ke seluruh permukaan ulas hingga 1 menit, dicuci dengan air mengalir dan

dikeringkan. Diteteskan larutan Alkohol 95% dan aseton selama 30 detik, cuci dengan air mengalir dan dikeringkan. Diteteskan larutan *safranin* sampai 2 menit, cuci air mengalir dan keringkan kemudian diamati menggunakan mikroskop dengan perbesaran kuat (Suvarna *et al.*, 2013).

Proses histopatologi

Pembuatan preparat histopatologi dilakukan melalui tahap fiksasi, dehidrasi, embedding, parafin blok, pemotongan, pewarnaan dan *mounting*. Fiksasi dilakukan dengan menyimpan potongan jaringan ke dalam *buffered neutral formalin* 10% selama 24 jam. Jaringan didehidrasi menggunakan *tissue processor* yang di dalamnya terdapat ethanol bertingkat 70%, 80%, dan 90%, absolut I, absolut II, absolut III, masing-masing dilakukan selama 60 menit. Setelah dehidrasi selesai kemudian dilakukan penjernihan dengan menggunakan xylol I, xylol II dan xylol III. Jaringan selanjutnya diinfiltrasi parafin cair 2 kali masing-masing 1 jam, dicetak, kemudian dipotong dengan mikrotom 3-5 mikron (Suvarna *et al.*, 2013). Pewarnaan HE dimulai dengan deparafinisasi menggunakan xylol I, xylol II dan xylol III masing-masing dilakukan selama 5 menit. Preparat dimasukkan ke dalam ethanol absolut I, absolut II, absolut III, ethanol 90%, ethanol 80% dan ethanol 70% masing-masing selama 5 menit. Preparat selanjutnya dibilas dengan aquades dan direndam dalam hematoxilin selama 5 menit, kemudian dibilas kembali menggunakan air mengalir selama 5 menit, selanjutnya direndam dalam eosin selama 3-5 menit. Preparat direndam ke dalam ethanol 70%, ethanol 80%, ethanol 90%, absolut I, absolut II dan absolut III masing-masing selama 3 menit, xylol I, xylol II dan xylol III masing-masing 5 menit. Tahap

terakhir ditutup dengan entelan dan gelas penutup.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Berdasarkan pengamatan dan bedah bangkai pada cadaver tersebut terlihat kondisi cadaver sangat kurus, terlihat lesi di ekor, lesi dan nodul keputihan pada lidah. Hasil pengamatan organ organ mencari pada pembesaran kantung empedu, berwarna coklat kehitaman, dengan ukuran panjang 4 cm dan lebar 2 cm (Gambar 1). Cairan empedu tersebut berisi 15 kristal batu empedu berukuran 2 mm, eksudat berwarna coklat kehitaman, darah dan gumpalan seperti fibrin.

Patofisiologi kolelitiasis atau batu empedu adalah akibat substansi tertentu pada cairan empedu yang meningkat, sehingga memiliki konsentrasi yang lebih tinggi daripada pelarutnya. Cairan empedu yang terkonsentrasi menyebabkan supersaturasi dan presipitasi sebagai kristal mikroskopik. Kristal ini terperangkap dalam mukus kantung empedu dan membentuk lumpur bilier (*biliary sludge*). Seiring berjalannya waktu, kristal ini menumpuk dan saling menyatu membentuk batu makroskopik. Gejala dan komplikasi kolelitiasis disebabkan dari penutupan duktus oleh lendir dan/atau batu di dalam kantung empedu atau duktus empedu. Terdapat 2 substansi utama pembentuk batu empedu, yaitu kolesterol dan *calcium bilirubinate* (Njeze *et al.*, 2013; Abraham *et al.*, 2014; Heuman, 2019).

Proses terbentuknya batu empedu kolesterol terjadi karena cairan empedu terkonsentrasi melalui penyerapan elektrolit dan air. Kolesterol disekresi oleh sel hepar ke dalam kantung empedu bersama dengan enzim lesitin dalam bentuk vesikel unilamelaris. Sel hepar juga mensekresi garam empedu sebagai deterjen kuat yang

diperlukan untuk pencernaan dan absorpsi lemak. Vesikel unilamelaris yang dilarutkan oleh garam empedu membentuk agregat larut air bernama *mixed micelles*. *Mixed micelles* mempunyai kapasitas mengikat kolesterol yang lebih rendah sehingga kolesterol semakin menumpuk dan membentuk kristal monohidrat. Kolelitiasis kolesterol ini dipercaya dipicu oleh kondisi dislipidemia (Abraham *et al.*, 2014; Heuman, 2019).

Kolelitiasis *calcium bilirubinate* dapat berbentuk batu pigmen hitam dan batu pigmen coklat. Bilirubin adalah produk dari pemecahan heme, yang disekresikan ke cairan empedu oleh sel hepar. Kebanyakan bilirubin tersedia dalam bentuk larut air atau terkonjugasi, sedangkan sisanya dalam bentuk tidak terkonjugasi. Bilirubin tak terkonjugasi akan membentuk presipitat dengan kalsium, yang masuk ke cairan empedu secara pasif. Pada kondisi pemecahan heme tinggi, bilirubin tidak terkonjugasi akan tersedia dalam jumlah lebih dari biasanya. *Calcium bilirubinate* akan mengkristal dan membentuk batu. Seiring waktu, batu ini akan teroksidasi dan berwarna hitam, sehingga dinamakan batu empedu pigmen hitam (Njeze *et al.*, 2013; Heuman, 2019).

Hasil pewarnaan Gram pada cairan empedu menunjukkan bermacam bentuk bakteri: batang, kokus dan kokobasil (Gambar 2). Batu empedu coklat biasanya muncul diakibatkan kolonisasi bakteri pada stasis cairan empedu. Cairan empedu umumnya steril, tetapi pada kondisi tertentu dapat menyebabkan kolonisasi bakteri, misalnya akibat striktur bilier. Bakteri akan menghidrolisis bilirubin terkonjugasi dan menyebabkan peningkatan bilirubin tak terkonjugasi, sehingga meningkatkan konsentrasi kristal *calcium bilirubinate*. Bakteri juga akan

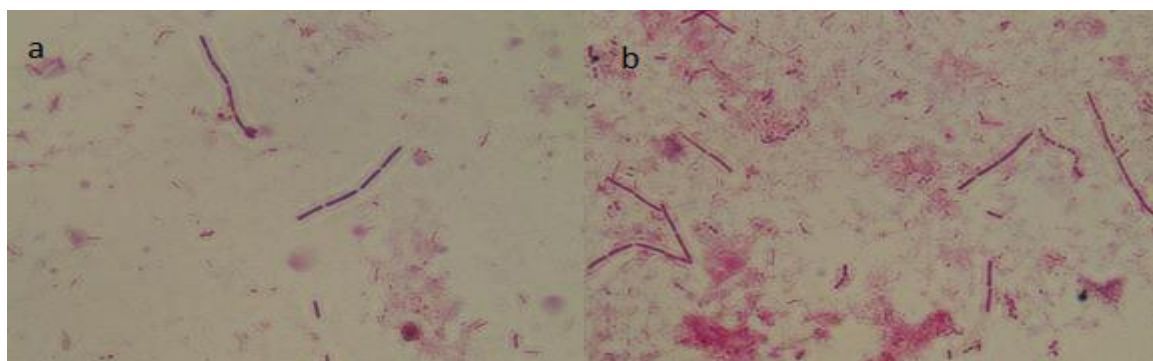
menghidrolisis lesitin untuk mengeluarkan asam lemak yang mengikat kalsium dan terpresipitasi. Produk presipitat menyerupai tanah liat atau yang disebut dengan batu empedu coklat (Njeze *et al.*, 2013; Heuman, 2019).

Batu empedu kolesterol yang terkolonisasi bakteri akan menyebabkan inflamasi mukosa kantung empedu. Bakteri dan leukosit menghidrolisis bilirubin terkonjugasi dan asam lemak, sehingga akan terbentuk kristal kolesterol, calcium bilirubinate, dan garam kalsium lainnya. Mekanisme ini menghasilkan batu empedu campuran. Pada rontgen abdomen akan tampak batu empedu dengan kalsifikasi perifer seperti gambaran cangkang telur akibat perselubungan kalsium (Heuman, 2019).

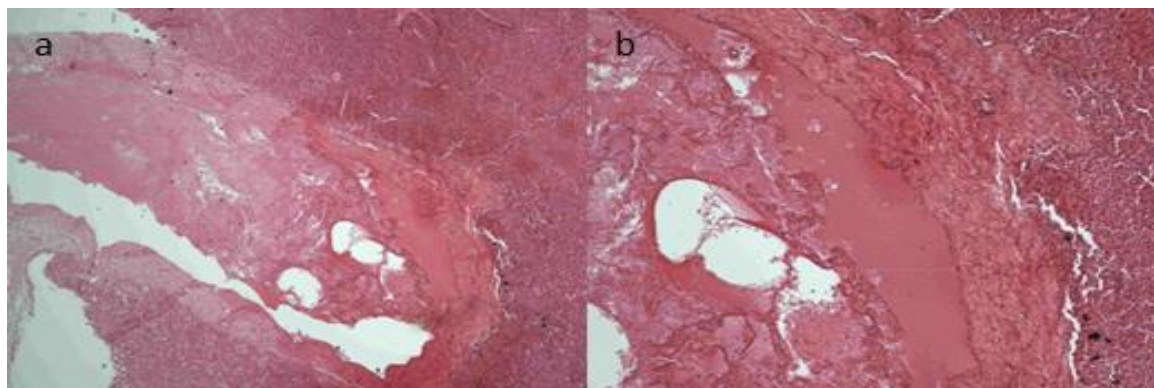
Hasil pemeriksaan histopatologi menunjukkan terjadi kolesistitis akut, peradangan kronis. Ketebalan muskularis propria kantung empedu meningkat secara signifikan (Gambar 3 dan 4). Hal ini sesuai dengan penelitian sebelumnya (Matyja *et al.*, 2013). Kolelitiasis spontan ditemukan pada monyet hijau Afrika jantan (*Chlorocebus aethiops*) dengan nekropsis. Choleliths bervariasi dalam ukuran, bentuk dan warna. Secara histologis, kandung empedu menunjukkan infiltrasi limfositik ringan sampai sedang. Bagian yang menunjukkan kolesistitis limfositik kronis yang ditandai epitel hiperplastik dan fibrosis ringan (Kleinlützum, and Plesker, 2017).



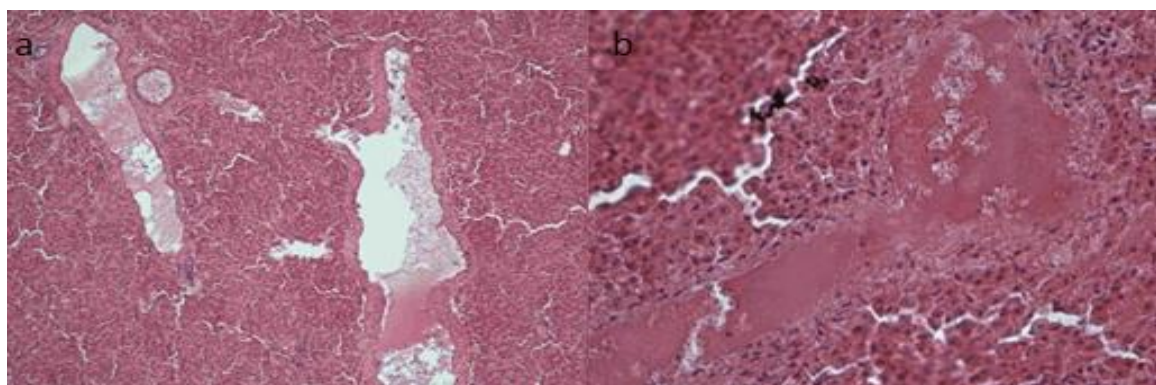
Gambar 1. a. Macaca fascicularis sangat kurus, dan keropeng di ekor, b. pembesaran kantung empedu, berwarna coklat kehitaman, dengan ukuran panjang 4 cm dan lebar 2 cm.



Gambar 2. a. Koloni bakteri bentuk batang berwarna basofilik diduga Gram-positif, b. koloni bakteri berbentuk batang dan kokus berwarna eosinofilik diduga Gram-negatif.



Gambar 3. a. Pelebaran lamina muskularis kantung empedu oleh sel sel limfosit, dan lumen empedu terisi oleh bacterial, sel debris dan sel radang, HE 100x, b. Pelebaran lamina muskularis kantung empedu oleh sel sel limfosit, dan lumen empedu terisi oleh bacterial, sel debris dan sel radang, HE 400x.



Gambar 4. a. Ductus biliaris menebal, lumen empedu terisi oleh bacterial, sel debris dan sel radang, HE 100x, b. Nekrosa dan peradangan kronis pada lobus hepar oleh oleh bakteri embolik, HE 400x.

KESIMPULAN

Berdasarkan hasil dan pembahasan dapat disimpulkan penyebab kematian *Macaca fascicularis* adalah cholelithiasis dan hepatitis.

DAFTAR PUSTAKA

- Abraham S, H.G Rivero, I.V Erlikh, L.F Griffith, V.K Kondamudi. 2014. Surgical and nonsurgical management of gallstones. *Am Fam Physician* 2014; 89:795–802.
- Heuman DM. 2019. Gallstones (Cholelithiasis): Practice Essentials, Background, Pathophysiology n.d. 2019.
- <https://emedicine.medscape.com/article/175667-overview>.
- Kleinlützum, D. and R. Plesker 2017. A case of gallstones in an African green monkey (*Chlorocebus aethiops*). *Primate Biol.* 4: 33–37.
- Lammert, F, M. Acalovschi, G. Ercolani, K.J. van Erpecum, K.S. Gurusamy, C.J van Laarhoven. 2016. EASL Clinical Practice Guidelines on the prevention, diagnosis and treatment of gallstones. *J. Hepatol.* 65:146–81. <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2016.03.005>.
- Matyja, A., K. Gil, A. Pasternak. 2013. Telocytes: new insight into the pathogenesis of gallstones diseases. *Journal of Cellular and Molecular Medicine.* <https://doi.org/10.1111/jcmm.12057>.
- Njeze, G.E. 2013. Gallstones. *Niger J Surg Off. Publ Niger Surg Res. Soc.;* 19:49. <https://doi.org/10.4103/1117-6806.119236>.
- Smith, K.M., P. Calle, B.L. Raphael, S. James, R. Moore, D. McAloose, E. Baitchman. 2006. Cholelithiasis in Four Callicitric Species (*Leontopithecus*,

- Callithrix*). *Journal of Zoo and Wildlife Medicine* 37 (1): 44-48.
- Suvarna, S.K., C. Layton, J.D. Bancroft. 2013. *Bancroft's Theory and Practice of Histological Techniques*, 7th edition. Queen's Medical Centre, Nottingham, UK
- Tanaja, J, R.A. Lopez, J.M. Meer. 2019. Cholelithiasis. StatPearls - NCBI Bookshelf n.d. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK470440/>