

PERBANDINGAN PEMBERIAN BRODIFAKUM DOSIS LD₅₀ DAN LD₁₀₀ TERHADAP RESIDU BRODIFAKUM PADA HEPAR TIKUS WISTARNugraha Adiyasa¹, Tuntas Dhanardhono², Sigid Kirana Lintang Bima²¹Mahasiswa Program Pendidikan S-1 Kedokteran Umum, Fakultas Kedokteran, Universitas Diponegoro²Staf Pengajar Forensik, Fakultas Kedokteran, Universitas Diponegoro

Jl. Prof. H. Soedarto, SH, Tembalang-Semarang 50275, Telp.02476928010

ABSTRAK

Latar Belakang : Brodifakum adalah senyawa yang umumnya digunakan sebagai racun tikus. Namun, sering disalah gunakan pada kasus kriminal. Brodifakum akan di metabolisme tubuh melalui organ ekskresi diantaranya hepar. Paparan brodifakum dalam dosis yang berbeda akan menghasilkan kadar residu yang berbeda pula.

Tujuan: Mengetahui perbandingan pemberian brodifakum dosis LD₅₀ dan LD₁₀₀ terhadap jumlah residu brodifakum pada hepar tikus wistar.

Metode: Penelitian ini merupakan penelitian eksperimental dengan menggunakan pendekatan *post test only control group design*. 27 sampel tikus wistar diberikan perlakuan pemberian brodifakum secara per oral. Residu brodifakum dideteksi menggunakan *High Performance Liquid Chromatography*. Dilakukan analisa deskriptif, uji non parametrik Mann-Whitney terhadap data. Hasil analisis dinyatakan bermakna bila nilai $p < 0,05$.

Hasil: Konsentrasi brodifakum pada hepar hewan coba meningkat berdasarkan jumlah brodifakum yang dimakan. Tikus mati pada hari ke-3 sebanyak 4, pada hari ke-5 sebanyak 7 dan pada hari terminasi sebanyak 16 tikus diterminasi. Kadar residu terendah didapatkan pada angka 0,00002 mg/kg dan tertinggi pada angka 0,00100 mg/kg. Uji Mann-Whitney didapatkan hasil perbandingan residu brodifakum pada hepar tikus pada dosis kontrol dan LD₅₀ ($p=0,001$) dan pada kontrol dan LD₁₀₀ ($p=0,000$). Antara jumlah residu brodifakum pada hepar tikus pada dosis LD₅₀ dan LD₁₀₀ ($p=0,539$).

Simpulan: Tidak ada perbedaan bermakna antara jumlah residu brodifakum pada hepar tikus pada dosis LD₅₀ dan LD₁₀₀ ($p=0,539$).

Kata kunci : brodifakum, dosis, residu, hepar.

ABSTRACT**COMPARISON OF BRODIFACUUM ADMINISTRATION DOSE LD₅₀ AND LD₁₀₀ TO BRODIFACUUM RESIDUE WITHIN *RATTUS NORVEGICUS* LIVER**

Background : Brodifacoum is a substance that usually used as rat poison. But, its often abused on some criminal case. Brodicoum are metabolised within the body through excretion organ, one of them are liver. Contact with different dose of brodifacoum will also result in different amount of brodifacoum residue.

Aim : To know the comparison of brodifacoum administration dose LD50 and LD100 to total residue of brodifacoum within *Rattus norvegicus* liver.

Methods : This study was an experimental study with post test only group design. The sample of this study are 27 *Rattus norvegicus* which given per oral administration of brodifacoum. The residue are detected using High Performance Liquid Chromatography. Descriptive analysis, and non parametric test were done using Mann-Whitney. The result of analysis are revealed significant if $p < 0,05$.

Results : The concentration in the sample liver are rising based on the brodifacoum that were consumes. The number of dead rat are on third day is 4, on fifth day is 7, and on termination day is 17. The lowest concentration of brodifacoum are 0,00002 mg/kg and the highest are 0,00100 mg/kg. The Mann-Whitney test result between control and LD₅₀ total residue of brodifacoum ($p=0,001$) and between control and LD₁₀₀ total residue of brodifacoum ($p=0,000$).

Conclusion : There is no significant differentiation of total brodifacoum residue between LD₅₀ and LD₁₀₀ ($p=0,539$).

Keywords : brodifacoum, dose, residue, liver.

PENDAHULUAN

Brodifakum memiliki waktu paruh yang relatif lama. Setelah pemberian secara per oral biasanya residu brodifakum pada hepar bertahan selama 96 jam dan mulai menurun setelah 2 sampai 8 hari kemudian. Bangkai hewan yang mati karena brodifakum pada umumnya masih memiliki residu brodifakum pada hepar mereka. Binatang yang memakan bangkai tikus yang memiliki residu brodifakum yang masih cukup tinggi dapat terkena efek dari brodifakum itu sendiri.¹ Sedangkan, potensi penyalahgunaan brodifakum pada manusia dapat terjadi dengan mencampurkan komponen brodifakum ke dalam makanan atau minuman.

Berdasarkan latar belakang tersebut diatas, maka dilakukan penelitian mengenai perbandingan pemberian brodifakum dosis LD₅₀ dan LD₁₀₀ terhadap residu brodifakum pada hepar tikus wistar. Penelitian tersebut dilakukan dengan menggunakan High Performance Liquid Chromatography. Tema tersebut dipilih karena dapat digunakan sebagai identifikasi keracunan yang terjadi akibat brodifakum.

METODE PENELITIAN

Penelitian ini merupakan penelitian eksperimental dengan menggunakan pendekatan post test only control group design. Penelitian dilakukan pada 27 sampel tikus wistar yang diberikan perlakuan pemberian brodifakum secara per oral pada bulan juni 2015 dan memenuhi kriteria penelitian. Variabel utama pada penelitian ini adalah jumlah residu pada tikus wistar yang diberikan brodifakum dengan dosis LD₅₀ dibandingkan dengan tikus yang diberikan brodifakum dosis LD₁₀₀.

Subjek yang memenuhi kriteria inklusi dibagi kedalam 6 kandang yang masing-masing kandang berisi 5 tikus, kemudian tikus ditandai dengan diberikan asam bikrat. Tanda diberikan pada kepala, punggung, ekor, kaki depan dan polos (tidak diberi tanda). Pemeriksaan yang digunakan untuk mengetahui jumlah residu brodifakum pada penelitian ini adalah pemeriksaan menggunakan alat *High Performance Liquid Chromatography* (HPLC). Hasil disajikan dalam bentuk tabel maupun grafik. Data disajikan secara deskriptif untuk mengetahui tendensi sentral dan karakteristik masing-masing sampel penelitian. Analisis uji non parametrik (Mann-Whitney) dilakukan untuk mengetahui perbandingan keberadaan brodifakum pada hepar tikus wistar yang diberikan LD₅₀ dan LD₁₀₀. Hasil analisis dinyatakan bermakna bila nilai $p < 0,05$.

Alat yang digunakan adalah HPLC karena alat ini memiliki tingkat sensitifitas yang tinggi. Terbukti dengan alat ini mampu mengukur hingga ketelitian 0,00000 mg/ml. Ditambah penggunaan sampel yang relatif sedikit yaitu hanya 20ul untuk tiap injeksi nya.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Hasil HPLC Kontrol

No	Tikus	Berat (gram)	Dosis (mg)	Residu	Konsentrasi (mg/ml)
1	A	145	-	-	-
2	B	195	-	-	-
3	C	153	-	-	-
4	D	201	-	-	-
5	E	180	-	-	-
6	F	178	-	-	-
7	G	204	-	-	-
8	H	184	-	-	-
9	I	170	-	-	-

Pada tikus kontrol tidak terdapat brodifakum pada hepar nya. Hal ini dikarenakan tikus kontrol tidak diberikan perlakuan pemberian brodifakum.

Hasil HPLC Dosis LD₅₀

No	Tikus	Berat (gram)	Dosis (mg)	Residu	Konsentrasi (mg/ml)
1	A	181	0.05	+	0.00002
2	B	200	0.05	+	0.00003
3	C	171	0.04	+	0.00003
4	D	179	0.05	+	0.00002
5	E	154	0.04	+	0.00002
6	F	182	0.05	-	
7	G	170	0.04	+	0.00003
8	H	213	0.05	+	0.00007
9	I	161	0.04	-	

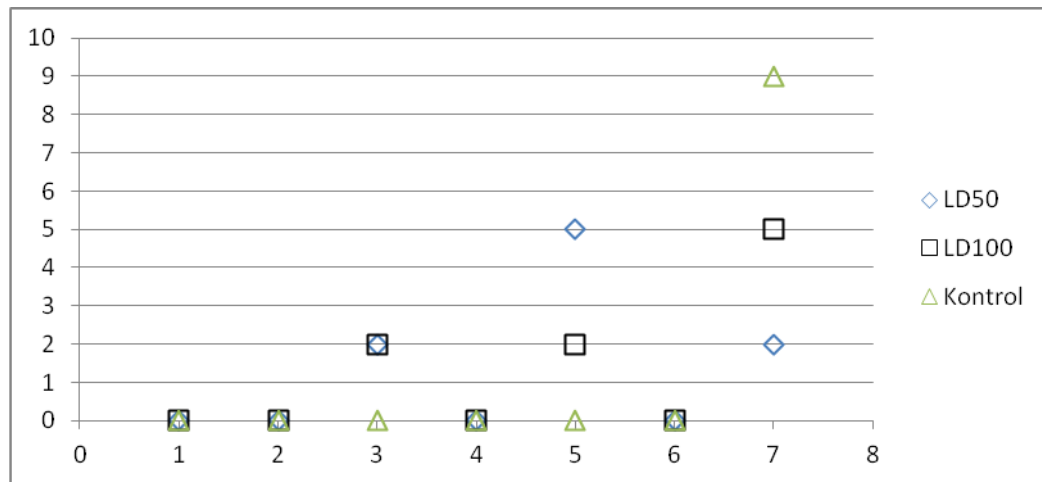
Pada tikus LD₅₀ sebanyak 77,7% tikus positif mengandung brodifakum pada hepar mereka. Sebanyak 22,2% negatif mengandung brodifakum. Konsentrasi tertinggi tercatat pada tikus H yaitu sebesar 0,00007 mg/ml.

Hasil HPLC Dosis LD₁₀₀

No	Tikus	Berat (gram)	Dosis (mg)	Residu	Konsentrasi (mg/ml)
1	A	167	0.18	+	0.00004
2	B	192	0.21	+	0.00005
3	C	173	0.19	-	
4	D	182	0.20	+	0.00009
5	E	154	0.17	+	0.00010
6	F	187	0.20	+	0.00100
7	G	204	0.22	+	0.00069
8	H	178	0.19	+	0.00045
9	I	201	0.22	+	0.00013

Pada dosis LD₁₀₀ sebanyak 88,8% tikus positif mengandung brodifakum pada heparinya. Hanya 11,1% yang tidak terkandung brodifakum pada heparinya. Konsentrasi tertinggi tercatat pada tikus F yaitu sebesar 0,00100 mg/ml.

Waktu Kematian Tikus



Gambar Waktu kematian tikus

Waktu kematian tikus mulai terjadi pada hari ke-3. Sebanyak 4 tikus ditemukan mati pada hari ke-3. 4 tikus tersebut adalah 2 tikus dari dosis LD₅₀ dan 2 tikus dari dosis LD₁₀₀. Pada hari ke-5 tikus pada kelompok LD₅₀ mati sebanyak 5 sampel dan jumlah ini tidak berubah hingga hari terminasi yaitu hari ke-7. Sedangkan pada dosis LD₁₀₀ pada hari ke-5 terjadi 2 kematian dan jumlah ini tidak berubah hingga hari terminasi yaitu hari ke-7. Pada penelitian ini untuk kelompok kontrol dan LD₅₀ didapatkan sampel yang mempunyai residu positif sebanyak 7 sampel dan yang tidak ditemukan residu sebanyak 11 buah sampel. Dengan uji Mann-Whitney, diperoleh angka *significancy* bermakna ($p = 0,001$). Karena nilai $p > 0,05$, dapat disimpulkan bahwa terdapat perbedaan bermakna antara jumlah residu brodifakum pada dosis kontrol dan LD₅₀.

Untuk perbandingan antara kelompok kontrol dan LD₁₀₀ didapatkan sampel yang mempunyai residu positif sebanyak 8 sampel dan yang tidak ditemukan residu sebanyak 10 buah sampel. Dengan uji Mann-Whitney, diperoleh angka *significancy* bermakna ($p = 0,000$). Karena nilai $p > 0,05$, dapat disimpulkan bahwa terdapat perbedaan bermakna antara jumlah residu brodifakum pada dosis kontrol dan LD₁₀₀.

Untuk perbandingan kelompok LD₅₀ dan LD₁₀₀ didapatkan sampel yang mempunyai residu positif sebanyak 15 sampel dan yang tidak ditemukan residu sebanyak 3 buah sampel. Dengan uji Mann-Whitney, diperoleh angka *significancy* tidak bermakna ($p = 0,539$). Karena nilai $p > 0,05$, dapat disimpulkan bahwa tidak ada perbedaan bermakna antara jumlah residu brodifakum pada dosis LD₅₀ dan LD₁₀₀.

Dengan demikian didapatkan hasil yang bermakna untuk perbandingan antara kelompok kontrol dengan kelompok LD₅₀ dan kelompok kontrol dengan kelompok LD₁₀₀. Sedangkan untuk perbandingan antara kelompok LD₅₀ dengan kelompok LD₁₀₀ ditemukan tidak ada perbedaan yang bermakna.

Pada penelitian ini, hasil yang didapatkan sejalan dengan penelitian sebelumnya yang dilakukan oleh C.T Eason⁵ bahwa konsentrasi brodifakum pada hepar akan meningkat berdasarkan jumlah brodifakum yang dimakan oleh hewan coba. Selain itu, dari hasil tes HPLC didapatkan sebanyak 84% tikus mengandung brodifakum pada heparinya. Hasil positif didapatkan karena hepar tikus segera diambil ketika tikus mati dan dimasukkan kedalam coolbox untuk segera dilakukan tes HPLC. Hal ini sejalan dengan penelitian yang sebelumnya dilakukan oleh C.T Eason⁵ bahwa brodifakum pada hepar tikus akan terdeteksi hingga jangka waktu 1 minggu.

SIMPULAN DAN SARAN

Simpulan

Konsentrasi brodifakum pada hepar hewan coba meningkat berdasarkan jumlah umpan yang dimakan namun peningkatan tersebut tidak signifikan. Terdapat perbedaan waktu kematian yang terjadi pada tikus kelompok LD₅₀ dan LD₁₀₀. Terdapat perbedaan bermakna antara jumlah residu brodifakum pada hepar tikus wistar pada dosis kontrol dan LD₅₀. Terdapat perbedaan bermakna antara jumlah residu brodifakum pada hepar tikus wistar pada dosis kontrol dan LD₁₀₀. Tidak ada perbedaan bermakna antara jumlah residu brodifakum pada hepar tikus wistar pada dosis LD₅₀ dan LD₁₀₀.

Saran

Perlu dilakukan penelitian serupa dengan dosis yang lebih bervariasi supaya hasil yang didapatkan lebih jelas, dengan jumlah sampel yang lebih banyak, dengan alat yang lebih canggih, salah satunya adalah menggunakan GC-MS (Gas Chromatography Mass Spectrofotometry) dan perlu dilakukan penelitian serupa dengan penanganan sampel yang lebih baik, contohnya dengan metode ekstraksi yang lebih baik. Selain itu, perlu juga dilakukan penelitian dengan perlakuan kronis.

DAFTAR PUSTAKA

1. J.R Dowding, E.C Murphy, C.R Veitch. Brodifacoum Residues in Target and Non-Target Species Following an Aerial Poisoning Operation on Motuihe Island, Hauraki Gulf, New Zealand. *New Zealand Journal of Ecology*. 1999: Vol.23(no.2):207-10.
2. Barlow AM, Gay AL, Park BK. Difenacoum (Neosorexsa) Poisoning. *British Medical Journal*. 1982: Vol.285: 541.
3. Bronstein AC, Spyker DA, Cantilena LR. 2010 Annual Report of the American Association of Poison Control Center National Poison Data System (NPDS):28th Annual Report. *Clinical Toxicology*. 2011:Vol.49: 910-41.
4. Elizabeth L., Joleigh Sutton, Ira Keith, Brian Qualls, Jon Zamber, Brian N.Walker. Prolonged Coagulopathy After Brodifacoum Exposure. *American Journal of Health-System Pharmacy*. 2014:Vol.71:639-42
5. C.T Eason, L. Milne, M. Potts, G. Morriss, G.R.G Wright, O.R.W Sutherland. Secondary and Tertiary Poisoning Risk Associated With Brodifacoum. *New Zealand Journal of Ecology*. 1999: Vol.23(no.2) 219-24.
6. Bert-ove Lund, Jose Luis Tadeo. Opinion of the Committe for Risk Assessment on a Dossier Proposing Harmonised Classification and Labeling at EU Level. *European Chemicals Agency*. 2014: 1-15
7. Kostova, Irena. Syntethic and Natural Coumarin as Cytotoxic Agents. *Current Medical Chemistry - Anti - Cancer Agents*. 2005:Vol. 5(no.1):29-46
8. Hoult J.R.S, Paya M., Pharmacological and Biochemical Actions of Simple Coumarins: Natural Product With Therapeutic Potential. *General Pharmacology: The Vascular System*. 1996:Vol.27(no.4):713-22
9. Jeffrey D., Sarah M., George P., Lois D.. Metabolic Detoxification Determines Species Differences in Coumarin-Induced Hepatotoxicity. *Toxicological Sciences*. 2004:Vol.80(no.2):249-57
10. Frequently Asked Question about Coumarin in Cinnamon and Other Foods. German : Bundesinstitut fur Risikobewerfung: 30 October 2006 (10 Februari 2015). Available from:
http://www.bfr.bund.de/en/frequently_asked_questions_about_coumarin_in_cinnamon_and_other_foods-8487.html
11. Chemical Sampling Information | Coumarin : United State of America: United State Department of Labor;(10 Februari 2015). Available From :
https://www.osha.gov/dts/chemicalsampling/data/CH_229620.html
12. Bye A., King H.K. The Biosynthesis of 4-hydroxycoumarin and Dicoumarol by *Aspergillus fumigatus* Fresenius. *Biochemical Journal*. 1970:Vol.117:237-45
13. Brodifacoum Health and Safety Guide. International Programme on Chemical Safety. Geneva:World Health Organization; 1995 (2014 ; 10 Februari 2015). Available from:
<http://www.inchem.org/documents/hsg/hsg/hsg093.htm>
14. Bromadiolon Health and Safety Guide. International Programme on Chemical Safety. Geneva:World Health Organization; 1995 (2014 ; 10 Februari 2015). Available from:
<http://www.inchem.org/documents/hsg/hsg/hsg094.htm>
15. Anticoagulant Rodenticide. International Programme on Chemical Safety. Geneva:World Health Organization; 1995 (2014 ; 10 Februari 2015). Available from :
<http://www.inchem.org/documents/ehc/ehc/ehc175.htm>

16. Difenacoum Health and Safety Guide. International Programme on Chemical Safety. Geneva:World Health Organization; 1995 (2014 ; 10 Februari 2015). Available from: <http://www.inchem.org/documents/hsg/hsg/hsg095.htm>
17. Warfarin Health and Safety Guide. International Programme on Chemical Safety. Geneva:World Health Organization; 1995 (2014 ; 10 Februari 2015). Available from: <http://www.inchem.org/documents/hsg/hsg/hsg096.htm>
18. Jeffrey N., James A., Barbara C.,Rebecca Moroose, Hugh Kim, Michael E., Michael J., Bruce Furie. Surreptitious Ingestion of a Long-Acting Vitamin K Antagonist/Rodenticide, Brodifacoum: Clinical and Metabolic Studies of Three Cases. *Bloodjournal*. 1990: 2555-559.
19. Valentina Olmos , Clara Magdalena. Brodifacoum Poisoning with Toxicokinetic Data. *Clinical Toxicology*. 2007:Vol.45:487-89
20. Watt B.E., Proudfoot A.T., Bradberry S.M., Vale J.A. Anticoagulant Rodenticides. *Toxicology Review*.2005:Vol.24(no.4):259-69
21. Cracium A.M, Groenen-van Dooren, Vermeer C. Induction of Prothrombin Syntesis by K-vitamins Compared in Vitamin-K deficient and in Brodifacoum Treated Rats. *Biochemistry Biophysiology*. 1998: Vol.1380(no.1):75-81
22. Jiri Patocka, Georg Petroianu, Kamil Kuca. Toxic Potential of Superwarfarin : Brodifacoum. *Military Medical Science Letters*. 20013:Vol.82:32-38
23. Moery S., Pontious J.M. Coagulopathy Associated with Superwarfarin Exposure. *Journal Oklahoma State Medical Association*. 2009: Vol.102(no.10):323-25
24. G. Richard, Mary Ann, Alex Mcmeeking, Robert S. Long-Acting Anticoagulant Overdose: Brodifacoum Kinetics and Optimal Vitamin K Dosing. *Annalytical Emergency Medicine*. 2000:Vol.36:262-67
25. Sentra Informasi Keracunan Nasional. Brodifakum. Pusat Informasi Obat dan Makanan, Badan Pom RI. Indonesia:Badan POM RI: 2012 (10 februari 2015) Available from: <http://ik.pom.go.id/v2014/katalog/BRODIFAKUM.pdf>
26. Alma M. Jose Bernal, Maria T., Constantion Camireno, Maria J. Analysis of Anticoagulant Rodenticide Residue in *Microtus arvalis* Tissue by Liquid Chromatography with Diode Array, Fluorescence and Mass Spectrometry Detection. *Journal of Chromatography B*. 2013:Vol.925: 76-85
27. Hardhono, Erie, Suryo, Ferdy. Situs Abdominis. *Laboratorium Anatomi Fakultas Kedokteran Universitas Diponegoro*. Semarang. 2011. 49-57
28. Gerber F., Krummen M., Potheter H., Roth A., Siffrin C., Spöndlin C. Practical Aspect of Fast Reversed-Phase High-Performance Liquid Chromatography Using 3µm Particle Packed Columns and Monolithic Columns in Pharmaceutical Development and Production Working Under Current Good Manufacturing Practice. *Journal of Chromatography A*. 2004:Vol.1036(no.2):12-33